

B.7. TOKSYCZNOŚĆ DAWKI POWTARZANEJ (28 DNI, DROGA POKARMOWA)

1. METODA

1.1. Wstęp

Zamieszczono we Wstępie Ogólnym Części B.

1.2. Definicje

Zamieszczono we Wstępie Ogólnym Części B.

1.3. Zasada badania

Badaną substancję należy podawać doustnie, codziennie, w zróżnicowanych dawkach kilku grupom zwierząt doświadczalnych, jeden poziom dawkowania na grupę, przez okres 28 dni. Przez okres podawania zwierzęta dokładnie obserwuje się każdego dnia w celu uchwycenia objawów toksycznych. Zwierzęta, które padną lub są w czasie badania uśmiercone, poddaje się sekcji, a zwierzęta, które przeżyły, uśmierca się po zakończeniu doświadczenia i poddaje sekcji.

W badaniach wykonanych zgodnie z metodą kładzie się nacisk na zmiany neurologiczne, jako specyficzny parametr kontrolny oraz na konieczność starannych obserwacji klinicznych zwierząt, w celu otrzymania jak największej ilości informacji. Za pomocą metody powinno identyfikować się substancje chemiczne o potencjalnym działaniu neurotoksycznym, które powinny być testowane z wykorzystaniem pogłębionych badań w tym kierunku. Poza tym, za pomocą tej metody, można wskazać na zmiany immunologiczne oraz toksyczność dla narządów układu rozrodczego.

1.4. Opis metody badania

1.4.1. Przygotowanie

Zdrowe, młode, dojrzałe płciowo zwierzęta należy losowo przydzielić do grup narażanych i grupy kontrolnej. Klatki należy usytuować w ten sposób, by zminimalizować możliwe skutki zależności od ustawienia. Zwierzęta należy oznaczyć i umieścić w klatkach przynajmniej pięć dni przed rozpoczęciem badania, w celu przystosowania ich do warunków laboratoryjnych.

Substancję powinno podać się za pomocą sondy albo z paszą lub wodą pitną. Sposób podawania dożołądkowego jest zależny od celu badania i właściwości fizykochemicznych badanego materiału.

O ile jest to niezbędne, badaną substancję rozpuszcza się lub zawiesza w odpowiednim nośniku. Zaleca się, by w miarę możliwości w pierwszej kolejności stosować roztwór/zawiesinę wodną, następnie wziąć pod uwagę roztwór/emulsję w oleju (np. w oleju kukurydzianym), a potem roztwory w innych nośnikach. Dla nośników innych niż woda należy znać ich właściwości toksyczne. Należy określić trwałość badanej substancji w stosowanym nośniku.

1.4.2. Warunki doświadczalne

1.4.2.1. Zwierzęta doświadczalne

Zalecanym gatunkiem gryzoni jest szczur, ale mogą być stosowane inne gatunki gryzoni. Należy stosować młode, zdrowe, dojrzałe płciowo zwierzęta powszechnie stosowanych szczepów laboratoryjnych. Samice powinny być dziewicze i nieciążarne. Podawanie należy rozpocząć tak szybko, jak to możliwe po odsadzeniu i zawsze zanim zwierzęta osiągną wiek dziewięciu tygodni.

Przed rozpoczęciem badania różnice w masie ciała zwierząt powinny być jak najmniejsze i nie powinny przekraczać $\pm 20\%$ średniej masy dla każdej płci.

Gdy badania dożołądkowe przy powtarzanym podawaniu prowadzone są jako wstępne do badań przewlekłych, należy raczej w obydwu badaniach używać zwierząt tego samego szczepu, pochodzących z tego samego źródła.

1.4.2.2. Liczba zwierząt i płć

Należy stosować przynajmniej 10 zwierząt (5 samic i 5 samców) na każdym poziomie dawkowania. Gdy planuje się zabijanie zwierząt w trakcie badania, ilość zwierząt należy zwiększyć przed rozpoczęciem badania o ilość planowaną do zabicia.

Dodatkowo grupa licząca 10 zwierząt (5 każdej płci) narażana na badaną substancję w najwyższej dawce może być użyta w celu obserwacji odwracalności zmian, ich trwałości lub opóźnionego pojawiania się skutków toksycznych, przez przynajmniej 14 dni po zaprzestaniu podawania. Dodatkowa grupa 10 zwierząt kontrolnych (5 każdej płci) może być również używana.

1.4.2.3. *Poziomy dawkowania*

Powinno stosować się przynajmniej trzy grupy narażane i grupę kontrolną. Poza podawaniem badanej substancji zwierzęta grupy kontrolnej powinny być traktowane w ten sam sposób, jak zwierzęta w grupach narażanych. Gdy stosuje się jakiś nośnik przy podawaniu badanej substancji, grupa kontrolna powinna otrzymywać ten sam nośnik w najwyższej stosowanej objętości.

Gdy na podstawie oceny innych danych nie należy się spodziewać skutków przy dawce 1000 mg/kg m.c./dzień, można przeprowadzić badania wartości dawki granicznej. Gdy nie ma stosownych danych, należy przeprowadzić badanie pilotażowe dla ułatwienia wyznaczenia dawek.

Przy doborze dawek należy brać pod uwagę istniejące dane o toksyczności i (toksyko-)kinetyce badanej substancji lub materiałów o zbliżonych właściwościach. Najwyższy poziom dawkowania należy dobrać tak, aby wywołał skutki toksyczne, jednak nie powodował padnięć lub poważnych cierpień zwierząt. Zróznicowania poziomów dawek należy dokonać tak, by móc wykazać zależność dawka/odpowiedź i uzyskać poziom bez dającego się zaobserwować działania na najniższym poziomie dawkowania (NOAEL). Współczynnik zawarty w granicach dwa do czterech jest optymalny dla ustalenia różnicy w poziomach dawek; dodanie czwartej grupy eksponowanej jest wskazane wtedy, gdy badanie jest przeprowadzane z użyciem dawek o dużych odstępach pomiędzy nimi (np. gdy zastosowano współczynnik większy niż 10).

W przypadku podawania substancji z paszą lub wodą pitną ważne jest zapewnienie, by wprowadzona do pożywienia ilość badanej substancji nie zakłócała normalnego żywienia lub równowagi wodnej. Gdy badana substancja jest podawana z paszą, należy stosować albo stałe jej stężenie w paszy (ppm), albo stałe dawki w stosunku do masy ciała; należy podać stosowany wariant. W przypadku podawania substancji sondą, należy ją podawać o tej samej godzinie i regulować w miarę potrzeby utrzymanie stałego poziomu dawki substancji w stosunku do masy ciała.

Gdy badania dożołądkowe przy powtarzającym podawaniu prowadzone są jako wstępne do badań przewlekłych, należy używać tej samej paszy w obydwu badaniach.

1.4.2.4. *Badanie wartości dawki granicznej*

O ile badanie przeprowadzone na jednym poziomie dawkowania wynoszącym co najmniej 1000 mg/kg m.c./dzień, przy podawaniu w paszy lub wodzie pitnej w równoważnym odsetku w paszy lub wodzie (w oparciu o ustaloną masę ciała), stosując postępowanie opisane dla tego badania, nie powoduje skutków toksycznych i gdy nie przewiduje się działania toksycznego w oparciu o dane dotyczące substancji strukturalnie zbliżonych, wykonywanie pełnego badania przy zastosowaniu trzech poziomów dawkowania nie jest konieczne. Badania wartości dawki granicznej nie stosuje się wtedy, gdy dane o narażeniu ludzi wskazują na konieczność stosowania wyższych poziomów dawkowania.

1.4.2.5. *Okres obserwacji*

Okres obserwacji powinien wynosić 28 dni. Zwierzęta z grupy dodatkowej, planowanej do dalszych obserwacji należy przetrzymywać przez dalszych 14 dni bez narażania, celem wykrycia odległych objawów, lub utrzymywania się ich, względnie ustąpienia skutków toksycznych.

1.4.3. *Sposób postępowania*

Zwierzętom należy podawać badaną substancję codziennie przez siedem dni w tygodniu przez okres 28 dni; podawanie 5 razy w tygodniu lub przez okres 14 dni należy uzasadnić. Gdy badaną substancję podaje się za pomocą zgłębnika, należy tego dokonać w pojedynczych dawkach, używając sondy żołądkowej lub odpowiedniej kaniuli intubacyjnej. Największa objętość płynu, jaką można podać jednorazowo, zależy od wielkości zwierzęcia doświadczalnego. Objętość ta nie powinna być większa aniżeli 1 cm³/100 g m.c., z wyjątkiem roztworów wodnych, które można podawać do 2 cm³/100 g m.c. Należy zminimalizować zmienność objętości dawki, dobierając stężenie tak, by zapewnić stałą objętość na wszystkich poziomach dawkowania. Wyjątkiem są substancje drażniące lub żrące, które mogą powodować silniejsze skutki przy wyższych stężeniach.

1.4.3.1. *Obserwacje ogólne*

Ogólne obserwacje kliniczne należy przeprowadzać przynajmniej raz dziennie, najlepiej o tym samym czasie, uwzględniając szczytowy okres spodziewanego skutku po podaniu. Należy odnotować stan zdrowia zwierząt. Przynajmniej dwa razy dziennie należy obserwować zachorowalność i umieralność wszystkich zwierząt. Zwierzęta konające lub wykazujące objawy silnego cierpienia lub bólu powinny być zabite ze względów humanitarnych i poddane sekcji.

Przed pierwszą ekspozycją (by umożliwić wewnętrzne porównania), a następnie przynajmniej co tydzień należy przeprowadzić u wszystkich zwierząt szczegółowe obserwacje kliniczne. Obserwacje te należy przeprowadzić poza klatką, w której zwierzę bytuje, najlepiej zawsze o tym samym czasie. Obserwacje należy starannie opisać, najlepiej używając systemów punktowych, wyraźnie określonych przez badające laboratorium. Należy dołożyć starań, aby zmiany w warunkach badania były minimalne i aby obserwacje były przeprowadzone przez obserwatorów nieznających poziomu dawkowania. Notowane objawy powinny zawierać, lecz nie ograniczać się tylko do nich, zmiany skóry, sierści, oczu i błon śluzowych, występowanie wydzielin i wydaliny oraz objawów autonomicznych (takich, jak łzawienie, stroszenie sierści, rozszerzenie źrenic, nietypowy sposób oddychania). Należy również odnotowywać zmiany w chodzie, postawie i reakcji na chwytywanie, jak również wystąpienie drgawek klonicznych lub tonicznych, stereotypię (np. nadmierne czyszczenie się, ciągłe krążenie) lub nietypowe zachowanie się (np. samookaleczenie, chodzenie do tyłu).

W czwartym tygodniu narażenia należy przeprowadzić badanie odczuwania różnych bodźców (takich, jak bodźce słuchowe, wzrokowe, z głębokich receptorów), szacowanie siły bólu i ocenę aktywności motorycznej. Dalsze szczegóły procedur, według których należy postępować, podano w odpowiednich pozycjach piśmiennictwa.

Obserwacje czynnościowe przeprowadzane w czwartym tygodniu narażenia mogą być pominięte, gdy doświadczenie prowadzi się jako badanie wstępne do badania podprzewlekłego (90 dni). W takim przypadku obserwacje czynnościowe należy włączyć do tego ostatniego badania. Z drugiej strony, dostępność danych z obserwacji czynnościowych z doświadczenia przy wielokrotnym podawaniu zwiększy możliwość wyboru poziomu dawek dla planowanego następnie badania podprzewlekłego.

Wyjątkowo, można także pominąć obserwacje czynnościowe w grupach, które w inny sposób wykazują objawy toksyczności w stopniu znacząco utrudniającym przeprowadzenie badań czynnościowych.

1.4.3.2. *Masa ciała i spożycie paszy/wody*

Wszystkie zwierzęta należy ważyć przynajmniej raz w tygodniu. Pomiaru spożycia paszy należy dokonywać również przynajmniej raz w tygodniu. Jeżeli badaną substancję podaje się w wodzie do picia, należy również przynajmniej raz w tygodniu mierzyć spożycie wody.

1.4.3.3. *Badanie hematologiczne*

Na zakończenie badania należy wykonać następujące oznaczenia hematologiczne: hematokryt, stężenie hemoglobiny, liczba erytrocytów, całkowita liczba leukocytów i ich skład procentowy, liczba płytek krwi i pomiar czasu krzepnięcia krwi.

Próbki krwi należy pobrać z ustalonego miejsca tuż przed lub w trakcie zabijania zwierząt i przechowywać w odpowiednich warunkach.

1.4.3.4. *Badanie biochemiczne*

Oznaczenia biochemiczne należy przeprowadzić w próbkach krwi uzyskanych od wszystkich zwierząt, tuż przed lub w trakcie zabijania zwierząt (oprócz padłych i/lub zabitych w czasie trwania doświadczenia) celem wykrycia znaczących skutków toksycznych, a szczególnie wpływu na nerki i wątrobę. Zaleca się głodzenie zwierząt przez noc przed pobraniem próbek krwi¹⁾. Badanie w osoczu lub surowicy powinno obejmować stężenia sodu, potasu, glukozy, cholesterolu całkowitego, mocznika, kreatyniny, białka całkowitego i albuminy, aktywność co najmniej

¹⁾ Dla szeregu pomiarów w surowicy i osoczu, szczególnie glukozy, preferuje się głodzenie przez noc. Głównym powodem tego postępowania jest to, że wzrost zmienności, który może nieuchronnie wynikać z braku głodzenia, może prowadzić do maskowania bardziej subtelnych skutków i utrudnić interpretację. Z drugiej strony nocne głodzenie może wpływać na ogólny metabolizm zwierząt, szczególnie w badaniach po narażeniu drogą pokarmową może zakłócać dzienną ekspozycję na badaną substancję. Jeżeli zastosuje się nocne głodzenie, to oznaczenie wskaźników kliniczno-biochemicznych należy przeprowadzić po obserwacjach czynnościowych w czwartym tygodniu badań.

dwóch enzymów wskazujących na uszkodzenie komórek wątrobowych (np. aminotransferazy alaninowej, aminotransferazy asparaginianowej, fosfatazy alkalicznej, gamma-glutamylotranspeptydazy i dehydrogenazy sorbitolowej). Oznaczanie aktywności dodatkowych enzymów (pochodzenia wątrobowego lub innego) i stężenie kwasów żółciowych może dostarczyć w pewnych warunkach pożytecznych informacji.

Dodatkowo w ostatnim tygodniu doświadczenia można przeprowadzić następujące badania moczu zbieranego o określonej porze: wygląd, objętość, osmolarność lub ciężar właściwy, pH, stężenie białka, glukozy i obecność krwi/komórek krwi.

Należy także rozważyć przeprowadzenie badań dla wykrycia w surowicy markerów ogólnego uszkodzenia tkanek. Inne oznaczenia, które należałoby wykonać (gdy o danej substancji wiadomo lub gdy istnieją podejrzenia, że może ona wpływać na procesy metaboliczne), obejmują stężenie wapnia, fosforanów, trójglicerydów na czczo, aktywności swoistych hormonów, stężenie methemoglobiny i aktywność cholinesterazy. Potrzeba wykonania tych badań jest ustalana dla pewnych klas substancji chemicznych lub w indywidualnych przypadkach.

W zależności od gatunków i obserwowanych i/lub spodziewanych skutków wywoływanych przez daną substancję istnieje potrzeba elastycznego podejścia do badań.

Zanim rozpocznie się ekspozycja, należy wziąć pod uwagę rozrzut wartości parametrów hematologicznych i biochemicznych u zwierząt, jeśli dane literaturowe są niewystarczające.

1.4.3.5. *Badania makroskopowe*

Wszystkie badane zwierzęta należy poddać pełnym, szczegółowym badaniom makroskopowym obejmującym staranne sprawdzenie powierzchni ciała, wszystkich naturalnych otworów, jamy czaszkowej, klatki piersiowej i jamy brzusznej wraz z zawartością. U wszystkich zwierząt (poza padłymi i/lub zabitymi w czasie trwania doświadczenia) należy wypreparować w razie potrzeby od przylegających tkanek wątrobę, nerki, przysadkę, jądra, najądrza, grasicę, śledzionę, mózg i serce i ustalić ich masę na mokro tak szybko, jak to tylko możliwe po sekcji w celu zapobieżenia wyschnięciu.

Następujące tkanki należy utrwalić w utrwalaczu najbardziej odpowiednim zarówno dla rodzaju tkanki, jak i zamierzonych badań histopatologicznych: wszystkie tkanki, w których makroskopowo stwierdzone zmiany, mózgowie (odpowiednie części jak mózg, mózdzek i most), rdzeń kręgowy, żołądek, jelito cienkie i grube (wraz z kępkami Peyera), wątroba, nerki, przysadka, śledziona, serce, grasicca, tarczycza, tchawica i płuca (utrwalone przez przepłukiwanie, a następnie zanurzenie w utrwalaczu), gonady, dodatkowe narządy płciowe (np. macica, prostata), pęcherz moczowy, węzły chłonne (jeden węzeł sphywowy charakterystyczny dla drogi podania i inny, odległy od drogi podania, wskazujący na skutki ogólnoustrojowe), nerw obwodowy (kulszowy lub piszczelowy) raczej w bliskim sąsiedztwie mięśnia i próbka szpiku kostnego (lub świeży aspirat szpiku kostnego). Wyniki badań klinicznych lub innych mogą sugerować konieczność wykonania badań innych tkanek. Należy również utrwalić narządy, które na podstawie znanych właściwości badanej substancji mogą być narządami krytycznymi.

1.4.3.6. *Badania histopatologiczne*

Pełne badania histopatologiczne należy wykonać na utrwalonych narządach i tkankach wszystkich zwierząt grupy kontrolnej i otrzymującej najwyższą dawkę. Badanie to należy rozszerzyć na zwierzęta wszystkich innych grup, gdy w grupie otrzymującej najwyższą dawkę obserwuje się zmiany wynikające z działania substancji.

Należy badać wszystkie tkanki, w których makroskopowo stwierdzono zmiany.

Gdy stosuje się grupę dodatkową, należy przeprowadzić badania histopatologiczne tkanek i narządów, w których stwierdzono zmiany grup narażanych.

2. WYNIKI

Należy podać wszystkie wyniki. Ponadto dane należy zestawić w tabelę przedstawiającą: w każdej badanej grupie ilość zwierząt na początku badania, ilość zwierząt, które padły lub które ze względów humanitarnych zabito w czasie trwania doświadczenia, oraz czas padnięć lub zabicia, ilość zwierząt z oznakami toksyczności, opis obserwowanych objawów działania toksycznego z podaniem czasu wystąpienia, trwania i intensywnością objawów toksycznych, ilość zwierząt ze zmianami chorobowymi, rodzaj zmian chorobowych i procent zwierząt wykazujących każdy rodzaj zmian.

Wyniki liczbowe należy ocenić za pomocą odpowiedniej, ogólnie akceptowanej, metody statystycznej. Metody statystyczne należy wybrać w czasie planowania badania.

3. SPRAWOZDANIE

3.1. Sprawozdanie z badań

W sprawozdaniu umieszcza się, z uwzględnieniem zakresu badań, następujące informacje:

- 1) zwierzęta doświadczalne:
 - a) stosowany gatunek/szczep,
 - b) liczba, wiek i płeć zwierząt,
 - c) źródło pozyskiwania, warunki przetrzymywania, sposób odżywiania itp.,
 - d) masa zwierząt na początku badań, w odstępach tygodniowych i na końcu badania;
- 2) warunki przeprowadzania badań:
 - a) uzasadnienie wyboru nośnika, w przypadku gdy nie jest to woda,
 - b) uzasadnienie wyboru poziomu dawkowania,
 - c) szczegóły przygotowania badanej substancji, przygotowania paszy, ustalenia stężenia, trwałości i jednorodności mieszaniny,
 - d) szczegóły podawania badanej substancji,
 - e) przekształcenie stężenia badanej substancji ze stężenia w paszy/wodzie (ppm) na rzeczywistą dawkę (mg/kg m.c./dzień), gdy się stosuje,
 - f) szczegóły dotyczące jakości paszy i wody;
- 3) wyniki:
 - a) masa ciała/zmiany masy ciała,
 - b) spożycie paszy i spożycie wody,
 - c) dane dotyczące reakcji toksycznej w zależności od płci i poziomu dawkowania, łącznie z objawami toksycznymi,
 - d) charakter, nasilenie i czas trwania objawów klinicznych (odwracalne czy też nie),
 - e) ocena aktywności czuciowej, siły chwytności i aktywności motorycznej,
 - f) wyniki badań hematologicznych z wartościami podstawowymi,
 - g) wyniki badań biochemicznych z wartościami podstawowymi,
 - h) dane dotyczące masy ciała przed uśmierceniem i masy narządów,
 - i) zmiany widoczne makroskopowo,
 - j) szczegółowy opis wszystkich zmian stwierdzonych mikroskopowo,
 - k) dane o wchłanianiu, o ile są dostępne,
 - l) opracowanie statystyczne wyników;
- 4) omówienie wyników;
- 5) wnioski.