

B.38. OPÓŹNIONA NEUROTOKSYCZNOŚĆ ZWIĄZKÓW FOSFOROORGANICZNYCH PO DAWCE POWTARZANEJ-28-DNIOWEJ

1. METODA

1.1. Wstęp

W szacowaniu i ocenie skutków toksycznego działania ważne jest uwzględnienie możliwości powodowania przez pewne klasy substancji chemicznych szczególnych objawów neurotoksyczności, których nie można wykryć w innych badaniach toksykologicznych. Zaobserwowano, że niektóre związki fosforoorganiczne wywołują objawy opóźnionego działania neurotoksycznego, które można wykazać za pomocą poniżej opisanej metody.

Do wykrycia substancji chemicznych, które mogą powodować opóźnione objawy polineuropatii, może być także stosowany test przesiewowy *in vitro*. Jednak ujemne wyniki badań *in vitro* nie są dowodem, że badana substancja nie wykazuje działania neurotoksycznego.

To 28-dniowe badanie opóźnionych skutków neurotoksycznych dostarcza informacji o możliwym zagrożeniu zdrowotnym, jakie może się pojawić po powtarzonym narażeniu przez określony czas. Dostarcza informacji o odpowiedzi zależnej od dawki i może umożliwić szacowanie poziomu niewywołującego działania szkodliwego, który można wykorzystać przy ustalaniu kryteriów bezpieczeństwa.

1.2. Definicje

1. **Związki fosforoorganiczne** obejmują estry fosforoorganiczne, tioestry lub bezwodniki kwasów fosforoorganicznych, fosfonoorganicznych, fosforamidoorganicznych lub kwasów fosforotionowych, fosfonotionowych lub fosfortiamidoorganicznych, lub inne substancje, czasami występujące w tej klasie związków chemicznych, które mogą powodować opóźnione objawy działania neurotoksycznego.

2. **Opóźniona neurotoksyczność** jest to zespół związany z wydłużonym, opóźnionym wystąpieniem objawów ataksji, obwodowych aksonopatii w rdzeniu kręgowym i nerwach obwodowych oraz hamowaniem i starzeniem się esterazy neurotoksycznej (NTE) w tkance nerwowej.

1.3. Zasada metody

Dzienne dawki badanej substancji podaje się drogą pokarmową kurom domowym przez 28 dni. Codziennie, przez 14 dni od podania ostatniej dawki obserwuje się u zwierząt zmiany w zachowaniu się, objawy ataksji i porażenia. Przeprowadza się oznaczenia biochemiczne, w szczególności oznacza się aktywność NTE, u kur wybranych losowo z każdej grupy (24 i 48 godzin po podaniu ostatniej dawki). Dwa tygodnie po podaniu ostatniej dawki pozostałe kury zabija się i przeprowadza badania histopatologiczne wybranych części układu nerwowego.

1.4. Opis metody badania

1.4.1. Przygotowanie

Zdrowe wolne od chorób wirusowych, młode, dojrzałe płciowo kury nieotrzymujące leków i niewykazujące wad w chodzeniu należy dobrać losowo do grup narażonych i kontrolnej oraz aklimatyzować do warunków laboratoryjnych przez przynajmniej 5 dni przed rozpoczęciem badania.

Należy stosować klatki lub ogrodzenia wystarczająco duże, aby zapewnić kurom swobodne poruszanie się i łatwą obserwację ich chodu.

Badaną substancję należy podawać codziennie drogą dożołądkową 7 dni w tygodniu, używając sondy lub kapsułek żelatynowych. Ciecze należy podawać w formie nierozcieńczonej lub rozpuszczone w odpowiednim nośniku takim, jak olej kukurydziany; o ile jest to możliwe, ciała stałe należy rozpuszczać, ponieważ duże dawki substancji stałej w kapsułkach żelatynowych nie wchłaniają się w wystarczającym stopniu. Należy znać charakterystykę toksykologiczną nośnika innego niż woda, jeżeli nie jest znana, należy ją ustalić przed badaniem.

1.4.2. Warunki doświadczalne

1.4.2.1. Zwierzęta doświadczalne

Zaleca się stosowanie młodych, dojrzałych płciowo kur domowych niosek (*Gallus gallus domesticus*), w wieku 8 do 12 miesięcy. Należy stosować kury o standardowych wymiarach, z tej samej hodowli i tego samego szczepu i hodować w typowych warunkach zapewniających swobodne poruszanie się.

1.4.2.2. Liczba i płeć

Należy stosować przynajmniej trzy grupy narażane i grupę kontrolną, którą eksponuje się na nośnik. Grupę kontrolną z nośnikiem należy traktować w ten sam sposób co grupy narażane, z wyjątkiem podawania badanej substancji.

Każda grupa powinna zawierać wystarczającą liczbę kur, aby przynajmniej sześć można było zabić w celu wykonania oznaczeń biochemicznych (trzy w każdym z dwóch punktów czasowych) oraz sześć, które przeżyły 21 dni okresu obserwacji, można było użyć do badań patologicznych.

1.4.2.3. Poziomy dawkowania

Poziomy dawkowania należy dobrać, biorąc pod uwagę wyniki trzech badań opóźnionej neurotoksyczności po podaniu jednorazowym, jak również inne istniejące dane o toksyczności lub kinetyce badanej substancji. Najwyższy poziom dawkowania należy dobrać z zamiarem wywołania skutków toksycznych najlepiej, gdy są to objawy opóźnionej neurotoksyczności, lecz bez wywoływania śmiertelności, czy też widocznego cierpienia. Następnie należy dobrać zmniejszające się dawki w celu określenia zależności dawka/odpowiedź i poziomu bez obserwowanego działania szkodliwego w najniższej dawce.

1.4.2.4. Badanie wartości dawki granicznej

Jeżeli w badaniu na poziomie dawkowania co najmniej 1000 mg/kg m.c., przeprowadzonym według opisanej procedury, nie wystąpią widoczne objawy toksyczne i o ile takich skutków nie należy oczekiwać w oparciu o dane o związkach o podobnej budowie, wtedy badanie z zastosowaniem większej dawki nie jest konieczne. Gdy dane o narażeniu u ludzi wskazują na potrzebę stosowania wyższego poziomu dawkowania, można przeprowadzić badanie przy użyciu dawki wyższej niż wartość graniczna.

1.4.2.5. Okres obserwacji

Należy obserwować wszystkie zwierzęta co najmniej raz dziennie w czasie 28 dni podawania i przez 14 po okresie podawania lub do czasu ich planowego zabicia.

1.4.3. Opis postępowania

Substancję badaną podaje się przez 7 dni w tygodniu, przez okres 28 dni.

1.4.3.1. Obserwacje ogólne

Obserwacje należy rozpocząć bezpośrednio po narażeniu. Należy obserwować starannie wszystkie kury co najmniej raz dziennie w czasie 28 dni podawania, a następnie przez 14 dni lub do czasu ich planowanego uśmiercenia. Należy notować wszystkie objawy zatrucia, uwzględniając czas ich wystąpienia, typ, rozległość i czas trwania. Obserwacje powinny obejmować nieprawidłowości w zachowaniu, lecz nie ograniczać się do nich. Objawy ataksji należy mierzyć za pomocą liczbowej skali stopniującej, zawierającej co najmniej cztery poziomy, oraz notować przypadki porażenia. Kury należy przynajmniej dwa razy w tygodniu wyjmować z klatek i poddawać przez pewien czas wymuszonej aktywności motorycznej takiej, jak wspinanie się po drabinie, celem ułatwienia obserwacji nawet niewielkich efektów toksycznych. Każdą kurę w stanie agonialnym należy zabić oraz poddać sekcji.

1.4.3.2. Masa ciała

Wszystkie kury należy zważyć tuż przed rozpoczęciem podawania badanej substancji i przynajmniej raz w tygodniu podczas badania.

1.4.3.3. *Badania biochemiczne*

Sześć kur losowo wybranych z każdej narażanej grupy i grupy kontrolnej z nośnikiem należy zabić w kilka dni po podaniu ostatniej dawki, wypreparować mózg i rdzeń kręgowy w odcinku lędźwiowym i zbadać na aktywność NTE. Może być też potrzebne wypreparowanie tkanki nerwu kulszowego i zbadanie jej na aktywność NTE. Z reguły, trzy ptaki z grupy kontrolnej i każdej grupy narażanej uśmierca się po 24 godzinach i trzy po 48 godzinach po podaniu ostatniej dawki. O ile obserwacje objawów działania toksycznego z badań po podaniu dawki jednorazowej lub innych badań sugerują inne czasy zabijania zwierząt po podaniu ostatniej dawki, wtedy należy to wykorzystać, a wybór uzasadnić.

W próbkach tych, gdy uzna się to za stosowne, można przeprowadzić również oznaczenie aktywności acetylocholinesterazy (AChE). Jednak spontaniczna reaktywacja AChE może wystąpić *in vivo*, co może doprowadzić do niedoszacowania potencjału hamującego AChE danej substancji.

1.4.3.4. *Badania makroskopowe*

Badania makroskopowe wszystkich zwierząt (zabijanych planowo i w stanie agonialnym) powinny obejmować obserwacje mózgu i rdzenia kręgowego.

1.4.3.5. *Badania histopatologiczne*

Badaniu mikroskopowemu należy poddać tkankę nerwową zwierząt, które przeżyły okres obserwacji i nie były użyte do badań biochemicznych. Tkanki należy utrwalić *in situ* stosując technikę perfuzji. Preparaty mikroskopowe powinny obejmować mózdzek (poziom środkowopodłużny), rdzeń przedłużony, rdzeń kręgowy i nerwy obwodowe. Należy wykonać preparaty rdzenia kręgowego z górnego odcinka szyjnego oraz okolicy śródpiersiowej i krzyżowolędźwiowej oraz preparaty okolic obwodowych nerwu piszczelowego i jego odgałęzień do mięśnia brzuchatego łydki i nerwu kulszowego. Preparaty należy barwić odpowiednimi barwnikami specyficznymi dla mieliny i aksonów. Początkowo, badania mikroskopowe należy przeprowadzić na utrwalonych tkankach wszystkich zwierząt grupy kontrolnej i z grupy, która otrzymała najwyższą dawkę. Jeżeli istnieją dowody na występowanie zmian u zwierząt otrzymujących najniższą dawkę, wtedy badaniem mikroskopowym należy objąć tkanki pobrane od wszystkich kur z grupy pośredniej i najniższej.

2. WYNIKI

Z reguły otrzymane wyniki ujemne dotyczące badanych parametrów (biochemiczne, histopatologiczne i obserwacji zachowania) nie wymagają pogłębionych badań pod względem opóźnionych skutków neurologicznych. Wyniki niejednoznaczne mogą powodować konieczność przeprowadzenia dalszych badań.

Wszystkie dane należy zestawić w formie tabel, wykazując dla każdej badanej grupy: liczbę zwierząt na początku badania, liczbę zwierząt wykazujących zaburzenia, skutki toksyczne ujawniające się w zmianie zachowania lub oznaczeniach biochemicznych, rodzaj i nasilenie tych zaburzeń lub skutków oraz odsetek zwierząt wykazujących każdy rodzaj i nasilenie zaburzeń lub skutków.

Wyniki badania należy ocenić w zależności od częstości występowania, nasilenia i korelacji zmian zachowania się, zmian biochemicznych i histopatologicznych oraz wszelkich innych skutków obserwowanych w grupach narażanych i kontrolnych.

Wyniki liczbowe należy ocenić za pomocą odpowiednich i powszechnie uznawanych metod statystycznych. Stosowane metody statystyczne należy wybrać podczas planowania badań.

3. SPRAWOZDANIE

3.1. Sprawozdanie z badań

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

1) zwierzęta doświadczalne:

- stosowany szczep,
- liczbę i wiek zwierząt,
- źródło pozyskania, warunki przebywania itp.,
- indywidualne masy zwierząt na początku doświadczenia;

2) warunki badania:

- szczegóły przygotowania substancji do badań, trwałość i jednorodność,
- uzasadnienie wyboru nośnika,
- szczegóły podawania badanej substancji,

- szczegóły dotyczące jakości paszy i wody,
- uzasadnienie doboru dawki,
- szczegółowy opis dawek łącznie ze szczegółami dotyczącymi nośnika, objętości i formy fizycznej podawanego materiału,
- rodzaj i szczegóły podawania stosowanego środka zabezpieczającego przed śmiertelnymi skutkami pobudzenia układu cholinergicznego;

3) wyniki:

- dane dotyczące masy ciała,
- dane na temat objawów toksycznych, włączając w to śmiertelność, w zależności od grup narażanych, poziom, przy którym nie obserwuje się żadnych objawów szkodliwych (NOAEL),
- rodzaj, nasilenie i czas trwania objawów klinicznych (czy są odwracalne, czy też nie),
- szczegółowy opis metod i otrzymanych wyników biochemicznych,
- wyniki badań sekcyjnych,
- szczegółowy opis wszystkich wyników histopatologicznych,
- statystyczne opracowanie wyników, gdzie to możliwe;

4) omówienie wyników;

5) wnioski.