

II

(Nem jogalkotási aktusok)

RENDELETEK

A BIZOTTSÁG 900/2014/EU RENDELETE

(2014. július 15.)

a vegyi anyagok regisztrálásáról, értékeléséről, engedélyezéséről és korlátozásáról (REACH) szóló 1907/2006/EK európai parlamenti és a tanácsi rendelet értelmében alkalmazandó vizsgálati módszerek megállapításáról szóló 440/2008/EK rendeletnek a műszaki fejlődéshez való hozzáigazítás céljából történő módosításáról

(EGT-vonatkozású szöveg)

AZ EURÓPAI BIZOTTSÁG,

tekintettel az Európai Unió működéséről szóló szerződésre,

tekintettel a vegyi anyagok regisztrálásáról, értékeléséről, engedélyezéséről és korlátozásáról (REACH), az Európai Vegyianyag-ügynökség létrehozásáról, az 1999/45/EK irányelv módosításáról, valamint a 793/93/EGK tanácsi rendelet, az 1488/94/EK bizottsági rendelet, a 76/769/EGK tanácsi irányelv, a 91/155/EGK, a 93/67/EGK, a 93/105/EK és a 2000/21/EK bizottsági irányelv hatályon kívül helyezéséről szóló, 2006. december 18-i 1907/2006/EK európai parlamenti és tanácsi rendeletre ⁽¹⁾ és különösen annak 13. cikke (2) bekezdésére,

mivel:

- (1) A 440/2008/EK bizottsági rendelet ⁽²⁾ megállapítja az 1907/2006/EK rendelettel összefüggésben alkalmazandó, a vegyi anyagok fizikai-kémiai tulajdonságainak, toxicitásának és ökotoxicitásának meghatározására szolgáló vizsgálati módszereket.
- (2) A 440/2008/EK rendeletet a műszaki fejlődés figyelembevételével és – a 2010/63/EU európai parlamenti és tanácsi irányelvvel ⁽³⁾ összhangban – a kísérleti célokra felhasznált állatok számának csökkentése érdekében naprakészé szükséges tenni oly módon, hogy a rendeletbe mielőbb bekerüljenek egyes, az OECD által a közelmúltban elfogadott új, illetve aktualizált vizsgálati módszerek. A Bizottság a tervezetről konzultált az érdekeltekkel.
- (3) Ez a műszaki fejlődéshez való hozzáigazítás hat új, a toxicitás és más egészségi hatások meghatározására szolgáló vizsgálati módszert tartalmaz: egy fejlődési neurotoxicitási vizsgálatot, egy kibővített egygenerációs reprodukciós toxicitási vizsgálatot, egy transzgenikus rágszálakon elvégezhető *in vivo* génmutációs vizsgálatot, egy, a szteroid-hormonok szintézisére kifejtett hatásokat értékelésre szolgáló *in vitro* vizsgálatot, valamint két, az ösztrogénszerű, illetve az (anti)androgén hatások kimutatására szolgáló *in vivo* módszert.
- (4) A 440/2008/EK rendeletet ezért megfelelően módosítani kell.
- (5) Az e rendeletben előírt intézkedések összhangban vannak az 1907/2006/EK rendelet 133. cikke alapján létrehozott bizottság véleményével,

⁽¹⁾ HLL 396., 2006.12.30., 1. o.

⁽²⁾ A Bizottság 2008. május 30-i 440/2008/EK rendelete a vegyi anyagok regisztrálásáról, értékeléséről, engedélyezéséről és korlátozásáról (REACH) szóló 1907/2006/EK európai parlamenti és a tanácsi rendelet értelmében alkalmazandó vizsgálati módszerek megállapításáról (HL L 142., 2008.5.31., 1. o.).

⁽³⁾ Az Európai Parlament és a Tanács 2010. szeptember 22-i 2010/63/EU irányelve a tudományos célokra felhasznált állatok védelméről (HL L 276., 2010.10.20., 33. o.).

ELFOGADTA EZT A RENDELETET:

1. cikk

A 440/2008/EK rendelet melléklete e rendelet mellékletének megfelelően módosul.

2. cikk

Ez a rendelet az *Európai Unió Hivatalos Lapjában* való kihirdetését követő harmadik napon lép hatályba.

Ez a rendelet teljes egészében kötelező és közvetlenül alkalmazandó valamennyi tagállamban.

Kelt Brüsszelben, 2014. július 15-én.

a Bizottság részéről
az elnök
José Manuel BARROSO

MELLÉKLET

A 440/2008/EK rendelet melléklete a következőképpen módosul:

A melléklet a következő B.53., B.54., B.55., B.56., B.57. és B.58. fejezettel egészül ki:

„B.53. FEJLŐDÉSI NEUROTOXICITÁSI VIZSGÁLAT

BEVEZETÉS

1. Ez a vizsgálati módszer egyenértékű az OECD 426. vizsgálati iránymutatásában (2007) leírt módszerrel. Az OECD szaporodási és fejlődési toxicitási munkacsoportja 1995 júniusában, Koppenhágában megvitatta, hogy frissíteni kell a reprodukciós és fejlődési toxicitásra vonatkozó, meglévő OECD vizsgálati iránymutatásokat, és új iránymutatásokat kell kidolgozni a még le nem fedett végpontokra (1). A munkacsoport azt javasolta, hogy a fejlődési neurotoxicitásra vonatkozó vizsgálati iránymutatást az amerikai EPA útmutató alapján kell összeállítani, amelyet azóta módosítottak (2). 1996 júniusában egy második konzultációs találkozót tartottak Koppenhágában, hogy útmutatót adjanak a Titkarság számára a fejlődési neurotoxicitásra vonatkozó új vizsgálati iránymutatás vázlatának összeállításához, beleértve a főbb elemekre, például az állatfaj kiválasztására, az adagolási időszakra, a tesztelési időszakra, a megvizsgálendő végpontokra, és az eredmények értékelésének kritériumaira vonatkozó részleteket. Az amerikai neurotoxicitási kockázateértékelési irányelv 1998-ban jelent meg (3). 2000 októberében egymás után egy OECD szakértői konzultációs értekezletet és egy ILSI Risk Science Institute workshopot, valamint 2005-ben Tokióban egy szakértői konzultációs találkozót tartottak. Ezeket a találkozókot abból a célból tartották, hogy megvitassák a jelenlegi vizsgálati iránymutatással kapcsolatos tudományos és technikai kérdéseket, és az üléseken (4) (5) (6) (7) hozott javaslatokat figyelembe vették a vizsgálati módszer kifejlesztése során. A vizsgálati módszer végrehajtására, értelmezésére és a használt terminológiára vonatkozó további információk megtalálhatók a reprodukciós toxicitási vizsgálatokról és értékelésükről szóló 43. számú (8) és a neurotoxicitási vizsgálatokról szóló 20. számú (9) OECD irányelvben.

KIINDULÁSI MEGFONTOLÁSOK

2. Számos vegyi anyagról ismert, hogy fejlődési neurotoxikus hatást fejt ki emberben és más fajokban (10) (11) (12) (13). A vegyi anyag toxikus tulajdonságainak felmérése és értékelése céljából a potenciális fejlődési neurotoxicitás meghatározására lehet szükség. A fejlődési neurotoxicitási vizsgálatok célja, hogy adatokat – beleértve a dózis-válasz jellemzést – szolgáltatassanak az utódok fejlődő idegrendszerére gyakorolt potenciális funkcionális és morfológiai hatásokról, amelyek a méhen belüli és a korai életszakaszban történt expozíció következtében esetlegesen felmerülhetnek.
3. A fejlődési neurotoxicitási vizsgálatot el lehet végezni külön vizsgálatként, be lehet építeni a reprodukciós toxicitási és/vagy felnőtt neurotoxicitási vizsgálatba (pl. B.34. (14), B.35. (15), B.43. (16) vizsgálati módszerek), vagy ki lehet vele egészíteni a prenatális fejlődési toxicitási vizsgálatot (pl. B.31 (17) vizsgálati módszer). Amikor a fejlődési neurotoxicitási vizsgálat be van építve vagy hozzá van kapcsolva egy másik vizsgálatához, elengedhetetlen mindkét vizsgálati típus integritásának megőrzése. A vizsgálatok során meg kell felelni a laboratóriumi állatok kutatásokban történő használatára vonatkozó jogszabályoknak, illetve kormányzati és intézményi iránymutatásoknak (pl. 18).
4. A vizsgáló laboratóriumnak a vizsgálat elvégzése előtt a vizsgált vegyi anyaggal kapcsolatos minden rendelkezésre álló információt figyelembe kell vennie. Ilyen információk a vegyi anyag megjelölése és szerkezete; fizikai-kémiai tulajdonságai; bármely más, a vegyi anyaggal elvégzett *in vitro* vagy *in vivo* toxicitási vizsgálatok eredményei; szerkezeti rokon vegyi anyagok toxikológiai adatai és a vegyi anyag várható alkalmazása(i). Ezekre az információkra azért van szükség, hogy minden érintett meggyőződjön arról, hogy a vizsgálat releváns az emberi egészség védelme szempontjából, és elősegíti majd a megfelelő kezdődózis kiválasztását.

A VIZSGÁLAT ELVE

5. A vizsgált vegyi anyagot vemhesség és szoptatás alatt adjuk be az állatoknak. Az anyaállatokat a vemhes és szoptató nőstényekre gyakorolt hatások értékelése céljából teszteljük, illetve az anyaállatok összehasonlító információval is szolgálhatnak (az anyaállatok összehasonlítása az utódokkal). Az utódokat a neurotoxicitási értékeléshez véletlenszerűen választjuk ki az almokból. Az értékelés egyrészt a súlyos neurológiai és viselkedési rendellenességek észlelését célzó megfigyelésekből áll, beleértve a fizikai fejlődés, a viselkedési egyedfejlődés, a motoros aktivitás, a motoros és szenzoros funkció, másrészt a tanulás és a memória értékelését, valamint az agytömeg és a neuropatológia posztnatális fejlődés és felnőttkor során történő értékeléséből.

6. Amikor a vizsgálati módszert külön vizsgálatként hajtjuk végre, a csoportokban rendelkezésre álló további állatokat fel lehet használni meghatározott idegrendszeri, neuropatológiai, neurokémiai vagy elektrofiziológiai eljárásokhoz, amelyek kiegészíthetik a vizsgálati módszer által ajánlott vizsgálatokból kapott adatokat (16) (19) (20) (21). A kiegészítő eljárások különösen akkor lehetnek hasznosak, ha az empirikus megfigyelés, a várható hatások, illetve a hatásmechanizmus egy bizonyos típusú neurotoxicitásra utalnak. Ezeket a kiegészítő eljárásokat az anyaállatokban és az utódokban egyaránt használni lehet. Ezen kívül *ex vivo* vagy *in vitro* eljárások is használhatók, mindaddig, amíg ezek az eljárások nem változtatják meg az *in vivo* eljárások integritását.

ELŐKÉSZÜLET A VIZSGÁLATHOZ

Az állatfaj kiválasztása

7. Az elsődleges vizsgálandó faj a patkány, de más faj is használható, ha megfelelő. Megjegyzendő azonban, hogy a vizsgálati módszerben meghatározott vemhességi és posztnatális napok az általánosan használt patkánytörzsekre vonatkoznak, és összehasonlítható időtartamokat kell választani, ha másik állatfajt vagy szokatlan törzset használunk. Más állatfaj használatát toxikológiai, farmakokinetikai és/vagy más adatokkal kell megindokolni. Az indoklásnak tartalmaznia kell a rendelkezésre álló fajspecifikus posztnatális idegrendszeri és neuropatológiai értékeléseket. Ha volt olyan korábbi vizsgálat, amely aggodalomra adott okot, meg kell fontolni az abban alkalmazott faj/törzs használatát. Mivel a különböző patkánytörzsek teljesítőképessége eltérő, bizonyítani kell, hogy a használatra kiválasztott törzs megfelelő termékenységgel és válaszképességgel rendelkezik. Az egyéb fajoknak a fejlődési neurotoxicitás kimutatásával kapcsolatos megbízhatóságát és érzékenységét dokumentumokkal kell alátámasztani.

Tartási és etetési körülmények

8. A kísérleti állatokat 22 ± 3 °C hőmérsékletű helyiségben kell tartani. Bár a helyiség relatív páratartalmának legalább 30 %-nak kell lennie, illetve a takarítás időtartamától eltekintve lehetőleg ne haladja meg a 70 %-ot, a célértéknek 50 és 60 % között kell lennie. A világítás legyen mesterséges, 12 órás világos és 12 órás sötét periódusok váltsák egymást. A párzás előtt és a vizsgálat időtartama alatt meg lehet fordítani a fényciklust annak érdekében, hogy a funkcionális és viselkedési végpontok értékelését a sötét periódus alatt lehessen elvégezni (piros fény alatt), vagyis abban az időszakban, amikor az állatok rendszerint aktívak (22). A világos-sötét ciklus bármilyen megváltoztatásának magában kell foglalnia egy megfelelő akklimatizációs időt ahhoz, hogy az állatok alkalmazkodjanak az új ciklushoz. Az etetéshez hagyományos laboratóriumi takarmány alkalmazható, korlátlan mennyiségű ivóvíz biztosítása mellett. A takarmány és a víz típusát fel kell jegyezni, és mindkettőt meg kell vizsgálni szennyező anyagokra.
9. Az állatok egyedileg vagy azonos ivarú egyedekből álló kisebb csoportokban is tarthatók. A pároztatást erre a célra alkalmas ketrecekben kell végezni. Miután meggyőződtek a párzás megtörténtéről, vagy a vemhesség 15. napjánál nem később a pároztatott nőstényeket egyedileg kell elhelyezni ellető vagy fialtató ketrecekben. A ketreceket úgy kell elrendezni, hogy minimálisra lehessen csökkenteni a ketrec elhelyezésének lehetséges hatásait. Az ellés közeledtével a pároztatott nőstények számára megfelelő és meghatározott fészekrakó anyagot kell biztosítani. Jól ismert, hogy a vemhesség során a nem megfelelő bánásmód vagy a stressz nem kívánatos kimenetelkekhez vezethet, ideértve a prenatális veszteségeket és a megváltozott magzati és posztnatális fejlődést. A kezeléssel nem összefüggő tényezők miatti magzati veszteség kivédése érdekében az állatokkal óvatosan kell bánni a vemhesség alatt, valamint kerülni kell a külső tényezők, így például a túlzott külső zaj miatti stresszt.

Az állatok előkészítése

10. A laboratóriumi körülményekhez hozzászoktatott, korábban vizsgálatban még részt nem vett, egészséges állatokat kell használni, kivéve, ha a vizsgálatot beépítjük egy másik vizsgálatba (lásd a 3. bekezdést). A kísérleti állatokat faj, törzs, eredet, nem, testtömeg és életkor szerint kell jellemezni. Minden állatot egyedi azonosító számmal kell ellátni. Amennyire csak megoldható, az állatok az összes vizsgálati csoportban legyenek azonos testtömegűek és korúak, illetve a vizsgálatban részt vevő fajra és törzsre jellemző normál tartományba essenek. Minden dózishoz még egyszer sem ellető, fiatal felnőtt nőstényeket kell használni. Gondosan ügyelni kell arra, hogy testvéreket nem szabad pároztatni. A vemhesség 0. napja az, amikor hüvelydugó és/vagy sperma észlelhető. Megfelelő akklimatizációs időt (pl. 2–3 nap) kell biztosítani, ha meghatározott ideje vemhes állatokat vásárolnak a szállítótól. A pároztatott nőstényeket megkülönböztetés nélkül kell a kontroll- és a kezelési csoportokba beosztani, és a lehetőségekhez mérten egyenletesen kell elosztani a csoportok között (pl. ajánlott a rétegzett random eljárás, amely egyenletes eloszlást biztosít a csoportok között, például a testtömeg alapján). Az azonos hímekkel pároztatott nőstényeket egyenletesen kell szétosztani a különböző csoportokban.

ELJÁRÁS

Az állatok száma és neme

11. Minden kísérleti és kontrollcsoportnak elegendő számú vemhes, a vizsgált vegyi anyaggal kezelendő nőtényt kell tartalmaznia, hogy megfelelő számú utódot termeljenek a neurotoxicitási értékeléshez. Összesen 20 alom használata ajánlott minden dózisszinthez. A párhuzamos és lépcsőzetes csoport adagolási tervek akkor használhatók, ha a csoportonkénti teljes alomszámot elértük, és megfelelő statisztikai modelleket alkalmazunk az ismétlések elszámolására.
12. A 4. posztnatális napon (PND) vagy azt megelőzően (az ellés napja a PND 0) minden alom méretét ki kell igazítani az extra kölykök véletlenszerű kiválasztás útján történő kiküszöbölésével, és egységes alomméretet kell kialakítani minden alomban (23). Az alom mérete nem haladhatja meg a használt rágcsálótörzsrre jellemző átlagos alomméretet (8–12). Az alomnak a lehetőségekhez mérten azonos számú hím és nőtény kölyökből kell állniuk. A kölykök szelektív eltávolítása, pl. a testtömeg alapján, nem elfogadható. Az almok standardizálása (selejtezés) után és a funkcionális végpontok vizsgálatát megelőzően az elválasztás előtti vagy elválasztás utáni vizsgálatra szánt kölyköket egyedi azonosítóval kell ellátni a kölykök azonosítására alkalmas bármely humánus módszer használatával (pl. 24).

Az állatok besorolása a funkcionális és viselkedési tesztekbe, az agytömeg mérésébe és a neuropatológiai értékelésekbe

13. A vizsgálati módszer különböző megközelítéseket tesz lehetővé az *in utero* és a szoptatás útján kezelt állatoknak a funkcionális és viselkedési tesztekhez, a szexuális éréshöz, az agytömeg meghatározásához és a neuropatológiai értékeléshez való hozzárendelése tekintetében (25). Egyéb, az idegrendszeri funkciót (pl. szociális viselkedés) értékelő, illetve neurokémiai vagy neuropatológiai vizsgálatokat lehet hozzáadni eseti elbírálás alapján, amíg ezek az eredetileg előírt vizsgálatok integritását nem veszélyeztetik.
14. Minden egyes dóziscsoportból kölyköket kell kiválasztani és hozzárendelni a 4. posztnatális napon (PND 4) vagy azt követően elvégzendő végpont-értékelésekhez. A kölykök kiválasztását úgy kell elvégezni, hogy minden alomból mindkét nem minden adagolási csoportban lehetőleg egyenlő arányban képviselve legyen az összes testben. A motoros aktivitás vizsgálata során ugyanazokat a hím és nőtény kölyköpárokat kell megvizsgálni az elválasztást megelőző minden életkorban (lásd a 35. bekezdést). Az egyéb vizsgálatok során azonos vagy különböző hím és nőtény párokat lehet hozzárendelni a különböző viselkedési tesztekhez. Különböző kölykök hozzárendelése lehet szükséges az elválasztott kölykök és a felnőtt egyedek kognitív funkciójának vizsgálataihoz annak érdekében, hogy kiküszöbölhető legyen az életkor és a korábbi képzés zavaró hatása ezekre a mérésekre (26) (27). Az elválasztáskor (PND 21) a vizsgálatra ki nem választott kölykök humánus módon eltávolíthatók. A kölykök elosztásának minden módosítását fel kell jegyezni. A statisztikai mértékegység az alom (vagy az anyaállat) és nem a kölyök.
15. A kölykök különböző módokon sorolhatók be az elválasztás előtti és elválasztás utáni vizsgálatokba, a kognitív tesztekbe, a patológiai vizsgálatokba, stb. (lásd az 1. ábrát az általános elrendezéssel és az 1. függelékkel a besorolási példákkal). Az állatok javasolt minimális száma az elválasztás előtti és elválasztás utáni vizsgálatok egyes dóziscsoportjaiban a következő:

Klinikai megfigyelések és testtömeg	Minden állat
Részletes klinikai megfigyelések	20/nem (1/nem/alom)
Agytömeg (fixálás után) PND 11-22	10/nem (1/alom)
Agytömeg (fixálatlan) ~ PND 70	10/nem (1/alom)
Neuropatológia (immerziós vagy perfúziós fixálás) PND 11-22.	10/nem (1/alom)
Neuropatológia (perfúziós fixálás) PND ~70.	10/nem (1/alom)

Nemi érés	20/nem (1/nem/alom)
Egyéb fejlődési tájékoztató pontok (választható)	Minden állat
Viselkedési egyedfejlődés	20/nem (1/nem/alom)
Motoros aktivitás	20/nem (1/nem/alom)
Motoros és szenzoros funkció	20/nem (1/nem/alom)
Tanulás és memória	10/nem ^(a) (1/alom)

(^a) A kognitív funkció vizsgálatok érzékenységtől függően meg kell fontolni nagyobb számú állat vizsgálatát, pl. 1 hím és 1 nőstény állat vizsgálatát almonként (az állatok hozzárendelésével kapcsolatban lásd az 1. függelék) (a minta méretével kapcsolatos további útmutatás az OECD 43. iránymutatásában található).

Adagolás

16. Legalább három dózisszintet és egy párhuzamos kontrollt kell alkalmazni. A dózisszinteket úgy kell megválasztani, hogy biztosítsák a kiváltott toxikus hatások fokozatosságát. Hacsak a vegyi anyag fizikai-kémiai jellege vagy biológiai tulajdonságai nem szabnak ennek határt, a legmagasabb adagolási szintet úgy kell megválasztani, hogy némi anyai toxicitást is kiváltson (pl. klinikai tünetek, csökkent testtömegnövekedés (legfeljebb 10 %) és/vagy dózis-korlátozó toxicitásra utaló bizonyíték a célszervben). A magas dózist 1 000 mg/ttkg/nap értékre lehet korlátozni, néhány kivételtől eltekintve. Például a várható humán expozíció magasabb dózis alkalmazását teheti szükségessé. Alternatívaként előzetes vizsgálatokat vagy előzetes dózisbehatároló vizsgálatokat kell végezni, hogy meghatározzuk az alkalmazandó legmagasabb dózist, amelynek minimális fokú anyai toxicitást is ki kell váltania. Ha a vizsgált vegyi anyagról standard fejlődési toxicitási vizsgálatban vagy előzetes vizsgálatban kimutatták, hogy fejlődési toxicitást okoz, legmagasabb dózisként azt a maximális dózist kell választani, amely az utódokban nem vált ki túlzott toxicitást, *in utero* vagy neonatális elhullást, illetve fejlődési rendellenességeket, mivel ezek kizárják a neurotoxicitás értelmezhető értékelését. A legalacsonyabb dózist úgy kell megválasztani, hogy semmilyen anyai vagy fejlődési toxicitásra utaló tünetet ne okozzon, ideértve a neurotoxicitást is. Fokozatosan csökkenő dózisszinteket kell választani azzal a céllal, hogy demonstrálni lehessen a dózisfüggő hatásokat és a megfigyelhető káros hatást nem okozó szintet (NOAEL), illetve a kimutatási határ közelében lévő dózisokat, amelyek lehetővé teszik a benchmark dózis meghatározását. A csökkenő dózisszintek meghatározásához gyakran optimális a 2–4-szeres intervallumok alkalmazása, a dózisok közötti nagyon nagy intervallumok (pl. 10-nél magasabb szorzófaktor) alkalmazása esetén pedig gyakran előnyös egy negyedik dóziscsoport beiktatása is.
17. A dózisszintek megválasztásakor figyelembe kell venni mind a rendelkezésre álló összes toxicitási adatot, mind a vizsgált vegyi anyag vagy a rokon anyagok metabolizmusával vagy toxikokinetikájával kapcsolatos további információkat. Ezek az információk segíthetik az adagolási rend megfelelőségének igazolását is. A kölyköknek történő közvetlen adagolást az expozíció és farmakokinetikai információk alapján kell mérlegelni (28) (29). A közvetlen adagolások vizsgálatok előtt gondosan mérlegelni kell az előnyöket és a hátrányokat (30).
18. A kísérő kontrollcsoport egy placebóval kezelt kontrollcsoport, vagy ha a vizsgált vegyi anyag beadásához vivőanyagot használnak, akkor egy vivőanyaggal kezelt kontrollcsoport. Minden állatnak ugyanolyan térfogatú vizsgált vegyi anyagot vagy vivőanyagot kell beadni a testtömeg alapján. Ha a beadás megkönnyítése érdekében vivőanyagot vagy más adalékot alkalmazunk, a következő jellemzőket kell figyelembe venni: a vizsgált vegyi anyag felszívódására, eloszlására, metabolizmusára vagy visszatartására gyakorolt hatások; a vizsgált vegyi anyag kémiai tulajdonságaira gyakorolt hatások, amelyek megváltoztathatják annak toxikus jellemzőit; valamint az állatok táplálék- és vízfogyasztására vagy tápláltsági állapotára gyakorolt hatások. A vivőanyag nem okozhat olyan hatásokat, amelyek zavarhatják a vizsgálat értelmezését, nem okozhat idegrendszeri toxicitást, és nem lehet hatással a reprodukcióra vagy a fejlődésre. Újfajta vivőanyagok esetében a vivőanyaggal kezelt kontrollcsoporton felül egy placebóval kezelt kontrollcsoportot is be kell iktatni. A kontrollcsoport(ok)ba tartozó állatokat ugyanolyan módon kell kezelni, mint a vizsgálati csoportokban lévőket.

A dózisok beadása

19. A vizsgált vegyi anyagot és a vivőanyagot olyan úton kell beadni, amely a leginkább megközelíti a lehetséges emberi expozíciót, valamint amely a kísérleti állatok vonatkozásában rendelkezésre álló anyagcsere és eloszlási információkon alapul. A beadás általában szájon át történik (pl. gyomorszonda, táplálék, ivóvíz), de egyéb módok (pl. bőr, inhaláció) is használhatók az anyag jellegétől és a várható vagy ismert emberi expozíciós utaktól függően (további útmutatás a 43. iránymutatásban található (8)). A választott beadási módra vonatkozó döntést indokolni kell. A vizsgált vegyi anyagot minden nap körülbelül ugyanabban az időpontban kell beadni.
20. Az egyes állatoknak beadandó dózist általában a legutóbbi testtömegmérés eredménye alapján kell meghatározni. A vemhesség utolsó harmadában azonban óvatosan kell eljárni a dózis beállításakor. Ha túlzott toxicitást észlelünk a kezelt anyaállatokban, akkor azokat humánus módon exterminálni kell.
21. A vizsgált vegyi anyagot vagy vivőanyagot minimálisan naponta kell beadni a pároztatott nőstényeknek az implantáció időpontjától (GD 6) kezdve a szoptatás egész időtartama alatt (PND 21) annak érdekében, hogy a kölyköket kitegyék a vizsgált vegyi anyagnak a pre- és posztnatális idegrendszeri fejlődés időszaka alatt. Azt az életkort, amikor az adagolás megkezdődik, illetve az adagolás időtartamát és gyakoriságát módosítani lehet, ha a bizonyítékok egy olyan kísérleti elrendezést támasztanak alá, amely relevánsabb az emberi expozíció szempontjából. Az adagolási időtartamokat hozzá kell igazítani az egyéb állatfajokhoz, hogy biztosítani lehessen az expozíciót az agy fejlődésének minden korai időszakában (ami egyenértékű az emberi agy prenatális és korai posztnatális növekedésével). Az adagolás indulhat a vemhesség kezdetétől (GD 0), habár figyelembe kell venni, hogy a vizsgált vegyi anyag preimplantációs veszteséget okozhat. Az adagolásnak a vemhesség 6. napján (GD 6) történő megkezdésével elkerülhető ez a kockázat, ebben az esetben azonban a 0. és 6. GD közötti fejlődési szakaszok kezelése elmarad. Ha a laboratórium külső forrásból adott időben pároztatott állatokat vásárol, akkor az adagolás megkezdése nem kivitelezhető a pároztatás napján (GD 0), és így a GD 6 jó kezdőnap lehet. A vizsgáló laboratóriumnak az adagolási rendet a vizsgált vegyi anyag hatásaira vonatkozó lényeges információk, a korábbi tapasztalatok és a logisztikai szempontok alapján kell megállapítania; ez magában foglalhatja az adagolásnak az elválasztás utáni időszakra történő kiterjesztését is. Nem kezelhetők az ellés napján azok az állatok, amelyek még nem teljesen ellették meg az utódaikat. Általában azt feltételezzük, hogy a kölykök expozíciója az anyatej útján fog megtörténni; meg kell azonban fontolni a kölykök közvetlen kezelését is azokban az esetekben, ahol hiányoznak az utódok folyamatos expozícióját alátámasztó bizonyítékok. Folyamatos expozícióra utaló bizonyítékok nyerhetők pl. a farmakokinetikai információkból, az utódokban jelentkező toxicitásból vagy a biomarkerek változásából (28).

MEGFIGYELÉSEK

Az anyaállatok megfigyelése

22. Az anyaállatok egészségi állapotát legalább naponta egyszer gondosan meg kell figyelni, ideértve a megbetegedéseket és elhullásokat.
23. A kezelési és megfigyelési időszak során rendszeresen részletesebb klinikai megfigyeléseket is végezni kell (legalább kétszer a vemhességi adagolási időszak alatt és kétszer a laktációs adagolási periódus alatt), dózisszintenként legalább tíz anyaállatban. Az állatokat az otthonul szolgáló ketrecen kívül olyan képzett technikusnak kell megfigyelnie, aki nincs tisztában az állatok kezelésének részleteivel és standardizált eljárásokat alkalmaz annak érdekében, hogy az állatokat erő stresszt és a megfigyelő elfoglaltságát minimalizálni, a megfigyelők közti megbízhatóságot pedig maximalizálni lehessen. Ahol lehetséges, célszerű, hogy egy adott vizsgálat megfigyeléseit ugyanaz a technikus végezze.
24. A megfigyelt tüneteket fel kell jegyezni. Ha megoldható, a megfigyelt tünetek erősségét is fel kell jegyezni. A klinikai megfigyelések többek között a bőr, a szőrzet, a szemek, a nyálkahártyák változásaira, szekrétrumok és autonóm aktivitás megjelenésére (pl. könnyezés, szörmeredezés, pupillaméret, szokatlan légzési mintázat és/vagy szájon át történő légzés, szokatlan vizezés vagy székletürítés) irányuljanak.
25. Rögzíteni kell továbbá a testhelyzettel, aktivitási szinttel (pl. a standard terület csökkent vagy fokozott felderítése) és a mozgáskoordinációval kapcsolatos összes szokatlan választ is. A járás (pl. kacsázás, ataxia), a testtartás (pl. púpos tartás) és a megfogásra, elhelyezésre vagy más környezeti ingerekre adott reakció megváltozását, valamint a rángós vagy görcsös mozgásokat, görcsös vonaglásokat, remegéseket, sztereotípiákat (pl. túlzott tisztálkodást, szokatlan fejmozgásokat, ismétlődő körbejárást), bizzar viselkedést (pl. harapást vagy túlzott nyalogatást, öncsonkítást, hátrafelé menést, hangadást) vagy agressziót is fel kell jegyezni.

26. A toxicitás tüneteit gondosan fel kell jegyezni, beleértve kialakulásuk napját és időpontját, a súlyosságot és az időtartamot.
27. Az állatokat a vizsgálat időtartama alatt legalább hetente egyszer meg kell mérni az adagoláskor, illetve az ellés napján vagy annak környékén, valamint a 21. posztnatális napon (PND 21) is (elválasztás). A gyomorszondával végzett vizsgálatok esetében az anyaállatokat legalább hetente kétszer kell megmérni. A dózist szükség esetén minden egyes testtömeg-meghatározás alkalmával be kell állítani. A táplálékfogyasztást legalább hetente kell mérni a vemhesség és a szoptatás alatt. A vízfogyasztást is legalább hetente kell mérni, ha az expozíció a vízellátáson keresztül történik.

Az utódok megfigyelése

28. Minden utódot legalább naponta gondosan meg kell figyelni a toxikus hatások, valamint a morbiditás és mortalitás észlelése céljából.
29. A kezelési és megfigyelési időszak során részletesebb klinikai megfigyeléseket is végezni kell az utódokon. Az utódokat (nemenként és almonként legalább 1 kölyköt) képzett technikusként kell megvizsgálni, aki nincs tisztában az állatok kezelésével és standardizált eljárásokat alkalmaz annak érdekében, hogy a megfigyelő elfogultságát minimalizálni, a megfigyelők közti megbízhatóságot pedig maximalizálni lehessen. Ahol lehetséges, célszerű, hogy a megfigyeléseket ugyanaz a technikus végezze. A megfigyelt fejlődési fázisnak megfelelően legalább a 24. és 25. bekezdésben leírt végpontokat ellenőrizni kell.
30. A toxicitás utódokban jelentkező minden tünetét gondosan fel kell jegyezni, beleértve a kialakulás napját és időpontját, a súlyosságot és az időtartamot.

Testi és fejlődési tájékoztató pontok

31. Az elválasztás előtti fejlődési tájékoztató pontok (pl. fülkagyló kitarulása, szem kinyílása, metszőfog előtörése) erősen korrelálnak a testtömeggel (30) (31). A testi fejlődés legjobb mutatója a testtömeg lehet. A fejlődési tájékoztató pontok mérése ezért csak akkor ajánlott, ha van korábbi bizonyíték arra, hogy ezek a végpontok további információkat nyújtanak. A fenti paraméterek értékelésének időzítése az 1. táblázatban látható. A várható hatásoktól és a kezdeti mérések eredményeitől függően tanácsos lehet további időpontokat hozzáadni, vagy a méréseket más fejlődési szakaszokban elvégezni.
32. A testi fejlődés értékelésekor célszerű a posztnatális életkor helyett a posztkoitális életkort használni (33). Ha a kölyköket az elválasztás napján vizsgáljuk, akkor ajánlott ezt a vizsgálatot a tényleges elválasztás előtt elvégezni, hogy kiküszöbölhető legyen az elválasztással járó stressz zavaró hatása. Ezenkívül a kölykök elválasztás utáni vizsgálatára nem kerülhet sor az elválasztást követő két napban.

1. táblázat

A testi és fejlődési tájékoztató pontok és a funkcionális/viselkedési végpontok értékelésének ütemezése^(a)

Végpontok	Életkori szakaszok	Elválasztás előtt ^(b)	Serdülőkor ^(b)	Fiatal ivarérett egyedek ^(b)
-----------	--------------------	----------------------------------	---------------------------	---

Testi és fejlődési tájékoztató pontok

Testtömeg és klinikai megfigyelések	hetente ^(c)	legalább minden két hétben	legalább minden két hétben
Agytömeg	PND 22 ^(d)		befejezéskor
Neuropatológia	PND 22 ^(d)		befejezéskor
Nemi érés	—	szükség szerint	—
Egyéb fejlődési tájékoztató pontok ^(e)	szükség szerint	—	—

Végpontok	Életkori szakaszok	Elválasztás előtt ^(b)	Serdülőkor ^(b)	Fiatal ivarérett egyedek ^(b)
-----------	--------------------	----------------------------------	---------------------------	---

Funkcionális/viselkedési végpontok

Viselkedési egyedfejlődés	legalább két mérés		
Motoros aktivitás (beleértve a habituációt)	1-3 alkalommal ^(f)	—	egyszer
Motoros és szenzoros funkció	—	egyszer	egyszer
Tanulás és memória	—	egyszer	egyszer

^(a) Ez a táblázat azt a minimális számú alkalmat adja meg, amikor méréseket kell végezni. A várható hatásoktól és a kezdeti mérések eredményeitől függően tanácsos lehet további időpontokat hozzáadni (pl. idős állatok), vagy a méréseket más fejlődési szakaszokban elvégezni.

^(b) A kölykök vizsgálata az elválasztás utáni két napban nem javasolt (lásd a 32. bekezdést). A serdülő állatok tesztelésére ajánlott életkorok: tanulás és memória = PND 25 ± 2; motoros és szenzoros funkció = PND 25 ± 2. A fiatal ivarérett egyedek tesztelésére ajánlott életkor PND 60-70.

^(c) A testtömegeket legalább hetente kétszer kell mérni, amikor a gyors testtömeg-gyarapodás időszakában a kölykök közvetlen adagolást kapnak a dózis beállítása céljából.

^(d) Az agytömegeket és a neuropatológiai elváltozásokat adott esetben egy korábbi időpontban is lehet értékelni (pl. PND 11) (lásd a 39. bekezdést).

^(e) A testtömeg mellett egyéb fejlődési tájékoztató pontokat is rögzíteni kell (pl. szem kinyílása), ha szükséges (lásd a 31. bekezdést).

^(f) Lásd a 35. bekezdést.

33. Az élő kölyköket meg kell számolni és a nemüket meg kell állapítani pl. vizuális vizsgálattal vagy az anogenitális távolság mérésével (34) (35), illetve az alomban lévő valamennyi kölyköt egyenként meg kell mérni a születéskor vagy nem sokkal azt követően, valamint legalább hetente egyszer a szoptatási időszak alatt, és azt követően legalább kéthetente egyszer. A szexuális érés értékelése céljából a hüvelykinyílás (36) vagy fitymaelválás (37) jelentkezésekor almonként legalább egy hím és egy nőstény korát és testtömegét meg kell határozni.

Viselkedési egyedfejlődés

34. A kiválasztott viselkedések egyedfejlődését a megfelelő életkorban, almonként és ivaronként legalább egy kölykőn kell mérni, ugyanazokat a kölyköket használva valamennyi vizsgálati napon az összes értékelte viselkedés vizsgálatára. A mérési napokat egyenletesen kell elosztani ebben az időszakban, hogy meghatározható legyen az adott magatartás egyedfejlődésének normál vagy a kezeléssel összefüggő változása (38). Néhány példa azokra a viselkedésekre, amelyek egyedfejlődését értékelni lehet: felegyenesedési reflex, negatív geotaxis és motoros aktivitás (38) (39) (40).

Motoros aktivitás

35. A motoros aktivitást (41) (42) (43) (44) (45) az elválasztás előtti időszakban és felnőtt korban egyaránt monitorozni kell. Az elválasztás idején történő vizsgálat tekintetében lásd a 32. bekezdést. A vizsgálatnak elegendő ideig kell tartania ahhoz, hogy demonstrálni lehessen a tesztmenet alatti habituációt a nem kezelt kontrollok esetében. Erősen ajánlott a motoros aktivitás használata a viselkedési egyedfejlődés értékelésére. Ha a viselkedési egyedfejlődés vizsgálatára használjuk, akkor a vizsgálathoz ugyanazokat az állatokat kell használni minden elválasztás előtti tesztmenet esetén. A vizsgálatnak elég gyakorinak kell lennie ahhoz, hogy értékelni lehessen a tesztmenet alatti habituáció egyedfejlődését (44). Ehhez három vagy több időpontra lehet szükség az elválasztást megelőzően, az elválasztás napját is beleértve (pl. PND 13, 17, 21). Ugyanezen állatok vagy alomtársaik vizsgálatára felnőtt korban is sort kell keríteni, a vizsgálat befejezésének időpontja környékén (pl. PND 60-70). Vizsgálatot további napokon is lehet végezni, amennyiben szükséges. A motoros aktivitást olyan automatizált aktivitásrögzítő készülékkel kell monitorozni, amely egyaránt képes észlelni az aktivitás növekedését és csökkenését (vagyis a kiindulási aktivitás az eszközzel mérve ne legyen olyan alacsony, hogy kizárja az aktivitás csökkenésének kimutatását, és ne legyen olyan magas, hogy kizárja az aktivitás növekedésének kimutatását). Minden eszközt olyan standard eljárásokkal kell bevizsgálni, amelyek a lehető legnagyobb mértékben garantálják a különböző eszközök folyamatos és

megbízható működését. A kezelési csoportokat a lehetséges mértékben kiegyensúlyozottan kell szétosztani a készülékek között. Minden állatot egyedileg kell megvizsgálni. A kezelési csoportokat ellensúlyozni kell a vizsgálati időpontok között, hogy kiküszöbölhető legyen az aktivitás cirkadián ritmusának zavaró hatása. Törekedni kell arra, hogy minimálisak legyenek a kísérleti körülmények közötti eltérések és ne legyenek szisztematikus összefüggésben a kezeléssel. Változók, amelyek hatással lehetnek a viselkedés számos mutatójára, beleértve a motoros aktivitást is: zajszint, a vizsgálati ketrec mérete és alakja, hőmérséklet, relatív páratartalom, fényviszonyok, szagok, az otthoni ketrec vagy új vizsgálati ketrec használata és zavaró környezeti tényezők.

Motoros és szenzoros funkció

36. A motoros és szenzoros funkciót legalább egyszer részletesen meg kell vizsgálni a serdülő időszakban és egyszer a fiatal felnőtt időszakban is (pl. PND 60-70). Az elválasztás idején történő vizsgálatra vonatkozóan lásd a 32. bekezdést. Elegendő vizsgálatot kell végezni annak érdekében, hogy megfelelő kvantitatív mintavételre kerüljön sor a szenzoros módzatok (pl. szomato-szenzoros, vesztibuláris) és a motoros funkciók (pl. erő, koordináció) értékeléséhez. Néhány példa a motoros és szenzoros funkció vizsgálatára: extenzor tolóerő válasz (46), felegyenesedési reflex (47) (48), riasztó hanghatásokhoz való hozzászokás (40) (49) (50) (51) (52) (53) (54), kiváltott potenciálok (55).

Tanulási és memóriatesztek

37. Az asszociatív tanulási és memóriatesztet az elválasztás után (pl. 25 ± 2 nap) és fiatal felnőttkorban (PND 60 és idősebb) kell elvégezni. Az elválasztás idején történő vizsgálat tekintetében lásd a 32. bekezdést. Ebben a két fejlődési szakaszban ugyanazt a vizsgálatot vagy különböző vizsgálatokat is lehet végezni. Az elválasztott és felnőtt patkányok esetében a tanulási és memóriavizsgálatok kiválasztásakor bizonyos fokú rugalmasság megengedett. A vizsgálatokat azonban úgy kell kialakítani, hogy azok megfeleljenek két kritériumnak. Egyrészt a tanulást egy több ismételt tanulási próba vagy szakasz során kialakuló változásként, vagy – az egyetlen próbát tartalmazó vizsgálatokban – egy olyan feltételre hivatkozva kell értékelni, amely a tanulási tapasztalat nem asszociatív hatását szabályozza. Másrészt a vizsgálatoknak az eredeti tanulás (akvizíció) mellett tartalmazniuk kell némi memóriamérést is (rövidtávú vagy hosszú távú), de ezt a memóriamérést az ugyanebből a vizsgálatból nyert akvizíció hiányában nem kell jelteni. Amennyiben a tanulási és memóriatesztek kimutatják a vizsgált vegyi anyag hatását, mérlegelni kell további vizsgálatok elvégzését az érzékszervi, motivációs és/vagy a motoros képességek változásain alapuló alternatív értelmezések kizárása érdekében. A fenti két kritérium mellett ajánlott a tanulási és memóriatesztet a vizsgálat alatt álló vegyi anyag osztályával szemben igazolt érzékenység alapján kiválasztani, amennyiben ilyen információ rendelkezésre áll a szakirodalomban. Ilyen információ hiányában néhány példa azokra a vizsgálatokra, amelyeket átalakíthatók úgy, hogy megfeleljenek a fenti szempontoknak: passzív elkerülés (43) (56) (57), »delayed-matching-to-position« vizsgálat felnőtt patkányok (58) és napos patkányok esetén (59), olfaktorikus kondicionálás (43) (60), Morris-féle vízi labirintus (61) (62) (63), Biel- vagy Cincinnati-labirintus (64) (65), radiális kar labirintus (66), T-labirintus (43), menetrend-vezérelt viselkedés megszerzése és megtartása (26) (67) (68). Az elválasztott (26) (27) és a felnőtt patkányok esetében (19) (20) az irodalom további vizsgálatokat ír le.

Post mortem vizsgálat

38. Az anyaállatokat az utódok leválasztása után lehet elaltatni.
39. Az utódok neuropatológiai értékelését a 22. posztнатális napon (PND 22) vagy egy korábbi, a 11. és 22. posztнатális nap (PND 11 és PND 22) közötti időpontban, valamint a vizsgálat befejezésekor humánusan exterminált állatokból származó szöveteken kell elvégezni. A 22. posztнатális napon (PND 22) elpusztított utódok esetében az agyi szöveteket kell értékelni; a vizsgálat befejezésekor elpusztított állatok esetében a központi idegrendszeri (CNS) és a perifériás idegrendszeri (PNS) szövetmintákat is ki kell értékelni. A 22. posztнатális napon (PND 22) vagy korábban elpusztított állatokkal immerzióval vagy perfúzióval lehet fixálni. A vizsgálat befejezésekor elpusztított állatokat perfúzióval kell fixálni. A szövetminták előkészítésének valamennyi lépése során, az állatok perfúziójától kezdve a szövetminták kimetszésén és a szövetek feldolgozásán át a metszetek festéséig, kiegyensúlyozott elrendezést kell alkalmazni úgy, hogy minden tételnek minden dóziscsoportból tartalmaznia kell reprezentatív mintákat. A neuropatológiára vonatkozó további útmutatás az OECD 20. iránymutatásában található (9), lásd még (103).

A szövetminták feldolgozása

40. A már a boncolás során nyilvánvaló súlyos rendellenességeket fel kell jegyezni. A szövetmintáknak az idegrendszer összes főbb régióját reprezentálniuk kell. A szövetmintákat megfelelő fixálóban kell tartani és a publikált standard szövettani protokolloknak megfelelően kell feldolgozni (69) (70) (71) (103). A paraffin-beágyazás elfogadható a központi idegrendszerből és a perifériás idegrendszerből származó szövetek esetében, de fixálás után ajánlott lehet az oszmium használata epoxi-beágyazással kombinálva, amennyiben magasabb felbontásra van szükség (pl. perifériás idegek esetében, ha perifériás neuropátia gyanúja merül fel és/vagy a perifériás idegek morфомetriai analízise

céljából). A morfológiai analízis céljára gyűjtött agyszöveteket minden dózisszinten egyidejűleg kell a megfelelő közegbe ágyazni annak érdekében, hogy elkerüljék a zsugorodási műtermékek kialakulását, amelyek a fixálószerben való hosszabb tároláshoz társulhatnak (6).

Neuropatológiai vizsgálatok

41. A kvalitatív vizsgálat céljai:

- i. a neuropatológiai változásokat mutató régiók beazonosítása az idegrendszeren belül;
- ii. a vizsgált vegyi anyaggal történt expozícióból eredő neuropatológiai elváltozások típusainak meghatározása; és
- iii. a neuropatológiai változások súlyossági tartományának meghatározása.

A neuropatológiai elváltozások kimutatása céljából a szövetminták reprezentatív szövettani metszeteinek mikroszkópos vizsgálatát megfelelően képzett patológusnak kell elvégeznie. Minden neuropatológiai elváltozáshoz hozzá kell rendelni egy szubjektív fokot, amely az elváltozás súlyosságát jelzi. A hematoxinil-eozin festés elegendő lehet a 22. posztnatális napon (PND 22) vagy korábban humánusan exterminált állatok agyi metszeteinek kiértékelésére. A vizsgálat befejezésekor elpusztított állatokból származó központi és perifériás idegrendszeri metszetek esetében azonban a myelin festés (pl. Luxol Fast Blue/krezilibolya) vagy az ezüst festés (pl. Bielschowsky- vagy Bodians-festés) ajánlott. Figyelembe véve a patológus szakmai értékelését és a megfigyelt elváltoztatások jellegét, egyéb festési módszerek alkalmazása is megfelelőnek tekinthető bizonyos típusú elváltozások azonosítása és jellemzése céljából (pl. gliális fibrilláris savas fehérje (GFAP) vagy lektin hisztokémia a gliális és mikroglialis elváltozások értékelésére (72), fluoro-jade festés a nekrosis kimutatására (73) (74), vagy ezüst festés a specifikus idegi degeneráció kimutatására (75)).

42. Morfológiai (mennyiségi) értékelést kell végezni, mivel ezek az adatok segíthetnek a kezeléssel összefüggő hatások kimutatásában és értékes segítséget nyújtanak az agy tömegében vagy morfológiájában a kezeléssel összefüggésben kialakuló különbségek értelmezése során (76) (77). Az idegszöveti mintát úgy kell levenni és előkészíteni, hogy az lehetővé tegye a morfológiai értékelést. A morfológiai értékelések közé tartozik például a specifikus agyi régiók lineáris vagy területi mérése (78). A lineáris vagy területi mérések megbízható mikroszkopikus tájékozódási pontok alapján gondosan kiválasztott homológ metszetek használatát követelik meg (6). Sztereológiát lehet használni a kezelések egyes paraméterekre, mint például bizonyos neuroanatómiai régiók térfogatára vagy sejteinek számára gyakorolt hatásainak azonosítására (79) (80) (81) (82) (83) (84).
43. Az agyakat meg kell vizsgálni a kezeléssel összefüggő neuropatológiai elváltozásokra és megfelelő mintákat kell venni minden nagyobb agyi régióból (pl. szaglólagymák, cerebrális cortex, hippocampus, bazális ganglionok, thalamus, hypothalamus, középgy (tectum, tegmentum, és agyi pedunculusok), hid, nyúltvelő, kisagy) az alapos vizsgálat érdekében. Fontos, hogy a metszeteket az összes állat esetében ugyanabban a síkban kell készíteni. A vizsgálat befejezésekor humánusan elpusztított felnőtt egyedek esetében a gerincvelő és a perifériás idegrendszer reprezentatív részeiből kell mintát venni. A vizsgált területeknek magukban kell foglalniuk a szemet a látóideggel és a retinával, a gerincvelőt a nyaki és ágyéki megvastagodásnál, a dorzális és ventrális idegyökérrostokat, a proximális ülőideget, a proximális sípcsonti ideget (a térdnél) és a sípcsonti ideg lábikraizom-ágait. A gerincvelőből és a perifériás idegekből készített metszeteknek mind keresztirányú vagy haránt irányú, mind hosszanti metszeteket tartalmazniuk kell.
44. A neuropatológiai értékelésnek a celluláris elváltozások (pl. neuronális vakuolizáció, degeneráció, nekrosis) és a szöveti elváltozások (pl. gliózis, leukocita infiltráció, cisztaképződés) vizsgálata mellett magában kell foglalnia az idegrendszert ért fejlődési károsodások vizsgálatát is (6) (85) (86) (87) (88) (89). Ebben a tekintetben fontos, hogy a kezeléssel összefüggő hatásokat meg kell különböztetni a normális fejlődési eseményektől, amelyek az állat elpusztításának időpontjában zajló fejlődési szakaszban előfordulhatnak (90). A fejlődési károsodásokat jelző jelentős elváltozások közé tartoznak egyebek között:

- a szaglólagymák, a nagyagy és a kisagy bruttó méretének és alakjának megváltozása,
- a különböző agyi régiók relatív méretének változásai, beleértve a régiók méretének a normális körülmények között átmeneti sejtpopulációk vagy axonális projekciók elvesztése vagy fennmaradása miatti csökkenését vagy növekedését (pl. a kisagy külső germinális rétege, corpus callosum),
- a proliferáció, migráció és differenciálódás elváltozásai, amelyet a túlzott mértékű apoptózist vagy nekrotizáló területek, az ektópiai, dezorientált vagy hibás alakulású neuronok klaszterei vagy szétszórt populációi, illetve az agykérgi struktúrák különböző rétegeinek relatív méretében kialakult módosulások jeleznek,

- a myelinizációs minták elváltozásai, beleértve a myelinhüvelyes struktúrák méretének csökkenését vagy megváltozott festődését,
- hydrocephalusra utaló bizonyíték, különösen a kamrák megnagyobbodása, az agyi vízvezeték szűkülete és az agyféltekék elvékonyodása.

A neuropatológiai elváltozások dózis-válasz összefüggéseinek elemzése

45. A kvalitatív és kvantitatív neuropatológiai analízisek céljára az alábbi többlépcsős eljárás ajánlott. Először a magas dózissal kezelt csoport metszeteit összehasonlítjuk a kontrollcsoport metszeteivel. Ha a magas dózissal kezelt csoportból származó állatokban nem található bizonyíték neuropatológiai elváltozásokra, nincs szükség további analízisre. Ha neuropatológiai elváltozások találhatók a magas dózissal kezelt csoportban, meg kell vizsgálni a közepes és az alacsony dózissal kezelt csoportokból származó állatokat. Ha a magas dózissal kezelt csoportot elhullás vagy más zavaró toxicitás miatt fel kell számolni, a magas és a közepes dózissal kezelt csoportokat meg kell vizsgálni neuropatológiai elváltozásokra. Ha a neurotoxicitás bármilyen jele mutatkozik a kisebb dózissal kezelt csoportokban, neuropatológiai analízist kell végezni. Ha a kvalitatív vagy kvantitatív vizsgálat során a kezeléssel összefüggő neuropatológiai elváltozások mutatkoznak, valamennyi dóziscsoport valamennyi állatának értékelése alapján meg kell határozni az előfordulás dózisfüggését, a léziók vagy morfológiai elváltozások gyakoriságát és súlyossági fokát. Az agy neuropatológiai elváltoztatást mutató valamennyi régióját be kell vonni ebbe az értékelésbe. A léziók minden típusa esetében be kell mutatni az egyes súlyossági fokok meghatározására használt jellemzőket, megjelölve azokat a jellemzőket, amelyek alapján különbséget tettünk az egyes fokozatok között. Az egyes léziók gyakoriságát és súlyosságát fel kell jegyezni, és statisztikai elemzést kell végezni a dózis-hatás összefüggés értékelése céljából. Kóddal ellátott metszetek használata ajánlott (91).

ADATOK ÉS JEGYZŐKÖNYVEZÉS

Adatok

46. Az adatokat külön-külön és táblázatos formában összesítve is jegyzőkönyvezni kell, minden egyes vizsgált csoport esetében megjelenítve az elváltozások típusát és az egyes elváltozásokat mutató anyaállatok, utódok (nem szerint) és almok számát. Ha az utódoknál közvetlen posztnatális expozíciót végeztünk, az útvonalat, valamint az expozíció időtartamát és időszakát is jegyzőkönyvezni kell.

Az eredmények értékelése és értelmezése

47. A fejlődési neurotoxicitási vizsgálat tájékoztatást nyújt egy vegyi anyaggal az *in utero* és a korai posztnatális fejlődés során történt ismételt expozíció hatásairól. Mivel mind az általános toxicitási, mind pedig a fejlődési neurotoxicitási végpontokra hangsúlyt fektetnek, a vizsgálat eredményei lehetővé teszik az általános anyai toxicitás hiányában is fellelő idegfejlődési hatások megkülönböztetését azoktól, amelyek az anyaállatra is csak toxikus szintek mellett fejeződnek ki. A vizsgálati elrendezésen belüli bonyolult összefüggések, a statisztikai elemzés, illetve az adatok biológiai jelentősége miatt a fejlődési neurotoxicitási adatok megfelelő értelmezéséhez szakértői értékelésre van szükség (107) (109). A vizsgálati eredmények értelmezéséhez a bizonyítékok súlyán alapuló megközelítést kell alkalmazni (20) (92) (93) (94). A viselkedési vagy morfológiai eredmények mintázatait, ha vannak ilyenek, valamint a dózis-válaszra utaló bizonyítékokat meg kell vitatni. A fejlődési neurotoxicitás értékelése szempontjából lényeges valamennyi vizsgálatból származó adatokat bele kell foglalni ebbe a jellemzésbe, beleértve az emberi epidemiológiai vizsgálatokat vagy esettanulmányokat, illetve az állatkísérleteket (pl. toxikokinetikai adatok, szerkezet-hatás információk és egyéb toxicitási vizsgálatok adatai). Ez magában foglalja a vizsgált vegyi anyag dózisa és a neurotoxikus hatás jelenléte vagy hiánya, gyakorisága és mértéke (nemenként) közötti kapcsolatot (20) (95).
48. Az adatok értékelésének tartalmaznia kell a biológiai és a statisztikai szignifikancia diszkusszióját. A statisztikai elemzést olyan eszköznek kell tekinteni, amely inkább segíti, mintsem meghatározza az adatok értelmezését. Egyedül a statisztikai szignifikancia hiánya alapján nem lehet a kezeléssel összefüggő hatás hiányára vonatkozó következtetést levonni, és egyedül a statisztikai szignifikancia alapján nem lehet a kezeléssel összefüggő hatásra sem következtetni. Az esetleges hamis negatív eredmények és a »negatív tények bizonyításának« nehézségei elleni védekezés érdekében tárgyalni kell a rendelkezésre álló pozitív és történeti kontroll adatokat, különösen akkor, ha nem mutatkoztak kezeléssel összefüggő hatások (102) (106). A hamis pozitív eredmények valószínűségét az adatok teljes statisztikai értékelésének fényében kell tárgyalni (96). Az értékelésnek tartalmaznia kell a megfigyelt neuropatológiai és viselkedési változások közötti kapcsolatot, ha van ilyen.

49. Minden eredményt elemezni kell a kísérleti elrendezésnek megfelelő statisztikai modellekkel (108). A paraméteres és nem paraméteres elemzés közötti választást meg kell indokolni, figyelembe véve olyan tényezőket, mint például az adatok jellege (transzformált vagy nem), eloszlása, valamint a kiválasztott statisztikai elemzési módszer relatív robusztussága. A vizsgálat céljának és elrendezésének útmutatóul kell szolgálnia a statisztikai elemzési módszer kiválasztásakor, hogy minimalizálni lehessen az I-es típusú (hamis pozitív) és a II-es típusú (hamis negatív) hibákat (96) (97) (104) (105). Az egyszerre többet ellő fajokat használó fejlődési vizsgálatok esetében, ahol almonként több kölyköt vizsgálunk, a statisztikai modellnek az almot is tartalmaznia kell, hogy csökkenteni lehessen az I-es típusú hibák arányát (98) (99) (100) (101). Statisztikai mértékegységül az almot kell választani, nem a kölyköt. A kísérleteket úgy kell megtervezni, hogy az alomtársakat ne tekintsük önálló megfigyelésnek. Az ugyanabban az alanyban többször mért végpontot olyan statisztikai modellel kell elemezni, amely figyelembe veszi, hogy ezek nem független mérések.

Vizsgálati jegyzőkönyv

50. A vizsgálati jegyzőkönyvnek a következőket kell tartalmaznia:

Vizsgált vegyi anyag:

- fizikai jelleg és szükség szerint a fizikai és kémiai tulajdonságok,
- azonosító adatok, beleértve a forrást is,
- a készítmény tisztasága, az ismert és/vagy várható szennyeződések.

Vivőanyag (ha van):

- a vivőanyag kiválasztásának indokolása, ha az nem víz vagy fiziológiás sóoldat.

Kísérleti állatok:

- az alkalmazott faj és törzs, és a patkánytól eltérő faj választásának indokolása,
- a kísérleti állatok szállítója,
- az állatok száma, kora a vizsgálat kezdetekor, neme,
- az állatok származása, tartási körülmények, takarmány, víz stb.,
- az egyes állatok testtömege a vizsgálat kezdetekor.

Vizsgálati körülmények:

- az adagolási szintek megválasztásának indokolása,
- az adagolási útvonal és időszak megválasztásának indokolása,
- a beadott dózisok, ezen belül a vivőanyagra, valamint a beadott anyag térfogatára és fizikai formájára vonatkozó adatok részletes leírása,
- a vizsgált vegyi anyag formulázásával/a takarmány előkészítésével, az elért koncentrációval, a készítmény stabilitásával és homogenitásával kapcsolatos adatok,
- az anyaállatok és az utódok egyedi azonosítására használt módszer,
- azon randomizálási eljárás(ok) részletes leírása, amely(ke)t az anyaállatok kezelési csoportokhoz való hozzárendelésére, a kölykök selejtezésre történő kiválasztására, valamint a kölykök tesztcsoportokhoz való hozzárendelésére felhasználtunk,
- a vizsgált vegyi anyag beadására vonatkozó adatok,
- ha alkalmazandó, a vizsgált vegyi anyag takarmányban/ivóvízben lévő koncentrációjának (ppm) átszámítása a tényleges dózisra (mg/testtömeg kg/nap),
- környezeti feltételek,
- a táplálék és a víz minősége (pl. csapvíz, desztillált víz),
- a vizsgálat kezdetének és végének napja.

Megfigyelések és vizsgálati eljárások:

- a megfigyelések és az eljárások szabványosítására használt eljárások, valamint a megfigyelések pontozására szolgáló operatív definíciók részletes leírása,
- az alkalmazott vizsgálati eljárások listája az alkalmazásuk indokolásával,
- az alkalmazott viselkedési/funkcionális, patológiai, neurokémiai és elektrofiziológiai eljárások részletei, beleértve az automatizált eszközökre vonatkozó információkat és adatokat is,
- az eszközök kalibrálását szolgáló és egyenértékűségüket biztosító, illetve a kezelési csoportoknak a vizsgálati eljárásokban való kiegyensúlyozását biztosító eljárások,
- minden, szakmai megítélést igénylő döntés rövid indokolása.

Eredmények (egyenként és összefoglalóan, szükség szerint középértékek és szórásnégyzetek megadásával):

- az állatok száma a vizsgálat kezdetén és végén,
- az egyes vizsgálati módszerekhez felhasznált állatok és almok száma,
- az egyes állatok és származási almuk azonosító száma,
- az alomméret és az átlagos születéskori testtömeg nemenként,
- a testtömegre és a testtömeg változására vonatkozó adatok, beleértve az anyaállatoknak és az utódoknak a vizsgálat befejezésekor mért testtömegét is,
- takarmányfogyasztási és indokolt esetben vízfogyasztási adatok (például ha a vizsgált vegyi anyagot vízzel adtuk be),
- a toxikus reakciókra vonatkozó adatok nemek és adagolási szint szerint, beleértve a toxicitás jeleit vagy az elhullást, beleértve adott esetben az elhullás okát és időpontját is,
- a részletes klinikai megfigyelések jellege, súlyossága, időtartama, a fellépés napja, időpontja és lefolyása,
- a fejlődési tájékozódási pontok (testtömeg, szexuális érés és viselkedési egyedfejlődés) pontszámai az egyes megfigyelési időpontokban,
- a viselkedési, funkcionális, neuropatológiai, neurokémiai, elektrofiziológiai eredmények részletes leírása nemek szerint, beleértve a kontrollokhoz viszonyított növekedéseket és csökkenéseket is,
- boncolási eredmények,
- agytömegek,
- a neurológiai tünetekből és léziókból levezetett diagnózisok, beleértve a természetesen előforduló betegségeket vagy állapotokat is,
- a jellemzőnek tekintett leletekről készült képek,
- a morfometriára használt metszetek homológ voltának értékelésére szolgáló kis nagyítású képek,
- felszívódási és anyagcsereadatok, beleértve a külön toxikokinetikai vizsgálatból származó kiegészítő adatokat is, ha volt ilyen,
- az eredmények statisztikai feldolgozása, beleértve az adatok és az eredmények elemzésére használt statisztikai modelleket is, függetlenül attól, hogy szignifikánsak voltak-e vagy sem,
- a vizsgáló személyzet névjegyzéke, beleértve a szakmai képzéseket is.

Az eredmények diszkussziója:

- dózis-hatás információk nemenként és csoportonként,
- bármely más toxikus hatás és a vizsgált vegyi anyag neurotoxicitási potenciáljával kapcsolatban levont következtetések kapcsolata nemenként és csoportonként,

- a toxikokinetikai információk (ha vannak ilyenek) hatása a következtetésekre,
- hasonlóságok bármely ismert neurotoxikus anyag hatásaival,
- a vizsgálati módszer megbízhatóságát és érzékenységét alátámasztó adatok (pozitív és történeti kontrolladatok),
- a neuropatológiai és a funkcionális hatások közötti kapcsolatok, ha vannak ilyenek,
- NOAEL- vagy benchmarkdózis az anyaállatok és az utódok esetében, nemenként és csoportonként.

Következtetések:

- az adatok értelmezésének átfogó diszkussziója az eredmények alapján, beleértve az arra vonatkozó következtetést, hogy a vizsgált vegyi anyag okozott-e fejlődési neurotoxicitást vagy sem, valamint a NOAEL-t is.

SZAKIRODALOM

- (1) OECD (1995). Draft Report of the OECD *Ad Hoc* Working Group on Reproduction and Developmental Toxicity. Copenhagen, Denmark, 13-14 June 1995.
- (2) US EPA (1998). U.S. Environmental Protection Agency Health Effects Test Guidelines. OPPTS 870.6300. Developmental Neurotoxicity Study. US EPA 712-C-98-239. Elektronikus formátumban: [http://www.epa.gov/opptsfrs/OPPTS_Harmonized/870_Health_Effects_Test_Guidelines/Series/].
- (3) US EPA (1998). Guidelines for Neurotoxicity Risk Assessment. US EPA 630/R-95/001F. Elektronikus formátumban: [<http://cfpub.epa.gov/ncea/cfm/recordisplay.cfm?PrintVersion=True&deid=12479>].
- (4) Cory-Slechta, D.A., Crofton, K.M., Foran, J.A., Ross, J.F., Sheets, L.P., Weiss, B., Mileson, B. (2001). Methods to identify and characterize developmental neurotoxicity for human health risk assessment: I. Behavioral effects. *Environ. Health Perspect.*, 109:79-91.
- (5) Dorman, D.C., Allen, S.L., Byczkowski, J.Z., Claudio, L., Fisher, J.E. Jr., Fisher, J.W., Harry, G.J., Li, A.A., Makris, S. L., Padilla, S., Sultatos, L.G., Mileson, B.E. (2001). Methods to identify and characterize developmental neurotoxicity for human health risk assessment: III. Pharmacokinetic and pharmacodynamic considerations. *Environ. Health Perspect.*, 109:101-111.
- (6) Garman, R.H., Fix, A.S., Jortner, B.S., Jensen, K.F., Hardisty, J.F., Claudio, L., Ferenc, S. (2001). Methods to identify and characterize developmental neurotoxicity for human health risk assessment: II. Neuropathology. *Environ. Health Perspect.*, 109:93-100.
- (7) OECD (2003). Report of the OECD Expert Consultation Meeting on Developmental Neurotoxicity Testing. Washington D.C., US, 23-25 October 2000.
- (8) OECD (2008). OECD Environment, Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 43. Guidance Document on Mammalian Reproductive Toxicity Testing and Assessment. Environment Directorate, OECD, Paris, July 2008. Elektronikus formátumban: [[http://search.oecd.org/officialdocuments/displaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono\(2008\)16&doclanguage=en](http://search.oecd.org/officialdocuments/displaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono(2008)16&doclanguage=en)].
- (9) OECD (2003). OECD Environment, Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 20. Guidance Document for Neurotoxicity Testing. Environment Directorate, OECD, Paris, September 2003. Elektronikus formátumban: [http://www.oecd.org/document/22/0,2340,en_2649_34377_1916054_1_1_1_1,00.html].
- (10) Kimmel, C.A., Rees, D.C., Francis, E.Z. (1990) Qualitative and quantitative comparability of human and animal developmental neurotoxicity. *Neurotoxicol. Teratol.*, 12: 173-292.
- (11) Spencer, P.S., Schaumburg, H.H., Ludolph, A.C. (2000) *Experimental and Clinical Neurotoxicology, 2nd Edition*, ISBN 0195084772, Oxford University Press, New York.
- (12) Mendola, P., Selevan, S.G., Gutter, S., Rice, D. (2002) Environmental factors associated with a spectrum of neurodevelopmental deficits. *Ment. Retard. Dev. Disabil. Res. Rev.* 8:188-197.
- (13) Slikker, W.B., Chang, L.W. (1998) *Handbook of Developmental Neurotoxicology, 1st Edition*, ISBN 0126488606, Academic Press, New York.

- (14) E melléklet B.34. fejezete: Egygenerációs reprodukciós toxicitásvizsgálat.
- (15) E melléklet B.35. fejezete: Kétgenerációs reprodukciós toxicitásvizsgálat.
- (16) E melléklet B.43. fejezete: Neurotoxicitási vizsgálat rágsálókban.
- (17) E melléklet B.31. fejezete: Prenatális fejlődési toxicitásvizsgálat.
- (18) Az Európai Parlament és a Tanács 2010. szeptember 22-i 2010/63/EU irányelve a tudományos célokra felhasznált állatok védelméről, HL L 276., 2010.10.20., 33. o.
- (19) WHO (1986) *Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals*, (Environmental Health Criteria 60), Albany, New York: World Health Organization Publications Center, USA. Elektronikus formátumban: [<http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc060.htm>].
- (20) WHO (2001) *Neurotoxicity Risk Assessment for Human Health: Principles and Approaches*, (Environmental Health Criteria 223), World Health Organization Publications, Geneva. Elektronikus formátumban: [<http://www.intox.org/databank/documents/supplem/supplem/ehc223.htm>].
- (21) Chang, L.W., Slikker, W. (1995) *Neurotoxicology: Approaches and Methods*, 1st Edition, ISBN 012168055X, Academic Press, New York.
- (22) De Cabo, C., Viveros, M.P. (1997) Effects of neonatal naltrexone on neurological and somatic development in rats of both genders. *Neurotoxicol. Teratol.*, 19:499-509.
- (23) Agnish, N.D., Keller, K.A. (1997) The rationale for culling of rodent litters. *Fundam. Appl. Toxicol.*, 38:2-6.
- (24) Avery, D.L., Spyker, J.M. (1977) Foot tattoo of neonatal mice. *Lab. Animal Sci.*, 27:110-112.
- (25) Wier, P.J., Guerriero, F.J., Walker, R.F. (1989) Implementation of a primary screen for developmental neurotoxicity. *Fundam. Appl. Toxicol.*, 13:118-136.
- (26) Spear, N.E., Campbell, B.A. (1979) *Ontogeny of Learning and Memory*. ISBN 0470268492, Erlbaum Associates, New Jersey.
- (27) Krasnegor, N.A., Blass, E.M., Hofer, M.A., Smotherman, W. (1987) *Perinatal Development: A Psychobiological Perspective*. Academic Press, Orlando.
- (28) Zoetis, T., Walls, I. (2003) *Principles and Practices for Direct Dosing of Pre-Weaning Mammals in Toxicity Testing and Research*. ILSI Press, Washington, DC.
- (29) Moser, V., Walls, I., Zoetis, T. (2005) Direct dosing of preweaning rodents in toxicity testing and research: Deliberations of an ILSI RSI expert working group. *Int. J. Toxicol.*, 24:87-94.
- (30) Conolly, R.B., Beck, B.D., Goodman, J.I. (1999) Stimulating research to improve the scientific basis of risk assessment. *Toxicol. Sci.*, 49: 1-4.
- (31) ICH (1993) ICH Harmonised Tripartite Guideline: Detection of Toxicity to Reproduction for Medical Products (S5A). International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use.
- (32) Lochry, E.A. (1987) Concurrent use of behavioral/functional testing in existing reproductive and developmental toxicity screens: Practical considerations. *J. Am. Coll. Toxicol.*, 6:433-439.
- (33) Tachibana, T., Narita, H., Ogawa, T., Tanimura, T. (1998) Using postnatal age to determine test dates leads to misinterpretation when treatments alter gestation length, results from a collaborative behavioral teratology study in Japan. *Neurotoxicol. Teratol.*, 20:449-457.
- (34) Gallavan, R.H. Jr., Holson, J.F., Stump, D.G., Knapp, J.F., Reynolds, V.L. (1999) Interpreting the toxicologic significance of alterations in anogenital distance: potential for confounding effects of progeny body weights. *Reprod. Toxicol.*, 13:383-390.
- (35) Gray, L.E. Jr., Ostby, J., Furr, J., Price, M., Veeramachaneni, D.N., Parks, L. (2000) Perinatal exposure to the phthalates DEHP, BBP, and DINP, but not DEP, DMP, or DOTP, alters sexual differentiation of the male rat. *Toxicol. Sci.*, 58:350-365.

- (36) Adams, J., Buelke-Sam, J., Kimmel, C.A., Nelson, C.J., Reiter, L.W., Sobotka, T.J., Tilson, H.A., Nelson, B.K. (1985) Collaborative behavioral teratology study: Protocol design and testing procedure. *Neurobehav. Toxicol. Teratol.*, 7:579-586.
- (37) Korenbrot, C.C., Huhtaniemi, I.T., Weiner, R.W. (1977) Preputial separation as an external sign of pubertal development in the male rat. *Biol. Reprod.*, 17:298-303.
- (38) Spear, L.P. (1990) Neurobehavioral assessment during the early postnatal period. *Neurotoxicol. Teratol.*, 12:489-95.
- (39) Altman, J., Sudarshan, K. (1975) Postnatal development of locomotion in the laboratory rat. *Anim. Behav.*, 23:896-920.
- (40) Adams, J. (1986) Methods in Behavioral Teratology. In: *Handbook of Behavioral Teratology*. Riley, E.P., Vorhees, C.V. (eds.) Plenum Press, New York, pp. 67-100.
- (41) Reiter, L.W., MacPhail, R.C. (1979) Motor activity: A survey of methods with potential use in toxicity testing. *Neurobehav. Toxicol.*, 1:53-66.
- (42) Robbins, T.W. (1977) A critique of the methods available for the measurement of spontaneous motor activity, *Handbook of Psychopharmacology*, Vol. 7, Iverson, L.L., Iverson, D.S., Snyder, S.H., (eds.) Plenum Press, New York, pp. 37-82.
- (43) Crofton, K.M., Peele, D.B., Stanton, M.E. (1993) Developmental neurotoxicity following neonatal exposure to 3,3'-iminodipropionitrile in the rat. *Neurotoxicol. Teratol.*, 15:117-129.
- (44) Ruppert, P.H., Dean, K.F., Reiter, L.W. (1985) Development of locomotor activity of rat pups in figure-eight mazes. *Dev. Psychobiol.*, 18:247-260.
- (45) Crofton, K.M., Howard, J.L., Moser, V.C., Gill, M.W., Reiter, L.W., Tilson, H.A., MacPhail, R.C. (1991) Interlaboratory comparison of motor activity experiments: Implications for neurotoxicological assessments. *Neurotoxicol. Teratol.*, 13:599-609.
- (46) Ross, J. F., Handley, D. E., Fix, A. S., Lawhorn, G. T., Carr, G. J. (1997) Quantification of the hind-limb extensor thrust response in rats. *Neurotoxicol. Teratol.*, 19:1997. 405-411.
- (47) Handley, D.E., Ross, J.F., Carr, G.J. (1998) A force plate system for measuring low-magnitude reaction forces in small laboratory animals. *Physiol. Behav.*, 64:661-669.
- (48) Edwards, P.M., Parker, V.H. (1977) A simple, sensitive, and objective method for early assessment of acrylamide neuropathy in rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 40:589-591.
- (49) Davis, M. (1984) The mammalian startle response. In: *Neural Mechanisms of Startle Behavior*, Eaton, R.C. (ed), Plenum Press, New York, pp. 287-351
- (50) Koch, M. (1999) The neurobiology of startle. *Prog. Neurobiol.*, 59:107-128.
- (51) Crofton, K.M. (1992) Reflex modification and the assessment of sensory dysfunction. In *Target Organ Toxicology Series: Neurotoxicology*, Tilson, H., Mitchell, C. (eds). Raven Press, New York, pp. 181-211.
- (52) Crofton, K.M., Sheets, L.P. (1989) Evaluation of sensory system function using reflex modification of the startle response. *J. Am. Coll. Toxicol.*, 8:199-211.
- (53) Crofton, K.M., Lassiter, T.L., Rebert, C.S. (1994) Solvent-induced ototoxicity in rats: An atypical selective mid-frequency hearing deficit. *Hear. Res.*, 80:25-30.
- (54) Ison, J.R. (1984) Reflex modification as an objective test for sensory processing following toxicant exposure. *Neurobehav. Toxicol. Teratol.*, 6:437-445.
- (55) Mattsson, J.L., Boyes, W.K., Ross, J.F. (1992) Incorporating evoked potentials into neurotoxicity test schemes. In: *Target Organ Toxicology Series: Neurotoxicity*, Tilson, H., Mitchell, C., (eds.), Raven Press, New York. pp. 125-145.
- (56) Peele, D.B., Allison, S.D., Crofton, K.M. (1990) Learning and memory deficits in rats following exposure to 3,3'-iminopropionitrile. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 105:321-332.

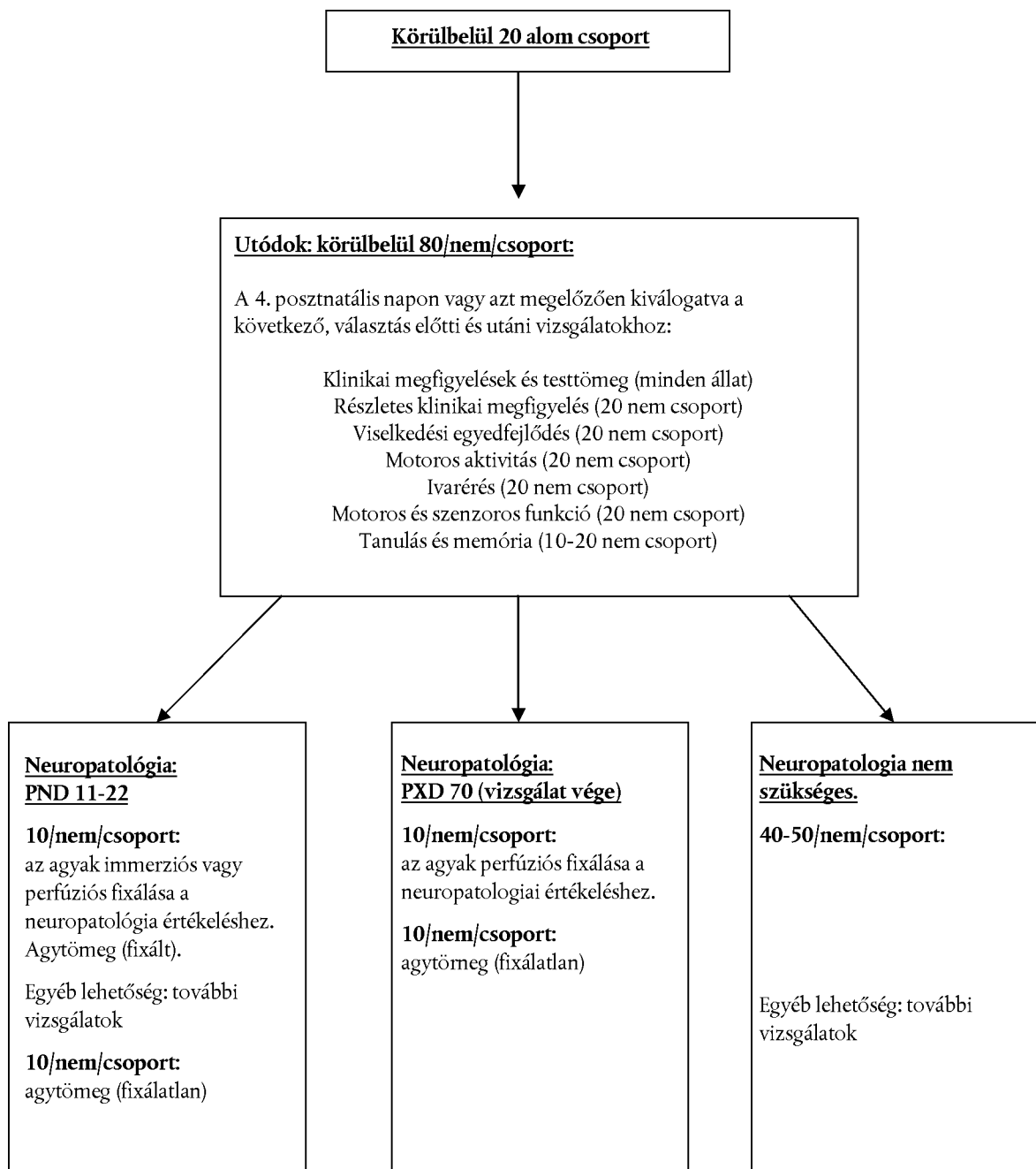
- (57) Bammer, G. (1982) Pharmacological investigations of neurotransmitter involvement in passive avoidance responding: A review and some new results. *Neurosci. Behav. Rev.* 6:247-296.
- (58) Bushnell, P.J. (1988) Effects of delay, intertrial interval, delay behavior and trimethyltin on spatial delayed response in rats. *Neurotoxicol. Teratol.*, 10:237-244.
- (59) Green, R.J., Stanton, M.E. (1989) Differential ontogeny of working memory and reference memory in the rat. *Behav. Neurosci.*, 103:98-105.
- (60) Kucharski, D., Spear, N.E. (1984) Conditioning of aversion to an odor paired with peripheral shock in the developing rat. *Develop. Psychobiol.*, 17:465-479.
- (61) Morris, R. (1984) Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J. Neurosci. Methods*, 11:47-60.
- (62) Brandeis, R., Brandys, Y., Yehuda, S. (1989) The use of the Morris water maze in the study of memory and learning. *Int. J. Neurosci.*, 48:29-69.
- (63) D'Hooge, R., De Deyn, P.P. (2001) Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory. *Brain Res. Rev.* 36:60-90.
- (64) Vorhees, C.V. (1987) Maze learning in rats: A comparison of performance in two water mazes in progeny prenatally exposed to different doses of phenytoin. *Neurotoxicol. Teratol.*, 9:235-241.
- (65) Vorhees, C.V. (1997) Methods for detecting long-term CNS dysfunction after prenatal exposure to neurotoxins. *Drug Chem. Toxicol.*, 20:387-399.
- (66) Akaike, M., Tanaka, K., Goto, M., Sakaguchi, T. (1988) Impaired Biel and Radial arm maze learning in rats with methyl-nitrosurea induced microcephaly. *Neurotoxicol. Teratol.*, 10:327-332.
- (67) Cory-Slechta, D.A., Weiss, B., Cox, C. (1983) Delayed behavioral toxicity of lead with increasing exposure concentration. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 71:342-352.
- (68) Campbell, B.A., Haroutunian, V. (1981) Effects of age on long-term memory: Retention of fixed interval responding. *J. Gerontol.*, 36:338-341.
- (69) Fix, A.S., Garman, R.H. (2000) Practical aspects of neuropathology: A technical guide for working with the nervous system. *Toxicol. Pathol.*, 28: 122-131.
- (70) Prophet, E.B., Mills, B., Arrington, J.B., Sobin, L.H. (1994) *Laboratory Methods in Histotechnology*, American Registry of Pathology, Washington, DC, pp. 84-107.
- (71) Bancroft, J.D., Gamble, M. (2002) *Theory and Practice of Histological Techniques*, 5th edition, Churchill Livingstone, London.
- (72) Fix, A.S., Ross, J.F., Stitzel, S.R., Switzer, R.C. (1996) Integrated evaluation of central nervous system lesions: stains for neurons, astrocytes, and microglia reveal the spatial and temporal features of MK-801-induced neuronal necrosis in the rat cerebral cortex. *Toxicol. Pathol.*, 24: 291-304.
- (73) Schmued, L.C., Hopkins, K.J. (2000) Fluoro-Jade B: A high affinity tracer for the localization of neuronal degeneration. *Brain Res.*, 874:123-130.
- (74) Krinke, G.J., Classen, W., Vidotto, N., Suter, E., Wurmlin, C.H. (2001) Detecting necrotic neurons with fluoro-jade stain. *Exp. Toxic. Pathol.*, 53:365-372.
- (75) De Olmos, I.S., Beltramino, C.A., and de Olmos de Lorenzo, S. (1994) Use of an amino-cupric-silver technique for the detection of early and semiacute neuronal degeneration caused by neurotoxicants, hypoxia and physical trauma. *Neurotoxicol. Teratol.*, 16:545-561.
- (76) De Groot, D.M.G., Bos-Kuijpers, M.H.M., Kaufmann, W.S.H., Lammers, J.H.C.M., O'Callaghan, J.P., Pakkenberg, B., Pelgrim, M.T.M., Waalkens-Berendsen, I.D.H., Waanders, M.M., Gundersen, H.J. (2005a) Regulatory developmental neurotoxicity testing: A model study focusing on conventional neuropathology endpoints and other perspectives. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, 19:745-755.

- (77) De Groot, D.M.G., Hartgring, S., van de Horst, L., Moerkens, M., Otto, M., Bos-Kuijpers, M.H.M., Kaufmann, W.S. H., Lammers, J.H.C.M., O'Callaghan, J.P., Waalkens-Berendsen, I.D.H., Pakkenberg, B., Gundersen, H.J. (2005b) 2D and 3D assessment of neuropathology in rat brain after prenatal exposure to methylazoxymethanol, a model for developmental neurotoxicity. *Reprod. Toxicol.*, 20:417-432.
- (78) Rodier, P.M., Gramann, W.J. (1979) Morphologic effects of interference with cell proliferation in the early fetal period. *Neurobehav. Toxicol.*, 1:129-135.
- (79) Howard, C.V., Reed, M.G. (1998) *Unbiased Stereology: Three-Dimensional Measurement in Microscopy*, Springer-Verlag, New York.
- (80) Hyman, B.T., Gomez-Isla, T., Irizarry, M.C. (1998) Stereology: A practical primer for neuropathology. *J. Neuro-pathol. Exp. Neurol.*, 57: 305-310.
- (81) Korbo, L., Andersen, B.B., Ladefoged, O., Møller, A. (1993) Total numbers of various cell types in rat cerebellar cortex estimated using an unbiased stereological method. *Brain Res.*, 609: 262-268.
- (82) Schmitz, C. (1997) Towards more readily comprehensible procedures in disector stereology. *J. Neurocytol.*, 26:707-710.
- (83) West, M.J. (1999) Stereological methods for estimating the total number of neurons and synapses: Issues of precision and bias. *Trends Neurosci.*, 22:51-61.
- (84) Schmitz, C., Hof, P.R. (2005) Design-based stereology in neuroscience. *Neuroscience*, 130: 813-831.
- (85) Gavin, C.E., Kates, B., Gerken, L.A., Rodier, P.M. (1994) Patterns of growth deficiency in rats exposed *in utero* to undernutrition, ethanol, or the neuroteratogen methylazoxymethanol (MAM). *Teratology*, 49:113-121.
- (86) Ohno, M., Aotani, H., Shimada, M. (1995) Glial responses to hypoxic/ischemic encephalopathy in neonatal rat cerebrum. *Develop. Brain Res.*, 84:294-298.
- (87) Jensen KF, Catalano SM. (1998) Brain morphogenesis and developmental neurotoxicology. In: *Handbook of Developmental Neurotoxicology*, Slikker, Jr. W., Chang, L.W. (eds) Academic Press, New York, pp. 3-41.
- (88) Ikonomidou, C., Bosch, F., Miksa, M., Bittigau, P., Vöckler, J., Dikranian, K., Tenkova, T.I., Stefovská, V., Turski, L., Olney, J.W. (1999) Blockade of NMDA receptors and apoptotic neurodegeneration in the developing brain. *Science*, 283:70-74.
- (89) Ikonomidou, C., Bittigau, P., Ishimaru, M.J., Wozniak, D.F., Koch, C., Genz, K., Price, M.T., Sefovská, V., Hörster, F., Tenkova, T., Dikranian, K., Olney, J.W. (2000) Ethanol-induced apoptotic degeneration and fetal alcohol syndrome. *Science*, 287:1056-1060.
- (90) Friede, R. L. (1989) *Developmental Neuropathology*. Second edition. Springer-Verlag, Berlin.
- (91) House, D.E., Berman, E., Seeley, J.C., Simmons, J.E. (1992) Comparison of open and blind histopathologic evaluation of hepatic lesions. *Toxicol. Let.*, 63:127-133.
- (92) Tilson, H.A., MacPhail, R.C., Crofton, K.M. (1996) Setting exposure standards: a decision process. *Environ. Health Perspect.*, 104:401-405.
- (93) US EPA (2005) Guidelines for Carcinogen Risk Assessment. US EPA NCEA-F-0644A.
- (94) US EPA (1996) Guidelines for Reproductive Toxicity Risk Assessment, Federal Register 61(212): 56274-56322.
- (95) Danish Environmental Protection Agency (1995) *Neurotoxicology*. Review of Definitions, Methodology, and Criteria. Miljøprojekt nr. 282. Ladefoged, O., Lam, H.R., Østergaard, G., Nielsen, E., Arlien-Søborg, P.
- (96) Muller, K.E., Barton, C.N., Benignus, V.A. (1984). Recommendations for appropriate statistical practice in toxicologic experiments. *Neurotoxicology*, 5:113-126.
- (97) Gad, S.C. (1989) Principles of screening in toxicology with special emphasis on applications to Neurotoxicology. *J. Am. Coll. Toxicol.*, 8:21-27.

- (98) Abby, H., Howard, E. (1973) Statistical procedures in developmental studies on a species with multiple offspring. *Dev. Psychobiol.*, 6:329-335.
- (99) Haseman, J.K., Hogan, M.D. (1975) Selection of the experimental unit in teratology studies. *Teratology*, 12:165-172.
- (100) Holson, R.R., Pearce, B. (1992) Principles and pitfalls in the analysis of prenatal treatment effects in multiparous species. *Neurotoxicol. Teratol.*, 14: 221-228.
- (101) Nelson, C.J., Felton, R.P., Kimmel, C.A., Buelke-Sam, J., Adams, J. (1985) Collaborative Behavioral Teratology Study: Statistical approach. *Neurobehav. Toxicol. Teratol.*, 7:587-90.
- (102) Crofton, K.M., Makris, S.L., Sette, W.F., Mendez, E., Raffaele, K.C. (2004) A qualitative retrospective analysis of positive control data in developmental neurotoxicity studies. *Neurotoxicol. Teratol.*, 26:345-352.
- (103) Bolon, B., Garman, R., Jensen, K., Krinke, G., Stuart, B., and an *ad hoc* working group of the STP Scientific and Regulatory Policy Committee. (2006) A 'best practices' approach to neuropathological assessment in developmental neurotoxicity testing – for today. *Toxicol. Pathol.* 34:296-313.
- (104) Tamura, R.N., Buelke-Sam, J. (1992) The use of repeated measures analysis in developmental toxicology studies. *Neurotoxicol. Teratol.*, 14(3):205-210.
- (105) Tukey, J.W., Ciminera, J.L., Heyse, J.F. (1985) Testing the statistical certainty of a response to increasing doses of a drug. *Biometrics*, 41:295-301.
- (106) Crofton, K.M., Foss, J.A., Haas, U., Jensen, K., Levin, E.D., and Parker, S.P. (2008) Undertaking positive control studies as part of developmental neurotoxicity testing: report from the ILSI Research Foundation/Risk Science Institute expert working group on neurodevelopmental endpoints. *Neurotoxicology and Teratology*, 30(4):266-287.
- (107) Raffaele, K.C., Fisher, E., Hancock, S., Hazelden, K., and Sobrian, S.K. (2008) Determining normal variability in a developmental neurotoxicity test: report from the ILSI Research Foundation/Risk Science Institute expert working group on neurodevelopmental endpoints. *Neurotoxicology and Teratology*, 30(4):288-325.
- (108) Holson, R.R., Freshwater, L., Maurissen, J.P.J., Moser, V.C., and Phang, W. (2008) Statistical issues and techniques appropriate for developmental neurotoxicity testing: a report from the ILSI Research Foundation/Risk Science Institute expert working group on neurodevelopmental endpoints. *Neurotoxicology and Teratology*, 30(4):326-348.
- (109) Tyl, R.W., Crofton, K.M., Moretto, A., Moser, V.C., Sheets, L.P., and Sobotka, T.J. (2008) Identification and interpretation of developmental neurotoxicity effects: a report from the ILSI Research Foundation/Risk Science Institute expert working group on neurodevelopmental endpoints *Neurotoxicology and Teratology*, 30(4):349-381.

1. ábra

Általános vizsgálati elrendezés a funkcionális/viselkedési tesztekhez, a neuropatológiai értékeléshez és az agytömegek vizsgálatához. Ez a vázlatrajz a 13–15. bekezdésben foglalt leíráson alapul (PND = posztinatális nap). Az állatok besorolására vonatkozó példák az 1. függelékben találhatók.



1. függelék

1. A lehetséges besorolásokra vonatkozó példák bemutatása szöveges és táblázatos formában az alábbiakban található. Ezek a példák annak illusztrálására szolgálnak, hogy a vizsgálati állatok különböző tesztelési paradigmákba való besorolása több különböző módon is elvégezhető.

1. példa

2. Nemenként és dózisszintenként 20 kölyköt (azaz almonként 1 hím és 1 nőstény kölyköt) használunk a viselkedési egyedfejlődés elválasztás előtti tesztelésére. Ezek közül az állatok közül nemenként és dózisszintenként 10 kölyköt (azaz almonként 1 hím vagy 1 nőstény kölyköt) a 22. posztnatális napon (PND 22) humánusan elpusztítunk. Az agyakat eltávolítjuk, lemérjük, és feldolgozzuk a szövettani értékeléshez. Ezen túlmenően agytömeg-adatokat gyűjtünk a dózisszintenként fennmaradó 10 hím és 10 nőstény állat fixálatlan agyának felhasználásával.
3. Nemenként és dózisszintenként további 20 állatot (azaz almonként 1 hím és 1 nőstény kölyköt) használunk az elválasztás utáni funkcionális/viselkedési tesztek céljára (részletes klinikai vizsgálatok, motoros aktivitás, riasztó hanghatások és kognitív funkciók tesztelése serdülő állatokban) és a szexuális éréskori életkor értékelésére. Ezek közül az állatok közül nemenként és dózisszintenként 10 kölyköt (azaz almonként 1 hím vagy 1 nőstény kölyköt) a vizsgálat befejezésekor (kb. PND 70) elaltatunk és perfúzióval rögzítünk. További in situ fixálást követően az agyat eltávolítjuk, és feldolgozzuk a neuropatológiai értékeléshez.
4. A kognitív funkciók fiatal felnőtt egyedekben (pl. PND 60-70) történő vizsgálatához egy harmadik adag, nemenként és dózisszintenként 20 db (azaz almonként 1 hím és 1 nőstény) kölyköt kell használni. Ezek közül az állatok közül nemenként és csoportonként 10 állatot (almonként 1 hím vagy 1 nőstény egyed) a vizsgálat befejezésekor el kell pusztítani, az agyakat el kell távolítani, majd megmérni.
5. A maradék 20 állat/nem/csoport esetleges további vizsgálatok számára van fenntartva.

1. táblázat

Kölyök sorszáma ^(a)		A vizsgálatba besorolt kölykök száma	Vizsgálat/Teszt
h	n		
1	5	20 h + 20 n 10 h + 10 n 10 h + 10 n	Viselkedési egyedfejlődés PND 22 agytömeg/neuropatológia/morfometria PND 22 agytömeg
2	6	20 h + 20 n 20 h + 20 n 20 h + 20 n 20 h + 20 n 20 h + 20 n 10 h + 10 n	Részletes klinikai megfigyelések Motoros aktivitás Nemi éré Motoros és szenzoros funkció Tanulás és memória (PND 25) Fiatal felnőtt agytömeg/neuropatológia/morfometria ~PND 70
3	7	20 h + 20 n 10 h + 10 n	Tanulás és memória (fiatal felnőtt egyedek) Fiatal felnőtt agytömeg ~PND 70
4	8	—	Tartalék állatok pótlás vagy további tesztek céljára

^(a) Ebben a példában az almokat leredukáljuk 4 hím + 4 nőstény egyedre; a hím kölyköket 1-től 4-ig, nőstény kölyköket 5-től 8-ig számozzuk.

2. példa

6. Nemenként és dózisszintenként 20 kölyköt (azaz almonként 1 hím és 1 nőstény) használunk a viselkedési egyedfejlődés elválasztás előtti tesztelésére. Ezek közül az állatok közül nemenként és dózisszintenként 10 kölyköt (almonként 1 hím vagy 1 nőstény kölyköt) humánusan elpusztítunk a 11. posztnatális napon (PND 11). Az agyakat eltávolítjuk, lemérjük, és feldolgozzuk a szövettani értékeléshez.
7. Nemenként és dózisszintenként további 20 állatot (azaz almonként 1 hím és 1 nőstény kölyköt) használunk az elválasztás utáni vizsgálatok céljára (részletes klinikai megfigyelések, motoros aktivitás, a szexuális érés kori életkor értékelése, motoros és szenzoros funkció). Ezek közül az állatok közül nemenként és dózisszintenként 10 kölyköt (azaz almonként 1 hím vagy 1 nőstény kölyköt) a vizsgálat befejezésekor (kb. PND 70) elaltatunk és perfúzióval rögzítünk. További in situ fixálást követően az agyat eltávolítjuk, megmérjük, és feldolgozzuk a neuropatológiai értékeléshez.
8. A kognitív funkciók serdülő és fiatal felnőtt egyedekben történő vizsgálatához nemenként és dózisszintenként 10 db kölyköt használunk (azaz almonként 1 hím és 1 nőstény kölyköt). Különböző állatokat használunk a kognitív funkció vizsgálatához a 23. posztnatális napon (PND 23) és fiatal felnőttekben. A vizsgálat befejezésekor a felnőttkorban vizsgálandó nemenkénti és csoportonkénti 10 állatot elpusztítjuk, majd az agyakat eltávolítjuk és megmérjük.
9. A vizsgálatra ki nem választott maradék 20 db/nem/csoport állatot az elválasztáskor elpusztítjuk és eltávolítjuk.

2. táblázat

Kölyök sorszáma ^(a)		A vizsgálatba besorolt kölykök száma	Vizsgálat/Teszt
h	n		
1	5	20 h + 20 n 10 h + 10 n	Viselkedési egyedfejlődés PND 11 agytömeg/neuropatológia/morfometria
2	6	20 h + 20 n 20 h + 20 n 20 h + 20 n 20 h + 20 n 10 h + 10 n	Részletes klinikai megfigyelések Motoros aktivitás Nemi érés Motoros és szenzoros funkció Fiatal felnőtt agytömeg/neuropatológia/morfometria ~PND 70
3	7	10 h + 10 n ^(b)	Tanulás és memória (PND 23)
3	7	10 h + 10 n ^(b)	Tanulás és memória (fiatal felnőtt egyedek) Fiatal felnőtt agytömeg
4	8	—	Az állatokat a 21. posztnatális napon (PND 21) elpusztítjuk és eltávolítjuk.

^(a) Ebben a példában az almokat leredukáljuk 4 hím + 4 nőstény egyedre; a hím kölyköket 1-től 4-ig, nőstény kölyköket 5-től 8-ig számozzuk meg.

^(b) Különböző kölyköket használunk a kognitív funkció vizsgálatához a 23. posztnatális napon (PND 23) és fiatal felnőttekben (pl. páros/páratlan alom az összesen 20 alomból).

3. példa

10. Nemenként és dózisszintenként 20 kölyköt (azaz almonként 1 hím és 1 nőstény kölyköt) használunk a 11. posztnatális napon (PND 11) az agytömeg mérésére és a neuropatológiai értékelésre. Ezek közül az állatok közül nemenként és dózisszintenként 10 kölyköt (azaz almonként 1 hím vagy 1 nőstény kölyköt) a 11. posztnatális napon (PND 11) humánusan elpusztítunk, majd az agyakat eltávolítjuk, lemérjük és feldolgozzuk a kórszövettani értékeléshez. Ezen túlmenően agytömeg-adatokat gyűjtünk a dózisszintenként fennmaradó 10 hím és 10 nőstény állat fixálatlan agyának felhasználásával.

11. Nemenként és dózisszintenként további 20 állatot (azaz almonként 1 hím és 1 nőstény kölyköt) használunk a viselkedési egyedfejlődés (motoros aktivitás) értékelésére, illetve az elválasztás utáni vizsgálatok céljára (motoros aktivitás, a szexuális érés kori életkor értékelése), valamint a serdülőkori kognitív funkció tesztelésére.
12. Nemenként és dózisszintenként további 20 állatot (azaz almonként 1 hím és 1 nőstény kölyköt) használunk a motoros és szenzoros funkciók tesztek (riasztó hanghatások) és a részletes klinikai megfigyelések céljára. Ezek közül az állatok közül nemenként és dózisszintenként 10 kölyköt (azaz almonként 1 hím vagy 1 nőstény kölyköt) a vizsgálat befejezésekor (kb. PND 70) elaltatunk és perfúzióval rögzítünk. További in situ fixálást követően az agyat eltávolítjuk, megmérjük, és feldolgozzuk a neuropatológiai értékeléshez.
13. Nemenként és dózisszintenként további 20 állatot (azaz almonként 1 hím és 1 nőstény kölyköt) használunk a fiatal felnőtt egyedek kognitív funkciójának tesztelésére. Ezek közül az állatok közül nemenként és csoportonként 10 állatot (azaz almonként 1 hím vagy 1 nőstény egyed) a vizsgálat befejezésekor elpusztítunk, az agyakat eltávolítjuk, majd megmérjük.

3. táblázat

Kölyök sorszáma ^(a)		A vizsgálatba besorolt kölykök száma	Vizsgálat/Teszt
h	n		
1	5	10 h + 10 n 10 h + 10 n	PND 11 agytömeg/neuropatológia/morfometria PND 11 agytömeg
2	6	20 h + 20 n 20 h + 20 n 20 h + 20 n 20 h + 20 n	Viselkedési egyedfejlődés (motoros aktivitás) Motoros aktivitás Nemi érés Tanulás és memória (PND 27)
3	7	20 h + 20 n 20 h + 20 n 10 h + 10 n	Riasztó hanghatások (serdülő és fiatal felnőtt egyedek) Részletes klinikai megfigyelések Fiatal felnőtt agytömeg/neuropatológia/morfometria ~PND 70
4	8	20 h + 20 n 10 h + 10 n	Tanulás és memória (fiatal felnőtt egyedek) Fiatal felnőtt agytömeg

^(a) Ebben a példában az almokat leredukáljuk 4 hím + 4 nőstény egyedre; a hím kölyköket 1-től 4-ig, nőstény kölyköket 5-től 8-ig számozzuk.

*2. függelék***Fogalommeghatározások**

Vegyi anyag: egy anyag vagy keverék

Vizsgált vegyi anyag: bármely, e vizsgálati módszer alkalmazásával vizsgált anyag vagy keverék.

B.54. UTEROTROFIKUS BIOLÓGIAI VIZSGÁLAT RÁGCSÁLÓKBAN: GYORS SZŰRŐVIZSGÁLAT AZ ÖSZTROGÉN-SZERŰ TULAJDONSÁGOK KIMUTATÁSÁRA**BEVEZETÉS**

1. Ez a vizsgálati módszer egyenértékű az OECD 440. vizsgálati iránymutatásában (2007) leírt módszerrel. Az OECD 1998-ban a meglévő vizsgálati iránymutatások felülvizsgálatára, valamint az endokrin rendszert esetlegesen károsító anyagok kiszűrésére és vizsgálatára vonatkozó új vizsgálati iránymutatások kidolgozására irányuló, kiemelt fontosságú tevékenységet indított (1). A tevékenység egyik eleme a rágcső uterotrofikus biológiai vizsgálati iránymutatásának kidolgozása volt. A rágcső uterotrofikus biológiai vizsgálatát ezután egy alapos validálási programnak vetették alá, beleértve a részletes háttér-dokumentáció összeállítását (2) (3), valamint a kiterjedt laboratóriumon belüli és laboratóriumok közötti vizsgálatokat, amelyek a biológiai vizsgálat relevanciáját és reprodukálhatóságát vizsgálták erős referencia-ösztrogénnel, gyenge ösztrogén-receptor agonistákkal, erős ösztrogén-receptor antagonistával, illetve negatív referencia vegyi anyaggal (4) (5) (6) (7) (8) (9). A B.54 vizsgálati módszer a validálási tesztprogram során szerzett tapasztalatokon és az ösztrogén agonistákkal kapcsolatban ennek keretében gyűjtött eredményeken alapul.
2. Az uterotrofikus biológiai vizsgálat egy gyors szűrővizsgálat, amelyet eredetileg az 1930-as években fejlesztettek ki (27) (28), és elsőként egy szakértői bizottság szabványosította szűrés céljára 1962-ben (32) (35). A vizsgálat a méh tömegének növekedésén vagy az uterotrofikus válasz fokozódásán alapul (összefoglalásért lásd: 29). Abból a szempontból értékeli a vegyi anyagokat, hogy képesek-e a természetes ösztrogének (például 17 β -ösztradiol) agonistáihoz vagy antagonistáihoz hasonló biológiai aktivitást kiváltani, habár sokkal ritkábban használják antagonisták, mint agonisták kimutatására. A méh kétféle módon reagál az ösztrogénre. A kezdeti válasz részben a megnövekedett vízfelvétel miatti tömeggyarapodás. Ezt a választ a szöveti osztódás miatti tömeggyarapodás követi (30). A méh által adott válaszok a patkányokban és az egerekben minőségileg hasonlóak.
3. Ez a biológiai vizsgálat *in vivo* szűrővizsgálati célokat szolgál, és alkalmazását az »OECD fogalmi kerete az endokrin rendszert károsító vegyi anyagok tesztelésére és értékelésére« (2. függelék) összefüggésében kell szemlélni. Ebben a fogalmi keretben a uterotrofikus biológiai vizsgálatot a 3. szint tartalmazza olyan *in vivo* vizsgálatként, amely egyetlen endokrin mechanizmusról, az ösztrogénszerű hatásról szolgáltat adatokat.
4. A uterotrofikus biológiai vizsgálatot arra használják, hogy beépítik az endokrin rendszerrel potenciálisan kölcsönhatásba lépő vegyi anyagok azonosítására szolgáló *in vitro* és *in vivo* vizsgálat sorozatba, amely végső soron az emberi egészségre vagy a környezetre gyakorolt kockázatok értékelését célozza. Az OECD validálási program erős és gyenge ösztrogén agonistákat egyaránt használt a vizsgálat ösztrogénszerű aktivitással rendelkező vegyszerek azonosítása terén nyújtott teljesítményének értékelésére (4) (5) (6) (7) (8). Ezáltal a vizsgálati eljárás érzékenysége az ösztrogén agonisták tekintetében jól bizonyított, jó laboratóriumon belüli és laboratóriumok közötti reprodukálhatóság mellett.
5. Ami a negatív vegyi anyagokat illeti, csak egyetlen »negatív« referencia vegyi anyag szerepelt a validálási programban, amelyet már negatívnak talált úgy az uterotrofikus vizsgálat, mint az *in vitro* receptorkötési és receptor-vizsgálatok, de további, az OECD validálási programmal összefüggésben nem álló vizsgálati adatokat is kiértékeltek, hogy még jobban alátámasszák az uterotrofikus biológiai vizsgálat ösztrogén agonisták szűrése terén mutatott specificitását (16).

KIINDULÁSI MEGFONTOLÁSOK ÉS KORLÁTOK

6. Az ösztrogén agonisták és antagonisták ligandumként hatnak az a és b ösztrogén receptorokra és aktiválhatják vagy gátolhatják a receptorok transzkripció működését. Ez káros egészségügyi kockázatokat eredményezhet, beleértve a reprodukció és a fejlődési hatásokat. Ezért fennáll az igény a vegyi anyagok lehetséges ösztrogén agonista vagy antagonista hatásának gyors felmérésére és értékelésére. Bár informatív, a ligandum affinitása egy ösztrogén receptorhoz vagy a riporter gén *in vitro* transzkripció aktiválása csak egy a lehetséges veszélyt meghatározó számos tényező közül. További tényezők lehetnek a szervezetbe történő belépéskor bekövetkező metabolikus aktiválódás és deaktiválódás, a célszövetekbe történő disztribúció, illetve a szervezetből történő kiürülés, amelyek legáltalában részben a beadás módjától és a vizsgált vegyi anyagtól függenek. Ennek következtében szükség van arra, hogy *in vivo*, azaz aktuális körülmények között szűrjék a vegyi anyagok lehetséges aktivitását, kivéve, ha a vegyi anyag jellemzői a felszívódás-eloszlás-metabolizmus-kiürülés (absorption-distribution-metabolism-elimination, ADME) tekintetében már jelenleg is megfelelő információkat szolgáltatnak. A méh szövetei gyors és erőteljes növekedéssel reagálnak az ösztrogének általi stimulációra, különösen laboratóriumi rágcsőfajokban, ahol az ösztrogén-ciklus körülbelül 4 napig tart. A rágcsőfajokat, különösen a patkányokat, széles körben használják a kockázatok jellemzését célzó toxicitási vizsgálatokra is. Ezért a rágcsőfajok méhe megfelelő célszerv az ösztrogén agonisták és antagonisták *in vivo* szűrésére.
7. A vizsgálati módszer az OECD validálási vizsgálatban alkalmazott azon protokollokon alapul, amelyeket a laboratóriumon belüli és laboratóriumok közötti vizsgálatokban megbízhatónak és megismételhetőnek találtak (5) (7). Jelenleg két módszer, nevezetesen az ovariectomizált kifejlett nőstény módszer (ovx-felnőtt módszer), és az éretlen,

nem ovariectomizált módszer (éretlen módszer) áll rendelkezésre. Az OECD validálási tesztprogramban bebizonyosodott, hogy a két módszer összehasonlítható érzékenységgel és reprodukálhatósággal rendelkezik. Az éretlen módszer azonban, mivel az állatok érintetlen hipotalamusz-hipofízis-gonád (HPG) tengellyel rendelkeznek, valamivel kevésbé specifikus, viszont a benne foglalt vizsgálatok köre nagyobb, mint az ovariectomizált módszer esetében, mert reagálni képes azokra a vegyi anyagokra is, amelyek nemcsak az ösztrogén receptorral, hanem a HPG-tengellyel is kölcsönhatásba lépnek. A patkány HPG-tengelye körülbelül 15 napos korban kezd működni. Ezt megelőzően a pubertást nem lehet olyan kezelésekkel felgyorsítani, mint pl. a GnRH. Amikor a nőstények kezdik elérni a pubertáskort, a nőstényeknek a hüvelykinyílás előtt több csendes ciklusuk van, amelyek nem eredményeznek hüvelykinyílást vagy ovulációt, de hormonális ingadozások megfigyelhetők. Ha egy vegyi anyag közvetlenül vagy közvetve serkenti a HPG-tengelyt, az korai pubertást, korai ovulációt és gyorsított hüvelykinyílást eredményez. Nemcsak a HPG tengelyre ható vegyi anyagok képesek erre, hanem néhány magasabb metabolizálható energiaszintet tartalmazó étrend is, amelyek serkentik a növekedést és felgyorsítják a hüvelykinyílást, anélkül, hogy ösztrogénszerű hatásuk lenne. Az ilyen vegyi anyagok nem váltanak ki uterotrofikus választ az OVX felnőtt állatokban, mivel a HPG-tengelyük nem működik.

8. Állatjóléti okok miatt az éretlen patkányokat használó módszert kell előnyben részesíteni, elkerülve az állatok műtéti előkezelését és elkerülve azoknak az állatoknak a kihagyását, amelyek kezdődő ivarzásra utaló bármilyen jelet mutatnak (lásd 30. bekezdés).
9. Az uterotrofikus válasz nem teljesen ösztrogén eredetű, azaz az ösztrogén agonistákon vagy antagonistákon kívül egyéb vegyi anyagok is választ válthatnak ki. Például a progeszteron, a tesztoszteron, vagy a különféle szintetikus progesztinek viszonylag nagy dózisaik mind stimulációhoz vezethetnek (30). Bármilyen választ szövettanilag lehet elemezni a keratinizáció és a hüvely-elszarusodás jelenlétére (30). A válasz lehetséges eredetétől függetlenül az uterotrofikus biológiai vizsgálat pozitív eredménye alapján további tisztázást célzó intézkedéseket kell kezdeményezni. Az ösztrogénszerű hatásra vonatkozó további bizonyítékokat lehet gyűjteni az *in vitro* vizsgálatokból, úgymint az ER kötődési vizsgálatokból és transzkripció aktiválási vizsgálatokból, illetve más *in vivo* vizsgálatokból, úgymint a nőstény pubertás vizsgálatból.
10. Figyelembe véve, hogy az uterotrofikus biológiai vizsgálat *in vivo* szűrővizsgálatként szolgál, a kiválasztott validálási megközelítés egyaránt megfelelt az állatjóléti megfontolásoknak és a lépcsőzetes vizsgálati stratégiának. Ezért az erőfeszítések arra összpontosultak, hogy alaposan validálják az ösztrogénszerű hatás – amely a fő aggály számos vegyi anyaggal szemben – reprodukálhatóságát és érzékenységet, míg a vizsgálat antiösztrogén elemére kevesebb figyelem irányult. Csak egyetlen erős aktivitású antiösztrogént vizsgáltak, mivel az egyértelmű antiösztrogén-profil (amelyet nem fed el valamilyen ösztrogénszerű aktivitás) rendelkező vegyi anyagok száma nagyon korlátozott. Így ez a vizsgálati módszer az ösztrogén protokollhoz tartozik, míg a vizsgálat antagonista módozatát leíró protokoll az iránymutatás tartalmazza (37). A tisztán antiösztrogén aktivitású vegyi anyagok esetében a vizsgálat reprodukálhatóságát és érzékenységet később fogják pontosabban meghatározni, miután a vizsgálati eljárást már egy ideig rutinszerűen használták, és több ilyen aktivitással rendelkező vegyi anyagot beazonosítottak.
11. Minden állatkísérleteken alapuló eljárást az állatgondozásra vonatkozó helyi szabványoknak megfelelően kell végrehajtani; az alábbiakban foglalt, gondozásra és kezelésre vonatkozó leírások minimális teljesítményszabványok, amelyeket a helyi szabályozások – mint például a tudományos célokra felhasznált állatok védelméről szóló 2010/63/EU európai parlamenti és tanácsi irányelv (2010. szeptember 22.) (38) – felülírnak (38). Az állatokkal való humánus bánásmódról további iránymutatás a megfelelő OECD-kiadványban található (25).
12. Mint minden, élő állatok felhasználásával végzett vizsgálat esetében, már a vizsgálat megkezdése előtt alapvető fontosságú ellenőrizni, hogy az adatok valóban szükségesek-e. Két olyan körülmény, amikor például az adatokra szükség lehet:
 - magas expozíciós potenciál (az elvi keretrendszer 1-es szintje, 2. függelék) vagy ösztrogénszerű hatásra utaló jelek (2. szint) esetén annak vizsgálata, hogy az ilyen hatások *in vivo* is előfordulhatnak-e,
 - a 4. vagy 5. szintű *in vivo* tesztekben mutatott ösztrogénszerű hatásra utaló jelek esetén annak alátámasztása, hogy a hatás kapcsolatban áll egy olyan ösztrogén-mechanizmussal, amelyet nem lehet *in vitro* vizsgálattal tisztázni.
13. Az ebben a vizsgálati módszerben használt fogalmak meghatározását az 1. függelék tartalmazza.

A VIZSGÁLAT ELVE

14. Az uterotrofikus biológiai vizsgálat az érzékenység tekintetében egy állatkísérletekből álló rendszerre támaszkodik, amelyben a hipotalamusz-hipofízis-petefészkek tengely nem működik, ami a keringő ösztrogén alacsony endogén szintjét eredményezi. Ez alacsony kiindulási méhtömeget és maximális választartományt biztosít a beadott ösztrogénre. Két ösztrogénre érzékeny állapot felel meg ennek a követelménynek nőstény rágcsálókban:
 - i. éretlen nőstények az elválasztás után és a pubertás előtt; és
 - ii. fiatal kifejlett nőstények a petefészkek eltávolítása után, megfelelő időt adva a méhszövetek visszafejlődésére.
15. A vizsgált anyagot orális szondán keresztül vagy szubkután injekció formájában naponta adagoljuk. A vizsgált vegyi anyag fokozatos dózisait adjuk be a kísérleti állatok legalább két kezelési csoportjának (iránymutatásért lásd a 33. bekezdést), csoportonként egy dózisszintet használva, az anyagot az éretlen módszer esetében három egymást követő napon, az ovx felnőtt módszer esetében pedig minimálisan három egymást követő napon beadva. Az állatokat körülbelül 24 órával az utolsó dózis után felboncoljuk. Ösztrogén agonisták esetében a kezelt állatcsoport átlagos méhtömegét a vivőanyag-csoportéhoz viszonyítva értékeljük a statisztikailag szignifikáns növekedés kimutatása érdekében. A vizsgálati csoport átlagos méhtömegének statisztikailag szignifikáns növekedése pozitív választ jelent a biológiai vizsgálatban.

A MÓDSZER ISMERTETÉSE

Az állatfaj kiválasztása

16. Általánosan használt laboratóriumi rágcsálótörzseket lehet alkalmazni. A validálás során például Sprague-Dawley- és Wistar-patkánytörzseket használtak. Az ismert vagy feltételezett alacsonyabb érzékenységi méhvel rendelkező törzseket nem szabad használni. A laboratóriumnak a 26. és 27. bekezdésben leírtak szerint bizonyítania kell a felhasznált törzs érzékenységét.
17. A patkányt és az egeret már az 1930-as évek óta használják rutinszerűen az uterotrofikus biológiai vizsgálatban. Az OECD validálási vizsgálatokat csak patkányokon végezték el azon az alapon, hogy a két fajt egyenértékűnek tekintették, ezért egy fajnak elegendőnek kell lennie a világméretű validálás céljára, hogy erőforrásokat és állatokat lehessen megtakarítani. A patkány a választott faj a legtöbb reprodukciós és fejlődési toxicitási vizsgálat esetében. Figyelembe véve, hogy hatalmas történelmi adatbázis létezik egerekre, egy korlátozott nyomonkövetésű validálási vizsgálatot végeztek egereken is annak érdekében, hogy az uterotrofikus biológiai vizsgálati módszert kiterjesszék az egerek kísérleti fajként való használatára (16). Egy áthidaló megközelítést választottak korlátozott számú vizsgált vegyi anyaggal, részt vevő laboratóriummal és nem kódolt minták vizsgálatával, összhangban az erőforrások és állatok megtakarítását célzó eredeti szándékkal. Az uterotrofikus biológiai vizsgálat fiatal felnőtt ovariektomizált egerekben végzett áthidaló validálási vizsgálata azt mutatja, hogy a patkányokban és egerekben kapott adatok minőségi és mennyiségi szempontból jól megfelelnek egymásnak. Ha az uterotrofikus biológiai vizsgálat eredménye egy hosszú távú vizsgálat előzménye, akkor mindkét kísérlethez ugyanabból a törzsből való, azonos eredetű állatokat használhatnak. Az áthidaló megközelítés az OVX egerekre korlátozódott és a jelentés nem nyújt megbízható adatsort az éretlen modell validálásához, ezért az egerek éretlen modelljét nem veszik figyelembe a jelenlegi vizsgálati módszer alkalmazási területén.
18. Így bizonyos esetekben patkányok helyett egereket is lehet használni. Ennek fajnak a használatát toxikológiai, farmakokinetikai és/vagy egyéb kritériumokkal meg kell indokolni. Egerekben szükség lehet a protokoll módosítására. Például az egerek testtömeghez viszonyított takarmányfogyasztása nagyobb, mint a patkányoké, ezért a takarmány fitoösztrogén-tartalmának alacsonyabbnak kell lennie egerek, mint patkányok esetében (9) (20) (22).

Tartási és etetési körülmények

19. Minden eljárásnak meg kell felelnie a laboratóriumi állatgondozásra vonatkozó helyi szabványoknak. Ezek a gondozásra és kezelésre vonatkozó leírások minimális teljesítményszabványok, amelyeket a helyi szabályozások – mint például a tudományos célokra felhasznált állatok védelméről szóló 2010/63/EU európai parlamenti és tanácsi irányelv (2010. szeptember 22.) (38) – felülírnak (38). A kísérleti állatok tartására szolgáló helyiség hőmérséklete 22 °C (kb. ± 3 °C eltérési tartománnyal) kell, hogy legyen. A helyiség relatív páratartalmának legalább 30 %-nak kell lennie és a takarítás időtartamától eltekintve lehetőleg ne haladja meg a 70 %-ot. A relatív páratartalom célértékének 50–60 % között kell lennie. A világítás legyen mesterséges. Naponta 12 órás világos és 12 órás sötét periódusok váltsák egymást.
20. A laboratóriumi takarmányt és az ivóvizet korlátozás nélkül kell biztosítani. A fiatal felnőtt állatok egyedileg vagy legfeljebb három egyedből álló csoportokban is tarthatók. Az éretlen állatok fiatal kora miatt társas, csoportos tartás ajánlott.

21. A laboratóriumi takarmányok magas fitoösztrogén-tartalmáról már ismert, hogy olyan mértékben növeli meg a rácsálók méhének tömegét, amely már zavarja az uterotrofikus biológiai vizsgálatot (13) (14) (15). A laboratóriumi takarmányok magas fitoösztrogén- és metabolizálható energia tartalma korai pubertáshoz is vezethet, ha éretlen állatokat használnak. A fitoösztrogének jelenléte elsősorban a szója és lucerna laboratóriumi takarmányba való beépítésének eredménye és a fitoösztrogének koncentrációja a standard laboratóriumi takarmány egyes gyártási tételei között is változik (23). A testtömeg egy fontos változó, mivel az elfogyasztott takarmány mennyisége összefügg a testtömeggel. Ezért az ugyanabból a takarmányból ténylegesen felvett fitoösztrogén-dózis állatfaj és életkor szerint különbözhet (9). Az éretlen nőtény patkányok testtömeg alapján számított takarmányfogyasztása mintegy kétszerese lehet az ovariectomizált fiatal felnőtt nőtényekének. A fiatal felnőtt egerek testtömeg alapján számított takarmányfogyasztása mintegy négyszerese lehet az ovariectomizált fiatal felnőtt nőtény patkányokénak.
22. Az uterotrofikus biológiai vizsgálat eredményei (9) (17) (18) (19) azonban azt mutatják, hogy korlátozott mennyiségű étrendi fitoösztrogén elfogadható és nem csökkenti a biológiai vizsgálat érzékenységet. Iránymutatásként, a fitoösztrogének étrendi szintje nem haladhatja meg a 350 µg genistein ekvivalens/gramm laboratóriumi takarmány értéket éretlen nőtény Sprague-Dawley- és Wistar-patkányok esetében (6) (9). Az ilyen étrend is megfelelő a fiatal felnőtt ovariectomizált patkányok vizsgálatkor, mivel a testtömegre vetített takarmányfogyasztás kisebb a fiatal felnőtt, mint a kifejlett állatokban. Amennyiben kifejlett ovariectomizált egereket vagy fitoösztrogénekre érzékenyebb patkányokat kell használni, oda kell figyelni az étrendi fitoösztrogénszint arányos csökkentésére (20). Ezen túlmenően, a különféle étrendek elérhető metabolikus energiájában mutatkozó különbségek a pubertás időpontjának eltolódásához vezethetnek (21) (22).
23. A vizsgálat előtt gondosan ki kell választani egy olyan étrendet, amelynek nem magas a fitoösztrogén- vagy metabolizálható energiaszintje (útmutatásért lásd (6) (9)), amelyek zavarhatnák az eredményeket (15) (17) (19) (22) (36). A laboratórium által használt vizsgálati rendszer 26. és 27. bekezdésekben meghatározott megfelelő teljesítményének biztosítása érdekében mindkét tényezőt ellenőrizni kell. A helyes laboratóriumi gyakorlattal (GLP) összhangban lévő biztonsági intézkedésként reprezentatív mintavételt kell végezni a vizsgálat során alkalmazott takarmány minden egyes tételéből a takarmány fitoösztrogén-tartalmának esetleges analízise céljából (pl. ha a kontroll méhtömeg magas a történelmi kontrollokhoz viszonyítva, vagy ha a referencia ösztrogén, a 17-alfa-etinil-ösztrodiol nem eredményez megfelelő választ). Az aliquotokat a vizsgálat részeként, vagy – 20°C-on fagyasztva, vagy olyan módon kell analizálni, amely megakadályozza a minták analízis előtti lebomlását.
24. Egyes alomanyagok természetes ösztrogén vagy antiösztrogén hatású vegyi anyagokat tartalmazhatnak (pl. a kukoricacsutkáról közismert, hogy befolyásolja a patkányok ciklusát és antiösztrogén hatású). A kiválasztott alomanyagoknak minimális mennyiségű fitoösztrogént szabad tartalmaznia.

Az állatok előkészítése

25. A betegségekre vagy fizikai rendellenességekre utaló jeleket nem mutató kísérleti állatokat véletlenszerűen kell besorolni a kontroll- és a kezelési csoportokba. A ketrecek úgy kell elrendezni, hogy minimálisra lehessen csökkenteni a ketrec elhelyezésének lehetséges hatásait. Az állatokat egyedi azonosítóval kell ellátni. Előnyös, ha az éretlen állatokat az akklimatizáció alatt az elválasztásig az anyaállatokkal vagy nevelőanyákkal közös ketrecekben helyezik el. Az akklimatizációs időszak a vizsgálat kezdete előtt fiatal felnőtt állatok és anyaállatokkal vagy nevelőanyákkal együtt szállított éretlen állatok esetében körülbelül 5 nap. Ha az éretlen állatokat választott állatokként, anyaállatok nélkül kapja meg a laboratórium, rövidebb időtartamú akklimatizációs időszak válhat szükségessé, mivel az adagolást az elválasztás után azonnal meg kell kezdeni (lásd a 29. bekezdést).

ELJÁRÁS

A laboratórium jártasságának igazolása

26. A laboratórium jártasságának ellenőrzésére két különböző módszert lehet alkalmazni:
- időszakos ellenőrzés, a kiindulási pozitív kontrollvizsgálatra támaszkodva (lásd a 27. bekezdést). Legalább hathavonta és minden alkalommal, amikor olyan változás történik, amely befolyásolhatja a vizsgálat teljesítményét (pl. új összetételű takarmány, változás a boncolást végző személyzetben, változás az állattörzsben vagy a szállítóban, stb.), ellenőrizni kell a tesztrendszer (állatmodell) érzékenységét a referencia ösztrogén megfelelő dóziséban (a 27. bekezdésben leírt kiindulási pozitív kontrollvizsgálat alapján) használatával: 17a-etinil-ösztrodiol (CAS-szám: 57-63-6) (EE),
 - egyidejű ellenőrzések használata, melynek keretében minden vizsgálatba bevonnak egy csoportot, amelyet a referencia ösztrogén megfelelő adagjával kezelnek.

Ha a rendszer nem a várt választ adja, meg kell vizsgálni és megfelelően módosítani kell a kísérleti körülményeket. Ajánlatos, hogy a referencia ösztrogén alkalmazott dózisa mindkét megközelítés esetében megközelítőleg az ED70 és 80 között legyen.

27. **Kiindulási pozitív kontrollvizsgálat** – Mielőtt a laboratórium első alkalommal végezne vizsgálatot eszerint a vizsgálati módszer szerint, a laboratóriumi jártasságát az állatmodell érzékenységének tesztelése útján igazolni kell a referencia ösztrogén dózis-válasz összefüggésének meghatározásával: 17 α -etinil-ösztadiol (CAS-szám: 57-63-6) (EE), minimum négy dózisban. A méhtömeg-választ össze kell hasonlítani a megalapozott történeti adatokkal (lásd az (5) referenciát). Ha ez a kiindulási pozitív kontrollvizsgálat nem adja a várt eredményeket, a kísérleti körülményeket meg kell vizsgálni és módosítani kell.

Az állatok száma és állapota

28. Minden egyes kezelési és kontrollcsoportnak legalább 6 állatot kell tartalmaznia (mind az éretlen, mind az ovx felnőtt módszer protokollja esetében).

Az éretlen állatok életkora

29. Az éretlen állatokkal végzett uterotrofikus biológiai vizsgálat esetében meg kell adni a születés napját. Az adagolást elég korán kell kezdeni ahhoz, hogy a vizsgált vegyi anyag adagolásának végéig az endogén ösztrogének szintjének a pubertáshoz kapcsolódó fiziológiás megemelkedésére még ne kerüljön sor. Másrészt, bizonyíték van arra, hogy a nagyon fiatal állatok kevésbé érzékenyek lehetnek. Az optimális életkor meghatározása során minden laboratóriumnak a nemi érssel kapcsolatos saját háttéradatait kell figyelembe vennie.

Általános szabályként alkalmazható, hogy patkányokban az adagolás a 18. posztnatális napon végrehajtott korai elválasztás után azonnal megkezdődhet (a születés napja a 0. posztnatális nap). Az adagolást patkányokban lehetőség szerint a 21. posztnatális napon be kell fejezni, de a 25. posztnatális napot megelőzően mindenféleképpen, mert ez után az életkor után a hipotalamusz-hipofízis-petefészkek tengely működni kezd, és az endogén ösztrogén szintek emelkedni kezdenek, amivel együtt a kiindulási átlagos méhtömeg és a csoporton belüli szórás is megemelkedik (2) (3) (10) (11) (12).

Az ovariectomiára vonatkozó eljárás

30. Az ovariectomizált nőstény patkányok és egerek esetében (kezelési és kontrollcsoportok) a petefészkek eltávolítására 6 és 8 hetes kor között kell sort keríteni. Patkányok esetében legalább 14 napnak kell eltelnie a petefészkek eltávolítása és az adagolás első napja között, hogy a méh visszafejlődhessen egy minimális, stabil kiindulási állapotra. Egerek esetében legalább 7 napnak kell eltelnie a petefészkek eltávolítása és az adagolás első napja között. Mivel kis mennyiségű petefészkek-szövet is elegendő egy szignifikáns keringő ösztrogénszint előállításához (3), az állatokat a felhasználás előtt meg kell vizsgálni a hüvelyből legalább öt egymást követő napon tamponált hámsejtek megfigyelésével (pl. patkányok esetében 10–14 nappal a petefészkek eltávolítása után). Ha az állatok az oestrus bármilyen jelét mutatják, azokat az állatokat nem szabad használni. Továbbá, a petefészkek-csonkokat boncoláskor meg kell vizsgálni a petefészkek-szövet jelenlétére utaló bizonyítékokra. Amennyiben van ilyen, akkor az állatot nem kell használni a számításokban (3).
31. Az ovariectomia eljárása azzal kezdődik, hogy az állat a megfelelő altatást követően ventrális helyzetben fekszik. A dorzolaterális hasfalat megnyitó kb. 1 cm-es hosszanti bemetszést az alsó bordaszél és a csípőlapát közötti felezőpontban, az ágyéki izom laterális szélétől néhány milliméterre laterálisan kell megtenni. A petefészket ki kell emelni a hasüregből és aszeptikus területre helyezni. A petefészket a petevezeték és a méhtest találkozásánál le kell választani. Miután meggyőződünk arról, hogy nem lépett fel súlyos vérzés, a hasfalat varrattal, a bőrt pedig kapcsokkal vagy megfelelő varrattal kell zárni. A ligációs pontokat sematikusan az 1. ábra mutatja be. Megfelelő posztoperatív fájdalomcsillapítást kell alkalmazni a rácsáloellátásban jártas állatorvos ajánlása szerint.

Testtömeg

32. Az ovx-felnőtt módszernél a testtömeg és a méh tömege nincs korrelációban, mert a méh tömegét a hormonok – mint az ösztrogének – befolyásolják ugyan, de a testméretet szabályozó növekedési faktorok nem. Ezzel ellentétben, az éretlen modellben az érés során a testtömeg összefüggésben áll a méh tömegével (34). Ezért a vizsgálat kezdetén az éretlen modellben használt állatok testtömege lehetőleg csak minimálisan térjen el egymástól és az átlagos értéktől maximum ± 20 %-kal különbözzön. Ez azt jelenti, hogy a tenyésztőnek szabványosítania kell az

alomszámot annak érdekében, hogy a különböző anyaállatok utódai közel azonos mennyiségű táplálékhoz jussanak. Az állatokat a randomizált súlyeloszlás módszerével kell besorolni a csoportokba (mind a kontroll-, mind a kezelési csoportokba), hogy az egyes csoportok átlagos testtömege statisztikailag ne különbözzön a többi csoporttól. Figyelembe kell venni, hogy amennyire csak lehetséges, kerülendő az alomtestvérek ugyanabba a kezelési csoportba való besorolása, de a vizsgálathoz használt almok számának növelése nélkül.

Adagolási szintek

33. Annak megállapítása érdekében, hogy a vizsgált vegyi anyag rendelkezik-e *in vivo* ösztrogénszerű hatással, két dóziscsoport és egy kontrollcsoport általában elegendő, és ezt az elrendezést ezért állatjóléti okok miatt előnyben kell részesíteni. Ha a cél a dózis-válasz görbe felállítása vagy az alacsonyabb dózisokra történő extrapoláció, akkor legalább 3 dóziscsoportra van szükség. Ha az ösztrogénaktivitás azonosításán túlmenő információra van szükség (például a hatóérték becslésére), fontolóra kell venni eltérő adagolási rend alkalmazását. A kontrollcsoportba tartozó állatokat a vizsgált vegyi anyag beadásától eltekintve ugyanolyan módon kell kezelni, mint a vizsgálati csoportokban lévőket. Ha vivőanyagot használunk a vizsgált anyag beadása során, a kontrollcsoport ugyanakkora mennyiségű vivőanyagot kapjon, mint a kezelési csoportok (vagy a vizsgálati csoportokban alkalmazott legnagyobb mennyiséget, ha eltérés van a különböző csoportok között).
34. Az uterotrofikus biológiai vizsgálat esetében a cél olyan dózisok kiválasztása, amelyek biztosítják az állatok túlélését és amelyek nem okoznak jelentős toxicitást vagy szorongást az állatoknak a vegyi anyag három egymást követő napon maximum 1 000 mg/kg/nap dózisban történő adagolása alatt. Valamennyi adagolási szint ajánlásánál és kiválasztásánál figyelembe kell venni a vizsgált, vagy azzal rokon vegyi anyagok toxicitására és (toxiko) kinetikájára vonatkozóan rendelkezésre álló adatokat. A legnagyobb dózisonál először az LD50 és/vagy akut toxicitási információkat kell figyelembe venni annak érdekében, hogy elkerüljék az állatok elhullását, súlyos szenvedését vagy szorongását (24) (25) (26). A legmagasabb dózisonak a maximális tolerált dózist (MTD) kell képviselnie; az olyan vizsgálatot, amelyet a pozitív uterotrofikus választ indukáló dózisszinten végeznek, szintén el lehet fogadni. Szűrőként a dózisok közötti nagy intervallumok (pl. fél log egység, amely 3,2 dózisprogressziónak felel meg, vagy akár egy log egység) általában elfogadhatók. Ha nem állnak rendelkezésre megfelelő adatok, akkor dózisbehataró vizsgálat végezhető az alkalmazandó dózisok meghatározása céljából.
35. Alternatívaként, ha az ösztrogén agonista potenciáját az *in vitro* (vagy *in silico*) adatok alapján meg lehet becsülni, ezek is figyelembe vehetők a dózis kiválasztásakor. Például, a vizsgált vegyi anyagnak azt a mennyiségét, amely a referencia agonistával (etinil-ösztadiol) egyenértékű uterotrofikus válaszokat eredményezne, az etinil-ösztadiolhoz viszonyított relatív *in vitro* potenciája alapján kell megbecsülni. A legnagyobb vizsgálati dózist úgy kapjuk meg, hogy ezt az ekvivalens dózist megszorozzuk egy megfelelő faktoral pl. 10-zel vagy 100-zal.

A dózisbehatarólas szempontjai

36. Ha szükséges, néhány állattal előzetes dózisbehataró vizsgálat végezhető. Ebben a tekintetben az OECD 19. iránymutatását (25) lehet használni, amely meghatározza az állatokban jelentkező toxicitásra vagy szorongásra utaló klinikai tüneteket. Ha a háromnapos adagolással járó dózisbehataró vizsgálatban megvalósítható, a méheket körülbelül 24 órával az utolsó dózis után lehet kimetszeni és megmérni. Ezek az adatokat azután felhasználhatók a fő vizsgálat elrendezésének megtervezésében (az elfogadható maximális és alacsonyabb dózisok kiválasztása, javaslatétel a dóziscsoportok számára).

A dózisok beadása

37. A vizsgált vegyi anyagot orális szondán keresztül vagy szubkután injekció formájában adagolják. Az állatjóléti és toxikológiai szempontokat, mint például a vegyi anyaggal való emberi expozíciós útvonallal kapcsolatos relevanciát (pl. gyomorszonda a lenyelés modellezésére, bőr alá adott injekció a belégzés vagy bőrön át történő adszorpció modellezésére), a vizsgálati vegyi anyag fizikai/kémiai tulajdonságait és különösen az anyagcserével és a kinetikával kapcsolatban rendelkezésre álló toxikológiai információkat és adatokat (pl. first pass metabolizmus elkerülése, jobb hatásfok adott útvonalon keresztül) egyaránt figyelembe kell venni a beadás útvonalának kiválasztásakor.
38. Ahol csak lehetséges, először valamilyen vizes oldat/szuszenzió használatát kell megfontolni. De mivel a legtöbb ösztrogén ligandum vagy azok metabolikus prekurzorai általában hidrofóbok, a leggyakoribb megközelítés az, hogy olajos oldatot/szuszenziót használnak (pl. kukorica-, mogyoró-, szezám- vagy olívaolaj). Ezek az olajok azonban különböző kalória- és zsírtartalommal rendelkeznek, így a vivőanyag befolyásolhatja a teljes metabolizálható energiabevitelt (ME), megváltoztatva ezáltal a potenciálisan mért végpontokat, mint például a méh tömegét, különösen az éretlen módszer esetében (33). Ezért a vizsgálat előtt a használni tervezett valamennyi vivőanyagot le kell tesztelni vivőanyag nélküli kontrollokkal szemben. A vizsgált vegyi anyagokat fel lehet oldani minimális

mennyiségű 95 %-os etanolban vagy más megfelelő oldószerben, majd a vizsgálati vivőanyaggal felhígítani a végső munkakonzentrációra. Az oldószer toxikus jellemzőit ismerni kell, és le is kell tesztelni egy külön csak oldószert tartalmazó kontrollcsoportban. Ha a vizsgált anyag stabilnak tekinthető, enyhe melegítést és erőteljes mechanikai hatást is lehet használni a vizsgált vegyi anyag feloldása során. Meg kell határozni azt is, hogy a vizsgált vegyi anyag mennyire stabil az adott vivőanyagban. Ha a vizsgált vegyi anyag a vizsgálat időtartama alatt stabil marad, akkor előállítható a vizsgált vegyi anyag kiindulási aliquotja, és a meghatározott adagolási hígítások naponta elkészíthetők.

39. Az adagolás időzítése függ az alkalmazott modellektől (az éretlen modellektől lásd a 29. bekezdésben, az ovx-felnőtt modellektől pedig a 30. bekezdésben). Az éretlen nőstény patkányoknak a vizsgált vegyi anyagot naponta kell adagolni három egymást követő napon át. Háromnapos kezelés ajánlott ovariektomizált nőstény patkányok esetében is, de hosszabb expozíciók is elfogadhatók, mert javíthatják a gyenge aktivitású vegyi anyagok kimutatását. Ovariektomizált nőstény egerek esetében a háromnapos adagolási időtartamnak elegendőnek kell lennie anélkül, hogy erős ösztrogén agonisták esetében jelentős előny származna az akár hétnaposra való kiterjesztésből; gyenge ösztrogének esetében azonban ez az összefüggés nem volt kimutatható a validálási vizsgálatban (16), így ovx-felnőtt egerekben az adagolást ki kell terjeszteni akár 7 egymást követő napra. A dózist minden nap hasonló időpontban kell beadni. A dózisokat szükség esetén ki kell igazítani, hogy az állat testtömegére vetítve állandó dózisszintet lehessen fenntartani (pl. mg vizsgált vegyi anyag per testtömeg kg per nap). Ami a beadott anyag volumenét illeti, a testtömegre vetített variabilitást az adagolt oldat koncentrációjának beállításával minimálisra kell csökkenteni annak érdekében, hogy a testtömegre vetítve állandó térfogatú anyagot lehessen beadni az állatoknak valamennyi dózisszinten és bármely beadási mód esetén.
40. Ha a vizsgált vegyi anyagot szondán át adagoljuk, lehetőleg egyetlen napi adagban kell azt gyomorszondán vagy megfelelő intubációs kanülön át beadni. Az egy alkalommal beadható folyadék maximális mennyisége a kísérleti állat méretétől függ. A állatgondozásra vonatkozó helyi iránymutatásokat be kell tartani, de a volumen nem haladhatja meg az 5 ml/testtömeg kg értéket, kivéve a vizes oldatok esetében, ahol 10 ml/testtömeg kg volument lehet használni.
41. Amikor a vizsgált anyag beadása szubkután injekció formájában történik, ezt napi egyszeri adaggal kell végrehajtani. A dózisokat a dorsoscapuláris vagy a lumbális régióba kell beadni steril (pl. 23-as vagy 25-ös méretű) tűvel és tuberkulin fecskendővel. Az injekció beadásának helyén a borotválás nem kötelező. Minden veszteséget, a beadás helyén történt szivárgást vagy nem teljes adagolást fel kell jegyezni. A patkányonként naponta injektált teljes térfogat nem haladhatja meg az 5 ml/testtömeg kg értéket, szétszétva 2 injektálási helyre, kivéve a vizes oldatokat, ahol 10 ml/testtömeg kg mennyiséget lehet használni.

Megfigyelések

Általános és klinikai megfigyelések

42. Általános klinikai megfigyeléseket legalább naponta kell végezni, vagy gyakrabban, ha toxicitás jelei figyelhetők meg. A megfigyeléseket lehetőleg minden nap ugyanabban az időpontban vagy időpontokban kell végezni, figyelembe véve az adagolást követően várható hatások csúcsidezeit. Valamennyi állatot meg kell figyelni a mortalitás és morbiditás előfordulására, valamint az általános klinikai tünetekre, mint például a bőr, a szőrzet, a szemek és a nyálkahártyák állapota, a váladékok és kiválasztott anyagok előfordulása, valamint az autonóm aktivitás (például könnyezés, szőrzet felborzolódása, pupillaméret, szokatlan légzési ritmusok) tekintetében megfigyelhető változásokra.

Testtömeg és táplálékfogyasztás

43. Minden állatot naponta, 0,1 gramm pontossággal kell megmérni, közvetlenül a kezelés megkezdése előtt, azaz amikor az állatokat beosztják a csoportokba. Opcionális mérésként a kezelési időszak alatt elfogyasztott takarmány mennyiségét is meg lehet mérni a takarmányadagolók súlyának ketrecenkénti megméréssel. A takarmányfogyasztási eredményeket gramm/patkány/nap értékben kell megadni.

Boncolás és a méh tömegének mérése

44. Huszonnégy órával az utolsó kezelés után a patkányokat humánusan el kell pusztítani. Ideális esetben a csoportok közötti boncolási sorrend véletlenszerűen kerül meghatározásra, hogy el lehessen kerülni a kezelési csoportok közvetlenül felfelé vagy lefelé irányuló progresszióját, ami kismértékben befolyásolná az adatokat. A biológiai vizsgálat célja az, hogy megmérje mind a nedves, mind a leitatott méh tömegét. A nedves tömeg magában foglalja a méh és a lumenális folyadék tömegét. A leitatott tömeget azután kell mérni, hogy a méh lumenális tartalmát kipréseltük és eltávolítottuk.

45. A boncolás előtt az éretlen állatokat meg kell vizsgálni, hogy kinyílt-e a hüvelyük. A boncolás azzal kezdődik, hogy a hasfalat az ágyéki symphysisnél kezdve megnyitjuk. Ezután a méhszarvat és a petefészkeket, ha vannak, elválasztjuk a dorzális hasfaltól. A húgyhólyagot és húgyvezetéseket eltávolítjuk a méh és a hüvely ventrális és laterális oldaláról. A végbél és a hüvely közötti fibrózis tapadást szétválasztjuk, amíg a vagina nyílásának és a gát bőrének találkozását be nem lehet azonosítani. A hüvely falát a vagina és a perineum bőre közötti találkozás fölött átvágva a méhet és a hüvelyt leválasztjuk a testről, amint az a 2. ábrán látható. A méhet a test faláról a méhszarvak dorzolaterális aspektusához teljes hosszuk mentén csatlakozó mesenterium finom átvágásával kell lefejtetni. A testből történő eltávolítás után a méhet gyorsan kell kezelni a szövetek kiszáradásának elkerülése érdekében. A kiszáradás miatti tömegcsökkenés nagyobb jelentőségű a kis szövetek, például a méh esetében (23). Ha jelen vannak a petefészkek, el kell távolítani azokat a petevezetésekről, elkerülve a méhszarvon keresztüli lumenális folyadékvesztést. Ha az állat már ovariectomizált, a csonkokat meg kell vizsgálni petefészekszövet jelenlétére. A felesleges zsír- és kötőszövetet le kell metszeni. A hüvelyt közvetlenül a méhnyak alatt távolítjuk el a méhről úgy, hogy a méhnyak a méhtesttel együtt maradjon, amint az a 2. ábrán látható.
46. Minden méhet egyedileg megjelölt és lemért tartályba kell helyezni (pl. Petri-csészébe vagy műanyag mérőtálkába), folyamatosan gondoskodva arról, hogy a méhek ne száradjanak ki mérés előtt (pl. sóoldattal kissé megnedvesített szűrőpapírt lehet elhelyezni a tartályban). A méhet a lumenális folyadékkal együtt kell megmérni, 0,1 mg pontossággal (nedves méhtömeg).
47. A méhekből ezután egyenként el kell távolítani a lumenális folyadékot. Ehhez mindkét méhszarvat kiszúrjuk vagy hosszában felvágjuk. A méhet enyhén megnedvesített szűrőpapírra helyezzük (pl. Whatman No. 3), majd egy második darab enyhén megnedvesített szűrőpapírral enyhén megnyomjuk a lumenális folyadék teljes eltávolítása céljából. A méhet a lumenális folyadék nélkül is megmérjük, 0,1 mg pontossággal (leitatott méhtömeg).
48. A vizsgálat befejezésekor mért méhtömeget annak igazolására lehet felhasználni, hogy az éretlen intakt patkányok megfelelő életkorát nem haladták meg, ebben a tekintetben azonban a laboratóriumban használt patkánytörzsre vonatkozó történeti adatok a mérvadóak (az eredmények értelmezéséért lásd az 56. bekezdést).

Választható vizsgálatok

49. A méhet a mérlegelés után 10 %-os semleges pufferelt formalinban lehet rögzíteni, hogy hematoxin-eozin (HE) festés után szövettanilag is meg lehessen vizsgálni. A hüvelyt is ennek megfelelően lehet megvizsgálni (lásd a 9. bekezdést). Ezen túlmenően, a mennyiségi összehasonlítás érdekében az endometriális epithelium morfológiai mérése is elvégezhető.

ADATOK ÉS JEGYZŐKÖNYVEZÉS

Adatok

50. A vizsgálati adatoknak a következőket kell tartalmazniuk:
- az állatok száma a vizsgálat kezdetekor,
 - a vizsgálat során elhullott vagy humánus okokból elpusztított állatok száma és azonosítója, valamint az elhullás vagy humánus elpusztítás dátuma és időpontja,
 - a toxicitás jeleit mutató állatok száma és azonosítója, valamint a megfigyelt toxicitási tünetek leírása, beleértve a toxikus hatások kezdetének időpontját, azok időtartamát és súlyosságát, és
 - a léziókat mutató állatok száma és azonosítója, valamint a léziók típusának leírása.
51. Az állatok egyedi adatai között rögzíteni kell a testtömeget, a nedves méh tömegét, és a leitatott méh tömegét. Az agonisták esetében egyoldalú statisztikai elemzéseket kell használni annak meghatározására, hogy a vizsgált vegyi anyag adagolása eredményezett-e statisztikailag szignifikáns ($p < 0,05$) növekedést a méh tömegében. Megfelelő statisztikai elemzést kell végezni, hogy teszteljék a leitatott és nedves méhtömeg kezeléssel kapcsolatos változásait. Az adatokat például a kovariancia elemzésével (ANCOVA) is ki lehet értékelni, kovariánsként a boncoláskor mért testtömeget használva. Variancia-stabilizáló logaritmikus transzformációt lehet végezni a méhadatokon az adatok elemzését megelőzően. Az egyes dóziscsoportok vívmányanyag kontrollcsoportokkal való páros összehasonlításához és a konfidencia intervallumok kiszámításához a Dunnett-Hsu teszt alkalmazható. Az esetleges kirívó esetek

detektálására és a varianciák homogenitásának értékelésére a studentizált reziduális pontok használhatók. Ezeket az eljárásokat alkalmazták az OECD validálási program során, a Statistical Analysis System (SAS Institute, Cary, NC), 8-as verzió PROC GLM funkciójának használatával (6) (7).

52. A záró jegyzőkönyvnek tartalmaznia kell:

Vizsgáló intézmény:

- a felelős személyzet és a vizsgálattal kapcsolatos felelősségi körök,
- a kiindulási pozitív kontrollvizsgálat adatai és az időszakos pozitív kontrolladatok (lásd a 26. és a 27. bekezdést).

Vizsgált vegyi anyag:

- a vizsgált vegyi anyag jellemzői,
- fizikai jelleg és adott esetben a fizikai és kémiai tulajdonságok,
- a hígítások készítésének módja és gyakorisága,
- a stabilitással kapcsolatban kapott adatok,
- az adagoló oldatok analízisei.

Vivőanyag:

- a vizsgálati vivőanyag jellemzői (jellege, szállítója és tételszáma),
- a választott vivőanyag indokolása (ha az nem víz).

Kísérleti állatok:

- faj és törzs, illetve megválasztásuk indokolása,
- szállító és konkrét szállítóeszköz,
- szállításkori életkor a születési dátummal,
- éretlen állatok esetében annak megadása, hogy anyaállattal vagy nevelt állattal együtt szállították-e őket, illetve az elválasztás dátuma,
- az állatok akklimatizációs eljárásának részletei,
- az állatok ketrecenkénti száma,
- az egyes állatok és a csoportok azonosításának részletei és módja.

A vizsgálat körülményei:

- a randomizálási folyamat részletei (az alkalmazott módszer),
- a dózis kiválasztásának indokolása,
- a vizsgált vegyi anyag formulázásával, az elért koncentrációval, a készítmény stabilitásával és homogenitásával kapcsolatos adatok,
- a vizsgált vegyi anyag adagolásának részletei és az expozíciós útvonal kiválasztásának indokolása,
- takarmány (név, típus, szállító, beltartalom, és ha ismert, a fitoösztrogének szintje),
- vízforrás (pl. csapvíz vagy szűrt víz) és a vízellátás módja (nagy tartályból csövön keresztül, palackban stb.),
- alom (név, típus, szállító, beltartalom),
- a ketreces tartás feltételeinek leírása, világítási intervallum, a helyiség hőmérséklete és páratartalma, takarítás,
- a boncolás és a méh mérlegelésére szolgáló eljárások részletes leírása,
- a statisztikai eljárások leírása.

*Eredmények**Minden egyes állat esetében:*

- egyéni testtömegek naponta (a csoportokba történő besorolástól a boncolásig) (0,1 gramm pontossággal),
- az egyes állatok életkora a vizsgált vegyi anyag adagolásának megkezdésekor (napokban számolva, a születés napját a 0. napnak tekintve),
- az egyes dózisok beadásának dátuma és időpontja,
- a beadott adagok számított térfogat és dózisa, valamint a beadás alatti vagy utáni veszteségekre vonatkozó megfigyelések,
- az állat állapotára vonatkozó napi feljegyzések, beleértve a lényeges tüneteket és megfigyeléseket,
- az elhullás feltételezhető oka (ha vizsgálat alatt haldokló vagy halott állapotban találták az állatot),
- a humánus elpusztítás dátuma és időpontja az utolsó adagolástól számított időintervallummal,
- a nedves méh tömege (0,1 mg pontossággal), valamint a boncolás és mérésére történő előkészítés alatti lumenális folyadékvesztéssel kapcsolatos megfigyelések,
- a leitatott méh tömege (0,1 mg pontossággal).

Minden állatcsoport esetében:

- átlagos napi testtömeg (0,1 mg pontossággal) és szórás (a csoportokba sorolástól a boncolásig),
- átlagos nedves méhtömeg és átlagos leitatott méhtömeg (0,1 mg pontossággal), szórások,
- ha mértük, a napi takarmányfogyasztás (elfogyasztott takarmány gramm/állat),
- a kezelési csoportok nedves és leitatott méhtömegeit a vivőanyag kontrollcsoportok megegyező adataival összehasonlító statisztikai elemzések eredményei,
- a kezelési csoportok teljes testtömegét és testtömeg-gyarapodását a vivőanyag kontrollcsoportok megegyező adataival összehasonlító statisztikai elemzések eredményei.

53. A vizsgálati módszer legfontosabb tényezőinek összefoglalása

	Patkány	Egér
Állatok		
Törzs	Általánosan használt laboratóriumi rágcsálótörzs	
Az állatok száma	Dóziscsoportonként legalább hat állat	
A csoportok száma	Legalább két tesztcsoport (útmutatásért lásd a 33. bekezdést) és egy negatív kontrollcsoport A pozitív kontrollcsoportra vonatkozó útmutatásért lásd a 26. és 27. bekezdést	
Tartási és etetési körülmények		
T° az állatok tartására szolgáló helyiségben	22 °C ± 3 °C	
Relatív páratartalom	50-60 %, de nem kevesebb, mint 30 % és nem több, mint 70 %	
Napi világítási elrendezés	12 óra világos, 12 óra sötét	
Étrend és ivóvíz	Ad libitum	

	Patkány	Egér
Tartás	Egyedileg vagy legfeljebb három egyedből álló csoportokban (éretlen állatok esetében társas csoportos tartás ajánlott)	
Étrend és alom	Az étrendben és az alomban alacsony fitoösztrogénszint ajánlott	

Protokoll

Módszer	Éretlen nem ovariectomizált módszer (előnyben részesített módszer). Ovariectomizált felnőtt nőstény módszer	Ovariectomizált felnőtt nőstény módszer
Az éretlen állatok életkora az adagoláskor	Legkorábban PND 18. Az adagolást a PND 25 előtt be kell fejezni.	A jelenlegi vizsgálati módszer szempontjából nem releváns.
Életkor az ovariectomia időpontjában	6 és 8 hetes kor között.	
Az ovariectomizált állatok életkora az adagoláskor	A petefészkek eltávolítása és az adagolás első napja között legalább 14 napnak kell eltelnie.	A petefészkek eltávolítása és az adagolás első napja között legalább 7 napnak kell eltelnie.
Testtömeg	Az állatok testtömege lehetőleg csak minimálisan térjen el egymástól, és az átlagos értéktől maximum ± 20 %-kal különbözhet.	

Adagolás

Az adagolás módja	Gyomorszonda vagy szubkután injekció	
Az adagolás gyakorisága	Napi egyszeri dózis	
Adagolandó térfogat gyomorszondához vagy szubkután injekcióhoz	≤ 5 ml/testtömeg kg (vagy max. 10 ml/testtömeg kg vizes oldat esetében) (2 injekciós helyre szétosztva a szubkután módszer esetében)	
Az adagolás időtartama	Három egymást követő nap az éretlen modell esetében Legalább három egymást követő nap az OVX-modell esetében	Hét egymást követő nap az OVX-modell esetében
Boncolás időpontja	Körülbelül 24 órával az utolsó dózis után	

Eredmények

Pozitív válasz	Az átlagos méhtömeg statisztikailag szignifikáns növekedése (nedves és/vagy leitatott)
Referencia ösztrogén	17 α -etinil-ösztadiol

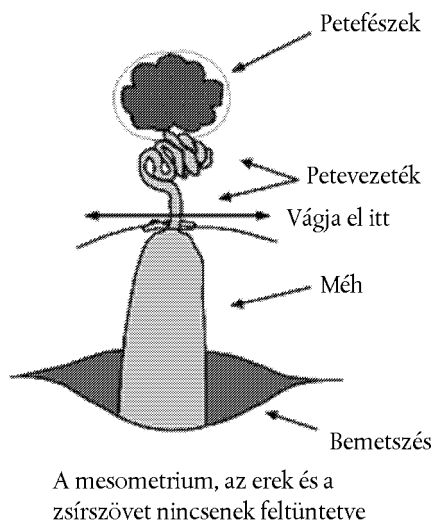
ÚTMUTATÁS AZ EREDMÉNYEK ÉRTELMEZÉSÉHEZ ÉS ELFOGADÁSÁHOZ

54. Általánosságban, az ösztrogénszerű hatás kimutatását szolgáló tesztet pozitívnak kell tekinteni, ha a méh tömege legalább a magas dózis esetében statisztikailag szignifikáns növekedést mutat ($p < 0,05$), az oldószer kontrollcsoporttal összehasonlítva. A pozitív eredményt ezenkívül alátámaszthatja, ha biológiailag elfogadható kapcsolatot lehet kimutatni a dózis és a válasz nagysága között, szem előtt tartva, hogy a vizsgált vegyi anyag egymást átfedő ösztrogén és antiösztrogén aktivitása hatással lehet a dózis-válasz görbére.
55. Ügyelni kell arra, hogy az adatok értelmezhetősége érdekében ne lépjük túl a maximális tolerált dózist. Ebből a szempontból a testtömeg csökkenését, a klinikai tüneteket és az egyéb megfigyeléseket alaposan meg kell vizsgálni.

56. Az uterotrofikus biológiai vizsgálat adatainak elfogadhatósága szempontjából fontos adat a méh tömege a vivőanyag kontrollcsoportban. A magas kontrollértékek megkérdőjelezhetik a biológiai vizsgálat érzékenységét és a nagyon gyenge ösztrogén agonisták kimutatására való képességét. A szakirodalom és az uterotrofikus biológiai vizsgálat validálása során kapott adatok azt mutatják, hogy magas kontrollátalakok spontán módon is előfordulhatnak, különösen éretlen állatokban (2) (3) (6) (9). Mivel a méh tömege éretlen patkányok esetében sok változótól függ, mint például a törzs vagy a testtömeg, nem adható meg konkrét felső érték a méh tömegére. Iránymutatásként, ha a leitatott méh tömege éretlen kontrollpatkányokban 40 és 45 mg között van, az eredményeket gyanúsítanak kell tekinteni, a 45 mg feletti méhtömegek pedig a vizsgálat megismétlését tehetik szükségessé. Ezt azonban eseti elbírálás alapján kell mérlegelni (3) (6) (8). Felnőtt patkányok vizsgálatakor a nem teljes ovariectomia után petefészekszövet maradhat vissza, amely endogén ösztrogént termelhet és késleltetheti a méh tömegének regresszióját.
57. A leitatott vivőanyag kontrollcsoportban az éretlen nőstény patkányok esetében a testtömeg 0,09 %-ánál, az ovariectomizált fiatal felnőtt nőstények esetében pedig a testtömeg 0,04 %-ánál alacsonyabb méhtömeg elfogadható eredményeket ad [lásd a 31. táblázatot (2)]. Ha a kontroll méhtömegek magasabbak ezeknél az értékeknél, akkor több tényezőt is alaposan meg kell vizsgálni, beleértve az állatok korát, az ovariectomia megfelelő kivitelezését, az étrendi fitoösztrogéneket, és így tovább, és a vizsgálat negatív eredményét (ösztrogén-aktivitásra utaló jelek nincsenek) óvatosan kell kezelni.
58. A vivőanyag kontrollcsoportra vonatkozó történeti adatokat meg kell őrizni a laboratóriumban. A pozitív referencia ösztrogénre (mint például a 17 α -etinil-ösztradiol) adott válaszokkal kapcsolatos történeti adatokat is meg kell őrizni a laboratóriumban. A laboratóriumok az ismert gyenge ösztrogén agonistákra adott válaszokat is tesztelhetik. Mindezen adatok összehasonlíthatók a rendelkezésre álló adatokkal (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) annak igazolására, hogy a laboratóriumi módszerek érzékenysége megfelelő.
59. A leitatott méhtömegek kisebb variabilitást mutattak az OECD validálási vizsgálat során, mint a nedves méhtömegek (6) (7). A bármelyik mérésben adott szignifikáns válasz azonban azt jelzi, hogy a vizsgált vegyi anyag pozitív az ösztrogénaktivitás szempontjából.
60. Az uterotrofikus válasz azonban nem teljesen ösztrogén eredetű, de az uterotrofikus biológiai vizsgálat pozitív eredményét általában úgy kell értelmezni, mint az in vivo ösztrogénpotenciál bizonyítékát, és további tisztázást kell kezdeményezni (lásd a 9. bekezdést és az »OECD Fogalmi keret az endokrin rendszert károsító vegyi anyagok tesztelésére és értékelésére« c. anyagot, 2. melléklet).

1. ábra

A petefészek műtéti eltávolításának sematikus ábrája

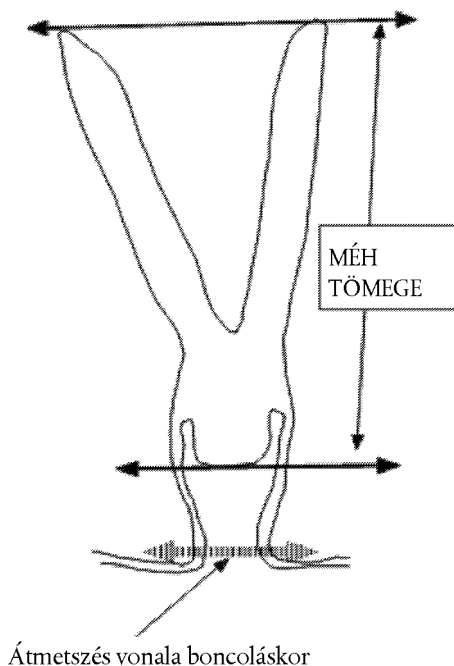


Az eljárás a dorzolaterális hasfalat az alsó bordaszél és a csípőlapát közötti felezőpontban megnyitó kb. 1 cm-es hosszanti bemetszéssel kezdődik, az ágyéki izom laterális szélétől néhány milliméterre laterálisan. A petefészeket megkeressük a hasüregben. A petefészeket kiemeljük a hasüregből egy aseptikus területre, érlelőtestet helyezünk

fel a petefészkek és a méh között a vérzés kontrollálása céljából, majd a petefészkeket a petevezetékek és a méhkürtök találkozásánál az érlekötés feletti átmetszéssel leválasztjuk. Miután meggyőződünk arról, hogy nem áll fenn jelentősebb mértékű vérzés, a hasfalat varrattal, a bőrt pedig pl. kapsokkal vagy megfelelő varrattal zárjuk. Az állatoknak a felhasználás előtt legalább 14 napot biztosítunk arra, hogy felépüljenek és a méh tömege minimálisra csökkenjen.

2. ábra

A méhszövetek eltávolítása és előkészítése a tömeg mérésére.



Az eljárás azzal kezdődik, hogy a hasfalat az ágyéki symphysisnél megnyitjuk. Ezután mindkét petefészket, ha megvannak, és a méhkürtöket leválasztjuk a dorzális hasfalról. A húgyhólyagot és húgyvezetéseket eltávolítjuk a méh és a hüvely ventrális és laterális oldaláról. A végbél és a hüvely közötti fibrózus tapadást szétválasztjuk, amíg a vagina nyílásának és a gát bőrének találkozását be nem lehet azonosítani. A hüvely falát a vagina és a perineum bőre közötti találkozás fölött átvágva a méhet és a hüvelyt leválasztjuk a testről, amint az ábrán látható. A méhet a test faláról a méhszarvak dorzolaterális aspektusához teljes hosszuk mentén csatlakozó mesenterium finom átvágásával kell lefejtetni. A testből való eltávolítást követően a felesleges zsír- és kötőszövetet lemetsszük. Ha megvannak a petefészkek, eltávolítjuk őket a petevezetésekről, elkerülve a méhszarvon keresztüli luminális folyadékvesztést. Ha az állat már ovariektomizált, a csomókat megvizsgáljuk petefészekszövet jelenlétére. A hüvelyt közvetlenül a méhnyak alatt távolítjuk el a méhről úgy, hogy a méhnyak a méhtesttel együtt maradjon, amint az ábrán látható. A méhet ezután meg lehet mérni.

1. függelék

FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

Antiösztrogenitás: egy vegyi anyag azon képessége, hogy emlőszövetekben a 17 β -ösztradiol hatását gátolja.

Vegyi anyag: egy anyag vagy keverék.

Születés napja: a 0. posztnatális nap.

Adagolás: általános fogalom, amely a dózist, valamint az adagolás gyakoriságát és időtartamát foglalja magában.

Dózis: a vizsgált vegyi anyag beadott mennyisége. Az uterotrofikus biológiai vizsgálat esetében a dózist a vizsgált vegyi anyag tömegének és a kísérleti állat egységnyi testtömegének napi hányadosaként (például mg/testtömeg kilogramm/nap) fejezzük ki.

Maximális tolerálható dózis (MTD): a vegyi anyag azon legnagyobb mennyisége, amely a szervezetbe beadva még nem pusztítja el a vizsgált állatokat (jelölése: LD₀) (IUPAC, 1993)

Ösztrogenitás: egy vegyi anyag azon képessége, hogy emlőszövetekben a 17 β -ösztradiolhoz hasonló hatást fejtsen ki.

X. posztnatális nap: az élet X. napja a születés napját követően.

Érzékenység: az összes olyan pozitív/aktív vegyi anyag aránya, amelyet a vizsgálat helyesen sorolt be. A vizsgálati módszer pontosságának olyan mérőszáma, amely kategorikus eredményre vezet, és amely fontos eszköz a vizsgálati módszer alkalmazhatóságának megítélésében.

Specifititás: a vizsgálat elvégzésével helyesen besorolt összes negatív/inaktív vizsgált vegyi anyag aránya. A vizsgálati módszer pontosságának olyan mérőszáma, amely kategorikus eredményre vezet, és amely fontos eszköz a vizsgálati módszer alkalmazhatóságának megítélésében.

Vizsgált vegyi anyag: bármely, e vizsgálati módszer alkalmazásával vizsgált anyag vagy keverék.

Uterotrofikus: a méh szöveteire gyakorolt pozitív hatás leírására használt fogalom.

Validáció: tudományos folyamat, amelynek célja egy adott vizsgálati módszer működési követelményeinek és korlátainak jellemzése, valamint megbízhatóságának és egy adott célhoz kapcsolódó relevanciájának igazolása.

2. függelék

Megjegyzés: A Test Guidelines Programme titkársága által az EDTA Task Force 6. Ülésén elért megállapodás alapján készített dokumentum

Az OECD fogalmi kerete az endokrin rendszert károsító vegyi anyagok tesztelésére és értékelésére

1. szint Rendezés és prioritások megállapítása a meglévő információk alapján	— fizikai-kémiai tulajdonságok, pl. molekulatömeg, reaktivitás, volatilitás, biológiai lebomlás — emberi és környezeti expozíció, pl. előállított volumen, kibocsátás, felhasználás módjai — veszély, pl. rendelkezésre álló toxikológiai adatok
2. szint Mechanisztikus adatokat szolgáltató <i>in vitro</i> vizsgálatok	— ER, AR, TR receptorkötődési affinitás — Transzkripció aktiválódás — Aromatáz és <i>in vitro</i> szteroidogenezis — Aril-hidrokarbon receptor felismerés/kötődés — QSAR — Magas teljesítményű előszűrés — Pajzsmirigy-funkció — Hal hepatocita VTG-vizsgálat — Egyéb (szükség szerint)
3. szint Egyetlen endokrin mechanizmusról és hatásról adatokat szolgáltató <i>in vitro</i> vizsgálatok	— Uterotróp vizsgálat (ösztrogének) — Hershberger assay (androgének) — Nem receptorok által mediált hormonfunkció — Egyéb (pl. pajzsmirigy) — Hal VTG (vitellogenin) vizsgálat (ösztrogén)
4. szint Több endokrin mechanizmusról és hatásról adatokat szolgáltató <i>in vitro</i> vizsgálatok	— kibővített OECD 407 (végpontok az endokrin mechanizmusok alapján) — hím és nőstény pubertális vizsgálatok — felnőtt ép hím vizsgálat — Hal gonadális hisztopatológiai vizsgálat — Beka metamorfózis vizsgálat
5. szint Endokrin és egyéb mechanizmusok hatásairól adatokat szolgáltató <i>in vitro</i> vizsgálatok	— 1-generációs vizsgálat (kibővített TG415)¹ — 2-generációs vizsgálat (kibővített TG416)¹ — reprodukciós szűrőteszt (kibővített TG421)¹ — kombinált 28 nap/reprodukciós szűrőteszt (kibővített TG 422)¹ ¹ A VMG mam által mérlegelendő lehetséges kibővítések — Részleges és teljes életciklus vizsgálatok halakban, madarakban, kétféltűekben és gerinctelenekben (fejlődés és reprodukció)

VMG mamm: Validation Management Group on Mammalian Testing and Assessment

MEGJEGYZÉSEK A KERETRENDSZERHEZ

1. megjegyzés: A belépés és kilépés minden szinten lehetséges és a veszély- és kockázatértékelésre szolgáló információk igények jellegétől függ
2. megjegyzés: Az 5-ös szinten az ökotoxikológiának olyan végpontokat is tartalmaznia kell, amelyek jelzik a káros hatások és a potenciális populációs károk mechanizmusait
3. megjegyzés: Amikor egy multimodális modell több egyetlen végpontú vizsgálatot lefed, ez a modell az egyetlen végpontú vizsgálatok helyébe lép
4. megjegyzés: Az egyes vegyi anyagokat eseti alapon kell értékelni, figyelembe véve az összes rendelkezésre álló információt és szem előtt tartva a keretrendszer különböző szintjeinek funkcióját.
5. megjegyzés: A keretrendszert jelenleg nem lehet mindenre kiterjedőnek tekinteni. A 3., 4. és 5. szinten olyan vizsgálatokat foglal magában, amelyek már rendelkezésre állnak vagy amelyek validálása még folyamatban van. Ami az utóbbiakat illeti, ezeket a keretrendszer ideiglenes jelleggel tartalmazza. Miután kifejlesztették és validálták ezeket, hivatalosan is bekerülnek a keretrendszerbe.
6. megjegyzés: Az 5. szintet nem lehet úgy tekinteni, hogy csak végleges tesztek tartalmaz. Az ezen a szinten szereplő tesztek úgy tekintik, hogy azok hozzájáruljanak az általános veszély- és kockázatértékeléshez

SZAKIRODALOM

- (1) OECD (1998). Report of the First Meeting of the OECD Endocrine Disrupter Testing and Assessment (EDTA) Task Force, 10th-11th March 1998, ENV/MC/CHEM/RA(98)5.
- (2) OECD (2003). Detailed Background Review of the Uterotrophic Bioassay: Summary of the Available Literature in Support of the Project of the OECD Task Force on Endocrine Disrupters Testing and Assessment (EDTA) to Standardise and Validate the Uterotrophic Bioassay. OECD Environmental Health and Safety Publication Series on Testing and Assessment No. 38. ENV/JM/MONO(2003)1.
- (3) Owens JW, Ashby J. (2002). Critical Review and Evaluation of the Uterotrophic Bioassay for the Identification of Possible Estrogen Agonists and Antagonists: In Support of the Validation of the OECD Uterotrophic Protocols for the Laboratory Rodent. Crit. Rev. Toxicol. 32:445-520.
- (4) OECD (2006). OECD Report of the Initial Work Towards the Validation of the Rodent Uterotrophic Assay – Phase 1. OECD Environmental Health and Safety Publication Series on Testing and Assessment No. 65. ENV/JM/MONO(2006)33.
- (5) Kanno, J, Onyon L, Haseman J, Fenner-Crisp P, Ashby J, Owens W. (2001). The OECD program to validate the rat uterotrophic bioassay to screen compounds for in vivo estrogenic responses: Phase 1. Environ Health Perspect. 109:785-94.
- (6) OECD (2006). OECD Report of the Validation of the Rodent Uterotrophic Bioassay: Phase 2 – Testing of Potent and Weak Oestrogen Agonists by Multiple Laboratories. OECD Environmental Health and Safety Publication Series on Testing and Assessment No. 66. ENV/JM/MONO(2006)34.
- (7) Kanno J, Onyon L, Peddada S, Ashby J, Jacob E, Owens W. (2003). The OECD program to validate the rat uterotrophic bioassay: Phase Two – Dose Response Studies. Environ. Health Persp. 111:1530-1549.
- (8) Kanno J, Onyon L, Peddada S, Ashby J, Jacob E, Owens W. (2003). The OECD program to validate the rat uterotrophic bioassay: Phase Two – Coded Single Dose Studies. Environ. Health Persp. 111:1550-1558.
- (9) Owens W, Ashby J, Odum J, Onyon L. (2003). The OECD program to validate the rat uterotrophic bioassay: Phase Two – Dietary phytoestrogen analyses. Environ. Health Persp. 111:1559-1567.
- (10) Ogasawara Y, Okamoto S, Kitamura Y, Matsumoto K. (1983). Proliferative pattern of uterine cells from birth to adulthood in intact, neonatally castrated, and/or adrenalectomized mice assayed by incorporation of [¹²⁵I]iododeoxyuridine. Endocrinology 113:582-587.
- (11) Branham WS, Sheehan DM, Zehr DR, Ridlon E, Nelson CJ. (1985). The postnatal ontogeny of rat uterine glands and age-related effects of 17 β -estradiol. Endocrinology 117:2229-2237.
- (12) Schlumpf M, Berger L, Cotton B, Conscience-Egli M, Durrer S, Fleischmann I, Haller V, Maerkl K, Lichtensteiger W. (2001). Estrogen active UV screens. SÖFW-J. 127:10-15.

- (13) Zarrow MX, Lazo-Wasem EA, Shoger RL. (1953). Estrogenic activity in a commercial animal ration. *Science*, 118:650-651.
- (14) Drane HM, Patterson DSP, Roberts BA, Saba N. (1975). The chance discovery of oestrogenic activity in laboratory rat cake. *Fd. Cosmet. Toxicol.* 13:425-427.
- (15) Boettger-Tong H, Murphy L, Chiappetta C, Kirkland JL, Goodwin B, Adlercreutz H, Stancel GM, Makela S. (1998). A case of a laboratory animal feed with high estrogenic activity and its impact on *in vivo* responses to exogenously administered estrogens. *Environ. Health Perspec.* 106:369-373.
- (16) OECD (2007). Additional data supporting the Test Guideline on the Uterotrophic Bioassay in rodents. OECD Environmental Health and Safety Publication Series on Testing and Assessment No. 67.
- (17) Degen GH, Janning P, Diel P, Bolt HM. (2002). Estrogenic isoflavones in rodent diets. *Toxicol. Lett.* 128:145-157.
- (18) Wade MG, Lee A, McMahon A, Cooke G, Curran I. (2003). The influence of dietary isoflavone on the uterotrophic response in juvenile rats. *Food Chem. Toxicol.* 41:1517-1525.
- (19) Yamasaki K, Sawaki M, Noda S, Wada T, Hara T, Takatsuki M. (2002). Immature uterotrophic assay of estrogenic compounds in rats given different phytoestrogen content diets and the ovarian changes in the immature rat uterotrophic of estrogenic compounds with ICI 182,780 or antide. *Arch. Toxicol.* 76:613-620.
- (20) Thigpen JE, Haseman JK, Saunders HE, Setchell KDR, Grant MF, Forsythe D. (2003). Dietary phytoestrogens accelerate the time of vaginal opening in immature CD-1 mice. *Comp. Med.* 53:477-485.
- (21) Ashby J, Tinwell H, Odum J, Kimber I, Brooks AN, Pate I, Boyle CC. (2000). Diet and the aetiology of temporal advances in human and rodent sexual development. *J. Appl. Toxicol.* 20:343-347.
- (22) Thigpen JE, Lockear J, Haseman J, Saunders HE, Caviness G, Grant MF, Forsythe DB. (2002). Dietary factors affecting uterine weights of immature CD-1 mice used in uterotrophic bioassays. *Cancer Detect. Prev.* 26:381-393.
- (23) Thigpen JE, Li L-A, Richter CB, Lebetkin EH, Jameson CW. (1987). The mouse bioassay for the detection of estrogenic activity in rodent diets: I. A standardized method for conducting the mouse bioassay. *Lab. Anim. Sci.* 37:596-601.
- (24) OECD (2008). Acute oral toxicity – up-and-down procedure. OECD Guideline for the testing of chemicals No 425.
- (25) OECD (2000). Guidance document on the recognition, assessment and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No 19. ENV/JM/MONO(2000)7.
- (26) OECD (2001). Guidance document on acute oral toxicity. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No 24. ENV/JM/MONO(2001)4.
- (27) Bulbring, E., and Burn, J.H. (1935). The estimation of oestrin and of male hormone in oily solution. *J. Physiol.* 85: 320 – 333.
- (28) Dorfman, R.I., Gallagher, T.F. and Koch, F.C (1936). The nature of the estrogenic substance in human male urine and bull testis. *Endocrinology* 19: 33 – 41.
- (29) Reel, J.R., Lamb IV, J.C. and Neal, B.H. (1996). Survey and assessment of mammalian estrogen biological assays for hazard characterization. *Fundam. Appl. Toxicol.* 34: 288 – 305.
- (30) Jones, R.C. and Edgren, R.A. (1973). The effects of various steroid on the vaginal histology in the rat. *Fertil. Steril.* 24: 284 – 291.
- (31) OECD (1982). Organization for Economic Co-operation and Development – Principles of Good Laboratory Practice, ISBN 92-64-12367-9, Paris.
- (32) Dorfman R.I. (1962). *Methods in Hormone Research*, Vol. II, Part IV: Standard Methods Adopted by Official Organization. New York, Academic Press.
- (33) Thigpen J. E. et al. (2004). Selecting the appropriate rodent diet for endocrine disruptor research and testing studies. *ILAR J* 45(4): 401-416.

- (34) Gray L.E. and Ostby J. (1998). Effects of pesticides and toxic substances on behavioral and morphological reproductive development: endocrine versus non-endocrine mechanism. *Toxicol Ind Health*. 14 (1-2): 159-184.
- (35) Booth AN, Bickoff EM and Kohler GO. (1960). Estrogen-like activity in vegetable oils and mill by-products. *Science*, 131:1807-1808.
- (36) Kato H, Iwata T, Katsu Y, Watanabe H, Ohta Y, Iguchi T (2004). Evaluation of estrogenic activity in diets for experimental animals using in vitro assay. *J. Agric Food Chem*. 52, 1410-1414.
- (37) OECD (2007). Guidance Document on the Uterotrophic Bioassay Procedure to Test for Antioestrogenicity. Series on Testing and Assessment. No. 71.
- (38) Az Európai Parlament és a Tanács 2010. szeptember 22-i 2010/63/EU irányelve a tudományos célokra felhasznált állatok védelméről (HL L 276., 2010.10.20., 33. o.).

B.55. HERSHBERGER BIOASSAY PATKÁNYOKBAN; GYORS SZŰRŐVIZSGÁLAT AZ (ANTI)ANDROGÉN TULAJDONSÁGOK KIMUTATÁSÁRA

BEVEZETÉS

1. Ez a vizsgálati módszer egyenértékű az OECD 441. vizsgálati iránymutatásában (2009) leírt módszerrel. 1998-ban az OECD a meglévő vizsgálati iránymutatások felülvizsgálatára, valamint az endokrin rendszert esetlegesen károsító anyagok kiszűrésére és vizsgálatára vonatkozó új vizsgálati iránymutatások kidolgozására irányuló, kiemelt fontosságú tevékenységet indított (1). A tevékenység egyik eleme a patkányok Hershberger bioassay vizsgálati iránymutatásának kidolgozása volt. A gyógyszeriparban történt több évtizedes használat után ezt a vizsgálatot először egy hivatalos szakértői bizottság szabványosította az androgén vegyszerek kimutatására szolgáló szűrővizsgálatként 1962-ben (2). A patkány Hershberger bioassay-t 2001 és 2007 között egy alapos validálási programnak vetették alá, beleértve a háttérdokumentum elkészítését (23), a részletes módszerdokumentáció összeállítását (3), a boncolási iránymutatás kifejlesztését (21) és a bioassay megbízhatóságának és reprodukálhatóságának igazolása céljából végzett kiterjedt, laboratóriumon belüli és laboratóriumok közötti vizsgálatokat. Ezeket a validálási vizsgálatokat egy erős referencia androgénnel (tesztoszteron-propionát (TP)), két erős szintetikus androgénnel (trenbolon-acetát és metil-tesztoszteron), egy erős antiandrogén gyógyszerkészítménnyel (flutamid), a természetes androgén (dihidro-tesztoszteron, DHT) szintézisének egy erős inhibitorával (finaszterid), több gyenge antiandrogén peszticiddel (linuron, vinklozolin, procimidon, p,p'-DDE), egy erős 5 α -reduktáz inhibitorral (finaszterid) és két ismert negatív vegyi anyaggal (dinitro-fenol és nonilfenol) végezték el (4) (5) (6) (7) (8). Ez a vizsgálati módszer a bioassay-vel gyűjtött hosszú történeti tapasztalatokon, a validálási tesztprogram során szerzett tapasztalatokon, valamint az ezek keretében kapott eredményeken alapul.
2. A Hershberger bioassay egy rövid távú *in vivo* szűrővizsgálat, amely a hím nemi szervek kiegészítő szöveteit használja. A vizsgálat az 1930-as évekből származik és az 1940-es években módosították, hogy beleépítsék a hím nemi szervek androgénre érzékeny izmait (2) (9-15). Az 1960-as években több mint 700 lehetséges androgént értékelték a protokoll szabványosított változatával (2) (14), és az 1960-as években ezt a vizsgálatot tartották az androgének és az antiandrogének kimutatására szolgáló standard módszernek (2) (15). A jelenlegi biológiai vizsgálat öt androgénfüggő szövet tömegének változásán alapul kasztrált peripubertális hím patkányokban. A vegyi anyagoknak az androgén agonistákéval, antagonistákéval vagy 5 α -reduktáz inhibitorokéval megegyező biológiai aktivitás kiváltására való képességét értékeli. A vizsgálati módszerbe bevont öt androgénfüggő célszövet: ventrális prosztata (VP), ondóhólyag (SV) (plusz a folyadék és a koaguláló mirigyek), levator ani-bulbocavernosus (LABC) izom, páros Cowper-mirigyek (COW), glans penis (GP). A kasztrált peripubertális hím patkányokban ezek a szövetek abszolút tömegük növekedésével reagálnak az androgénekre. Amikor ugyanezeket a szöveteket erős referencia androgén beadásával arra ösztönzik, hogy növeljék a tömegüket, mind az öt szövet abszolút tömegének csökkenésével reagál az antiandrogénekre. A Hershberger bioassay elsődleges modellje a műtétileg ivartalanított peripubertális hím állat, amelyet a Hershberger validálási program 1., 2. és 3. fázisában validáltak.
3. A Hershberger bioassay az androgén agonisták, androgén antagonisták és 5 α -reduktáz inhibitorok mechanisztikus *in vivo* szűrővizsgálatának céljára szolgál, és alkalmazását az »OECD Fogalmi keret az endokrin rendszert károsító vegyi anyagok tesztelésére és értékelésére« c. (2. függelék) összefüggésében kell szemlélni. Ebben a fogalmi keretben a Hershberger bioassay-t a 3. szint tartalmazza olyan *in vivo* vizsgálatként, amely egyetlen endokrin mechanizmusról, az (anti)androgénszerű hatásról szolgáltat adatokat. A Hershberger bioassay-t úgy használják, hogy beépítik az endokrin rendszerrel potenciálisan kölcsönhatásba lépő vegyi anyagok azonosítására szolgáló *in vitro* és *in vivo* vizsgálatssorozatba, amely végső soron az emberi egészségre vagy a környezetre gyakorolt veszélyek és kockázatok értékelését célozza.

4. Az ivartalanítással kapcsolatos állatjóléti megfontolások miatt az ép (nem ivartalanított) stimulált elválasztott hím egyedeket választották ki alternatív modellként a Hersberger bioassay-hez, hogy a kasztrálási lépés elkerülhető legyen. A stimulált elválasztott vizsgálati módszert validálták (24); a validálási vizsgálatok során azonban a Hersberger bioassay elválasztott változata a tesztelt dózisokban nem bizonyult alkalmasnak a gyenge antiandrogének androgénfüggő szervek tömegére gyakorolt hatásainak következetes értékelésére. Ezért ezt a vizsgálati módszer nem tartalmazza. Ugyanakkor figyelembe véve, hogy alkalmazása nemcsak állatjóléti előnyökkel jár, de az egyéb hatásmechanizmusokra vonatkozó információkat is nyújthat, a teszt rendelkezésre áll az OECD 115. iránymutatásában (25).

KIINDULÁSI MEGFONTOLÁSOK ÉS KORLÁTOK

5. Az androgén agonisták és antagonisták ligandumként hatnak az androgén receptorokra és aktiválhatják vagy gátolhatják a receptor által kontrollált géntranszkripciót. Ezenkívül egyes vegyi anyagok néhány androgén célszövetben gátolják a tesztoszteronnak egy hatásosabb természetes androgénre, a dihidrotesztoszteronra való átalakítását (5 α -reduktáz inhibitorok). Az ilyen vegyi anyagok egészségügyi veszélyt jelenthetnek, beleértve a reprodukív és a fejlődési hatásokat. Ezért fennáll a szabályozói igény a vegyi anyagok lehetséges androgén agonista, antagonistá vagy 5 α -reduktáz inhibitor hatásának gyors felmérésére és értékelésére. Bár informatívak, a ligandum receptor-kötődésben mért affinitása egy androgén receptorhoz vagy a riportter génnek *in vitro* transzkripció aktiválása nem az egyetlen meghatározói a lehetséges veszélynek. További tényezők lehetnek a szervezetbe történő belépéskor bekövetkező metabolikus aktiválódás és deaktiválódás, a vegyi anyag célszövetekbe történő disztribúciója, illetve a szervezetből történő kiürülése. Ennek következtében szükség van arra, hogy *in vivo*, azaz aktuális körülmények között és expozíció mellett szűrjék a vegyi anyagok lehetséges aktivitását. Az *in vivo* értékelés kevésbé fontos, ha a vegyi anyag jellemzői a felszívódás-eloszlás-metabolizmus-kiürülés (absorption-distribution-metabolism-elimination, ADME) tekintetében ismertek. Az androgénfüggő szövetek gyors és erőteljes növekedéssel reagálnak az androgének általi stimulációra, különösen a kasztrált peripubertális hím patkányokban. A rágszálófa-jokat, különösen a patkányokat, széles körben használják a kockázatok jellemzését célzó toxicitási vizsgálatokra is. Ezért az vizsgálatnak a kasztrált peripubertális patkányokat és az öt célszövetet felhasználó változata alkalmas az androgén agonisták, antagonisták és 5 α -reduktáz inhibitorok *in vivo* szűrésére.
6. A vizsgálati módszer az OECD validálási vizsgálatban alkalmazott azon protokollokon alapul, amelyeket a laboratóriumon belüli és laboratóriumok közötti vizsgálatokban megbízhatónak és reprodukálhatónak találtak (4) (5) (6) (7) (8). Ez a vizsgálati módszer mind az androgén, mind az antiandrogén eljárást bemutatja.
7. Bár az OECD Hersberger bioassay validálási program során volt némi eltérés az egyes laboratóriumok között az antiandrogének kimutatására használt TP dózisában (0,2 vagy 0,4 mg/kg/nap, szubkután injekció), alig volt különbség a két protokollváltozat között a gyenge vagy erős antiandrogén aktivitás detektálására vonatkozó képességben. Ugyanakkor egyértelmű, hogy a TP dózisa nem lehet annyira magas, hogy blokkolja a gyenge androgén receptor (AR) antagonisták hatását, vagy olyan alacsony, hogy az androgén szövetek antiandrogén egyidejű alkalmazása nélkül is csak kis növekedési választ mutassanak.
8. Az egyes androgénfüggő szövetek által adott növekedési válasz nem teljesen androgén eredetű, az androgén agonistákon kívül más vegyi anyagok is megváltoztathatják egyes szövetek tömegét. Ugyanakkor több szövet egyidejű növekedési válasza inkább androgén-specifikus mechanizmust támaszt alá. Például az erős ösztrogének magas dózisa növelhetik az ondóhólyag tömegét, az vizsgálatba bevont többi androgénfüggő szövet azonban nem ad hasonló választ. Az antiandrogén vegyi anyagok androgénreceptor antagonistaként vagy 5 α -reduktáz inhibitorokként működhetnek. Az 5 α -reduktáz inhibitoroknak változó hatásuk van, mert a hatásosabb dihidrotesztoszteronra történő konverzió szövetenként eltérő mértékű. Az 5 α -reduktáz gátló antiandrogének, mint a finaszterid, kifejezettebb hatással bírnak a ventrális prosztatában, mint más szövetekben, összehasonlítva egy potens AR antagonistával, például a flutamiddal. Ezt a szöveti válaszban megmutatkozó különbséget arra lehet használni, hogy különbséget tegyenek az AR által mediált és az 5 α -reduktáz által mediált hatásmódok között. Ezen túlmenően, az androgén receptor evolúciósan rokon az egyéb szteroid hormonok receptoraival, és ezért néhány más hormon, ha magas, szuprafiziológias dózisszinteken adagolják, képes megkötődni és antagonizálni a TP növekedést serkentő hatásait (13). Továbbá az is valószínűnek tűnik, hogy a fokozott szteroid metabolizmus és a szérumszintjének ennek következtében előálló csökkenése csökkentheti az androgénfüggő szövetek növekedését. Ezért a Hersberger bioassay pozitív eredményét az adatok bizonyító erejének mérlegelésével kell értékelni, beleértve az *in vitro* vizsgálatokat, mint például az AR és az ösztrogén receptor (ER) kötődési vizsgálatokat és a megfelelő transzkripció aktiválási vizsgálatokat, vagy más *in vivo* vizsgálatokat, amelyek hasonló androgén célszöveteket vizsgálnak, mint például a hím pubertális vizsgálat, a 15 napos ép felnőtt hím vizsgálat, vagy a 28 vagy 90 napos ismételt adagolású vizsgálatok.

9. A tapasztalat azt mutatja, hogy a xenobiotikum androgének ritkábbak, mint a xenobiotikum antiandrogének. A várakozások szerint ezért a Hershberger bioassay-t a leggyakrabban antiandrogének szűrésére fogják használni. Azonban az androgének tesztelésére szolgáló eljárás is ajánlható szteroid vagy szteroidszerű vegyi anyagok, illetve olyan vegyi anyagok esetében, amelyeknél a lehetséges androgén hatásra vonatkozó jelzés a fogalmi keret 1. vagy 2. szintjében foglalt módszerekből származik (2. számú melléklet). Hasonlóképpen, ha esetleg az 5. szintű vizsgálatokban (anti)androgén profilokkal összefüggő káros hatásokat lehet megfigyelni, akkor fel kell mérni, hogy a vegyi anyag endokrin hatásmechanizmus alapján működik-e.
10. Minden állatkísérleteken alapuló eljárást az állatgondozásra vonatkozó helyi szabványoknak megfelelően kell végrehajtani; az alábbiakban foglalt, gondozásra és kezelésre vonatkozó leírások minimális teljesítményszabványok, amelyeket a helyi szabályozások – mint például a tudományos célokra felhasznált állatok védelméről szóló 2010/63/EU európai parlamenti és tanácsi irányelv (2010. szeptember 22.) (26) – felülírnak (38). Az állatokkal való humánus bánásmódról szóló további iránymutatás a megfelelő OECD-kiadványban található (17).
11. Mint minden, kísérleti állatokat felhasználó biológiai vizsgálatnál, itt is alaposan meg kell fontolni, hogy el kell-e egyáltalán végezni ezt a vizsgálatot. Alapvetően két okból lehet egy ilyen döntést hozni:
 - magas expozíciós potenciál (a fogalmi keret 1-es szintje) vagy az *in vitro* vizsgálatokban megfigyelt (anti)androgénszerű hatásra utaló jelek (2. szint) esetén annak alátámasztását célzó vizsgálatok, hogy az ilyen hatások *in vivo* is előfordulhatnak-e,
 - a 4. vagy 5. szintű *in vivo* vizsgálatokban az (anti)androgenitással összhangban álló hatások esetén a konkrét hatásmechanizmust alátámasztó vizsgálatok, pl. annak meghatározására, hogy a hatások (anti)androgén mechanizmus miatt létezik-e fel.
12. Az ebben a vizsgálati módszerben használt fogalmak meghatározását az 1. függelék tartalmazza.

A VIZSGÁLAT ELVE

13. A Hershberger bioassay érzékenységehez minimális mennyiségű endogén androgént termelő hím állatokra van szükség. Ez ivartalanított hím állatok használatával érhető el, feltéve, hogy a kasztrálás után elegendő időt biztosítottak a célszövetek minimumra való visszafejlődéséhez és az egységes kiindulási tömeg eléréséhez. Így a potenciális androgén aktivitás szűrésekor a keringő endogén androgének szintje alacsony, a hipotalamusz-agyalapi mirigy-gonád tengely nem képes a visszacsatolási mechanizmusok révén a kompenzációra, a szövetek reagálóképessége maximális, a szövet kiindulási tömegének variabilitása pedig minimális. A potenciális antiandrogén aktivitás szűrésekor következetesebb szöveti tömeggyarapodás érhető el, ha a szöveteket referencia androgénnel stimuláljuk. Ennek eredményeként a Hershberger bioassay-hez csak 6 állatra van szükség dóziscsoportonként, míg az ép pubertáskorú vagy felnőtt hím egyedekkel végzett más vizsgálatokban dóziscsoportonként 15 hím állat vizsgálata javasolt.
14. A peripubertális hím patkányok ivartalanítását a megfelelő módon kell elvégezni az elfogadott érzéstelenítési és aszeptikus technikák alkalmazásával. A műtét utáni első néhány napban fájdalomcsillapítót kell adni műtét utáni kellemetlen érzés megszüntetéséhez. A kasztráció annak révén növeli a vizsgálat pontosságát a gyenge androgének és az antiandrogének felismerése terén, hogy megszünteti az intakt állatokban jelen lévő kompenzációs endokrin feed-back mechanizmusokat, amelyek csökkenthetik a beadott androgének és antiandrogének hatását, valamint hogy kizárja a szérumszteron-szintjének egyedek közötti nagymértékű variabilitását. Ezért a kasztráció csökkenti az ezen endokrin aktivitások szűréséhez szükséges állatok számát.
15. Amikor a szűrés potenciális androgén aktivitás detektálása céljából történik, a vizsgált vegyi anyagot tíz egymást követő napon át naponta adjuk be az állatoknak gyomorszondán át orálisan vagy szubkután (sc.) injekció formájában. A vizsgált vegyi anyagokat a kísérleti állatok legalább két kezelési csoportjának adjuk be, csoportonként egy dózisszintet használva. Az állatokat körülbelül 24 órával az utolsó dózis után felboncoljuk. Két vagy több célszerv tömegének a vivőanyag kontrollcsoportéhoz viszonyított statisztikailag szignifikáns növekedése a vizsgált vegyi anyag csoportokban azt jelzi, hogy a vizsgált vegyi anyag pozitív a potenciális androgén aktivitás szempontjából (lásd a 60. bekezdést). Az olyan androgének, mint a trenbolon, amelyeket az 5α – redukáz nem alakít át, kifejezettebb hatást gyakorolnak az LABC-re és a GP-re, mint a TP, de minden szövetnek nagyobb növekedést kell mutatnia.
16. Amikor a szűrés potenciális antiandrogén aktivitás detektálása céljából történik, a vizsgált vegyi anyagot tíz egymást követő napon át naponta adjuk be az állatoknak gyomorszondán át orálisan vagy szubkután injekció formájában, és az állatok naponta sc injekció formájában TP dózisokat is kapnak (0,2 vagy 0,4 mg/kg/nap). A

validálási programban azt állapították meg, hogy 0,2 vagy 0,4 mg/kg/nap TP-dózist is lehet használni, mivel mindkét dózis alkalmas volt az antiandrogének kimutatására, ezért az egyik dózist ki kell választani a vizsgálatban történő használat céljára. A vizsgált vegyi anyag fokozatos dózisait adjuk be a kísérleti állatok legalább három kezelési csoportjának, csoportonként egy dózisszintet használva. Az állatokat körülbelül 24 órával az utolsó dózis után felboncoljuk. Két vagy több célszerv tömegének statisztikailag szignifikáns csökkenése a vizsgált vegyi anyag plusz TP csoportban csak a TP kontrollcsoporttal összehasonlítva azt jelzi, hogy a vizsgált vegyi anyag pozitív potenciális antiandrogén aktivitásra (lásd a 61. bekezdést).

A MÓDSZER ISMERTETÉSE

A faj és a törzs kiválasztása

17. A patkányt már az 1930-as évek óta rutinszerűen használják a Hershberger bioassay-ben. Bár biológiailag valószínű, hogy a patkány és az egér hasonló válaszokat adna, a patkánymodellel szerzett 70 éves tapasztalat alapján a patkány a kiválasztott faj a Hershberger bioassay-hez. Ezenkívül, mivel a Hershberger bioassay eredménye egy hosszú távú multigenerációs vizsgálat előzménye lehet, mindkét kísérlethez csak ugyanabból a fajból és törzsből származó, azonos eredetű állatokat használhatunk.
18. Ez a protokoll lehetővé teszi a laboratóriumoknak, hogy kiválasszák a vizsgálati eljárásban alkalmazandó patkánytörzset, amelynek általánosságban ugyanannak kell lennie, mint a részt vevő laboratórium által történetileg használt törzs. Az általánosan használt laboratóriumi patkánytörzsek is használhatók; 42 napos kornál lényegesen később érő törzseket azonban nem szabad használni, mivel ezeknek a hímeknek a 42 napos korban történő kasztációja megelőzheti a glans penis tömegének mérését, amelyet csak akkor lehet elvégezni, miután a fityma elkülönült a péniszttesttől. Így a Fisher 344 patkánytól származó törzseket nem szabad használni, ritka esetektől eltekintve. A Fisher 344 patkány szexuális fejlődésének más, általánosabban használt törzsekkel, például a Sprague-Dawley- vagy a Wistar-törzsszel (16) összehasonlítva eltérő az időzítése. Ha ilyen törzset kívánnak használni, akkor a laboratóriumnak egy kicsit idősebb korban kell ivartalanítania az állatokat, és demonstrálnia kell az alkalmazott törzs érzékenységét is. A patkánytörzs kiválasztását a laboratóriumnak egyértelműen meg kell indokolnia. Ha a szűrővizsgálat egy ismételt adagolású orális vizsgálat, reprodukzív és fejlődési vizsgálat, vagy hosszú távú vizsgálat bevezetője lehet, akkor lehetőleg minden vizsgálatához ugyanabból a törzsből való, azonos eredetű állatokat kell használni.

Tartási és etetési körülmények

19. Minden eljárásnak meg kell felelnie a laboratóriumi állatgondozásra vonatkozó valamennyi helyi szabványnak. Ezek a gondozásra és kezelésre vonatkozó leírások minimális teljesítményszabványok, amelyeket a szigorúbb helyi szabályozások – mint például a tudományos célokra felhasznált állatok védelméről szóló 2010/63/EU európai parlamenti és tanácsi irányelv (2010. szeptember 22.) (26) – felülírnak (38). A kísérleti állatok tartására szolgáló helyiség hőmérsékletének 22 °C-nak (kb. ± 3 °C eltérési tartománnyal) kell lennie. A helyiség relatív páratartalmának legalább 30 %-nak kell lennie, és a takarítás időtartamától eltekintve lehetőleg ne haladja meg a 70 %-ot. A relatív páratartalom célértékének 50–60 % között kell lennie. A világítás legyen mesterséges. Naponta 12 órás világos és 12 órás sötét periódusok váltsák egymást.
20. Az állatok fiatal kora miatt és mert a patkányok társas lények, a csoportos tartás előnyösebb az elszigeteltséggel szemben. Ketrecenként két-három állat elhelyezése révén elkerülhető a zsúfoltság és a hozzá kapcsolódó stressz, amely zavarhatja a járulékos ivarszervi szövetek fejlődésének hormonális szabályozását. A szennyező anyagok eltávolítása érdekében a ketreceket alaposan meg kell tisztítani és úgy kell elrendezni, hogy minimálisra lehessen csökkenteni a ketrec elhelyezésének lehetséges hatásait. Megfelelő méretű (~2 000 négyzetcentiméter) ketrecek alkalmazásával megakadályozható a túlszűfoltóság.
21. Valamennyi állatot humánus módszerrel egyedileg kell azonosítani (pl. füljelölés vagy krotália). Az azonosításra használt módszert fel kell jegyezni.
22. A laboratóriumi takarmányt és az ivóvizet korlátozás nélkül kell biztosítani. A Hershberger bioassay-t végző laboratóriumoknak azt a laboratóriumi takarmányt kell használniuk, amelyet a vegyi anyagok tesztelése során általánosan használnak. A bioassay validálási vizsgálatában az étrendre visszavezethető hatás vagy variabilitás nem volt megfigyelhető. Az alkalmazott étrendet fel kell jegyezni és a laboratóriumi takarmány mintáját az esetleges későbbi analízishez meg kell őrizni.

Alkalmassági kritériumok az androgénfüggő szervek tömegének méréséhez

23. A validációs vizsgálat során nem találtak bizonyítékot arra, hogy a testtömeg csökkenése befolyásolta volna a célszövetek tömegének növekedését vagy csökkenését (amelyet súlyozni kellene a vizsgálatban).

24. A validálási programban sikeresen alkalmazott patkánytörzseknél az androgénfüggő szervek tömege nagyobb a nehezebb patkánytörzsekben, mint a könnyebb törzsekben. Ezért a Hershberger bioassay teljesítménykritériumai nem tartalmazzák az abszolút várt szervi tömegeket a pozitív és negatív kontrollok esetében.
25. Mivel egy szövet relatív szórása inverz kapcsolatban áll a statisztikai erővel, a Hershberger bioassay teljesítménykritériumai az egyes szövetek maximális relatív szórásán alapulnak (1. táblázat). A relatív szórások az OECD validálási vizsgálatokból származnak. Negatív kimenetek esetében a laboratóriumnak meg kell vizsgálnia a kontrollcsoport és a nagy dózisu kezelési csoport relatív szórását annak meghatározására, hogy a maximális relatív szórásra vonatkozó követelményt túllépték-e.
26. A tanulmányt meg kell ismételni, ha: 1) a kontrollcsoportban és a nagy dózisu kezelési csoportokban a tíz lehetséges egyedi relatív szórás közül három vagy több meghaladja az agonista és antagonistá vizsgálatokhoz az 1. táblázatban megadott maximumokat, és 2) legalább két célszövet marginálisan inszignifikáns volt, azaz a *r* értékek 0,05 és 0,10 között voltak.

1. táblázat

Az OECD validálási vizsgálatokban a kasztrációs modell járulékos ivarszervi célszöveti részére meghatározott legnagyobb megengedett relatív szórások ⁽¹⁾

Szövet	Antiandrogén hatás	Androgén hatás
Ondóhólyagok	40 %	40 %
Ventrális prosztata	40 %	45 %
LABC	20 %	30 %
Cowper-mirigyek	35 %	55 %
Glans penis	17 %	22 %

ELJÁRÁS

Jogszabályi megfelelés és a laboratórium vizsgálata

27. Az uterotrofikus vizsgálattal ellentétben (e melléklet B.54. fejezete) a Hershberger vizsgálat esetében a laboratórium jártasságát a vizsgálat megkezdése előtt nem kell igazolni, mert a vizsgálat szerves részeként egyidejűleg pozitív (tesztoszteron-propionát és flutamid) és negatív kontrollok is futnak.

Az állatok száma és állapota

28. Minden kezelési és kontrollcsoportnak minimum 6 állatot kell tartalmaznia. Ez az androgén és az antiandrogén protokollokra is vonatkozik.

Ivartalanítás

29. Az állatok érkezésekor először több napos akklimatizációs időszakot kell biztosítani, hogy az állatok egészségesek és életerősek legyenek. Mivel a 42 napos kor vagy a 42. posztnatális nap (PND) előtt kasztrált állatoknál még nem szükségszerűen mutatkozik a fitymaelválás, az állatokat a 42. posztnatális napon vagy azután kell ivartalanítani, nem előtte. Az állatokat altatásban ivartalanítjuk oly módon, hogy egy metszést ejtünk a herezacskón, majd mindkét herét és mellékherét eltávolítjuk az erek és a spermavezetékek lekötésével. Miután meggyőződünk arról, hogy vérzés nem lépett fel, a herezacskót varrattal vagy kapcsolokkal kell zárni. A műtét utáni első néhány napban az állatokat fájdalomcsillapítóval kell kezelni a műtét utáni kellemetlen érzést enyhítése érdekében. Ha a szállítótól ivartalanított állatokat vásároltunk, az állatok életkorát és a szexuális érettség fázisát a szállítónak kell garantálnia.

⁽¹⁾ Adott szövet relatív szórásának küszöbértékét a validálási program adott (agonista vagy antagonistá) modellt használó összes kísérletének átlagértékeihez kapcsolódó – a legkisebbtől a legnagyobbig sorba rendezett – relatív szórások grafikonjából határozták meg. A relatív szórás küszöbértékét annál a pontnál olvasták le, ahol a sorozat következő legmagasabb relatív szórásához szükséges emelkedés drámaian nagyobb volt, mint az előző néhány relatív szórásnál – a »töréspont«. Meg kell jegyezni, hogy bár ez az elemzés viszonylag megbízható »töréspontokat« azonosított a vizsgálat antagonistá modelljéhez, az agonista vizsgálat során nyert relatív szórások görbéi sokkal egyenletesebb növekedést mutattak, ami a relatív szórás küszöbértékének e módszerrel történő azonosítását némileg önkényessé teszi.

Ivartalanítás utáni akklimatizáció

30. Az állatoknak a kasztrálás után legalább 7 napig folytatniuk kell a laboratóriumi körülményekhez való akklimatizációt, hogy lehetővé váljon a célszövetek tömegének regressziója. Az állatokat naponta meg kell vizsgálni és a betegség vagy fizikai rendellenesség tüneteit mutató állatokat el kell távolítani. Így a kezelést az adagolás (vizsgált anyag) megkezdésével már PND 49 napos korban el lehet kezdeni, de nem később, mint PND 60. A boncoláskori életkor nem lehet nagyobb, mint PND 70. Ez a rugalmasság lehetővé teszi a laboratórium számára, hogy hatékony menetrendet alakítson ki a kísérleti feladatok elvégzéséhez.

A testtömeg és a csoportokba randomizálás

31. Az egyedi testtömegek közötti különbségek az állatcsoportokon belül és a csoportok között is eltéréseket eredményeznek a szövetek tömegében. A szöveti tömeg variabilitásának növekedése megnövekedett relatív szórást eredményez és csökkenti a vizsgálat statisztikai erejét (ezt nevezik néha vizsgálati érzékenységnak). Ezért a testtömeg eltéréseit kísérletileg és statisztikailag is kontrollálni kell.
32. A kísérleti szabályozás kis testtömeg-eltérések előállítását jelenti a vizsgálati csoporton belül és a csoportok között. Először is, a szokatlanul kicsi vagy nagy állatokat kerülni kell, az ilyenek nem kerülhetnek be a vizsgálati állományba. A vizsgálat megkezdésekor a felhasznált állatok tömegének variabilitása nem haladhatja meg az átlagos testtömeg $\pm 20\%$ -át (pl. $175\text{ g} \pm 35\text{ g}$ peripubertális kasztrált patkányok esetében). Másodszor, az állatokat a randomizált súlyeloszlás módszerével kell besorolni a csoportokba (mind a kontroll-, mind a kezelési csoportokba), hogy az egyes csoportok átlagos testtömege statisztikailag ne különbözzön a többi csoportétól. Az alkalmazott blokkrandomizálási eljárást fel kell jegyezni.
33. Mivel a toxicitás csökkentheti a kezelési csoportok testtömegét a kontrollcsoportéhoz viszonyítva, a vizsgált vegyi anyag adagolásának első napján mért testtömeget lehet statisztikai kovariánsként használni a boncoláskor mért testtömeg helyett.

Adagolás

34. Annak megállapítása érdekében, hogy a vizsgált vegyi anyag rendelkezik-e *in vivo* androgénszerű hatással, két dóziscsoport plusz egy pozitív és egy vivőanyag (negatív) kontrollcsoport (lásd a 43. bekezdést) általában elegendő, ezért állatjóléti okok miatt ezt az elrendezést előnyben részesítik. Amennyiben a cél a dózis-válasz görbe felállítása vagy az alacsonyabb dózisokra történő extrapoláció, akkor legalább 3 dóziscsoportra van szükség. Ha az androgénaktivitás azonosításán túlmenő információra van szükség (például a hatóérték becslésére), eltérő adagolási rend alkalmazását kell megfontolni. Antiandrogének tesztelése esetén a vizsgált vegyi anyagot referencia androgén agonistával együtt adjuk be. Legalább 3, a vizsgált vegyi anyag különböző dózisaival kezelt vizsgálati csoportot, valamint egy pozitív és egy negatív kontrollcsoportot (lásd a 44. bekezdést) kell használni. A kontrollcsoportba tartozó állatokat a vizsgált vegyi anyag beadásától eltekintve ugyanolyan módon kell kezelni, mint a vizsgálati csoportokban lévőket. Ha a vizsgált vegyi anyag beadásához vivőanyagot alkalmazunk, a kontrollcsoportnak a vivőanyagból a kezelési csoportokban használt legnagyobb mennyiséget kell kapnia.
35. Valamennyi adagolási szint ajánlásánál és kiválasztásánál figyelembe kell venni a vizsgált, vagy az azzal rokon vegyi anyagok toxicitására és (toxiko)kinetikájára vonatkozóan rendelkezésre álló adatokat. A legnagyobb adag esetében először az LD50 és/vagy az akut toxicitási információkat kell figyelembe venni az állatok elhullásának, illetve súlyos szenvedésének vagy szorongásának elkerülése érdekében (17) (18) (19) (20), másrészt figyelembe kell venni a szubkrónikus és krónikus vizsgálatokban használt dózisokra vonatkozó információkat. Általánosságban, a legmagasabb dózis nem idézheti elő az állatok testtömegének a kontroll testtömeg 10% -ánál nagyobb mértékű csökkentését. A legmagasabb dózis vagy 1) az a legmagasabb dózis, amely biztosítja az állatok túlélését és amely 10 egymást követő napon maximum $1\,000\text{ mg/kg/nap}$ dózisban beadva nem okoz jelentős toxicitást vagy szorongást az állatoknak (lásd a 36. bekezdést) vagy – ha ez az alacsonyabb – 2) az (anti)androgén hatást kiváltó dózis. Szűrőként a dózisok közötti nagy intervallumok is elfogadhatók, pl. fél log egység, amely $3,2$ dózisprogresszióknak felel meg, vagy akár egy log egység is. Ha nem állnak rendelkezésre megfelelő adatok, akkor dózisbehatároló-vizsgálatot (lásd a 37. bekezdést) lehet végezni az alkalmazandó dózisok meghatározása céljából.

Határdózis

36. Ha az $1\,000\text{ mg/testtömeg kg/nap}$ határdózis és egy alacsonyabb dózis az ebben a vizsgálatban leírt eljárások alkalmazása mellett nem idéz elő statisztikailag szignifikáns változást a reprodukív szervek tömegében, akkor a további dóziszintek feleslegesnek tekinthetők. A határdózis alkalmazandó, kivéve, ha az emberi expozícióra vonatkozó adatok ennél nagyobb adagolási szint használatát indokolják.

A dózisbehatárolás szempontjai

37. Ha szükséges, néhány állattal előzetes dózisbehatároló vizsgálatot lehet végezni a megfelelő dóziscsoportok kiválasztásához [az akut toxicitási vizsgálat módszereit használva (e melléklet B.1.a. és B.1.b. fejezete (27), OECD TG 425 (19))]. A Hershberger bioassay esetében a cél olyan dózisok kiválasztása, amelyek biztosítják az állatok túlélését és amelyek nem okoznak jelentős toxicitást vagy szorongást az állatoknak a vegyi anyag tíz egymást követő napon legfeljebb 1000 mg/kg/nap határdózisban történő adagolása alatt, a 35. és 36. bekezdésben megadottak szerint. Ebben a tekintetben az OECD iránymutatását (25) lehet használni, amely meghatározza az állatokban jelentkező toxicitásra vagy szorongásra utaló klinikai tüneteket. Ha a tíznapos adagolással járó dózisbehatároló vizsgálatban megvalósítható, a célszöveteket körülbelül 24 órával az utolsó dózis adagolása után lehet kimetszeni és megmérni. Ezeket az adatokat azután arra lehet használni, hogy segítsék a dózisok kiválasztását a fő vizsgálatban.

Referencia vegyi anyagok és vivőanyag

38. A referencia androgén agonista a tesztoszteron-propionát (TP) kell legyen, CAS-szám: 57-82-5. A referencia TP-dózis 0,2 mg/testtömeg kg/nap vagy 0,4 mg/testtömeg kg/nap lehet. A referencia androgén antagonistá a flutamid (FT) kell legyen, CAS-szám: 1311-84-7. A referencia FT-adag 3 mg/testtömeg kg/nap kell legyen és az FT-t a referencia TP adagolásával együtt kell alkalmazni.
39. Ahol csak lehetséges, először valamilyen vizes oldat/szuszpenzió használatát kell megfontolni. De mivel számos androgén ligandum vagy azok metabolikus prekursorai hidrofóbok, a leggyakoribb megközelítés az, hogy olajos oldatot/szuszpenziót használnak (pl. kukorica-, mogoró-, szezám- vagy olívaolaj). A vizsgált vegyi anyagokat fel lehet oldani minimális mennyiségű 95 %-os etanolban vagy más megfelelő oldószerben, majd a vizsgálati vivőanyaggal felhígítani a végső munkakonzentrációra. Az oldószer toxikus jellemzőit ismerni kell, és le is kell tesztelni egy külön csak oldószert tartalmazó kontrollcsoportban. Ha a vizsgált anyag stabilnak tekinthető, enyhe melegítést és erőteljes mechanikai hatást is lehet használni a vizsgált vegyi anyag feloldása során. Meg kell határozni azt is, hogy a vizsgált vegyi anyag mennyire stabil az adott vivőanyagban. Ha a vizsgált vegyi anyag stabil marad a vizsgálat időtartama alatt, akkor elő lehet állítani a vizsgált vegyi anyag kiindulási aliquotját, és a meghatározott adagolási hígításokat naponta el lehet készíteni, gondosan ügyelve arra, hogy elkerüljük a minták szennyeződését és állagromlását.

A dózisok beadása

40. A TP-t szubkután injekció formájában, az FT-t gyomorszondán át kell beadni.
41. A vizsgált vegyi anyagot orális szondán keresztül vagy szubkután injekció formájában adagoljuk. Az állatjóléti szempontokat és a vizsgálati vegyi anyag fizikai/kémiai tulajdonságait figyelembe kell venni a beadás módjának kiválasztásakor. Ezenkívül a toxikológiai szempontokat, mint például a vegyi anyaggal való emberi expozíciós úttal kapcsolatos relevanciát (pl. gyomorszonda a lenyelés modellezésére, bőr alá adott injekció a belégzés vagy bőrön át történő adszorpció modellezésére) és az anyagcserével és a kinetikával kapcsolatban rendelkezésre álló toxikológiai információkat és adatokat (pl. first pass metabolizmus elkerülése, jobb hatások adott útvonalon keresztül) egyaránt figyelembe kell venni, mielőtt kiterjedt, hosszú távú tesztelést kezdeményeznénk, ha az injekciós adagolás pozitív eredményt adott.
42. Az állatokat azonos módon és tíz egymást követő napon át körülbelül 24 órás időközönként kell kezelni. Az adagolási szintet naponta be kell állítani az egyidőben történő napi testtömeg-mérések alapján. Az adag térfogatát és az adagolás időpontját az expozíció minden napján fel kell jegyezni. Ügyelni kell arra, hogy az adatok értelmezhetősége érdekében ne lépjük túl a 35. bekezdésben megadott maximális dózist. A testtömeg csökkenését, a klinikai tüneteket és az egyéb megfigyeléseket alaposan meg kell vizsgálni ebből a szempontból. Az orális gyomorszondázáshoz gyomorszondát vagy megfelelő intubációs kanült kell használni. Az egy alkalommal beadható folyadék maximális mennyisége a kísérleti állat méretétől függ. A állatgondozásra vonatkozó helyi iránymutatásokat be kell tartani, de a volumen nem haladhatja meg az 5 ml/testtömeg kg értéket, kivéve a vizes oldatok esetében, ahol 10 ml/testtömeg kg volument lehet használni. A szubkután injekció esetében a dózisokat a dorsocapuláris és/vagy a lumbális régióba kell beadni steril (pl. 23-as vagy 25-ös méretű) tűvel és tuberkulin fecskendővel. Az injekció beadásának helyén a borotválás nem kötelező. Minden veszteséget, a beadás helyén történt szivárgást vagy nem teljes adagolást fel kell jegyezni. A patkányonként naponta injektált anyag teljes térfogata nem haladhatja meg a 0,5 ml/testtömeg kg mennyiséget.

Az androgén agonistákra vonatkozó különleges eljárások

43. Az androgén agonisták tesztelése esetében a vivőanyag a negatív kontroll, a TP-vel kezelt csoport pedig a pozitív kontroll. Az androgén agonistáknak megfelelő biológiai aktivitást egy vegyi anyag beadásával teszteljük, amelyet 10 egymást követő napon át kell adni a kezelési csoportoknak a kiválasztott dózisokban. A vizsgált vegyi anyag csoportokban lévő állatok öt járulékos ivarszervi szövetének tömegét összehasonlítjuk a vivőanyag csoportéval a statisztikailag szignifikáns tömegnövekedés kimutatása céljából.

Az androgén antagonistákra és 5 α -reduktáz inhibitorokra vonatkozó különleges eljárások

44. Az androgén antagonisták és az 5 α -reduktáz inhibitorok tesztelése esetében a TP-kezelt csoport a negatív kontroll, az FT és TP referencia dózisaival együttesen kezelt csoport pedig a pozitív kontroll. Az androgén antagonistáknak és 5 α -reduktáz inhibitoroknak megfelelő biológiai aktivitást a TP referencia dózisének és a vizsgált anyag-
nak 10 egymást követő napon át történő beadásával tesztelik. A TP plusz vizsgált vegyi anyag csoportokban lévő állatok öt járulékos ivarszervi szövetének tömegét összehasonlítják a csak referencia TP-t kapó csoportéval a statisztikailag szignifikáns tömegcsökkenés kimutatása céljából.

MEGFIGYELÉSEK**Klinikai megfigyelések**

45. Általános klinikai megfigyeléseket legalább naponta kell végezni, vagy gyakrabban, ha toxicitás jelei figyelhetők meg. A megfigyeléseket lehetőleg minden nap ugyanabban az időpontban vagy időpontokban kell végezni, figyelembe véve az adagolást követően várható hatások csúcsidezeit. Valamennyi állatot meg kell figyelni a mortalitás és morbiditás előfordulására, valamint az általános klinikai tünetekre, mint például a bőr, a szőrzet, a szemek és a nyálkahártyák állapota, a váladékok és kiválasztott anyagok előfordulása, valamint az autonóm aktivitás (például könnyezés, szőrzet felborzolódása, pupillaméret, szokatlan légzési ritmusok) tekintetében megfigyelhető változásokra.
46. Az elhullott állatokat adatelemzés nélkül kell eltávolítani és ártalmatlanítani. Az állatok boncolás előtti bármilyen mortalitását fel kell jegyezni, együtt a mortalitás nyilvánvaló okával. A moribund állatokat humánus módon el kell pusztítani. A moribund állapotú, majd elpusztított állatokat bele kell venni a vizsgálati jegyzőkönyvbe a morbiditás nyilvánvaló okával együtt.

Testtömeg és takarmányfogyasztás

47. Minden állatot naponta meg kell mérni 0,1 gramm pontossággal, közvetlenül a kezelés megkezdése előtt, azaz amikor az állatokat beosztják a csoportokba. Opcionális mérésként a kezelési időszak alatt elfogyasztott takarmány mennyiségét is meg lehet mérni a takarmányadagoló súlyának ketrecenkénti megméréssel. A takarmányfogyasztási eredményeket gramm/patkány/nap értékben kell megadni.

A szövetek és szervek boncolása és tömegének mérése

48. Körülbelül 24 órával a vizsgált anyag utolsó beadását követően a patkányokat el kell altatni és ki kell véreztetni a vizsgálatot végző laboratórium normál eljárása szerint, majd boncolást kell végezni. A humánus elpusztításra használt módszert fel kell jegyezni a laboratóriumi jegyzőkönyvben.
49. Ideális esetben a csoportok közötti boncolási sorrend véletlenszerűen kerül meghatározásra, hogy el lehessen kerülni a kezelési csoportok közvetlenül felfelé vagy lefelé irányuló progresszióját, ami befolyásolhatná az adatokat. A boncoláskor tett megállapításokat, azaz a kóros elváltozásokat/látható léziókat fel kell jegyezni és jegyzőkönyvezni kell.
50. Az öt androgénfüggő szövet (VP, SV, LABC, COW, GP) tömegét meg kell mérni. Ezeket a szövetmintákat ki kell metszeni, gondosan el kell távolítani róluk a felesleges tapadó szöveteket és a zsírt, majd meg kell határozni azok friss (fixálatlan) tömegét. Minden szövetet különös gondossággal kell kezelni, hogy elkerüljük a folyadékvesztéseket és a kiszáradást, amelyek jelentős hibákat és variabilitást okozhatnak a feljegyzett tömegek csökkentése révén. A

szövetek közül több nagyon kicsi vagy nehezen boncolható lehet, és ez variabilitást eredményezhet. Ezért fontos, hogy a járulékos ivarszervi szövetek boncolását végző személyek ismerjék ezeknek a szöveteknek a standard boncolási eljárásait. A boncolás szabványos műveleti eljárásainak (standard operating procedure, SOP) kézikönyve beszerezhető az OECD-től (21). A SOP útmutató szerinti körütekintő képzés minimalizálja a variabilitás potenciális forrásait a vizsgálatban. Ideális esetben ugyanaz a kórboncnok legyen felelős egy adott szövet boncolásáért, hogy kiküszöbölhető legyen a személyek közötti különbség a szövetek feldolgozása során. Ha ez nem lehetséges, a boncolást úgy kell megtervezni, hogy az egyes kórboncnokok egy adott szövetet boncoljanak az összes kezelési csoportban, és ne egy kórboncnok boncoljon minden szövetet a kontrollcsoportban, miközben valaki más a felelős a kezelési csoportokért. Mindegyik járulékos ivarszervi szövetet leitatás nélkül kell megmérni 0,1 gramm pontossággal, majd a kapott értékeket minden állatnál fel kell jegyezni.

51. A szövetek közül több nagyon kicsi vagy nehezen boncolható lehet, és ez variabilitást eredményezhet. A korábbi vizsgálatok eltérő relatív szórásokat jeleztek, amelyek különbözőek lehetnek a laboratórium jártasságától függően. Néhány esetben nagy különbségeket figyeltek meg a szövetek, például a VP és COW abszolút tömegében, egy adott laboratóriumon belül is.
 52. A máj, a páros vese és a páros mellékvese tömegének mérése választható. A szövetekről itt is el kell távolítani a rátapadó fasciát és zsírt. A májat meg kell mérni 0,1 gramm pontossággal és az eredményt fel kell jegyezni, a páros vesét és a páros mellékvesét meg kell mérni a 0,1 gramm pontossággal és az eredményt fel kell jegyezni. Amellett, hogy a májat, a vesét és a mellékveséket befolyásolják az androgének, ezek a szervek a szisztémás toxicitásnak is hasznos jelzői.
 53. A szérumluteinizáló hormon (LH), tüszőstimuláló hormon (FSH) és a tesztoszteron (T) szintjének mérése választható. A szérum T-szintek segítenek annak meghatározásában, hogy a vizsgált vegyi anyag kiváltja-e a tesztoszteron metabolizmusát a májban, csökkentve ezáltal a szérumban mérhető szintet. A T-adatok nélkül az ilyen hatás egy antiandrogén mechanizmuson keresztül megvalósuló hatásnak tűnhet. Az LH-szint információt szolgáltat egy antiandrogén azon képességéről, hogy a szervek tömegének csökkentése mellett befolyásolja a hipotalamusz-hipofízis funkciót is, ami a hosszú távú vizsgálatokban heredaganatot válthat ki. Az FSH hormon fontos szerepet játszik a spermatogenezisben. A szérum T4 és T3 szintén választható mérések, amelyek hasznos kiegészítő információt szolgáltathatnak a vegyi anyagok azon képességéről, hogy megzavarják a pajzsmirigyhormonok homeosztázisát. Ha hormonméréseket kell végezni, a patkányokat boncolás előtt anesztetizálni kell és vért kell venni szívpunkcióval, az érzéstelenítési módszert óvatosan megválasztva, hogy ne befolyásolja a hormonmérést. A szérum előkészítésének módszerét, a radioimmunoassay vagy egyéb mérési készletek forrását, az analitikai eljárásokat és az eredményeket fel kell jegyezni. Az LH-szinteket ng/szérum ml mértékegységben kell jegyzőkönyvezni, a T-szinteket szintén.
 54. A szövetek boncolását fotókkal kiegészített részletes boncolási útmutató formájában kiegészítő anyagként tették közzé a validálási program részeként (21). A boncolást bemutató videó is megtalálható a Korea Food and Drug Administration weblapján (22).
- Az állatot ventrális felületével felfelé fektetve határozzuk meg, hogy a pénisz fitymája elvált-e már a pénisz makkjától. Ha igen, akkor húzzuk vissza a fitymát és távolítsuk el a pénisz makkját, majd mérjük meg (0,1 mg pontossággal) és jegyezzük fel a tömegét.
 - Nyissuk fel a hasi bőrt és a hasfalat, és tárjuk fel a zsigereket. Ha választható szerveket kell mérni, vegyük ki és mérjük meg a májat 0,1 g pontossággal, ezután távolítsuk el a gyomrot és a beleket, majd távolítsuk el és mérjük meg a páros veséket és a páros mellékveséket is 0,1 mg pontossággal. Ez a boncolási technika felfedi a húgyhólyagot és megkezdí a járulékos ivarszervi célszövetek boncolását.
 - A VP boncolásához különítsük el a húgyhólyagot a ventrális izomrétegtől a kötőszövetnek a középvonal mentén történő átvágásával. Mozdítsuk el a húgyhólyagot anterior irányba az ondóhólyagok (SV) felé, felfedve a ventrális prosztata bal és jobb lebenyét (amelyeket zsírréteg fed). Óvatosan fejtjük fel a zsírt a VP jobb és bal lebenyéről. Óvatosan mozdítsuk el a VP jobb lebenyét a húgycsőről és metsszük le a lebenyt a húgycsőről. Miközben még mindig kézben tartjuk a VP jobb lebenyét, óvatosan mozdítsuk el a VP bal lebenyét a húgycsőről, majd metsszük le, ezután pedig mérjük le 0,1 mg pontossággal és jegyezzük fel a tömeget.
 - Az ondóhólyagok és a koaguláló mirigyek (seminal vesicles plus coagulating glands, SVCG) boncolásakor mozdítsuk el a húgyhólyagot kaudális irányba, felfedve az ondóvezeteket és az ondóhólyag és a koaguláló mirigyek (SVCG) jobb és bal lebenyeit. A folyadék szivárgását érfogóval akadályozzuk meg az SVCG tövéénél, ahol az ondóvezeték a húgycsőhöz csatlakozik. Óvatosan metsszük le az SVCG-t, majd az érfogót a helyén tartva távolítsuk el a zsírt és a kapcsolódó anatómiai képleteket, ezután pedig helyezzük le a mérőtálcába, távolítsuk el az érfogót, mérjük le 0,1 mg pontossággal és jegyezzük fel a tömeget.

- A levator ani plusz bulbocavernosus izmok (levator ani plus bulbocavernosus muscles, LABC) boncolásakor fel kell tárni az izmokat és a pénisz bázisát. Az LA izmok körbeveszik a vastagbelet, míg az elülső LA és BC izmok a bulbus penishez kapcsolódnak. A bőrt, illetve a pénisz bázisa és a végbélnyílás anterior vége közötti perianális adnexumot távolítsuk el. A BC izmokat fokozatosan metsszük le a bulbus penistről és a szövetekről. A vastagbelet kettévágjuk és a teljes LABC-t kiboncoljuk és eltávolítjuk. Az LABC-t megtisztítjuk a zsírtól és adnexumtól, majd megmérjük 0,1 mg pontossággal és a tömeget feljegyezzük.
 - Az LABC eltávolítása után a kerek Cowper- vagy bulbourethrális mirigyek (COW) láthatóvá válnak a bulbus penis alapjánál, attól kissé dorzálisan. Gondos boncolásra van szükség, hogy a folyadékcsízárgás megelőzése érdekében elkerülhető legyen a vékony kapszula bemetszése. Mérjük meg a páros COW-t 0,1 mg pontossággal és jegyezzük fel a tömeget.
 - Ezenkívül, ha bármely mirigyből folyadékvesztés történik a boncolás és kimetszés során, azt fel kell jegyezni.
55. Ha a vegyi anyag értékelése az ésszerűnél több állat felboncolását igényli egyetlen napon belül, a vizsgálat kezdetét szét lehet osztani két egymást követő napra, ami a boncolás és a kapcsolódó munkák két napra történő szétosztását is eredményezi. A vizsgálat ilyen módon való elosztása esetén kezelési csoportonként csak az állatok egyik felét kell használni naponta.
56. A tetemeiket a boncolást követően megfelelő módon meg kell semmisíteni.

JEGYZŐKÖNYVEZÉS

Adatok

57. Az adatokat egyedenként (pl. testtömeg, járulékos ivarszervi szövetek tömege, választható mérések, egyéb válaszok és megfigyelések) vagy állatcsoportonként (az összes mérési átlagai és szórása) kell jegyzőkönyvezni. Az adatokat táblázatos formában kell összefoglalni. Az adatoknak tartalmazniuk kell az állatok számát a vizsgálat kezdetén, a vizsgálat alatt elhullott vagy toxicitás jeleit mutató állatok számát, a megfigyelt toxicitási tünetek leírását, beleértve a fellépés időpontját, időtartamát és súlyosságát.
58. A záró jegyzőkönyvnek tartalmaznia kell:

Vizsgáló intézmény

- létesítmény neve, helye,
- vizsgálatvezető és egyéb személyzet, valamint a vizsgálattal kapcsolatos felelősségi körök,
- a vizsgálat kezdetének és végének időpontja, vagyis a vizsgált vegyi anyag adagolásának első napja és a boncolás utolsó napja.

Vizsgált vegyi anyag

- beszerzési forrás, tételszám, azonosítás, tisztaság, szállító teljes címe, vizsgált vegyi anyag(ok) jellemzése,
- fizikai jelleg és adott esetben a fizikai és kémiai tulajdonságok,
- tárolási körülmények és a hígítás készítésének módja és gyakorisága,
- a stabilitással kapcsolatban kapott adatok,
- az adagoló oldatok/szuszpenziók analízisei.

Vivőanyag

- a vivőanyag jellemzői (azonosítás, szállító és tételszám),
- a választott vivőanyag indokolása (ha az nem víz).

Kísérleti állatok és állattenyésztési eljárások

- az alkalmazott faj/törzs és megválasztásuk indoklása,
- az állatok forrása vagy szállítója teljes címmel,
- a szállított állatok száma és életkora,

- tartási körülmények (hőmérséklet, megvilágítás stb.),
- takarmány (név, típus, szállító, tételszám, beltartalom, és ha ismert, a fitoösztrogének szintje),
- alom (név, típus, szállító, beltartalom),
- körülmények és az állatok száma a ketrecben.

A vizsgálat körülményei

- életkor a kasztráció időpontjában és az akklimatizáció időtartama a kasztrálás után,
- az egyes állatok testsúlya a vizsgálat kezdetekor (0,1 g pontossággal),
- a randomizáció folyamata és a vivőanyag, referencia, valamint a vizsgált vegyi anyag csoportokba és ketrecekbe való besorolás jegyzőkönyve,
- a testtömegek átlaga és szórása az egyes csoportban a vizsgálat valamennyi mérési napján,
- a dózis kiválasztásának indoka,
- a vizsgált vegyi anyag beadási módja és az expozíciós útvonal kiválasztásának indoklása,
- ha a vizsgálat antiandrogén hatás kimutatását célozza, a TP-kezelés (dózis és térfogat),
- a vizsgált vegyi anyaggal történt kezelés (dózis és térfogat),
- az adagolás időpontja,
- boncolási eljárások, ideértve a kivéreztetés és az érzéstelenítés eszközeit,
- ha szérumanalízist végeznek, a módszer részleteit meg kell adni. Például, ha RIA-t használnak, jegyzőkönyvezni kell a RIA eljárást, a RIA-készlet forrását, a készlet lejárati dátumait, a szcintillációs számlálási és a standardizálási eljárást.

Eredmények

- minden állat napi megfigyelése az adagolás során, egyebek mellett az alábbi szempontokból:
- testtömeg (0,1 g pontossággal),
- klinikai tünetek (ha vannak),
- a takarmányfogyasztásra vonatkozó bármely mérés vagy feljegyzés,
- boncolási megfigyelések állatonként, egyebek mellett:
- a boncolás dátuma,
- a kezelési állatcsoport,
- az állat azonosítója,
- a kórbocnok,
- a boncolás és kimetszés időpontja,
- az állat kora,
- végső testtömeg a boncoláskor, bármilyen statisztikailag szignifikáns növekedés vagy csökkenés megadásával,
- az állat kivéreztetésének rendje és a boncolás során történő kimetszés rendje,
- az öt androgén-dependens célszövet tömege:
- ventrális prosztata (0,1 mg pontossággal),
- ondóhólyag és koaguláló mirigyek, beleértve a folyadékot (páros szervek, 0,1 mg pontossággal),
- levator ani plusz bulbocavernosus izom komplex (0,1 mg pontossággal),
- Cowper-mirigyek (friss tömeg – páros szerv, 0,1 mg pontossággal),
- glans penis (friss tömeg 0,1 mg pontossággal),

- választható szövetek tömege, ha ilyen is történt;
- máj (0,1 mg pontossággal),
- vese (páros szerv, 0,1 mg pontossággal),
- mellékvese (páros, 0,1 mg pontossággal),
- általános megjegyzések és észrevételek,
- szérumszint hormonok analízise, ha ilyen is történt,
 - szérumszint LH (választható – ng/szérumszint ml),
 - szérumszint T (választható – ng/szérumszint ml),
- általános megjegyzések és észrevételek.

Az adatok összegzése

Az adatokat táblázatos formában kell összefoglalni, amely tartalmazza a minta méretét az egyes csoportok esetén, az átlagos értéket és az átlag vagy a szórás standard hibáját. A táblázatoknak tartalmazniuk kell a boncoláskor mért testtömegeket, a testtömeg változását az adagolás kezdetétől a boncolásig, a cél járulékos ivarszervi szövetek tömegét és a választható szervek tömegét.

Az eredmények tárgyalása

Az eredmények elemzése

59. A test és a szervek boncoláskor mért tömegén – szükség esetén megfelelő adatátalakítással – statisztikai elemzést kell végezni különféle jellemzőkre, mint például a variancia homogenitására. A kezelési csoportokat össze kell hasonlítani a kontrollcsoporttal olyan technikák használatával, mint például az ANOVA, amelyet páros összehasonlításnak (pl. egyoldali Dunnett-teszt) és a statisztikai különbség kritériumának kell követnie, például $p \leq 0,05$. Azonosítani kell a statisztikai szignifikanciát elérő csoportokat. A »relatív szerv« tömegeket azonban kerülni kell az ilyen adatmanipuláció alapjául szolgáló érvénytelen statisztikai feltételezések miatt.
60. Androgén agonizmus esetén a kontrollnak a csak vivőanyagot kapó tesztcsoportnak kell lennie. A vizsgált vegyi anyag hatásmechanizmusának jellemzői eltérő relatív válaszokhoz vezethetnek a szövetek között, például a trenbolonnak, amelyet az 5-alfa-reduktáz nem alakít át, kifejezettebb hatása van a LABC-re és a GP-re, mint a TP-nek. Az öt androgénfüggő célszövet (VP, LABC, GP, CG és SVCG) közül bármelyik kettő vagy több tömegének statisztikailag szignifikáns növekedését ($p \leq 0,05$) pozitív androgén agonista eredménynek kell tekinteni, és valamennyi célszövetnek bizonyos mértékű fokozott növekedést kell mutatnia. A járulékos ivarszervek (accessory sex organs, ASO) szöveti válaszainak kombinált értékelését megfelelő sokváltozós adatelemzéssel lehet elvégezni. Ez javíthatja az elemzést, különösen azokban az esetekben, ahol csak egyetlen szövet ad statisztikailag szignifikáns választ.
61. Androgén antagonizmus esetében a kontrollnak a referencia androgénnel (csak tesztoszteron-propionát) kezelt csoportnak kell lennie. A vizsgált vegyi anyag hatásmechanizmusának jellemzői eltérő relatív válaszokhoz vezethetnek a szövetek között, például az 5-alfa-reduktáz inhibitoroknak, mint a finaszterid, kifejezettebb hatása van a ventrális prosztatára, mint egyéb szövetekre, összehasonlítva az erős AR antagonistákkal, mint amilyen például a flutamid. Az öt androgénfüggő célszövet (VP, LABC, GP, CG és SVCG) közül bármelyik kettő vagy több tömegének statisztikailag szignifikáns csökkenését ($p \leq 0,05$) a csak TP-kezeléssel összehasonlítva pozitív androgén antagonistá eredménynek kell tekinteni, és valamennyi célszövetnek bizonyos mértékű csökkent növekedést kell mutatnia. Az ASO szöveti válaszok kombinált értékelését megfelelő sokváltozós adatelemzéssel lehet elvégezni. Ez javíthatja az elemzést, különösen azokban az esetekben, ahol csak egyetlen szövet ad statisztikailag szignifikáns választ.
62. Az adatokat táblázatos formában kell összefoglalni, amely tartalmazza az átlagot, az átlag standard hibáját (a szórás is elfogadható) és az egyes csoportok mintaméretét. Az egyedi adattáblákat is bele kell foglalni a jegyzőkönyvbe. A kontrolladatok egyedi értékeit, átlagait, valamint az SE (szórás) értékeket és a relatív szórásokat meg kell vizsgálni annak eldöntése érdekében, hogy megfelelnek-e a várt történeti értékekkel való konzisztencia elfogadható kritériumainak. Az egyes szervek tömegének az 1. táblázatban (lásd a 25. és 26. bekezdést) szereplő relatív szórásait meghaladó relatív szórások meghatározzák, hogy vannak-e hibák az adatrögzítésben

vagy -bevitelben, vagy hogy a laboratórium elsajátította-e az androgénfüggő szövetek pontos boncolási technikáját vagy indokolt a továbbképzés/gyakorlás. Általánosságban, a relatív szórások (szórás osztva az átlagos szervtömeggel) laborról laborra és vizsgálatról vizsgálatra reprodukálhatók. A bemutatott adatoknak tartalmazniuk kell legalább a ventrális prosztata, az ondóhólyag, a levator ani plusz bulbocavernosus izom, a Cowper-mirigyek, a glans penis és a máj tömegét és a testtömeget, valamint a testtömeg változását az adagolás megkezdésétől a boncolásig. Az adatokat a kovariancia testtömeggel való módosítása után is be lehet mutatni, de ez nem helyettesíti a kiigazítatlan adatok bemutatását. Ezenfelül, ha fitymaelválás (preputial separation, PPS) nem fordul elő egyik csoportban sem, a PPS előfordulási gyakoriságát fel kell jegyezni és statisztikailag össze kell hasonlítani a kontrollcsoporttal a Fisher Exact teszt alkalmazásával.

63. Amikor a számítógépes adatok bevitelének pontosságát az eredeti adatlapokkal való összevetés alapján ellenőrzik, a biológiailag nem hihető vagy a kezelési csoport átlagától több mint három szórással eltérő szervtömeg-értékeket gondosan meg kell vizsgálni és el lehet vetni, mivel valószínűleg adatrögzítési hibák.
 64. A vizsgálati eredmények összehasonlítása az OECD relatív szórásaival (1. táblázat) gyakran fontos értelmezési lépés a vizsgálati eredmények érvényessége tekintetében. A vivőanyag kontrollcsoportra vonatkozó történeti adatokat meg kell őrizni a laboratóriumban. A pozitív referencia vegyi anyagokra (mint például a TP és az FT) adott válaszokkal kapcsolatos történeti adatokat is meg kell őrizni a laboratóriumban. A laboratóriumok is rendszeresen ellenőrizhetik az ismert gyenge androgén agonistákra és antagonistákra adott választ és megőrizhetik ezeket az adatokat. Ezeket az adatokat össze lehet hasonlítani a rendelkezésre álló OECD-adatokkal annak biztosítása érdekében, hogy a laboratórium módszerei megfelelő statisztikai pontosságot és teljesítményt eredményezzenek.
-

1. függelék

FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

Androgén: fogalom, amelyet az androgén-dependens szövetekre gyakorolt pozitív hatás leírására használnak.

Antiandrogén: egy vegyi anyag azon képessége, hogy emlősállatok szervezetében a TP hatását gátolja.

Vegyi anyag: egy anyag vagy keverék.

Születés napja: a 0. posztnatális nap.

Dózis: a vizsgált vegyi anyag beadott mennyisége. A Hershberger bioassay esetében a dózist a vizsgált vegyi anyag tömegének és a kísérleti állat egységnyi testtömegének napi hányadosaként (például mg/testtömeg kilogramm/nap) fejezzük ki.

Adagolás: általános fogalom, amely a dózist, valamint az adagolás gyakoriságát és időtartamát foglalja magában.

Moribund: kifejezés, amelyet a haldokló, elhullás-közeli állapotban lévő állatok leírására használunk.

X. posztnatális nap: az élet X. napja a születés napját követően.

Érzékenység: a vizsgálati módszer azon képessége, hogy helyesen azonosítja be azokat a vegyi anyagokat, amelyek rendelkeznek a vizsgált tulajdonsággal.

Specifititás: a vizsgálati módszer azon képessége, hogy pontosan azonosítja be azokat a vegyi anyagokat, amelyek nem rendelkeznek a vizsgált tulajdonsággal.

Vizsgált vegyi anyag: bármely, e vizsgálati módszer alkalmazásával vizsgált anyag vagy keverék.

Validáció: tudományos folyamat, melynek célja egy adott vizsgálati módszer működési követelményeinek és korlátjainak jellemzése, valamint megbízhatóságának és egy adott célhoz kapcsolódó relevanciájának igazolása.

2. függelék

Megjegyzés: A Test Guidelines Programme titkársága által az EDTA Task Force 6. Ülésén elért megállapodás alapján készített dokumentum

Az OECD fogalmi kerete az endokrin rendszert károsító vegyi anyagok tesztelésére és értékelésére

1. szint Rendezés és prioritások megállapítása a meglévő információk alapján	— fizikai-kémiai tulajdonságok, pl. molekulatömeg, reaktivitás, volatilitás, biológiai lebomlás — emberi és környezeti expozíció, pl. előállított volumen, kibocsátás, felhasználás módjai — veszély, pl. rendelkezésre álló toxikológiai adatok
2. szint Mechanisztikus adatokat szolgáltató <i>in vitro</i> vizsgálatok	— ER, AR, TR receptorkötődési affinitás — Transzkripció aktiválódás — Aromatáz és <i>in vitro</i> szteroidogenezis — Aril-hidrokarbon receptor felismerés/kötődés — QSAR — Magas teljesítményű előszűrés — Pajzsmirigy-funkció — Hal hepatocita VTG-vizsgálat — Egyéb (szükség szerint)
3. szint Egyetlen endokrin mechanizmusról és hatásról adatokat szolgáltató <i>in vitro</i> vizsgálatok	— Uterotróp vizsgálat (ösztrogének) — Hershberger assay (androgének) — Nem receptorok által mediált hormonfunkció — Egyéb (pl. pajzsmirigy) — Hal VTG (vitellogenin) vizsgálat (ösztrogén)
4. szint Több endokrin mechanizmusról és hatásról adatokat szolgáltató <i>in vitro</i> vizsgálatok	— kibővített OECD 407 (végpontok az endokrin mechanizmusok alapján) — hím és nőstény pubertális vizsgálatok — felnőtt ép hím vizsgálat — Hal gonadális hisztopatológiai vizsgálat — Beka metamorfózis vizsgálat
5. szint Endokrin és egyéb mechanizmusok hatásairól adatokat szolgáltató <i>in vitro</i> vizsgálatok	— 1-generációs vizsgálat (kibővített TG415)¹ — 2-generációs vizsgálat (kibővített TG416)¹ — reprodukciós szűrőteszt (kibővített TG421)¹ — kombinált 28 nap/reprodukciós szűrőteszt (kibővített TG 422)¹ ¹ A VMG mam által mérlegelendő lehetséges kibővítések — Részleges és teljes életciklus vizsgálatok halakban, madarakban, kétélűekben és gerinctelenekben (fejlődés és reprodukció)

VMG mamm: Validation Management Group on Mammalian Testing and Assessment

Megjegyzések a keretrendszerhez

1. *megjegyzés:* A belépés és kilépés minden szinten lehetséges és a veszély- és kockázatértékelésre szolgáló információs igények jellegétől függ
2. *megjegyzés:* Az 5-ös szinten az ökotoxikológiának olyan végpontokat is tartalmaznia kell, amelyek jelzik a káros hatások és a potenciális populációs károk mechanizmusait
3. *megjegyzés:* Amikor egy multimodális modell több egyetlen végpontú vizsgálatot lefed, ez a modell az egyetlen végpontú vizsgálatok helyébe lép
4. *megjegyzés:* Az egyes vegyi anyagokat eseti alapon kell értékelni, figyelembe véve az összes rendelkezésre álló információt és szem előtt tartva a keretrendszer különböző szintjeinek funkcióját.
5. *megjegyzés:* A keretrendszert jelenleg nem lehet mindenre kiterjedőnek tekinteni. A 3., 4. és 5. szinten olyan vizsgálatokat foglal magában, amelyek már rendelkezésre állnak vagy amelyek validálása még folyamatban van. Ami az utóbbiakat illeti, ezeket a keretrendszer ideiglenes jelleggel tartalmazza. Miután kifejlesztették és validálták ezeket, hivatalosan is bekerülnek a keretrendszerbe.
6. *megjegyzés:* Az 5. szintet nem lehet úgy tekinteni, hogy csak végleges tesztek tartalmaz. Az ezen a szinten szereplő tesztek úgy tekintik, hogy hozzájáruljanak az általános veszély- és kockázatértékeléshez.

SZAKIRODALOM

- (1) OECD (1998). Report of the First Meeting of the OECD Endocrine Disrupter Testing and Assessment (EDTA) Task Force, 10th-11th March 1998, ENV/MC/CHEM/RA(98)5.
- (2) Dorfman RI (1962). Standard methods adopted by official organization. Academic Press, NY.
- (3) Gray LE Jr, Furr J and Ostby JS (2005). Hershberger assay to investigate the effects of endocrine disrupting compounds with androgenic and antiandrogenic activity in castrate-immature male rats. In: *Current Protocols in Toxicology* 16.9.1-16.9.15. J Wiley and Sons Inc.
- (4) OECD (2006). Final OECD report of the initial work towards the validation of the rat Hershberger assay. Phase 1. Androgenic response to testosterone propionate and anti-androgenic effects of flutamide. Environmental Health and Safety, Monograph Series on Testing and Assessment N° 62. ENV/JM/MONO(2006)30.
- (5) OECD (2008). Report of the OECD Validation of the Rat Hershberger Bioassay: Phase 2: Testing of Androgen Agonists, Androgen Antagonists and a 5 α -Reductase Inhibitor in Dose Response Studies by Multiple Laboratories. Environmental Health and Safety, Monograph Series on Testing and Assessment N° 86. ENV/JM/MONO(2008)3.
- (6) OECD (2007). Report of the Validation of the Rat Hershberger Assay: Phase 3: Coded Testing of Androgen Agonists, Androgen Antagonists and Negative Reference Chemicals by Multiple Laboratories. Surgical Castrate Model Protocol. Environmental Health and Safety, Monograph Series on Testing and Assessment N° 73. ENV/JM/MONO(2007)20.
- (7) Owens, W, Zeiger E, Walker M, Ashby J, Onyon L, Gray, Jr, LE (2006). The OECD programme to validate the rat Hershberger bioassay to screen compounds for in vivo androgen and antiandrogen responses. Phase 1: Use of a potent agonist and a potent antagonist to test the standardized protocol. *Env. Health Persp.* 114:1265-1269.
- (8) Owens W, Gray LE, Zeiger E, Walker M, Yamasaki K, Ashby J, Jacob E (2007). The OECD program to validate the rat Hershberger bioassay to screen compounds for in vivo androgen and antiandrogen responses: phase 2 dose-response studies. *Environ Health Perspect.* 115(5):671-8.
- (9) Korenchevsky V (1932). The assay of testicular hormone preparations. *Biochem J*26:413-422.
- (10) Korenchevsky V, Dennison M, Schalit R (1932). The response of castrated male rats to the injection of the testicular hormone. *Biochem J*26:1306-1314.
- (11) Eisenberg E, Gordan GS (1950). The levator ani muscle of the rat as an index of myotrophic activity of steroidal hormones. *J Pharmacol Exp Therap* 99:38-44.
- (12) Eisenberg E, Gordan GS, Elliott HW (1949). Testosterone and tissue respiration of the castrate male rat with a possible test for myotrophic activity. *Endocrinology* 45:113-119.
- (13) Hershberger L, Shipley E, Meyer R (1953). Myotrophic activity of 19-nortestosterone and other steroids determined by modified levator ani muscle method. *Proc Soc Exp Biol Med* 83:175-180.

- (14) Hilgar AG, Vollmer EP (1964). Endocrine bioassay data: Androgenic and myogenic. Washington DC: United States Public Health Service.
- (15) Dorfman RI (1969). Androgens and anabolic agents. In: Methods in Hormone Research, volume IIA. (Dorfman RI, ed.) New York: Academic Press, 151-220.
- (16) Massaro EJ (2002). Handbook of Neurotoxicology, volume I. New York: Humana Press, p 38.
- (17) OECD (2000). Guidance document on the recognition, assessment and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No 19. ENV/JM/MONO(2000)7.
- (18) OECD (1982). Organization for Economic Co-operation and Development – Principles of Good Laboratory Practice, ISBN 92-64-12367-9, Paris.
- (19) OECD (2008). Acute oral toxicity – up-and-down procedure. OECD Guideline for the testing of chemicals No 425.
- (20) OECD (2001). Guidance document on acute oral toxicity. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No 24. ENV/JM/MONO(2001)4.
- (21) Supplemental materials for Owens et al. (2006). The OECD programme to validate the rat Hershberger bioassay to screen compounds for in vivo androgen and antiandrogen responses. Phase 1: Use of a potent agonist and a potent antagonist to test the standardized protocol. Env. Health Persp. 114:1265-1269. See, section II, The dissection guidance provided to the laboratories: <http://www.ehponline.org/docs/2006/8751/suppl.pdf>.
- (22) Korea Food and Drug Administration. Visual reference guide on Hershberger assay procedure, including a dissection video. http://rndmoa.kfda.go.kr/endocrine/reference/education_fr.html.
- (23) OECD (2008). Background Review Document on the Rodent Hershberger Bioassay. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No 90. ENV/JM/MONO(2008)17.
- (24) OECD (2008). Draft Validation report of the Intact, Stimulated, Weanling Male Rat Version of the Hershberger Bioassay.
- (25) OECD (2009). Guidance Document on the Weanling Hershberger Bioassay in rats: A shortterm screening assay for (anti)androgenic properties. Series on Testing and Assessment, Number 115.
- (26) Az Európai Parlament és a Tanács 2010. szeptember 22-i 2010/63/EU irányelve a tudományos célokra felhasznált állatok védelméről (HL L 276., 2010.10.20., 33. o.).
- (27) E melléklet következő fejezetei:
- B.1.a: Akut orális toxicitás – rögzített dózisz eljárás
- B.1.b: Akut orális toxicitás – akut toxikus osztály módszer

B.56 KIBŐVÍTETT EGYGENERÁCIÓS REPRODUKCIÓS TOXICITÁSI VIZSGÁLAT

BEVEZETÉS

1. Ez a vizsgálati módszer egyenértékű az OECD 443. vizsgálati iránymutatásában (2012) leírt módszerrel. A vizsgálati módszer a Nemzetközi Élettudományi Intézet (ILSI) Egészség- és Környezettudományi Intézete (HESI) mezőgazdasági vegybiztonsági technikai ellenőrző bizottságának (ACSA Technical Committee) az F₁ életszakasz kibővített egygenerációs reprodukciós vizsgálatra vonatkozó javaslatán alapul, amely megjelent Cooper et al., 2006 közlésében (1). A vizsgálati tervben számos fejlesztést és pontosítást hajtottak végre a vizsgálat rugalmasabbá tétele és annak kihangsúlyozása érdekében, hogy a meglévő ismeretekből kell kiindulni, az életben tett megfigyeléseket pedig a vizsgálat irányítására és személyre szabására kell használni. Ez a vizsgálati módszer részletes leírást ad a kibővített egygenerációs reprodukciós toxicitási vizsgálat elvégzéséhez. A vizsgálati módszer az F₁-állatok három kohortját írja le:
 1. kohort: a reprodukciós/fejlődési végpontokat értékeli; ezt a kohortot ki lehet bővíteni az F₂-generációval is,
 2. kohort: a vegyi anyag-expozíciónak a fejlődő idegrendszerre gyakorolt lehetséges hatását értékeli,
 3. kohort: a vegyi anyag-expozíciónak a fejlődő immunrendszerre gyakorolt lehetséges hatását értékeli.

2. A második generáció értékeléséről, és a fejlődési neurotoxicitási kohort és/vagy a fejlődési immunotoxicitási kohort kihagyásáról szóló döntésnek tükröznie kell az értékelt vegyi anyagról meglévő ismereteket, valamint a különböző szabályozó hatóságok igényeit. A vizsgálati módszer célja, hogy részletesen bemutassa, hogyan végezhető el a vizsgálat, és felvázolja, hogyan kell az egyes kohortokat értékelni.
3. A 2. generáció előállítására vonatkozó belső kiváltó tényezőkkel kapcsolatos döntési eljárást az OECD 117. iránymutatása (39) írja le a belső kiváltó tényezőket használó szabályozó hatóságok számára.

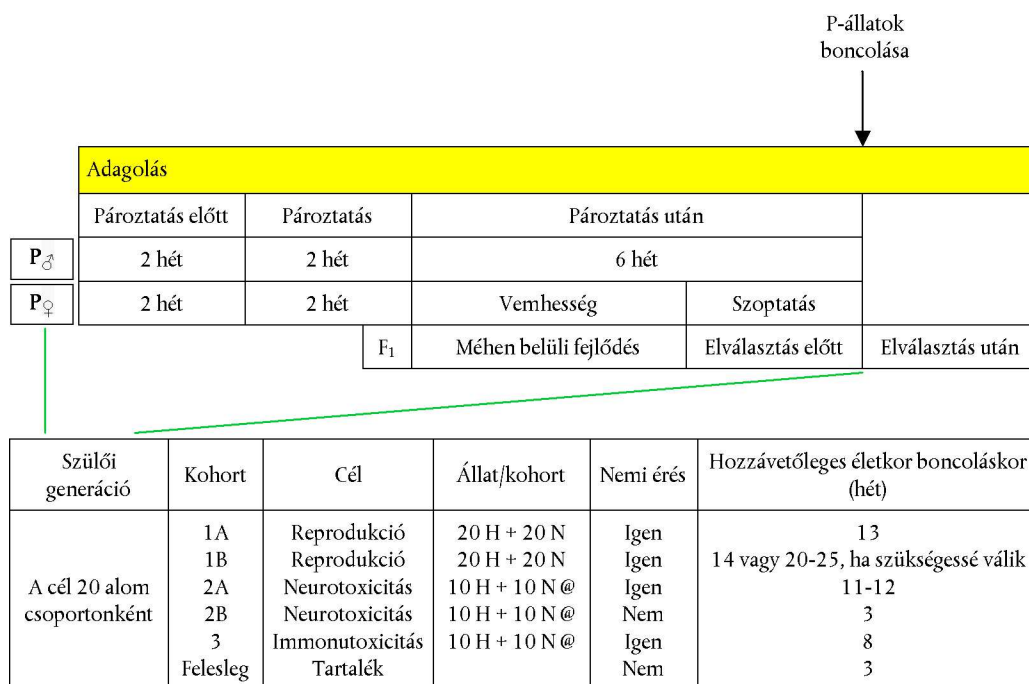
Kiindulási megfontolások és célkitűzések

4. A kibővített egygenerációs reprodukciós toxicitási vizsgálat fő célja, hogy értékelje azokat a speciális életszakaszokat, amelyekre nem terjednek ki az egyéb típusú toxicitási vizsgálatok, és tesztelje a pre- és posztnatális vegyi anyag-expozíció eredményeként esetleg előforduló hatásokat. A reprodukciós végpontok esetében a tervek szerint – első lépésként és ha rendelkezésre áll – az ismételt dózisú vizsgálatokból (beleértve a reprodukciós toxicitási szűrővizsgálatokat, például OECD TG 422 (32)), vagy az endokrin rendszert károsító anyagok kimutatását célzó rövid távú szűrővizsgálatokból (például uterotrofikus vizsgálat – B.54. vizsgálati módszer (36); Hershberger assay – B.55. vizsgálati módszer (37)) származó információt használjuk fel arra, hogy kimutassuk a hímek és nőtények szaporítószerveire gyakorolt hatásokat. Ez hímek esetében magában foglalja a spermatogenezist (herék kórszövettani vizsgálata), nőtények esetében pedig az ivari ciklust, a follikulusok számát/a petesejtek érését, valamint a petefészek integritását (kórszövettan). A kibővített egygenerációs reprodukciós toxicitási vizsgálat olyan reprodukciós végpontok tesztelésére használható, amelyhez a hímek és nőtények interakciójára, konceptussal rendelkező nőtényekre és utódokkal rendelkező nőtényekre van szükség, valamint az F₁-nemzedékre a szexuális érettségig (lásd az OECD 151. iránymutatását, amely támogatja ezt a vizsgálati módszert (40)).
5. A vizsgálati módszer célja, hogy értékelje a vegyi anyagok pre- és posztnatális fejlődésre gyakorolt hatásait, valamint hogy részletesen értékelje a szisztémás toxicitást vemhes és szoptató nőtényekben, illetve a fiatal és felnőtt utódokban. A kulcsfontosságú fejlődési végpontoknak, mint például az utódok életképességének, az újszülöttek egészségi állapotának, a születéskori fejlettségi állapotnak, valamint a felnőttkorig tartó fizikai és funkcionális fejlődésnek a részletes vizsgálata várhatóan beazonosítja az utódokban a speciális célszerveket. A vizsgálat ezenkívül információkat nyújt a vizsgált vegyi anyagnak a felnőtt hím és nőtény szaporítórendszer integritására és teljesítményére gyakorolt hatásaival kapcsolatban és/vagy megerősíti ezeket az információkat. Különösen, de nem kizárólag, a következő paramétereket kell figyelembe venni: az ivarmirigyek funkciója, az ivari ciklus, a spermiumok érése a mellékherében, a párzási viselkedés, a fogamzás, a vemhesség, az ellés és a szoptatás. Továbbá, az ezekre a rendszerekre gyakorolt lehetséges hatásokat a fejlődési neurotoxicitási és fejlődési immunotoxicitási értékelésekből kapott információk jellemzik. Az ezekből a vizsgálatokból származó adatoknak lehetővé kell tennie a káros hatást nem okozó szintek (NOAEL-ek), a legkisebb megfigyelhető ártalmas hatást okozó szintek (LOAEL-ek) és/vagy a benchmark dózisok meghatározását a különböző végpontok esetében, és/vagy a korábbi ismételt dózisú vizsgálatokban kimutatott hatások jellemzésére kell használni ezeket az adatokat és/vagy támpontul kell szolgálniuk a későbbi vizsgálatokhoz.
6. A 1. ábrán látható a protokoll sémája. A vizsgálandó vegyi anyagot folyamatosan kell adagolni fokozatosan növekvő dózisokban hím és nőtény állatok több csoportjának. Ezt a szülői (P) generációt egy előre meghatározott párzás előtti időtartományban (a vizsgált vegyi anyagról rendelkezésre álló információ alapján kiválasztott időtartam, de legalább két hét) és a két hetes párzási időszakban kell kezelni. A P-hímeket tovább, legalább az F₁ elválasztásáig kezeljük. Ezeket a hímeket legalább 10 héten át kell kezelni. Hosszabb ideig is lehet, ha a reprodukciós hatások tisztázására van szükség. A P-nőtények kezelése folytatódik a vemhesség és a szoptatás alatt, egészen a vizsgálatnak az almok elválasztása után történő befejezéséig (azaz 8-10 hetes kezelés). Az F₁-utódok további kezelést kapnak a vizsgált vegyi anyaggal az elválasztástól a felnőtté válásig. Amennyiben a második generációt is értékeli (lásd OECD 117. iránymutatás (39)), az F₁-utódok kezelése az F₂ elválasztásáig, vagy a vizsgálat befejezéséig tovább folytatódik.
7. Minden állaton klinikai megfigyeléseket és kórbonctani vizsgálatokat kell végezni a toxicitás jeleinek kimutatása érdekében, és külön hangsúlyt kell fektetni a hím és női szaporítórendszer épségére és teljesítőképességére, valamint az utódok egészségére, növekedésére, fejlődésére és működésére. Elválasztáskor a kiválasztott utódokat besoroljuk az egyes alcsoportokba (1–3. kohort, lásd a 33. és 34. bekezdést és az 1. ábrát) a további vizsgálatok céljára, ideértve a nemi érést, a reprodukciós szervek integritását és funkcióját, a neurológiai és viselkedési végpontokat és az immunfunkciót.
8. A vizsgálatok elvégzése során a klinikai tüneteknek, mint a biztonsági értékeléshez használt kísérleti állatok humánus végpontjainak felismeréséről, értékeléséről és használatáról szóló 19. OECD-iránymutatásban (34) ismertetett vezéreleket és szempontokat kell követni.

9. Amikor elegendő számú vizsgálat áll rendelkezésre, hogy meggyőződjene ennek az új vizsgálati elrendezésnek a hatásáról, a vizsgálati módszert felülvizsgálják, és ha szükséges, a szerzett tapasztalatok fényében módosítják.

1. ábra

A kibővített egygenerációs reprodukciós toxicitási vizsgálat sémája



@ Almonként egy, összességében reprezentatív a 20 alomra nézve, ha lehetséges

A MÓDSZER LEÍRÁSA/A VIZSGÁLAT ELŐKÉSZÜLETEI

Állatok

Az állatfaj és a törzs kiválasztása

10. A reprodukciós toxicitási vizsgálatához használandó faj kiválasztását gondosan mérlegelni kell a rendelkezésre álló valamennyi információ fényében. A háttér adatok mennyisége és az általános toxicitási vizsgálatokkal való összehasonlíthatóság miatt azonban rendszerint a patkány az előnyben részesített állatfaj, és az ebben a vizsgálati módszerben megadott kritériumok és ajánlások is erre a fajra vonatkoznak. Ettől eltérő fajok alkalmazását megfelelően indokolni kell, és a protokoll megfelelő módosítására is szükség lesz. Nem szabad olyan törzseket alkalmazni, amelyek kevésbé termékenyek, vagy amelyekben magas a spontán fejlődési defektusok előfordulási gyakorisága.

Életkor, testtömeg és beválogatási kritériumok

11. Korábban vizsgálatban még részt nem vett, egészséges szülőállatokat kell használni. A hímeket és a nőstényeket egyaránt tanulmányozni kell, és a nőstényeknek nulliparának és nem vemhesnek kell lennie. A P-állatoknak szexuálisan érettnnek, az adagolás kezdetén hasonló tömegűnek (azonos nemen belül), a párzáskor hasonló korúnak (kb. 90 nap) és a vizsgált faj és törzs reprezentatív példányainak kell lennie. Az állatoknak az érkezés után legalább 5 napig akklimatizálódniuk kell. Az állatokat véletlenszerűen soroljuk be a kontroll- és kezelt csoportokba, oly módon, ami hasonló átlagos testtömeg-értékeket eredményez a csoportok között (azaz a középérték ± 20 %-a).

Tartási és etetési körülmények

12. A kísérleti állatok tartására szolgáló helyiség hőmérséklete 22 °C (± 3 °C) kell, hogy legyen. A relatív páratartalomnak 30–70 % között kell lennie, az ideális érték 50–60 % között van. A mesterséges világítást úgy kell

beállítani, hogy 12 órás világos és 12 órás sötét periódusok váltsák egymást. Hagyományos laboratóriumi táplálás alkalmazható korlátozás nélküli ivóvízellátással. Különös figyelmet kell fordítani a takarmány fitoösztrogén-tartalmára, mivel a takarmány magas fitoösztrogén-szintje befolyásolhatja egyes reprodukciós végpontokat. Szabványosított, nyitott receptúrájú takarmány használata ajánlott, amelyben csökkentették ösztrogénszerű vegyi anyagok mennyiségét (2) (30). A takarmány megválasztását a vizsgált vegyi anyaggal való megfelelő keveredés igénye is befolyásolhatja, ha a vizsgált vegyi anyagot a takarmánnyal adjuk be. Igazolni kell a vizsgált vegyi anyag arányát, homogenitását és stabilitását a takarmányban. Rendszeresen ellenőrizni kell, hogy a takarmány és az ivóvíz nem tartalmaz-e szennyező anyagokat. A vizsgálat során használt takarmány tételeiből vett mintákat megfelelő körülmények között (pl. – 20 °C-on fagyasztván) meg kell őrizni a jelentés véglegesítéséig arra az esetre, ha az eredmények takarmányösszetevők további elemzését teszik szükségessé.

13. Az állatokat ketrecben, azonos nemű és kezelési csoportba tartozó állatokból álló kis csoportokban kell tartani. Egyedileg is elhelyezhetők a sérülések elkerülése érdekében (pl. hímek a párzási időszak után). A pároztatásokat erre a célra alkalmas ketrecekben kell végezni. Miután a párzás bizonyíthatóan megtörtént, a feltételezhetően vemhes nőstényeket külön-külön kell elhelyezni fiasztató ketrecekben, ahol megfelelő és meghatározott fészekrakó anyagot kell biztosítani számukra. Az almoknak az anyaállattal kell maradniuk az elválasztásig. Az F₁-állatokat ketrecben, azonos nemű és kezelési csoportba tartozó állatokból álló kis csoportokban kell tartani az elválasztástól a vizsgálat befejezéséig. Ha tudományos szempontból indokolt, az állatokat egyedileg is el lehet helyezni. A kiválasztott alomanyag fitoösztrogén-szintjének minimálisnak kell lennie.

Az állatok száma és azonosítása

14. Normális esetben minden teszt- és kontrollcsoportnak elegendő számú pároztatandó állatpárt kell tartalmaznia, hogy az dóziscsoportonként legalább 20 vemhes nőstényt eredményezzen. A cél az, hogy megfelelő mennyiségű vemhességet hozzunk létre ahhoz, hogy felmérhessük a vegyi anyag hatását a termékenységre, a vemhességre és az anyai viselkedésre a P-nemzedékben, valamint a növekedésre és a fejlődésre az F₁-utódokban a fogamzástól az érettségig. Ha nem sikerül elérni a kívánt számú vemhes állatot, az nem feltétlenül érvényteleníti a vizsgálatot, hanem eseti elbírálás alapján kell kiértékelni, figyelembe véve a lehetséges ok-okozati összefüggést a vizsgált vegyi anyaggal.
15. Minden P-állatot egyedi azonosító számmal kell ellátni az adagolás megkezdése előtt. Ha a laboratóriumi történeti adatok azt mutatják, hogy a nőstények jelentős része esetleg nem fog szabályos (4 vagy 5 napos) ivari ciklust mutatni, akkor az ivari ciklusokat a kezelés megkezdése előtt javasolt kiértékelni. Alternatív megoldásként a csoport mérete is megnövelhető annak érdekében, hogy mindegyik csoportban legalább 20 nősténynek legyen szabályos (4 vagy 5 napos) ivari ciklusa a kezelés kezdetén. A születés utáni (PND) 0. vagy 1. napon, az újszülöttek első vizsgálata során minden F₁-utódot egyedi azonosítóval kell ellátni. A származási almot beazonosító feljegyzéseket minden F₁-állat esetében meg kell őrizni a vizsgálat egész időtartama alatt, adott esetben az F₂-állatok esetében is.

Vizsgált vegyi anyag

A vizsgált vegyi anyagról rendelkezésre álló információk

16. A rendelkezésre álló információkat a beadási módra, a vívőanyag kiválasztására, az állatfaj kiválasztására, a dózisok kiválasztására és az adagolási ütemterv lehetséges módosítására vonatkozó döntések céljából felül kell vizsgálni. Ezért a vizsgált vegyi anyagról rendelkezésre álló valamennyi releváns információt, azaz a fizikai-kémiai, toxikokinetikai (beleértve a fajspecifikus anyagcserét) és toxikodinamikai tulajdonságokat, a szerkezet-hatás összefüggéseket (SAR), az *in vitro* anyagcsere folyamatokat, a korábbi toxicitási vizsgálatok eredményeit és a szerkezeti analógokra vonatkozó releváns információkat figyelembe kell venni a kibővített egygenerációs reprodukciós toxicitási vizsgálat tervezése során. A felszívódásra, eloszlásra, metabolizmusra és eliminációra (ADME) és a bioakkumulációra vonatkozó előzetes információk a kémiai szerkezetből, a fizikai-kémiai adatokból, a plazmafehérjékhez való kötődés mértékéből vagy a toxikokinetikai (TK) vizsgálatokból származhatnak, míg a toxicitási vizsgálatok eredményei kiegészítő információkat közölnek, például a NOAEL, az anyagcsere vagy a metabolizmus indukciója tekintetében.

A toxikokinetikai adatok figyelembevétele

17. Bár használatuk nem kötelező, a korábban elvégzett dózisbehatároló és egyéb vizsgálatok TK-adatai rendkívül hasznosak a vizsgálati elrendezés megtervezésében, az alkalmazott dózisok szintjének kiválasztásában és az eredmények kiértékelésében. Különösen hasznosak azok az adatok, amelyek: 1) igazolják a fejlődő magzatok és kölykök vizsgált anyaggal (vagy a metabolitjaival) történt expozícióját, 2) becslést adnak a belső dozimetriáról

és 3) értékeli a kinetikai folyamatok potenciális dózisfüggő telítettségét. Amennyiben rendelkezésre állnak, további TK-adatokat is figyelembe kell venni, mint például a metabolit profilokat, koncentráció-idő görbét, stb. Kiegészítő TK-adatokat is lehet gyűjteni a fő vizsgálat során, feltéve, hogy az nem zavarja a fő vizsgálati végpontok gyűjtését és értelmezését.

Általános útmutatóként az alábbi TK-adathalmaz lehet hasznos a kibővített egygenerációs reprodukciós toxicitási vizsgálat tervezése során:

- terhesség késői szakasza (pl. vemhesség 20. napja) – anyai vér és magzati vér,
- szoptatás középső szakasza (PND 10) – anyai vér, kölyök vér és/vagy tej,
- korai elválasztás utáni szakasz (pl. PND 28) – elválasztott kölyök vérmintái.

Az egyes analitok (pl. szülő vegyi anyag és/vagy metabolitok) és a mintavételi rendszer meghatározása során rugalmasan kell eljárni. Például a mintavételek száma és időzítése egy adott mintavételi napon a beadási módtól, valamint a nem terhes állatokban mutatott TK-tulajdonságok előzetes ismeretétől fog függeni. Az étrendi vizsgálatok esetében elegendő a minden nap egyetlen konzisztens időpontban történő mintavétel, míg a gyomorszondán át történő adagolás további mintavételi időpontokat tehet szükségessé a különböző belső dózisok pontosabb becslése érdekében. Azonban egyik mintavételi napon sincs szükség a teljes koncentráció-időgörbe elkészítésére. Szükség esetén a vért az almon belül nemenként egyesíteni lehet a magzati és újszülöttkori analízisekhez.

Az adagolás módja

18. Az adagolási mód kiválasztásánál az emberi expozíció szempontjából leginkább releváns útvonal(ak)at kell figyelembe venni. Bár a protokollt a vizsgált vegyi anyag takarmányon keresztül történő beadására tervezték, a vegyi anyag jellemzőitől és a szükséges információktól függően módosítható más beadási módra is (ivóvíz, gyomorszonda, belégzés, bőr).

A vivőanyag kiválasztása

19. A vizsgált vegyi anyagot szükség esetén alkalmas vivőanyagban feloldjuk vagy szuszpendáljuk. Lehetőség szerint elsősorban vizes oldatot/emulziót ajánlatos alkalmazni, másodsorban olajos (például kukoricacsíra-olajban elkészített) oldatot vagy emulziót. A víztől eltérő vivőanyagok esetében ismerni kell a vivőanyag toxikológiai tulajdonságait. A potenciális belső toxicitással rendelkező vivőanyagok használatát kerülni kell (pl. aceton, DMSO). Meg kell határozni azt is, hogy a vizsgált vegyi anyag mennyire stabil az adott vivőanyagban. Ha vivőanyagot vagy más adalékanyagot használunk az adagolás megkönnyítésére, a következő tulajdonságokat kell figyelembe venni: a vizsgált vegyi anyag felszívódására, eloszlására, metabolizmusára vagy retenciójára gyakorolt hatások, a vizsgált vegyi anyag kémiai tulajdonságaira gyakorolt azon hatások, amelyek módosíthatják annak toxikus jellemzőit, valamint az állatok táplálék- és vízfogyasztására vagy tápláltsági állapotára gyakorolt hatások.

A dózis megválasztása

20. A vizsgálatnak alapesetben legalább három dózisszintet és egy párhuzamos kontrollt kell tartalmaznia. A megfelelő dózisok megválasztásakor a vizsgálatvezetőnek figyelembe kell vennie az összes rendelkezésre álló információt, beleértve a korábbi vizsgálatokból származó dózisinformációkat, a vemhes vagy nem vemhes állatok TK-adatait, a laktációs transzfer mértékét, valamint az emberi expozícióra vonatkozó becsléseket. Ha olyan TK-adatok állnak rendelkezésre, amelyek a TK-folyamatok dózisfüggő telítődését jelzik, ügyelni kell arra, hogy elkerüljék az olyan magas adagokat, amelyek egyértelműen telítődést mutatnak, feltéve természetesen, hogy az emberi expozíció várhatóan jóval a telítettségi pont alatt lesz. Ilyen esetekben a legmagasabb dózisszintnek a nemlineáris TK-viselkedésbe való átmenet inflexiós pontján vagy kicsivel felette kell lennie.
21. Az erre vonatkozó TK-adatok hiányában a dózisszinteknek a toxikus hatásokon kell alapulnia, kivéve, ha ezt a vizsgált vegyi anyag fizikai/kémiai jellege korlátozza. Ha a dózisok a toxicitáson alapulnak, a legmagasabb dózist úgy kell megválasztani, hogy valamilyen szisztémás toxicitást váltson ki, de ne okozza az állat halálát vagy súlyos szenvedését.
22. Fokozatosan csökkenő dózisszinteket kell választani annak érdekében, hogy demonstrálni lehessen a dózisfüggő hatásokat és a megfigyelhető káros hatást nem okozó szintet (NOAEL), illetve a kimutatási határ közelében lévő dózisokat, amelyek lehetővé teszik benchmark dózis meghatározását a legérzékenyebb végpontokra. A NOAEL-ek és LOAEL-ek közötti nagy dózistávolság elkerülése érdekében gyakran a két- vagy négyszeres intervallumok az optimálisak. Nagyon nagy dózisintervallumok (pl. 10-nél magasabb szorzófaktor) alkalmazása helyett gyakran előnyösebb egy negyedik vizsgálati csoport beiktatása.

23. A kontrollcsoportba tartozó állatokat a vizsgált vegyi anyag beadásától eltekintve ugyanolyan módon kell kezelni, mint a vizsgálati csoportokban lévőket. Ez a csoport egy kezeletlen vagy placebóval kezelt kontrollcsoport, vagy ha a vizsgálandó anyag beadásához vivőanyagot használnak, akkor egy vivőanyaggal kezelt kontrollcsoport. Vivőanyag alkalmazása esetén a kontrollcsoportban a legnagyobb alkalmazott mennyiségben kell beadni a vivőanyagot.

Határdózis-vizsgálat

24. Amennyiben az ismételt dózisu vizsgálatokban nincs bizonyíték a toxicitásra legalább 1 000 mg/testtömeg kg/nap dózisban, vagy ha toxicitás nem várható a szerkezetileg és/vagy metabolikusan rokon vegyi anyagokra vonatkozó adatok alapján, amelyek az *in vivo/in vitro* metabolikus tulajdonságok hasonlóságát jelzik, a több dózisszintet használó vizsgálatra nem feltétlenül van szükség. Ilyen esetekben kibővített egygenerációs reprodukciós toxicitási vizsgálatot lehet végezni kontrollcsoporttal és egyetlen, legalább 1 000 mg/testtömeg kg/nap dózissal. Ha azonban ezen a határdózison reprodukciós vagy fejlődési toxicitásra utaló bizonyíték található, további vizsgálatokra lesz szükség alacsonyabb dózisokkal a NOAEL beazonosítása céljából. Ezek a határdózis-vizsgálati szempontok csak akkor érvényesek, ha az emberi expozíció nem indikál magasabb dózist.

A KÍSÉRLET VÉGREHAJTÁSA

Az utódok expozíciója

25. Az adagolás preferált módja a takarmányban történő expozíció. Mesterséges táplálást alkalmazó vizsgálat végzése esetén figyelembe kell venni, hogy a kölykök általában mindaddig csak közvetve, az anyatejen keresztül kapják a vizsgált vegyi anyagot, amíg az elválasztáskor meg nem kezdődik a közvetlen adagolás. A táplálékkal vagy ivóvízzel történő adagolást alkalmazó vizsgálatok esetében a kölykök közvetlenül is megkapják a vizsgált vegyi anyagot, amikor a szoptatási időszak utolsó hetében önállóan is elkezdene táplálkozni. Meg kell fontolni a vizsgálati terv módosítását, ha a vizsgált vegyi anyag gyengén választódik ki a tejben, valamint akkor, ha hiányzik a bizonyíték az utódok folyamatos expozíciójára. Ezekben az esetekben a rendelkezésre álló toxikokinetikai információk, az utódokban jelentkező toxicitás vagy a biológiai markerek változásai alapján meg kell fontolni az utódoknak a szoptatás alatti közvetlen adagolását (3) (4). A szoptatott kölykökön végzett közvetlen adagolások vizsgálatok előtt gondosan mérlegelni kell az előnyöket és a hátrányokat (5).

Adagolási ütemterv és a dózisok beadása

26. Az ivari ciklusra, a férfi és a női ivarszervek kórszövettanára és a here/mellékhere spermaanalízisére vonatkozó egyes információk elérhetők a korábbi megfelelő időtartamú ismételt dózisu toxicitási vizsgálatokból. A kibővített egygenerációs reprodukciós toxicitási vizsgálatban a párzás előtti kezelés időtartama ezért a funkcionális változásokra gyakorolt olyan hatások észlelését célozza, amelyek zavarhatják a párzási viselkedést és a megtermékenyítést. A párzás előtti kezelés legyen elég hosszú, hogy a P-hímeknél és -nőstényeknél elérjék az állandósult állapotú expozíciós körülményeket. A párosodás előtti 2 hetes kezelés a legtöbb esetben mindkét nemnél megfelelőnek tekinthető. A nőstények esetében ez 3–4 teljes ivari ciklust is magában foglal és elegendőnek kell lennie a ciklusra gyakorolt bármilyen káros hatás észleléséhez. Hímeknél ez megfelel az érlelődő spermiumok mellékhere-tranzitjához szükséges időnek, és lehetővé teszi a spermiumokra a here után (a spermiumképződés utolsó szakaszaiban és a spermiumok mellékherében zajló érése során) gyakorolt hatások észlelését. A vizsgálat befejezéséig, amikor a here és a mellékhere kórszöveti vizsgálata és a spermaparaméterek analízise tervezett, a P- és F₁-hímek legalább egy teljes spermiumképződési folyamaton át ki voltak téve a vizsgálat anyagnak ((6) (7) (8) (9) és OECD 151. iránymutatás (40)).
27. A hímek párzás előtti expozíciós forgatókönyvét módosítani lehet, ha a heretoxicitást (a spermatogenesis károsodása) vagy a spermiumok integritására és funkciójára gyakorolt hatásokat a korábbi vizsgálatok már egyértelműen beazonosították. Hasonlóképpen, a nőstények esetében a vizsgált vegyi anyagnak az ivari ciklusra és így a szexuális fogékonyságra gyakorolt ismert hatásai eltérő párzás előtti expozíciós forgatókönyveket támaszthatnak alá. Különleges esetekben elfogadható lehet, hogy a P-nőstények kezelése csak azután indul, hogy spermiumpozitív kenetet sikerült venni (lásd a 151. OECD iránymutatást (40)).
28. Ha a párzás előtti adagolási időszakot meghatároztuk, az állatokat heti hét napon át folyamatosan kell a vizsgált vegyi anyaggal kezelni, egészen a boncolásig. Valamennyi állatot ugyanazon a módon kell kezelni. Az adagolást a kéthetes párzási időszak alatt is folytatni kell, P-nőstények esetében a vemhesség és a szoptatás alatt is, egészen az elválasztás utáni elaltatásig. A hímeket azonos módon kell kezelni az elaltatásig, amelyre az F₁-állatok elválasztásakor kerül sor. A boncolás tekintetében elsőbbséget kell adni azoknak a nőstényeknek, amelyeket a szoptatás

ugyanazon/hasonló napján kell felboncolni. A hímek boncolása több napra is áthúzódhat a laboratórium lehetőségeitől függően. A kiválasztott F₁-hímek és nőtények közvetlen adagolását az elválasztáskor kell megkezdeni – kivéve abban az esetben, ha azt már a szoptatás alatt megkezdték – és a tervezett boncolásig folytatni, a kohort feladatától függően.

29. A takarmánnyal vagy ivóvízzel adagolt vegyi anyagok esetében fontos annak biztosítása, hogy a vizsgált vegyi anyag beadott mennyisége nem zavarja meg a szokásos táplálékfelvételt vagy a vízháztartás egyensúlyát. Amennyiben a vizsgált vegyi anyagot a táplálékkal juttatják be, a táplálékbeli koncentrációt (ppm) vagy az állat testtömegére számított dózist kell állandó értéken tartani, és meg kell adni, hogy melyik alternatívát választottuk ki.
30. Ha a vizsgált vegyi anyagot szondán keresztül juttatják be, az egy időpontban beadott folyadék térfogata általában nem haladhatja meg az 1 ml/100 g testtömeg értéket (0,4 ml/100 g testtömeg a maximum az olajok, pl. a kukoricaolaj esetében). Az irritáló vagy korróziót okozó vegyi anyagok kivételével, amelyek esetében a magasabb koncentrációk súlyosabb hatásokat okoznak, minimálisra kell csökkenteni a térfogatbeli eltéréseket, amihez a koncentrációt kell úgy beállítani, hogy minden dózisszinten állandó térfogatot lehessen biztosítani. A kezelésnek minden nap hasonló időpontban kell történnie. Az egyes állatoknak adott adagnak általában a legfrissebb egyedi testtömeg-méréseken kell alapulnia, és legalább hetente korrigálni kell a felnőtt hímek és a felnőtt, nem vemhes nőtények esetében, illetve minden második napon a vemhes nőtények és az F₁-állatok esetében, ha az adagolásra az elválasztás előtt és az elválasztás utáni 2 hétben kerül sor. Ha a TK-adatok azt mutatják, hogy a vizsgált vegyi anyag csak kis mértékben jut át a placentán, a vemhesség utolsó hetében mesterséges táplálással bejuttatott adagot esetleg módosítani kell, hogy megakadályozzuk az anyaállatokra túlságosan toxikus dózis beadását. A nőtények a fialás napján nem kezelhetők gyomorszondán keresztül vagy bármely egyéb olyan módon, amelynek során az állatokat meg kell fogni; előnyösebb kihagyni a vizsgált vegyi anyag adagolását a fialás napján, mint megzavarni az ellés folyamatát.

Pároztatás

31. A P-nőtényeket egyetlen, véletlenszerűen kiválasztott, nem rokon, azonos dóziscsoportból származó hímekkel kell elhelyezni (1:1 párosítás), amíg párosodásra utaló bizonyíték nem észlelhető vagy amíg 2 hét el nem telik. Amennyiben nincs elegendő hím, például a hím párosodás előtti elhullása miatt, akkor a hím(ek)et, amelyek már párosodtak, második nőtény(ek)kel is párosítani lehet (1:1), hogy minden nőtény pároztatva legyen. A vemhesség 0.-napja definíció szerint az a nap, amikor a párosodás tényét megerősítették (hüvelydugó vagy ondó figyelhető meg a nőtényben). Az állatokat a lehető leghamarabb el kell különíteni, ha párosodás utáni bizonyíték figyelhető meg. Ha a párosodás 2 hét alatt nem történik meg, az állatokat el kell különíteni a párosodás minden további lehetőségére nélkül. Az adatok között egyértelműen fel kell tüntetni a pároztatott párokat.

Az alom mérete

32. Az ellés utáni negyedik napon módosíthatjuk az egyes almok egyedszámát a létszám fölötti kölykök véletlenszerű eltávolításával, hogy az eredmény – amennyire lehetséges – almonként öt hím és öt nőtény utód legyen. A kölykök szelektív, pl. a testtömeg alapján történő eltávolítása nem elfogadható. Ha a hím és nőtény utódok száma nem teszi lehetővé a nemként öt azonos nemű utódot tartalmazó almok kialakítását, részleges kiegyenlítés is elfogadható (például hat hím és négy nőtény).

A kölykök kiválasztása az elválasztás utáni vizsgálatokhoz (lásd az 1. ábrát)

33. Az elválasztáskor (kb. PND 21) az összes rendelkezésre álló alomból csoportonként legfeljebb 20 kölyköt beválogatunk a további vizsgálatokhoz a dóziscsoportokba és a kontrollcsoportba, és a nemi érést tartjuk őket (kivéve, ha korábbi vizsgálatra van szükség). A kölyköket véletlenszerűen választjuk ki, azzal a kivétellel, hogy a nyilvánvalóan csökkent utódokat (az állatok testtömege több mint két szórással alatta van az adott alom átlagos tömegének) nem kell figyelembe venni, mivel nem valószínű, hogy a kezelési csoport reprezentatív képviselői lesznek.

A 21. posztnatalis napon a kiválasztott F₁-utódokat véletlenszerűen besoroljuk a három kohort egyikébe az alábbiak szerint:

1. kohort (1.A és 1.B) = Reprodukciós/fejlődési toxicitási vizsgálat,
2. kohort (2.A és 2.B) = Fejlődési neurotoxicitási vizsgálat,
3. kohort = fejlődési immunotoxicitási vizsgálat,

1.A kohort: Egy hím és egy nőstény/alom/csoport (20/nem/csoport): prioritást élvező kiválasztás a szaporítórendszerre gyakorolt hatások és az általános toxicitás elsődleges értékeléséhez.

1.B kohort: Egy hím és egy nőstény/alom/csoport (20/nem/csoport): prioritást élvező kiválasztás a szaporodási teljesítményének az F_1 -állatok pároztatása útján történő nyomonkövetési értékeléséhez, amennyiben ezt is értékelik (lásd az OECD 117. iránymutatását (39)), valamint további kórszövettani adatok gyűjtéséhez reprodukív vagy endokrin toxikus anyagok gyanúja esetén, vagy ha az 1.A kohort eredményei kétesek.

2.A kohort: Csoportonként összesen 20 kölyköt (10 hím és 10 nőstényt csoportonként, egy hím és egy nőstényt almonként) sorolunk be idegrendszeri vizsgálatra, amelyet a felnőttek idegkórszövettani értékelése követ.

2.B kohort: Csoportonként összesen 20 kölyköt (10 hím és 10 nőstényt csoportonként, egy hím és egy nőstényt almonként) sorolunk be elválasztáskori idegkórszövettani értékelésre (PND 21 vagy PND 22). Ha nincs elegendő állat, akkor az állatok 2.A kohortba történő besorolását kell előnyben részesíteni.

3. kohort: Csoportonként összesen 20 kölyköt (10 hím és 10 nőstény csoportonként; almonként egy állat, ha lehetséges). További kölykökre lehet szükség a kontrollcsoportból, hogy betöltsék a pozitív kontroll állatok szerepét a T-sejt függő antitest válasz vizsgálat (TDAR) során, amelyet $PND 56 \pm 3$ kell elvégezni.

34. Ha nincs minden kohort kiszolgálásához elegendő számú kölyök egy alomban, az 1. kohort elsőbbséget élvez, hiszen azt ki lehet bővíteni, hogy egy F_2 -generációt produkáljon. Különleges aggály esetén – például ha a vegyi anyag gyaníthatóan neuro-, immun- vagy reprodukciós toxicitást okoz – további kölyköket lehet rendelni bármelyik kohorthoz. Ezeket a kölyköket különböző időpontokban lehet vizsgálatokra vagy kiegészítő végpontok értékelésére használni. A kohortokba nem sorolt kölyköket klinikai biokémiai vizsgálatnak (55. bekezdés) és makroszkopos boncolásnak (68. bekezdés) vetjük alá.

A P állatok második pároztatása

35. A P-állatok második pároztatása általában nem ajánlott, hiszen az implantációs helyek számára vonatkozó fontos adatok elvesztéséhez vezet (és így a posztimplantációs és perinatális veszteségek elvesztéséhez, amelyek a lehetséges teratogén potenciál mutatói) az első alom esetében. A vegyi anyagnak kitett nőstényekre gyakorolt valamely hatás vizsgálatára vagy tisztázására vonatkozó igényt az szolgálja jobban, ha a vizsgálatot kibővíti, hogy magába foglalja az F_1 -generáció pároztatását is. A P-hímek második pároztatása kezeletlen nőstényekkel azonban mindig egy lehetőség abban az esetben, ha kétes leleteket kell tisztázni, vagy ha az első pároztatás során olyan termékenységre gyakorolt hatást figyeltek meg, amelynek további jellemzésére van szükség.

MEGFIGYELÉSEK ÉLŐ ÁLLATBAN

Klinikai megfigyelések

36. A P- és a kiválasztott F_1 -állatok esetében naponta egyszer általános klinikai megfigyelést kell végezni. Ha az adagolás gyomorszondán keresztül történik, a klinikai megfigyeléseket az adagolás előtti és utáni időpontra kell időzíteni (a csúcs plazmakoncentrációhoz társított toxicitás lehetséges jeleinek észlelése érdekében). A releváns viselkedésváltozásokat, a nehéz vagy hosszan tartó ellés jeleit és a toxicitás minden tünetét rögzíteni kell a jegyzőkönyvben. Az állatokat naponta kétszer, illetve hétféleken naponta egyszer meg kell vizsgálni súlyos toxicitás, megbetegedés és elhullás szempontjából.
37. Ezenkívül az összes P- és F_1 -állatot (elválasztás után) heti rendszerességgel részletesen meg kell vizsgálni, ami kényelmesen elvégezhető az állat mérésekor, minimálisra csökkentve a kezeléssel járó stresszt. A megfigyeléseket gondosan kell végezni és a vizsgálati laboratórium által meghatározott pontozásos rendszerek segítségével kell rögzíteni. Törekedni kell arra, hogy a vizsgálati körülmények közötti különbségek minimálisak legyenek. A feljegyzett észleléseknek ki kell terjedniük többek között a bőr, a szőrzet, a szemek és a nyálkahártyák állapota, a váladékok és kiválasztott anyagok előfordulása, valamint az autonóm aktivitás (például könnyezés, szőrzet felborzolódása, pupillaméret, szokatlan légzési ritmusok) tekintetében megfigyelhető változásokra. A járás, a testtartás és a kézbevitelre adott reakció megváltozását, valamint a klónusos vagy tónusos görcsök, sztereotip viselkedés (például túlzott mosdás, megkergülés) vagy bármilyen bizarr viselkedésmód (például öncsonkítás, hátrafelé járás) megfigyelt eseteit is fel kell jegyezni.

Testtömeg és táplálék-/vízfogyasztás

38. A kezelés első napján, majd azt követően legalább hetente egyszer meg kell mérni a P-állatok testtömegét. Ezenkívül a P-nőstényeket a szoptatás ideje alatt ugyanazokon a napokon kell lemérni, mint a saját aljukban lévő kölyköket (lásd a 44. bekezdést). Az F₁-állatok tömegét egyenként kell megmérni az elválasztáskor (PND 21), azt követően pedig legalább hetente. A testtömeget azon a napon is rögzíteni kell, amikor az állatok eléri a pubertást (a fityma különválása befejeződik vagy a hüvely átjárhatóvá válik). Minden állat tömegét megmérjük az elaltatáskor.
39. A takarmány- és vízfogyasztást (amennyiben a vizsgált vegyi anyag beadása az ivóvízben történik) a vizsgálat alatt legalább hetente rögzíteni kell, ugyanazon a napon, amikor az állatok testtömegét is mérik (kivéve az együttes tartás időszakát). Az F₁-állatok ketrecenkénti takarmányfogyasztását a kohortba történő beválasztás időpontjától kezdve hetente kell rögzíteni.

Ivari ciklus

40. A korábbi ismételt dózísú toxicitási vizsgálatokból esetleg már rendelkezésre állhatnak a vizsgált vegyi anyag ivari ciklusra gyakorolt hatásaival kapcsolatos előzetes információk, amelyeket fel lehet használni a kibővített egygenerációs reprodukciós toxicitási vizsgálat vizsgált vegyi anyagra szabott protokolljának megtervezése során. Az ivari ciklus (hüvelyi citológiával történő) értékelése általában a kezelési időszak elején indul és a pázás megerősítéséig vagy a kéthetes pázási időszak végéig folytatódik. Ha a nőstényeket a kezelést megelőzően már megvizsgáltuk normál ivari ciklusra, akkor célszerű a kezelés elindulása után is folytatni a kenetvételt, de ha a kezelés kezdetekor nem specifikus hatások lehetősége merül fel (például a takarmányfogyasztás jelentős csökkenése a vizsgálat elkezdése után), akkor az állatoknak a párosításhoz vezető kéthetes kenetvételi időszak kezdete előtt akár két hét időt is lehet adni, hogy alkalmazkodjanak a kezeléshez. A nőstények kezelési időszakának ily módon történő meghosszabbítása esetén (azaz ha a pároztatás előtti kezelés 4 hetes lesz) megfontolandó fiatalabb állatok beszerzése és a hímek párosítás előtti kezelésének meghosszabbítása. A hüvelyi/méhnyaki sejtek vétele során vigyázni kell arra, hogy ne sérüljön meg a nyálkahártya, és ne alakuljon ki ezáltal álvemhesség (10) (11).
41. A hüvelyi átjárhatóság kezdetét követően az 1.A kohortba tartozó F₁-nőstények hüvelyi keneteit naponta kell megvizsgálni, amíg az első elszarusodott kenet fel nem jegyezzük, annak érdekében, hogy meghatározzuk a két esemény közötti időintervallumot. Az 1.A kohortba sorolt F₁-nőstények ivari ciklusát is meg kell figyelni a PND 75-től kezdve két héten keresztül. Ezenkívül, ha az F₁-nemzedék pároztatására is szükség van, az 1.B kohortban hüvelyi citológiát kell végezni a párok kialakításának időpontjától a pázásra utaló bizonyíték észleléséig.

Pároztatás és vemhesség

42. A szokásos végpontokon (pl. testtömeg, takarmányfogyasztás, klinikai megfigyelések, beleértve a mortalitás/morbiditás ellenőrzését) kívül a párok kialakításának időpontját, valamint a megtermékenyítés és a fialás időpontját is rögzítjük és kiszámítjuk a prekoitalis intervallumot (a párok kialakításától a megtermékenyítésig) és a vemhesség időtartamát (a megtermékenyítéstől a fialásig). A P-nőstényeket a várható fialás időpontjában gondosan meg kell vizsgálni a nehéz ellésre utaló jelek szempontjából. A fészkelő viselkedés vagy a szoptatási teljesítmény bármilyen eltérést fel kell jegyezni.
43. A nap, amelyen a fialás lezajlik, a 0. laktációs nap (LD 0) az anyaállat számára és a 0. posztnatális nap (PND 0) az utódok számára. Másik lehetőségként az összehasonlítások a posztkoitalis időn is alapulhatnak a vemhesség időtartamában mutatkozó különbségek posztnatális fejlődési adatokra gyakorolt zavaró hatásának megszüntetése érdekében, de a fialáshoz képest számított időtartamokat is fel kell jegyezni. Ez különösen fontos abban az esetben, ha a vizsgált vegyi anyag hatással van a vemhesség időtartamára.

Az utódok paraméterei

44. Az ellés után minden almot a lehető leghamarabb meg kell vizsgálni (PND 0 vagy 1) a kölykök számának és ivarának, a halvaszületések és élveszületések számának, valamint a makroszkópos rendellenességeknek a megállapítása céljából (külsőleg látható rendellenességek, beleértve a farkastorkot; a bőr alatti vérzést; a rendellenes bőrszínt vagy textúrát; a köldökszinór jelenlétét; a tej hiányát a gyomorban; a beszáradt váladék jelenlétét). Ezenkívül az újszülöttek első klinikai vizsgálatának tartalmaznia kell a testhőmérséklet, az aktivitási állapot és a megfogásra adott reakció minőségi értékelését. A 0. posztnatális napon vagy egy későbbi időpontban elhullott kölykökben meg kell határozni az esetleges defektusokat és az elhullás okát. Az élő kölyköket meg kell számolni és egyenként meg kell mérni a 0. vagy 1. posztnatális napon, majd azt követően rendszeresen, például legalább a PND 4, 7, 14 és 21 napokon. Az állatok életkorának megfelelő klinikai vizsgálatokat az utódok testtömegének

mérésekor meg kell ismételni, vagy gyakrabban, ha eset-specifikus megállapításokat tettünk a születéskor. A feljegyzett észleléseknek ki kell terjedniük többek között a külső rendellenességekre, a bőr, a szőrzet, a szemek és a nyálkahártyák állapotára, a váladékok és kiválasztott anyagok előfordulására, valamint az autonóm aktivitásra. A testtartás, a járás bizonytalansága, a kézbevétel, valamint a tónusos vagy klónusos görcsök, sztereotip viselkedés vagy bizzar viselkedésmód megfigyelt eseteit is fel kell jegyezni.

45. Az anogenitális távolságot (AGD) a kölykökben legalább egy alkalommal meg kell mérni PND 0 és PND 4 között. A kölykök testtömegét azon a napon kell megmérni, amikor az AGD-t is mérjük, és az AGD-t normálni kell a kölykök méretére, ami lehetőleg a testtömeg köbgyöke (12). A 12. vagy 13. posztnatális napon ellenőrizni kell a mellbimbók/bimbóudvar jelenlétét hím kölykökben.
46. Minden kiválasztott F_1 -állatot naponta kell értékelni a makk-fityma különválás (hímek) vagy vaginális átjárhatóság (nőstények) szempontjából, amit ezeknek a végpontoknak a várható elérése előtt kell megkezdeni, hogy észlelni lehessen, ha az állatok korábban érik el a szexuális érést. Fel kell jegyezni a nemi szervek minden rendellenességét, mint például a tartós vaginális filamentumot, hypospadiát vagy osztott hímvesszőt. Az F_1 -állatok ivarérettségét a testi fejlődéssel kell összehasonlítani az életkornak és a testsúllynak a makk és a fityma különválásakor (hímek) vagy a hüvely kinyílásakor (nőstény) történő meghatározásával (13).

A potenciális fejlődési neurotoxicitás értékelése (2.A és 2.B kohort)

47. A neurotoxicitási értékeléshez a 2.A kohort mindegyik kezelési csoportjából 10 hím és 10 nőstény állatot és a 2.B kohort mindegyik kezelési csoportjából 10 hím és 10 nőstény állatot kell használni (mindegyik kohort esetében: almonként 1 hím vagy 1 nőstény, minden almot legalább 1 kölyöknek kell képviselnie; véletlenszerű kiválasztás). A 2.A kohort állatait riasztó hanghatásoknak, funkcionális megfigyelési sorozatnak, motoros aktivitási (lásd a 48-50. bekezdést) és neuropatológiai értékeléseknek (lásd a 74-75. bekezdést) kell alávetni. Törekedni kell arra, hogy minimálisak legyenek a kísérleti körülmények közötti eltérések és ne legyenek szisztematikus összefüggésben a kezeléssel. Változók, amelyek hatással lehetnek a viselkedésre: zajszint (pl. szakaszos zaj), hőmérséklet, páratartalom, világítás, szagok, napszak és zavaró környezeti tényezők. A neurotoxicitási vizsgálatok eredményeit a megfelelő történeti kontroll referencia tartományokhoz viszonyítva kell értelmezni. A 2.B kohort állatait neuropatológiai értékelésre kell használni a 21. vagy a 22. posztnatális napon (lásd a 74-75. bekezdést).
48. A riasztó hanghatásokra adott választ a 24. posztnatális napon (± 1 nap) kell megvizsgálni a 2.A kohort állatainak felhasználásával. A vizsgálat napját ellensúlyozni kell a kezelt és a kontroll csoportokban. Minden szakasz 50 vizsgálatból áll. A riasztó hanghatásokra adott választ vizsgáló tesztben meg kell határozni az átlagos válasz amplitúdóját a 10 vizsgálatból álló egyes blokkokban (5 blokk, egyenként 10-10 vizsgálat), a vizsgálati feltételeket úgy optimalizálva, hogy azok tesztmenet alatti habituációt eredményezzenek. Ezeknek az eljárásoknak összhangban kell lenniük a B.53 vizsgálati módszerrel (35).
49. Egy megfelelő időpontban a PND 63 és a PND 75 között a 2.A kohort állatait egy funkcionális megfigyelési sorozatnak és a motoros aktivitást vizsgáló automatizált tesztnek vetjük alá. Ezeknek az eljárásoknak összhangban kell lenniük a B.43 (33) és a B.53 vizsgálati módszerrel (35). A funkcionális megfigyelési sorozat magában foglalja az állat megjelenésének, viselkedésének és funkcionális integritásának alapos leírását. Ezeket az állatoknak az otthonul szolgáló ketrecben, illetve az állatok áthelyezése után egy standard megfigyelő karámban (nyílt területen) – ahol az állatok szabadon mozognak – végzett megfigyelése, valamint manipulatív tesztek útján értékeljük. A tesztelésben a legkevésbé interaktívól a leginkább interaktív felé kell haladni. A megfigyelések listáját az 1. függelék mutatja be. Minden állatot alaposan képzett megfigyelőknek kell megvizsgálniuk, akik nincsenek tisztában az állat kezelési állapotával, és szabványosított eljárásokat használnak a megfigyelői variabilitás minimalizálása érdekében. Amennyiben lehetséges, célszerű, hogy ugyanaz a megfigyelő értékelje az állatokat egy adott teszt során. Ha ez nem lehetséges, demonstrálni kell a megfigyelők közötti megbízhatóságot. A viselkedési vizsgálatban szereplő valamennyi paraméter esetében egyértelmű, operatív módon meghatározott skálákat és pontozási kritériumokat kell használni. Lehetőség szerint objektív mennyiségi méréseket kell kidolgozni azokhoz a megfigyelési végpontokhoz, amelyek szubjektív rangsorolást igényelnek. A motoros aktivitás esetében minden állatot külön-külön kell tesztelni. A tesztnek elegendően hosszú ideig kell tartania ahhoz, hogy a kontrollok esetében demonstrálni lehessen az tesztmenet alatti habituációt. A motoros aktivitást olyan automatizált aktivitásrögzítő készülékkel kell monitorozni, amely egyaránt képes az aktivitás növekedésének és csökkenésének észlelésére (vagyis a kiindulási aktivitás az eszközzel mérve ne legyen olyan alacsony, hogy kizárja az aktivitás csökkenésének kimutatását, és ne legyen olyan magas, hogy kizárja az aktivitás növekedésének kimutatását). Minden eszközt be kell vizsgálni olyan standard eljárásokkal, amelyek a lehető legnagyobb mértékben garantálják a különböző eszközök folyamatos és megbízható működését. A kezelési csoportokat a lehetséges mértékben kiegyensúlyozottan kell szétosztani a készülékek között. A kezelési csoportokat ellensúlyozni kell a tesztidőpontok között, hogy kiküszöbölhető legyen az aktivitás cirkadián ritmusának zavaró hatása.
50. Ha a meglévő adatok azt mutatják, hogy egyéb funkcionális vizsgálatra is szükség van (pl. érzékszervi, szociális, kognitív), ezeket úgy kell beilleszteni, hogy ne veszélyeztessék a vizsgálatban végzett egyéb értékelések integritását. Amennyiben ezeket a vizsgálatokat ugyanazokban az állatokban hajtják végre, amelyeket a standard riasztó

hanghatások vizsgálata, a funkcionális megfigyelési vizsgálat és a motoros aktivitás vizsgálata során is használtak, a különböző tesztek úgy kell ütemezni, hogy minimálisra csökkentsék annak a kockázatát, hogy veszélyeztessék ezeknek a teszteknek az integritását. A kiegészítő eljárások különösen akkor lehetnek hasznosak, ha az empirikus megfigyelés, a várható hatások, illetve a hatásmechanizmus egy bizonyos típusú neurotoxicitásra utalnak.

A potenciális fejlődési immunotoxicitás értékelése (3. kohort)

51. Az 56. posztnatális napon (± 3 nap) a 3. kohort mindegyik kezelési csoportjának állatai közül 10 hím és 10 nőtényt (almonként 1 hím és 1 nőtényt; minden almot legalább 1 kölyök képvisel; véletlenszerű kiválasztás) egy T-sejt dependens antitest válasz vizsgálatban, azaz egy T-sejt függő antigénre, mint például a birka vörösvértestre (sheep red blood cells, SRBC), vagy a kulcslyuk csiga hemocianinra (keyhole limpet hemocyanin, KLH) adott primer IgM antitestreakció vizsgálatban kell felhasználni, összhangban az aktuális immunotoxicitási vizsgálati eljárásokkal (14) (15). A választ a specifikus plak-képző sejteknek (PFC) a lépben való megszámlálásával vagy az SRBC- vagy KLH-specifikus IgM antitestek szérumszintjének ELISA-val történő meghatározásával lehet kiértékelni, a csúcsválasz időpontjában. A válaszok általában négy (PFC válasz) vagy öt (ELISA) nappal az intravénás immunizálást követően adják a csúcsot. Abban az esetben, ha az elsődleges antitestválaszt a plak-képző sejtek megszámlálásával vizsgálják, megengedett, hogy az állatok alcsoportjait különböző napokon értékeljük, feltéve, hogy: az alcsoport immunizálását és elutaltatását úgy időzíti, hogy a PFC-eket a válasz csúcsán számolják meg; az alcsoportok azonos számú hím és nőtény utódot tartalmaznak minden dóziscsoportból, beleértve a kontrollokat is; és az alcsoportokat körülbelül ugyanabban a posztnatális életkorban értékeljük. A vizsgált vegyi anyaggal való expozíció a lépnek a PFC-válaszhoz való összegyűjtését vagy a szérumoknak az ELISA-vizsgálathoz való levételét megelőző napig folytatódik.

A lehetséges reprodukciós toxicitás nyomonkövető értékelése (1.B kohort)

52. Az 1.B kohortba tartozó állatokat a 90. posztnatális napon túl is kezelés alatt lehet tartani, és pároztatni lehet, hogy F₂-generációt állítsanak elő, ha szükséges. Azonos dóziscsoportba tartozó hímeket és nőtényeket kell összeköltöztetni (elkerülve a testvérek párosítását), legfeljebb két hét időtartamra, amely a 90. posztnatális napon vagy azt követően kezdődhet, de a 120. posztnatális napnál nem később. Az eljárások hasonlóak a P-állatoknál használt eljárásokhoz. A bizonyítékok súlya alapján azonban az almot már a 4. posztnatális napon el lehet altatni helyett, hogy végigkövetnénk őket az elválasztásig vagy azon túl.

MEGFIGYELÉSEK A VIZSGÁLAT LEZÁRÁSÁKOR

Klinikai biokémia/Hematológia

53. A P-állatokban figyelemmel kell kísérni a szisztémás hatásokat. A vizsgálat lezárásakor éhgyomri vérmintát kell venni egy meghatározott helyről tíz véletlenszerűen kiválasztott P-híméből és -nőtényéből dóziscsoportonként, amelyet megfelelő körülmények mellett kell tárolni, és részleges vagy teljes körű hematológiai, klinikai biokémiai, valamint T4- és TSH-vizsgálatnak vagy a vizsgált vegyi anyag ismert hatásprofilja által indikált egyéb vizsgálatoknak kell alávetni (lásd az OECD 151. iránymutatását (40)). A vizsgálati időszak végén a következő hematológiai paramétereket kell megvizsgálni: hematokrit, hemoglobin-koncentráció, vörösvértest-szám, teljes és differenciált vérkép, trombocitaszám és véralvadási idő/képesség. A vérplazma- és vészérum-meghatározások során vizsgálandó elemek: vércukor, összkoleszterin, karbamid, kreatinin, összprotein, albumin és legalább két, a májsejti hatásokat jelző enzim (pl. alanin-aminotranszferáz, aszpartát-aminotranszferáz, alkalikus foszfatáz, gamma-glutamil-transzpeptidáz és szorbitol-dehidrogenáz). További enzimek vizsgálata és az epesavak mérése bizonyos körülmények között hasznos információkkal szolgálhat. Ezenkívül az összes állatból vért lehet venni és eltárolni egy későbbi időpontban végzendő esetleges analízis céljára, amely segítséget nyújthat a kétes hatások tisztázásában vagy a belső expozíciós adatok előállításában. Ha a P-állatok második pároztatása nem szerepel a tervekben, akkor a vérmintákat az állatok ütemterv szerinti elpusztításakor végzett eljárás részeként vagy közvetlenül azelőtt kell levenni. Abban az esetben, ha az állatokat megtartják, a vérmintákat néhány nappal az állatok második alkalommal történő pároztatása előtt kell levenni. Annak az esetnek a kivételével, ha az ismételt dózisú vizsgálatokból származó adatok azt mutatják, hogy a vizsgált vegyi anyag nem befolyásolja a paramétert, az állatok elpusztítása előtt vizeletvizsgálatot kell elvégezni, és a következő paramétereket kell kiértékelni: makroszkopos megjelenés, mennyiség, ozmolalitas vagy fajsúly, pH-érték, fehérje, glükóz, vér és vesejtek, sejtörmelék. A vizeletet a vizsgált vegyi anyag és/vagy a metabolit(ok) kiválasztódásának monitorozására is lehet gyűjteni.
54. Az F₁-állatokban is figyelemmel kell kísérni a szisztémás hatásokat. A vizsgálat lezárásakor éhgyomri vérmintát kell venni egy meghatározott helyről tíz véletlenszerűen kiválasztott 1.A kohort híméből és nőtényéből dóziscsoportonként, amelyet megfelelő körülmények mellett kell tárolni, és standard klinikai biokémiai vizsgálatnak kell alávetni, beleértve a pajzsmirigyhormonok (T4 és TSH) szérumszintjeinek értékelését, a hematológiát (teljes és differenciált leukocita- és vörösvértest-szám) és a vizeletvizsgálatot.

55. A 4. posztnatális napon megmaradó kölyköket makroszkópos boncolásnak kell alávetni, és meg kell fontolni a szérumban pajzsmirigyhormon (T4) koncentrációjának mérését. Szükség esetén az újszülött (PND 4) vért a biokémiai/pajzsmirigyhormon analízisekhez almonként egyesíteni lehet. A 22. posztnatális napon makroszkópos boncolásnak alávetett választott kölykökből (kohortokba be nem válogatott F₁-kölykök) is lehet vért gyűjteni a T4- és TSH-analízishez.

Spermaparaméterek

56. A sperma paramétereit minden P-generációs hímekben mérni kell, kivéve, ha a meglévő adatok azt mutatják, hogy a sperma paraméterei nem változtak a 90 napos vizsgálat során. A spermaparaméterek vizsgálatát minden 1.A kohort hímében el kell végezni.
57. A vizsgálat végén a here és a mellékhere tömege minden P és F₁ (1.A kohort) hím esetében rögzítésre kerül. Legalább egy herét és egy mellékherét félre kell tenni a kórszövettani vizsgálatához. A fennmaradó mellékherét a mellékhere farkában lévő spermiumtartalék számszerűsítésére használjuk (16) (17). Ezen túlmenően, a mellékhere farkából (vagy az ondóvezetékéből) spermiumokat kell gyűjteni olyan módszerekkel, amelyek minimálisra csökkentik a spermiumok károsodását, amely zavarná a spermiumok motilitásának és morfológiájának értékelését (18).
58. A spermiumok mozgékonyágát lehet közvetlenül az állat elpusztítása után értékelni vagy felvételt is lehet készíteni a későbbi analízishez. A fokozottan motilis spermiumok százalékos arányát meg lehet határozni szubjektív vagy objektív módon számítógép által támogatott mozgáselemzés segítségével (19) (20) (21) (22) (23) (24). A spermiumok morfológiájának értékeléséhez mellékheréből (vagy ondóvezetékéből) származó spermamintát kell megvizsgálni fixált vagy nedves állapotban (25), és mintánként legalább 200 spermiumot kell kategorizálni normál (fej és középrész/farok egyaránt normál) vagy kóros spermiumként. A morfológiai sperma-rendellenességek közé tartoznak például a fúzió, az izolált fejek és a torz fej és/vagy farok (26). A torz vagy nagy spermiumfej a spermiumképződés hibáira utalhat.
59. Ha a spermaminták le vannak fagyaszthatva, a kenetek le vannak fixálva és a spermiumok mozgékonyágának elemzését szolgáló felvételeket a boncolás időpontjában rögzítettük (27), a későbbi elemzést a kontroll és a magas dózissal kezelt hímekekre lehet korlátozni. Ha azonban a kezeléssel összefüggő hatások figyelhetők meg, a kisebb dózissal kezelt csoportokat is értékelni kell.

Makroszkópos boncolás

60. A vizsgálat befejezésekor vagy idő előtti elhullás esetén valamennyi P- és F₁-állatban makroszkóposan meg kell vizsgálni az esetleges strukturális rendellenességeket vagy patológiás elváltozásokat. Külön figyelmet kell szentelni a szaporítószerveknek. Az elhullásközeli állapotba került és ezért humánus módon exterminált és az elpusztult kölyköket jegyzőkönyvezni kell, és a nem macerált kölykökben meg kell határozni az esetleges defektusokat és/vagy az elhullás okát, majd konzerválni kell őket.
61. A felnőtt P- és F₁-nőstények esetében a boncolás napján meg kell vizsgálni a hüvelyi kenetet, hogy meghatározzuk az ivari ciklus szakaszát, és hogy lehetővé tegyük a korreláció felállítását a szaporítószervek kórszövettanával. A P-nőstények (és az F₁-nőstények, ha vannak ilyenek) méhében megvizsgáljuk az implantációs helyek jelenlétét és számát, olyan módon, amely nem veszélyezteti a kórszövettani értékelést.

Szervtömeg és a szövetek megőrzése – P és F₁ felnőtt állatok

62. A vizsgálat befejezésének időpontjában a testtömegeket és a megfelelő kohortokba (az alábbiak szerint) tartozó valamennyi P- és F₁-felnőtt állat alább felsorolt szerveinek nedves tömegét a lehető leghamarabb meg kell határozni, hogy a kimetszés utáni kiszáradás elkerülhető legyen. Ezeket a szerveket ezután megfelelő körülmények között meg kell őrizni. Eltérő rendelkezés hiányában a páros szerveket külön-külön vagy együtt is le lehet mérni, összhangban a vizsgálatot végző laboratórium általános gyakorlatával.

— méh (petevezetékekkel és méhnyakkal), petefészkek,

— here, mellékhere (teljes és cauda a spermiumszám meghatározásához használt mintákhoz),

— prosztata (dorzolaterális és ventrális részek együtt). A prosztata és a kapcsolódó szervek megtisztítása során ügyelni kell arra, hogy ne szűrjük át a folyadékkal teli ondóhólyagokat. Ha kezeléssel összefüggő hatás mutatkozik a prosztata teljes tömegében, a fixálás után a dorzolaterális és ventrális szegmenseket gondosan szét kell választani, és külön-külön le kell mérni,

- ondóhólyagok a koaguláló mirigyekkel és váladékukkal (egy egységként),
 - agy, máj, vese, szív, lép, csecsemőmirigy, agyalapi mirigy, pajzsmirigy (fixálás után), mellékvesék és ismert célszervek vagy -szövetek.
63. A fent felsorolt szervek mellett a perifériás ideg-, az izom-, a gerincvelő-, a szem- és látóideg-, az emésztőrendszer-, a húgyhólyag-, a tüdő-, a légcső- (a pajzsmiriggyel és a mellékpajzsmiriggyel), a csontvelő-, az ondóvezeték- (hímek), az emlőmirigy- (hímek és nőtények), és a hüvelymintákat megfelelő körülmények között meg kell őrizni.
64. Az 1.A kohort állatainak minden szervét meg kell mérni és meg kell őrizni a kórszövettani vizsgálatához.
65. A pre- és posztnatálisan kiváltott immunotoxikus hatások vizsgálatához az 1.A kohort mindegyik kezelési csoportjából 10 hím és 10 nőtény állatot (almonként 1 hím vagy 1 nőtény; minden almot legalább 1 kölyöknek kell képviselnie; véletlenszerű kiválasztás) a következő vizsgálatoknak kell alávetni az elaltatáskor:
- az expozíciós útvonalhoz kapcsolódó és attól távoli területről származó nyirokcsomók lemerése (a mellékvese mirigyek, a csecsemőmirigy és a lép tömege mellett, amelyeket már valamennyi 1.A kohort állaton megmértek),
 - a lép-limfocita alcsoport analízise (CD4+ és CD8+ T-limfociták, B-limfociták, természetes ölősejtek) a lép egyik felének felhasználásával, a lép másik felét a kórszövettani értékeléshez konzerváljuk.
- A lép-limfocita szubpopulációk nem immunizált (1.A kohort) állatokban történő elemzése meghatározza, hogy az expozíció összefügg-e a »segítő« (CD4+) vagy citotoxikus (CD8+) thymus-eredetű limfociták vagy természetes ölősejtek (NK) (gyors válasz neoplasztikus sejtekre és kórokozókra) immunológiai egyensúlyi eloszlásának eltolódásával.
66. A 1.B kohort állatok esetében a következő szerveket kell megmérni és a megfelelő szöveteiből blokkokat készíteni:
- vagina (nem mért),
 - méh a méhnyakkal,
 - petefészkek,
 - here (legalább egy),
 - mellékherék,
 - ondóhólyag és koaguláló mirigyek,
 - prosztata,
 - agyalapi mirigy,
 - azonosított célszervek.

Az 1.B kohort kórszövettani értékelését akkor kell elvégezni, ha az 1.A kohort eredményei kétesek, illetve szaporodási vagy endokrin mérgező anyagok gyanúja merül fel.

67. 2.A és 2.B kohort: Fejlődési neurotoxicitási vizsgálat (PND 21 vagy PND 22 és felnőtt utód). A 2.A kohort állatokat a viselkedési teszt után el kell altatni, az agytömegeket fel kell jegyezni és teljes idegkórszövettani vizsgálatot kell végezni a neurotoxicitás értékelése céljából. A 2.B kohort állatokat a 21. vagy 22. posztnatális napon el kell altatni, az agytömegeket fel kell jegyezni és az agyakat mikroszkóppal meg kell vizsgálni a neurotoxicitás értékelése céljából. A 2.A kohortba tartozó állatoknál előírás a perfúziós fixálás, ami választható a 2.B kohortba tartozó állatok esetében, amint azt a B.53 vizsgálati módszer előírja (35).

Szervtömeg és a szövetek megőrzése – F₁ elválasztott állatok

68. A kohortokba be nem válogatott kölyköket, beleértve a csökkent egyedeket, az elválasztás után a 22. posztnatális napon el kell altatni, kivéve, ha az eredmények azt mutatják, hogy élő állatokban végzendő további vizsgálatokra van szükség. Az elaltatott kölykökön makroszkópos boncolást kell végezni, beleértve a szaporítószervek értékelését a 62. és 63. bekezdésben leírtak szerint. Annyi alomból, amennyiből csak lehetséges, nemenként és csoportonként legfeljebb 10 kölyök esetében meg kell mérni az agy, a lép és a csecsemőmirigy tömegét, és megfelelő körülmények között meg kell őrizni ezeket a szerveket. Ezenkívül ezeknek a hím és nőtény kölyköknek az emlőszöveteit meg lehet őrizni további mikroszkópos elemzés céljára ⁽¹⁾ (lásd az OECD 151. iránymutatását (40)). A makroszkópos rendellenességeket és a célszöveteket meg kell őrizni az esetleges szövettani vizsgálat céljából.

⁽¹⁾ A kutatások kimutatták, hogy az emlőmirigy, különösen az emlőmirigy fejlődésének az élet korai szakaszában zajló fázisában, az ösztrogénaktivitás érzékeny végpontja. Ajánlott a vizsgálati módszerbe olyan végpontok beillesztése, amelyek a mindkét nemhez tartozó kölykök emlőmirigyét érintik, ha validálták ezeket.

Kórszövettan – P-állatok

69. A 62. és 63. bekezdésben felsorolt szervek teljes kórszövetteni vizsgálatát minden magas dózissal kezelt és kontroll P-állatban el kell végezni. A kezeléssel összefüggő változásokat mutató szerveket az alacsonyabb dóziscsoportokba tartozó állatokban is meg kell vizsgálni a NOEL meghatározása érdekében. El kell végezni továbbá valamennyi olyan állat szaporítószerveinek kórszövetteni vizsgálatát, amelyek gyaníthatóan csökkent termékenységgel bírnak, így például azok esetében, amelyek nem tudtak párzani, megfoganni, utódokat nemzeni vagy egészséges utódokat a világra hozni, vagy amelyeknél az ivari ciklusra vagy a spermiumok számára, motilitására vagy morfológiájára gyakorolt hatásokat észleltünk, és valamennyi makroszkópos elváltozást is kórszövetteni vizsgálatnak kell alávetni.

Kórszövettan – F₁-állatok*Az 1. kohort állatai*

70. A 62. és 63. bekezdésben felsorolt szervek teljes kórszövetteni vizsgálatát minden magas dózissal kezelt és kontroll felnőtt 1.A kohort állatban el kell végezni. Az alomokat legalább nemenként 1 kölyöknek kell képviselni. A kezeléssel összefüggő változásokat és makroszkópos léziókat mutató szerveket és szöveteket az alacsonyabb dóziscsoportokba tartozó állatokban is meg kell vizsgálni a NOEL meghatározása érdekében. A limfoid szervekre pre- és posztnatális korban gyakorolt hatások értékeléséhez az összegyűjtött nyirokcsomók és csontvelő kórszövetteni vizsgálatát is el kell végezni az 1.A kohortba tartozó 10 hím és 10 nőstény állaton, a csecsemőmirigy, a lép és a mellékvesék 1A állatokban már elvégzett kórszövetteni értékelése mellett.
71. Szaporodási vagy endokrin mérgező anyagok gyanúja esetén az 1.B kohortba tartozó valamennyi állatnak a 66. bekezdésben leírt blokk állapotba feldolgozott szaporodási és endokrin szöveteinek kórszövetteni vizsgálatot kell végezni. Az 1.B kohorton szintén szövetteni vizsgálatot kell végezni, ha az a 1.A kohort eredményei kétesek.
72. A felnőtt nőstények petefészkeinek tüszőkezdeményeket és növekvő tüszőket, valamint sárgatesteket is kell tartalmaznia; ezért a kórszövetteni vizsgálatnak az F₁-nőstényekben a tüszőkezdemények és a kis fejlődő tüszők, valamint a sárgatestek mennyiségi értékelését kell céloznia; az állatok számának, a petefészkek-szekció kiválasztásának, valamint a szekcióból vett minta méretének statisztikailag megfelelőnek kell lennie az alkalmazott értékelési eljárásához. A tüszőket először a kontroll és a nagy dózissal kezelt állatokban lehet megszámlálni, és abban az esetben, ha káros hatást észlelnek az utóbbiban, az alacsonyabb dózissal kezelt állatokat is meg kell vizsgálni. A kezelt és kontroll petefészkek összehasonlításához a vizsgálatoknak ki kell terjedniük a tüszőkezdemények összeszámlálására, amelyekhez hozzá lehet venni a kis növekvő tüszőket is (lásd az OECD 151. iránymutatását (40)). A sárgatestek értékelését az ivari ciklus vizsgálatával párhuzamosan kell elvégezni, hogy a ciklus szakaszát figyelembe lehessen venni az értékelés során. A petevezeteket, a méhet és a hüvelyt a szervre jellemző megfelelő fejlődés szempontjából is megvizsgáljuk.
73. A herék részletes szövetteni vizsgálatát az F₁-hímeken végezzük el, hogy azonosítsuk a here differenciálásra és fejlődésére, valamint a spermatogenezisre gyakorolt kezeléssel összefüggő hatásokat (38). Amennyiben lehetséges, a rete testis részeit is meg kell vizsgálni. A mellékhere fejét, testét és farkát, valamint az ondóvezeteket a szervre jellemző megfelelő fejlődés, valamint a P-hímeknél szükséges paraméterek szempontjából vizsgáljuk.

A 2. kohort állatai

74. A 2.A kohort valamennyi magas dózissal kezelt és kontroll állatán nemenként idegkórszövetteni vizsgálatot végzünk az idegrendszeri vizsgálat befejezését követően (PND 75 után, de nem később, mint PND 90). Az agy kórszövetteni vizsgálatát a 2.B kohort minden magas dózissal kezelt és kontroll állatán nemenként a 21. vagy 22. posztnatális napon végezzük el. A kezeléssel összefüggő változásokat mutató szerveket vagy szöveteket az alacsonyabb dóziscsoportokba tartozó állatokban is meg kell vizsgálni a NOEL meghatározása érdekében. A 2.A és 2.B kohortba sorolt állatok esetében az agy több metszetét is megvizsgáljuk a szaglóagymák, cerebrális cortex, hippocampus, bazális ganglionok, thalamus, hypothalamus, középagy (tectum, tegmentum, és agyi pedunculusok), agytörzs és a kisagy vizsgálata érdekében. Kizárólag a 2.A kohort esetében a szemeket (retina és látóideg) és a perifériás ideg-, izom- és a gerincvelőmintákat is megvizsgáljuk. Ezeknek az idegkórszövetteni eljárásoknak összhangban kell lenniük a B.53 vizsgálati módszerrel (35).
75. A morфомetriai (kvantitatív) értékeléseket az agy reprezentatív területein (megbízható mikroszkopikus tájékozási pontok alapján gondosan kiválasztott homológ szakaszok) kell végezni, és ezek az értékelések magukban foglalhatják a specifikus agyi régiók lineáris és/vagy területi méréseit is. Legalább három egymást követő metszetet kell készíteni minden tájékozási pontnál (szint), hogy kiválasztható legyen az adott értékelendő agyi terület leginkább homológ és reprezentatív metszete. A kórboncnoknak megfelelő döntést kell hoznia, hogy a mérésre

előkészített metszetek homológok-e a mintakészlet egyéb metszeteivel, és így alkalmasak-e a bevélogatásra, hiszen különösen a lineáris mérések viszonylag rövid távolságon belül is változhatnak (28). A nem homológ metszetek használata tilos. Bár a cél az, hogy az erre a célra fenntartott valamennyi állatból (10/nem/dózisszint) mintát vegyünk, kisebb állatszámok is elegendők lehetnek. A nemenként és dózisszintenként kevesebb mint 6 állatból származó minta azonban általában nem tekinthető elégségesnek ehhez a vizsgálati módszerhez. Sztereológiát lehet használni a kezelések egyes paraméterekre, mint például bizonyos neuroanatómiai régiók térfogatára vagy sejteinek számára gyakorolt hatásainak azonosítására. A szövetminták előkészítésének valamennyi lépése során, a szövetek fixálásától kezdve a szövetminták kimetszésén és a szövetek feldolgozásán át a metszetek festéséig, kiegyensúlyozott elrendezést kell alkalmazni úgy, hogy minden tételnek minden dóziscsoportból kell reprezentatív mintákat tartalmaznia. Ha morfometriai vagy sztereológiai elemzést kell végezni, az agyszöveteket minden dózisszinten egyidejűleg kell a megfelelő közegbe ágyazni annak érdekében, hogy elkerüljük a zsugorodási műtermékek kialakulását, amelyek a fixálószerben való hosszabb tároláshoz társulhatnak.

JEGYZŐKÖNYVEZÉS

Adatok

76. Az adatokat külön-külön és táblázatos formában összefoglalva is be kell mutatni. Szükség esetén minden vizsgálati csoport és generáció esetében a következőket kell jegyzőkönyvezni: az állatok száma a vizsgálat kezdetekor, a vizsgálat során elpusztult vagy humánus okokból elpusztított állatok száma, minden elhullás vagy humánus elpusztítás időpontja, a termékeny állatok száma, a vemhes nőstények száma, az almodat elő nőstények száma, a toxicitás jeleit mutató állatok száma. A toxicitás leírását is jegyzőkönyvezni kell, beleértve kezdetének idejét, időtartamát és súlyosságát.
77. A számszerű eredményeket megfelelő és elfogadott statisztikai módszerrel kell értékelni. A statisztikai módszereket a vizsgálati elrendezés részeként kell kiválasztani, és megfelelően kell kezelni a nem normális adatokat (pl. számlálási adatok), a cenzúrázott adatokat (pl. korlátozott megfigyelési idő), a nem függetlenséget (pl. az almodat hatásai és az ismételt mérések) és a nem egyenlő varianciákat. Az általánosított lineáris kevert modellek és a dózis-válasz modellek az e vizsgálati módszer által generált adatok elemzéséhez megfelelő elemzési eszközök széles körét lefedik. A jegyzőkönyvnek elegendő információt kell tartalmaznia az alkalmazott elemzési módszerrel és számítógépes programmal kapcsolatban ahhoz, hogy egy független bíráló vagy statisztikus értékelhesse vagy újraértékelhesse az elemzést.

Az eredmények értékelése

78. A vizsgálat eredményeit a megfigyelt hatások, ezen belül a boncolási és mikroszkópos eredmények szempontjából kell értékelni. Az értékelésnek tartalmaznia kell a kapcsolatot, vagy annak hiányát, a dózis és a rendellenességek – beleértve a makroszkópos léziókat – jelenléte, előfordulása és súlyossága között. A célszerveket, a termékenységet, a klinikai tüneteket, a reprodukciós és almodteljesítményt, a testtömeg változásait, a mortalitást és minden más toxikológiai és fejlődési hatást is értékelni kell. Különös figyelmet kell fordítani az ivarspecifikus változásokra. A vizsgálati eredmények értékelésekor figyelembe kell venni a vizsgált vegyi anyag fizikai-kémiai tulajdonságait és az esetlegesen rendelkezésre álló toxikokinetikai adatokat, beleértve a placentán át történő transzfert és a tejbe történő kiválasztódást is.

Vizsgálati jegyzőkönyv

79. A vizsgálati jegyzőkönyvnek tartalmaznia kell a jelen vizsgálatban a P-, F₁- és – adott esetben – F₂-állatokból gyűjtött következő információkat:

Vizsgált vegyi anyag:

- a vizsgált vegyi anyag kémiai, toxikokinetikai és toxikodinamikai tulajdonságaira vonatkozó valamennyi rendelkezésre álló információ,
- azonosító adatok,
- tisztaság.

Vivőanyag (ha van):

- a vivőanyag megválasztásának indokolása, ha az nem víz.

Kísérleti állatok:

- felhasznált faj/törzs,
- az állatok száma, kora és neme,
- származás, tartási körülmények, takarmány, fészekrakó anyagok stb.,
- az egyes állatok testtömege a vizsgálat kezdetekor,
- a P-nőstények hüvelykenet-adatai a kezelés megkezdése előtt (ha az adatok összegyűjtése megtörtént ebben az időpontban),
- a P-generáció párosításának nyilvántartása, megadva a hím és nőstény partnereket és a pároztatás sikeressége,
- a felnőtt F_1 -állatok származási almának nyilvántartása.

Vizsgálati körülmények:

- az adagolási szintek megválasztásának indoklása,
- a vizsgált vegyi anyag formulázásával/a táplálék előkészítésével, az elért koncentrációval kapcsolatos információk,
- a készítmény stabilitása és homogenitása a vivőanyagban vagy hordozóban (pl. takarmány, ivóvíz), a vérben és/vagy a tejben a felhasználás és a felhasználások között tárolás feltételei mellett,
- a vizsgált vegyi anyag beadására vonatkozó adatok,
- átszámítás a vizsgált vegyi anyagnak a takarmányban/ivóvízben meglévő koncentrációjáról (ppm) a tényleges dózisra (mg/testtömeg kg/nap), ha alkalmazható,
- a táplálék és a víz minőségére vonatkozó adatok (ezen belül a takarmány összetétele, ha rendelkezésre áll),
- a randomizálási eljárások részletes leírása, amelyeket a kölykök selejtezésre történő kiválasztására és a kezelési csoportokba való besorolására használtak,
- környezeti feltételek,
- a vizsgáló személyzet listája, beleértve a szakmai képzéseket.

Eredmények (összefoglaló és egyéni adatok, nemek és adagolás szerint):

- a P- és F_1 -állatok takarmányfogyasztása, vízfogyasztása (ha rendelkezésre áll), takarmányhasznosítása (egy gramm elfogyasztott takarmányra eső testtömeg-gyarapodás, kivéve az együttélés és a szoptatás időszakát), vizsgált vegyi anyag fogyasztása (takarmányban/ivóvízben történő adagolás esetén),
- felszívódási adatok (ha vannak),
- resttömeg adatok a P-generációnál,
- a kiválasztott F_1 -állatok testtömeg adatai az elválasztás után,
- a vizsgálat során bekövetkező elhullás időpontja, illetve hogy az állatok életben maradtak-e az exterminálásig,
- a klinikai megfigyelések jellege, súlyossága és időtartama (a változások visszafordíthatók-e vagy sem),
- hematológia, vizeletvizsgálat és klinikai kémiai adatok, beleértve a TSH- és T4-értékeket,
- a lépsejtek fenotípusos elemzése (T-, B-, NK-sejtek),
- csontvelő cellularitás,
- toxikus reakcióra vonatkozó adatok,
- normális vagy abnormális ivari ciklust mutató P- és F_1 -nőstények száma és a ciklus időtartama,
- párzásig eltelt idő (prekoitális intervallum, a párosítás és a párzás közötti napok száma),
- a szaporodásra gyakorolt toxikus és más hatások, beleértve azoknak az állatoknak számát és százalékos arányát, amelyeknél megvalósult a párzás, a vemhesség, a fialás és a szoptatás, azoknak a hímeknek a számát és százalékos arányát, amelyek vemhességet váltottak ki, azoknak a nőstényeknek a számát és százalékos arányát, amelyek dystocia/elhúzódó vagy nehéz ellés jeleit mutatták,
- a vemhesség és – ha rendelkezésre áll – a fialás időtartama,
- a beágyazódások száma, az alom nagysága és a hím kölykök aránya,

- a beágyazódás utáni veszteségek, az élveszületések és halvaszületések száma és százalékos aránya,
- az alom tömege és a kölykök tömege (hímek, nőstények és kombinált), a csökkent egyedek száma, ha megállapításra került,
- a szemmel látható rendellenességeket mutató kölykök száma,
- az utódokra, a születés utáni növekedésre, az életképességre gyakorolt toxikus és egyéb hatások stb.,
- a fizikai tájékozódási pontokra vonatkozó adatok kölykökben és egyéb posztnatális fejlődési adatok,
- az F₁-állatok nemi éréseire vonatkozó adatok,
- adott esetben a kölykökben és felnőtt állatokban végzett funkcionális megfigyelésekkel kapcsolatos adatok,
- resttömeg az elatatkor, valamint a P- és felnőtt F₁-állatok abszolút és relatív szervtömegadatai,
- boncolási eredmények,
- az összes kórszövettani lelet részletes ismertetése,
- teljes ondósejtszám a mellékhere farki részében, az előrehaladó mozgást végző ondósejtek százalékos aránya, morfológiailag normál ondósejtek százalékos aránya és az azonosított rendellenességet mutató ondósejtek százalékos aránya a P- és F₁-hímekben,
- adott esetben a P- és F₁-nőstények petefészkeiben található tüszők száma és érési szakaszai,
- a sárgatestek száma az F₁-nőstények petefészkeiben,
- adott esetben az eredmények statisztikai feldolgozása.

A 2. kohort paraméterei:

- a megfigyelések és eljárások szabványosítására használt eljárások, valamint a megfigyelések pontozására szolgáló operatív definíciók részletes leírása,
- az alkalmazott vizsgálati eljárások listája, alkalmazásuk indoklásával,
- az alkalmazott viselkedési/funkcionális, neuropatológiai és morfometriás eljárások részletei, beleértve az automatizált eszközökre vonatkozó információkat és adatokat,
- az eszközök kalibrálását szolgáló és egyenértékűségüket biztosító, illetve a kezelési csoportoknak a vizsgálati eljárásokban való kiegyensúlyozását biztosító eljárások,
- a szakmai megítélést igénylő bármilyen döntés rövid indoklása,
- a viselkedési, funkcionális, neuropatológiai és morfometriás eredmények részletes leírása nemek és dóziscsoportok szerint, beleértve a kontrollokhoz viszonyított növekedést és csökkenést,
- agytömeg,
- a neurológiai tünetekből és léziókból levezetett diagnózisok, beleértve a természetesen előforduló betegségeket vagy állapotokat,
- a példaértékű leletekről készült képek,
- a morfometriára használt metszetek homológ voltának értékelésére szolgáló kis nagyítású képek,
- az eredmények statisztikai feldolgozása, beleértve az adatok és az eredmények elemzésére használt statisztikai modelleket, függetlenül attól, hogy szignifikánsak voltak-e vagy sem,
- bármely más toxikus hatás és a vizsgált vegyi anyag neurotoxicitási potenciáljával kapcsolatban levont következtetések kapcsolata nemenként és csoportonként,
- a toxikokinetikai információk hatása a következtetésekre,
- a vizsgálati módszer megbízhatóságát és érzékenységét alátámasztó adatok (azaz a pozitív és a történeti kontroll adatok),
- a neuropatológiai és funkcionális hatások közötti kapcsolatok, ha vannak ilyenek,
- NOAEL vagy benchmark dózis az anyaállatok és az utódok esetében, nemenként és dóziscsoportonként,
- az adatok értelmezésének diszkussziója az eredmények alapján, beleértve azt a következtetést, hogy a vizsgált vegyi anyag okozott-e fejlődési neurotoxicitást vagy nem, valamint a NOAEL-t.

A 3. kohort paramétere:

- a szérum IgM-antitest titere (SRBC- vagy KLH-szenzitizáció), vagy a lép IgM PFC-egységek (SRBC-szenzitizáció),
- a TDAR-módszer teljesítményét a laboratóriumi optimalizálási folyamat részeként igazolni kell a vizsgálat első alkalommal való felállításakor, illetve rendszeresen (pl. évente) minden laboratóriumban,
- az adatok értelmezésének diszkussziója az eredmények alapján, beleértve azt a következtetést, hogy a vizsgált vegyi anyag okozott-e fejlődési immunotoxicitást vagy nem, valamint a NOAEL-t.

Az eredmények tárgyalása

Következtetések, ezen belül a szülői és utódhatásokra vonatkozó NOAEL-értékek

Rendelkezésre kell bocsátani minden olyan információt is, amelyet nem a vizsgálat során gyűjtöttek, de hasznos lehet az eredmények értelmezéséhez (pl. a hatások hasonlósága bármely ismert neurotoxikus anyaghoz).

Az eredmények értelmezése

80. A kibővített egygenerációs reprodukciós toxicitási vizsgálat információkkal szolgál valamely vegyi anyagnak a szaporodási ciklus összes fázisában történő, ismételt expozíció hatásairól, szükség szerint. A vizsgálat különösen a szaporítórendszerrel, valamint az utódok fejlődésével, növekedésével, túlélésével és funkcionális végpontjaival kapcsolatban ad információkat a 90. posztnatális napig.
81. A vizsgálat eredményeinek értelmezésekor figyelembe kell venni a vegyi anyagról rendelkezésre álló összes információt, beleértve a fizikai-kémiai, valamint toxikokinetikai és toxikodinamikai tulajdonságokat, a szerkezeti analógokra vonatkozó lényeges információkat, és a vizsgált vegyi anyaggal korábban végzett toxicitási vizsgálatok eredményeit (pl. akut toxicitás, ismételt alkalmazás utáni toxicitás, mechanisztikus vizsgálatok, illetve az azt értékelő vizsgálatok, hogy vannak-e a fajok között jelentős mennyiségi és minőségi különbségek az *in vivo/in vitro* metabolikus tulajdonságokban). Amennyiben megoldható, a makroszkópos boncolási eredményeket és a szervtömegadatokat a más, ismételt dózisu vizsgálatokban tett megfigyelésekkel összefüggésben kell értékelni. Az utódok növekedésének csökkenését a vizsgált vegyi anyagnak a tej összetételére gyakorolt hatásával kapcsolatban is lehet értelmezni (29).

2. kohort (fejlődési neurotoxicitás)

82. Az idegrendszeri és neuropatológiai eredményeket az összes megállapítás összefüggésében kell értelmezni, az adatok bizonyító erején alapuló megközelítést szakértői megítéléssel kombinálva. A viselkedési vagy morfológiai eredmények mintázatait, ha vannak ilyenek, valamint a dózis-válaszra utaló bizonyítékokat meg kell vitatni. A fejlődési neurotoxicitás értékelését bele kell foglalni ebbe a jellemzésbe, beleértve az emberi epidemiológiai vizsgálatokat vagy esettanulmányokat, illetve az állatkísérleteket (pl. toxikokinetikai adatok, szerkezet-hatás információk és egyéb toxicitási vizsgálatok adatai). Az adatok értékelésének tartalmaznia kell a biológiai és a statisztikai szignifikancia diszkusszióját. Az értékelésnek tartalmaznia kell a kapcsolatot – ha van ilyen – a megfigyelt neuropatológiai és viselkedési változások között. A fejlődési neurotoxicitási eredmények értelmezésével kapcsolatos iránymutatásért lásd a B.53 vizsgálati módszert (35) és a Tyl et al., 2008 publikációt (31).

3. kohort (fejlődési immunotoxicitási vizsgálat)

83. Az immunrendszer működésének TDAR-módszerrel (T-sejt dependens antitest válasz) mért gátlását vagy serkentését az összes észrevétel összefüggésében kell értékelni. A TDAR eredményének jelentőségét az immunológiai kapcsolódású mutatókra (pl. a csontvelő cellularitása, a limfoid szövetek tömege és körszövettana, a limfocita-alcsoportok eloszlása) gyakorolt egyéb hatások is alátámaszthatják. A TDAR által megállapított hatások kevésbé értelmezhetők lehetnek, ha alacsonyabb expozíciós koncentrációnál egyéb toxikus tüneteket figyeltek meg.
84. A reprodukciós és neurotoxicitási eredmények értelmezésével kapcsolatban az OECD 43. iránymutatását kell alkalmazni (26).

SZAKIRODALOM

- (1) Cooper, R.L., J.C. Lamb, S.M. Barlow, K. Bentley, A.M. Brady, N. Doerr, D.L. Eisenbrandt, P.A. Fenner-Crisp, R.N. Hines, L.F.H. Irvine, C.A. Kimmel, H. Koeter, A.A. Li, S.L. Makris, L.P. Sheets, G.J.A. Speijers and K.E. Whitby (2006), »A Tiered Approach to LIFE Stages Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment«, *Critical Reviews in Toxicology*, 36, 69-98.

- (2) Thigpen, J.E., K.D.R. Setchell, K.B. Ahlmark, J. Locklear, T. Spahr, G.F. Leviness, M.F. Goelz, J.K. Haseman, R.R. Newbold, and D.B. Forsythe (1999), »Phytoestrogen Content of Purified Open and Closed Formula Laboratory Animal Diets«, *Lab. Anim. Sci.*, 49, 530- 536.
- (3) Zoetis, T. and I. Walls (2003), Principles and Practices for Direct Dosing of Pre-Weaning Mammals in Toxicity Testing and Research, ILSI Press, Washington, DC.
- (4) Moser, V.C., I. Walls and T. Zoetis (2005), »Direct Dosing of Prewaning Rodents in Toxicity Testing and Research: Deliberations of an ILSI RSI Expert Working Group«, *International Journal of Toxicology*, 24, 87-94.
- (5) Conolly, R.B., B.D. Beck, and J.I. Goodman (1999), »Stimulating Research to Improve the Scientific Basis of Risk Assessment«, *Toxicological Sciences*, 49, 1-4.
- (6) Ulbrich, B. and A.K. Palmer (1995), »Detection of Effects on Male Reproduction – a Literature Survey«, *Journal of the American College of Toxicologists*, 14, 293-327.
- (7) Mangelsdorf, I., J. Buschmann and B. Orthen (2003), »Some Aspects Relating to the Evaluation of the Effects of Chemicals on Male Fertility«, *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 37, 356-369.
- (8) Sakai, T., M. Takahashi, K. Mitsumori, K. Yasuhara, K. Kawashima, H. Mayahara and Y. Ohno (2000). »Collaborative work to evaluate toxicity on male reproductive organs by repeated dose studies in rats – overview of the studies«, *Journal of Toxicological Sciences*, 25, 1-21.
- (9) Creasy, D.M. (2003), »Evaluation of Testicular Toxicology: A Synopsis and Discussion of the Recommendations Proposed by the Society of Toxicologic Pathology«, *Birth Defects Research, Part B*, 68, 408-415.
- (10) Goldman, J.M., A.S. Murr, A.R. Buckalew, J.M. Ferrell and R.L. Cooper (2007), »The Rodent Estrous Cycle: Characterization of Vaginal Cytology and its Utility in Toxicological Studies«, *Birth Defects Research, Part B*, 80 (2), 84-97.
- (11) Sadleir, R.M.F.S. (1979), »Cycles and Seasons«, in C.R. Auston and R.V. Short (eds.), *Reproduction in Mammals: I. Germ Cells and Fertilization*, Cambridge, New York.
- (12) Gallavan, R.H. Jr, J.F. Holson, D.G. Stump, J.F. Knapp and V.L. Reynolds (1999), »Interpreting the Toxicologic Significance of Alterations in Anogenital Distance: Potential for Confounding Effects of Progeny Body Weights«, *Reproductive Toxicology*, 13: 383-390.
- (13) Korenbrot, C.C., I.T. Huhtaniemi and R.I. Weiner (1977), »Preputial Separation as an External Sign of Pubertal Development in the Male Rat«, *Biological Reproduction*, 17, 298-303.
- (14) Ladics, G.S. (2007), »Use of SRBC Antibody Responses for Immunotoxicity Testing«, *Methods*, 41, 9-19.
- (15) Gore, E.R., J. Gower, E. Kurali, J.L. Sui, J. Bynum, D. Ennulat and D.J. Herzyk (2004), »Primary Antibody Response to Keyhole Limpet Hemocyanin in Rat as a Model for Immunotoxicity Evaluation«, *Toxicology*, 197, 23-35.
- (16) Gray, L.E., J. Ostby, J. Ferrell, G. Rehnberg, R. Linder, R. Cooper, J. Goldman, V. Slott and J. Laskey (1989), »A Dose-Response Analysis of Methoxychlor-Induced Alterations of Reproductive Development and Function in the Rat«, *Fundamental and Applied Toxicology*, 12, 92-108.
- (17) Robb, G.W., R.P. Amann and G.J. Killian (1978), »Daily Sperm Production and Epididymal Sperm Reserves of Pubertal and Adult Rats«, *Journal of Reproduction and Fertility*, 54, 103-107.
- (18) Klinefelter, G.R., L.E. Jr Gray and J.D. Suarez (1991), »The Method of Sperm Collection Significantly Influences Sperm Motion Parameters Following Ethane Dimethanesulfonate Administration in the Rat«, *Reproductive Toxicology*, 5, 39-44.
- (19) Seed, J., R.E. Chapin, E.D. Clegg, L.A. Dostal, R.H. Foote, M.E. Hurtt, G.R. Klinefelter, S.L. Makris, S.D. Perreault, S. Schrader, D. Seyler, R. Sprando, K.A. Treinen, D.N. Veeramachaneni and L.D. Wise (1996), »Methods for Assessing Sperm Motility, Morphology, and Counts in the Rat, Rabbit, and Dog: a Consensus Report«, *Reproductive Toxicology*, 10, 237- 244.
- (20) Chapin, R.E., R.S. Filler, D. Gulati, J.J. Heindel, D.F. Katz, C.A. Mebus, F. Obasaju, S.D. Perreault, S.R. Russell and S. Schrader (1992), »Methods for Assessing Rat Sperm Motility«, *Reproductive Toxicology*, 6, 267-273.
- (21) Klinefelter, G.R., N.L. Roberts and J.D. Suarez (1992), »Direct Effects of Ethane Dimethanesulphonate on Epididymal Function in Adult Rats: an *In Vitro* Demonstration«, *Journal of Andrology*, 13, 409-421.

- (22) Slott, V.L., J.D. Suarez and S.D. Perreault (1991), »Rat Sperm Motility Analysis: Methodologic Considerations«, *Reproductive Toxicology*, 5, 449-458.
 - (23) Slott, V.L., and S.D. Perreault (1993), »Computer-Assisted Sperm Analysis of Rodent Epididymal Sperm Motility Using the Hamilton-Thorn Motility Analyzer«, *Methods in Toxicology, Part A*, Academic, Orlando, Florida, pp. 319-333.
 - (24) Toth, G.P., J.A. Stober, E.J. Read, H. Zenick and M.K. Smith (1989), »The Automated Analysis of Rat Sperm Motility Following Subchronic Epichlorhydrin Administration: Methodologic and Statistical Considerations«, *Journal of Andrology*, 10, 401-415.
 - (25) Linder, R.E., L.F. Strader, V.L. Slott and J.D. Suarez (1992), »Endpoints of Spermatotoxicity in the Rat After Short Duration Exposures to Fourteen Reproductive Toxicants«, *Reproductive Toxicology*, 6, 491-505.
 - (26) OECD (2008), *Guidance Document on Mammalian Reproductive Toxicity Testing and Assessment*, Series on Testing and Assessment, No. 43, ENV/JM/MONO(2008)16, OECD, Paris.
 - (27) Working, P.K., M. Hurtt (1987), »Computerized Videomicrographic Analysis of Rat Sperm Motility«, *Journal of Andrology*, 8, 330-337.
 - (28) Bolin, B., R. Garman, K. Jensen, G. Krinke, B. Stuart, and an ad Hoc Working Group of the STP Scientific and Regulatory Policy Committee (2006), »A 'Best Practices' Approach to Neuropathologic Assessment in Developmental Neurotoxicity Testing – for Today«, *Toxicological Pathology*, 34, 296-313.
 - (29) Stütz, N., B. Bongiovanni, M. Rassetto, A. Ferri, A.M. Evangelista de Duffard, and R. Duffard (2006), »Detection of 2,4-dichlorophenoxyacetic Acid in Rat Milk of Dams Exposed During Lactation and Milk Analysis of their Major Components«, *Food Chemicals Toxicology*, 44, 8-16.
 - (30) Thigpen, JE, K.D.R. Setchell, J.K. Haseman, H.E. Saunders, G.F. Caviness, G.E. Kissling, M.G. Grant and D.B. Forsythe (2007), »Variations in Phytoestrogen Content between Different Mill Dates of the Same Diet Produces Significant Differences in the Time of Vaginal Opening in CD-1 Mice and F344 Rats but not in CD Sprague Dawley Rats«, *Environmental health perspectives*, 115(12), 1717-1726.
 - (31) Tyl, R.W., K. Crofton, A. Moretto, V. Moser, L.P. Sheets and T.J. Sobotka (2008), »Identification and Interpretation of Developmental Neurotoxicity Effects: a Report from the ILSI Research Foundation/Risk Science Institute Expert Working Group on Neurodevelopmental Endpoints«, *Neurotoxicology and Teratology*, 30: 349-381.
 - (32) OECD (1996), *Combined Repeated Dose Toxicity Study with the Reproduction/Developmental Toxicity Screening Test*, OECD Guideline for Testing of Chemicals, No. 422, OECD, Paris.
 - (33) E melléklet B.43. fejezete: Neurotoxiciási vizsgálat rágcsálókban
 - (34) OECD (2000), *Guidance Document on the recognition, assessment, and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluations*, Series on Testing and Assessment, No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris.
 - (35) E melléklet B.53. fejezete: Fejlődési neurotoxiciási vizsgálat
 - (36) E melléklet B.54. fejezete: Uterotrofikus biológiai vizsgálat rágcsálókban: gyors szűrővizsgálat az ösztrogénszerű tulajdonságok kimutatására
 - (37) E melléklet B.55. fejezete: Hershberger bioassay patkányokban: gyors szűrővizsgálat az (anti)androgén tulajdonságok kimutatására
 - (38) OECD (2009), *Guidance Document for Histologic Evaluation of Endocrine and Reproductive Test in Rodents*, Series on Testing and Assessment, No. 106, OECD, Paris.
 - (39) OECD (2011), *Guidance Document on the Current Implementation of Internal Triggers in the Extended One Generation Reproductive Toxicity Study in the United States and Canada*, Series on Testing and Assessment, No. 117, ENV/JM/MONO(2011)21, OECD, Paris.
 - (40) OECD (2013), *Guidance Document supporting TG 443: Extended One Generation Reproductive Toxicity Study*, Series on Testing and Assessment, No. 151, OECD, Paris.
-

1. függelék

Mérések és megfigyelések a funkcionális megfigyelési vizsgálatban (2.A kohort)

Saját ketrec – Nyílt terület	Manipulálás	Fiziológia
Testtartás	Kivétel könnyűsége	Hőmérséklet
Akaratlan klónusos vagy tónusos görcsök	Kézbevétel könnyűsége	Testtömeg
Szemhéjak bezárása	Izomtónus	Pupillareakció
Szőrmeredezés	Válasz közelítésre	Pupillaméret
Nyálzás	Válasz érintésre	
Könnyezés	Válasz zajra	
Hangadás	Válasz farokcsípésre	
Hátrafelé járás	Felegyenesezési válasz	
Járási rendellenességek	Földre érkező lábak távolsága	
Ébredés	Elülső végtag fogáserőssége	
Sztereotip viselkedés	Hátulsó végtag fogáserőssége	
Bizarr viselkedés		
Foltok		
Légzési rendellenességek		

2. függelék

FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

Vegyi anyag: egy anyag vagy keverék.

Vizsgált vegyi anyag: bármely, e vizsgálati módszer alkalmazásával vizsgált anyag vagy keverék.

B.57. H295R SZTEROIDOGENEZIS-VIZSGÁLAT

BEVEZETÉS

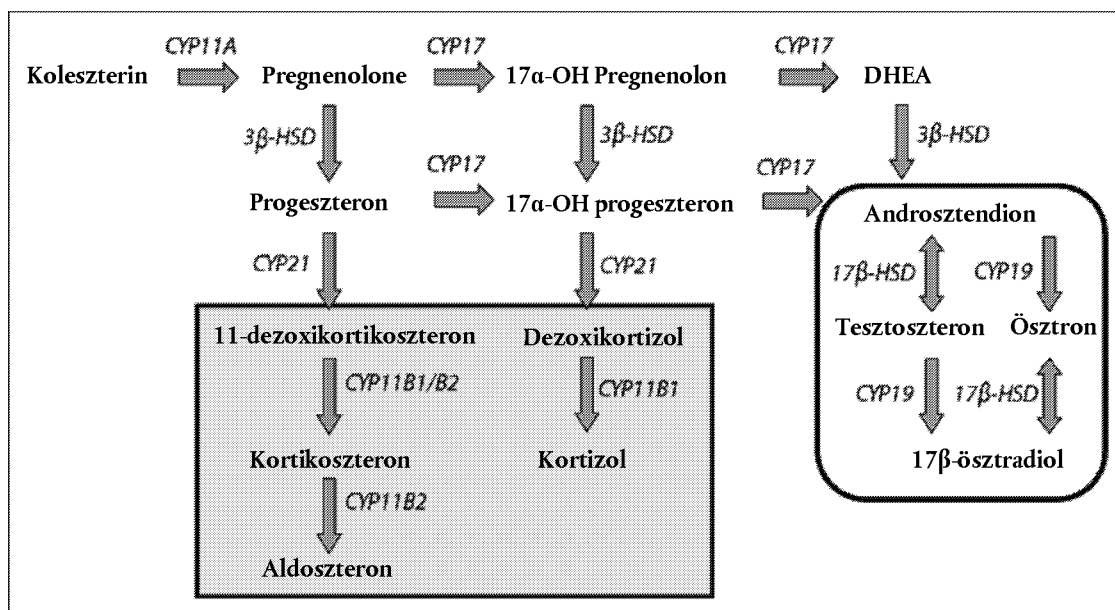
1. Ez a vizsgálati módszer egyenértékű az OECD 456. vizsgálati iránymutatásában (2011) leírt módszerrel. Az OECD 1998-ban kiemelt fontosságú tevékenységet indított a meglévő vizsgálati iránymutatások felülvizsgálatára, valamint az endokrin rendszert esetlegesen károsító vegyi anyagok kiszűrésére és vizsgálatára vonatkozó új vizsgálati iránymutatások kidolgozása érdekében. Az OECD 2002. évi »Konceptcionális keret az endokrin rendszert károsító vegyi anyagok tesztelésére és értékelésére« című dokumentuma öt szintet foglal magában, amelyek mindegyike különböző szintű biológiai komplexitásnak felel meg (1). Az ebben a vizsgálati módszerben leírt *in vitro* H295R szteroidogenezis-vizsgálat (H295R) egy humán adrenocarcinoma sejtvonalat (NCI-H295R sejtek) használ, és 2. szintű »mechanisztikus adatokat szolgáltató *in vitro* vizsgálatnak« számít, amely szűrési és rangsorolási célokra használható. A vegyi anyagok szteroidogenezisre, különösen a 17 β -ösztradiol (E2) és a tesztoszteron (T) termelésére gyakorolt hatásainak szűrésére szolgáló vizsgálat kifejlesztését és szabványosítását egy több lépésből álló folyamat keretében végezték el. A H295R vizsgálatot optimalizálták és validálták (2) (3) (4) (5).
2. A H295R szteroidogenezis-vizsgálat célja olyan vegyi anyagok kimutatása, amelyek befolyásolják az E2 és a T termelését. A H295R-vizsgálat azoknak a xenobiotikumoknak az azonosítására szolgál, amelyek azokat az endogén komponenseket célozzák meg, amelyekből a koleszterintől az E2 és/vagy a T termeléséig tartó sejten belüli biokémiai útvonal felépül. A H295R-vizsgálatnak nem célja azoknak a vegyi anyagoknak az azonosítása, amelyek a hipotalamusz-hipofízis-gonád (HPG) tengelyre gyakorolt hatásuk révén befolyásolják a szteroidogenezist. A vizsgálat célja, hogy IGEN/NEM választ adjon egy vegyi anyag azon képessége tekintetében, hogy indukálja vagy gátolja-e a T és az E2 termelését; néhány esetben azonban kvantitatív eredmények is nyerhetők (lásd az 53. és az 54. bekezdést). A vizsgálat eredményei a hormontermelésnek az oldószerkontrollokhoz (SC-k) képest vett relatív változásaként vannak kifejezve. A vizsgálat célja nem az, hogy konkrét mechanisztikus információkat nyújtson a vizsgált vegyi anyag és az endokrin rendszer kölcsönhatásáról. A sejtvonal alkalmazásával azonban végeztek már kutatásokat egyes enzimekre és köztes hormonokra, például a progeszteronra gyakorolt hatások azonosítására vonatkozóan is (2).
3. Az ebben a vizsgálati módszerben használt fogalmak és rövidítések meghatározását a függelék tartalmazza. Az oldatok készítésére, a sejtek tenyésztésére és a vizsgálat különböző aspektusainak végrehajtására vonatkozó utasításokat tartalmazó részletes protokoll »A tesztoszteron- és az ösztradioltermelés modulátorainak azonosítására szolgáló H295R szteroidogenezis-vizsgálat több laboratóriumban végzett validálása« című OECD-dokumentum I–III. függelékében található (4).

KIINDULÁSI MEGFONTOLÁSOK ÉS KORLÁTOK

4. A szteroid nemi hormonok bioszintézisében öt különböző enzim vesz részt, amelyek hat különböző reakciót katalizálnak. A koleszterinnek a citokróm P450 (CYP) koleszterin-oldallánc hasító enzim (CYP11A) által pregnenolonná történő enzimés átalakítása alkotja az első lépést a biokémiai reakciók sorában, amelyek a szteroid végtermékek szintézisében csúcsosodnak ki. A következő két reakció sorrendjétől függően a szteroidogenezis útvonala kétfelé ágazik: a Δ^5 -hidroxiszteroid útvonalra és a Δ^4 -ketoszteroid útvonalra, amelyek az androsztendion termelésében találkoznak ismét (1. ábra).
5. Az androsztendiont a 17 β -hidroxiszteroid-dehidrogenáz (17 β -HSD) alakítja tesztoszteronná (T). A tesztoszteron egyszerre köztes és végső hormontermék. Hímekben a T-t az 5 α -reduktáz dihidrotesztoszteronná (DHT) alakíthatja át, amely a sejtmembránokban, a sejtmagburokban és az androgén hatás célszöveteinek endoplazmatikus retikulumaiban található meg, például a prosztatában és az ondóhólyagban. A DHT lényegesen hatásosabb androgén, mint a T, és végtermék hormonnak is tekintik. A H295R-vizsgálat nem méri a DHT-t (lásd a 10. bekezdést).
6. Az androgén vegyi anyagokat szteroidogén útvonalon ösztrogén vegyi anyagokká átalakító enzim az aromatáz (CYP19). A CYP19 a T-t 17 β -ösztradiollá (E2), az androsztendiont pedig ösztronná alakítja át. Az E2-t és a T-t tartják a szteroidogén út végtermék hormonjainak.
7. A CYP17 liáz aktivitásának a köztes szubsztrátumokkal kapcsolatos specifikussága különbözik az egyes fajok között. Emberben az enzim a Δ^5 -hidroxiszteroid reakcióút szubsztrátjait (pregnenolon), míg patkányban a Δ^4 -ketoszteroid reakcióút szubsztrátjait (progeszteron) részesíti előnyben (19). A CYP17 liáz aktivitásának ezen különbségei megmagyarázhatják a vegyi anyagokra adott válasz különböző fajok közötti egyes eltéréseit, amelyek megváltoztatják az *in vivo* szteroidogenezist (6). A H295-sejtekről már kimutatták, hogy ezek tükrözik a legjobban az emberi felnőtt mellékvese enzimműködését és szteroidtermelési mintáját (20), de az is ismert, hogy az androgénszintézis Δ^5 -hidroxiszteroid és a Δ^4 -ketoszteroid útvonalának enzimeit egyaránt megjelenítik (7) (11) (13) (15).

1. ábra

Szteroidképző útvonal a H295R sejtekben



Megjegyzés:

Az enzimek dőlt, a hormonok félkövér betűvel vannak szedve, a nyilak pedig a szintézis irányát jelzik. Szürke háttér jelzi a kortikoszteroid utakat/termékeket. A nemi szteroid utak/termékek bekarikázva láthatók. CYP = citokróm P450; HSD = hidroxiszteroid-dehidrogenáz; DHEA = dehidroepiandroszteron.

8. Az emberi H295R adenocarcinoma-sejtvonal hasznos *in vitro* modell a szteroidhormon-szintézisre gyakorolt hatások vizsgálatában (2) (7) (8) (9) (10). A H295R-sejtvonal azokat a géneket fejezi ki, amelyek a szteroidogenezis fentebb említett összes kulcsfontosságú enzimét kódolják (11) (15) (1. ábra). Ez egyedülálló tulajdonság, mert ezeknek a géneknek az *in vivo* expressziója a szövetből és a fejlődési stádiumtól függ, és jellemzően egyik szövet vagy fejlődési szakasz sem fejezi ki a szteroidogenezisben részt vevő összes gént (2). A H295R-sejtek a zónásan differenciálatlan humán magzati mellékvese-sejtek fiziológiai jellemzőivel rendelkeznek (11). A sejtek egy egyedülálló *in vitro* rendszert képviselnek abban a tekintetben, hogy képesek előállítani a felnőtt mellékvesekéregben és az ivarmirigyekben található összes szteroid hormont, lehetővé téve a kortikoszteroidok és a szteroid nemi hormonok, mint például az androgének és az ösztrogének szintézisére gyakorolt hatások vizsgálatát egyaránt, bár a vizsgálat validálása csak a T és az E2 kimutatására történt meg. A vizsgálati rendszer által rögzített, a T- és az E2-termelés módosulásának formájában megnyilvánuló változások a vizsgált vegyi anyagok és a H295R-sejtek által kifejezett szteroidogén funkciók közötti különböző kölcsönhatások következményei lehetnek. Ezek közé tartozik a génextpresszió, a szintézis vagy a szteroid hormonok előállításában, átalakításában vagy eliminációjában részt vevő enzimek funkciójának modulációja (12) (13) (14). A hormontermelés gátlása bekövetkezhet a reakcióútban szereplő enzimhez való közvetlen kompetitív kötődés, a kofaktorokra – mint például az NADPH (nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát) és a cAMP (ciklikus adenosin-monofoszfát) – gyakorolt hatás és/vagy a szteroid-metabolizmus növekedése vagy a szteroidogenezis útvonalában szereplő bizonyos enzimek génextpressziójának gátlása révén. Míg a gátlás a hormontermelésben szerepet játszó közvetlen vagy közvetett folyamatoknak egyaránt a függvénye lehet, az indukció tipikusan közvetett jellegű, mint például a kofaktorok, mint a NADPH és a cAMP befolyásolása (például a forskolin esetében), vagy a szteroidmetabolizmus csökkentése (13), illetve a szteroidogén génextpresszió feljebb szabályozása.

9. A H295R-vizsgálatnak számos előnye van:

- egyaránt lehetővé teszi a T- és E2-termelés növekedésének és csökkenésének kimutatását,
- lehetőséget biztosít a vegyi anyag sejtek életképességére gyakorolt lehetséges hatásának, citotoxicitásának közvetlen értékelésére. Ez egy fontos tulajdonság, mivel lehetővé teszi a citotoxicitás miatti hatások megkülönböztetését a vegyi anyagok és a szteroidogén utak közötti közvetlen kölcsönhatások alapján fellépő hatásoktól, ami nem lehetséges a több, különböző érzékenységgű és funkciójú sejttypusból álló szöveti explantátum rendszerekben,

- nem igényli állatok használatát,
 - a H295R sejtvonala a kereskedelembe kapható.
10. A vizsgálat alapvető korlátai az alábbiak:
- A vizsgálat metabolikus képessége nem ismert, de valószínűleg meglehetősen korlátozott, ezért azokat a vegyi anyagokat, amelyeket metabolikusan aktiválni kell, a vizsgálati eljárás valószínűleg nem fogja érzékelni.
 - A H295R a mellékveséből származó szövetként rendelkezik a glükó- és mineralokortikoidok, illetve a nemi hormonok termelésére képes enzimekkel is, ezért a glükó- és mineralokortikoidok termelésére kifejtett hatások befolyásolhatják a T-nek és az E2-nek a vizsgálatban megfigyelhető szintjét is.
 - A vizsgálat nem méri a DHT-t és ezért nem várható, hogy kimutassa az 5 α -reduktáz gátló vegyi anyagokat, amelyek esetében a Hersberger assay-t (16) lehet használni.
 - A H295R-vizsgálat nem fogja érzékelni azokat a vegyi anyagokat, amelyek a hipotalamusz-hipofízis-gonád tengely (HPG) befolyásolása révén zavarják a szteroidogenezist, mivel azt csak ép állatokban lehet vizsgálni.

A VIZSGÁLAT ELVE

11. A vizsgálat célja a T- és E2-termelést befolyásoló vegyi anyagok kimutatása. A T egyúttal egy köztes termék is az E2 előállításához vezető úton. A vizsgálat képes észlelni azokat a vegyi anyagokat, amelyek tipikusan gátolják vagy indukálják a szteroidogenezis-útvonal enzimeit.
12. A vizsgálatot rendszerint standard sejtenyésztési körülmények között, 24-lyukú szövettenyésztő lemezekon végezzük. Alternatívaként egyéb lemezméreteket is lehet használni a vizsgálat elvégzésére, de a sejtelepítés körülményeit és a kísérleti feltételeket megfelelően módosítani kell a teljesítménykritériumoknak való megfelelés érdekében.
13. A többlyukú lemezen történt 24 órás akklimatizációs időszak után a sejteket 48 órán keresztül a vizsgált vegyi anyag hét koncentrációjának tesszük ki legalább három példányban. Negatív és pozitív kontrollként oldószert, egy ismert hormoninhibítort és egy hormontermelést indukáló anyagot futtatunk rögzített koncentrációban. Az expozíciós idő végén minden lyukból eltávolítjuk a táptalajt. Az egyes lyukakban lévő sejtek életképességét a táptalaj eltávolítása után azonnal elemezzük. Különböző módszerekkel lehet mérni a hormonok koncentrációját a táptalajban, beleértve a kereskedelmi forgalomban kapható hormonmérő készleteket és/vagy a műszeres technikákat, mint például a folyadékkromatográfia-tömegspektrometriát (LC-MS). Az adatokat az oldószert kontrollhoz és a megfigyelhető hatást okozó legalacsonyabb koncentrációhoz (LOEC) viszonyított valahányszoros változásban fejezzük ki. Ha a vizsgálat eredménye negatív, a legnagyobb vizsgált koncentrációt megfigyelhető hatást nem okozó koncentrációként (NOEC) jegyezzük könyvezzük. A vegyi anyag szteroidogenezist befolyásoló képességére vonatkozó következtetést legalább két független tesztre kell alapozni. Az első teszt dózisbehatároló vizsgálatként funkcionálhat, adott esetben a 2. és 3. vizsgálat koncentrációinak kiigazításával, ha oldhatósági vagy citotoxicitási problémák lépnek fel, vagy ha a vegyi anyag aktivitása a vizsgált koncentrációtartomány végén helyezkedik el.

SEJTKULTÚRA ELJÁRÁS

Sejtvonala

14. Az NCI-H295R sejteket az Amerikai Típusú Sejtkultúra-Gyűjteménytől (American Type Culture Collections – ATCC) anyagátadási szerződés (Material Transfer Agreement – MTA) aláírásával lehet megvásárolni ⁽¹⁾.

Bevezetés

15. Mivel az E2-termelő kapacitás a sejtek életkorának/passzálások számának növekedésével változik (2), a sejteket használat előtt egy adott protokoll szerint kell tenyészteni, és fel kell jegyezni a sejtek kioltatása óta történt passzálások számát, valamint annak az passzálásnak a sorszámát is, amelyen a sejteket lefagyasztottuk és folyékony nitrogén tárolóba helyeztük. Az első szám a passzálások számát jelzi, a második szám pedig leírja annak a passzálásnak a számát, amelyen a sejteket lefagyasztottuk és betároltuk. Például, azokat a sejteket, amelyeket az ötödik passzálás után fagyasztottunk le, majd felolvasztottunk, és ismételt tenyésztést követően háromszor felolvasztottunk (4 passzálás, a frissen felolvasztott sejteket 1. passzálásnak tekintve), 4.5 passzálásként címkéznénk fel. A számozási rendszer egy példáját a validálási jelentés I. függeléké szemlélteti (4).
16. A kiegészített és fagyasztó táptalajok alapjaként alapközeget használunk. A kiegészített táptalaj a sejtenyésztés szükséges eleme. A fagyasztó táptalajt kifejezetten úgy tervezték meg, hogy lehetővé tegye a sejtek hatásmentes

⁽¹⁾ ATCC CRL-2128; ATCC, Manassas, VA, USA, [<http://www.lgcstandards-atcc.org/>].

lefagyasztását a hosszú távú tárolás céljára. Használat előtt a Nu-szérumot (vagy az olyan összehasonlítható tulajdonságokkal rendelkező szérumot, amelyről kimutatták, hogy a vizsgálati teljesítményre és minőség-ellenőrzésre (QC) vonatkozó követelményeknek megfelelő adatokat produkál) – amely a kiegészített táptalajok alkotórésze – analizálni kell a háttér T- és E2-koncentráció szempontjából. Az oldatok előkészítését a validálási jelentés II. függelége írja le (4).

17. Az eredeti ATCC-tételtől származó H295R-sejttenyészet megkezdését követően a sejteket öt passzálon keresztül kell tenyészteni (azaz a sejteket 4-szer kell felosztani). Az ötödik passzázs sejtjeit ezután folyékony nitrogénben lefagyasztjuk tárolás céljából. A sejtek lefagyasztása előtt a negyedik passzázs sejtjeiből vett mintát lefuttatjuk egy QC-lemezen (lásd a 36. és 37. bekezdést) annak ellenőrzése céljából, hogy a hormonok termelődése és a pozitív kontroll vegyi anyagokra adott válasz megfelel-e a vizsgálat minőségbiztosítási kritériumainak, amelyeket az 5. táblázat tartalmaz.
18. A H295R-sejteket tenyészteni kell, le kell fagyasztani és folyékony nitrogénben kell tárolni annak érdekében, hogy folyamatosan rendelkezésre álljanak megfelelő passzálású/korú sejtek a tenyésztés és a használat céljára. Egy új ⁽¹⁾ vagy fagyasztott ⁽²⁾ sejt-tétel tenyésztésbe vétele utáni passzálások maximális száma, amely még elfogadható a H295R-vizsgálatban való használatra, nem haladhatja meg a 10-et. Például az 5. passzázsban lefagyasztott tételtől származó sejt-kultúrák passzálásainak elfogadható száma 4,5-10,5 lenne. Az ezekből a fagyasztott tételekből indult sejtek esetében a 19. bekezdésben leírt eljárást kell követni. Ezeket a sejteket legalább négy (4) további passzálon át kell tenyészteni (passzázs-szám 4,5) a tesztelésben való használatot megelőzően.

Sejtek indítása fagyasztott állományból

19. A sejtek fagyasztott állományból történő indítására vonatkozó eljárást kell alkalmazni, amikor egy új sejt-tételt tenyésztés és tesztelés céljából kiemelünk a folyékony nitrogén tartályból. Ennek az eljárásnak a részleteit a validálási jelentés III. függelége tartalmazza (4). A sejteket eltávolítjuk a folyékony nitrogén tartályból, gyorsan felolvasztjuk, kiegészített táptalajban egy centrifugacsőbe helyezjük, szobahőmérsékleten centrifugáljuk, újrasszuspendáljuk a kiegészített táptalajban, majd átvisszük egy sejttenyésztő edénybe. A táptalajt a következő napon le kell cserélni. A H295R-sejteket 37 °C-on inkubátorban tenyésztjük 5 % CO₂-t tartalmazó levegő atmoszférában, és a táptalajt hetente 2-3 alkalommal megújítjuk. Amikor a sejt-kultúra körülbelül 85-90 %-ban egybefolyik, akkor meg kell osztani. A sejtek megosztására azért van szükség, hogy biztosítsuk a sejtek egészségét és növekedését, és hogy fenntartsuk a sejt-kultúrát a biológiai tesztek elvégzésére. A sejteket háromszor átöblítjük foszfáttal pufferelt sóoldattal (PBS, Ca²⁺ Mg²⁺ nélkül), és felszabadítjuk a sejttenyésztő edényből egy megfelelő leválasztó enzim, például tripszin PBS-ben (Ca²⁺ Mg²⁺ nélkül) való hozzáadásával. Közvetlenül azután, hogy a sejtek leválnak a sejttenyésztő edényről, az enzimes eljárást le kell állítani úgy, hogy kiegészített táptalajt adunk hozzá a kultúrához az enzimes kezeléshez használt térfogat háromszoros mennyiségében. A sejteket behelyezzük egy centrifugacsőbe, szobahőmérsékleten centrifugáljuk, a felülúszót elöntjük, és a sejt-pelletet újrasszuspendáljuk kiegészített táptalajban. Megfelelő mennyiségű sejtoldatot áthelyezünk az új sejttenyésztő edénybe. A sejtoldat mennyiségét úgy kell beállítani, hogy a sejtek 5-7 napon belül összefolyjanak. Az ajánlott másodlagos tenyésztési arány 1:3-1:4. A lemezt gondosan fel kell címkézni. A sejtek most már készen állnak a vizsgálatban való felhasználásra és a felesleges sejteket le kell fagyasztani folyékony nitrogénben a 20. bekezdésben leírtak szerint.

A H295R-sejtek lefagyasztása (a sejtek előkészítése a folyékony nitrogénben való tárolásra)

20. A H295R-sejtek fagyasztásra történő előkészítése érdekében a sejtek felosztására vonatkozó fentiekben leírt eljárást kell követni a sejt-pelletnek a centrifugacső alján történő újrasszuspendálásáig. Itt a sejt-pelletet a fagyasztó táptalajban kell újrasszuspendálni. Az oldatot átvisszük egy megfelelően felcímkézett kriogén fiolába, és – 80 °C hőmérsékleten 24 órán keresztül fagyasztjuk, majd a kriogén fiolát folyékony nitrogénbe helyezjük tárolás céljából. Ennek az eljárásnak a részleteit a validálási jelentés III. függelége tartalmazza (4).

A sejtek lemezre ültetése és előzetes inkubálása tesztelés céljából

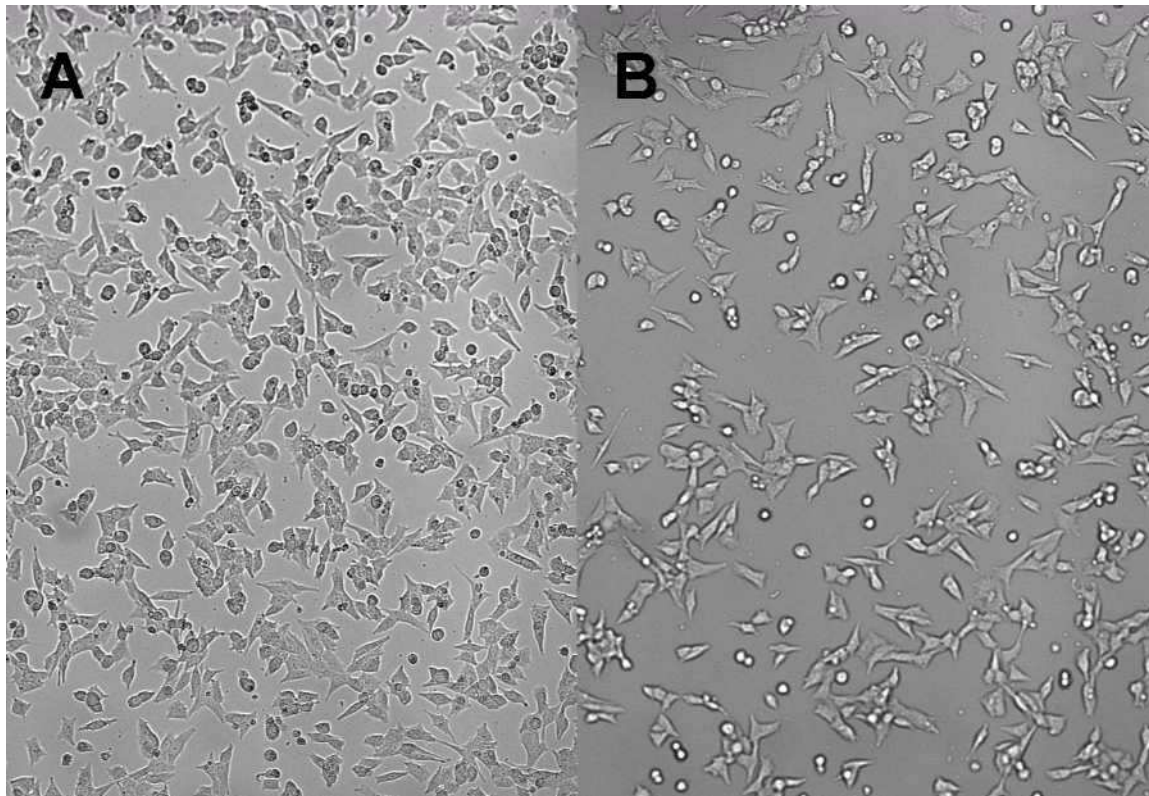
21. Az, hogy a 19. bekezdésben körvonalazott módon előkészített 24-lyukú lemezekből mennyire lesz szükség, a vizsgálandó vegyi anyagok számától és a tenyésztőedényekben lévő sejtek konfluenciájától függ. Általános szabály, hogy a 80-90 %-ban összefolyó sejtek egy sejttenyésztő edénye (75 cm²) elegendő mennyiségű sejtet szolgáltat 1,5 (24-lyukú) lemezhez 200 000-300 000 sejt/ml táptalaj célsűrűség mellett, aminek eredményeként körülbelül 50-60 %-os összefolyás érhető el a lyukakban 24 óra alatt (2. ábra). Általában ez az optimális sejt-sűrűség a hormontermeléshez a vizsgálatban. Nagyobb sűrűség esetén a T- és E2-termelési minták megváltoznak. A vizsgálat első alkalommal történő elvégzése előtt ajánlott tesztelni a 200 000 és 300 000 sejt/ml közötti különböző ültetési sűrűségeket, és a lyukakban 24 óra alatt 50-60 %-os összefolyást eredményező sűrűséget kell kiválasztani a további kísérletekhez.

⁽¹⁾ Az »új tétel« kifejezés az ATCC-től kapott friss sejt-tételt jelenti.

⁽²⁾ A »fagyasztott tétel« kifejezés olyan sejteket jelent, amelyeket már korábban tenyésztettek és lefagyasztottak egy ATCC-től eltérő laboratóriumban.

2. ábra

24-lyukú tenyésztőlemezen 24 óra után 50 %-os ültetési sűrűségű H295R-sejtek mikrofotogramja a lyuk szélén (A) és közepén (B)



22. A táptalajt lepipettázzuk a sejtenyésztő edényből, és a sejteket 3-szor átöblítjük steril PBS-sel (Ca^{2+} Mg^{2+} nélkül). Enzimoldatot (PBS-ben) adunk hozzá, amely elválasztja a sejteket a sejtenyésztő edénytől. A sejtek leválására biztosított megfelelő idő után az enzimes eljárást le kell állítani úgy, hogy kiegészített táptalajt adunk hozzá a kultúrához az enzimes kezeléshez használt térfogat háromszoros mennyiségében. A sejteket behelyezzük egy centrifugacsőbe, szobahőmérsékleten centrifugáljuk, a felülúszót elöntjük, és a sejt pelletet kiegészített táptalajban újraszuszpendáljuk. A sejtsűrűséget például hemocitóméterrel vagy sejtszámlálóval kiszámítjuk. A sejtoldatot fel kell hígítani a kívánt ültetési sűrűségekre és alaposan össze kell keverni a homogén sejtsűrűség biztosítása érdekében. A sejteket 1 ml sejtoldat/lyuk mennyiségben kell ültetni, illetve a lemezeket és lyukakat fel kell címkézni. A beoltott lemezeket 37°C -on 5 % CO_2 -t tartalmazó levegő atmoszférában 24 órán át inkubáljuk, hogy lehetővé tegyünk a sejteknek a lyukakban való megtapadását.

MINŐSÉG-ELLENŐRZÉSI KÖVETELMÉNYEK

23. Rendkívül fontos, hogy az adagolás során az oldatokból és mintákból pontos mennyiségeket helyezzünk el a lyukakban, mivel ezek a térfogatok határozzák meg azokat a koncentrációkat, amelyeket a vizsgálat eredményeinek számítása során használunk.
24. A sejt kultúra megkezdése és bármely azt követő vizsgálat előtt minden laboratóriumnak bizonyítania kell a hormonmérési rendszerének érzékenységét (29–31. bekezdés).
25. Ha ellenanyag-alapú hormonmérési vizsgálatokat tervezünk használni, a vizsgálandó vegyi anyagokat a vizsgálat megkezdése előtt meg kell vizsgálni, hogy zavarják-e a 32. bekezdésben körvonalazott, a T és E2 számszerűsítésére használt mérési rendszert.

26. A vizsgálathoz ajánlott oldószer a DMSO. Ha alternatív oldószert alkalmazunk, akkor a következőket kell meghatározni:
- a vizsgált vegyi anyag, a forskolin és a prokloráz oldhatósága az oldószerben, valamint
 - citotoxicitás az oldószer koncentrációjának függvényében.
- Ajánlott, hogy a maximálisan megengedhető oldószer-koncentráció ne haladja meg az oldószer legkevesbé citotoxikus koncentrációjának 10-szeres hígítását.
27. A vizsgálat először történő elvégzése előtt a laboratóriumnak el kell végeznie a 33–35. bekezdésben leírt minősítő kísérletet annak igazolására, hogy a laboratórium képes fenntartani és előállítani a kémiai vizsgálatokhoz szükséges megfelelő sejt kultúrát és kísérleti körülményeket.
28. Ha új sejttétellel kívánunk elindítani egy tesztelést, az új tétel használata előtt le kell futtatni egy kontroll lemezt a sejtek teljesítményének értékelése céljából a 36. és 37. bekezdésben leírtak szerint.

A hormonmérő rendszer teljesítménye

A módszer érzékenysége, pontossága, precizitása és keresztreaktivitás a mintamátrixszal

29. Minden laboratórium az általa kiválasztott hormonmérési rendszert használhatja a H295R-sejtek T- és E2-termelésének elemzéséhez, amíg az megfelel a teljesítménykritériumoknak, beleértve a meghatározási határt (LOQ) is. Névlegesen ez 100 pg/ml a T és 10 pg/ml az E2 esetében, amelyek a validálási vizsgálatokban megfigyelt bazális hormonszinteken alapulnak. Azonban magasabb vagy alacsonyabb szintek is megfelelőek lehetnek attól függően, hogy a vizsgálatot végző laboratórium milyen bazális hormonszintet ért el. A QC-lemezek és a tesztek futtatásának megkezdése előtt a laboratóriumnak belső hormon kontrollal kezelt kiegészített táptalajok elemzésével bizonyítania kell, hogy a használandó hormonvizsgálat kellő pontossággal és precizitással tudja mérni a hormonkoncentrációkat a kiegészített táptalajban ahhoz, hogy megfeleljen az 1. és 5. táblázatban meghatározott QC-kritériumoknak. A kiegészített táptalajba az egyes hormonoknak legalább három koncentrációját kell bevenni (pl. 100, 500 és 2 500 pg/ml T, 10, 50 és 250 pg/ml E2; vagy a választott hormonmérési rendszer kimutatási határain alapuló legalacsonyabb koncentráció használható a T és E2 legalacsonyabb koncentrációjaként) és analízálni. A nem extrahált minták mért hormonkoncentrációinak a névleges koncentrációkhoz képest 30 %-on belül kell lennie, és az azonos minta ismételt mérései közötti variáció nem haladhatja meg a 25 %-ot (további QC-kritériumokért lásd még a 8. táblázatot). Ezeknek a QC-kritériumoknak a teljesülése esetén azt feltételezzük, hogy a kiválasztott hormonmérési vizsgálat kellőképpen pontos, precíz, és nem ad olyan keresztreakciót a táptalaj komponenseivel (mintamátrix), hogy az jelentősen befolyásolná a vizsgálat eredményét. Ebben az esetben nincs szükség a minták hormonmérés előtti extrakciójára.
30. Abban az esetben, ha az 1. és 8. táblázatban foglalt QC-kritériumok nem teljesülnek, az jelentős mátrixhatásra utalhat, és a kísérletet extrahált kezelt táptalajjal kell elvégezni. A extrakciós eljárás egy példáját a validálási jelentés II. függeléke szemlélteti (4). A hormonkoncentráció méréseit az extrahált mintákon három példányban kell elvégezni. ⁽¹⁾ Ha kimutatható, hogy a táptalaj komponensei az extrahálás után nem zavarják a hormonkimutatási módszert a QC-kritériumokban meghatározottak szerint, minden további kísérleteket extrahált minták felhasználásával kell elvégezni. Ha az extrahálás után a QC-kritériumok nem teljesülnek, a felhasznált hormonmérő rendszer nem alkalmas a H295R szteroidogenezis vizsgálat céljára, és alternatív hormonkimutatási módszert kell használni.

Standard görbe

31. Az oldószer kontrollok (SC-k) hormonkoncentrációjának a standard görbe lineáris részén belül kell lennie. A legelőnyösebb az, ha az SC-értékek közel esnek a lineáris rész közepéhez annak érdekében, hogy a hormonszintézis indukciója és inhibíciója mérhető legyen. A táptalajok (vagy extraktok) mérendő hígításait ennek megfelelően kell kiválasztani. A lineáris kapcsolatot megfelelő statisztikai megközelítés segítségével kell meghatározni.

Kémiai interferencia teszt

32. Ha ellenanyag-alapú vizsgálatokat, például enzimköti immunoszorbens vizsgálatot (ELISA) és radioimmun vizsgálatot (RIA) fognak a hormonok mérésére használni, a vegyi anyagok tényleges tesztelésének megkezdése előtt a vegyi anyagok mindegyikét meg kell vizsgálni a használni tervezett hormonmérési rendszerrel való lehetséges interferencia tekintetében (validálási jelentés III. függeléke (4)), mert néhány vegyi anyag zavarhatja ezeket a vizsgálatokat (17). Ha a hormonanalízis a T és/vagy E2 bazális hormontermelés ≥ 20 %-ának megfelelő interferencia

⁽¹⁾ Megjegyzés: Ha extrakcióra van szükség, minden kivonattal három párhuzamos mérést végzünk. Minden mintát csak egyszer extrahálunk.

előfordulását mutatja ki, le kell futtatni egy kémiai hormonvizsgálati interferencia tesztet (például a validálási jelentés (4) III. függelékének 5.0. fejezetében leírt tesztet) a vizsgált vegyi anyag törzsoldatának összes hígításán annak a küszöbdózisnak a meghatározására, amely mellett jelentős ($\geq 20\%$) interferencia lép fel. Ha az interferencia kisebb mint 30% , az eredményeket korrigálni lehet az interferenciával. Ha az interferencia meghaladja a 30% -ot, az adatok érvénytelenek, és az adott koncentráció adatait el kell vetni. Ha egy vizsgált vegyi anyag több mint egy nem citotoxikus koncentráció mellett is jelentős interferenciát mutat a hormonmérési rendszerrel, másik hormonmérési rendszert kell használni. A szennyező vegyi anyagok által kiváltott interferencia elkerülése érdekében ajánlott, hogy a hormonokat alkalmas oldószerrel extraháljuk a táptalajból, a lehetséges módszerek megtalálhatók validálási jelentésben (4).

1. táblázat

A hormonmérő rendszer teljesítménykritériumai

Paraméter	Kritérium
A mérési módszer érzékenysége	Meghatározási határ (LOQ) T: 100 pg/ml; E2: 10 pg/ml ^(a)
A hormonextrakció hatékonysága (kizárólag akkor, ha extrakcióra van szükség)	A bevitt hormonmennyiség átlagos visszanyerési aránya (a három mérés alapján) nem térhet el több mint 30% -ban a bevitt mennyiségtől.
Kémiai interferencia (kizárólag az anti-test-alapú rendszerek esetében)	Nem fordul elő jelentős (az adott hormon bazális hormontermelése $\geq 30\%$ -ának megfelelő) keresztreaktivitás a sejtek által termelt semelyik hormonnal ^(b) ^(c)

^(a) Megjegyzés: A módszer mérési határértékei az 5. táblázatban megadott bazális hormontermelési értékeken alapulnak és teljesítményalapúak. Ha magasabb bazális hormontermelést lehet elérni, akkor a határérték is nagyobb lehet.

^(b) Egyes T- és E2-antitestek nagyobb százalékban is keresztreakcióba léphetnek az androsztendionnal és az ösztroonnal. Ilyen esetekben nem lehet pontosan meghatározni a 17β -HSD-re gyakorolt hatásokat. Az adatok azonban továbbra is hasznos információt nyújthatnak az ösztrogén- vagy androgéntermelésre gyakorolt hatásokról általában. Ilyen esetekben az adatokat androgén/ösztrogén választban kell kifejezni E2 és T helyett.

^(c) Ezek a következők: koleszterin, pregnenolon, progeszteron, 11-dezoxikortikoszteron, kortikoszteron, aldoszteron, 17α -pregnenolon, 17α -progeszteron, dezoxikortizol, kortizol, DHEA, androsztendion, ösztroon.

Laboratóriumi jártassági teszt

33. Ismeretlen vegyi anyagok vizsgálata előtt a laboratóriumnak egy laboratóriumi jártassági teszt lefuttatásával kell demonstrálnia, hogy képes előállítani és fenntartani a megfelelő sejtkultúrát és a vizsgálat sikeres lebonyolításához szükséges vizsgálati körülményeket. Mivel egy vizsgálat végrehajtása közvetlenül összefügg a vizsgálatot végző laboratóriumi személyzettel, ezeket az eljárásokat részlegesen meg kell ismételni, ha változás következik be a laboratóriumi személyzetben.
34. Ezt a jártassági tesztet a 38–40. bekezdésben felsoroltakkal megegyező feltételek mellett kell elvégezni, a sejteket erős, közepes és gyenge induktorok és inhibitorok 7 növekvő koncentrációjának, valamint egy negatív vegyi anyagnak kitéve (lásd a 2. táblázatot). Pontosabban, a vizsgálandó vegyi anyagok közé tartozik az erős induktor forskolin (CAS-szám: 66575-29-9), az erős inhibitor prokloráz (CAS-szám: 67747-09-5), a mérsékelt induktor atrazin (CAS-szám: 1912-24-9), a közepes inhibitor aminoglutetimid (CAS-szám: 125-84-8), a gyenge induktor (E2-termelés) és gyenge inhibitor (T-termelés) biszfenol-A (CAS-szám: 80-05-7), és a negatív vegyi anyag humán chorion-gonadotropin (HCG) (CAS-szám: 9002-61-3), amint azt a 2. táblázat mutatja. Külön lemezeket futtatunk az egyes vegyi anyagokra a 6. táblázatban bemutatott sémának megfelelően. A napi futtatásokba is be kell illeszteni egy QC-lemezt (4. táblázat, 36–37. bekezdés) a jártassági tesztanyagok részére.

2. táblázat

Jártassági tesztanyagok és expozíciós koncentrációk

Jártassági tesztanyag	Vizsgálati koncentrációk [μ M]
Prokloráz	0 ^(a) , 0,01, 0,03, 0,1, 0,3, 1, 3, 10
Forskolin	0 ^(a) , 0,03, 0,1, 0,3, 1, 3, 10, 30

Jártassági tesztanyag	Vizsgálati koncentrációk [μM]
Atrazin	0 ^(a) , 0,03, 0,1, 1, 3, 10, 30, 100
Aminoglutetimid	0 ^(a) , 0,03, 0,1, 1, 3, 10, 30, 100
Biszfénol-A	0 ^(a) , 0,03, 0,1, 1, 3, 10, 30, 100
HCG	0 ^(a) , 0,03, 0,1, 1, 3, 10, 30, 100

^(a) Oldószer (DMSO) kontroll (0), 1 μl DMSO/lyuk

A H295R jártassági tesztanyagoknak való expozícióját 24-lyukú lemezen kell elvégezni a laboratóriumi jártassági teszt során. Az adagolás μM -ban van megadva a vizsgált vegyi anyagok valamennyi dózisa esetében. A dózisokat DMSO-hoz kell hozzáadni 0,1 térfogatszázalék arányban lyukanként. Az összes tesztkoncentrációt három lyukban kell vizsgálni (6. táblázat). Az egyes vegyi anyaghoz külön lemezeket kell futtatni. Minden napi futtatásba egy QC-lemezt is be kell illeszteni.

35. A sejtek életképességének és a hormonoknak az elemzését a 42–46. bekezdésben előírtak szerint kell elvégezni. A küszöbértéket (megfigyelhető hatást okozó legalacsonyabb koncentráció, LOEC) és a besorolásra vonatkozó döntést jegyzőkönyvezni kell, és össze kell hasonlítani a 3. táblázatban szereplő értékekkel. Az adatok elfogadhatónak tekinthetők, ha megfelelnek a 3. táblázatban foglalt LOEC-értékeknek és besorolási döntéseknek.

3. táblázat

A jártassági tesztanyagok küszöbértékei (LOEC) és besorolási döntései

	CAS-szám	LOEC [μM]		Besorolási döntés	
		T	E2	T	E2
Prokloráz	67747-09-5	$\leq 0,1$	$\leq 1,0$	+ ^(a) (Indukció)	+ (Inhibíció)
Forskolin	66575-29-9	≤ 10	$\leq 0,1$	+ (Indukció)	+ (Indukció)
Atrazin	1912-24-9	≤ 100	≤ 10	+ (Indukció)	+ (Indukció)
Aminoglutetimid	125-84-8	≤ 100	≤ 100	+ (Inhibíció)	+ (Inhibíció)
Biszfénol-A	80-05-7	≤ 10	≤ 10	+ (Inhibíció)	+ (Indukció)
HCG	9002-61-3	n/a	n/a	Negatív	Negatív

^(a) +, pozitív

n/a: nem alkalmazható, mivel a negatív kontroll nem citotoxikus koncentrációjának való expozíció után nem történhet változás.

Minőség-ellenőrzési lemez

36. A minőség-ellenőrzési (QC) lemezt a H295R-sejtek standard tenyésztési körülmények közötti teljesítményének ellenőrzésére, valamint az oldószeres kontrollokban, a pozitív és negatív kontrollokban mért hormonkoncentrációk, valamint az egyéb QC-mérések történeti adatbázisának létrehozására használjuk.
- A H295R-sejtek teljesítményét QC-lemez használatával kell értékelni minden egyes új ATCC tétel esetében vagy ha egy korábban lefagyasztott sejttálmányt első alkalommal használunk, kivéve, ha a laboratórium jártassági tesztjét (32-34. bekezdés) ezzel a sejttétellel futtattuk le.
 - A QC-lemez teljes értékelést ad a vizsgálati feltételekről (pl. a sejtek életképessége, oldószeres kontrollok, negatív és pozitív kontrollok, valamint intra- és inter-assay variabilitás) a vegyi anyagok vizsgálata során, és azt minden tesztfuttatásba be kell építeni.
37. A QC-vizsgálatra 24-lyukú lemezen kerül sor, és ugyanazokat az inkubációs, adagolási, sejt életképességi/citotoxicitási, hormonextrakciós és hormonelemzési eljárásokat követi, mint amelyeket a 38–46. bekezdés a vegyi anyagok tesztelésére leír. A QC-lemez vakpróbákat, oldószeres kontrollokat, egy ismert induktor két koncentrációját (forskolin, 1 és 10 μM), valamint az E2- és T-szintézis egy ismert inhibitorának két koncentrációját (prokloráz, 0,1 és 1 μM) is tartalmazza. Ezen túlmenően pozitív kontrollként MeOH-t használunk

kiválasztott lyukakban az életképességi/citotoxicitási vizsgálatban. A lemezelrendezés részletes leírása a 4. táblázatban található. A QC-lemezen teljesítendő kritériumokat az 5. táblázat tartalmazza. A T és az E2 minimális bazális hormon termelését mind az oldószer kontrollban, mind a vakpróbákban teljesíteni kell.

4. táblázat

A minőség-ellenőrzési lemez elrendezése a nem kezelt és az E2- és T-termelés ismert gátlóinak (PRO = prokloráz) és stimulánsainak (FOR = forskolin) kitett H295R-sejtek teljesítményének vizsgálatához. Az expozíciós kísérlet befejezése és a táptalaj eltávolítása után 70 %-os metanol oldatot adunk hozzá minden MeOH-lyukhoz, hogy pozitív kontrollként szolgáljanak a citotoxicitási vizsgálat során (a citotoxicitási vizsgálatot lásd a validálási jelentés III. függelékben (4))

	1	2	3	4	5	6
A	Vakpróba ^(a)	Vakpróba ^(a)	Vakpróba ^(a)	Vakpróba ^(a) (+ MeOH) ^(b)	Vakpróba ^(a) (+ MeOH) ^(b)	Vakpróba ^(a) (+ MeOH) ^(b)
B	DMSO ^(c) 1 µl	DMSO ^(c) 1 µl	DMSO ^(c) 1 µl	DMSO ^(c) 1 µl (+ MeOH) ^(b)	DMSO ^(c) 1 µl (+ MeOH) ^(b)	DMSO ^(c) 1 µl (+ MeOH) ^(b)
C	FOR 1 µM	FOR 1 µM	FOR 1 µM	FOR 0,1 µM	FOR 0,1 µM	FOR 0,1 µM
D	FOR 10 µM	FOR 10 µM	FOR 10 µM	FOR 1 µM	FOR 1 µM	FOR 1 µM

^(a) A vakpróbák sejtjeihez csak táptalajt adunk (azaz nincs oldószer).

^(b) A metanolt (MeOH) az expozíció megszüntetése és a táptalajnak ezekből a lyukakból történt eltávolítása után adjuk hozzá.

^(c) DMSO oldószeres kontroll (1 µl/lyuk).

5. táblázat

A minőség-ellenőrzési lemez teljesítménykritériumai

	T	E2
A hormon bazális termelődése az oldószeres kontrollban (SC)	Az LOQ $\geq$ 5-szöröse	Az LOQ $\geq$ 2,5-szöröse
Indukció (10 µM forskolin)	Az SC $\geq$ 1,5-szöröse	Az SC $\geq$ 7,5-szöröse
Inhibíció (1µM prokloráz)	Az SC $\leq$ 0,5-szöröse	Az SC $\leq$ 0,5-szöröse

VEGYIANYAG-EXPOZÍCIÓS ELJÁRÁS

38. Az előinkubált sejteket eltávolítjuk az inkubátorból (21. bekezdés) és az adagolást megelőzően mikroszkóp alatt ellenőrizzük, hogy jó állapotban vannak-e (tapadás, morfológia).
39. A sejteket biológiai biztonsági fülkében helyezük el, a kiegészített táptalajt eltávolítjuk és új kiegészített táptalajjal váltjuk fel (1 ml/lyuk). Ehhez a vizsgálati módszerhez oldószerként lehetőleg DMSO-t kell alkalmazni. Ha azonban más oldószer használata indokolt, azt tudományos érvekkel kell alátámasztani. A sejteket a vizsgált vegyi anyagnak úgy tesszük ki, hogy 1 ml kiegészített táptalajhoz (lyuk térfogata) hozzáadjuk a DMSO-ban feloldott megfelelő törzssoldat 1 µl-ét (lásd a validálási jelentés II. függelékét (4)). Ez azt eredményezi, hogy a DMSO végső

koncentrációja a lyukakban 0,1 % lesz. A megfelelő elkeveredéshez általában előnyös, ha a vizsgált vegyi anyag DMSO-ban feloldott megfelelő törzsoldatát összekeverjük a kiegészített táptalajjal, hogy megkapjuk minden egyes dózis kívánt végső koncentrációját, és a keveréket közvetlenül a régi táptalaj eltávolítása után hozzáadjuk az egyes lyukakhoz. Ha ezt az opciót használjuk, a DMSO koncentrációja (0,1 %) konzisztens marad az összes lyukban. A két legnagyobb koncentrációt tartalmazó lyukat sztereomikroszkóp segítségével vizuálisan értékeljük csapadékok képződése vagy a zavarosság jelei szempontjából, amelyek a vizsgált vegyi anyag nem komplett oldhatóságára utalnak. Ha ilyen körülmények (elfelhősödés, csapadék képződése) figyelhetők meg, a következő kisebb koncentrációt tartalmazó lyukakat is megvizsgáljuk (és így tovább), és azokat a koncentrációkat, amelyek nem teljesen mennek oldatba, ki kell zárni a további értékelésből és elemzésből. A lemezt visszahelyezzük az inkubátorba, ahol 37 °C-on 5 % CO₂-t tartalmazó levegő atmoszférában 48 órán keresztül inkubáljuk. A vizsgált vegyi anyag lemez elrendezését a 6. táblázat mutatja. Az 1–7. törzsoldatok a vizsgált vegyi anyag növekvő dózisainak elhelyezését mutatják.

6. táblázat

Adagolási séma a H295R-sejtek vizsgált vegyi anyaggal való expozíciójához 24-lyukú lemezen

	1	2	3	4	5	6
A	DMSO	DMSO	DMSO	4. törzsoldat	4. törzsoldat	4. törzsoldat
B	1. törzsoldat	1. törzsoldat	1. törzsoldat	5. törzsoldat	5. törzsoldat	5. törzsoldat
C	2. törzsoldat	2. törzsoldat	2. törzsoldat	6. törzsoldat	6. törzsoldat	6. törzsoldat
D	3. törzsoldat	3. törzsoldat	3. törzsoldat	7. törzsoldat	7. törzsoldat	7. törzsoldat

40. 48 óra elteltével az expozíciós lemezeket eltávolítjuk az inkubátorból, és mikroszkóp alatt minden lyukban ellenőrizzük a sejtek állapotát (tapadás, morfológia, összefolyás foka) és a citotoxicitás jeleit. Minden egyes lyuk táptalaját két egyenlő mennyiségű részre osztjuk (egyenként körülbelül 490 µl), és átvisszük két megfelelően jelölt fiolába (azaz lyukanként egy alikvot tartalék mintaként szolgál). A sejtek kiszáradásának megakadályozása érdekében egy időben egy sorból vagy oszlopból távolítjuk el a táptalajt, és helyére a sejteletképességi/toxicitási vizsgálathoz szükséges táptalajt töltjük be. Ha a sejteletképességet/citotoxicitást nem kell azonnal mérni, 200 µl PBS-t (Ca²⁺ és Mg²⁺ ionokkal) adunk az egyes lyukakhoz. A táptalajokat – 80 °C-on fagyaszthatjuk le a hormonkoncentrációk elemzését célzó további feldolgozásig (lásd a 44–46. bekezdést). Bár a T és az E2 a – 80 °C-on tartott táptalajban általában legalább 3 hónapig stabil marad, minden laboratóriumnak dokumentálnia kell a hormonok stabilitását a tárolás során.
41. A táptalaj eltávolítása után azonnal meghatározzuk a sejtek életképességét és a citotoxicitást az egyes expozíciós lemezekben.

A sejtek életképességének meghatározása

42. Szabadon választott sejteletképességi/citotoxicitási vizsgálatot lehet használni a vizsgált vegyi anyag sejtek életképességére gyakorolt potenciális hatásának meghatározására. A vizsgálatnak alkalmasnak kell lennie arra, hogy pontosan mérje az adott lyukban lévő életképes sejtek százalékos arányát, vagy igazolni kell, hogy a vizsgálat közvetlenül összehasonlítható (lineáris függvénye) a Live/Dead® Assay-vel (lásd a validálási jelentés III. függelékét (4)). Egy másik vizsgálatról, az MTT-vizsgálatról [3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazolium-bromid] (18) kimutatták, hogy ugyanolyan jól működik. A sejtek életképességének a fenti módszerek alkalmazásával történő értékelése egy relatív mérés, amely nem szükségszerűen mutat lineáris kapcsolatot a lyukban lévő sejtek abszolút számával. Ezért az elemzőnek el kell végeznie minden lyuk szubjektív képi értékelését is, illetve digitális képeket kell készítenie és archiválnia kell azokat az SC-kről és a két legnagyobb nem citotoxikus koncentrációról a valós sejtsűrűség későbbi értékelése céljára, amennyiben erre lenne szükség. Ha a vizuális ellenőrzés során úgy tűnik, vagy ha az életképességi/citotoxicitási vizsgálat azt mutatja, hogy a sejtek száma megnövekedett, a látszólagos növekedést ellenőrizni kell. Ha a sejtszám növekedése megerősítésre kerül, ezt jelezni kell a vizsgálati jegyzőkönyvben. A sejtek életképességét az SC-k átlagos válaszához viszonyítva fejezzük ki, amelyet 100 %-ban életképes sejtekből állónak tekintünk, és kiszámítása az alkalmazott sejteletképességi/citotoxicitási vizsgálatnak megfelelően történik. Az MTT-vizsgálat esetében a következő képletet lehet használni:

életképes sejtek % = (válasz a lyukban – átlagos válasz a MeOH-kezelt lyukakban [= 100 % halott]) ÷ (átlagos válasz az SC-lyukakban – átlagos válasz a MeOH-kezelt lyukakban [= 100 % halott])

43. Az SC-k átlagos életképességéhez (= 100 %-os életképesség) viszonyított 80 %-nál alacsonyabb életképességet mutató lyukakat nem kell figyelembe venni az adatok végső elemzésénél. A szteroidogenezis csaknem 20 %-os citotoxicitás mellett történő gátlását gondosan mérlegelni kell annak biztosítása érdekében, hogy nem a citotoxicitás az oka a gátlásnak.

Hormonanalízis

44. Minden laboratórium az általa kiválasztott hormonmérési rendszert használhatja a T és az E2 analíziséhez. Az egyes kezelési csoportok táptalajának tartalék alikvotjait hígítások készítésére lehet használni, hogy a koncentrációt a standard görbe lineáris részébe hozzuk. Amint az a 29. bekezdésben kihangsúlyozásra került, a laboratóriumoknak a QC-futtatások vagy a vegyi anyagok vizsgálata előtt belső hormon kontrollal kezelt kiegészített táptalaj elemzésével bizonyítani kell, hogy a hormonmérési rendszere (pl. ELISA, RIA, LC-MS, LC-MS/MS) megfelel a QC-kritériumoknak. Annak érdekében, hogy a vizsgálati rendszer összetevői ne zavarják a hormonok mérését, szükség lehet a hormonok kivonására a táptalajból a mérés előtt (az extrakció szükséges vagy nem szükséges voltának eldöntését megalapozó feltételeket lásd a 30. bekezdésben). Az extrakciót javasolt a validálási jelentés III. függelékben foglalt eljárásoknak megfelelően elvégezni (4).
45. Amennyiben kereskedelmi tesztkészletet használunk a hormontermelés mérésére, a hormonanalízist a vizsgálati készlet gyártójának kézikönyvében megadottak szerint kell végezni. A legtöbb gyártó egyedülálló eljárással rendelkezik a hormonanalízisek elvégzésére. A minták hígításait úgy kell módosítani, hogy az oldószer kontrollok várható hormonkoncentrációi az adott vizsgálat standard görbéje lineáris tartományának középpontjába essenek (a validálási jelentés III. függeléke (4)). A standard görbe lineáris részén kívüli értékeket el kell utasítani.
46. A végső hormonkoncentráció kiszámítása az alábbiak szerint történik:

Példa:

Kivont anyag:	450 µl táptalaj
Rekonstituálva:	250 µl vizsgálati pufferben
Hígítás a vizsgálatban:	1:10 (ahhoz, hogy a minta a standard görbe lineáris tartományába kerüljön)
Hormonkoncentráció a vizsgálatban:	150 pg/ml (már hozzáigazítva a vizsgált minta ml-enkénti koncentrációjához)
Kinyerési fok:	89 %
Végső hormonkoncentráció =	(hormonkoncentráció (ml-enként) ÷ kinyerési fok) × (hígítási faktor)
Végső hormonkoncentráció =	(150 pg/ml) ÷ (0,89) × (250 µl/450 µl) × 10 = 936,3 pg/ml

A tesztkoncentrációk megválasztása

47. A legalább két, egymástól független futtatást kell a vizsgálatból végezni. Ajánlott, hogy a kezdeti futtatáshoz a vizsgálati koncentrációkat $\log_{10}$ intervallumokra határozzuk meg egymástól és 10^{-3} M legyen a maximális

koncentráció, kivéve, ha olyan előzetes, például az oldhatóság korlátaira vagy citotoxicitásra vonatkozó információ áll rendelkezésre, amely a vizsgálati koncentrációk megválasztásának alapjául szolgálhat. Ha a vegyi anyag oldható, egyik tesztelt koncentrációban sem citotoxikus, és az első futtatás negatív volt minden koncentrációban, akkor ezt egy vagy több, az első futtatással megegyező feltételeket alkalmazó futtatásban meg kell erősíteni (7. táblázat). Ha az első futtatás eredményei nem egyértelműek (azaz az SC-hez viszonyított valahányszoros változás csak egyetlen koncentrációban statisztikailag szignifikáns) vagy pozitívak (azaz a valahányszoros változás két vagy több szomszédos koncentrációban is statisztikailag szignifikáns), a vizsgálatot a 7. táblázatnak megfelelően a kiválasztott vizsgálati koncentráció finomításával meg kell ismételni. A második és harmadik futtatásban (ha van ilyen) alkalmazott tesztkoncentrációkat az első futtatás eredményei alapján ki kell igazítani, a hatást kiváltó koncentrációkat $1/2$ log koncentráció intervallumokkal közrefogva (pl. ha 0,001, 0,01, 0,1, 1, 10, 100, 1 000 μM eredeti futtatása indukciót eredményezett az 1 és 10 μM koncentrációknál, a második futtatásban a vizsgált koncentrációknak 0,1, 0,3, 1, 3, 10, 30, 100 μM -nak kell lenniük), kivéve, ha alacsonyabb koncentrációkat kell alkalmazni a LOEC eléréséhez. Az utóbbi esetben a második futtatásban legalább öt, az első futtatásban vizsgált legalacsonyabb koncentráció alatti koncentrációt kell használni fél-logaritmikus skála segítségével. Ha a második futtatás nem erősíti meg az első futtatást (azaz statisztikai szignifikancia nem fordul elő a korábban pozitívan vizsgált koncentráció ± 1 koncentráció-növekmény értéknél), egy harmadik kísérletet kell végezni az eredeti vizsgálati körülmények mellett. Az első futtatás nem egyértelmű eredményeit negatívnak tekintjük, ha a két következő futtatás egyike sem erősítette meg a megfigyelt hatást. A nem egyértelmű eredményeket pozitív válasznak (hatás) tekintjük, ha a választ legalább még egy futtatással meg lehet erősíteni ± 1 koncentráció-növekményen belül (az adatok értelmezési eljárását lásd az 55. bekezdésben).

7. táblázat

A lehetséges kimenetek döntési mátrixa

1. futtatás	2. futtatás		3. futtatás		Döntés	
Kimenetel	Döntés	Kimenetel	Döntés	Kimenetel	Pozitív	Negatív
Negatív	Megerősítés ^(a)	Negatív	Stop			X
Negatív	Megerősítés ^(a)	Pozitív	Finomítás ^(b)	Negatív		X
Kétes ^(c)	Finomítás ^(b)	Negatív	Megerősítés ^(a)	Negatív		X
Kétes ^(c)	Finomítás ^(b)	Negatív	Megerősítés ^(a)	Pozitív	X	
Kétes ^(c)	Finomítás ^(b)	Pozitív			X	
Pozitív	Finomítás ^(b)	Negatív	Megerősítés ^(a)	Pozitív	X	
Negatív	Megerősítés ^(a)	Pozitív	Finomítás ^(b)	Pozitív	X	
Pozitív	Finomítás ^(b)	Pozitív	Stop		X	

^(a) A korábbi futtatást ugyanazon kísérleti terv használatával meg kell erősíteni.

^(b) A vizsgálatot $1/2$ -log koncentrációintervallumokkal újra kell futtatni (közrefogva azt a koncentrációt, amelyik jelentősen különböző vizsgálati eredményt adott az előző kísérletben).

^(c) Az SC-hez viszonyított valahányszoros változás egy adott koncentrációnál statisztikailag szignifikánsan eltér.

A tesztlemez minőség-ellenőrzése

48. A QC-lemezre vonatkozó kritériumokon túlmenően a párhuzamos lyukak közötti eltérésekre, az ismételt kísérletekre, a hormonmérési rendszerek linearitására és érzékenységre, az ugyanazon minta párhuzamos hormonmérései közötti variabilitásra, és a hormonsúcsoknak a táptalaj extrakciója (ha van ilyen; az extrakciós követelmények tekintetében lásd a 30. bekezdést) utáni százalékos visszanyerésére vonatkozó egyéb minőségi kritériumokat is teljesíteni kell, amelyeket a 8. táblázat tartalmaz. Az adatoknak az egyes paraméterekre meghatározott elfogadható tartományon belül kell esnie, hogy figyelembe vehessük azokat a további értékelés során. Amennyiben ezek a feltételek nem teljesülnek, a táblázatban meg kell jegyezni, hogy a szóban forgó minta esetében a QC-kritériumok nem teljesültek, és a mintát újra kell elemezni vagy ki kell zárni az adathalmazból.

8. táblázat

A H295R-vizsgálati tesztlemez paramétereinek elfogadható tartományai és/vagy variációja (%).

LOQ: a hormonmérési rendszer meghatározási határa; SC: oldószerkontroll; DPM: percenkénti bomlás

	Összehasonlítandó	T	E2
Bazális hormontermelés az SC-kben	Az LOQ valahányszoros	≥ 5 -ször	$\geq 2,5$ -szer
Expozíciós követelmények – Lemezen belüli relatív szórás az SC-k esetében (párhuzamos lyukak)	Abszolút koncentrációk	$\leq 30 \%$	$\leq 30 \%$
Expozíciós követelmények – Lemezek közötti relatív szórás az SC-k esetében (megismételt kísérletek)	Valahányszoros változás	$\leq 30 \%$	$\leq 30 \%$
Hormonmérési rendszer – Érzékenység	Kimutatható valahányszoros növekedés az OK-hoz viszonyítva	≥ 5 -ször	$\geq 2,5$ -szer
Hormonmérési rendszer – Ismételt mérés relatív szórása az SC-k esetében ^(a)	Abszolút koncentrációk	$\leq 25 \%$	$\leq 25 \%$
Táptalaj extrakciója – A belső 3H standard kinyerése (ha van ilyen)	DPM	$\geq 65 \%$ nominális	

^(a) Ugyanazon minta ismételt méréseire vonatkozik.

ADATELEMZÉS ÉS JEGYZŐKÖNYVEZÉS

Adatelemzés

49. A vegyi anyag által módosított hormontermelés relatív növekedésének/csökkenésének értékeléséhez az eredményeket normalizálni kell az egyes tesztlemezek átlagos SC-értékéhez, és az eredményeket az SC-khez viszonyított változtatásban kell kifejezni minden tesztlemezen. Minden adatot átlag ± 1 szórás formában kell kifejezni.
50. Az adatok elemzése során csak az olyan lyukakból származó hormonadatokat kell figyelembe venni, ahol a citotoxicitás alacsonyabb volt 20 %-nál. A relatív változásokat a következő módon kell kiszámítani:

Relatív változás = (hormonkoncentráció a lyukban) $\div$ (oldószeres kontroll lyukak átlagos hormonkoncentrációja).

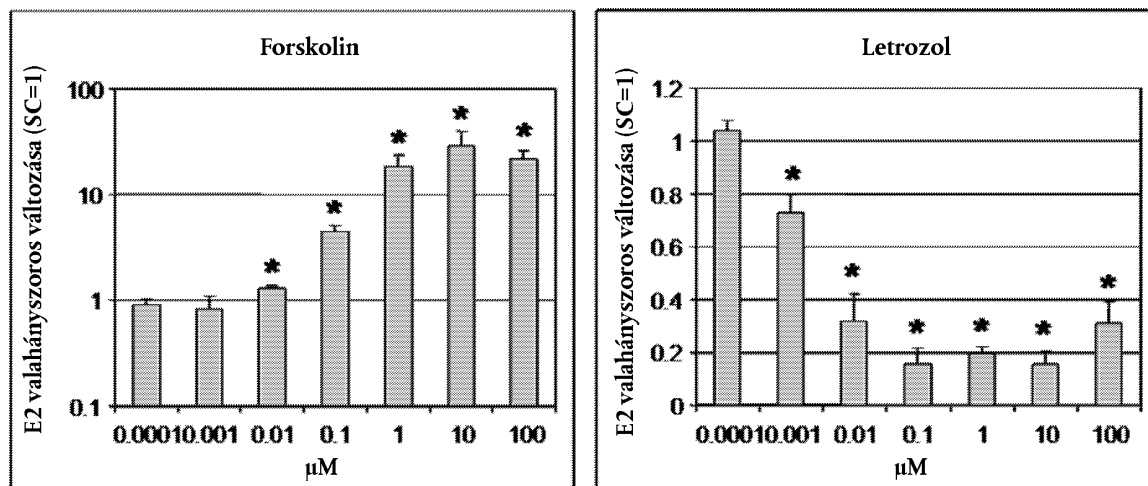
51. Ha a lyuk vizuális ellenőrzése során úgy tűnik, vagy ha a 42. bekezdésben leírt életképességi/citotoxicitási vizsgálat azt mutatja, hogy a sejtek száma megnövekedett, a látszólagos növekedést ellenőrizni kell. Ha a sejtszám növekedése megerősítésre kerül, ezt jelezni kell a vizsgálati jegyzőkönyvben.
52. Statisztikai elemzések végzése előtt a normalitásra és a szóráshomogenitásra vonatkozó feltételezéseket ki kell értékelni. A normalitást standard probability plotok használatával vagy más megfelelő statisztikai módszerrel (pl. Shapiro-Wilk-teszt) kell értékelni. Ha az adatok (valahányszoros változások) nem normális eloszlásúak, akkor meg kell próbálni átalakítani az adatokat, hogy megközelítsék a normális eloszlást. Ha az adatok normális vagy megközelítőleg normális eloszlásúak, a vegyi anyag koncentrációcsoportjai és az SC-k közötti különbségeket egy paraméteres teszttel (pl. Dunnett-teszt) kell elemezni, ahol a *koncentráció* a független és a *válasz* (valahányszoros változás) a függő változó. Ha az adatok nem normális eloszlásúak, egy megfelelő nem-paraméteres tesztet kell alkalmazni (pl. Kruskal Wallis, Steel's Many-one rank teszt). A különbségeket $p \leq 0,05$ esetén tekintjük szignifikánsnak. Az egyes lyukak statisztikai értékelését az átlagos értékek alapján végezzük el, amelyek független párhuzamos adatpontokat testesítenek meg. Mivel nagy a dózisok közötti távolság az első futtatásban ($\log_{10}$ -skála), várható, hogy sok esetben nem lehetséges egyértelmű koncentráció-válasz kapcsolatokat leírása, ha a két legnagyobb dózis a szigmoid görbe lineáris részén van. Ezért az első futtatás vagy bármely más adathalmaz esetében, ahol ez a feltétel bekövetkezik (például ahol a maximális hatékonyság nem becsülhető), I. típusú rögzített változós statisztikákat kell alkalmazni a fent leírtak szerint.

53. Ha több mint két adatpont fekszik a görbe lineáris részén és ha a maximális hatékonyságot ki lehet számítani – amint az egyes 2. futtatások esetében várható, amelyek az expozíciós koncentrációk fél-log távolságát használják – probit, logit vagy egyéb megfelelő regressziós modellt kell használni a hatékony koncentrációk (pl. EC50 és EC20) kiszámításához.
54. Az eredményeket mind grafikus (átlag $\pm$ 1 szórást képviselő oszlopdiagramok), mind táblázatos (LOEC/NOEC, hatásirány, és a maximális válasz ereje, amely a dózis-válasz adatok részét képezi) formátum biztosítani kell (lásd a példát a 3. ábrán). Az adatok értékelése csak akkor tekinthető érvényesnek, ha az legalább két, egymástól függetlenül végzett futtatáson alapul. Egy kísérlet vagy futtatás akkor tekinthető függetlennek, ha azt másik időpontban, új oldatokkal és kontrollokkal végeztük el. A 2. és 3. futtatásban (ha szükséges) alkalmazott koncentrációtartományt ki lehet igazítani az 1. futtatás eredményei alapján, hogy jobban meghatározza a LOEC-t tartalmazó dózis-válasz tartományt (lásd a 47. bekezdést).

3. ábra

Példa a H295R-vizsgálat során nyert adatok bemutatására és értékelésére grafikus és táblázatos formában.

A csillagok az oldószeres kontrollhoz viszonyított statisztikailag szignifikáns különbségeket jelzik ($p < 0,05$). LOEC: megfigyelhető hatást okozó legalacsonyabb koncentráció; Maximális változás: a bármilyen koncentráció mellett megfigyelt válasz legnagyobb erőssége az SC-válasz átlagához (= 1) képest.



Vegyí anyag	LOEC	Maximális változás
Forskolin	0,01	0,15-szörös
Letrozol	0,001	29-szeres

Az adatok értelmezési eljárása

55. A vizsgált vegyi anyagot akkor ítéljük pozitívnak, ha a valahányszoros indukció két szomszédos koncentrációban legalább két független futtatás során statisztikailag eltér ($p \leq 0,05$) a kontroll oldószertől (7. táblázat). A vizsgált vegyi anyagot akkor ítéljük negatívnak, ha két független futtatás negatív eredményt ad, vagy három futtatás esetén, ha két futtatás negatív, és egy kétes vagy pozitív. Ha a három független kísérlet során generált adatok nem felelnek meg a 7. táblázatban felsorolt döntési kritériumoknak, a kísérleti eredmények nem értelmezhetők. Az oldhatóság határait meghaladó vagy citotoxikus koncentrációnál elért eredményeket nem kell figyelembe venni az eredmények értelmezésénél.

Vizsgálati jegyzőkönyv

56. A vizsgálati jegyzőkönyvnek a következőket kell tartalmaznia:

Vizsgáló intézmény

- létesítmény neve és helye,
- vizsgálatvezető és egyéb személyzet, valamint a vizsgálattal kapcsolatos felelősségi körök,
- a vizsgálat kezdetének és végének dátuma.

Vizsgált vegyi anyag, reagensek és kontrollok

- azonosító (adott esetben név/CAS-szám), forrás, tételszám, tisztaság, szállító, valamint a vizsgált vegyi anyag, a reagensek és a kontrollok jellemzői,
- a vizsgált vegyi anyag fizikai természete és főbb fizikai-kémiai tulajdonságai,
- a vizsgált vegyi anyagok, reagensek és kontrollok tárolási körülményei, az előkészítés módja és gyakorisága,
- a vizsgált vegyi anyag stabilitása.

Sejtek

- a sejtek forrása és típusa,
- a tesztben használt sejtek passzálásainak száma (passzázsazonosító),
- a sejt kultúrák fenntartása használt eljárás leírása.

Vizsgálat előtti követelmények (ha van ilyen)

- a vegyi anyag hormonvizsgálati interferencia tesztjének leírása és eredményeinek ismertetése,
- a hormonextrakciós hatások mérésének leírása és eredményeinek ismertetése,
- valamennyi elvégzendő analitikai vizsgálat standard és kalibrációs görbéi,
- a választott analitikai vizsgálatok kimutatási határértékei.

Vizsgálati körülmények

- a táptalaj összetétele,
- a vizsgált vegyi anyag koncentrációja,
- sejtsűrűség (becsült vagy mért sejtkoncentráció 24 és 48 óra után),
- a vizsgált vegyi anyag oldhatósága (oldhatósági határérték, ha meghatároztuk),
- inkubációs idő és körülmények.

Vizsgálati eredmények

- a kontrollok és vizsgált vegyi anyagok lyukainak—a párhuzamos méréseknek a nyers adatai, a hormontermelés méréseire használt műszer eredeti adatformátumában (pl. OD, fluoreszcencia egységek, DPM stb.),
- a normalitás validálása vagy az adatok transzformációjának magyarázata,
- a lyukanként mért átlagos válaszok ± 1 szórás,
- citotoxicitási adatok (citotoxicitás okozó vizsgálati koncentrációk),
- annak megerősítése, hogy QC-követelmények teljesültek,
- sejttoxicitással korrigált relatív változás az oldószeres kontrollhoz viszonyítva,
- az egyes koncentrációknál észlelt relatív változást (valahányszoros változás) mutató oszlopdiagram, a szórás és a statisztikai szignifikancia a 49–54. bekezdés szerint.

Az adatok értelmezése

- alkalmazzuk az adatértelmezési eljárást az eredményekre, és vitassuk meg az eredményeket.

Diskusszió

- Van-e utalás a vizsgálatban arra az eshetőségre, hogy a T/E2-adatokat befolyásolták a glükó- és mineralokortikoid utakra kifejtett közvetett hatások?

Következtetések

SZAKIRODALOM

- (1) OECD (2002), OECD Conceptual Framework for the Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals, in Appendix 2 to Chapter B.54 of this Annex
- (2) Hecker, M., Newsted, J.L., Murphy, M.B., Higley, E.B., Jones, P.D., Wu, R. and Giesy, J.P. (2006), Human adrenocarcinoma (H295R) cells for rapid in vitro determination of effects on steroidogenesis: Hormone production, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 217, 114-124.
- (3) Hecker, M., Hollert, H., Cooper, R., Vinggaard, A.-M., Akahori, Y., Murphy, M., Nellemann, C., Higley, E., Newsted, J., Wu, R., Lam, P., Laskey, J., Buckalew, A., Grund, S., Nakai, M., Timm, G., and Giesy, J. P. (2007), The OECD validation program of the H295R steroidogenesis assay for the identification of in vitro inhibitors or inducers of testosterone and estradiol production, Phase 2: inter laboratory pre-validation studies. *Env. Sci. Pollut. Res.*, 14, 23 – 30.
- (4) OECD (2010), *Multi-Laboratory Validation of the H295R Steroidogenesis Assay to Identify Modulators of Testosterone and Estradiol Production*, OECD Series of Testing and Assessment No. 132, ENV/JM/MONO(2010)31, Paris. Available at [http://www.oecd.org/document/30/0,3746,en_2649_34377_1916638_1_1_1_1,00.html]
- (5) OECD (2010), *Peer Review Report of the H295R Cell-Based Assay for Steroidogenesis*, OECD Series of Testing and Assessment No. 133, ENV/JM/MONO(2010)32, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/document/30/0,3746,en_2649_34377_1916638_1_1_1_1,00.html]
- (6) Battelle (2005), Detailed Review Paper on Steroidogenesis, Available at: [http://www.epa.gov/endo/pubs/edmvsv/steroidogenesis_drp_final_3_29_05.pdf]
- (7) Hilscherova, K., Jones, P. D., Gracia, T., Newsted, J. L., Zhang, X., Sanderson, J. T., Yu, R. M. K., Wu, R. S. S. and Giesy, J. P. (2004), Assessment of the Effects of Chemicals on the Expression of Ten Steroidogenic Genes in the H295R Cell Line Using Real-Time PCR, *Toxicol. Sci.*, 81, 78-89.
- (8) Sanderson, J. T., Boerma, J., Lansbergen, G. and Van den Berg, M. (2002), Induction and inhibition of aromatase (CYP19) activity by various classes of pesticides in H295R human adrenocortical carcinoma cells, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 182, 44-54.
- (9) Breen, M.S., Breen, M., Terasaki, N., Yamazaki, M. and Conolly, R.B. (2010), Computational model of steroidogenesis in human H295R cells to predict biochemical response to endocrine-active chemicals: Model development for metyrapone, *Environ. Health Perspect.*, 118: 265-272.
- (10) Higley, E.B., Newsted, J.L., Zhang, X., Giesy, J.P. and Hecker, M. (2010), Assessment of chemical effects on aromatase activity using the H295R cell line, *Environ. Sci. Poll. Res.*, 17:1137-1148.
- (11) Gazdar, A. F., Oie, H. K., Shackleton, C. H., Chen, T. R., Triche, T. J., Myers, C. E., Chrousos, G. P., Brennan, M. F., Stein, C. A. and La Rocca, R. V. (1990), Establishment and characterization of a human adrenocortical carcinoma cell line that expresses Multiple pathways of steroid biosynthesis, *Cancer Res.*, 50, 5488-5496.
- (12) He, Y.H., Wiseman, S.B., Zhang, X.W., Hecker, M., Jones, P.D., El-Din, M.G., Martin, J.W. and Giesy, J.P. (2010), Ozonation attenuates the steroidogenic disruptive effects of sediment free oil sands process water in the H295R cell line, *Chemosphere*, 80:578-584.
- (13) Zhang, X.W., Yu, R.M.K., Jones, P.D., Lam, G.K.W., Newsted, J.L., Gracia, T., Hecker, M., Hilscherova, K., Sanderson, J.T., Wu, R.S.S. and Giesy, J.P. (2005), Quantitative RT-PCR methods for evaluating toxicant-induced effects on steroidogenesis using the H295R cell line, *Environ. Sci. Technol.*, 39:2777-2785.
- (14) Higley, E.B., Newsted, J.L., Zhang, X., Giesy, J.P. and Hecker, M. (2010), Differential assessment of chemical effects on aromatase activity, and E2 and T production using the H295R cell line, *Environ. Sci. Pol. Res.*, 17:1137-1148.
- (15) Rainey, W. E., Bird, I. M., Sawetawan, C., Hanley, N. A., McCarthy, J. L., Mcgee, E. A., Wester, R. and Mason, J. I. (1993), Regulation of human adrenal carcinoma cell (NCI-H295) production of C19 steroids, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 77, 731-737.
- (16) Chapter B.55 of this Annex: Hershberger Bioassay in Rats: A short-term Screening Assay for (Anti)Androgenic Properties.
- (17) Shapiro, R., and Page, L.B. (1976), Interference by 2,3-dimercapto-1-propanol (BAL) in angiotensin I radioimmunoassay, *J. Lab. Clin. Med.*, 2, 222-231.
- (18) Mosmann, T. (1983), Rapid colorimetric assay for growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, *J. Immunol. Methods.*, 65, 55-63.

-
- (19) Brock, B.J., Waterman, M.R. (1999). Biochemical differences between rat and human cytochrome P450c17 support the different steroidogenic needs of these two species, *Biochemistry*. 38:1598-1606.
- (20) Oskarsson, A., Ulleras, E., Plant, K., Hinson, J. Goldfarb, P.S., (2006), Steroidogenic gene expression in H295R cells and the human adrenal gland: adrenotoxic effects of lindane in vitro, *J. Appl. Toxicol.*, 26:484-492.
-

Függelék

FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

Konfluencia: az a lefedettség vagy proliferáció, amelyet a sejtek a táptalaj felületén vagy a táptalajban érnek.

Vegyí anyag: anyag vagy keverék.

Relatív szórás: a statisztikai eloszlás szórásának és számtani középértékének hányadosa.

CYP: a citokróm P450 monooxigenázok, egy géncsalád és a belőlük előállított enzimek, amelyek a legkülönbözőbb biokémiai reakciók katalizálásában vesznek részt, köztük a szteroidhormonok szintézisében és anyagcseréjében is.

DPM: percnkénti bomlásszám. Azon atomok száma adott mennyiségű radioaktív anyagban, amelyek az észlelés szerint egy perc alatt lebomlanak.

E2: a 17 β -ösztadiol, a legfontosabb ösztrogén az emlősök szervezetében.

H295R sejtek: humán adenocarcinoma-sejtek, amelyek a zónásan differenciálatlan humán magzati mellékvesesejtek fiziológiai jellemzőivel rendelkeznek, és amelyek a szteroidogenezis-út vonal összes enzimét kifejezik. Az ATCC-től szerezhetők be.

Fagyasztó táptalaj: a sejtek lefagyasztására és a fagyasztott sejtek tárolására használt táptalaj. Alapmédiumból, valamint BD NuSerum-ból és dimetil-szulfoxidból áll.

Lineáris tartomány: az a tartomány egy hormonmérési rendszer standard görbéjén, amelyen belül az eredmények a mintában jelen lévő analit koncentrációjával arányosak.

LOQ: a meghatározási határ, vagyis az a legkisebb vegyi anyag-mennyiség, amely egy megadott konfidenciahatáron belül megkülönböztethető az adott vegyi anyag hiányától (üres érték). Ha a szöveg másként nem jelzi, e módszer alkalmazásában az LOQ-t jellemzően a vizsgálati rendszer gyártója határozza meg.

LOEC: a megfigyelhető hatást okozó legalacsonyabb koncentráció, vagyis az a legkisebb koncentráció, amelynél a vizsgálat által adott válasz statisztikailag eltér az oldószerkontrollétól.

NOEC: a megfigyelhető hatást nem okozó koncentráció, vagyis az a legnagyobb vizsgált koncentráció, amelynél a vizsgálat még nem ad pozitív választ.

Passázás: az a szám, ahányszor a sejteket felosztottuk a sejt kultúrájának a fagyasztott állományból való elindítása után. A fagyasztott állományból indított első passázshoz az egyes szám van hozzárendelve (1). Az egy alkalommal már felosztott sejtek alkotják a 2. passázst, stb.

PBS: a Dulbecco-féle, foszfáttal puffertolt sóoldat.

Minőség-ellenőrzés: rövidítve QC, az érvényes adatok biztosításához szükséges intézkedések összessége.

Minőség-ellenőrzési lemez: olyan 24 lyukú lemez, amely két-két koncentrációt tartalmaz pozitív és negatív kontrollból, és az új sejttelek viselkedésének ellenőrzésére, illetve a vegyi anyagok vizsgálatához szükséges pozitív kontroll biztosítására szolgál.

Futtatás: új oldatokkal és kontrollokkal elvégzett független vizsgálat.

Alapközeg: az egyéb reagensek elkészítésének alapja. A Dulbecco-féle módosított Eagle-táptalaj és a Ham-féle F-12 tápanyagkeverék 1:1 arányú keveréke (DMEM/F12) 15 mM HEPES-pufferben, fenolvörös és nátrium-hidrogén-karbonát nélkül. Pufferként nátrium-hidrogén-karbonáttal egészítik ki, lásd a validálási jelentés II. függelékét (4).

Kiegészített táptalaj: alapközegeből plusz BD Nu-Serum-ból és ITS+ premium mixből álló táptalaj, lásd a validálási jelentés II. függelékét (4).

Szteroidogenezis: a koleszterintől a különböző szteroidhormonok szintéziséhez vezető út. A szteroidszintézis számos intermediere, mint például a progeszteron és a tesztoszteron önmagukban is fontos hormonok, de egyúttal prekursorai is a szintézis folyamatában később keletkező hormonoknak.

T: tesztoszteron, a két legfontosabb androgén egyike az emlősök szervezetében.

Vizsgált vegyi anyag: e vizsgálati módszer alkalmazásával vizsgált anyag vagy keverék.

Vizsgálati lemez: az a lemez, amelyen a H295R-sejteket kitesszük a vizsgált anyag hatásának. A vizsgálati lemezek három-három példányt tartalmaznak az oldószeres kontrollból, valamint a vizsgált vegyi anyag hét koncentrációsintjéből.

Tripszin 1X: a tripszin, egy, a hasnyálmirigyben termelődő szerin-proteáz enzim híg oldata, amelyet arra használunk, hogy leválasszuk a sejteket a sejtenyésző lemezről, lásd a validálási jelentés III. függelékét (4).

B.58. TRANSZGENIKUS RÁGCSÁLÓ SZOMATIKUS ÉS CSÍRASEJT GÉN MUTÁCIÓS VIZSGÁLATOK**BEVEZETÉS**

1. Ez a vizsgálati módszer egyenértékű az OECD 488. vizsgálati iránymutatásában (2013) leírt módszerrel. Az *in vitro* mutációs vizsgálatok széles köréhez állnak rendelkezésre európai uniós vizsgálati módszerek, amelyek ki tudják mutatni a kromoszóma- és/vagy génmutációkat. Léteznek vizsgálati módszerek az *in vivo* végpontokhoz is (pl. kromoszóma-rendellenességek és nem tervezett DNS-szintézis), ezek azonban nem mérik a génmutációt. A transzgenikus rágcsáló (TGR) mutációs tesztek kielégítik a gyakorlatias és széles körben elérhető *in vivo* génmutációs tesztek iránti igényt.
2. A TGR mutációs tesztek alaposan felülvizsgáltak (24) (33). Ezek a tesztek transzgenikus patkányokat és egereket használnak, amelyek a kromoszómába integrált plazmid vagy a fág shuttle vektorok több példányát is tartalmaznak. A transzgének riporter géneket tartalmaznak a vizsgált vegyi anyagok által *in vivo* indukált különböző típusú mutációk kimutatása céljából.
3. A rágcsálóban előforduló mutációkat úgy értékeljük, hogy a transzgént kinyerjük és a riporter gén fenotípusát egy olyan bakteriális gazdasejtben elemezzük, amelyből hiányzik ez a riporter gén. A TGR génmutációs vizsgálatok a rágcsálók szinte bármely szövetéből visszanyert, genetikailag semleges génekben előidézett mutációkat mérni tudják. Ezek a vizsgálatok tehát megkerülik a legtöbb meglévő korlátot, amelyek az endogén gének *in vivo* génmutációs vizsgálataihoz kapcsolódnak (pl. a szövetek korlátozott alkalmassága az elemzésre, negatív/pozitív szelekció a mutációkkal szemben).
4. A bizonyítékok azt jelzik, hogy a transzgének hasonló módon reagálnak mutagénekre, mint az endogén gének, különösen a bázispár szubsztitúciók, a frameshift mutációk, és a kis deléciók és inszerciók kimutatása tekintetében (24).
5. A genotoxicitás vizsgálatával foglalkozó nemzetközi műhely (International Workshops on Genotoxicity Testing – IWGT) jóváhagyta a TGR génmutációs vizsgálatok felvételét a génmutációk *in vivo* kimutatására szolgáló vizsgálatok közé, és egy protokollt javasolt a végrehajtásukra (15) (29). Ez a vizsgálati módszer ezen az ajánlason alapul. A protokoll használatát támogató további elemzések találhatóak a szakirodalomban (16).
6. Várható, hogy a TGR génmutációs vizsgálatot a jövőben össze lehet majd kapcsolni egy ismételt dózisu toxicitási vizsgálat (e melléklet B.7. fejezete). Adatokra van azonban szükség annak igazolására, hogy a TGR génmutációs tesztek érzékenysége nem befolyásolja az ismételt dózisu toxikológiai vizsgálatban használt, az adagolási időszak vége és a mintavételi idő közötti rövidebb, egynapos időtartam, szemben a TGR génmutációs tesztekben használt 3 nappal. Az adatokra annak igazolása céljából is szükség van, hogy az ismételt dózisu vizsgálat teljesítményét nem érinti hátrányosan a transzgenikus rágcsálótörzs használata a hagyományos rágcsálótörzsek helyett. Amikor ezek az adatok rendelkezésre állnak, a módszert aktualizálni fogják.
7. A kulcsfontosságú fogalmak meghatározásai a függelékben találhatók.

KIINDULÁSI MEGFONTOLÁSOK

8. Azok a TGR génmutációs vizsgálatok, amelyek esetében elegendő adat áll rendelkezésre, hogy támogassák az alkalmazását ebben a vizsgálati módszerben, a következők: *lacZ*-bakteriofág egér (Muta™Mouse); *lacZ*-plazmid egér; *gpt*-delta (*gpt* és *Spi*⁻) egér és patkány; *lacI*-egér és -patkány (Big Blue®), standard körülmények között elvégezve. Ezen túlmenően a *cII* pozitív szelekciós vizsgálat használható a mutációk értékelésére a Big Blue® és Muta™Mouse modellekben. A mutagenézist a TGR modellekben általában mutációs gyakoriságként értékelik; szükség esetén azonban további információkat nyújthat a mutációk molekuláris elemzése (lásd a 24. bekezdést).
9. A rágcsáló *in vivo* génmutációs vizsgálatok különösen fontos szerepet játszanak a mutagén veszély becslésében, mivel az ezekben a vizsgálatokban adott válaszok az *in vivo* metabolizmustól, a farmakokinetikától, a DNS-javító folyamatoktól és a transzláció DNS-szintézistől függenek, bár ezek a különböző fajok, a különböző szövetek és a különböző típusú DNS-károsodások esetén eltérőek lehetnek. A génmutációk *in vivo* vizsgálata hasznos eszköz az *in vitro* rendszerben észlelt mutagén hatások további vizsgálata, valamint a más *in vivo* végpontokat használó vizsgálatok eredményeinek nyomonkövetése során (24). A génmutáció mellett, hogy ok-okozati összefüggésben áll a rákos megbetegedés indukciójával, fontos végpont a szomatikus szövetek mutációalapú, nem daganatos betegségeinek (12) (13), valamint a csírávonalon keresztül átadott betegségek előrejelzése szempontjából is.

10. Ha bizonyíték van arra, hogy a vizsgált vegyi anyag vagy egy fontos metabolitja nem éri el egyik célszövetet sem, akkor a TGR génmutációs vizsgálat nem alkalmazható.

A VIZSGÁLAT ELVE

11. A 8. bekezdésben leírt vizsgálatokban a megcélzott gén bakteriális vagy bakteriofág-eredetű, ezért a rácsáló genomiális DNS-éből való visszanyerés eszköze a transzgén beépítése egy λ -bakteriofágba vagy egy plazmid shuttle vektorba. Az eljárás magában foglalja a genomiális DNS-nek a rácsáló célszövetéből való extrakcióját, a genomiális DNS *in vitro* feldolgozását (azaz a λ -vektorok becsomagolását, vagy a plazmidok ligációját és elektroporációját a shuttle vektor helyreállítására), valamint a mutációk azt követő kimutatását a bakteriális gazdaszervezetben, megfelelő körülmények között. A vizsgálatokhoz semleges transzgéneket használunk, amelyek a legtöbb szövetből könnyen kinyerhetők.
12. Az alap TGR génmutációs kísérlet során a rácsálót meghatározott ideig kezeljük a vegyi anyaggal. A vegyi anyagot bármilyen megfelelő útvonalon beadhatjuk, beleértve a beültetést is (pl. orvosi eszközök vizsgálata). Azt a teljes időtartamot, ameddig az állatnak a vegyi anyagot adagoljuk, adagolási időszakként nevezzük. Az adagolást általában egy olyan időszak követi az állat elpusztítása előtt, amelynek során a vegyi anyagot nem adagoljuk és amelynek során a kijavíthatlan DNS-léziók stabil mutációként rögzülnek. A szakirodalomban ezt az időszakot többféleképpen is nevezik: manifesztációs idő, fixációs idő vagy expressziós idő; az időszak vége a mintavétel időpontja (15) (29). Az állat elpusztítását követően genomiális DNS-t izolálunk a célszövet(ek)ből és megtisztítjuk.
13. Adott állat egyféle szövetének több csomagolásból/ligálásból származó adatait általában aggregáljuk, és a mutációs gyakoriságot általában összesen 10^5 - 10^7 plakk-képző vagy kolóniaképző egység használatával értékeljük. Pozitív szelekciós módszer alkalmazása esetén az összes plakk-képző egységet meghatározzuk egy külön nem szelektív lemezkészlettel.
14. A pozitív szelekciós módszereket azért fejlesztették ki, hogy megkönnyítsék a mutációk kimutatását mind a *gpt*-génben [*gpt*-delta egér és patkány, *gpt*⁻ fenotípus (20) (22) (28)], mind a *lacZ*-génben [MutaTMMouse vagy *lacZ*-plazmid egér (3) (10) (11) (30)]; eközben a *lacI*-gén mutációit Big Blue® állatokban egy nem szelektív módszerrel mutatják ki, amely színes (kék) plakkok képződésén keresztül azonosítja a mutációkat. Pozitív szelekciós módszer is rendelkezésre áll a λ -bakteriofág shuttle vektor *cII*-génjében fellépő pontmutációk [Big Blue® egér vagy patkány és MutaTMMouse (17)] és a *λ-red* és *-gam* génekben fellépő deléziós mutációk észlelésére [Spi⁻ szelekció *gpt*-delta egérben és patkányban (21) (22) (28)]. A mutációs gyakoriságot úgy számítjuk ki, hogy a transzgénben mutációkat tartalmazó plakkok/plazmidok számát elosztjuk az azonos DNS-mintából kinyert összes plakk/plazmid számával. A TGR génmutációs vizsgálatokban a mutációs gyakoriság a jegyzőkönyvezett paraméter. Ezen túlmenően, a mutációs gyakoriságot a független mutációkat hordozó sejtek hányadaként is meg lehet határozni; ehhez a számításához szükség van a klonális expanzióval való korrekcióra, amelyet a kinyert mutációk szekvenálásával végeznek el (24).
15. A *lacI*, *lacZ*, *cII* és a *gpt* pontmutációs tesztekben kimutatott mutációk főként bázispár szubsztitúciós mutációk, frameshift mutációk és kis inszerciók/deléciók. Az ilyen típusú mutációk relatív aránya a spontán mutációk között hasonló ahhoz, mint amit az endogén *Hprt*-génben megfigyeltek. A nagy deléciókat csak a Spi⁻ szelekcióval és a *lacZ* plazmid vizsgálatokkal lehet kimutatni (24). Az érdeklődésre számot tartó mutációk az egérben vagy patkányban *in vivo* előforduló mutációk. Az *in vitro* és *ex vivo* mutációk, amelyek a fág/plazmid kinyerés, replikáció vagy javítás során fordulhatnak elő, viszonylag ritkák, és egyes rendszerekben konkrétan beazonosíthatók vagy a bakteriális gazda/positív szelekciós rendszerrel kizárhatók.

A MÓDSZER ISMERTETÉSE

Előkészületek

Az állatfaj kiválasztása

16. Jelenleg már többféle transzgenikus egéren végzett génmutáció-detektálási modell is létezik, és ezeket a rendszereket szélesebb körben használják, mint a transzgenikus patkányos modelleket. Ha a patkány egyértelműen alkalmasabb modell, mint az egér (például amikor olyan daganat karcinogenezisének mechanizmusát vizsgáljuk, amely csak patkányokban fordul elő, amikor patkányon végzett toxicitási vizsgálattal való összehasonlításra van szükség, vagy ha a patkány anyagcseréjéről ismert, hogy jobban reprezentálja az emberi anyagcserét), meg kell fontolni a transzgenikus patkányos modellek használatát.

Tartási és etetési körülmények

17. A kísérleti állatokat ideálisan 22 °C ($\pm$ 3 °C) hőmérsékletű helyiségben kell tartani. Bár a helyiség relatív páratartalmának legalább 30 %-nak kell lennie, illetve a takarítás időtartamától eltekintve lehetőleg nem haladhatja meg a 70 %-ot, célértékként az 50–60 % relatív páratartalom fenntartására kell törekedni. A világítás legyen mesterséges, naponta 12 órás világos időszakkal, amelyet 12 órás sötét periódusok kövessenek. Az etetéshez hagyományos laboratóriumi takarmány alkalmazható, korlátlan mennyiségű ivóvíz biztosítása mellett. A takarmány megválasztását a vizsgált vegyi anyaggal való megfelelő keveredés igénye is befolyásolhatja, ha a vizsgált vegyi anyagot ezen az úton adjuk be. Az állatokat azonos nemű állatokból álló kis csoportokban (legfeljebb öt állat) kell elhelyezni, amennyiben nem várható agresszív viselkedés. Ha tudományos szempontból indokolt, az állatok egyedileg is elhelyezhetők.

Az állatok előkészítése

18. Az egészséges, fiatal, ivarérett felnőtt (a kezelés kezdetén 8–12 hetes) állatokat véletlenszerűen soroljuk be a kontroll- és a kezelési csoportokba. Az állatokat egyenként azonosítani kell. Az állatokat legalább öt napig szoktatni kell a laboratóriumi körülményekhez. A ketrecek úgy kell elrendezni, hogy a lehető legkisebb legyen a ketrec elhelyezésének lehetséges hatása. A vizsgálat kezdetén az állatok testtömege lehetőleg csak minimálisan térjen el egymástól, és a nemenkénti átlagos értéktől maximum $\pm$ 20 %-kal különbözhet.

A dózisok előkészítése

19. Az állatoknak történő adagolás előtt a szilárd halmazállapotú vizsgált vegyi anyagokat fel kell oldani vagy szuszpendálni kell megfelelő oldószerekben vagy vivőanyagokban, vagy bele kell keverni a takarmányba vagy az ivóvízbe. A folyékony vizsgált vegyi anyagok közvetlenül vagy az adagolás előtt hígított formában alkalmazhatók. Belélegzéses expozíció esetén a vizsgált vegyi anyagok fizikai-kémiai tulajdonságaiktól függően gáz, gőz vagy szilárd/folyadék aeroszol formában adagolható. A vizsgált vegyi anyagból mindig friss készítményeket kell alkalmazni, kivéve akkor, ha az anyag tárolás során való stabilitása bizonyított.

Vizsgálati körülmények*Oldószer/Vivőanyag*

20. Az oldószer/vivőanyag nem okozhat toxikus hatásokat a választott dózisok mellett, és nem alkalmazható olyan anyag, amelyről feltehető, hogy kémiai reakcióba fog lépni a vizsgált vegyi anyaggal. Ha nem jól ismert oldószert/vivőanyagot alkalmazunk, akkor felhasználását alá kell támasztani a kompatibilitását bizonyító referenciadatokkal. Amennyiben lehetséges, először valamilyen vizes oldószer/vivőanyag használatát ajánlatos megfontolni.

Pozitív kontrollok

21. Általában szükséges párhuzamos pozitív kontrollállatokat használni. Azokban a laboratóriumokban azonban, amelyek igazolták a szakértelmüket (lásd a 23. bekezdést) és rendszeresen végzik ezeket a vizsgálatokat, a módszer sikerességének igazolására a korábban pozitív kontrollal kezelt állatokból származó DNS is felhasználható. Az ilyen korábbi kísérletekből származó DNS-eket ugyanabból a fajból és célszövetből kell venni, és megfelelően kell tárolni (lásd a 36. bekezdést). Párhuzamos pozitív kontrollok használatakor nem szükséges az állatokat ugyanazon az útvonalon kezelni, mint a vizsgált vegyi anyag esetében, azonban a pozitív kontrolloknak bizonyítottan mutációkat kell kiváltaniuk a vizsgált vegyi anyag egy vagy több célszövetében. A pozitív kontroll céljára felhasznált vegyi anyagok dózisait úgy kell megválasztani, hogy olyan, gyenge vagy mérsékelt hatást váltsanak ki, amely kritikus a vizsgálati eljárás működése és érzékenysége szempontjából. A pozitív kontroll céljára felhasználható vegyi anyagokra és a hozzájuk tartozó célszövetekre az 1. táblázat tartalmaz példákat.

1. táblázat

Példák a pozitív kontroll céljára felhasználható vegyi anyagokra és azok célszöveire

Pozitív kontroll vegyi anyag és CAS-száma	EINECS-név és EINECS-szám	Jellemzők	Mutációs célszövet	
			Patkány	Egér
N-etil-N-nitrózurea [CAS-szám: 759-73-9]	N-etil-N-nitrózurea [212-072-2]	Közvetlenül ható mutagén	Máj, tüdő	Csontvelő, vastagbél, vastagbél-epithelium, belek, máj, tüdő, lép, vese, petefészek granulosa sejtek, hím csírasejtek

Pozitív kontroll vegyi anyag és CAS-száma	EINECS-név és EINECS-szám	Jellemzők	Mutációs célszövet	
			Patkány	Egér
Etil-karbamát (uretán) [CAS-szám: 51-79-6]	Uretán [200-123-1]	Mutagén, metabolizmust igényel, de csak gyenge hatása van		Csontvelő, előgyomor, vékonybél, máj, tüdő, lép
2,4-diamino-toluén [CAS-szám: 95-80-7]	4-metil-m-fenilén-diamin [202-453-1]	Mutagén, metabolizmust igényel, pozitív az Spi ⁻ vizsgálatban is	Máj	Máj
Benzo[a]pirén [CAS-szám: 50-32-8]	Benzo[def]kriazén [200-028-5]	Mutagén, metabolizmust igényel	Máj, omenta	Csontvelő, emlő, vastagbél, előgyomor, mirigyes gyomor, szív, máj, tüdő, hím csírasejtek

Negatív kontrollok

22. Minden mintavételi időpontban negatív kontrollokat is kell használni, amelyeket csak oldószerezrel és vivőanyaggal kezeltünk, és a kezelésük egyébiránt ugyanolyan módon történik, mint a kezelési csoportoké. Ha nem állnak rendelkezésre olyan történeti vagy publikált kontrolladatok, amelyek igazolják, hogy a választott oldószerez/vivőanyag nem idéz elő ártalmas vagy mutagén hatásokat, a vivőanyag kontroll elfogadhatóságának megállapítása érdekében kezeletlen kontrollokat is alkalmazni kell minden mintavételi időpontban.

A laboratórium jártasságának igazolása

23. A szakértelmet ezekben a vizsgálatokban a publikált adatok alapján várható eredmények reprodukálására való képesség demonstrálásával kell megállapítani (24) a következő területeken: 1) mutációs gyakoriság pozitív kontroll vegyi anyagokkal (beleértve a gyenge válaszokat is), például az 1. táblázatban felsorolt anyagokkal, nem mutagénekkel, valamint vivőanyag kontrollokkal, és 2) transzgén kinyerése genomiális DNS-ből (pl. csomagolás hatékonysága).

A mutációk szekvenálása

24. Jogszabályi célú alkalmazás esetében a mutációk DNS-szekvenálása nem szükséges, különösen, ha a kapott eredmény egyértelműen pozitív vagy negatív. A szekvenálási adatok azonban hasznosak lehetnek, ha nagy interindividális variáció figyelhető meg. Ezekben az esetekben a szekvenálást arra lehet használni, hogy kizárja a jackpot vagy klonális eseményeket az egyedi mutációk arányának egy adott szövetben való azonosításával. Állatonként és szövetenként körülbelül 10 mutáció szekvenálásának elegendőnek kell lennie annak egyszerű megállapításához, hogy a klonális mutációk hozzájárultak-e a mutációs gyakorisághoz; akár 25 mutáció szekvenálására lehet viszont szükséges a mutációs gyakoriság klonalitással való matematikai korrekciójához. A mutációk szekvenálása akkor is megfontolandó, amikor a mutációs gyakoriság kismértékű növekedését (azaz éppen csak meghaladja a kezeletlen kontroll értékeket) figyelik meg. A mutációs spektrumnak a kezelt és a kezeletlen állatokból származó mutáns telepek közötti különbségei alátámasztják a mutagén hatást (29). A mutációs spektrumok hasznosak lehetnek a mechanisztikus hipotézisek kifejlesztése során is. Ha a szekvenálást bele kell foglalni a vizsgálati protokollba, nagy figyelmet kell fordítani az ilyen vizsgálatok elrendezésére, különös tekintettel a mintánként szekvenált mutációk számára, hogy elérjük az alkalmazott statisztikai modell szerinti megfelelő erőt (lásd a 43. bekezdést).

ELJÁRÁS

Az állatok száma és neme

25. Az állatok csoportonkénti számát úgy kell előre meghatározni, hogy elegendően nagy legyen ahhoz, hogy biztosítsa legalább a megduplázódott mutációs gyakoriság kimutatásához szükséges statisztikai erőt. A csoportméret legalább öt állat, de ha a statisztikai erő nem elegendő, az állatok számát szükség szerint növelni kell. Alapesetben hím állatokat kell használni. Előfordulhatnak olyan esetek, amikor indokolt lenne csak nőstényeket tesztelni, például ha nőkben alkalmazandó humán gyógyszereket tesztelnek, vagy amikor a nőkre jellemző metabolizmust vizsgálják. Ha jelentős különbségek vannak a nemek között toxicitás vagy anyagcsere szempontjából, akkor hímekekre és nőstényekre is szükség lesz.

Adagolási időszak

26. Megfigyelések szerint a mutációk a kezelések során egyre inkább felhalmozódnak, ezért ismételt dózisú kezelésre van szükség naponkénti kezeléssel 28 napon keresztül. Ez általában elfogadhatónak tekinthető a gyenge mutagének által előidézett mutációk elegendő felhalmozódásához, illetve megfelelő expozíciós időt biztosít a mutációknak a lassan osztódó szervezetben való kimutatásához. Egyes értékelésekhez alternatív kezelési sémák is megfelelőek lehetnek, de ezeket az alternatív adagolási sémákat tudományosan meg kell indokolni a protokollban. A kezelések nem lehetnek rövidebbek, mint az összes releváns metabolizáló enzim teljes indukciójához szükséges idő, és a rövidebb kezelések több, a különböző proliferációs sebességű szervezetnek megfelelő mintavételi időpontot tehetnek szükségessé. Valamennyi rendelkezésre álló információt (pl. általános toxicitás, metabolizmus és farmakokinetika) fel kell használni a protokoll igazolása során, különösen, ha a protokoll eltér a fenti szabványajánlásoktól. Bár a 8 hétnél hosszabb kezelési idők növelhetik a vizsgálat érzékenységét, ezeket világosan meg kell magyarázni és indokolni, mivel a hosszú kezelési idők a mutációs gyakoriság látszólagos növekedését okozhatják a klonális expanciónak köszönhetően (29).

Dózisszintek

27. A dózisszinteket az általános toxicitást mérő dózisbehatároló vizsgálat eredményeire kell alapozni, amelyet azonos expozíciós módon végeztünk el, vagy pedig a korábbi szubakut toxicitási vizsgálatok eredményeire. A dózistartományok meghatározásához ugyanazon rágcslátörzsből származó nem transzgenikus állatokat lehet használni. A fő vizsgálat során annak érdekében, hogy dózis-válasz adatokat lehessen gyűjteni, a teljes vizsgálatnak egy negatív kontrollcsoportot is tartalmaznia kell (lásd a 22. bekezdést), valamint legalább három, egymástól megfelelő távolságra elhelyezkedő dózisszintet, kivéve, ha a határdózist használjuk (lásd a 28. bekezdést). A felső dózis a maximális tolerálható dózis (MTD) legyen. Az MTD az a dózis, amely olyan egyértelmű toxicitásjeleket vált ki, hogy annál magasabb adagok, azonos adagolás mellett, várhatóan halált okoznak. A kis nem mérgező dózisban specifikus biológiai aktivitást mutató vegyi anyagok (mint például a hormonok és a mitogének), valamint azok a vegyi anyagok, amelyek a toxikokinetikai tulajdonságok telítődését mutatják, kivételek lehetnek a dózismeghatározási követelmények alól, és eseti alapon kell őket értékelni. Az alkalmazott dózisoknak át kell fogniuk a maximálistól a már csak kissé vagy egyáltalán nem toxikusig terjedő tartományt.

Határdózis-vizsgálat

28. Ha a dózisbehatárolási kísérletek vagy a rokon rágcslátörzsekből származó adatok azt jelzik, hogy a legalább a határdózist tartalmazó kezelési séma (lásd lentebb) semmilyen megfigyelhető toxikus hatást nem hoz létre, és ha nem várható genotoxicitás a szerkezetileg rokon anyagokkal kapcsolatos adatok alapján, akkor nem szükséges a három dózis használatával végrehajtott teljes vizsgálat. 28 napos adagolási időszak (azaz 28 db napi kezelés) esetén a határdózis 1 000 mg/testtömeg kg/nap. 14 napos vagy annál rövidebb adagolási időszak esetén a határdózis 2 000 mg/testtömeg kg/nap (a 28 napi kezeléstől eltérő adagolási rendeket tudományosan meg kell indokolni a protokollban, lásd a 26. bekezdést).

A dózisok beadása

29. A vizsgált vegyi anyagot rendszerint gyomorszondán keresztül inkubációs kanül segítségével, vagy hasüregbe adott injekció segítségével adjuk be. A vizsgálat tervezése során általánosságban az emberi expozíció várható útvonalát figyelembe kell venni. Ezért az egyéb expozíciós útvonalak (például ivóvíz, szubkután, intravénás, külsőleg, inhalációs, intratracheális, étrendi vagy implantációs) is elfogadhatók lehetnek, amennyiben azokat meg lehet indokolni. Az intraperitoneális injekció nem ajánlott, mivel az nem egy fiziológiailag releváns emberi expozíciós útvonal. A gyomorszondán keresztül vagy injekcióval egyszerre beadható maximális folyadékmennyiség a kísérleti állat méretétől függ. A térfogat nem haladhatja meg a 2 ml/100 g testtömeg mennyiséget. Az ennél nagyobb mennyiségek használatát meg kell indokolni. A magasabb koncentrációban rendszerint fokozottabb hatást kiváltó irritáló vagy maró vegyi anyagok kivételével a koncentráció megfelelő beállításával a minimálisra kell csökkenteni a vizsgált anyag mennyiségének változásait, hogy a mennyiség valamennyi adagolási szinten konstans legyen.

Mintavételi időpontok

Szomatikus sejtek

30. A mintavételi idő egy kritikus változó, mivel a mutációk rögzüléséhez szükséges időtartam határozza meg. Ez az időtartam szövetspecifikus, és úgy tűnik, hogy kapcsolatban áll a sejtpopuláció kicserélődési idejével, amelynek szempontjából a csontvelő és a belek gyors reagálását, a máj viszont sokkal lassabb reagálását kell számítani. A

mutációs gyakoriságnak mind a gyorsan, mind a lassan osztódó szövetekben való mérésére megfelelő kompromisszum a 28 egymást követő napon történő kezelés (a 26. bekezdésben jelzettek szerint), valamint az utolsó kezelés után három nappal történő mintavétel, bár a maximális mutációs gyakoriság a lassan osztódó szövetekben ilyen körülmények között esetleg nem manifesztálódik. Amennyiben a lassan osztódó szövetek különösen fontosak, a 28 napos adagolási időtartam után 28 nappal történő későbbi mintavétel megfelelőbb lehet (16) (29). Ebben az esetben a későbbi mintavételi időpont felváltja a 3 napos mintavételi időpontot, amit tudományosan is meg kell indokolni.

Csírasejtek

31. A TGR-vizsgálatok alkalmasak a génmutáció indukciójának tanulmányozására hím csírasejtekben (7) (8) (27), amelyekben a spermatogenezis időzítését és kinetikáját már pontosan meghatározták (27). Az elemzés céljára még szuperovuláció után is alacsony számban rendelkezésre álló petesejtek, valamint az a tény, hogy a petesejtekben nincs DNS-szintézis, kizárják a mutáció transzgenikus vizsgálattal való meghatározását a női csírasejtekben (31).
32. A hím csírasejtek mintavételi időpontjait úgy kell megválasztani, hogy a kitett sejttípusok széles tartományából lehessen mintát venni a csírasejt-fejlődés teljes folyamatában, illetve úgy, hogy a mintavételben megcélzott szakasz kellő expozícióban részesüljön. A fejlődő csírasejteknek a spermatogoniális őssejtből az érett, az ondóvezeték/mellékhere farkát elérő spermiummá való progressziójához szükséges időtartam ~49 nap egérben (36) és ~70 nap patkányban (34) (35). Az ondóvezeték/mellékhere farkából a 28 napos expozíció és a rákövetkező háromnapos mintavételi időszak szerint gyűjtött felhalmozódott sperma (7) (8) fogja képviselni a spermatogenesis nagyjából második felében kitett sejtpopulációt, amely magában foglalja a meiotikus és posztmeiotikus időszakot is, de nem tartalmazza a spermatogoniális vagy őssejt időszakot. Annak érdekében, hogy megfelelően tudjunk mintát venni az ondóvezeték/mellékhere farkából azokból a sejtekből, amelyek az expozíciós idő alatt még spermatogoniális őssejtek voltak, egy további mintavételi időpontra is szükség van legalább 7 héttel (egér) vagy 10 héttel (patkány) a kezelés befejezését követően.
33. A herecsatornácskákból a 28 + 3 napos kezelési és mintavételi menetrend szerint kinyert sejtek egy kevert populációt tartalmaznak, amelyben a csírasejtek fejlődésének minden szakasza képviselve van (7) (8). Ezeknek a sejteknek a génmutáció kimutatása céljából történő mintavétele nem ad olyan pontos értékelést azokról a szakaszokról, amelyekben a csírasejt-mutációkat előidézték, mint a spermiumoknak az ondóvezeték/mellékhere farkából való mintavétele (hiszen a tubulusokból vett mintában többféle csírasejt-típus fordul elő, és lesz néhány szomatikus sejt is, amely szennyezi a sejtpopulációt). Ha azonban a herecsatornácskákból való sejtmintavételt az ondóvezeték/mellékhere farkából származó ondósejtekkel kombinálják, és a mintavételre a 28 + 3 napos mintavételi rend szerint kerül sor, az bizonyos szinten lefedi a csírasejt-fejlődés fázisainak többségében kitett sejteket, és hasznos lehet néhány csírasejt-mutagén kimutatására.

Megfigyelések

34. Naponta legalább egyszer, lehetőleg minden nap ugyanazon időpont(ok)ban általános klinikai megfigyelést kell végezni, figyelembe véve az adagolást követően várható hatások érvényesülésének csúcsidezőszakát. Fel kell jegyezni a kísérleti állatok klinikai állapotát. Naponta legalább kétszer meg kell vizsgálni az összes állatot megbetegedés és elhullás szempontjából. Minden állat tömegét hetente legalább egyszer, illetve elpusztításkor is le kell mérni. A felvett táplálék mennyiségét heti rendszerességgel le kell mérni. Amennyiben a vizsgált vegyi anyagot az ivóvízzel adjuk be, a vízfogyasztást minden vízcsera alkalmával és legalább hetente le kell mérni. A túlzott toxicitás nem halálos jeleit mutató állatokat a vizsgálati időszak befejezése előtt el kell altatni (23).

A szövetek gyűjtése

35. A szövetek gyűjtését világosan meg kell indokolni. Mivel a mutációk indukcióját gyakorlatilag bármilyen szövetben tanulmányozni lehet, a begyűjtendő szövetek kiválasztását a vizsgálat lefolytatásának okára, illetve a vizsgálat alatt álló vegyi anyaggal kapcsolatban rendelkezésre álló mutagenitási, karcinogenitási vagy toxicitási adatokra kell alapozni. A megfontolandó lényeges tényezők közé kell tartoznia a beadás útjának (a valószínű emberi expozíciós útvonal(ak)ra alapozva), a becsült szöveti megoszlásnak, valamint a lehetséges hatásmechanizmusnak. A háttérinformációk hiányában többféle érdekesnek tűnő szomatikus szövetet is kell gyűjteni. Ezeknek gyorsan osztódó, lassan osztódó és az érintkezés helyén található szöveteket is képviselniük kell. Ezenkívül az ondóvezeték/mellékhere farkából származó ondósejteket és a herecsatornácskákból származó fejlődő csírasejteket (a 32. és 33. bekezdésben leírtak szerint) is össze kell gyűjteni és el kell tárolni arra az esetre, ha a jövőben a csírasejt-mutagenitás elemzésére lenne szükség. A szervek tömegét meg kell mérni, és a nagyobb szervek esetében ugyanazokat a területeket kell begyűjteni az összes állatból.

A szövetek és a DNS tárolása

36. A szöveteket (vagy szövethomogenizátumokat) – 70 °C-on vagy az alatt kell tárolni és 5 éven belül fel kell használni DNS-izolálásra. A hűtőszekrényben 4 °C-on, megfelelő pufferben tárolt izolált DNS-t optimálisan 1 éven belül kell felhasználni mutációanalízisre.

A szövetek kiválasztása mutációanalízisre

37. A szövetek kiválasztásának megfelelő megfontolásokon kell alapulnia, például: 1) a beadási útvonal vagy az első érintkezés helye (pl. mirigyes gyomor, ha az adagolás orális, tüdő, ha az adagolás inhalációs, vagy bőr, ha helyi alkalmazás történt), és 2) az általános toxicitási vizsgálatokban megfigyelt farmakokinetikai paraméterek, amelyek szöveti hajlamot, visszatartást vagy felhalmozódást jeleznek, vagy megmutatják a toxicitás célszerveit. Ha a vizsgálatokat a karcinogenitási vizsgálatok nyomkövetése céljából végezzük el, a karcinogenitás célszöveteit figyelembe kell venni. A szövetek elemzésre való kiválasztásának maximalizálnia kell azoknak a vegyi anyagoknak a kimutatását, amelyek közvetlenül ható *in vitro* mutagének, gyorsan metabolizálódnak, nagyon reaktívak vagy rosszul szívódnak fel, vagy azokét a vegyi anyagokét, amelyek esetében a beadás módja határozza meg a célszövetet (6).
38. Háttérinformációk hiányában és figyelembe véve az érintkezés helyét a beadás módja alapján, a májat és legalább egy gyorsan osztódó szövetet (pl. mirigyes gyomor, csontvelő) kell értékelni mutagenitás szempontjából. A legtöbb esetben a fenti követelményeket már két gondosan kiválasztott szövet elemzésével teljesíteni lehet, de bizonyos esetekben három vagy több szövetre lehet szükség. Ha jelentősebb ok van arra, hogy csírasejtekre gyakorolt hatásokat feltételezzünk, beleértve a szomatikus sejtek pozitív válaszait is, a csírasejt-szövetek mutációit is vizsgálni kell.

Mérési módszerek

39. A mutációk kimutatására szabványos laboratóriumi vagy publikált módszerek állnak rendelkezésre az ajánlott transzgenikus modellekhez: *lacZ*-lambda bakteriofág és plazmid (30); *lacI*-egér (2) (18); *gpt*-delta egér (22); *gpt*-delta patkány (28); *cII* (17). A módosításokat meg kell indokolni és megfelelően dokumentálni kell. Több csomagolás adatait összesíteni lehet és a plakkok vagy telepek megfelelő számának elérésére lehet használni. Ha azonban nagyszámú csomagolási reakcióra van szükség, hogy elérjük a plakkok megfelelő számát, az rossz minőségű DNS jele lehet. Ilyen esetekben az adatokat óvatosan kell kezelni, mert megbízhatatlanok lehetnek. Az DNS-mintánkénti plakkok vagy telepek optimális száma szempontjából a kellő számú mutáció adott spontán mutációs gyakoriság melletti felderítésének statisztikai valószínűsége az irányadó. Általában legalább 125 000–300 000 plakkra van szükség, ha a spontán mutációs gyakoriság nagyságrendje 3×10^{-5} (15). A Big Blue® *lacI*-vizsgálat esetében fontos annak igazolása, hogy a mutáns szín fenotípusok teljes körét ki lehet mutatni megfelelő színtestek ellenőrzésével az egyes vizsgálati lemezekkel párhuzamos alkalmazásával. A szöveteket és a kapott mintákat (elemeket) blokk elrendezés segítségével kell feldolgozni és elemezni, ahol a vívíőanyag/oldószer kontrollcsoport elemeit, a pozitív kontrollcsoportot (ha van) vagy a pozitív kontroll DNS-t (adott esetben), valamint minden egyes kezelési csoportot együtt dolgoznak fel.

ADATOK ÉS JEGYZŐKÖNYVEZÉS

Az eredmények feldolgozása

40. Az egyes állatok adatait táblázatban kell összefoglalni. A kísérleti egység maga az állat. A jegyzőkönyvnek tartalmaznia kell az összes plakk-képző egység (PFU) vagy telepképző egység (cfu) számát, a mutációk számát, valamint a mutációs gyakoriságot az összes állatból származó valamennyi szövet esetében. Ha több csomagolási/tartálék reakciót végeztek, a DNS-mintánkénti reakciók számát jegyzőkönyvezni kell. Noha minden egyes reakció adatait meg kell őrizni, csak a teljes pfu- vagy CFU-értéket szükséges jegyzőkönyvezni. A toxicitásra és a klinikai tünetekre vonatkozó adatokat a 34. bekezdés alapján jegyzőkönyvezni kell. A mutációk szekvenálásának eredményeit, valamint az ebből eredő, az egyes állatokra és szövetekre vonatkozó mutációs gyakorisági számításokat be kell mutatni.

Statisztikai értékelés és az eredmények értelmezése

41. Különböző kritériumok léteznek a pozitív eredmény meghatározására, ilyen például a mutációs gyakoriság növekedése a dózis függvényében vagy a mutációs gyakoriság egyértelmű növekedése egy meghatározott dóziscsoportban az oldószer/vívíőanyag kontrollcsoportéhoz viszonyítva. Legalább három kezelt dóziscsoportot kell megvizsgálni annak érdekében, hogy elegendő adat álljon rendelkezésre a dózis-válasz elemzéshez. Bár az eredmények biológiai jelentőségének kell az elsődleges szempontnak lennie, megfelelő statisztikai módszereket is lehet alkalmazni a vizsgálati eredmények értékelése során (4) (14) (15) (25) (26). Az alkalmazott statisztikai teszteknek az állatot kell kísérleti egységnek tekinteniük.

42. E vizsgálatban nem mutagén anyagnak tekintendő az a vizsgált vegyi anyag, amely esetében a hozzá tartozó eredmények egyetlen szövetben sem elégitik ki a fenti kritériumokat. A negatív eredmény biológiai jelentőségéhez a szövet expozícióját igazolni kell.
43. A DNS-szekvenálási elemzések esetében számos statisztikai megközelítés áll rendelkezésre az eredmények értelmezéséhez (1) (5) (9) (19).
44. A válaszreakció biológiai jelentőségének értékelésekor támpontot adhat annak mérlegelése, hogy a megfigyelt értékek a kontrollokkal kapott régebbi eredmények tartományába esnek-e (32).

Vizsgálati jegyzőkönyv

45. A vizsgálati jegyzőkönyvnek a következőket kell tartalmaznia:

Vizsgált vegyi anyag:

- azonosítási adatok és CAS-szám, ha ismert,
- forrás és rendelkezésre állás esetén a tételezés,
- fizikai jelleg és tisztaság,
- a vizsgálat elvégzése szempontjából releváns fizikai-kémiai tulajdonságok,
- a vizsgált vegyi anyag stabilitása, ha ismert.

Oldószer/vivőanyag:

- a vivőanyag kiválasztásának indoklása,
- a vizsgált vegyi anyag oldhatósága és stabilitása az oldószerben/vivőanyagban, ha ismert,
- a takarmány-, ivóvíz- vagy inhalációs készítmények előkészítése,
- a készítmények analitikai vizsgálatai (pl. stabilitás, homogenitás, névleges koncentráció).

Kísérleti állatok:

- a felhasznált faj/törzs és megválasztásuk indoklása,
- az állatok száma, kora és neme,
- az állatok származása, tartási körülmények, takarmány stb.,
- az állatok tömege a vizsgálat kezdetekor, az egyes csoportok esetében a testtömegtartományt, átlagértéket és a szórást is ideértve.

Vizsgálati körülmények:

- a pozitív és negatív (vivőanyag/oldószer) kontrollok adatai,
- a dózisbehatároló vizsgálat adatai,
- az adagolási szintek kiválasztásának indoklása,
- a vizsgált vegyi anyag előkészítésére vonatkozó részletek,
- a vizsgált vegyi anyag beadására vonatkozó adatok,
- a beadási mód indoklása,
- az állati toxicitás mérésére szolgáló módszerek, beleértve adott esetben a kórszövettani vagy hematológiai elemzéseket, illetve az állatok megfigyelésének és a testtömeg mérésének gyakorisága,
- az annak ellenőrzésére szolgáló módszerek, hogy a vizsgált vegyi anyag elérte-e a célszövetet vagy az általános keringési rendszert, ha negatív eredményt kaptak,
- tényleges dózis (mg/testtömeg kg/nap) a vizsgált vegyi anyagnak a takarmányban/ivóvízben meglévő koncentrációjából (ppm) és a fogyasztásból számítva, ha alkalmazható,
- a táplálék és a víz minőségére vonatkozó adatok,
- a kezelési és mintavételi menetrendek részletes leírása és kiválasztásuk indoklása,

- az eutanázia módja,
- a szövetek izolálására és tartósítására használt eljárások,
- a rácsáló genomiális DNS izolálásának módszerei, a transzgén genomiális DNS-ből történő kinyerése és a transzgenikus DNS-átvitel a bakteriális gazdaszervezetbe,
- valamennyi sejt, készlet és reagens beszerzési forrása és tételszáma (adott esetben).
- a mutációk számolására szolgáló módszerek,
- a mutációk molekuláris elemzésének módszerei és használatuk a klonalitás korrekciójára és/vagy a mutációs gyakoriság kiszámítására, ha van ilyen.

Eredmények:

- az állatok állapota a vizsgálati időszak előtt és alatt, beleértve a toxicitás jeleit,
- a test és a szervek tömege az elaltatáskor,
- az egyes szövetek/állatok esetében a mutációk száma, az értékelt plakkok vagy telepek száma, a mutációs gyakoriság,
- az egyes szövetek/állatcsoportok esetében a csomagolási reakciók DNS-mintánkénti száma, a mutációk száma összesen, az átlagos mutációs gyakoriság, szórás,
- a dózis-válasz kapcsolat, ahol lehetséges,
- az egyes szövetek/állatok esetében a független mutációk száma és az átlagos mutációs gyakoriság, ha a mutációk molekuláris elemzését elvégezték,
- párhuzamos és történeti negatív kontrolladatok tartományokkal, átlagértékekkel és szórásokkal,
- a párhuzamos pozitív kontrollok (vagy a nem párhuzamos DNS-pozitív kontroll) adatai,
- analitikai meghatározások, amennyiben rendelkezésre állnak (pl. a csomagolás során használt DNS-koncentráció, a DNS-szekvenálás adatai),
- statisztikai elemzések és alkalmazott módszerek.

Az eredmények tárgyalása

Következtetések

SZAKIRODALOM

- (1) Adams, W.T. and T.R. Skopek (1987), »Statistical Test for the Comparison of Samples from Mutational Spectra«, *J. Mol. Biol.*, 194: 391-396.
- (2) Bielas, J.H. (2002), »A more Efficient Big Blue® Protocol Improves Transgene Rescue and Accuracy in an Adduct and Mutation Measurement«, *Mutation Res.*, 518: 107-112.
- (3) Boerrigter, M.E., M.E. Dollé, H.-J. Martus, J.A. Gossen and J. Vijg (1995), »Plasmid-based Transgenic Mouse Model for Studying *in vivo* Mutations« *Nature*, 377(6550): 657-659
- (4) Carr, G.J. and N.J. Gorelick (1995), »Statistical Design and Analysis of Mutation Studies in Transgenic Mice«, *Environ. Mol. Mutagen*, 25(3): 246-255.
- (5) Carr, G.J. and N.J. Gorelick (1996), »Mutational Spectra in Transgenic Animal Research: Data Analysis and Study Design Based upon the Mutant or Mutation Frequency«, *Environ. Mol. Mutagen*, 28: 405-413.
- (6) Dean, S.W., T.M. Brooks, B. Burlinson, J. Mirsalis, B. Myhr, L. Recio and V. Thybaud (1999), »Transgenic Mouse Mutation Assay Systems can Play an important Role in Regulatory Mutagenicity Testing *in vivo* for the Detection of Site-of-contact Mutagens«, *Mutagenesis*, 14(1): 141-151.
- (7) Douglas, G.R., J. Jiao, J.D. Gingerich, J.A. Gossen and L.M. Soper(1995), »Temporal and Molecular Characteristics of Mutations Induced by Ethylnitrosourea in Germ Cells Isolated from Seminiferous Tubules and in Spermatozoa of *lacZ* Transgenic Mice«, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92: 7485-7489.

- (8) Douglas, G.R., J.D. Gingerich, L.M. Soper and J. Jiao (1997), »Toward an Understanding of the Use of Transgenic Mice for the Detection of Gene Mutations in Germ Cells«, *Mutation Res.*, 388(2-3): 197-212.
- (9) Dunson, D.B. and K.R. Tindall (2000), »Bayesian Analysis of Mutational Spectra«, *Genetics*, 156: 1411–1418.
- (10) Gossen, J.A., W.J. de Leeuw, C.H. Tan, E.C. Zwarthoff, F. Berends, P.H. Lohman, D.L. Knook and J. Vijg(1989), »Efficient Rescue of Integrated Shuttle Vectors from Transgenic Mice: a Model for Studying Mutations *in vivo*«, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86(20): 7971–7975.
- (11) Gossen, J.A. and J. Vijg (1993), »A Selective System for lacZ-Phage using a Galactose-sensitive *E. coli* Host«, *Biotechniques*, 14(3): 326, 330.
- (12) Erikson, R.P. (2003), »Somatic Gene Mutation and Human Disease other than Cancer«, *Mutation Res.*, 543: 125-136.
- (13) Erikson, R.P. (2010), »Somatic Gene Mutation and Human Disease other than Cancer: an Update«, *Mutation Res.*, 705: 96-106.
- (14) Fung, K.Y., G.R. Douglas and D. Krewski (1998), »Statistical Analysis of lacZ Mutant Frequency Data from Muta™-Mouse Mutagenicity Assays«, *Mutagenesis*, 13(3): 249–255.
- (15) Heddle, J.A., S. Dean, T. Nohmi, M. Boerrigter, D. Casciano, G.R. Douglas, B.W. Glickman, N.J. Gorelick, J.C. Mirsalis, H.-J. Martus, T.R. Skopek, V. Thybaud, K.R.Tindall and N. Yajima (2000), »In vivo Transgenic Mutation Assays«, *Environ. Mol. Mutagen.*, 35: 253-259.
- (16) Heddle, J.A., H.-J. Martus and G.R. Douglas (2003), »Treatment and Sampling Protocols for Transgenic Mutation Assays«, *Environ. Mol. Mutagen.*, 41: 1-6.
- (17) Jakubczak, J.L., G. Merlino, J.E. French, W.J. Muller, B. Paul, S. Adhya and S. Garges (1996), »Analysis of Genetic Instability during Mammary Tumor Progression using a novel Selection-based Assay for *in vivo* Mutations in a Bacteriophage λ Transgene Target«, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93(17): 9073–9078.
- (18) Kohler, S.W., G.S. Provost, P.L. Kretz, A. Fieck, J.A. Sorge and J.M. Short (1990), »The Use of Transgenic Mice for Short-term, *in vivo* Mutagenicity Testing«, *Genet. Anal. Tech. Appl.*, 7(8): 212–218.
- (19) Lewis P.D., B. Manshian, M.N. Routledge, G.B. Scott and P.A. Burns (2008), »Comparison of Induced and Cancer-associated Mutational Spectra using Multivariate Data Analysis«, *Carcinogenesis*, 29(4): 772-778.
- (20) Nohmi, T., M. Katoh, H. Suzuki, M. Matsui, M. Yamada, M. Watanabe, M. Suzuki, N. Horiya, O. Ueda, T. Shibuya, H. Ikeda and T. Sofuni (1996), »A new Transgenic Mouse Mutagenesis Test System using Spi – and 6-thioguanine Selections«, *Environ. Mol. Mutagen.*, 28(4): 465–470.
- (21) Nohmi, T., M. Suzuki, K. Masumura, M. Yamada, K. Matsui, O. Ueda, H. Suzuki, M. Katoh, H. Ikeda and T. Sofuni (1999), »Spi – Selection: an Efficient Method to Detect γ -ray-induced Deletions in Transgenic Mice«, *Environ. Mol. Mutagen.*, 34(1): 9–15.
- (22) Nohmi, T., T. Suzuki and K.I. Masumura (2000), »Recent Advances in the Protocols of Transgenic Mouse Mutation Assays«, *Mutation Res.*, 455(1–2): 191–215.
- (23) OECD (2000), Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation, Series on Testing and Assessment, N°19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris.
- (24) OECD (2009), Detailed Review Paper on Transgenic Rodent Mutation Assays, Series on Testing and Assessment, N° 103, ENV/JM/MONO(2009)7, OECD, Paris.
- (25) Piegorsch, W.W., B.H. Margolin, M.D. Shelby, A. Johnson, J.E. French, R.W. Tennant and K.R. Tindall (1995), »Study Design and Sample Sizes for a lacI Transgenic Mouse Mutation Assay«, *Environ. Mol. Mutagen.*, 25(3): 231–245.
- (26) Piegorsch, W.W., A.C. Lockhart, G.J. Carr, B.H. Margolin, T. Brooks, ... G.R. Douglas, U.M. Liegibel, T. Suzuki, V. Thybaud, J.H. van Delft and N.J. Gorelick (1997), »Sources of Variability in Data from a Positive Selection lacZ Transgenic Mouse Mutation Assay: an Interlaboratory Study«, *Mutation. Res.*, 388(2–3): 249–289.
- (27) Singer, T.M., I.B. Lambert, A. Williams, G.R. Douglas and C.L. Yauk (2006), »Detection of Induced Male Germline Mutation: Correlations and Comparisons between Traditional Germline Mutation Assays, Transgenic Rodent Assays and Expanded Simple Tandem Repeat Instability Assays«, *Mutation. Res.*, 598: 164-193.

- (28) Toyoda-Hokaiwado, N., T. Inoue, K. Masumura, H. Hayashi, Y. Kawamura, Y. Kurata, M. Takamune, M. Yamada, H. Sanada, T. Umemura, A. Nishikawa and T. Nohmi (2010), »Integration of in vivo Genotoxicity and Short-term Carcinogenicity Assays using F344 gpt delta Transgenic Rats: in vivo Mutagenicity of 2,4-diaminotoluene and 2,6-diaminotoluene Structural Isomers«, *Toxicol. Sci.*, 114(1): 71-78.
 - (29) Thybaud, V., S. Dean, T. Nohmi, J. de Boer, G.R. Douglas, B.W. Glickman, N.J. Gorelick, J.A. Heddle, R.H. Heflich, I. Lambert, H.-J. Martus, J.C. Mirsalis, T. Suzuki and N. Yajima (2003), »In vivo Transgenic Mutation Assays«, *Mutation Res.*, 540: 141-151.
 - (30) Vijg, J. and G.R. Douglas (1996), »Bacteriophage λ and Plasmid *lacZ* Transgenic Mice for studying Mutations in vivo« in: G. Pfeifer (ed.), *Technologies for Detection of DNA Damage and Mutations, Part II*, Plenum Press, New York, NY, USA, pp. 391-410.
 - (31) Yauk, C.L., J.D. Gingerich, L. Soper, A. MacMahon, W.G. Foster and G.R. Douglas (2005), »A *lacZ* Transgenic Mouse Assay for the Detection of Mutations in Follicular Granulosa Cells«, *Mutation Res.*, 578(1-2): 117-123.
 - (32) Hayashi, M., K. Dearfield, P. Kasper, D. Lovell, H.-J. Martus, V. Thybaud (2011), »Compilation and Use of Genetic Toxicity Historical Control Data«, *Mutation Res.*, doi:10.1016/j.mrgentox.2010.09.007.
 - (33) OECD (2011), *Retrospective Performance Assessment of OECD Test Guideline on Transgenic Rodent Somatic and Germ Cell Gene Mutation Assays*, Series on Testing and Assessment, N° 145, ENV/JM/MONO(2011)20, OECD, Paris.
 - (34) Clermont, Y. (1972), »Kinetics of spermatogenesis in mammals seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal«, *Physiol. Rev.* 52: 198-236.
 - (35) Robaire, B., Hinton, B.T., and Oregbin-Crist, M.-C. (2006), »The Epididymis«, in Neil, J.D., Pfaff, D.W., Chalis, J.R. G., de Kretser, D.M., Richards, J.S., and P. M. Wassarman (eds.), *Physiology of Reproduction*, Elsevier, the Netherlands, pp. 1071-1148.
 - (36) Russell, L.B. (2004), »Effects of male germ-cell stage on the frequency, nature, and spectrum of induced specific-locus mutations in the mouse«, *Genetica*, 122: 25-36.
-

Függelék

FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

Adagolási időszak: az a teljes időszak, amely alatt az állatot kezelik.

Bázispár cseréje: olyan típusú mutáció, amely egyetlen DNS nukleotid bázisnak egy másik DNS nukleotid bázissal való cseréjét okozza.

Kapszid: a vírusrészecskét körülvevő fehérjeburok.

Vegyi anyag: egy anyag vagy keverék.

Klonális expanszió: sok sejt előállítása egyetlen (mutáns) sejtből.

Kolóniaképző egység (cfu): az életképes baktériumok mérőszáma.

Konkatamer: hosszú, folytonos biomolekula, amely sorba kapcsolódott több azonos másolatból áll.

Cos-hely: 12 nukleotidból álló egyszálú DNS-szegmens, amely a lambda bakteriofág dupla szálú genomának mindkét végén megtalálható.

Deléció: olyan mutáció, amelyben egy vagy több (szekvenciális) nukleotid elvész a genomból.

Elektroporáció: elektromos impulzusok alkalmazása abból a célból, hogy növelje a sejtmembránok permeabilitását.

Endogén gén: a genomban őshonos gén.

Extra-binomiális variáció: egy populáció arányának az ismételt becslések során mutatkozó nagyobb változékonysága, mint ami várható lenne, ha a populációnak a binomiális eloszlása lenne.

Frameshift mutáció: számos nukleotid inszerciója vagy deléciója által okozott olyan genetikai mutáció, amely nem osztható maradék nélkül hárommal, egy olyan DNS-szekvencián belül, amely egy fehérjét/peptidet kódol.

Inszerció: egy vagy több nukleotid bázispár hozzáadása egy DNS-szekvenciához.

Jackpot: nagyszámú mutáció, amelyek klonális expanszió révén keletkeztek egyetlen mutációból.

Nagy deléciók: több kilobázis méretű deléciók a DNS-ben (amelyek hatékonyan kimutathatók a Spi^- szelekciós és a *lacZ*-plazmid vizsgálatokkal).

Ligálás: DNS-molekulák két végének kovalens összekapcsolása DNS-ligáz alkalmazásával.

Mitogén: olyan vegyi anyag, amely arra serkenti a sejtet, hogy sejtosztódásba kezdjen, kiváltva ezzel a mitózist (azaz a sejtosztódást).

Semleges gén: olyan gén, amelyet nem befolyásolnak a pozitív vagy negatív szelekciós nyomások.

Csomagolás: fertőző fágrészecskék szintézise fágkapszidból és farokfehérjékből, valamint fág DNS-molekulák konkata-merjéből álló készítményből. Általánosan használják a lambda-vektorra klónozott (cos-helyekkel elválasztott) DNS-nek a fertőző lambda-részecskébe való becsomagolására.

Csomagolási hatékonyság: az a hatékonyság, amellyel a csomagolt bakteriofágokat visszanyerik a gazdabaktériumokban.

Plakk-képző egység (pfu): az életképes bakteriofágok mérőszáma.

Pontmutáció: általános fogalom, amely a DNS-szekvencia csak egy kis részét érintő mutációkat foglalja magában, beleértve a kis inszerciókat, deléciókat és bázispár-szubsztitúciókat.

Pozitív szelekció: olyan módszer, amely csak a mutációk túlélését teszi lehetővé.

Riporter gén: olyan gén, amelynek mutációs génterméke könnyen kimutatható.

Mintavételi idő: annak az időszaknak a vége az állat elpusztítása előtt, amelynek során a vegyi anyagot nem adagolják és amelynek során a feldolgozatlan DNS-léziók stabil mutációként rögzülnek.

Shuttle vektor: oly módon felépített vektor, amely két különböző gazdafajban is szaporodni tud; ennek megfelelően a shuttle vektorba illesztett DNS-t két különböző sejtípusban vagy két különböző élőlényben is lehet tesztelni vagy manipulálni.

Vizsgált vegyi anyag: Bármely, e vizsgálati módszer alkalmazásával vizsgált anyag vagy keverék.

Transzgenikus: olyan szervezet, amelynek genomja egy másik faj génjének vagy génjeinek átültetése révén megváltozott.”
