

## **B.28. TOKSYCZNOŚĆ PODPRZEWLEKŁA – NARAŻENIE PRZEZ SKÓRĘ (90-DNIOWE POWTARZANE NARAŻENIE NA SKÓRĘ U GRYZONI)**

### **1. METODA**

#### **1.1 Wstęp**

Zamieszczono we Wstępie Ogólnym Części B.

#### **1.2. Definicje**

Zamieszczono we Wstępie Ogólnym Części B.

#### **1.3. Substancje kontrolne**

Nie są stosowane.

#### **1.4. Zasada badania**

Badaną substancję nakłada się w stopniowanych dawkach na skórę zwierząt z kilku grup doświadczalnych przez 90 dni, jedna dawka dla jednej grupy. Aby stwierdzić wystąpienie objawów toksycznych, zwierzęta obserwuje się codziennie przez cały okres nanoszenia substancji. U zwierząt, które padły podczas doświadczenia, wykonywana jest sekcja, a na końcu doświadczenia sekcję wykonuje się u wszystkich zwierząt, które przeżyły badanie.

#### **1.5. Kryteria wiarygodności badań**

Nie są stosowane.

#### **1.6. Opis metody badania**

##### **1.6.1. Przygotowania**

Zwierzęta muszą odbyć co najmniej 5-dniową kwarantannę w warunkach, które będą obowiązywać podczas doświadczenia. Przed rozpoczęciem badania zdrowe, młode zwierzęta należy wybrać losowo, oznakować i przydzielić do grup badanych i kontrolnych. U zwierząt badanych, na krótko przed doświadczeniem, sierść musi zostać ostrzyżona na grzbietowej części tułowia. Może być również zastosowane golenie, ale należy je wykonać na około 24 godziny przed rozpoczęciem badania. Powtórne strzyżenia lub golenia są zwykle potrzebne w tygodniowych odstępach. Podczas strzyżenia i golenia należy zachować ostrożność, aby nie skaleczyć skóry. Dla naniesienia badanej substancji należy oczyścić z sierści nie mniej niż 10% powierzchni ciała. Przy decydowaniu o wielkości powierzchni, którą pozbawia się sierści, jak i wielkości powierzchni, na którą nanosi się badaną substancję, należy brać pod uwagę masę ciała zwierząt. Jeżeli badana substancja jest ciałem stałym, to może być sproszkowana; aby zapewnić dobry kontakt ze skórą, badaną substancję należy zwilżyć wodą lub, jeżeli zachodzi taka potrzeba, odpowiednim nośnikiem. Badane substancje w stanie ciekłym aplikuje się zwykle w formie nierozcieńczonej. Badane substancje aplikuje się przez 5 do 7 dni w tygodniu.

##### **1.6.2. Warunki doświadczenia**

###### **1.6.2.1. Zwierzęta doświadczalne**

Do doświadczenia powinny być użyte dorosłe szczury, króliki lub świnki morskie. Można również używać innych gatunków, ale ich użycie wymaga uzasadnienia. Na początku doświadczenia różnice masy ciała zwierząt nie powinny przekraczać  $\pm 20\%$  wartości średniej. Jeżeli badanie toksyczności podprzewlekłej skórnej jest wykonywane jako poprzedzające badanie przewlekłe, to w obydwu badaniach należy używać tego samego gatunku i szczepu zwierząt.

#### 1.6.2.2. Liczba i płeć zwierząt

Dla każdego poziomu dawkowania należy użyć co najmniej 20 zwierząt (10 samców i 10 samic) ze zdrową skórą. Nie powinny być używane samice ciężarne i takie, które były kojarzone. Jeżeli w trakcie doświadczenia przewiduje się uśmiercanie zwierząt, to liczba zwierząt powinna być zwiększona o tyle zwierząt, ile przewiduje się zabić przed zakończeniem doświadczenia. Dodatkowo może być testowana grupa towarzysząca 20 zwierząt (po 10 zwierząt każdej płci), które w celu stwierdzenia odwracalności, utrzymywania się i opóźnionego wystąpienia efektów toksycznych po 90-dniowym podawaniu substancji w wysokiej dawce są następnie obserwowane przez okres 28 dni po zakończeniu narażenia przez skórę.

#### 1.6.2.3. Poziomy dawkowania

Wymagane są co najmniej 3 poziomy dawkowania substancji badanej, grupa kontrolna z nośnikiem, jeżeli jest on stosowany. Okres narażenia powinien wynosić co najmniej 6 godzin na dzień. Aplikowanie badanej substancji powinno się odbywać o tej samej porze każdego dnia, ilość badanej substancji należy korygować w odstępach (1 lub 2 tygodniowych) tak, aby utrzymać stały poziom dawkowania w odniesieniu do masy ciała zwierząt. Z wyjątkiem aplikowania badanej substancji, zwierzęta grupy kontrolnej należy traktować tak samo jak zwierzęta grup badanych. Jeżeli stosuje się nośnik ułatwiający dawkowanie, zwierzęta grupy kontrolnej z nośnikiem należy traktować tak samo jak zwierzęta z grup badanych; powinny one otrzymywać takie same ilości nośnika, jak zwierzęta grupy doświadczalnej narażanej na badaną substancję w najwyższej dawce. Narażenie na badaną substancję w najwyższej dawce powinno powodować wystąpienie objawów toksycznych, ale nie powinno powodować wystąpienia zgonów lub wywoływać tylko nieliczne zgony. Najniższa dawka nie powinna wywoływać żadnych objawów działania toksycznego. Najniższy poziom dawkowania powinien być wyższy od przewidywanego poziomu narażenia u ludzi. Przy średnim poziomie dawkowania powinny występować minimalne, możliwe do stwierdzenia objawy toksyczne. Jeżeli stosowana jest więcej niż jedna dawka pośrednia, to należy dawki tak dobrać, aby uzyskać stopniowanie efektów toksycznych. Dla prawidłowej oceny wyników przy niskich i średnich poziomach narażenia, a także w grupach kontrolnych, przypadki padnięć nie powinny być liczne.

Jeżeli zastosowanie badanej substancji powoduje ostre podrażnienie skóry, to stosowane stężenie należy obniżyć; może to przy najwyższej stosowanej dawce spowodować zredukowanie lub brak innych objawów toksycznych. Jeżeli skóra ulegnie poważnemu uszkodzeniu, to może być konieczne wcześniejsze zakończenie doświadczenia i podjęcie nowych badań przy niższych stężeniach.

#### 1.6.2.4. Badanie wartości dawki granicznej

Jeżeli we wstępnych badaniach narażenia na badaną substancję w dawce 1000 mg/kg lub wyższej, odpowiadającej prawdopodobnemu lub znanemu narażeniu ludzi, nie stwierdza się objawów działania toksycznego, to dalsze badanie może być zbędne.

#### 1.6.2.5. Okres obserwacji

W celu stwierdzenia wystąpienia objawów toksycznych, zwierzęta doświadczalne należy obserwować codziennie. Należy notować czas padnięcia zwierząt, a także czas pojawienia się i ustąpienia objawów toksycznych.

#### 1.6.3. Opis postępowania

Zwierzęta należy umieszczać w klatkach pojedynczo. Badaną substancję należy nanosić przez 7 dni w tygodniu, przez 90 dni. W celu stwierdzenia powrotu do normy lub utrzymywania się efektów toksycznych, zwierzęta w każdej grupie towarzyszącej, przewidzianej do obserwacji tych efektów, należy obserwować przez następne 28 dni, bez aplikowania badanej substancji. Czas ekspozycji powinien wynosić 6 godzin dziennie.

Badaną substancję należy nanosić jednorodną warstwą na powierzchnię, która powinna wynosić około 10% całej powierzchni ciała. Podczas badania substancji silnie toksycznych pole powierzchni pokrytej może być mniejsze, ale powinno być ono pokryte cienką jednolitą warstwą substancji badanej.

W czasie narażenia badana substancja powinna być utrzymywana w kontakcie ze skórą przez nałożenie porowatego gazika i niedrażniącego przylepca. Miejsce badane należy tak zabezpieczyć, aby zwierzę nie mogło zjeść badanej substancji. Można zastosować ograniczenie ruchów przeciwdziałające zjedzeniu badanej substancji, ale nie zaleca się całkowitego unieruchomienia.

Po zakończeniu ekspozycji należy usunąć resztki badanej substancji, używając do tego celu wody lub użyć innych właściwych sposobów oczyszczenia skóry. Należy codziennie obserwować wszystkie zwierzęta, notować

objawy toksyczne, łącznie z czasem ich wystąpienia, nasileniem i czasem trwania. Obserwacje w klatkach powinny dotyczyć zmian: skóry, sierści, oczu, błon śluzowych, a także układu oddechowego, krążenia, autonomicznego i ośrodkowego układu nerwowego, aktywności somatomotorycznej i zachowania. Regularne obserwowanie zwierząt jest konieczne, aby być pewnym, że nie traci się badanych zwierząt z powodu kanibalizmu, autolizy tkanek lub przemieszania zwierząt. Na końcu doświadczenia u wszystkich zwierząt z grup doświadczalnych, które przeżyły (z wyjątkiem grupy towarzyszącej), wykonuje się sekcje. Zwierzęta konające należy zabić i wykonać sekcję.

Zwykle u wszystkich zwierząt, w tym i z grupy kontrolnej wykonuje się następujące badania:

- badania oftalmologiczne; za pomocą oftalmoskopu lub innego odpowiedniego sprzętu należy wykonać przed rozpoczęciem podawania badanej substancji i przy końcu doświadczenia, najlepiej u wszystkich zwierząt albo co najmniej u zwierząt narażanych na najwyższą dawkę i u zwierząt grupy kontrolnej. Jeżeli zostaną stwierdzone zmiany w oczach, wtedy należy przebadać wszystkie zwierzęta,
- hematologiczne; powinny być wykonane na końcu doświadczenia; w skład badań hematologicznych wchodzi hematokryt, zawartość hemoglobiny, liczba erytrocytów, całkowita liczba białych ciałek krwi i ich wzór odsetkowy, parametry krzepliwości tj. czas krzepnięcia, czas protrombinowy, czas trombolastynowy i liczba płytek krwi,
- biochemiczne; badanie krwi należy wykonać na końcu doświadczenia. Testy biochemiczne, które są uznane za odpowiednie we wszystkich doświadczeniach, to badania równowagi elektrolitowej, metabolizmu węglowodanów, funkcji nerek i wątroby. Na wybór specyficznych testów wpływają obserwacje wskazujące na sposób działania badanej substancji. Sugeruje się następujące oznaczenia: poziom wapnia, fosforu, chlorków, sodu, potasu, poziom glukozy na czczo (z okresem głodzenia właściwym dla gatunku), aktywność aminotransferazy alaninowej i aminotransferazy asparginianowej w surowicy krwi, dekarboksylazy ornitynowej, gamma-glutamylotranspeptydazy, zawartość azotu mocznikowego, stężenie albumin, kreatyniny we krwi, całkowitej bilirubiny, białka całkowitego w surowicy krwi. Inne oznaczenia, które mogą być konieczne dla dokonania prawidłowej oceny toksykologicznej, to: oznaczenie profilu lipidowego, stężenia hormonów, równowagi kwasowo-zasadowej, stężenia methemoglobiny, aktywności cholinesterazy. Dodatkowe badania biochemiczne mogą być wykonywane, jeżeli konieczne jest szersze przebadanie obserwowanych efektów,
- badanie moczu; w zakresie badań wykonywanych rutynowo nie jest wymagane, wymagane jest tylko wtedy, jeżeli są wskazania poparte oczekiwanymi lub obserwowanymi objawami działania toksycznego.

Jeżeli podstawowe własne wyniki archiwalne są niewystarczające, należy rozważyć możliwość wykonania oznaczeń parametrów hematologicznych i biochemicznych przed rozpoczęciem narażania.

#### 1.6.3.1. *Badania sekcyjne*

Wszystkie zwierzęta powinny być poddane pełnej sekcji wykonanej makroskopowo, w której zakres wchodzi badanie zewnętrznej powierzchni ciała, wszystkich otworów naturalnych ciała oraz jamy czaszkowej, piersiowej i brzusznej wraz z ich zawartością. Aby uniknąć wysychania, wątrobę, nerki, nadnercza i jądra należy zważyć natychmiast po wycięciu. Aby umożliwić dalsze badania histopatologiczne następujące narządy i tkanki należy utrwalić w odpowiednim medium: wszystkie, w których makroskopowo stwierdzono uszkodzenia, mózgowie-włączając odcinki rdzenia/mostu, kora mózgu i mózdzku, przysadka, tarczyca/przytarczyce, grasica, (tchawica) i płuca, serce, aorta, ślinianki, wątroba, śledziona, nerki, nadnercza, trzustka, gonady, macica, dodatkowe narządy układu rozrodczego, pęcherzyk żółciowy (jeśli jest), skóra, przełyk, żołądek, dwunastnica, jelito czcze, jelito kręte, jelito ślepe, okrężnica, odbytnica, pęcherz moczowy, wybrane węzły chłonne, (gruczoły mleczne samic), (mięśnie udowe), nerw obwodowy, (mostek ze szpikiem), (oczy), (kość udowa łącznie z powierzchnią stawową), (rdzeń kręgowy na trzech poziomach szyjnym, śródpiersiowym i lędźwiowym) i (gruczoły łzowe). Tkanki umieszczone w nawiasach należy badać tylko wtedy, jeżeli wskazują na to objawy toksyczne, a także wtedy, gdy mogą być narządami krytycznymi działania toksycznego badanej substancji.

#### 1.6.3.2. *Badania histopatologiczne*

Należy wykonać pełne badania histologiczne skóry normalnej i narażanej oraz narządów i tkanek zwierząt grupy kontrolnej i grupy narażanej na badaną substancję w najwyższej dawce.

Należy zbadać wszystkie tkanki, w których makroskopowo stwierdzono uszkodzenia.

Należy zbadać narządy krytyczne w innych grupach doświadczalnych.

Jeżeli używa się szczurów, płuca zwierząt narażanych na badaną substancję w niskich i pośrednich dawkach należy poddać badaniom histopatologicznym dla stwierdzenia infekcji, co służy właściwej ocenie stanu zdrowia zwierząt. U zwierząt tych grup dalsze badania histopatologiczne nie są wymagane jako rutynowe, ale muszą być zawsze przeprowadzone badania histopatologiczne tych narządów, w których wykazano uszkodzenia w grupie zwierząt narażanych na badaną substancję w wysokiej dawce.

Jeżeli badana jest grupa towarzysząca, badania histopatologiczne powinny być wykonane na tkankach i narządach, w których stwierdzano działanie toksyczne u zwierząt innych grup narażanych.

## **2. WYNIKI BADAŃ**

Uzyskane wyniki badań należy zebrać w formie tabel, zamieszczając w nich dla każdej grupy, liczbę zwierząt na początku doświadczenia, liczbę zwierząt, u których stwierdzono uszkodzenie, rodzaj tego uszkodzenia oraz odsetek zwierząt wykazujących jakiegokolwiek typ uszkodzenia. Wyniki powinny być analizowane odpowiednimi metodami statystycznymi. Może być zastosowana każda uznana metoda statystyczna.

## **3. SPRAWOZDANIE**

### **3.1. Sprawozdanie z badań**

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

- gatunek, szczerp, źródło pochodzenia zwierząt, warunki środowiskowe, rodzaj paszy itp.,
- warunki przeprowadzenia badania,
- poziomy dawkowania (łącznie z nośnikiem, jeżeli jest używany) i stężenia,
- dane dotyczące efektów toksycznych w zależności od dawki i płci,
- w miarę możliwości poziom dawkowania, przy którym nie występują efekty toksyczne i inne,
- czas padnięcia zwierząt w trakcie doświadczenia lub informację, czy zwierzęta przeżyły do końca badania,
- opis efektów toksycznych lub innych efektów,
- czas zaobserwowania każdego nietypowego objawu i czas jego trwania,
- dane dotyczące masy ciała i zużycia paszy,
- wyniki badań oftalmologicznych,
- rodzaj przeprowadzonych badań hematologicznych i ich wyniki,
- rodzaj przeprowadzonych badań biochemicznych i ich wyniki (łącznie z wynikami badań moczu, jeżeli były wykonane),
- wyniki sekcji,
- szczegółowy opis zmian stwierdzonych w badaniach histopatologicznych,
- statystyczne opracowanie uzyskanych wyników,
- omówienie wyników,
- interpretację uzyskanych wyników.

### **3.2. Ocena i interpretacja**

Przeprowadza się na podstawie przepisów Wstępu Ogólnego Części B.