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


1.6.2. Warunki doświadczenia

1.6.2.1. Zwierzęta doświadczalne

Do doświadczenia powinny być użyte dorosłe szczury, królik lub świnki morskie. Można również używać innych gatunków, ale ich użycie wymaga uzasadnienia. Na początku doświadczenia różnice masy ciała zwierząt nie powinny przekraczać ±20% wartości średniej. Jeżeli badanie toksyczności podprzewlekkiej skórnej jest wykonywane jako poprzedzające badanie przewlekłe, to w obydwu badaniach należy używać tego samego gatunku i szczepy zwierząt.
1.6.2.2. Liczba i pleć 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 uśmiekanie 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 odwroczalności, 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 grupy badanej. Jeżeli stosuje się nośnik ułatwiający dawkowanie, zwierzęta grupy kontrolnej z nośnikiem należy traktować tak samo jak zwierzęta grupy badanej; 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 powinna występować minimalne, możliwe do stwierdzenia objawy toksyczne. Jeżeli stosowana jest więcej niż jedna dawka pośrednia, to należy dawki tak dobrze, aby uzyskać stopniowanie objawów 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


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

Po zakończeniu ekspozycji należy usuwać resztki badanej substancji, używając do tego celu wody lub użyć innych właściwych sposobów oczyszczania skóry. Należy codziennie obserwować wszystkie zwierzęta, notować
objawy tokysyczne, łącznie z czasem ich występowania, 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 w użyciu wszystkich zwierząt z grup doświadczalnych, które przeżyły (z wyjątkiem grupy towarzyszącej), wykonuje się sekcję. Zwierzęta konające należy zabić i wykonać sekcję.

Zwylke 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 narażonych 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 wchodzą hematokryt, zawartość hemoglobiny, liczba erytroцитów, całkowita liczba białych ciałek krwi i ich wzór odsetkowy, parametry krzepliwości tj. czas krzepnięcia, czas protrombinowy, czas tromboplastyny 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 elektrólutowej, 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, chłorków, sodu, potasu, poziom glukozy na czczu (z okresem głodzenia właściwym dla gatunku), aktywność aminotransferazy alaninowej i aminotransferazy asparaginowej w surowicy krwi, dekarboksylazy ornitynowej, gamma-glutamyltransferazy, 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, wątroby, nerki, nadnercza i jądra należy zważyć natychmiast po wycięciu. Aby umożliwić dalsze badania histopatologiczne następujące narzędzia i tkanki należy utrwałić w odpowiednim medium: wszystkie, w których makroskopowo stwierdzono uszkodzenia, mózgowo-włączając odcinki rdzenia/mostu, kora mózgu i mózdku, przysadka, tarczycę/przysrączycy, grusica, (tchawica) i płuc, serce, aorta, ślimianki, wątroba, śledzioną, nerki, nadnercza, trzustka, gonady, macica, dodatkowe narzędzia układu rozrodczego, płęczynek żołciowego (jeśli jest), skóry, przełyk, żołądek, dwunastnica, jelito czesze, jelito kręte, jelito ślepce, okrężnica, odbytnica, płęczynki moczowe, wybrane węzły chłonne, (gruczoły mięsne samiec), (mięśnie udowe), nerw obwodowy, (mostek ze szpikiem), (oczny, (kość udowa łącznie z powierzchnią stawową), (róże krewiny na trzech poziomach szynnym, śródpiersiowym i lędźwiowym) i gruczoły żołowej). Tkanki umieszczone w nawiązasach należy bądać tylko wtedy, jeżeli wskazują na to objawy toksyczne, a także wtedy, gdy mogą być narzędziami krytycznymi działania toksycznego badanej substancji.

1.6.3.2. Badania histopatologiczne

Należy wykonać pełne badania histologiczne skóry normalnej oraz narażanej oraz narzędzi i tkane 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, płuc zwierząt narażonych 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 zauważane. Przeprzewodzone badania histopatologiczne tych narzędzi, 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 narażonych.

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 jakikolwiek typ uszkodzenia. Wyniki powinny być analizowane odpowiednimi metodami statystycznymi. Może być zastosowana każda uznaną metoda statystyczna.

3. SPRAWOZDANIE

3.1. Sprawozdanie z badań

W sprawozdaniu zamieszczana się, z uwzględnieniem zakresu badań, następujące informacje:
- gatunek, szczep, 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 podnieszenia zwierząt do trakcji doświadczenia lub informację, czy zwierzęta przeżyły do końca badania,
- opis efektów toksycznych lub innych efektów,
- czas zaoberwowania każdego nietypowego objawu i czas jego trwania,
- dane dotyczące masy ciała i uzycia 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.