

ДИРЕКТИВА 2000/32/ЕО НА КОМИСИЯТА

от 19 май 2000 година

за привеждане в съответствие с техническия прогрес за двадесет и шести път на Директива 67/548/ЕИО на Съвета относно сближаването на законовите, подзаконовите и административните разпоредби на държавите-членки по отношение на класифицирането, опаковането и етикетиранието на опасни вещества и препарати*

(Текст от значение за ЕИП)

КОМИСИЯТА НА ЕВРОПЕЙСКИТЕ ОБЩНОСТИ

като взе предвид Договора за създаване на Европейската общност,

като взе предвид Директива 67/548/ЕИО на Съвета от 27 юни 1967 г. относно сближаването на законовите, подзаконовите и административни разпоредби относно класификацията, опаковането и етикетиранието на опасни вещества¹, последно изменена с Директива 1999/33/ЕО на Европейския парламент и на Съвета², и по-специално член 28 от нея,

като има предвид, че:

1. Приложение I към Директива 67/548/ЕИО съдържа списък на опасни вещества, заедно с подробности за класификацията и процедурите по етикетиранието по отношение на всяко вещество. Съвременните научни и технически познания са показали, че списъкът с опасни вещества в това приложение следва да се адаптира. Някои езикови варианти на директивата изискват поправки в конкретни части на въведението и на таблица А към приложение I.
2. Приложение III към Директива 67/548/ЕИО съдържа списък на фрази-предупреждения, посочващи естеството на особените рискове, свързани с опасни вещества и препарати. Приложение IV към Директива 67/548/ЕИО съдържа списък на фрази-съвети за безопасност, отнасящи се до опасни вещества и препарати. Приложение VI към Директива 67/548/ЕИО съдържа ръководство за класификацията и етикетиранието на опасни вещества и препарати. Някои езикови варианти на директивата изискват поправки в конкретни раздели на приложения III, IV и VI.

* Приета след 27-та преработка.

¹ ОВ 196, 16.8.1967 г., стр. 1.

² ОВ L 199, 30.7.1999 г., стр. 57.

3. В приложение V към Директива 67/548/ЕИО са посочени методите за определяне на физикохимичните свойства, токсичността и екоотоксичността на веществата и препаратите. Необходимо е това приложение да се приведе в съответствие с техническия прогрес.
4. Приложение IX към Директива 67/548/ЕИО съдържа разпоредбите, отнасящи се до начините за затваряне, безопасни за деца. Тези разпоредби следва да се преработят и актуализират. Необходимо е да се разшири сферата на употреба на начините за затваряне, безопасни за деца.
5. Предвидените в настоящата директива мерки са в съответствие със становището на Комитета по привеждане в съответствие с техническия прогрес на директиви, отнасящи се до премахването на техническите бариери за търговията с опасни вещества и препарати,

ПРИЕ НАСТОЯЩАТА ДИРЕКТИВА :

Член 1

Директива 67/548/ЕИО се изменя, както следва:

1. Приложение I се изменя, както следва:

а) Забележка Р в приложение 1А към настоящата директива заменя съответната забележка в предисловието.

б) Редовете в приложение 1Б към настоящата директива заменят съответните редове в таблица А.

в) Вписванията в приложение 1В към настоящата директива заменят съответните текстове.

г) Добавят се вписванията в приложение 1Г към настоящата директива.

2. Рисковата фраза в приложение 2 към настоящата директива заменя съответната фраза в приложение III.

3. Приложение IV се изменя, както следва:

а) фразите - съвети за безопасност в приложение 3А към настоящата директива заменят съответните фрази в приложение IV.

б) комбинираните фрази-съвети за безопасност в приложение 3Б към настоящата директива заменят съответните фрази в приложение IV.

4. Част 4 от приложение V се изменя, както следва:

а) Текстът в приложение 4А към настоящата директива заменя глава Б10,

б) Текстът в приложение 4Б към настоящата директива заменя глава Б11,

в) Текстът в приложение 4В към настоящата директива заменя глава Б12,

г) Текстът в приложение 4Г към настоящата директива заменя глава Б13 и глава Б14.

- д) Текстът в приложение 4Д към настоящата директива заменя глава Б17.
 - е) Текстът в приложение 4Е към настоящата директива заменя глава Б23. Изменя се съответно заглавието на глава Б23 в обяснителната бележка.
 - ж) Добавя се текста в приложение 4Ж към настоящата директива.
5. Четвъртото тире на общото въведение към част В на приложение V се заличава.
 6. Текстовете в приложение 5 към настоящата директива заменят съответните текстове в приложение VI.
 7. Приложение IX се изменя, както е посочено в приложение 6 към настоящата директива.

Член 2

1. Държавите-членки приемат и публикуват не по-късно от 1 юни 2001 г. необходимите законовите, подзаконови и административни разпоредби, за да се съобразят с настоящата директива. Те незабавно информират Комисията за това.

Когато държавите-членки приемат тези разпоредби, в тях се съдържа позоваване на настоящата директива или то се извършва при официалното им публикуване. Условието и редът на позоваване се определят от държавите-членки.

2. Държавите-членки уведомяват Комисията за текста на основните разпоредби от националното си законодателство в областта, регулирана от настоящата директива, както и таблица на съответствието между разпоредбите на настоящата директива и приетите национални разпоредби.

Настоящата директива влиза в сила на третия ден след публикуването ѝ в *Официален вестник на Европейските общности*.

Член 4

Адресати на настоящата директива са държавите-членки.

Съставено в Брюксел на 19 май 2000 година.

За Комисията:
Margot WALLSTRÖM
Член на Комисията

ПРИЛОЖЕНИЕ 1А

ВЪВЕДЕНИЕ КЪМ ПРИЛОЖЕНИЕ I

Обяснение на бележките относно идентификацията, класификацията и етикетирането на веществата

ДА:

Бележка Q:

Класифицирането, което е предизвикателно за рак, може да се прилага за фибри, които отговарят на следните условия:

- един краткотраен биоперсистенс тест при инхалация е показал, че фибри, които са по-дълги от 20 μm , имат един среден период на полуразпад по-малко от 10 дни
- един краткотраен биоперсистенс тест при интратрахеална инстилация е показал, че фибри, които са по-дълги от 20 μm , имат един среден период на полуразпад по-малко от 40 дни
- един подходящ интра-перитонеален тест не е показал предизвикателно за рак действие, или
- един подходящ дълготраен инхалационен тест не е показал релевантни заболяващо предизвикателно за рак действия или неопластични промени.

SV:

Бележка Q:

Веществото не трябва да се класифицира като канцерогенно, ако може да се докаже, че то отговаря на следните условия:

- един краткотраен тест за определяне на биологичната устойчивост при инхалация е показал, че фибри по-дълги от 20 μm имат един среден период на полуразпад по-малко от 10 дни
- един краткотраен тест за определяне на биологичната устойчивост при интратрахеална инстилация е показал, че фибри по-дълги от 20 μm имат един среден период на полуразпад по-малко от 40 дни
- един подходящ интраперитонеален тест не е дал доказателства за повишен канцерогенитет
- отсъствие на релевантен патогенитет или неопластични промени в един подходящ дълготраен инхалационен тест.

(Не засяга ES версия)

(Не засяга DE версия)

(Не засяга EL версия)

(Не засяга EN версия)

(Не засяга FR версия)

(Не засяга IT версия)

(Не засяга NL версия)

(Не засяга PT версия)

(Не засяга FI версия)

ΠΡΟΛΟΓΗΜΗ 1Β

ΤΑΒΛΙΤΣΑ Α

Z	Ζηακ	ES	DA	DE	EL	EN	FI	FR	IT	NL	PT	SV
„18	Ar	Argón	Argon	Argon	Αργο	Argon	Argon	Argon	Argon	Argon	Árgon	Argon
„64	Gd	Gadolinio	Gadolinium	Gadolinium	Γαδολινιο	Gadolinium	Gadolinium	Gadolinium	Gadolinio	Gadolinium	Gadolinio	Gadolinium

ПРИЛОЖЕНИЕ 1В

Индекс №	Химическо наименование	Бележки към веществата	ЕС номер	CAS номер	Класификация	Етикиране	Граници на концентрация	Бележки към препаратите
006-011-00-7	карбарил (ISO) 1-нафтил метилкарбамат		200-555-0	63-25-2	Кацерог. кат. 3; R40 Xn; R22 N; R50	Xn; N R: 22-40-50 S: (2-)22-24-36/37-46-61		
006-013-00-8	метам-натрий (ISO) натриев метилдитиокарбамат		205-293-0	137-42-8	Xn; R22 R31 C; R34 R43 N; R50-53	C; N R: 22-31-34-43-50/53 S: (1/2-)26-36/37/39-45-60-61		
006-015-00-9	диурон (ISO) 3-(3,4-дихлорфенил)-1,1-диметилкарбамид		206-354-4	330-54-1	Кацерог. кат. 3; R40 Мутаг. кат. 3; R40 Xn; R22-48/22 N; R50-53	Xn; N R: 22-40-48/22-50/53 S: (2-)13-22-23-37-46-60-61		
006-016-00-4	пропоксур (ISO) 2-изопропоксифенил N-метилкарбамат 2-изопропоксифенил метилкарбамат		204-043-8	114-26-1	T; R25 N; R50-53	T; N R: 25-50/53 S: (1/2-)37-45-60-61		
006-017-00-X	алдикарб (ISO) 2-метил-2-(метилтио)пропанал-О-(N-метилкабамоил)оксим		204-123-2	116-06-3	T+; R26/28 T; R24 N; R50-53	T+; N R: 24-26/28-50/53 S: (1/2-)22-36/37-45-60-61		
006-018-00-5	аминокарб (ISO) 4-(диметиламино)-3-толил метилкарбамат		217-990-7	2032-59-9	T; R24/25 N; R50-53	T; N R: 24/25-50/53 S: (1/2-)28-36/37-45-60-61		
006-019-00-0	ди-алат (ISO) S-(2,3-дихлораллил)-N,N-ди-изопропилтиокарбамат		218-961-1	2303-16-4	Кацерог. кат. 3; R40 Xn; R22 N; R50-53	Xn; N R: 22-40-50/53 S: (2-)25-36/37-60-61		

Индекс №	Химическо наименование	Бележки към веществата	ЕС номер	CAS номер	Класификация	Етикиране	Граници на концентрация	Бележки към препаратите
006-020-00-6	барбан (ISO) 4-хлорбут-2-инил N-(3-хлорфенил)карбамат		202-930-4	101-27-9	Xn; R22 R43 N; R50-53	Xn; N R: 22-43-50/53 S: (2-)24-36/37-60-61		
006-023-00-2	меркаптодиметур (ISO) метиокарб 3,5-диметил-4-метилтиофенил N-метилкарбамат		217-991-2	2032-65-7	T; R25 N; R50-53	T; N R: 25-50/53 S: (1/2-)22-37-45-60-61		
006-024-00-8	проксан-натрий (ISO) натриев O-изопропилдитиокарбамат		205-443-5	140-93-2	Xn; R22 Xi; R38 N; R51-53	Xn; N R: 22-38-51/53 S: (2-)13-61		
006-026-00-9	карбофуран (ISO) 2,3-дихидро-2,2-диметилбензофуран-7-ил N-метилкарбамат		216-353-0	1563-66-2	T+; R26/28 N; R50-53	T+; N R: 26/28-50/53 S: (1/2-)36/37-45-60-61		
006-028-00-X	динобутон (ISO) 2-(1-метилпропил)-4,6-динитрофенил-изопропил карбонат		213-546-1	973-21-7	T; R25 N; R50-53	T; N R: 25-50/53 S: (1/2-)37-45-60-61		
006-029-00-5	диоксакарб (ISO) 2-(1,3-диоксолан-2-ил)фенил N-метилкарбамат		230-253-4	6988-21-2	T; R25 N; R51-53	T; N R: 25-51/53 S: (1/2-)37-45-61		
006-033-00-7	метоксурон (ISO) 3-(3-хлор-4-метоксифенил)-1,1-диметилкарбамид		243-433-2	19937-59-8	N; R50-53	N R: 50/53 S: 60-61		
006-034-00-2	пебулат (ISO) N-бутил-N-етил-S-пропилтиокарбамат		214-215-4	1114-71-2	Xn; R22 N; R51-53	Xn; N R: 22-51/53 S: (2-)23-61		
006-035-00-8	пиримикарб (ISO) 5,6-диметил 2-(диметиламино)-пиримидин-4-ил-N,N-диметилкарбамат		245-430-1	23103-98-2	T; R25 N; R50-53	T; N R: 25-50/53 S: (1/2-)22-37-45-60-61		

Индекс №	Химическо наименование	Бележки към веществата	ЕС номер	CAS номер	Класификация	Етикиране	Граници на концентрация	Бележки към препаратите
006-037-00-9	промекарб (ISO) 3-изопропил-5-метилфенил N-метилкарбамаг		220-113-0	2631-37-0	T; R25 N; R50-53	T; N R: 25-50/53 S: (1/2-)24-37-45-60-61		
006-038-00-4	сулфалат (ISO) 2-хлоралил N,N- диметилдитиокарбамаг	E	202-388-9	95-06-7	Кацерог. клас. 2; R45 Xn; R22 N; R50-53	T; N R: 45-22-50/53 S: 53-45-60-61		
006-039-00-X	три-алат (ISO) S-(2,3,3-трихлоралил) N,N-диизопропилтиокарбамаг		218-962-7	2303-17-5	Xn; R22-48/22 R43 N; R50-53	Xn; N R: 22-43-48/22-50/53 S: (2-)24-37-60-61		
006-042-00-6	монурон (ISO) 3-(4-хлорфенил)-1,1- диметилкарбамагид		205-766-1	150-68-5	Кацерог. клас. 3; R40 Xn; R22 N; R50-53	Xn; N R: 22-40-50/53 S: (2-)36/37-60-61		
006-043-00-1	монурон-ТСА 3-(4-хлорфенил)-1,1-диметилурон трихлорацетат		—	140-41-0	Xi; R36/38 Кацерог. клас. 3; R40 N; R50-53	Xn; N R: 36/38-40-50/53 S: (2-)36/37-60-61		
006-045-00-2	метомил (ISO) 1-(метилтио)етилиденамино N-метилкарбамаг		240-815-0	16752-77-5	T+; R28 N; R50-53	T+; N R: 28-50/53 S: (1/2-)22-36/37-45-60-61		
006-046-00-8	бендиокарб (ISO) 2,2-диметил-1,3-бензодиксол-4-ил N-метилкарбамаг		245-216-8	22781-23-3	T; R23/25 Xn; R21 N; R50-53	T; N R: 21-23/25-50/53 S: (1/2-)22-36/37-45-60-61		
006-047-00-3	буфенкарб (ISO) Смес: 3-(1-метилбутил)фенил N-метилкарбамаг и 3-(1-етилпропил)фенил N-метилкарбамаг		—	8065-36-9	T; R24/25 N; R50-53	T; N R: 24/25-50/53 S: (1/2-)28-36/37-45-60-61		
006-048-00-9	етиофенкарб (ISO) 2-(етилтиометил)фенил N-метилкарбамаг		249-981-9	29973-13-5	Xn; R22 N; R50-53	Xn; N R: 22-50/53 S: (2-)60-61		

Индекс №	Химическо наименование	Бележки към веществата	ЕС номер	CAS номер	Класификация	Етикиране	Граници на концентрация	Бележки към препаратите
006-050-00-X	фенурон-ТСА 1,1-диметил-3-фенилуρον трихлорацетат		—	4482-55-7	Xi; R38 N; R50-53	Xi; N R: 38-50/53 S: (2-)60-61		
006-053-00-6	изопрокарб (ISO) 2-изопропилфенил N-метилкарбамат		220-114-6	2631-40-5	Xn; R22 N; R50-53	Xn; N R: 22-50/53 S: (2-)60-61		
006-054-00-1	мексакарбат (ISO) 3,5-диметил-4-(диметиламинофенил) N-метилкарбамат		206-249-3	315-18-4	T+; R28 Xn; R21 N; R50-53	T+; N R: 21-28-50/53 S: (1/2-)36/37-45-60-61		
006-057-00-8	нитрапирин (ISO) 2-хлор-6-трихлорметилпиридин		217-682-2	1929-82-4	Xn; R22 N; R51-53	Xn; N R: 22-51/53 S: (2-)24-61		
006-060-00-4	оксикарбоксин (ISO) 2,3 дихидро 6-метил-5-(N-фенилкарбамоил)-1,4-оксотиин 4,4 диоксид		226-066-2	5259-88-1	Xn; R22 R52-53	Xn R:22-52/53 S: (2-)61		
006-069-00-3	тиофанат-метил (ISO) 1,2-ди(3-(метооксикарбонил)-2-тиоуреидо)бензен		245-740-7	23564-05-8	Мутаг. кат. 3; R40 N; R50-53	Xn; N R: 40-50/53 S: (2-)36/37-60-61		
006-070-00-9	фурмециклокс N-циклохексил-N-метокси-2,5-диметил-3-фурамид		262-302-0	60568-05-0	Кацерог. кат. 3; R40 N; R50-53	Xn; N R: 40-50/53 S: (2-)36/37-60-61		
006-088-00-7	ненфуракарб (ISO) етил-N-[(2,3-дихидро-2,2-диметилбензофуран-7-илоксикарбонил(метил)аминотио)]-N-изопропил-β-аланинат		—	82560-54-1	T; R23/25 N; R50-53	T; N R: 23/25-50/53 S: (1/2-)36/37-45-60-61		

Индекс №	Химическо наименование	Бележки към веществата	ЕС номер	CAS номер	Класификация	Етикиране	Граници на концентрация	Бележки към препаратите
007-012-00-5	N,N'-диметилхидразин 1,1-диметилхидразин	Е	200-316-0	57-14-7	F; R11 Кацерог. кат. 2; R45 T; R23/25 C; R34 N; R51-53	F; T; N R: 45-11-23/25-34-51/53 S: 53-45-61		
007-013-00-0	N,N'-диметилхидразин 1,2-диметилхидразин	Е	—	540-73-8	Кацерог. кат. 2; R45 T; R23/24/25 N; R51-53	T; N R: 45-23/24/25-51/53 S: 53-45-61	C ≥ 25%: T; R45-23/24/25 3% < C < 25%: T; R45-20/21/22 0,01% < C < 3%: T; R45	
009-003-00-1	Флуороводородна киселина... %	В	231-634-8	7664-39-3	T+; R26/27/28 C; R35	T+; C R: 26/27/28-35 S: (1/2-)7/9-26-36/37-45	C ≥ 7%: T+; C; R26/27/28-35 1% ≤ C < 7%: T; R23/24/25-34 0,1% ≤ C < 1%: Xn; R20/21/22-36/37/38	
015-039-00-9	азинфос-метил (ISO) О,О-диметил-4-оксобензотриазин-3-илметил фосфордитиоат		201-676-1	86-50-0	T+; R26/28 T; R24 R43 N; R50-53	T+; N R: 24-26/28-43-50/53 S: (1/2-)28-36/37-45-60-61		
015-048-00-8	фентион (ISO) О,О-диметил-О (4- метилтио -m-толил) фосфоротиоат		200-231-9	55-38-9	Мутаг. кат. 3; R40 T; R23-48/25 Xn; R21/22 N; R50-53	T; N R: 21/22-23-40-48/25-50/53 S: (1/2-)36/37-45-60-61		
015-056-00-1	азинофос-етил (ISO) О,О-диетил 4-оксобензотриазин-3-илметилфосфордитиоат		220-147-6	2642-71-9	T+; R28 T; R24 N; R50-53	T+; N R: 24-28-50/53 S: (1/2-)28-36/37-45-60-61		

Индекс №	Химическо наименование	Бележки към веществата	ЕС номер	CAS номер	Класификация	Етикиране	Граници на концентрация	Бележки към препаратите
015-140-00-8	триазофос (ISO) О,О-диетил-О-1-фенил-1Н-1,2,4- триазол-3-илфосфорогиоат		245-986-5	24017-47-8	T; R23/25 Xn; R21 N; R50-53	T; N R: 21-23/25-50/53 S: (1/2-)36/37-45-60-61		
016-013-00-X	серен дихлорид		234-129-0	10545-99-0	R14 C; R34 N; R50	C; N R: 14-34-50 S: (1/2-)26-36/37/39-45-61	C ≥ 10%: C; R34 5% ≤ C < 10%: Xi; R36/37/38	
016-014-00-5	серен тетрахлорид		—	13451-08-6	R14 C; R34 N; R50	C; N R: 14-34-50 S: (1/2-)26-36/37/39-45-61	C ≥ 10%: C; R34 5% ≤ C < 10%: Xi; R36/37/38	
016-023-00-4	диметил сулфат	E	201-058-1	77-78-1	Кацегог. кат. 2; R45 Мутаг. кат. 3; R40 T+; R26 T; R25 C; R34 R43	T+ R: 45-25-26-34-43 S: 53-45	C ≥ 25%: T+; R45-25-26-34-43 10% ≤ C < 25%: T+; R45-22-26-34-43 7% ≤ C < 10%: T+; R45-22-26-36/37/38-43 5% ≤ C < 7%: T; R45-22-23-36/37/38-43 3% ≤ C < 5%: T; R45-22-23-43 1% ≤ C < 3%: T; R45-23-43 0,1% ≤ C < 1%: T; R45-20 0,01% ≤ C < 0,1%: T; R45	
016-024-00-X	димексано (ISO) бис (метокситиокарбонил)дисулфид		215-993-8	1468-37-7	Xn; R22 N; R50-53	Xn; N R: 22-50/53 S: (2-)60-61		

Индекс №	Химическо наименование	Бележки към веществата	ЕС номер	CAS номер	Класификация	Етикиране	Граници на концентрация	Бележки към препаратите
016-071-00-6	тринариев 3-амино-6,13-дихлор-10-[(3-((4-хлор-6-(2-сулфофениламино)-1,3,5-триазин-2-ил)амино)пропил)амино]-4,11-трифеноксидиоказин дисулфонат		410-130-3	136248-03-8	R43	Xi R: 43 S: (2-)22-24-37		
022-001-00-5	титаниев тетрахлорид		231-441-9	7550-45-0	R14 C; R34	C R: 14-34 S: (1/2-)7/8-26-36/37/39-45	C ≥ 10%: C; R34 5% ≤ C < 10%: Xi; R36/37/38	
030-004-00-8	диметил цинк [1] диетил цинк [2]		208-884-1 [1] 209-161-3 [2]	544-97-8 [1] 557-20-0 [2]	R14 F; R17 C; R34 N; R50-53	F; C; N R: 14-17-34-50/53 S: (1/2-)16-43-45-60-61		
050-002-00-0	циклохексатин (ISO) трициклохексилстанан трициклохексилкалаен хидроксид		236-049-1	13121-70-5	Xn; R20/21/22 N; R50-53	Xn; N R: 20/21/22-50/53 S: (2-)13-60-61		
050-012-00-5	тетрациклохексилстанан [1] хлор(трициклохексил)станан [2] бутил(трициклохексил)станан [3]		215-910-5 [1] 221-437-5 [2] 230-358-5 [3]	1449-55-4 [1] 3091-32-5 [2] 7067-44-9 [3]	Xn; R20/21/22 N; R50-53	Xn; N R: 20/21/22-50/53 S: (2-)26-28-60-61	C ≥ 1%: Xn; R20/21/22	1
050-017-00-2	фенбутагиноксид (ISO) бис(трис(2-метил-2-фенилпропил)-калаен оксид		236-407-7	13356-08-6	T+; R26 Xi; R36/38 N; R50/53	T+; N R: 26-36/38-50/53 S: (1/2-)28-36/37-45-60-61		
082-009-00-X	Жълто – оловен сулфохромот C1 Пигмент Жълто 34 (Това вещество се идентифицира в Цветовия Индекс № с Конституционен номер C1 77603)		215-693-7	1344-37-2	Caenor. cat. 3; R40 Repr. cat. 1; R61 Repr. cat. 3; R62 R33 N; R50-53	T; N R: 61-33-40-50/53-62 S: 53-45-60-61		1

Индекс №	Химическо наименование	Бележки към веществата	ЕС номер	CAS номер	Класификация	Етиктиране	Граници на концентрация	Бележки към препаратите
082-010-00-5	Червено - оловно-хроматен молибдатен сулфат CI Пигмент Червено 104 (Това вещество се идентифицира в Цветовия Индекс № с Конституционен номер CI 77605)		235-759-9	12656-85-8	Кацерог. кат. 3; R40 Repr. kat. 1; R61 Repr. kat. 3; R62 R33 N; R50-53	T; N R: 61-33-40-50/53-62 S: 53-45-60-61		1
601-024-00-X	кумол [1] пропилбензен [2]		202-704-5 [1] 203-132-9 [2]	98-82-8 [1] 103-65-1 [2]	R10 Xn; R65 Xi; R37 N; R51-53	Xn; N R: 10-37-51/53-65 S: (2-)24-37-61-62		4
601-032-00-3	бензо[a]пирен бензо[def]хризен		200-028-5	50-32-8	Кацерог. кат. 2; R45 Мутаг. кат. 2; R46 Repr. kat. 2; R60-61 N; R50-53	T; N R: 45-46-60-61-50/53 S: 53-45-60-61		
601-034-00-4	бензо[e]ацефенантрилен		205-911-9	205-99-2	Кацерог. кат. 2; R45 N; R50-53	T; N R: 45-50/53 S: 53-45-60-61		
602-035-00-2	1,4-дихлорбензен p-дихлорбензен		203-400-5	106-46-7	Xi; R36 N; R50-53	Xi; N R: 36-50/53 S: (2-)24/25-46-60-61		
602-054-00-6	3-йодпропен алил йодид		209-130-4	556-56-9	R10 C; R34	C R: 10-34 S: (1/2-)7-26-45		

Индекс №	Химическо наименование	Бележки към веществата	ЕС номер	CAS номер	Класификация	Етикиране	Граници на концентрация	Бележки към препаратите
603-076-00-9	бут-2-ин-1,4-диол 2-бутин-1,4-диол		203-788-6	110-65-6	T; R23/25 Xn; R21-48/22 C; R34	T R: 21-23/25-34-48/22 S: (1/2-)26-36/37/39-45	C ≥ 50%: T; R21-23/25-34-48/22 25% ≤ C < 50%: T; R21-23/25-36/38-48/22 10% ≤ C < 25%: Xn; R20/22-48/22 3% ≤ C < 10%: Xn; R20/22	
603-091-00-0	екзо-1-метил-4-(1-метилетил)-7-оксабицикло[2.2.1]хептан-2-ол		402-470-6	87172-89-2	O; R8 Xn; R22 Xi; R36	O; Xn R: 8-22-36 S: (2-)26		
603-093-00-1	екзо-(±)-1-метил-4-(1-метилетил)-2-[(2-метилфенил)метокси]-7-оксабицикло[2.2.1]хептан		402-410-9	87818-31-3	Xn; R20 N; R51-53	Xn; N R: 20-51/53 S: (2-)23-61		
603-097-00-3	1,1',1"-нигритотрипропан-2-ол триизопропаноламин		204-528-4	122-20-3	Xi; R36 R52-53	Xi R:36-52/53 S: (2-)26-61		
603-117-00-0	пропан-2-ол изопропилалкохол изопропанол		200-661-7	67-63-0	F; R11 Xi; R36 R67	F; Xi R: 11-36-67 S: (2-)7-16-24/25-26		6
604-020-00-6	бифенил-2-ол 2-хидроксибифенил 2-фенилфенол (ISO)		201-993-5	90-43-7	Xi; R36/37/38 N; R50	Xi; N R: 36/37/38-50 S: (2-)22-61		
604-021-00-1	2-фенилфенол, натриева сол натриев 2-фенилфенолат		205-055-6	132-27-4	Xn; R22 Xi; R37/38-41 N; R50	Xn; N R: 37/38-41-50 S: (2-)22-26-61		

Индекс №	Химическо наименование	Бележки към веществата	ЕС номер	CAS номер	Класификация	Етикиране	Граници на концентрация	Бележки към препаратите
604-024-00-8	4,4'-изобутилетилендифенол или 2,2-бис(4-хидроксфенил)-4-метилпентан		401-720-1	6807-17-6	Repr. kat. 2; R60 Xi; R36 N; R50-53	T; N R: 60-36-50/53 S: 53-45-60-61		
604-041-00-0	ацифлуорфен [1] ацифлуорфен -натрий [2] 5-[2-хлор-4-(трифлуорметил)фенокси]-2-нитробензоена киселина [1] натрий-5-[2-хлор-4-(трифлуорметил)фенокси]-2-нитробензоат [2]		256-634-5 [1] 263-560-7 [2]	50594-66-6 [1] 62476-59-9 [2]	Xn; R22 Xi; R38-41 N; R50-53	Xn; N R: 22-38-41-50/53 S: (2-)24-39-60-61		
604-043-00-1	монобензон 4-хидроксифенил бензил етер хидрохинон монобензил етер		203-083-3	103-16-2	Xi; R36 R43	Xi R: 36-43 S: (2-)24/25-26-37		
604-044-00-7	мехинол 4-метоксифенол хидрохинон монометил етер		205-769-8	150-76-5	Xn; R22 Xi; R36 R43	Xn R: 22-36-43 S: (2-)24/25-26-37/39-46		
605-016-00-7	глиокзал ... % етандиал ... %	B	203-474-9	107-22-2	Мутаг. kat. 3; R40 Xn; R20 Xi; R36/38 R43	Xn R: 20-36/38-40-43 S: (2-)36/37	C ≥ 10%: Xn; R20-36/38-40-43 1 % ≤ C < 10%: Xn; R40-43	
606-016-00-X	пиндон(ISO) 2-пивалолилиндан-1,3-дион		201-462-8	83-26-1	T; R25-48/25 N; R50-53	T; N R: 25-48/25-50/53 S: (1/2-)37-45-60-61		
606-018-00-0	дихлон (ISO) 2,3-дихлор-1,4-нафтохинон		204-210-5	117-80-6	Xn; R22 Xi; R36/38 N; R50-53	Xn; N R: 22-36/38-50/53 S: (2-)26-60-61		
606-019-00-6	хлордекон (ISO) перхлорпентацикло[5.3.0.0 ^{2,6} .0 ^{3,9} .0 ^{4,8}] декан-5-он декахлорпентацикло[5.2.1.0 ^{2,6} .0 ^{3,9} .0 ^{5,8}]] декан-4-он		205-601-3	143-50-0	Кацерог. kat. 3; R40 T; R24/25 N; R50-53	T; N R: 24/25-40-50/53 S: (1/2-)22-36/37-45-60-61		

Индекс №	Химическо наименование	Бележки към веществата	ЕС номер	CAS номер	Класификация	Етикиране	Граници на концентрация	Бележки към препаратите
606-034-00-8	метрибузин (ISO) 4-амино-6- <i>трет</i> -бутил-3-(метилтио)-1,2,4-триазин-5(4H)-он 4-амино-4,5-дихидро-6-(1,1-диметилетил)-3-метилтио-1,2,4-триазин-5-он		244-209-7	21087-64-9	Xn; R22 N; R50-53	Xn; N R: 22-50/53 S: (2-)60-61		
606-035-00-3	хлоридазон (ISO) 5-амино-4-хлор-2-фенилпиридазин-3(2H)-он пиразон		216-920-2	1698-60-8	R43 N; R50-53	Xi; N R: 43-50/53 S: (2-)24-37-60-61		
606-036-00-9	кинометионат хинометионат (ISO) 6-метил-1,3-дифтиоло(4,5- <i>b</i>)-хиноксалин-2-он		219-455-3	2439-01-2	Repr. kat. 3; R62 Xn; R20/21/22-48/22 Xi; R36 R43 N; R50-53	Xn; N R: 20/21/22-36-43-48/22-50/53-62 S: (2-)24-37-60-61		
606-037-00-4	тридимефон (ISO) 1-(4-хлорфенокси)-3,3-диметил-1-(1,2,4-триазол-1-ил)бутан-2-он		256-103-8	43121-43-3	Xn; R22 N; R51-53	Xn; N R: 22-51/53 S: (2-)61		
606-044-00-2	2,4,6-триметилбензофенон		403-150-9	954-16-5	Xn; R22 Xi; R36 N; R50-53	Xn; N R: 22-36-50/53 S: (2-)26-60-61		
607-043-00-X	дикамба (ISO) 2,5-дихлор-6-метоксибензоена киселина 3,6-дихлор-2-метоксибензоена киселина		217-635-6	1918-00-9	Xn; R22 Xi; R41 R52-53	Xn; N R: 22-41-52/53 S: (2-)26-61		
607-057-00-6	кумахлор (ISO) 3-[1-(4-хлорфенил)-3-оксобутил]-4-хидроксикумарин		201-378-1	81-82-3	Xn; R48/22 R52-53	Xn R:48/22-52/53 S: (2-)37-61		
607-058-00-1	кумафурил (ISO) фумарин (<i>RS</i>)-3-[1-(2-furyl)-3-оксобутил]-4-хидроксикумарин 4-хидрокси-3-[3-оксо-1-(2-фурил)бутил] кумарин		204-195-5	117-52-2	T; R25-48/25 R52-53	T R:25-48/25-52/53 S: (1/2-)37-45-61		

Индекс №	Химическо наименование	Бележки към веществата	ЕС номер	CAS номер	Класификация	Етикиране	Граници на концентрация	Бележки към препаратите
607-079-00-6	келеван (ISO) етил-4-оксо-5-(перхлор-5- хидроксипентацикло[5.3.0.0 ^{2,6} .0 ^{3,9} .0 ^{4,8}]декан-5-ил)-4 оксопентаноат етил-5-(1,2,3,5,6,7,8,9,10,10- декахлор-4-хидроксипентацикло [5.2.1.0 ^{2,6} .0 ^{3,9} .0 ^{5,8}]декан-4-ил)-4- оксовалерат		—	4234-79-1	T; R24 Xn; R22 N; R51-53	T; N R: 22-24-51/53 S: (1/2-)36/37-45-61		
607-097-00-4	тримелитов анхидрид на бензен- 1,2,4-трикарбоксилна киселина 1,2- анхидрид		209-008-0	552-30-7	Xi; R37-41 R42/43	Xn R: 37-41-42/43 S: (2-)22-26-36/37/39		
607-143-00-3	валерианова киселина		203-677-2	109-52-4	C; R34 R52-53	C R:34-52/53 S: (1/2-)26-36-45-61		
607-152-00-2	2,3,6-ТВА (ISO) 2,3,6-трихлорбензоатна киселина беназолин		200-026-4	50-31-7	Xn; R22 N; R51-53	Xn; N R: 22-51/53 S: (2-)61		
607-153-00-8	беназолин (ISO) (4-хлор-2,3-дихидро-2-оксо 1,3- бензотиазол-3-ил)оцетна киселина		223-297-0	3813-05-6	Xi; R36/38 R52-53	Xi R:36/38-52/53 S: (2-)22-61		
607-156-00-4	хлорфенсон (ISO) 4-хлорфенил-4-хлорбензенсулфонат		201-270-4	80-33-1	Xn; R22 Xi; R38 N; R50-53	Xn; N R: 22-38-50/53 S: (2-)37-60-61		
607-158-00-5	натриева сол на хлороцетна киселина натриев хлорацетат		223-498-3	3926-62-3	T; R25 Xi; R38 N; R50	T; N R: 25-38-50 S: (1/2-)22-37-45-61		
607-159-00-0	хлорбензилат(ISO) етил-2,2-ди(4-хлорфенил)-2- хидроксиацетат етил-4,4'-дихлорбензилат		208-110-2	510-15-6	Xn; R22 N; R50-53	Xn; N R: 22-50/53 S: (2-)60-61		

Индекс №	Химическо наименование	Бележки към веществата	ЕС номер	CAS номер	Класификация	Етикиране	Граници на концентрация	Бележки към препаратите
607-176-00-3	Смес от: α -(3-(3-(2H-бензотриазол-2-ил)-5-трет-бутил-4-хидроксифенил)пропионил)- ω -хидроксиполи(окситилен); α -(3-(3-(2H-бензотриазол-2-ил)-5-трет-бутил-4-хидроксифенил)пропионил)- ω -3-(3-(2H-бензотриазол-2-ил)-5-трет-бутил-4-хидроксифенил)пропионилоксиполи(окситилен)		400-830-7	—	R43 N; R51-53	Xi; N R: 43-51/53 S: (2-)36/37-61		
607-188-00-9	хидроген натрий-N-карбосилатоетил-N-октадец-9-енилмалеамат		402-970-4	—	R43 N; R51-53	Xi; N R: 43-51/53 S: (2-)24/37-61		
607-209-00-1	Смес от: O,O'-ди(1-метилетил)тридио-бис-тиоформат; O,O'-ди(1-метилетил)тетратио-бис-тиоформат; O,O'-ди(1-метилетил)пентатио-бис-тиоформат		403-030-6	—	Xn; R22 R43 N; R50-53	Xn; N R: 22-43-50/53 S: (2-)36/37-60-61		
607-213-00-3	етил-3,3-бис[1,1-диметилпропил)перокси]бутират		403-320-2	67567-23-1	E; R2 O; R7 R10 N; R51-53	E; N R: 2-7-10-51/53 S: (2-)37-14-33-36/37/39-61		
607-217-00-5	2-епоксиетил-2-[4-(2,6-дихидро-2,6-диоксо-7-фенил-1,5-диоксаиндацен-3-ил)феноксид]ацетат		403-960-2	—	R43 R53	Xi R: 43-53 S: (2-)24-37-61		
607-243-00-7	натриев 3,6-дихлоро-о-анизат [1] 3,6-дихлоро-о-анизова киселина, съединение с 2,2'-иминодиетанол (1:1) [2] 3,6-дихлоро-о-анизова киселина, съединение с 2-аминоетанол (1:1) [3]		217-846-3 [1] 246-590-5 [2] 258-527-9 [3]	1982-69-0 [1] 25059-78-3 [2] 53404-28-7 [3]	R52-53	R: 52/53 S: 61		
607-248-00-4	нафталам -натрий натриев N-нафт-1-илфталамат		205-073-4	132-67-2	Xn; R22	Xn R: 22 S: (2)		

Индекс №	Химическо наименование	Бележки към веществата	ЕС номер	CAS номер	Класификация	Етиктиране	Граници на концентрация	Бележки към препаратите
607-249-00-X	(1-метил-1,2-етандиил)бис[окси(метил-2,1-етандиил)диакрилат трипропиленглико диакрилат TPGDA		256-032-2	42978-66-5	Xi; R36/37/38 R43 N; R51-53	Xi; N R:36/37/38-43-51/53 S: (2-)24-37-61	$C \geq 10\%$: Xi; R36/37/38-43 $1\% \leq C < 10\%$: Xi; R43	
607-252-00-6	ламбда-цихалотрин(ISO) Смес (1:1) от : (S)-алфа-циано-3-феноксibenзил(Z)-(1R)- <i>cis</i> -3-(2-хлор-3,3,3-трифлуоропропенил)-2,2-диметилциклопропанкарбоксилат и (R)-алфа-циано-3-феноксibenзил(Z)-(1S)- <i>cis</i> -3-(2-хлор-3,3,3-трифлуоропропенил)-2,2-диметилциклопропанкарбоксилат		415-130-7	91465-08-6	T+; R26 T; R25 Xn; R21 N; R50-53	T+; N R: 21-25-26-50/53 S: (1/2-)28-36/37/39-38-45-60-61		
607-255-00-2	флуороксигир (ISO) 4-амино-3,5-дихлор-6-флуоро-2-пиридилоксиоцетна киселина		—	69377-81-7	R52-53	R: 52/53 S: 61		
608-003-00-4	акрилонитрил	D E	203-466-5	107-13-1	F; R11 Кацеров. кат. 2; R45 T; R23/24/25 Xi; R37/38-41 R43 N; R51-53	F; T; N R: 45-11-23-/24/25-37/38-41-43-51/53 S: 9-16-53-45-61	$C \geq 20\%$: T; R45-23/24/25-37/38-41-43 $10\% \leq C < 20\%$: T; R45-23/24/25-41-43 $5\% \leq C < 10\%$: T; R45-23/24/25-36-43 $1\% \leq C < 5\%$: T; R45-23/24/25-43 $0,2\% \leq C < 1\%$: T; R45-20/21/22 $0,1\% \leq C < 0,2\%$: T; R45	
608-016-00-5	1,4 дициано-2,3,5,6-тетрахлорбензен		401-550-8	1897-41-2	R43 N; R50-53	Xi; N R: 43-50/53 S: (2-)24-37-60-61		

Индекс №	Химическо наименование	Бележки към веществата	ЕС номер	CAS номер	Класификация	Етикиране	Граници на концентрация	Бележки към препаратите
609-030-00-4	динотерб (ISO) 2-трет-бутил-4,6-динитрофенол	Е	215-813-8	1420-07-1	Repr. kat. 2; R61 T+; R28 T; R24 R44 N; R50-53	T+; N R: 61-24-28-44-50/53 S: 53-45-60-61		
609-040-00-9	нитрофен (ISO) 2,4-дихлорфенил 4-нитрофенил етер	Е	217-406-0	1836-75-5	Кацегог. kat. 2; R45 Repr. kat. 2; R61 Xn; R22 N; R50-53	T; N R: 45-61-22-50/53 S: 53-45-60-61		
609-044-00-0	тегнацен (ISO) 1,2,4,5-тетрахлор-3-нитробензен		204-178-2	117-18-0	Xn; R22 R43 N; R50-53	Xn; N R: 22-43-50/53 S: (2-)24-37-60-61		
611-008-00-4	4-аминоазобензен 4-(фенилазо)анилин		200-453-6	60-09-3	Кацегог. kat. 2; R45 N; R50-53	T; N R: 45-50/53 S: 53-45-60-61		
611-013-00-1	трилигиев 1-хидрокси-7-(3-сулфонатоанилино)-2-(3-метил-4(2-метокси-4-(3-сулфонатофенилазо)фенилазо)фенилазо)нафтаден-3-сулфонат		403-650-7	117409-78-6	E; R2 N; R51-53	E; N R: 2-51/53 S: (2-)35-61		
611-031-00-X	4,4'-(4-иминциклохекса-2,5-диенилиденметил)дианилин хидрохлорид CI Базово червено 9		209-321-2	569-61-9	Кацегог. kat. 2; R45	T R: 45 S: 53-45		
612-035-00-4	2-метоксианилин о-анизидин	Е	201-963-1	90-04-0	Кацегог. kat. 2; R45 Мутаг. kat. 3; R40 T; R23/24/25	T R: 45-23/24/25 S: 53-45		
612-042-00-2	бензидин 1,1'-бифенил-4,4'-диамин 4,4'-диаминобифенил бифенил-4,4'-илендиамин	Е	202-199-1	92-87-5	Кацегог. kat. 1; R45 Xn; R22 N; R50-53	T; N R: 45-22-50/53 S: 53-45-60-61	C ≥ 25%: T; R45-22 0,01% ≤ C < 25%: T; R45	

Индекс №	Химическо наименование	Бележки към веществата	ЕС номер	CAS номер	Класификация	Етиктиране	Граници на концентрация	Бележки към препаратите
612-051-00-1	4,4'-диаминодифенилметан 4,4'-метилендианилин	Е	202-974-4	101-77-9	Кацегог. кат. 2; R45 Мутаг. кат. 3; R40 Т; R39/23/24/25Xn; R48/20/21/22 R43 N; R51-53	Т; N R: 45-39/23/24/25-43-48/20/21/22-51/53 S:53-45-61		
612-081-00-5	Соли на 4,4'-би-о-толуидин Соли на 3,3'-диметилбензидин Соли на о-толуидин	А Е	210-322-5 265-294-7 277-985-0	612-82-8 64969-36-4 74753-18-7	Кацегог. кат. 2; R45 Xn; R22 N; R51-53	Т; N R: 45-22-51/53 S: 53-45-61		
612-099-00-3	4-метил-т-фенилендиамин 2,4-толуендиамин	Е	202-453-1	95-80-7	Кацегог. кат. 2; R45 Т; R25 Xn; R21 Xi; R36 R43 N; R51-53	Т; N R: 45-21-25-36-43-51/53 S: 53-45-61		
612-105-00-4	2-пиперазин-1-илетиламин		205-411-0	140-31-8	Xn; R21/22 C; R34 R43 R52-53	С R: 21/22-34-43-52/53 S: (1/2-)26-36/37/39-45-61		
612-111-00-7	2-метил-т-фенилендиамин 2,6-толуендиамин		212-513-9	823-40-5	Мутаг. кат. 3; R40 Xn; R21/22 R43 N; R51-53	Xn; N R: 21/22-40-43-51/53 S: (2-)24-36/37-61		
612-125-00-3	2-метил-р-фенилендиамин 2,5-толуендиамин		202-442-1	95-70-5	Т; R25 Xn; R20/21 R43 N; R51-53	Т; N R: 20/21-25-43-51/53 S: (1/2-)24-37-45-61		

Индекс №	Химическо наименование	Бележки към веществата	ЕС номер	CAS номер	Класификация	Етикиране	Граници на концентрация	Бележки към препаратите
612-144-00-7	флуметралин (ISO) N-(2-хлор-6-флуорбензил)-N-етил-алфа, алфа, алфа-трифлуоро-2,6 динитро- <i>p</i> -толуидин		—	62924-70-3	Xi; R36/38 R43 N; R50-53	Xi; N R: 36/38-43-50/53 S: (2-)36/37-60-61		
612-151-00-5	диаминотолуен	Е	246-910-3	25376-45-8	Кацерог. кат. 2; R45 T; R25 Xn; R20/21 Xi; R36 R43 N; R51-53	T; N R: 45-20/21-25-36-43-51/53 S: 53-45-61		
613-018-00-4	морфамкват (ISO) 1,1'-бис(3,5-диметилморфолинкарбонил-метил)-4,4'-бипиридилиев йон		—	7411-47-4	Xn; R22 Xi; R36/37/38 R52-53	Xn R: 22-36/37/38-52/53 S: (2-)22-36-61		
613-031-00-5	симклозен трихлоризоцианурова киселина трихлор-1,3,5-триазинтрион		201-782-8	87-90-1	O; R8 Xn; R22 R31 Xi; R36/37 N; R50-53	O; Xn; N R: 8-22-31-36/37-50/53 S: (2-)8-26-41-60-61		
613-038-00-3	6-фенил-1,3,5-триазин-2,4-диилдиамин 6-фенил-1,3,5- триазин -2,4-диамин бензогуанамин		202-095-6	91-76-9	Xn; R22 R52-53	Xn R:22-52/53 S: (2-)61		
613-042-00-5	имазалил (ISO) 1-[2-(алилюкси)етил-2-(2,4-дихлорфенил)етил]-1H-имидазол		252-615-0	35554-44-0	Xn; R20/22 N; R41 N; R50-53	Xn; N R: 20/22-41-50/53 S: (2-)26-39-60-61		
613-043-00-0	имазалил сулфат (ISO) 1-[2-(алилюкси)етил-2-(2,4-дихлорфенил)]-1H-имидазол-хидроген сулфат [1] (±)-1-[2-(алилюкси)етил-2-(2,4-дихлорфенил)]-1H- имидазол-хидроген сулфат[2]		261-351-5 [1] 281-291-3 [2]	58594-72-2 [1] 83918-57-4 [2]	Xn; R20/22 Xi; R41 N; R50-53	Xn; N R: 20/22-41-50/53 S: (2-)26-39-60-61		

Индекс №	Химическо наименование	Бележки към веществата	ЕС номер	CAS номер	Класификация	Етиктиране	Граници на концентрация	Бележки към препаратите
613-066-00-6	тербутетон (ISO) 2-трет-бутиламино-4-етиламино-6-метокси-1,3,5-триазин		251-637-8	33693-04-8	Xn; R22 N; R50-53	Xn; N R: 22-50/53 S: (2-)60-61		
613-091-00-2	марфамкват дихлорид [1] марфамкват сулфат [2]		225-062-8 [1]	4636-83-3 [1] 29873-36-7 [2]	Xn; R22 Xi; R36/37/38 R52-53	Xn; R: 22-36/37/38-52/53 S: (2-)22-36-61		
613-098-00-0	N-(n-октил)-2-пиролидинон		403-700-8	2687-94-7	C; R34 N; R51-53	C; N R: 34-51/53 S: (1/2-)23-26-36/37/39-45-61		
613-130-00-3	хексаюназол (ISO) (RS)-2-(2,4-дихлорфенил)-1-(1H-1,2,4-триазол-1-ил)хексан-2-ол		—	79983-71-4	R43 N; R51-53	Xi; N R: 43-51/53 S: (2-)24-37-61		
613-131-00-9	пирохиолон (ISO) 1,2,5,6-тетраhydro[3,2,1-ij]хинолин-4-он		—	57369-32-1	Xn; R22 R52-53	Xn R:22-52/53 S: (2-)61		
613-134-00-5	миколбутанил (ISO) 2-(4-хлорфенил)-2-[(1H-1,2,4-триазол-1-илметил)хексаннитрил		—	88671-89-0	Repr. kat. 3; R63 Xn; R22 Xi; R36 N; R51-53	Xn; N R: 22-36-51/53-63 S: (2-)36/37-46-61		
613-137-00-1	метабензтриазурон (ISO) 1-(1,3-бензотриазол-2-ил)1,3-диметилкарбамид		242-505-0	18691-97-9	N; R50-53	N R: 50/53 S: 60-61		
613-139-00-2	метсулфорон-метил метил 2-(4-метокси-6-метил-1,3,5-триазин-2-илкарбамоилсулфамойл)бензоат		—	74223-64-6	N; R50-53	N R: 50/53 S: 60-61		

Индекс №	Химическо наименование	Бележки към веществата	ЕС номер	CAS номер	Класификация	Етикиране	Граници на концентрация	Бележки към препаратите
614-001-00-4	никотин (ISO) 3-(N-метил-2-пиролидинил)пиридин		200-193-3	54-11-5	T+; R27 T; R25 N; R51-53	T+; N R: 25-27-51/53 S: (1/2-)36/37-45-61		
614-006-00-1	бруцин 2,3-диметоксистрихин		206-614-7	357-57-3	T+; R26/28 R52-53	T+ R:26/28-52/53 S: (1/2-)13-45-61		
614-007-00-7	бруцин сулфат [1] бруцин нитрат [2] Стрихнин-10-он, 2,3-диметокси- моно[(R)-1-метилхептил 1,2- бензендикарбоксилат] [3] Стрихнин-10-он, 2,3-диметокси- съединение с (S)-моно(1- метилхептил-1,2-бензен- дикарбоксилат (1:1) [4]		225-432-9 [1] 227-317-9 [2] 269-439-5 [3] 269-710-8 [4]	4845-99-2 [1] 5786-97-0 [2] 68239-26-9 [3] 68310-42-9 [4]	T+; R26/28 R52-53	T+ R: 26/28-52/53 S: (1/2-)13-45-61		
615-006-00-4	2-метил- <i>m</i> -фенилен диизоцианат [1] 4-метил- <i>m</i> -фенилен диизоцианат [2] <i>m</i> -толилиден диизоцианат [3] толуен-2,6-диизоцианат [1] толуен-2,4-диизоцианат [2] толуен-диизоцианат [3]	C	202-039-0 [1] 209-544-5 [2] 247-722-4 [3]	91-08-7 [1] 584-84-9 [2] 26471-62-5 [3]	Кацеров. кат. 3; R40 T+; R26 Xi; R36/37/38 R42/43 R52-53	T+ R: 26-36/37/38-40-42/43- 52/53 S: (1/2-)23-36/37-45-61	C≥20%: T+; R26-36/37/38-40-42/43 7% ≤ C < 20%: T+; R26-40-42/43 1% ≤ C < 7%: T; R23-40-42/43 0,1% ≤ C < 1%: Xn; R20-42	2
616-010-00-9	тозилхлорамид натрий		204-854-7	127-65-1	Xn; R22 R31 C; R34 R42	C R: 22-31-34-42 S: (1/2-)7-22-26-36/37/39- 45		
616-034-00-X	пирокарбонид (ISO) 3,4-дихидро-6-метил-2H-пиран-5- карбоканилид		246-419-4	24691-76-7	R52-53	R: 52/53 S: 61		
616-035-00-5	цимоксанил 2-циано-N-[(етиламино)карбонил]-2- (метоксимино)ацетамид		261-043-0	57966-95-7	Xn; R22 R43 N; R50-53	Xn; N R: 22-43-50/53 S: (2-)36/37-60-61		

Индекс №	Химическо наименование	Бележки към веществата	ЕС номер	CAS номер	Класификация	Етиктиране	Граници на концентрация	Бележки към препаратите
617-004-00-9	1,2,3,4-тетрахидро-1-нафтил хидропероксид		212-230-0	771-29-9	O; R7 Xn; R22 C; R34 N; R50-53	O; C; N R: 7-22-34-50/53 S:(1/2-)3/7-14-26-36/37/39-45-60-61	C \geq 25 %: C; R22-34 10% \leq C < 25%: C; R34 5% \leq C < 10%: Xi; R36/37/38	
617-006-00-X	бис(α,α -диметилбензил) пероксид		201-279-3	80-43-3	O; R7 Xi; R36/38 N; R51-53	O; Xi; N R: 7-36/38-51/53 S: (2-)3/7-14-36/37/39-61		
617-008-00-0	дибензоил пероксид бензоил пероксид		202-327-6	94-36-0	E; R2 Xi; R36 R43	E; Xi; R: 2-36-43 S: (2-)3/7-14-36/37/39		
650-007-00-3	хлордимерформ (ISO) N^2 -(4-хлор- <i>o</i> -толил)- N^1,N^1 - диметилформамидин		228-200-5	6164-98-3	Кацерог. кат. 3; R40 Xn; R21/22 N; R50-53	Xn; N R: 21/22-40-50/53 S: (2-)22-36/37-60-61		
650-008-00-9	дразоксолон (ISO) 4-(2-хлорфенилхидразон]-3-метил-5- изоксазол		227-197-8	5707-69-7	T; R25 N; R50-53	T; N R: 25-50/53 S: (1/2-)22-24-36/37-45-60-61		
650-009-00-4	хлордимерформ хидрохлорид N^1 -(4-хлор- <i>o</i> -толил)- N,N - диметилформамидинхидрохлорид N^2 -(4-хлор- <i>o</i> -толил)- N^1,N^1 - диметилформамидинхидрохлорид		243-269-1	19750-95-9	Кацерог. кат. 3; R40 Xn; R22 N; R50-53	Xn; N R: 22-40-50/53 S: (2-)22-36/37-60-61		
650-033-00-5	есфенвалерат (ISO) (<i>S</i>)- α -циано-3-феноксibenзил-(<i>S</i>)-2- (4-хлорфенил)-3-метилбутират		—	66230-04-4	T; R23/25 R43 N; R50-53	T; N R: 23/25-43-50/53 S: (1/2-)24-36/37/39-45-60-61		
650-041-00-9	триаулуфурон (ISO) 1-[2-(2-хлоретокси)фенилсулфонил]- 3-(4-метокси-6-метил-1,3,5-триазин- 2-ил)карбамид		—	82097-50-5	N; R50-53	N R: 50/53 S: 60-61		

ПРИЛОЖЕНИЕ 1Г

Индекс №	Химическо наименование	Бележки към веществата	ЕС номер	CAS номер	Класификация	Етикиране	Граници на концентрация	Бележки към препаратите
006-090-00-8	2-(3-йодопроп-2-ин-1-илокси)етил фенилкарбамат		408-010-0	88558-41-2	Xn; R20 Xi; R41 R52-53	Xn R: 20-41-52/53 S: (2-)22-26-39-61		
014-016-00-0	Смес от: 1,3-дихекс-5-ен-1-ил-1,1,3,3-тетраметилдисулксан и 1,3-дихекс-п-ен-1-ил-1,1,3,3-тетраметилдисулксан		406-490-6	—	N; R51-53	N R: 51/53 S: 61		
015-164-00-9	калциев-Р,Р'(1-хидроксиетилен)бис(дихидрогенфосфо нат)дихидрат		400-480-5	36669-85-9	R52-53	R:52/53 S: 61		
015-165-00-4	Смес от: тиобис(4,1-фенилен)-S,S,S',S'-тетрафенилдисулфониумбисхексафлуоро фосфат; дифенил(4-фенилтиофеил)сулфониум хексафлуорофосфат		404-986-7	—	Xi; R41 N; R50-53	Xi; N R: 41-50/53 S: (2-)15-26-39-60-61		
015-166-00-X	3,9-бис(2,6-ди- <i>трет</i> -бутил-4-метилфенокси)-2,4,8,10-тетраокса-3,9-дифосфаспиро[5.5]ундекан		410-290-4	80693-00-1	R53	R:53 S: 61		
015-167-00-5	3-(хидроксифенилфосфинил)пропанова киселина		411-200-6	14657-64-8	Xi; R41	Xi R: 41 S: (2-)26-39		
601-050-00-1	бензен C ₁₀ -C ₁₃ -алкилни деривати		267-051-0	67774-74-7	N; R50	N R: 50 S: 61		
601-051-00-7	4-фенилбут-1-ен		405-980-7	768-56-9	Xi; R38 N; R51-53	Xi; N R: 38-51/53 S: (2-)37-61		
602-083-00-4	дифенил етер пентапентабромо дериват пентабромодеифенил етер		251-084-2	32534-81-9	Xn; R48/21/22 R64 N; R50-53	Xn; N R: 48/21/22-50/53-64 S: (1/2-)36/37-45-60-61		
602-084-00-X	1,1-дихлор-1-флуоретан		404-080-1	1717-00-6	N; R52-53-59	N R: 52/53-59 S: 59-61		
603-128-00-0	2-(фенилметокси)нафтаден		405-490-3	613-62-7	R53	R:53 S: 61		
603-129-00-6	1- <i>трет</i> -бутоксипропан-2-ол		406-180-0	57018-52-7	R10 Xi; R41	Xi R: 10-41 S: (2-)26-39		
603-130-00-1	Смес от изомери на : α-(диметил)бифенилил)-ω-хидроксиполи (окснетилен)		406-325-8	—	Xn; R22 R52-53	Xn R:22-52/53 S: (2-)39-61		

Индекс №	Химическо наименование	Бележки към веществата	ЕС номер	CAS номер	Класификация	Етикиране	Граници на концентрация	Бележки към препаратите
603-131-00-7	Смес (3:1): 1-деокси-1-[метил(1-оксодецил)амино]-D-глицитол; 1-деокси-1-[метил(1-оксотетрадецил)амино]-D-глицитол		407-290-1	—	Xi; R41	Xi R: 41 S: (2-)26-39		
603-132-00-2	2-(хидроксиметил)-9-метил-6-(1-метилетил)-1,4-диоксапиро[4.5]декан		408-200-3	63187-91-7	Xi; R38-41 R52-53	Xi R:38-41-52/53 S: (2-)26-37/39-61		
603-133-00-8	Смес от: 3-[4-амино-2-хлор-5-нитрофенил)амино]пропан-1,2-диол и 3,3'-(2-хлор-5-нитро-1,4-фенилендимино)бис(пропан-1,2-диол)		408-240-1	—	Xn; R22 R52-53	Xn R:22-52/53 S: (2-)22-36-61		
603-134-00-3	Смес от: заместени додецил и/или тетрадецил, дифенил етери. Веществото е получено чрез реакцията на Фридел Крафтс. Катализаторът се отстранява от продукта на реакцията. Дифенил етер се замества от C ₁ -C ₁₀ алкилни групи. Алкилните групи са свързани произволно между C ₁ и C ₆ . Използват се 50/50 линейни C ₁₂ и C ₁₄ .		410-450-3	—	R53	R: 53 S: 61		
603-135-00-9	бис[2,2,2"нирилотрис(етанолато)]-1-N,O]бис[2-(2-метоксиетокси)етокси]-титан		410-500-4	—	Xi; R41 N; R51-53	Xi; N R: 41-51/53 S: (2-)26-39-61		
603-136-00-4	3-(4-(бис(2-хидроксиетил)амино)-2-нитрофенил)амино)-1-пропанол		410-910-3	104226-19-9	R43 R52-53	Xi R:43-52/53 S: (2-)24-37-61		
603-137-00-X	Смес от: 1-деокси-1-[метил(1-оксоексадецил)амино]-D-глицитол и 1-деокси-1-[метил(1-оксооктадецил)амино]-D-глицитол		411-130-6	—	Xi; R41	Xi R: 41 S: (2-)26-39		
603-138-00-5	3-(2,2-диметил-3-хидроксипропил)толуен или): 2,2-диметил-3-(3-метилфенил)пропанол		403-140-4	103694-68-4	R52-53	R:52/53 S: 61		
604-050-00-X	4-хлор-о-крезол 4-хлор-2-метил фенол		216-381-3	1570-64-5	T; R23 C; R 35 N; R50	T; C; N R: 23-35-50 S: (1/2-)26-36/37/39-45-61	C ≥ 25%: T; C; R23-35 10% ≤ C < 25%: C; R20-35 5% ≤ C < 10%: C; R20-34 3% ≤ C < 5%: Xn; R20-36/37/38 1% ≤ C < 3%: Xi; R36/37/38	

Индекс №	Химическо наименование	Бележки към веществата	ЕС номер	CAS номер	Класификация	Етикиране	Граници на концентрация	Бележки към препаратите
604-051-00-5	3,5-бис(3,5-ди-трет-бутил-4-хидрокси)бензил-2,4,6-триметилфенол		401-110-5	87113-78-8	R52-53	R:52/53 S: 61		
604-052-00-0	2,2'-метиленбис(6-(2Н-бензотриазол-2-ил)-4-(1,1,3,3-тетраметилбутил)фенол)		403-800-1	103597-45-1	R53	R:53 S: 61		
604-053-00-6	2-метил-4-(1,1-диметилетил)-6-1-метилпентадецил)-фенол		410-760-9	157661-93-3	Xi; R38 R43 N; R50-53	Xi; N R: 38-43-50/53 S: (2-)24-37-60-61		
604-054-00-1	Смес от: 2-метокси-4-(тетраhydro-4-метилен-2Н-пиран-2-ил)-фенол и 4-(3,6-дихидро-4-метил-3,6-дихидро-2Н-пиран-2-ил)-2-метоксифенол		412-020-0	—	R43 R52-53	Xi R:43-52/53 S: (2-)24-37-61		
604-055-00-7	2,2'-(3,5,5,5'-тетраметил-(1,1'-бифенил)-4,4'-диил)-бис(оксиметилен))-бис-оксиран		413-900-7	85954-11-6	Мутаг. кат.3; R40	Xn R: 40 S: (2-)22-36-37		
605-027-00-7	Смес от: 3а,4,5,6,7,7а-хексахидро-4,7-метано-1Н-инден-6-карбоксалдехид и 3а,4,5,6,7,7а-хексахидро-4,7-метано-1Н-инден-5-карбоксалдехид		410-480-7	—	R43 N; R51-53	Xi; N R: 43-51/53 S: (2-)24-37-61		
606-051-00-0	4-пентилциклохексанон		406-670-4	61203-83-6	N; R51-53	N R: 51/53 S: 61		
606-052-00-6	4-(N,N-дибутиламино)-2-хидрокси-2'-карбоксибензофенон		410-410-5	54574-82-2	R52-53	R:52/53 S: 61		
607-272-00-5	флуорокспир-метил (ISO) [1] флуорокспир-бутометил (ISO) [2] метилхептил, О-((4-амино-3,5-дихлор-6-флуоро-2-пиридилокси) ацетат [1] (2-бутоксид-1-метилетил), О-((4-амино-3,5-дихлор-6-флуоро-2- пиридилокси) ацетат [2]		279-752-9 [1] —	81406-37-3 [1] 154486-27-8 [2]	N; R50-53	N R: 50/53 S: 60-61		
607-273-00-0	амониум-7-(2,6-диметил-8-(2,2-диметилбутирилокси)-1,2,6,7,8,8а-хексахидро-1-нафтил)-3,5-дихидроксигепаноат		404-520-2	—	R52-53	R:52/53 S: 61		
607-274-00-6	2-(N-бензил-N-метиламино)етил-3-амино-2-бутеноат		405-350-1	54527-73-0	R43 N; R51-53	Xi; N R: 43-51/53 S: (2-)24-37-61		
607-275-00-1	натриев (бензоилокси)бензен-4-сулфонат		405-450-5	66531-87-1	R43	Xi R: 43 S: (2-)24-37		
607-276-00-7	бис[(1-метилимидазол)-2-етил-хексаноат]], цинков комплекс		405-635-0	—	Xi; R38-41 N; R50-53	Xi; N R: 38-41-50/53 S: (2-)26-37/39-60-61		

Индекс №	Химическо наименование	Бележки към веществата	ЕС номер	CAS номер	Класификация	Етикиране	Граници на концентрация	Бележки към препаратите
607-277-00-2	Смес от: 2-(хексилтио)етиламин хидрохлорид и натриев пропионат		405-720-2	—	Xn; R22 Xi; R41 R43 N; R51-53	Xn; N R: 22-41-43-51/53 S: (2-)24-26-37/39-61		
607-278-00-8	Смес от: изомери на натриев фенетилнафталенсулфонат и натриев нафтилегилбензенсулфонат		405-760-0	—	Xi; R41 R43 R52-53	Xi R: 41-43-52/53 S: (2-)24-26-37/39-61		
607-279-00-3	Смес от: п-октадециламинодиетил-бис(хидрогенмалеат) и п-октадециламинодиетил хидроген-малеат хидрогенфталат		405-960-8	—	R43 N; R51-53	Xi; N R: 43-51/53 S: (2-)24-37-61		
607-280-00-9	натриев 4-хлор-1-хидроксибутан-1-сулфонат		406-190-5	54322-20-2	Xn; R22 Xi; R36 R43	Xn R: 22-36-43 S: (2-)22-26-36/37		
607-281-00-4	Смес от разклонени и линейни : C ₇ -C ₉ алкил-3-[3-(2 <i>H</i> -бензотриазол-2-ил)-5-(1,1-диметил-етил)-4-хидроксифенил]пропионати		407-000-3	127519-17-9	N; R51-53	N R: 51/53 S: 61		
607-282-00-X	2-(ацетоксиметил)-4-бензилоксипропил-1-ил ацетат		407-140-5	131266-10-9	R52-53	R: 52/53 S: 61		
607-283-00-5	(<i>E</i>) етил-4-оксо-4-фенилпропанат		408-040-4	15121-89-8	Xn; R21/22 Xi; R38-41 R43 N; R50-53	Xn; N R: 21/22-38-41-43-50/53 S: (2-)26-36/37/39-60-61		
607-284-00-0	Смес 9:1 от: натрий-3,3'-(1,4-фениленбис(карбонилимино-3,1-пропандилимино))бис(10-амино-6,13-дихлор)4,1-трифенодиоксазиндисулфонат и литиев 3,3'-(1,4-фениленбис(карбонилимино-3,1-пропанедил-имино))бис(10-амино-6,13-дихлор-4,1-трифенодиоксазиндисулфонат		410-040-4	136213-76-8	N; R51-53	N R: 51/53 S: 61		
607-285-00-6	Смес от : 7-((3-аминофенил)сулфонил)амино)-нафтален-1,3-дисулфонова киселина, натриев 7-((3-аминофенил)сулфонил)амино)нафтален 3-1,3-дисулфонат и калиев 7-((3-аминофенил)сулфонил)амино)нафтален 3-1,3-дисулфонат		410-065-0	—	R43	Xi R: 43 S: (2-)22-24-37		
607-286-00-1	Смес от : натриев/калиев 7-[[[3-[4-(2-хидрокси-нафтил)азо]фенил]азо]фенил]сулфонил]амино]-нафтален-1,3-дисулфонат		410-070-8	141880-36-6	R43 R52-53	Xi R:43-52/53 S: (2-)22-24-37-61		

Индекс №	Химическо наименование	Бележки към веществата	ЕС номер	CAS номер	Класификация	Етикиране	Граници на концентрация	Бележки към препаратите
607-287-00-7	O'-метил O-(1-метил-2-(метакрилоилокси)етил]-1,2,3,6-тетрахидрофталат		410-140-8	—	R52-53	R:52/53 S: 61		
607-288-00-2	Тетранатриев [с-(3-(1-(3-(е(6-дихлор-5-цианопиримидин-f-ил(метил)амино)пропил-1,6-дихидро-2-хидрокси-4-метил-6-оксо-3-пиридилазо)-4-сулфонатофенилсулфамой)фгалоциани н-a,b,d-трисулфонато(6-))никелато(II), където a е 1 или 2, или 3 или 4; b е 8 или 9, или 10, или 11; c е 15 или 6, или 17, или 18; d е 22 или 23, или 24, или 25 и където e и f заедно са съответно 2 и 4 или 4 и 2.		410-160-7	148732-74-5	Xi; R36 R43 R52-53	Xi R: 36-43-52/53 S: (2-)22-26-36/37-61		
607-288-00-8	3-(3-(4-(2,4-би(1,1 диметилпропил)фенокси)бутил аминарбошил-4-хидрокси-1-нафталенил)тио)пропанова киселина		410-370-9	105488-33-3	R53	R:53 S: 61		
607-290-00-3	Смес (съотношение неизвестно)от: 1-C ₁₄ -C ₁₈ алкилоксикарбонил-2-(3-алилокси-2-хидроксипропоксикарбонил)етан-1-сулфонат и амониев 2-C ₁₄ -C ₁₈ -алкилоксикарбонил-1-(3-алилокси-2-хидроксипропоксикарбонил)етан-1-сулфонат		410-540-2	—	Xi; R38 R43 N; R50-53	Xi; N R: 38-43-50/53 S: (2-)24-37-60-61		
607-291-00-9	додецил-ω-(C ₅ /C ₆ -циклоалкил)алкил карбоксилат		410-630-1	104051-92-5	R53	R: 53 S: 61		
607-292-00-4	Смес от: [1-(метоксиметил)-2-(C ₁₂ алкокси)-етокси]оцетна киселина и [1-(метоксиметил)-2-(C ₁₄ алкокси)-етокси]оцетна киселина		410-640-6	—	Xi; R38-41 N; R50-53	Xi; N R: 38-41-50/53 S: (2-)26-37/39-60-61		
607-293-00-X	Смес от: N-аминоетилпиперазониум моно-2,4,6-триметилнонилдифенил етер ди-сулфонат и N-аминоетилпиперазониум-ди-2,4,6-триметилнонилдифенил 1 етер ди-сулфонат		410-650-0	—	Xi; R41 R43 N; R51-53	Xi; N R: 41-43-51/53 S: (2-)26-36/37/39-61		
607-294-00-5	натриев 2-(бензоилокси)-1-хидроксиетан-сулфонат		410-680-4	—	R43	Xi R: 43 S: (2-)24-37		

Индекс №	Химическо наименование	Бележки към веществата	ЕС номер	CAS номер	Класификация	Етикиране	Граници на концентрация	Бележки към препаратите
607-295-00-0	Смес от: тетранатриев фосфоенан-2- дикарбоксилат и хексанатриев фосфобутан-1,2,3,4- тетракарбоксилат		410-800-5	—	R43 N; R51-53	Xi; N R: 43-51/53 S: (2-)24-37-61		
607-296-00-6	Смес от: тетраестери на пентаеритрол с хептанова киселина и 2-етилхексанова киселина		410-830-9	—	R53	R: 53 S: 61		
607-297-00-1	(Е-Е')-3,3'-(1,4-фенилендиметил)бис(2- оксоборнан-10-сулфонова киселина		410-960-6	92761-26-7	Xi; R41	Xi R: 41 S: (2-)26-39		
607-298-00-7	2- (триметиламонно)етоксикарбоксибенз ен-4-сулфонат		411-010-3	—	R43	Xi R: 43 S: (2-)22-36/37		
607-299-00-2	метил-3-(ацетилтио)-2-метил- пропаноат		411-040-7	97101-46-7	Xn; R22 R43 N; R50-53	Xn; N R: 22-43-50/53 S: (2-)24-37-60-61		
607-300-00-6	тринатриев [2-(5-хлор-2,6- дифлуоропиримидин-4-иламино)-5-(b- сулфамоил-с,d-сулфонатофтало- цианин-а-ил-К4, N29,N30,N31,N32- сулфони-ламино)бензоато(5-)]купрат(II), където а = 1, 2, 3, 4, b = 8, 9, 10, 11, c = 15, 16, 17, 18, d = 22, 23, 24, 25		411-430-7	—	R43	Xi R: 43 S: (2-)22-24-37		
607-301-00-1	Смес от: додеканова киселина и поли(1- 7)лактатни естери на додеканова киселина		411-860-5	—	Xi; R38-41 R43 N; R51-53	Xi; N R: 38-41-43-51/53 S: (2-)24-26-37/39-61		
607-302-00-7	Смес от: тетрадеканова киселина и поли(1- 7)лактатни естери на тетрадеканова киселина		411-910-6	—	Xi; R38-41 R43 N; R51-53	Xi; N R: 38-41-43-51/53 S: (2-)24-26-37/39-61		
607-303-00-2	1-циклопропил-6,7-дифлуор-1,4- дихидро-4-оксо-хинолин-3- карбоксилна киселина		413-760-7	93107-30-3	Repr. kat. 3; R62 R52-53	Xn R: 62-52/53 S: (2-)22-36/37-61		
608-023-00-3	4-(4-хлорфенил)-2-фенил-2-[(1H-1,2,4- триазол-1-ил)метил]бутаннитрил		406-140-2	114369-43-6	N; R50-53	N R: 50/53 S: 60-61		
608-024-00-9	2-(4-(N-бутил-N- фениламино)фенил)етилен-1,1,2- трикарбонитрил		407-650-8	97460-76-9	R53	R:53 S: 61		
608-025-00-4	2-нитро-4,5- бис(бензилокси)фенилацетонитрил		410-970-0	117568-27-1	R53	R:53 S: 61		

Индекс №	Химическо наименование	Бележки към веществата	ЕС номер	CAS номер	Класификация	Етикиране	Граници на концентрация	Бележки към препаратите
609-053-00-X	хидразин-три-нитрометан		414-850-9	—	E; R3 O; R8 Кацерог. кат. 2; R45 T; R23/25 R43	E; T R: 45-3-8-23/25-43 S: 53-45		
610-010-00-2	1-бромо-1-(2-фурил)-2-нитроетилен		406-110-9	35950-52-8	Xn; R22-48/22 C; R34 R43 N; R50-53	C; N R: 22-34-43-48/22-50/53 S: (1/2-)22-26-36/37/39-45-60-61		
611-043-00-5	Смес (2:1:1) от: тринатриев N(1')-N(2):N(1'')-N(2'')-η-6-[2-амино-4-(или 6)-хидрокси-(или 4-амино-2-хидрокси)фенилазо]-6''-(карбанилоил-2-хидроксипроп-1-енилазо)-5',5'''-дисулфамоил-3,3'''-дисулфонатобис(нафтаден-2,1'-азобензен-1,2'-диолаго-O(1),O(2'))-хромат, тринатриев N(1')-N(2):N(1'')-N(2'')-η-6,6''-бис(1-карбанилоил-2-хидроксипроп-1-енилазо)-5',5'''-дисулфамоил-3,3'''-дисулфонатобис(нафтаден-2,1'-азобензен-1,2'-диолаго-O(1),O(2'))-хромат и тринатриев N(1')-N(2):N(1'')-N(2'')-η-6,6''-бис[(2-амино-4-(или 6)-хидрокси-(или 4-амино-2-хидрокс)фенилазо)-5',5'''-дисулфамоил-3,3'''-дисулфонатобис(нафтаден-2,1'-азобензен-1,2'-диолаго-O(1),O(2'))-хромат		402-850-1		Xi; R41 R52-53	Xi R: 41-52/53 S: (2-)26-39-61		

Индекс №	Химическо наименование	Бележки към веществата	ЕС номер	CAS номер	Класификация	Етиктиране	Граници на концентрация	Бележки към препаратите
611-044-00-0	Смес от : трет-алкил(C ₁₂ -C ₁₄)амоний бис[1-[(2-хидрокси-5-нитрофенил)азо]-2-нафталенолато(2-)]-хромат; трет-алкил(C ₁₂ -C ₁₄)амоний бис[1-[(2-хидрокси-4-нитрофенил)азо]-2-нафталенолато(2-)]-хромат(1-); трет-алкил(C ₁₂ -C ₁₄)амоний бис[1-[[5-(1,1-диметилпропил)-2-хидрокси-3-нитрофенил]азо]-2-нафталенолато(2-)]-хромат(1-); трет-алкил(C ₁₂ -C ₁₄)амоний-[[1-[(2-хидрокси-5-нитрофенил)азо]-2-нафталенолато(2-)]-1-[(2-хидрокси-5-нитрофенил)азо]-2-нафталенолато(2-)]-хромат(1-); трет-алкил(C ₁₂ -C ₁₄)амоний-[[1-[[5-1,1-диметилпропил)-2-хидрокси-3-нитрофенил]азо]-2-нафталенолато(2-)]-1-[(2-хидрокси-5-нитрофенил)азо]-2-нафталенолато(2-)]-хромат(1-); трет-алкил(C ₁₂ -C ₁₄)амоний((1-(4(или5)-нитро-2-оксидофенилазо)-2-нафталолато) (1-(3-нитро-2-оксидо-5-пентилфенилазо)-2-нафталолато))хромат(1-)		403-720-7	117527-94-3	N; R51-53	N R: 51/53 S: 61		
611-045-00-6	2-[4-[N-4-ацетоксибутил)-N-етил]амино-2-метилфенилазо]-3-ацетил-5-нитротиофен		404-830-8	—	R53	R:53 S: 61		
611-046-00-1	4,4'-диамино-2-метилазобензен		407-590-2	43151-99-1	T; R25 Xn; R48/22 R43 N; R50-53	T; N R: 25-43-48/22-50/53 S: (1/2-)22-28-36/37-45-60-61		
611-047-00-7	Смес (1:1) от : 2-[[4-[N-етил-N-(2-ацетоксиетил)амино]фенил]азо]-5,6-дихлорбензотиазол и [[4-[N-етил-N-(2-ацетоксиетил)амино]фенил]азо]-6,7-дихлорбензотиазол		407-890-3	111381-11-4	R53	R: 53 S: 61		
611-048-00-2	Смес (1:1) от: 2-[[4-[бис(2-ацетоксиетил)амино]фенил]азо]-5,6-дихлорбензотиазол и 2-[[4-[бис(2-ацетоксиетил)амино]фенил]азо]-6,7-дихлорбензотиазол		407-900-6	111381-12-5	R53	R: 53 S: 61		

Индекс №	Химическо наименование	Бележки към веществата	ЕС номер	CAS номер	Класификация	Етиктиране	Граници на концентрация	Бележки към препаратите
611-049-00-8	Смес (2:1:1) от: 7-[4-(3-(диетиламинопропиламино)-6-(3-(диетиламинопропиламино)-1,3,5-триазин-2-иламино)-4-хидрокси-3-(4-фенилазофенилазо)-нафтален-2-сулфонат, оцетна киселина и млечна киселина (2:1:1)		408-000-6	118658-98-3	Xn; R48/22 R43 R52-53	Xn R: 43-48/22-52/53 S: (2-)(22-36/37-61		
611-051-00-9	2-(4-(N-етил-N-(2-хидрокси)етил)амино-2-метилфенил)азо-6-метокси-3-метилбензотиазолиум хлорид		411-110-7	136213-74-6	N; R50-53	N R: 50/53 S: 60-61		
611-052-00-4	мононатриум аква-[5-[[2,4-дихидрокси-5-[(2-хидрокси-3,5-динитрофенил)азо]-фенил]азо]-2-нафталенсулфонат], железен комплекс		400-720-9	—	R52-53	R: 52/53 S: 61		
612-156-00-2	Смес от: трихексадецилметиламониев хлорид и дихексадецилдиметиламониев хлорид		405-620-9	—	Xi; R41 N; R50-53	Xi; N R: 41-50/53 S: (2-)(26-39-60-61		
612-157-00-8	(Z)-1-(1-бензо[b]тиен-2-илетанон оксим хидрохлорид		410-780-8	—	Xn; R22-48/22 Xi; R41 R43 N; R51-53	Xn; N R: 22-41-43-48/22-51/53 S: (2-)(22-26-36/37/39-61		
612-158-00-3	Смес от: бис(5-додецил-2-хидроксибензалдоксимат)мед(II) C ₁₂ -алкилна група е разклонена и 4- додецил салицилалдоксим		410-820-4	—	R53	R: 53 S: 61		
612-159-00-9	Реакционни продукти от: триметилхексаметилен диамин (смес от 2,2,4-триметил-1-6-хександиамин и 2,4,4-триметил-1-6-хександиамин (в списъка на EINECS), Епоксид 8 (деривати на моно[(C ₁₀ -C ₁₆)-алкилокси]метил]оксиран) и p-толуенсулфонова киселина		410-880-1	—	Xn; R22 C; R34 N; R50-53	C; N R: 22-34-50/53 S: (1/2-)(23-26-36/37/39-45-60-61		
613-149-00-7	2-трет-бутил-5-[(4-трет-бутилбензилтио)-4-хлор-пиридазин-3(2H)-он		405-700-3	96489-71-3	T; R23/25 N; R50-53	T; N R: 23/25-50/53 S: (1/2-)(36/37-45-60-61		
613-150-00-2	2,2'-[3,3'-(пиперазин-1,4-диил)дипропил]бис(1H-бензимидазо[[2,1-b]бензо[1,m,n][3,8]фенантролин-1,3,6-трион		406-295-6	—	R53	R:53 S: 61		
613-151-00-8	1-(3-мезилокси-5-третилюксиметил-2-D-треофурил)тимин		406-360-9	104218-44-2	R53	R:53 S: 61		

Индекс №	Химическо наименование	Бележки към веществата	ЕС номер	CAS номер	Класификация	Етиктиране	Граници на концентрация	Бележки към препаратите
613-152-00-3	фенил-N-(4,6-диметоксипиримидин-2-ил)карбамаг		406-600-2	89392-03-0	R43 N; R51-53	Xi; N R: 43-51/53 S: (2-)24-37-61		
613-153-00-9	2,3,5-трихлорпиридин		407-270-2	16063-70-0	R52-53	R:52/53 S: 61		
613-154-00-4	2-амино-4-хлор-6-метоксипиримидин		410-050-9	5734-64-5	Xn; R22	Xn R: 22 S: (2-)22		
613-155-00-X	5-хлор-2,3-дифлуорпиридин		410-090-7	89402-43-7	R10 Xn; R22 R52-53	Xn R: 10-22-52/53 S: (2-)23-36-61		
613-156-00-5	2-бутил-4-хлор-5-формилимидазол		410-260-0	83857-96-9	R43 N; R51-53	Xi; N R: 43-51/53 S: (2-)24-37-61		
613-157-00-0	2,4-диамино-5-метоксиметилпиримидин		410-330-0	54236-98-5	Xn; R22-48/22 Xi; R36	Xn R: 22-36-48/22 S: (2-)22-26-36		
613-158-00-6	2,3-дихлор-5-трифлуорметил-пиридин		410-340-5	69045-84-7	Xn; R20/22 Xi; R41 R43 N; R51-53	Xn; N R: 20/22-41-43-51/53 S: (2-)24-26-37/39-61		
613-159-00-1	4-[2-[4-(1,1-диметилетилфенил)-етокси]хиназолин		410-580-0	120928-09-8	T; R25 Xn; R20 N; R50-53	T; N R: 20-25-50/53 S: (1/2-)37-45-60-61		
613-160-00-7	(1S)-2-метил-2,5-диазобисцикло[2.2.1]хептан дихидробромид		411-000-9	125224-62-6	R43	Xi R: 43 S: (2-)24-37		
615-022-00-1	метил-3-изоцианатосулфонил-2-тиофен-карбоксилат		410-550-7	79277-18-2	E; R2 R14 Xn; R48/22 R42/43	E; Xn R: 2-14-42/43-48/22 S: (2-)22-30-35-36/37		
615-023-00-7	метил естер на 2-(изоцианатосулфонилметил)бензоена киселина или: метил-2-(изоцианатосулфонилметил)бензоат		410-900-9	83056-32-0	R10 R14 Мутаг. кат. 3; R40 Xn; R20-48/22 Xi; R41 R42	Xn R: 10-14-20-40-41-42-48/22 S: (2-)23-26-36/37/39		
616-044-00-4	N-(3,5-дихлор-4-етил-2-хидроксифенил)-2-(3-пентадецилфенокси)-бутанамид		402-510-2	—	N; R51-53	N R: 51/53 S: 61		
616-045-00-X	2'-(4-хлор-3-циано-5-формил-2-тиенилазо)-5'-(диетиламино)-2-метоксинацетанилид		405-190-2	122371-93-1	R43 R53	Xi R: 43-53 S: (2-)22-24-37-61		
616-046-00-5	N-[2-(6-хлор-7-метилпиразоло(1,5-b)1,2,4-триазол-4-ил)пропил]-2-(2,4-ди- <i>m</i> рет-пентилфенокси)октанамид		406-390-2	—	N; R50-53	N R: 50/53 S: 60-61		

Индекс №	Химическо наименование	Бележки към веществата	ЕС номер	CAS номер	Класификация	Етиктиране	Граници на концентрация	Бележки към препаратите
616-047-00-0	Смес от: 2,2',2''2'''-(егилендинитрилотетракис-N,N-ди(C ₁₆)алкилацетамид; 2,2',2''2'''-(егилендинитрилотетракис-N,N-ди(C ₁₈)алкилацетамид		406-640-0	—	R43	Xi R: 43 S: (2-)24-37		
616-048-00-6	3'-трифлуорметилизобутиранилид		406-740-4	1939-27-1	Xn; R48/22 N; R51-53	Xn; N R: 48/22-51/53 S: (2-)22-36-61		
616-049-00-1	2-(2,4-бис(1,1-диметилетил)фенокси)N-(3,5-дихлор-4-етил-2-хидроксифенил)-хексанамида		408-150-2	99141-89-6	R53	R:53 S: 61		
616-050-00-7	N-[2,5-дихлор-4-(1,1,2,3,3,3-хексафлуорпропокси)-фенил]-аминокарбонил]-(2,6-дифлуоробензамида		410-690-9	103055-07-8	R43 N; R50-53	Xi; N R: 43-50/53 S: (2-)24-37-60-61		
616-051-00-2	Смес от: 2,4-бис(N'-(4-метилфенил)-уреидо)-толуен и 2,6-бис(N'-(4-метилфенил)-уреидо)-толуен		411-070-0	—	R53	R: 53 S: 61		
617-015-00-9	бис(4-метилбензоил)пероксид		407-950-9	895-85-2	E; R2 O; R7 N; R50-53	E; N R: 2-7-50/53 S: (2-)7-14-36/37/39-47-60-61		
650-032-00-X	ципроконазол (ISO) (2 <i>RS</i> ,3 <i>RS</i>); 2 <i>RS</i> , 3 <i>SR</i>)-2-(4-хлорфенил)-3-циклопропил-1-(1 <i>H</i> -1,2,4-триазол-1-ил)бутан-2-ол		—	94361-06-5	Repr. kat. 3; R63 Xn; R22 N; R50-53	Xn; N R: 22-50/53-63 S: (2-)36/37-60-61		

ПРИЛОЖЕНИЕ 2

R 66

IT: L'esposizione ripetuta può provocare secchezza e screpolature della pelle.

BG: Повтарящата се експозиция може да предизвика сухота или напукване на кожата.

(Не засяга ES версия)

(Не засяга DA версия)

(Не засяга DE версия)

(Не засяга EL версия)

(Не засяга EN версия)

(Не засяга FR версия)

(Не засяга NL версия)

(Не засяга PT версия)

(Не засяга FI версия)

(Не засяга SV версия)

ПРИЛОЖЕНИЕ 3А

§ 23

FR: Ne pas respirer les gaz/fumées/vapeurs/aérosols [terme(s) approprié(s) à indiquer par le fabricant].

BG: Да не се вдишва газа/дима/парите/аерозола (подходящата дума/подходящите думи се посочва/посочват от производителя).

(Не засяга ES версия)

(Не засяга DA версия)

(Не засяга DE версия)

(Не засяга EL версия)

(Не засяга EN версия)

(Не засяга IT версия)

(Не засяга NL версия)

(Не засяга PT версия)

(Не засяга FI версия)

(Не засяга SV версия)

§ 26

DE: Bei Berührung mit den Augen sofort gründlich mit Wasser abspülen und Arzt konsultieren.

BG: При контакт с очите, веднага да се изплакнат обилно с вода и да се потърси медицинска помощ.

(Не засяга ES версия)

(Не засяга DA версия)

(Не засяга EL версия)

(Не засяга EN версия)

(Не засяга FR версия)

(Не засяга IT версия)

(Не засяга NL версия)

(Не засяга PT версия)

(Не засяга FI версия)

(Не засяга SV версия)

S 56

DE: Diesen Stoff und seinen Behälter der Problemabfallentsorgung zuführen.

EN: Dispose of this material and its container to hazardous or special waste collection point.

IT: Smaltire questo materiale e i relativi contenitori in un punto di raccolta di rifiuti pericolosi o speciali.

BG: Този материал и опаковката му да се изхвърлят само на места за събиране на опасни или специални отпадъци.

(Не засяга ES версия)

(Не засяга DA версия)

(Не засяга EL версия)

(Не засяга FR версия)

(Не засяга NL версия)

(Не засяга PT версия)

(Не засяга FI версия)

(Не засяга SV версия)

ПРИЛОЖЕНИЕ 3В

S 27/28

DE: Bei Berührung mit der Haut beschmutzte, getränkte Kleidung sofort ausziehen und Haut sofort mit viel ... abwaschen (vom Hersteller anzugeben).

BG: Незабавно да се съблече цялото замърсено облекло. След контакт с кожата веднага да се измие обилно с ... (посочва се от производителя).

(Не засяга ES версия)

(Не засяга DA версия)

(Не засяга EL версия)

(Не засяга EN версия)

(Не засяга FR версия)

(Не засяга IT версия)

(Не засяга NL версия)

(Не засяга PT версия)

(Не засяга FI версия)

(Не засяга SV версия)

S 29/56

ES: No tirar los residuos por el desagüe; elimínese esta sustancia y su recipiente en un punto de recogida pública de residuos especiales o peligrosos.

DE: Nicht in die Kanalisation gelangen lassen; diesen Stoff und seinen Behälter der Problemabfallentsorgung zuführen.

EN: Do not empty into drains, dispose of this material and its container to hazardous or special waste collection point.

IT: Non gettare i residui nelle fognature; smaltire questo materiale e i relativi contenitori in un punto di raccolta di rifiuti pericolosi o speciali.

NL: Afval niet in de gootsteen werpen; deze stof en de verpakking naar een inzamelpunt voor gevaarlijk of bijzonder afval brengen.

SV: Töm ej i avloppet, lämna detta material och dess behållare till insamlingsställe för farligt avfall.

BG: Да не се изпуска в канализацията. Този материал и опаковката му да се изхвърлят само на места събиране на опасни или специални отпадъци.

(Не засяга DA версия)

(Не засяга EL версия)

(Не засяга FR версия)

(Не засяга PT версия)

(Не засяга FI версия)

ПРИЛОЖЕНИЕ 4А

Б.10. МУТАГЕННОСТ — ТЕСТ *ИН ВИТРО* ЗА ХРОМОЗОМНИ АБЕРАЦИИ ПРИ БОЗАЙНИЦИ

1. МЕТОД

Настоящият метод е копие на теста *ин витро* за хромозомни аберации на бозайници - OECD TG 473 от 1997 г.

1.1 ВЪВЕДЕНИЕ

Целта на теста *ин витро* за хромозомни аберации е да се идентифицират агентите, причиняващи структурни хромозомни аберации в култивирани клетки от бозайници (1) (2) (3). Структурните аберации могат да бъдат два типа: хромозомни и хроматидни. При повечето химични мутагени индуцираните аберации са от хроматиден тип, но се срещат също и аберации от хромозомен тип. Увеличение в полиплоидията може да е показателно за това, че един химикал има потенциал да предизвиква геномни аберации. Все пак, настоящият метод не е предназначен да измерва геномни аберации и не се използва рутинно за тази цел. Хромозомните мутации и свързаните с тях събития са причината за много генетични болести при човека, а има реални доказателства, че хромозомните мутации и свързаните с тях събития, които водят до промени в онкогените и тумороподтискащите гени на соматични клетки, участват в причиняването на рак при хора и опитни животни.

За *ин витро* теста за хромозомни аберации могат да се използват култури на доказани клетъчни линии, клетъчни щамове или първични клетъчни култури. Клетките се избират въз основа на способността на растеж в културата, стабилността на кариотипа, броя на хромозомите, хромозомното разнообразие и спонтанната честота на хромозомни аберации.

Тестове, провеждани *ин витро*, по принцип изискват използването на екзогенен източник на метаболитна активация. Тази система на метаболитна активация не може изцяло да възпроизведе *ин vivo* условията при бозайници. Следва внимателно да се избягват условия, които биха довели до положителни резултати, неотразяващи свойствена мутагенност, и които биха могли да възникнат от промени на рН, осмотично налягане или високи нива на цитотоксичност (4) (5).

Настоящият тест се използва за откриване на евентуални мутагени и канцерогени при бозайници. Много съединения, които са положителни в настоящия тест, са канцерогени за бозайници; все пак, няма идеална съответствие между настоящия тест и канцерогенността. Съответствието зависи от химичния клас, а се появяват все повече доказателства, че съществуват канцерогени, които не се откриват с настоящия тест, тъй като очевидно те действат чрез други механизми, различни от прякото увреждане на ДНК. Вижте също “Общо въведение”, Част Б.

1.1. ДЕФИНИЦИИ

Хроматиден тип аберация: структурно увреждане на хромозомата, изразяващо се в разкъсване на единични хроматиди или разкъсване и повторно съединяване между хроматиди.

Хромозомен тип аберация: структурно увреждане на хромозомата, изразяващо се в разкъсване, или разкъсване и повторно съединяване на двата хроматида от една и съща страна.

Ендоредупликация: процес, при който след период S на ДНК репликация ядрото не навлиза в митоза, а започва друг S период. Резултатът е хромозоми с 4, 8, 16 ... хроматиди.

Празнина: ахроматично увреждане, по-малко от ширината на един хроматид с минимална несъосност на хроматидите .

Митотичен индекс: съотношението на клетки в метафаза, разделени на броя клетки, наблюдавани в клетъчна популация; показател за степента на пролиферация на тази популация.

Геномна аберация: промяна в броя на хромозомите в сравнение с нормалния брой, характерен за използваните клетки.

Полиплоидия: множимо на хаплоидния брой хромозоми (n), различно от диплоидния брой (т.е. 3n, 4n, и т.н.).

Структурна аберация: промяна в хромозомната структура, която се открива при микроскопско изследване на етапа на метафаза на клетъчното деление, наблюдавана във вид на заличавания и фрагменти, вътрешнохромозомни или междухромозомни изменения

1.2. ПРИНЦИП НА МЕТОДА НА ТЕСТА

Клетъчни култури се подлагат на въздействието на тестваното вещество с и без метаболитна активизация. На предварително определени интервали след излагането на клетъчните култури към тестваното вещество те се третират с блокиращо метафазата вещество (напр. Колцемид® или колхицин), събират се, оцветяват се и метафазните клетки се анализират под микроскоп за наличието на хромозомни аберации.

1.4. ОПИСАНИЕ НА МЕТОДА НА ТЕСТА

1.4.1. Подготовка

1.4.1.1. Клетки

Могат да се използват разнообразни клетъчни линии, щамове или първични клетъчни култури, включително и човешки клетки (напр. фибробласти от китайски хамстер, лимфоцити от периферна кръв на хора или други бозайници).

1.4.1.2. Хранителни среди и условия за отглеждане на културата

При отглеждането на културата следва да се използват подходящи хранителни среди и инкубационни условия (носители на културата, концентрация на CO₂, температура и влажност). Доказаните клетъчни линии и щамове следва да се проверяват редовно за стабилност на модалния хромозомен брой и отсъствие на микоплазмено замърсяване, а ако са замърсени, не следва да се използват. Следва да се знае нормалното време на клетъчен цикъл при клетките и използваните условия за отглеждане на културата.

1.4.1.3. Приготвяне на културите

Установени клетъчни линии и щамове: от изходни култури се размножават клетки, посяват се в хранителна среда с такава гъстота, че културите да не достигат точката на сливане преди времето на обиране, и се инкубират при 37 °C.

Лимфоцити: цялостна кръв, третирана с антикоагулант (напр. хепарин), или сепарирани лимфоцити, получени от здрави субекти, се добавят към хранителната среда, съдържаща митоген (напр. фитохемаглутинин), и се инкубират при 37 °C.

1.4.1.4. Метаболична активация

Клетките следва да се излагат на тестваното вещество, както в присъствието, така и в отсъствието на подходяща система за метаболична активация. Най-често използваната система е постмитохондрична фракция (S9) с добавка на ко-фактор, приготвена от черните дробове на гризачи, третирани с ензимно-индуциращи реактиви като Ароклор 1254 (6) (7) (8)(9) или смес от фенобарбитон и β -нафтофлафон (10) (11) (12).

Постмитохондричната фракция обичайно се използва в концентрации с обхват от 1 до 10% v/v в последната тестова среда. Състоянието на система за метаболична активация може да зависи от изпитвания химикал. В някои случаи може да е подходящо да се прилага повече от една концентрация на постмитохондрична фракция.

Редица разработки, включително изграждането клетъчни линии чрез генно инженерство, изразяващи специфични активизиращи ензими, могат да осигурят възможности за ендогенна активация. Изборът на използваните клетъчни линии следва да е научно обоснован (напр. чрез приложимостта на изоензим Цитохром P450 за метаболизма на тестваното вещество).

1.4.1.5. Тествано вещество/подготовка

Твърдите вещества за теста следва да се разтворят или суспендират в подходящи разтворители или носители, и, ако е необходимо, да се разреждат преди третирането на клетките. Течните тествани вещества могат да се добавят директно към тестовите системи и/или да се разреждат преди третирането. Следва да се използват пресни препарати на тестваното вещество, освен ако данните за устойчивостта му не показват, че може да се съхранява.

1.4.2. Условия за провеждане на теста

1.4.2.1. Разтворител/носител

Не следва да има съмнения за химическа реакция на разтворителя/носителя с тестваното вещество и той следва да е съвместим с оцеляването на клетките и активността на S9. Ако се използват други освен добре познатите разтворители/носители, включването им в теста следва да се подкрепи от данни за съвместимостта им. Препоръчва се, винаги когато е възможно, първо да се разглежда възможността за прилагането на воден разтворител/носител. При тестването на вещества, нестабилни във вода, използваните органични разтворители не следва да съдържат вода. Водата може да се отстрани чрез добавянето на молекулно сито.

1.4.2.2. Концентрации на излагането

Измежду критериите, които следва да се имат предвид при определянето на най-високите концентрации, са цитотоксичността, разтворимостта в тестовата система и промените в рН или осмотичното налягане.

Цитотоксичността следва да се определи със и без метаболитна активация в главния експеримент, като се използва подходяща индикация на клетъчната цялост и растеж като степен на сливане, количества жизнеспособни клетки, или митотичен индекс. Може да бъде полезно, ако се определи цитотоксичността и разтворимостта в предварителен експеримент.

Следва да се използват най-малко три концентрации, които могат да бъдат подложени на анализ. Там, където се среща цитотоксичност, тези три концентрации следва да покриват обхват от максимална до слаба или липса на токсичност; това обикновено означава, че концентрациите следва да се различават с коефициент не повече от 2 до $\sqrt{10}$. В момента на събиране на реколтата най-високата концентрация следва да показва значително намаляване на степента на сливане, клетъчния брой или митотичен индекс (всички са повече от 50%). Митотичният индекс е само едно косвено мерило за цитотоксичните/цитостатични ефекти и зависи от времето след третирането. Все пак, митотичният индекс е приложим за суспензионни култури, при които други начини на измерване на токсичността могат да се окажат неудобни и непрактични. Информацията за клетъчната кинетика като средно генерационно време (СГВ), може да се използва като допълваща информация. СГВ, обаче, е едно общо средно число, което не винаги е показателно за съществуването на забавени субпопулации, а дори съвсем малко увеличение на средното генерационно време може да се свърже с особено голямо забавяне на времето на оптимален добив на аберации.

За относително нецитотоксични вещества максималната тестова концентрация следва да е 5 μ l/ml, 5 mg/ml или 0,01 M, в зависимост от това коя е най-ниска.

За относително неразтворими вещества, които не са токсични в концентрации, по-ниски от неразтворимата концентрация, най-високата използвана доза следва да е в концентрация над границата на разтворимост в последната хранителна среда в края на периода на третиране. В някои случаи (напр. когато токсичността се получава само с концентрация, по-висока от най-ниската неразтворимата концентрация), препоръчително е тестът да се провежда при повече от една концентрация с видимо утаяване. Полезно би било разтворимостта да се прецени в началото и края на обработването, тъй като разтворимостта може да се измени по време на курса на излагане в тестовата система поради наличието на клетки, серум S9 и др. Неразтворимостта може да се установи и с просто око. Преципитатът не следва да пречи на отчитането.

1.4.2.3. Отрицателни и положителни контроли

Във всеки експеримент следва да се включат паралелни положителни и отрицателни (разтворител или носител) контроли, с и без метаболитна активация. Когато се прилага метаболитна активация, химикалът за положителен контрол, следва да е такъв, че да изисква активация, за да произведе мутагенна реакция.

За извършване на положителни контроли следва да се използва известен еластоген при нива на излагане, при които се очаква да се достигне репродуцируемо и забележимо увеличение спрямо фон, показващ нагледно чувствителността на тестовата система. Концентрациите на положителен контрол следва да са така избрани, че ефектите да са ясни, но да не разкриват непосредствено на четящото устройство идентичността на кодираните предметни стъкла. Примерите за положителни контролни вещества включват:

Метаболитна активация	Вещество	CAS No	Einecs No
-----------------------	----------	--------	-----------

Отсъствие на екзогенна метаболитна активация	Метил метансулфонат	66-27-3	200-625-0
	Етил метансулфонат	62-50-0	200-536-7
	Етил нитрозокарбамид	759-73-9	212-072-2
	Митомицин С	50-07-7	200-008-6
	4-нитрохинолин-N-оксид	56-57-5	200-281-1
Наличие на екзогенна метаболитна активация	бензо[а]пирен	50-32-8	200-028-5
	Циклофосфамид Циклофосфамид монохидрат	50-18-0 6055-19-2	200-015-4

Могат да се използват други подходящи положителни контролни вещества. За положителна контрола следва да се взема предвид използването на химикали, принадлежащи към химичен клас, когато такива са налични.

Отрицателните контроли, състоящи се само от разтворител или носител в средата, в която се извършва обработването, и третирано по същия начин като културите, които се обработват, следва да се включат за всяко прибиране на клетъчна реколтата. В допълнение към това следва също да се използват нетретирано контроли, освен ако няма контролни данни от предишни изследвания, показващи че от избрания разтворител не се предизвикват делеционни или мутагенни ефекти.

1.4.3. Процедура

1.4.3.1. Третиране с тестваното вещество

Пролифериращите клетки се обработват с тестваното вещество при наличието и при отсъствието на метаболитна активационна система. Третирането на лимфоцити следва да започне около 48 часа след митогенната стимулация.

1.4.3.2. Нормално за всяка концентрация следва да е използването на дубликатни култури, а те са силно препоръчителни и за отрицателни/разтворителни контролни култури. Когато на базата на данни от предишни изследвания може да се демонстрира минимално вариране между дубликатни култури (13) (14), би могло да се приеме използването на една култура за всяка концентрация.

Газообразни или летливи вещества следва да се тестват чрез подходящи методи, като например в запечатани носители на културата (15)(16).

1.4.3.3. Време за събиране на реколтата от културата

В първия експеримент клетките следва да се експонират на въздействието на тестваното вещество, както със, така и без метаболитна активация, в продължение на 3 до 6 часа и да се вземе проба след време, равно на около 1,5 пъти от нормалната продължителност на клетъчния цикъл след началото на третирането (12). Ако тази процедура дава отрицателни резултати както със, така и без активация, следва да се извърши допълнителен експеримент без активация, с непрекъснато третиране до вземането на проба след време,

равно на около 1,5 пъти от нормалната продължителност на клетъчния цикъл. Някои химични вещества могат по-лесно да се различат при периоди на обработване/вземане на проба, по-дълги от 1,5 пъти от продължителността на клетъчния цикъл. Отрицателните резултати с метаболитна активация следва да се потвърдят за всеки случай поотделно. В случаите, когато се счита, че не е необходимо потвърждаването на отрицателни резултати, това следва да е обосновано.

1.4.3.4. Подготовка на хромозомите

Клетъчните култури се третират с Колцемид® или колхицин обикновено в продължение на 1 до 3 часа преди събирането на реколтата. Всяка клетъчна култура се обира и обработва отделно за подготовката на хромозомите. Подготовка на хромозомите включва хипотонично третиране на клетките, фиксиране и оцветяване

1.4.3.5. Анализ

Всички предметни стъкла, включително и тези на положителните и отрицателни контроли, следва да се кодират независимо едно от друго преди микроскопския анализ. Тъй като процедурите на фиксиране водят често до разкъсване на част от метафазните клетки със загуба на хромозоми, отчетените клетки следва да съдържат известен брой центромери, равен на модалния брой $\neq 2$ за всички клетъчни типове. Следва да се отчетат най-малко 200 добре разнесени метафази за всяка концентрация и контрола, разделени поравно между дубликатите, ако това е приложимо. Този брой може да се намали, когато се наблюдава голям брой аберации.

Въпреки че целта на теста е да се открият структурни хромозомни аберации, от значение е да се регистрира полиплоидия и ендоредупликация, когато тези събития се наблюдават.

2. ДАННИ

2.1. ОБРАБОТКА НА РЕЗУЛТАТИТЕ

Експерименталната единица е клетката и по тази причина следва да се оценява процентът на клетки със структурна хромозомна аберация(и). Следва да се изготвят списъци на различни типове структурни хромозомни аберации с техния брой и честоти при експерименталните и контролни култури. Празнините се отбелязват отделно и се протоколират, но по принцип не се включват в общата честота на аберациите.

Следва също да се документират съпътстващите измервания на цитотоксичността за всички третирани и отрицателни контролни култури в главните опити за аберации.

Следва да се осигурят данни за отделните култури. Освен това всички данни следва да се резюмират в табличен вид.

Няма изискване за потвърждаване на ясна положителна реакция. Двухазните резултати следва да се изяснят чрез допълнително тестване, като за предпочитане е условията на опита да се модифицират. Необходимостта от потвърждаване на отрицателни резултати е разгледана в т. 1.4.3.3. Изменението на параметрите на изследването с цел разширяване на обхвата на изследваните условия следва да се има предвид при последващите експерименти. Параметрите на изследването, които могат да се изменят, включват границите на концентрацията и условията на метаболитна активация.

2.2. ОЦЕНКА И ТЪЛКУВАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ

Има няколко критерия за определяне на положителен резултат като например увеличение, свързано с концентрацията, или репродуцируемо увеличение в броя на клетки с хромозомни аберации. Първо, следва да се вземе предвид биологичната значимост на резултатите. При оценката на резултатите от теста биха могли да се използват статистически методи (3) (13). Статистическата значимост не следва да е единственият решаващ фактор за положителна реакция.

Едно увеличение в броя на полиплоидни клетки може да показва, че тестваното вещество е способно да инхибира митотични процеси и да индуцира многобройни хромозомни аберации. Увеличение в броя на клетки с ендоредуплицирани хромозоми може да е показателно за способността на тестваното вещество да инхибира прогресията на клетъчния цикъл (17) (18).

Тествано вещество, за което резултатите не удовлетворяват горните критерии се счита немутагенно в настоящата система.

Въпреки че повечето опити дават ясно положителни или отрицателни резултати, в редки случаи получените данни изключват възможността да се направи категорична преценка за активността на тестваното вещество. Резултатите могат да останат неясни или под въпрос, независимо от това колко пъти е повторен опитът.

Положителните резултати от теста *in vitro* за хромозомни аберации показват, че тестваното вещество индуцира структурни хромозомни аберации в култивирани соматични клетки на бозайници. Отрицателните резултати показват, че при условията на теста изследваното вещество не предизвиква хромозомни аберации в култивирани соматични клетки на бозайници.

3. ДОКЛАДВАНЕ

ДОКЛАД ЗА ТЕСТА

Докладът за теста трябва да съдържа следната информация:

Разтворител/носител:

- обосновка за избора на носител,
- разтворимост и стабилност на тестваното вещество в разтворител/носител, ако са известни.

Клетки:

- тип и източник на клетки,
- кариотипни особености и дали използваният тип клетки е подходящ,
- отсъствие на микопlasма, ако е приложимо,
- информация за продължителността на клетъчния цикъл,
- пол на кръвните донори, цялостна кръв или изолирани лимфоцити, използван митоген,
- брой на пасажи, ако е приложим,
- методи за поддържане на клетъчна култура, ако са приложими,
- модален брой на хромозомите.

Условия за провеждане на теста:

- идентичност на веществото, блокиращо метафазата, концентрация и времетраене на излагането на клетките,
- основна причина за избора на концентрации и брой култури, в т.ч., напр. цитотоксични данни и ограничения за разтворимостта, ако са налични,
- състав на средите, CO₂ концентрация, ако са приложими,
- концентрация на тестваното вещество,
- общ обем на носителя и тествано вещество,
- температура на инкубация,
- време на инкубация,
- времетраене на третирането,
- гъстота на клетките при посяване, ако е необходимо,
- тип и състав на система за метаболитна активация, в т.ч. критериите за приемливост,
- положителни и отрицателни контроли,
- методи на подготовка на предметно стъкло,
- критерии за отчитане на аберации,
- брой на анализирани метафази,
- методи за измерване на токсичността,
- критерии за считане на проучванията положителни, отрицателни или двузначни,

Резултати:

- признаци на токсичност, напр. степен на сливане, данни за клетъчния цикъл, клетъчно броене, митотичен индекс,
- признаци на утаяване,
- данни за рН и осмотичното налягане на средата за тестване, ако са определени,
- дефиниция за аберации, в т.ч. празнини,
- брой на клетки с хромозомни аберации и тип на хромозомните аберации, дадени отделно за всяка третирана и контролна култура,
- изменения в полиплоидията, ако се наблюдават,
- взаимоотношение доза-реакция, при възможност,
- статистически анализ, ако има такъв,
- данни от паралелни отрицателни (разтворител/носител) и положителни контроли,
- данни от предишни изследвания от отрицателни (разтворител/носител) и положителни контроли, с обхвати, средни стойности и стандартни отклонения.

Обсъждане на резултатите.

Заключения.

БИБЛИОГРАФИЯ

- (1) Evans, H. J. (1976), *Cytological Methods for Detecting Chemical Mutagens*, w: *Chemical mutagens, Principles and Methods for their Detection*, Vol. 4, Hollaender, A. (ed) Plenum Press, New York and London, pp. 1-29.
- (2) Ishidate, M. Jr. and Sofumi, T. (1985), *The In Vitro Chromosomal Aberration Test Using Chinese Hamster Lung (CHL) Fibroblast Cells in Culture*, in: *Progress in Mutation Research*, Vol. 5, Ashby, J. et al., (eds) Elsevier Science Publishers, Amsterdam-New York-Oxford, pp. 427-432.
- (3) Galloway, S. M., Armstrong, M. J., Reuben, C., Colman, S., Brown, B., Cannon, C., Bloom, A. D., Nakamura, F., Ahmed, M., Duk, S., Rimp, J., Margolin, G. H., Resnick, M. A., Anderson, G. and Zeiger E. (1978), *Chromosome aberration and sister chromatic exchanges in Chinese hamster*

ovary cells: Evaluation of 108 chemicals, *Environ. Molec. Mutagen* 10 (suppl.10), pp. 1-175.

- (4) Scott, D., Galloway, S. M., Marshall, R. R., Ishidate, M. Jr., Brusick, D., Ashby, J. and Myhr, B. C. (1991), Genotoxicity under Extreme Culture Conditions. A report from ICPEMC Task Group 9, *Mutation Res.*, 257, pp. 147-204.
- (5) Morita, T., Nagaki, T., Fukuda, I. and Okumura, K., (1992), Clastogenicity of low pH to Various Cultured Mammalian Cells, *Mutation Res.*, 268, pp. 297-305.
- (6) Ames, B. N., McCann, J. and Yamasaki, E. (1975), Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian Microsome Mutagenicity Test, *Mutation Res.*, 31, pp. 347-364.
- (7) Maron, D. M. and Ames, B. N. (1983), Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test, *Mutation Res.*, 113, pp. 173-215.
- (8) Natarajan, A. T., Tates, A. D., van Buul, P. P. W., Meijers, M. and de Vogel, N. (1976), Cytogenetic Effects of Mutagen/Carcinogens after Activation in a Microsomal System *In Vitro*, I. Induction of Chromosome Aberrations and Sister Chromatid Exchange by Diethylnitrosamine (DEN) and Dimethylnitrosamine (DMN) in CHO Cells in the Presence of Rat-Liver Microsomes, *Mutation Res.*, 37, pp. 83-90.
- (9) Matsuoka, A., Hayashi, M. and Ishidate, M. Jr. (1979), Chromosomal Aberration Tests on 29 Chemicals Combined with S9 Mix *In Vitro*, *Mutation Res.*, 66, pp. 277-290.
- (10) Elliot, B. M., Combes, R. D., Elcombe, C. R., Gatehouse, D. G., Gibson, G. G., Mackay, J. M. and Wolf, R. C. (1992), Report of UK Environmental Mutagen Society Working Party. Alternative to Aroclor 1254-induced S9 in *In Vitro* Genotoxicity Assays, *Mutagenesis*, 7, pp. 175-177.
- (11) Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K. and Sugimura, T. (1976), A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems, in: de Serres, F. J. Fouts, J. R. Bend, J. R. and Philpot, R. M. (eds), *In Vitro Metabolic Activation in Mutagenesis Testing*, Elsevier, North-Holland, pp. 85-88.
- (12) Galloway, S. M., Aardema, M. J., Ishidate, M. Jr., Ivett, J. L., Kirkland, D. J. Morita, T., Mosesso, P., Sofumi, T. (1994), Report from Working Group on *In Vitro* Tests for Chromosomal Aberrations, *Mutation Res.*, 312, pp. 241-261.
- (13) Richardson, C., Williams, D. A., Allen, J.A., Amphlett, G., Chanter, D. O. and Phillips, B. (1989), Analysis of Data from *In Vitro* Cytogenetic Assays, w: *Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data*, Kirkland, D. J., (cd) Cambridge University Press, Cambridge, pp. 141-154.
- (14) Soper, K. A. and Galloway, S. M. (1994), Replicate Flasks are not Necessary for *In Vitro* Chromosome Aberration Assays in CHO Cells, *Mutation Res.*,

312, pp. 139-149.

- (15) Krahn, D. F., Barsky, F. C. and McCooey, K. T. (1982), CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids, in: Tice, R. R., Costa, D. L., Schaich, K. M. (eds), *Genotoxic Effects of Airborne Agents*, New York, Plenum, pp. 91-103.
- (16) Zamora, P. O., Benson, J. M., Li, A. P. and Brooks, A. L. (1983), Evaluation of an Exposure System Using Cells Grown on Collagen Gels for Detecting Highly Volatile Mutagens in the CHO/HGPRT Mutation Assay, *Environmental Mutagenesis*, 5, pp. 795-801.
- (17) Locke-Huhle, C. (1983), Endoreduplication in Chinese hamster cells during alpha-radiation induced G2 arrest, *Mutation Res.*, 119, pp. 403-413.
- (18) Huang, Y., Change, C. and Trosko, J. E. (1983), Aphidicolin-induced endoreduplication in Chinese hamster cells, *Cancer Res.*, 43, pp. 1362-1364.”

ПРИЛОЖЕНИЕ 4Б

Б.11. МУТАГЕННОСТ —ТЕСТ *ИН ВИВО* ЗА ХРОМОЗОМНИ АБЕРАЦИИ В КОСТНИЯ МОЗЪК НА БОЗАЙНИЦИ

1. МЕТОД

Настоящият метод е изцяло подобен на “Тест за хромозомни аберации в костния мозък на бозайници - OECD TG 475 от 1997 г.”

1.1 ВЪВЕДЕНИЕ

Тестът *ин vivo* в микроядрата на клетки от бозайници се използва за откриване на структурни хромозомни аберации, индуцирани от тествано вещество в клетки от костен мозък на животни, обикновено гризачи (1) (2) (3) (4). Структурните хромозомни аберации могат да бъдат два вида: хромозомни или хроматидни. Едно увеличение в полиплоидията би могло да показва, че дадено химично вещество има потенциал да предизвиква геномни аберации. С повечето химични мутагени се предизвикват аберации от хроматиден тип, но хромозомният тип аберации също се срещат. Хромозомните аберации и свързаните с тях събития са причината за генетични болести у човека, а има реални доказателства, че хромозомните мутации и свързаните с тях събития, причиняващи промени в онкогените и тумороподтискащите гени, участват в причиняването на рак на хора и експериментални системи.

В настоящия тест обикновено се използват гризачи. Обект на настоящия тест е тъканта на костният мозък, тъй като последния представлява високо васкуларизирана тъкан и съдържа популация от бързо циклиращи клетки, които могат лесно да се изолират и обработят. Друг видове и тъкани не са обекти на настоящия метод.

Настоящият тест за хромозомни аберации е от специално значение за оценка на мутагенната опасност поради това, че позволява разглеждане на фактори на *ин vivo* метаболизма, фармакокинетиката и процесите на ДНК репарация, въпреки че те варират при различните видове и тъкани. Тест *ин vivo* е също полезен за по-нататъшното изследване на мутагенния ефект, установен чрез тест *ин vitro*.

Ако има доказателства, че тестваното вещество или реактивен метаболит няма да достигнат до тъканта, която е обект на изследване, не е подходящо да се използва в настоящият тест.

Вижте също “Общо въведение”, Част Б.

1.2.ДЕФИНИЦИИ

Хроматиден тип аберация: структурно увреждане на хромозомата, изразяващо се в разкъсване на единични хроматиди или разкъсване и повторно съединяване между хроматиди.

Хромозомен тип аберация: структурно увреждане на хромозомата, изразяващо се в разкъсване, или разкъсване и повторно съединяване на двата хроматида на същата страна.

Ендоредупликация: процес, при който след период S на ДНК репликация ядрото не навлиза в митоза, а започва друг S период. Резултатът е хромозоми с 4, 8, 16, ... хроматиди.

Празнина: ахроматично увреждане, по-малко от ширината на един хроматид с минимална несъосност на хроматида-(ите) .

Геномна аберация: промяна в броя на хромозомите в сравнение с нормалния брой, характерен за използваните клетки.

Полиплоидия: кратно число на хаплоидния брой хромозоми (n), различно от диплоидния брой (т.е. $3n$, $4n$, и т.н.).

Структурна аберация: промяна в хромозомната структура, която се открива чрез микроскопско изследване на етапа на метафаза на клетъчното деление, наблюдавана във вид на заличавания и фрагменти, вътрешнохромозомни или междухромозомни изменения.

1.3 ПРИНЦИП НА МЕТОДА НА ТЕСТА

Животни се излагат на тестваното вещество по подходящ начин и се убиват в подходящи моменти след обработването. Преди убиването, животните се третират с блокиращ метафазата агент (напр. колхицин или Колцеמיד®). След това се приготвя хромозомен препарат от клетки на костния мозък, оцветява се и клетките в метафаза се анализират за хромозомни аберации.

2.2. ОПИСАНИЕ НА МЕТОДА НА ТЕСТА

1.4.1. ПОДГОТОВКА

1.4.1.1. Подбор на животински вид

Обичайно използваните животни са плъхове, мишки и китайски хамстери, въпреки че всеки подходящ вид бозайник би могъл да се използва. Следва да се вземат общо използваните лабораторни щамове на млади, здрави, пораснали животни. В началото на изследването вариациите в теглото на животните следва да е минимално и да не превишават $\pm 20\%$ от средното тегло на всеки пол.

1.4.1.2. Условия на отглеждане и хранене

Прилагат се общите условия в Общото въведение към част Б, въпреки че следва да се цели влажността на въздуха да е 50-60%.

1.4.1.3. Подготовка на животните

Здрави, млади, пораснали животни се определят произволно за контролните и опитни групи. Клетките следва да се подредят така, че да се намалят до минимум евентуалните ефекти от разполагането им. На животните се дава уникална идентификация. Животните са аклиматизират към лабораторните условия поне пет дена.

1.4.1.4. Приготвяне на дози

Твърдите вещества за теста следва да се разтворят или суспендират в подходящи разтворители или носители, и, при необходимост, да се разреждат преди даване на дозата на животните. Течните вещества за теста могат да се дават директно или да разреждат преди дозиране. Следва да се използват пресни препарати на тестваното вещество, освен ако данните за устойчивостта му не показват, че може да се съхранява.

1.4.2. Условия за провеждане на теста

1.4.2.1. Разтворител/носител

Разтворителят/носителят не следва да предизвиква токсично въздействие с използваните нива на дозиране, а също така не следва да има съмнения за химическа реакция между него и тестваното вещество. Ако се използват други, освен добре познатите разтворители/носители, включването им в теста следва да се подкрепи от данни за съвместимостта им. Препоръчва се, винаги когато е възможно, първо да се разглежда възможността за прилагането на воден разтворител/носител.

1.4.2.2. Контроли

Във всеки тест следва да се включват паралелни положителни и отрицателни (разтворител/носител) контроли за всеки пол. Като се изключи третирането с тестваното вещество, с животните в контролните групи следва да борава по един и същи начин, както с животните от опитните групи.

Положителните контроли следва да произвеждат структурни аберации *in vivo* при нива на излагане, при които се очаква да се постигне забележимо увеличение спрямо дадения фон. Положителните контролни дози следва да са така избрани, че ефектите да са ясни, но да не разкриват непосредствено на четеца идентичността на кодираните предметни стъкла. Приемливо е положителните контроли, да се прилагат по различен начин от тестваното вещество и да им се взема проба само еднократно. За положителна контрола може да се разглежда използването на химикали, принадлежащи към химичен клас, когато такива са налични.

Примерите за положителни контролни вещества включват:

Вещество	CAS No	Einecs No
етил метасулфонат	62-50-0	200-536-7
етил нитрозокарбамид	759-73-9	212-072-2
митомицин С	50-07-7	200-008-6
циклофосфамид	50-18-0	200-015-4
циклофосфамид монохидрат	6055-19-2	
триетиленмеламин	51-18-3	200-083-5

За всяко вземане на проби следва да се включват отрицателните контроли, третирани само с разтворител или носител, а за всички останали неща третирани както опитните групи, освен ако няма приемлива изменчивост между животните и честотите на клетки с хромозомни аберации са доказани с контролни данни от предшестващи изследвания. Ако за отрицателни контроли се прилага еднократно вземане на проби, най-подходящият момент е първото вземане на проба. Освен това, следва също да се използват нетретирани контроли, освен ако няма данни от предшестващи изследвания или публикувани контролни данни, показващи, че няма никакви вредни или мутагенни ефекти, предизвикани от избрания разтворител/носител.

1.5. ПРОЦЕДУРА

1.5.1. Брой и пол на животните

Всяка група от животни, с които се извършват опити и всяка контролна група включва поне пет животни за анализ от един и същ пол. Ако по времето на изследването има налични данни от изследвания на същия вид и по същия начин на излагане, които показват, че няма значителни разлики между половете по отношение на токсичността, то

тестването на един пол ще бъде достатъчно. Когато излагането на хора спрямо химически вещества може да е в специфична зависимост от пола, като например към някои фармацевтични агенти, тестът следва да се проведе с животни от подходящия пол.

1.5.2 График на обработване

За предпочитане е тестваните вещества да се въвеждат чрез еднократно третиране. Тестваните вещества могат също да се въвеждат като доза на отделни части, т.е. две обработвания в един и същи ден, разделени от не повече от няколко часа, за да се улесни прилагането на голям обем материал. Други режими на дозиране следва да са научно обосновани.

Пробите следва да се вземат в два отделни момента след третирането в един ден. За гризачи първият интервал на вземане на проба е 1,5 пъти от продължителността на нормалния клетъчен цикъл (който нормално е 12-18 часа) след третирането. Тъй като времето за поемането и метаболизма на тестваното вещество, както и ефекта му върху кинетиката на клетъчния цикъл, могат да повлияят на оптималното време за откриване на хромозомни аберации, препоръчва се и вземане на по-късна проба - 24 часа след първата проба. Ако се използват режими на дози за повече от един ден, следва да се взема една проба 1,5 пъти продължителността на нормалните клетъчни цикли след последното третиране.

Преди убиването животните се инжектират интраперитонеално с подходяща доза на блокиращ метафазата агент (напр. Колцеמיד® или колхицин). След това, след подходящ интервал от време от животните се взема проба. За мишки този интервал е приблизително 3-5 часа; за китайски хамстери - около 4-5 часа. Клетките се събират от костния мозък и се анализират за хромозомни аберации.

1.5.3. Нива на дозиране

Ако се извършва изследване за обхват поради това, че няма подходящи данни в наличност, то следва да е в същата лаборатория, като се използва същия вид, шам, пол и режим на третиране, както в главното изследване (5). Ако има токсичност, за първото вземане на проба се използват три нива на дозиране. Тези нива на дозиране следва да включват обхват от максимална до слаба токсичност или липса на токсичност. При вземане на проба на по-късен етап следва да се прилага само най-високата доза. Най-високата доза се дефинира като доза, създаваща признаци на такава токсичност, че от повисоки нива на дозиране, базирани на същия режим, би могло да се очаква да доведат до леталност. Вещества със специфични биологични активности при ниски, нетоксични дози (като хормони и митогени) могат да бъдат изключения от критериите за определяне на дозата и трябва да се оценяват за всеки конкретен случай. Най-високата доза може също да се дефинира като доза, която показва известни признаци на токсичност в костния мозък (напр. намаляване на митотичния индекс с повече от 50%).

1.5.4. Граничен тест

Ако тест с едно ниво на дозиране от минимум 2 000 mg/kg телесно тегло при еднократно третиране или две третираня в един и същи ден, не дава забележими токсични ефекти, а не би могло да се очаква генотоксичност на базата на данни от структурно свързани вещества, то тогава пълно изследване с три нива на дозиране може да не се счита за необходимо. За по-дълготрайни изследвания граничната доза е 2 000 mg/kg/телесно тегло/ден за период на третиране до 14 дни и 1 000 mg/kg/телесно тегло/ден за период на

третиране, по-дълъг от 14 дни. Очакваното излагане при хора може да покаже необходимост в граничния тест да се използва по-високо ниво на дозиране.

1.5.5. Администриране на дозите

Тестваното вещество обикновено се дава със стомашна сонда като се използва тръба или подходяща интубационна канюла, или чрез интраперитонеална инжекция. Други начини на излагане биха били приемливи, ако могат да се обосноват. Максималният обем течност, който може да се вкара еднократно със стомашна сонда или инжекция зависи от големината на опитното животно. Обемът не трябва да превишава 2ml/100g телесно тегло. Обеми, по-високите от тези, трябва да се обосноват. С изключение на дразнеци или корозивни вещества, които нормално дават изострящи ефекти при по-високи концентрации, варируемостта на тестовия обем следва да се сведе до минимум чрез регулиране на концентрацията с цел осигуряване на постоянен обем на всички нива на дозиране.

1.5.6. Подготовка на хромозомите

Непосредствено след убиването на животните костният мозък се извлича, експонира се в хипотоничен разтвор и се фиксира. След това клетките се разнасят върху предметни стъкла и се оцветяват.

1.5.7. Анализ

Митотичният индекс следва да се определи като мярка на цитотоксичност в най-малко 1 000 клетки на едно животно за всички опитни животни (включително и положителните контроли) и животни, които не са подлагани на опити, с отрицателни контроли.

За всяко животно следва да се анализират най-малко 100 клетки. Този брой би могъл да се намали, когато се наблюдава висок брой аберации. Всички предметни стъкла, включително и тези на положителните и отрицателните контроли, следва да се кодират поотделно преди анализа под микроскоп. Тъй като процедурите по подготовка на предметно стъкло често водят до разкъсване на част от метафазите със загуба на хромозоми, отчетените клетки следва да съдържат известен брой центромери, равни на броя $2n \pm 2$.

ДАННИ

2.1. ОБРАБОТКА НА РЕЗУЛТАТИТЕ

Данните за всяко от животните следва да се представят в таблица. Експерименталната единица е животното. За всяко изследвано животно отделно се оценява броя на отчетените клетки, броя на аберации на клетка и процента на клетки със структурна хромозомна аберация(и). Следва да се показват различните типове структурни хромозомни аберации с броя и честотата им за групите, при които се извършват опити, и за контролните групи. Празнини се регистрират отделно и докладват, но принципно не се включват в общата честота на аберациите. Ако няма факти за разлика в реакцията между половете, данните от двата пола могат да се комбинират за статистическия анализ.

2.2. ОЦЕНКА И ТЪЛКУВАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ

Има няколко критерия за определяне на положителен резултат, като например свързано с дозата увеличение в относителния брой на клетки с хромозомни аберации, или явно увеличение в броя на клетки с аберации в групата с еднократна доза и еднократно вземане на проба. Първо следва да се вземе предвид биологичната значимост на резултатите. Статистически методи може да се използват като помощно средство за оценката на резултатите от теста (6). Статистическата значимост не следва да е единственият решаващ фактор за положителна реакция.

Двузначните резултати следва да се изяснят чрез още тестове, като за предпочитане е да се изменят условията на експеримента.

Увеличение в полоплоидията може да е показателно за това, че тестваното вещество има потенциала да индуцира геномни хромозомни аберации. Увеличение в ендоредупликацията може да показва, че тестваното вещество е в състояние да инхибира прогресията на клетъчния цикъл (7) (8).

Тествано вещество, за което резултатите не отговарят на горните критерии, се счита за немутагенно при настоящия тест.

Въпреки че повечето опити дават ясно положителни или отрицателни резултати, в редки случаи наборът данни изключва възможността да се направи категорична преценка за активността на тестваното вещество. Резултатите могат да останат неясни или под въпрос, независимо от това колко пъти е извършен опитът.

Положителните резултати от теста *in vivo* за хромозомни аберации показват, че тестваното вещество предизвиква структурни хромозомни аберации в костния мозък на тествания вид. Отрицателните резултати показват, че при условията за провеждане на теста, тестваното вещество не предизвиква хромозомни аберации в костния мозък на тествания вид.

Следва да се обсъди вероятността тестваното вещество или метаболитите му да достигнат общото кръвообращение или по-конкретно тъканта, която е обект на тестването (напр. системна токсичност).

3. ДОКЛАДВАНЕ

ДОКЛАД ЗА ТЕСТА

Докладът за теста трябва да включва следната информация:

Разтворител/носител:

- обосновка за избора на носител,
- разтворимост и стабилност на тестваното вещество в разтворител/носител, ако са известни.

Опитни животни:

- вид/щам,
- брой, възраст и пол на животните,
- източник, условия на отглеждане, начин на хранене и др.
- индивидуално тегло на животните в началото на теста, в т.ч. обхват на телесното тегло, средни стойности и стандартно отклонение за всяка група.

Условия за провеждане на теста:

- положителни и отрицателни (носител/разтворител) контролни данни,
- данни от изследването за установяване на обхват, ако е проведено,
- основна причина за избора на нивото на дозата,
- подробности за приготвянето на тестваното вещество,
- подробности за администрирането на тестваното вещество,
- основна причина за начина на администриране,
- методи за проверка на достигането на тестваното вещество до общото кръвообращение или тъкан, която е обект на тестването, ако са приложими,
- преминаване от концентрация (ppm) на тестваното вещество в храната/питейната вода към действителната доза (mg/kg телесно тегло), ако е приложимо,
- подробности за качеството на храната и водата,
- подробно описание на графици на третиране и вземане на проби,
- методи на измерване на токсичността,
- идентичност на блокиращото метафазата вещество, концентрация и времетраене на третирането
- методи на приготвяне на предметно стъкло,
- критерии за отчитане на аберации,
- брой на анализирани клетки /животно,
- критерии за определяне на изследванията като положителни, отрицателни или двузначни.

Резултати:

- признаци на токсичност,
- митотичен индекс,
- тип и брой на аберациите, дадени отделно за всяко животно,
- общ брой на аберациите на група със средни стойности и стандартни отклонения,
- изменения в полиплоидията, ако се наблюдават,
- взаимоотношение доза-реакция, където е възможно,
- статистически анализи, ако има такива,
- паралелни отрицателни контролни данни,
- исторически отрицателни данни от предишни изследвания с обхвати, средни стойности и стандартни отклонения
- паралелни положителни контролни данни.

Обсъждане на резултатите.

Заклучения.

Резултати:

БИБЛИОГРАФИЯ

- (1) Adler, I. D. (1984), Cytogenetic Tests in Mammals, w: *Mutagenicity Testing: a Practical Approach*, S. Venitt and J. M. Parry (eds), IRL Press, Oxford, Washington D.C., pp. 275-306.
- (2) Preston, R. J., Dean, B. J., Galloway, S., Holden, H., McFee, A. F. and Shelby, M. (1987), Mammalian *In vivo* Cytogenetic Assays: Analysis of Chromosome Aberrations in Bone Marrow Cells, *Mutation Res.*, 189, pp. 157-165.
- (3) Richold, M., Chandley, A., Ashby, J., Gatehouse, D. G., Bootman, J. and Henderson, L. (1990), *In vivo* Cytogenetic Assays, w: D. J. Kirkland (ed.), *Basic Mutagenicity Tests, UKEMS Recommended Procedures. UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report, Part I revised*,

Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 115-141.

- (4) Tice, R. R., Hayashi, M., MacGregaro, J. T., Anderson, D., Blakey, D. H., Holden, H. E., Kirsch-Volders, M., Oleson Jr., F. B., Pacchierotti, F., Preston, R. J., Romagna, F., Shimada, H., Sutou, S. and Vannier, B. (1994), Report from the Working Group on the *in Vivo* Mammalian Bone Marrow Chromosomal Aberration Test, *Mutation Res.*, 312, pp. 305-312.
- (5) Fielder, R. J., Allen, J. A., Boobis, A. R., Botham, P. A., Doe, J., Esdaile, D. J., Gatehouse, D. G., Hodson-Walker, G., Morton, D. B., Kirkland, D. J. and Richold, M. (1992), Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group: Dose setting in *In Vivo* Mutagenicity Assays, *Mutagenesis*, 7, pp. 313-319.
- (6) Lovell, D. P., Anderson, D., Albanese, R., Amphlett, G. E., Clare, G., Ferguson, R., Richold, M., Papworth, D. G. and Savage, J. R. K. (1989), Statistical Analysis of *In Vivo* Cytogenetic Assays, w: *UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing, Report Part III. Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data*, D. J. Kirkland (ed.) Cambridge University Press, Cambridge, pp. 184-232.
- (7) Locke-Huhle, C. (1983), Endoreduplication in Chinese hamster cells during alpha-radiation-induced G2 arrest, *Mutation Res.*, 119, pp. 403-413.
- (8) Huang, Y., Change, C. and Trosko, J. E. (1983), Aphidicolin-induced endoreduplication in Chinese hamster cells, *Cancer Res.*, 43, pp. 1362-1364.”

ПРИЛОЖЕНИЕ 4В

Б.12. МУТАГЕННОСТ — ИН ВИВО МИКРОЯДРЕН ТЕСТ НА ЕРИТРОЦИТИ ОТ БОЗАЙНИЦИ

1. МЕТОД

Настоящият метод е изцяло подобен на Микроядрен тест на еритроцити от бозайници - OECD TG 474 от 1997 г.

1.1. ВЪВЕДЕНИЕ

Микроядрен тест *ин vivo* на еритроцити от бозайници се използва за откриване на увреждания, предизвиквани от тестваното вещество, на хромозомите или митотичния апарат на еритробласти чрез анализ на еритроцити, така както са взети като проби от клетки в костния мозък и/или периферната кръв на животни, обичайно гризачи.

Целта на микроядрения тест е да се идентифицират вещества, причиняващи цитогенно увреждане, което води до образуването на микроядра, съдържащи изоставачи хромозомни фрагменти или цели хромозоми.

Когато еритробласт на костен мозък се развие в полихроматичен еритроцит, главното ядро се екструдира, а всяко образувано вече микроядро може да изостане в иначе обезядрената цитоплазма. Онагледяването на микроядрата се улеснява в тези клетки, тъй като на тях им липсва главното ядро. Увеличаването на честотата на полихроматични еритроцити с микроядра в третираните животни е показател за индуцирано хромозомно увреждане.

В настоящия тест обикновено се използва костния мозък на гризачи, тъй като в тази тъкан се произвеждат полихроматични еритроцити. Измерването на незрели (полихроматични) еритроцити с микроядра в периферна кръв е еднакво приемливо във всеки вид, при който неспособността на далака да отстранява еритроцити с микроядра е изявена, или който е показал адекватна чувствителност да открива агенти, причиняващи структурни или геномни хромозомни аберации. Микроядрата могат да бъдат разграничени чрез редица критерии. Те включват идентификация на наличието или отсъствието на кинетохорна или центромерна ДНК в микроядрата. Честотата на незрели (полихроматични) еритроцити с микроядра е главната крайна точка. Броят на зрели (нормохроматични) еритроцити в периферната кръв, съдържащи микроядра измежду даден брой зрели еритроцити може също да се използва като крайна точка за анализа на опита, когато животните се третират в продължение на четири или повече седмици.

Настоящият микроядрен тест *ин vivo* на еритроцити от бозайници е особено важен за оценка на мутагенната опасност поради това, че дава възможност за разглеждане на фактори на процесите *ин vivo* на метаболизма, фармакокинетиката и възстановителните процеси в ДНК, въпреки че те могат да варират според вида, тъканта и генетичните крайни точки. Анализ чрез тест *ин vivo* е полезен и за по-нататъшното изследване на мутагенния ефект, установен чрез система *ин vitro*.

Ако има доказателства, че тестваното вещество или реактивен метаболит няма да достигнат до тъкан, която е обект на анализ, не е подходящо да се използва настоящият тест.

Вижте също “Общо въведение”, Част Б.

1.2 ДЕФИНИЦИИ

Центромера (Кинетохора): област(и) на хромозомата, с която вретеновидни фибри се свързват по време на клетъчното деление, като така позволяват методично придвижване на дъщерните хромозоми към полюсите на дъщерните клетки.

Микроядра: малки ядра, отделни от и в допълнение към главното ядро на клетките, произведени по време на телофазата на митоза (мейоза) чрез изоставящи хромозомни фрагменти или цели хромозоми.

Нормохроматичен еритроцит: зрял еритроцит, на който му липсват рибозоми и може да бъде отличен от незрели, полихроматични еритроцити чрез оцветявания, селективни за рибозоми.

Полихроматичен еритроцит: незрял еритроцит в междинен етап на развитие, който все още съдържа рибозоми и следователно може да бъде отличен от зрели нормохроматични еритроцити чрез оцветявания, селективни за рибозоми.

1.3 ПРИНЦИП НА МЕТОДА НА ТЕСТА

Животните се експонират на въздействието на тестваното вещество по подходящ начин. Ако се използва костен мозък, животните се убиват в подходящи моменти след третирането, костният мозък се извлича, а препаратите се изготвят и оцветяват (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7). Когато се използва периферна кръв, кръвта се взема в подходящи моменти след третирането, а препаратите за намазка се изготвят и оцветяват (4) (8) (9) (10). За опити с периферна кръв следва да мине възможно най-малко време между излагането и обирането на реколтата от клетки. Препаратите се анализират за наличие на микроядра.

1.4 ОПИСАНИЕ НА МЕТОДА НА ТЕСТА

1.2.1. ПОДГОТОВКА

1.2.1.1.Подбор на животинския вид

Ако се използва костен мозък, препоръчват се мишки или плъхове, въпреки че всеки подходящ вид от бозайници би могъл да се използва. Когато се използва периферна кръв, препоръчват се мишки. Все пак, всеки подходящ вид от бозайници би могъл да се използва, при условие че това е вид, в който далакът не отстранява еритроцити с микроядра или вид, показал адекватна чувствителност за откриване на агенти, които причиняват структурни или геномни хромозомни аберации. За теста трябва да се вземат общо използваните лабораторни щамове на млади, здрави животни.

В началото на изследването, вариациите в теглото на животните следва да са минимални и да не превишават $\pm 20\%$ от средното тегло на всеки пол.

1.4.1.2. Условия на отглеждане и хранене

Прилагат се общите условия в Общото въведение към част Б, въпреки че целта е влажността на въздуха да е 50-60%.

1.4.1.3. Подготовка на животните

Здрави млади животни се отделят на произволен принцип за контролните и опитни групи. На животните се дава уникална идентификация. Животните са аклиматизират към лабораторните условия поне пет дена. Клетките следва да се подредят така, че да се намалят до минимум евентуалните ефекти от разполагането им.

1.4.1.4. Приготвяне на дози

Твърдите вещества за теста следва да се разтворят или суспендират в подходящи разтворители или носители, и, при необходимост, да се разреждат преди даване на дозата на животните. Течните вещества за теста могат да се дозират директно или да разреждат преди дозиране. Следва да се използват пресни препарати на тестваното вещество, освен ако данните за устойчивостта му не показват, че може да се съхранява.

1.4.2. Условия за провеждане на теста

1.4.2.1. Разтворител/носител

Разтворителят/носител не следва да има токсично въздействие при използваните нива на дозиране, а също така не следва да предизвиква съмнения за химическа реакция между него и тестваното вещество. Ако се използват други, освен добре познатите разтворители/носители, включването им в теста следва да се подкрепи от данни за съвместимостта им. Препоръчва се, винаги когато е възможно, първо да се разглежда възможността за прилагането на воден разтворител/носител.

1.4.2.2. Контроли

Във всеки тест следва да се включват паралелни положителни и отрицателни (разтворител/носител) контроли за всеки пол. Като се изключи третирането с тестваното вещество, с животните в контролните групи следва да борави по един и същи начин както с животните от групите, с които се извършват опити.

Положителните контроли следва да произвеждат микроядра *in vivo* при нива на излагане, при които се очаква да се постигне забележимо увеличение спрямо съответния фон. Положителните контролни дози следва да са така избрани, че ефектите да са ясни, но да не разкриват непосредствено на четеца идентичността на кодираните предметни стъкла. Приемливо е положителните контроли, да се администрират по различен начин от тестваното вещество и да им се взема проба само еднократно. Освен това, за положителна контрола следва да се смята използването на химикали, принадлежащи към химичен клас, когато такива са налични.

Примерите за положителни контролни вещества включват:

Вещество	CAS No	Einecs No
етил метансулфонат	62-50-0	200-536-7
N- етил -N-нитрозокарбамид	759-73-9	212-072-2
митомицин С	50-07-7	200-008-6
циклофосфамид	50-18-0	200-015-4
циклофосфамид монохидрат	6055-19-2	
триетиленмеламин	51-18-3	200-083-5

За всяко вземане на проби следва да се включват отрицателните контроли, третирани само с разтворител или носител, а за всички останали неща третирани както опитните групи, освен ако няма приемлива изменчивост между животните и честотите на клетки с микроядра са доказани с контролни данни от предишни изследвания. Ако за отрицателни контроли се прилага еднократно вземане на проби, най-подходящият момент е първият. Освен това, следва също да се използват необработени контроли, освен ако няма контролни данни от предишни изследвания или публикувани контролни данни, които показват, че няма никакви вредни или мутагенни ефекти, предизвикани от избрания разтворител/носител.

Ако се използва периферна кръв, проба преди третирането може да е приемлива в качеството на паралелна отрицателна контрола, но само при кратките изследвания на периферна кръв (напр. 1 до 3 третираня), когато резултантните данни са в очаквания обхват за контрола от предишни изследвания.

1.5. ПРОЦЕДУРА

1.5.1. Брой и пол на животните

Всяка група за опити и всяка контролна група трябва да включват поне пет анализируеми животни от един пол (11). Ако по времето на изследването има налични данни от изследвания на същия вид и чрез същия начин на излагане, които показват, че няма значителни разлики между половете по отношение на токсичността, то тестването на един пол ще бъде достатъчно. Когато излагането на хора спрямо химически вещества може да е в специфична зависимост от пола, като например с някои фармацевтични агенти, тестът следва да се проведе с животни от подходящия пол.

1.5.2. График на обработване

Не може да се препоръча стандартен график на обработване (т.е. едно, две или повече третираня на 24-часови интервали). Пробите от обширни режими на дози са приемливи дотолкова, доколкото е демонстриран положителен ефект за настоящото изследване, или за изследване с отрицателен ефект дотолкова, доколкото е демонстрирана токсичността или е използване граничната доза и дозирането е продължило до времето на вземане на проба. Тестваните вещества могат също да се администрират като разделена доза, т.е. две третираня в един и същи ден, разделени от не повече от няколко часа, за да се улесни даването на голям обем материал.

Тестът може да се извърши по два начина:

а) животните се третират веднъж с тестваното вещество. Проби от костен мозък се вземат най-малко два пъти, като се започне не по-рано от 24 часа след третирането, но не повече от 48 часа след третирането на подходящи интервали между пробите. Вземането на проби по-рано от 24 часа след третирането следва да бъде обосновано. Проби от периферна кръв се вземат най-малко два пъти, като се започне не по-рано от 36 часа след третирането на подходящи интервали след първото, но не повече от 72 часа. Когато се разпознае положителна реакция след едно вземане на проба, не се изисква допълнително вземане на проба;

б) Ако се прилагат две или повече обработвания на ден (напр. две или повече третираня на 24-часови интервали), следва да се вземат проби веднъж между 18-ия и 24-ия час след

последното третиране за костния мозък и веднъж между 36-ия и 48-ия час след последното третиране за периферната кръв (12).

Когато е уместно, може да се използва друг график на вземане на проби.

1.5.3. Нива на дозиране

Ако се извършва изследване за обхват поради това, че няма в наличност подходящи данни, то следва да се извърши в същата лаборатория, като се използва същия вид, щам, пол и режим на третиране, който се използва и в главното изследване (13). Ако има токсичност, за първото вземане на проба се използват три нива на дозиране. Тези нива на дозиране следва да включват обхват от максимална до слаба токсичност или липса на токсичност. При вземане на проба на по-късен етап е необходимо да се прилага само най-високата доза. Най-високата доза се дефинира като доза, създаваща признаци на такава токсичност, че от по-високи нива на дозиране, базирани на същия режим, би могло да се очаква да доведат до леталност. Вещества със специфични биологични активности при ниски, нетоксични дози (като хормони и митогени) могат да бъдат изключения по отношение на критериите за определяне на дозата и следва да се оценяват за всеки конкретен случай. Най-високата доза може също да се дефинира като доза, която показва известни признаци на токсичност в костния мозък (напр. намаляване на съответната част от незрели еритроцити спрямо общия брой еритроцити в костния мозък или периферната кръв).

1.5.4. Граничен тест

Ако тест с едно ниво на дозиране от минимум 2 000 mg/kg телесно тегло при еднократно третиране или две третириания в един и същи ден, не дава забележими токсични ефекти, а генотоксичност не би могла да се очаква на базата на данни от структурно свързани вещества, то тогава пълно изследване с три нива на дозиране може да не се счита за необходимо. За по-дълготрайни изследвания граничната доза е 2 000 mg/kg/телесно тегло/ден за период на третиране до 14 дни и 1 000 mg/kg/телесно тегло/ден за период на третиране, по-дълъг от 14 дни. Очакваното излагане към хора може да покаже, че е необходимо в граничния тест да се използва по-високо ниво на дозиране.

1.5.5. Администриране на дозите

Тестваното вещество обикновено се дава със стомашна сонда като се използва тръба или подходяща интубационна канюла, или чрез интраперитонеална инжекция. Други начини на излагане биха били приемливи, ако могат да се обосноват. Максималният обем течност, който може да се вкара еднократно със стомашна сонда или инжекция зависи от големината на опитното животно. Обемът не следва да превишава 2ml/100g телесно тегло. Използването на обеми, по-големи от тези, трябва да бъде обосновано. С изключение на дразнещи или корозивни вещества, които нормално дават изострящи ефекти при по-високи концентрации променливостта на тестовия обем следва да се сведе до минимум чрез регулиране на концентрацията с цел осигуряване на постоянен обем на всички нива на дозиране.

1.5.6. Подготовка на костния мозък/кръвта

Клетките на костния мозък обичайно се вземат от бедрените кости или от тибиите (големите пищяли), непосредствено след убиването на животното. Според общоприетата практика клетките се изваждат от бедрените кости или от тибиите, подготвят се и се оцветяват по установените методи. Периферната кръв се взема от опашната вена или друг подходящ кръвоносен съд и незабавно се оцветява суправитално (8) (9) (10), или се приготвят препарати за намазка, след което се оцветяват. Използването на специфични оцветители за ДНК (напр. акридин оранжево (14) или Хъохст 33258 плюс пиронин-У (15)) може да елиминира някои от артефактите, свързани с използването на оцветител, което не е специфично за ДНК. Това предимство не изключва използването на конвенционални багрила (напр. Гиемса). Могат също да се използват допълнителни системи (напр. целулозни колони за отстраняване на клетки с ядра (16)), при условие че е доказано, че тези системи работят адекватно в лабораторното приготвяне на микроядра.

1.5.7. Анализ

Пропорцията на незрелите от общо (незрели + зрели) еритроцити се определя за всяко животно като се отброяват общо най-малко 200 еритроцити за костен мозък и 1 000 еритроцити за периферна кръв (17). Всички предметни стъкла, включително и тези за положителни и отрицателни контроли, следва да се кодират поотделно преди анализа под микроскоп. Най-малко 2 000 незрели еритроцити на животно се изследват за разпространението на незрели еритроцити с микроядра. Допълнителна информация може да се получи чрез изследване на зрели еритроцити за микроядра. Когато се анализират предметни стъкла, пропорцията незрели от общия брой еритроцити не следва да е по-малко от 20% от контролната стойност. Когато животните се третират непрекъснато в течение на четири или повече седмици, най-малко 2 000 зрели еритроцити на животно могат също да се изследват за разпространението на микроядра. Приемливи алтернативи на ръчния анализ са системите за автоматизиран анализ (анализ на изображението и поточен цитометричен анализ на клетъчни суспензии), ако са подходящо обосновани и валидирани.

2. ДАННИ

2.1. ОБРАБОТКА НА РЕЗУЛТАТИТЕ

Индивидуалните данни за животните следва да се представят в таблица. Експерименталната единица е животното. За всяко изследвано животно следва да се дава отделно броят на отчетените незрели еритроцити, броят на незрелите еритроцити с микроядра и броят на незрелите спрямо общото количество на еритроцитите. Когато животните се третират непрекъснато в течение на четири или повече седмици, данни за зрелите еритроцити следва също да се дадат, ако са събрани. Пропорцията на незрелите спрямо общия брой на еритроцитите, и ако се счита за приложимо, процентът на еритроцитите с микроядра, се посочва за всяко животно. Ако няма факти за разлика в реакцията между половете, данните от двата пола могат да се комбинират за статистическия анализ.

2.2. ОЦЕНКА И ТЪЛКУВАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ

Има няколко критерия за определяне на положителен резултат, като свързано с дозата увеличение на броя клетки с микроядра или явно увеличение на броя клетки с микроядра

в група с еднократна доза и еднократно вземане на проба. Първо следва да се разгледа биологичната значимост на резултатите. При оценката на резултатите от теста като помощно средство може да се използват статистически методи (18) (19). Статистическата значимост не следва да е единственият решаващ фактор за положителна реакция. Двухзначните резултати следва да се изяснят чрез допълнително тестване, като за предпочитане е да се изменят условията на експеримента.

Тествано вещество, за което резултатите не отговарят на горните критерии, се счита за немутагенно при настоящия тест.

Въпреки че повечето експерименти дават ясно положителни или отрицателни резултати, в редки случаи наборът данни изключва възможността да се направи категорична преценка за активността на тестваното вещество. Резултатите могат да останат двухзначни или под въпрос, независимо от това колко пъти е повторен опитът.

Положителните резултати в микронуклеарния тест показват, че веществото индуцира микроядра, които са резултат от хромозомно увреждане или увреждане на митотичния апарат в еритробластите на опитния вид. Отрицателните резултати показват, че при условията за провеждане на теста, тестваното вещество не създава микроядра в незрелите еритроцити на тествания вид.

Следва да се обсъди вероятността тестваното вещество или метаболитите му да достигнат общото кръвообращение или конкретно тъканта, която е обект на изследване (напр. системна токсичност).

ДОКЛАДВАНЕ

ДОКЛАД ЗА ТЕСТА

Докладът за теста следва да включва следната информация:

Разтворител/носител:

- обосновка за избора на носител,
- разтворимост и стабилност на тестваното вещество в разтворител/носител, ако са известни.

Опитни животни:

- вид/щам,
- брой, възраст и пол на животните,
- източник, условия на отглеждане, начин на хранене и др.,
- индивидуално тегло на животните в началото на теста, в т.ч. обхват на телесното тегло, средни стойности и стандартно отклонение за всяка група.

Условия за провеждане на теста:

- положителни и отрицателни (носител/разтворител) контролни данни,
- данни от изследването за установяване на обхват, ако е проведено,
- основна причина за избора на нивото на дозата,
- подробности за приготвянето на тестваното вещество,
- подробности за администрирането на тестваното вещество,
- основна причина за начина на администриране,
- методи за проверка на достигането на тестваното вещество до общото кръвообращение или прицелната тъкан, ако са приложими,

- преминаване от концентрация (ppm) на тестваното вещество в храната/питейната вода към действителната доза (mg/kg телесно тегло), ако е приложимо,
- подробности за качеството на храната и водата,
- подробно описание на графици на третиране и вземане на проби,
- методи на приготвяне на предметно стъкло,
- методи на измерване на токсичността,
- критерии за отчитане на незрели еритроцити,
- брой на анализирани клетки /животно,
- критерии за считане на изследванията положителни, отрицателни или двузначни.

Резултати:

- признаци на токсичност,
- пропорция на незрелите еритроцити от общия брой еритроцити,
- брой на незрелите еритроцити с микроядра, посочен отделно за всяко животно,
- средна стойност \pm стандартно отклонение на незрелите еритроцити с микроядра на група,
- взаимоотношение доза-реакция, където е възможно,
- статистически анализи, ако има такива,
- паралелни отрицателни данни и отрицателни данни от предишни изследвания,
- паралелни положителни контролни данни.

Обсъждане на резултатите.

Заключения.

БИБЛИОГРАФИЯ

- (1) Heddle, J. A. (1973), A Rapid In Vivo Test for Chromosomal Damage, *Mutation Res.*, 18, pp. 187-190.
- (2) Schmid, W. (1975), The Micronucleus Test, *Mutation Res.*, 31, pp. 9-15.
- (3) Heddle, J. A., Salamone, M. F., Hite, M., Kirkhart, B., Mavournin, K., MacGregor, J. G. and Newell, G. W. (1983), The Induction of Micronuclei as a Measure of Genotoxicity, *Mutation Res.* 123, pp. 61-118.
- (4) Mavournin, K. H., Blakey, D. H., Cimino, M. C., Salamone, M. F. and Heddle, J. A. (1990), The In Vivo Micronucleus Assay in Mammalian Bone Marrow and Peripheral Blood. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program, *Mutation Res.*, 239, pp. 29-80.
- (5) MacGregor, J. T., Schlegel, R., Choy, W. N. and Wehr, C. M. (1983), Micronuclei in Circulating Erythrocytes: A Rapid Screen for Chromosomal Damage During Routine Toxicity Testing in Mice, w: *Developments in Science and Practice of Toxicology*, ed. A. W. Hayes, R. C. Schnell and T. S. Miya. Elsevier, Amsterdam, pp. 555-558.
- (6) MacGregor, J. T., Heddle, J. A. Hite, M., Margolin, G. H., Ramel, C., Salamone, M. F., Tice, R. R., and Wild, D. (1987), Guidelines for the Conduct of Micronucleus Assays in Mammalian Bone Marrow Erythrocytes, *Mutation Res.*, 189, pp. 103-112.

- (7) MacGregor, J. T., Wehr, C. M., Henika, P. R. and Shelby, M. E. (1990), The in vivo Erythrocyte Micronucleus Test: Measurement at Steady State Increases Assay Efficiency and Permits Integration with Toxicity Studies, *Fund. Appl. Toxicol.* 14, pp. 513-522.
- (8) Hayashi, M., Morita, T., Kodama, Y., Sofumi, T. and Ishidate, M. Jr. (1990), The Micronucleus Assay with Mouse Peripheral Blood Reticulocytes Using Acridine Orange-Coated Slides, *Mutation Res.*, 245, pp. 245-249.
- (9) The Collaborative Study Group for the Micronucleus Test (1992). Micronucleus Test with Mouse Peripheral Blood Erythrocytes by Acridine Orange Supravital Staining: The Summary Report of the 5th Collaborative Study by CSGMT/JEMMS, MMS, *Mutation Res.*, 278, pp. 83-98.
- (10) The Collaborative Study Group for the Micronucleus Test (CSGMT/JEMMS, MMS: The Mammalian Mutagenesis Study Group of the Environmental Mutagen Society of Japan) (1995), Protocol recommended for the short-term mouse peripheral blood micronucleus test, *Mutagenesis*, 10, pp. 53-159.
- (11) Hayashi, M., Tice, R. R., MacGregor, J. T., Anderson, D., Blackey, D. H., Kirsch-Volders, M., Oleson, Jr. F. B., Pacchicrotti, F., Romagna, F., Shimada, H. Sutou, S. and Vannier, B. (1994), in Vivo Rodent Erythrocyte Micronucleus Assay, *Mutation Res.*, 312, pp. 293-304.
- (12) Higashikuni, N. and Sutou, S. (1995), An optimal, generalised sampling time of 30 ± 6 h after double dosing in the mouse peripheral micronucleus test, *Mutagenesis*, 10, pp. 313-319.
- (13) Fielder, R. J., Allen, J. A., Boobis, A. R., Botham, P. A., Doe, J., Esdaile, D. J., Gatehouse, D. G., Hodson-Walker, G., Morton, D. B., Kirkland, D. J. and Rochold, M. (1992), Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group: Dose Setting in In Vivo Mutagenicity Assays, *Mutagenesis*, 7, pp. 313-319.
- (14) Hayashi, M., Sofumi, T. and Ishidate, M. Jr. (1983), An Application of Acridine Orange Fluorescent Staining to the Micronucleus Test, *Mutation Res.*, 120, pp. 241-247.
- (15) MacGregor, J. T., Wehr, C. M. and Langlois, R. G. (1983), A Simple Fluorescent Staining Procedure for Micronuclei and RNA in Erythrocytes Using Hoechst 33258 and Pyromin Y, *Mutation Res.*, 120, pp. 269-275.
- (16) Romagna, F. and Staniforth, C. D. (1989), The automated bone marrow micronucleus test, *Mutation Res.*, 213, pp. 91-104.
- (17) Gollapudi, B. and McFadden, L. G. (1995), Sample size for the estimation of polychromatic to normochromatic erythrocyte ratio in the bone marrow micronucleus test, *Mutation Res.*, 347, pp. 97-99.
- (18) Richold, M., Ashby, J., Bootman, J., Chandley, A., Gatehouse, D. G. and Henderson, L. (1990), In Vivo Cytogenetics Assay, w: D. J. Kirkland (ed.),

Basic Mutagenicity tests, UKEMS Recommended Procedures, UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report, Part I, revised, Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 115-141.

- (19) Lovell, D. P., Anderson, D., Albanese, R., Amphlett, G. E., Clare, G., Ferguson R., Richold, M., Papworth, D. G. and Savage, J. R. K. (1989), Statical Analysis of In Vivo Cytogenetic Assays, w: D. J. Kirkland (ed.), *Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report, Part III*, Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 184-232.”

ПРИЛОЖЕНИЕ 4 Г

Б.13/14. МУТАГЕННОСТ — БАКТЕРИИ ЗА ТЕСТВАНЕ НА ОБРАТНИ МУТАЦИИ

1. МЕТОД

Настоящият метод е изцяло подобен на Бактериален тест за обратни мутации OECD TG 471 от 1997 г.

1.1. ВЪВЕДЕНИЕ

Бактериалният тест за обратни мутации използва изискващи аминокиселина щамове на *Salmonella typhimurium* и на *Escherichia coli*, за да се открият точкови мутации, състоящи се в заместване, добавяне или делеция на една или няколко ДНК базови двойки (1) (2) (3). Принципът на настоящия бактериален тест за обратни мутации се състои в това, че той открива мутации, които обръщат мутациите, налични в тестваните щамове и възстановяват функционалните способности на бактериите да синтезират основна аминокиселина. Ревертантните бактерии се откриват по способността им да растат при отсъствието на аминокиселина, изисквана от родителския тестван щам.

Точковите мутации са причината за много човешки генетични заболявания и има фактически доказателства, че точковите мутации в онкогени и тумороподтискащи гени на соматични клетки участват в образуването на тумори у хора и експериментални животни. Бактериалният тест за обратни мутации е бърз, евтин и относително лесен за провеждане. Много от тестваните щамове имат няколко характеристики, които ги правят почувствителни за откриване на мутации, включително реагиращи секвенции на ДНК в положение на реверсия, повишена клетъчна пропускливост към големи молекули и елиминиране на системи за репарация на ДНК или увеличаването на репарационните процеси на ДНК, при които са възможни грешки. Специфичността на тестваните щамове може да даде полезна информация за типовете мутации, които се индуцират от генотоксични агенти. За бактериалните тестове за обратни мутации съществува огромна база данни с резултати за голямо разнообразие от структури, а също така са разработени и добре установени методологии за тестване на химикали с различни физико-химични свойства, в т.ч. летливи съединения.

Вижте също “Общо въведение”, Част Б.

1.2. ДЕФИНИЦИИ

Тест за обратни мутации в *Salmonella typhimurium* или *Escherichia coli* открива мутация в нуждаещия се от аминокиселина щам (съответно хистидин или триптофан), за да се получи независим от външна доставка на аминокиселина щам.

Мутагени - заместители на основна двойка са агенти, причиняващи основна промяна в ДНК. В реверсивен тест тази промяна може да възникне от страната на първоначалната мутация или от втора страна в бактериалния геном.

Фреймшифт мутагени са агенти, предизвикващи добавянето или делецията на една или повече основни двойки в ДНК, като по този начин се променя четящата рамка в РНК.

1.3. НАЧАЛНИ СЪОБРАЖЕНИЯ

Бактериалният тест за обратни мутации използва прокариотни клетки, които се различават от клетките на бозайниците по фактори като поглъщане, метаболизъм, хромозомна структура и ДНК репарационни процеси. Провежданите тесотве *in vitro* по принцип изискват използването на екзогенен източник на метаболитна активация. Системите *in vitro* за метаболитна активация не могат изцяло да имитират условията *in vivo* на бозайниците. Следователно тестът не осигурява пряка информация за мутагенната и канцерогенна сила на дадено вещество при бозайници.

Бактериалният тест за обратни мутации обикновено се използва като първоначално откриване на генотоксична дейност, и в частност, на дейност, индуцираща точкова мутация. Обширна база данни е показала, че много химикали, които са положителни при настоящия тест, също проявяват мутагенна активност при други тестове. Има примери за мутагенни агенти, които не се откриват с настоящия тест; причините за тези недостатъци могат да се припишат на специфичното естество на установената крайна точка, разлики в метаболитната активация или разлики в бионаличността. От друга страна, факторите, които подобряват чувствителността на бактериалния тест за обратни мутации могат да доведат до надценяване на мутагенна активност.

Бактериалният тест за обратни мутации може да не е подходящ за оценката на някои класове химични вещества, например някои съединения с високо бактерицидно съдържание (напр. някои антибиотици) и тези, за които се счита (или се знае), че си взаимодействат конкретно със системата на клетъчна репликация у бозайниците напр. някои инхибитори на топоизомеразата и някои нуклеозидни аналози). В подобни случаи може би по-подходящи са тестовете за мутации при бозайници.

Въпреки че много съединения, които са положителни в настоящия тест, са канцерогени за бозайниците, съответствието не е абсолютно. То зависи от химичния клас, а има канцерогени, които не се откриват с настоящия тест, тъй като те действат чрез други, негенотоксични механизми или механизми, които не се срещат в бактериалните клетки.

1.4. ПРИНЦИП НА МЕТОДА НА ТЕСТА

Суспензии на бактериални клетки се експонират на въздействието на тестваното вещество с наличие и отсъствие на система за екзогенна метаболитна активация. При метода с посяване на блюдо тези суспензии се смесват с пласт от агар и незабавно се посяват в блюдо върху минимална среда. При метода с предварително инкубиране сместа за обработване се инкубира и след това се смесва с пласт от агар преди да се посее в блюдо върху минимална среда. При двата метода след два или три дни инкубация се преброяват ревертантните колонии и се сравняват с броя на спонтанни ревертантни колонии в контролни плочки с разтворител.

Описани са няколко процедури за провеждането на бактериалния тест за обратни мутации. Измежду най-често използваните са методът с посяване в блюдо (1) (2) (3) (4), прединкубационният метод (2) (3) (5) (6) (7) (8), флукуационният метод (9) (10) и суспензионният метод (11). Описани са и модификации за тестване на газове или пари (12).

Описаните в метода процедури се отнасят главно за метода с посяване в блюдо и прединкубационния метод. Който и да е от тях е приемлив за провеждане на опити, както със, така и без метаболитна активация. Някои вещества могат да се открият по-ефикасно като се използва прединкубационния метод. Тези вещества принадлежат към химични класове, включващи алифатни нитрозамини с къси вериги, двувалентни метали, алдехиди, азо багрила и диазо съединения, пиролизидинови алкалоиди, алилни съединения и нитро съединения (3). Признава се също, че някои класове мутагени не винаги се откриват със

стандартните процедури като методът на посяване в блюдо или прединкубационния метод. Те трябва да се считат за "специални случаи" и силно се препоръчва за откриването им да се използват други процедури. Следните "специални случаи" биха могли да бъдат идентифицирани (заедно с примери за процедурите, които биха могли да се използват за откриването им): азо багрила и диазо съединения (3) (5) (6) (13), газове и летливи химикали (12) (14) (15) (16) и гликозиди (17) (18). Отклонение от стандартната процедура следва да бъде научно обосновано.

1.5. ОПИСАНИЕ НА МЕТОДА НА ТЕСТА

1.5.1. Подготовка

1.5.1.1. Бактерии

Свежи бактериални култури следва да се отглеждат до късната експоненциална или ранна стационарна фаза на растеж (приблизително 10^9 клетки на ml). Не следва да се използват култури в късна стационарна фаза. От първостепенна важност е културите, използвани в опита, да съдържат висок титър жизнеспособни бактерии. Титърът може да се илюстрира с контролни данни от предишни изследвания за кривите на растежа или във всеки анализ на опита чрез определяне количествата на жизнеспособни клетки чрез експеримент с посев в блюдо.

Препоръчителната температура на инкубация е 37°C.

Следва да се използват се най-малко пет бактериални щама. Те включват четири щама на *Salmonella typhimurium* (TA 1535; TA 1537 или TA97a или TA97; TA98; и TA100), които са показали, че са надеждни и репродуктивно реагиращи между лабораториите. Тези четири щама на *Salmonella typhimurium* имат GC основни двойки на главната реверсивна страна и е известно, че те не биха могли да открият някои оксидиращи мутагени, напречно свързващи се агенти и хидразини. Подобни вещества могат да се открият с щамове на *Escherichia coli* WP2 или *Salmonella typhimurium* TA102 (19), които имат AT основна двойка на главната реверсивна страна. Следователно препоръчителната комбинация от щамове е:

- *Salmonella typhimurium* TA1535, и
- *Salmonella typhimurium* TA1537 или TA97 или TA97a, и
- *Salmonella typhimurium* TA98, и
- *Salmonella typhimurium* TA100, и
- *Escherichia coli* WP2 uvrA, или *Escherichia coli* WP2 uvrA (pKM101), или *Salmonella typhimurium* TA102.

За да се открият напречно свързващи се мутагени, може би е за предпочитане да се включи TA102 или да се добави щам of *Escherichia coli* с изобилие от ДНК репарации (напр. *Escherichia coli* WP2 или *Escherichia coli* WP2 (pKM101)).

Следва да се използват установените процедури за приготвяне на изходна култура, проверка на маркера и съхранение. Следва да се посочи необходимата за растеж аминокиселината за приготвянето на всяка замразена изходна култура (хистидин за щамове на *Salmonella typhimurium*, и триптофан за щамове на *Escherichia coli*). По аналогичен начин следва да се проверят други фенотипни характеристики, а именно: наличието или отсъствието на плазмиди на R-фактор, при необходимост (т.е. устойчивост на ампицилин в щамовете TA98, TA100 и TA97a или TA97, WP2 uvrA и WP2 uvrA

(pKM101), и устойчивост на ампицилин+тетрациклин в щам TA 102); наличието на характерни мутации (т.е. gfa мутация в *Salmonella typhimurium* чрез чувствителност към кристално виолетово, и umrA мутация в *Escherichia coli* или umrB мутация в *Salmonella typhimurium*, чрез чувствителност към ултравиолетова светлина) (2) (3). Щамовете следва също така да произвеждат спонтанни ревертантни колонии в блюдо в рамките на честотните обхвати, които се очакват от контролните данни, получени от предишни изследвания в лабораторията и, за предпочитане, в обхвата, описан в литературата.

1.5.1.2. Среда

Използва се подходящ минимален агар (напр. съдържащ минимална среда Е на Фьогел-Бонер и глюкоза), и пласт от агар, съдържащ хистидин и биотин или триптофан, за да се получат няколко клетъчни деления (1) (2) (9).

1.5.1.3. Метаболична активация

Бактериите трябва да се експонират на тестваното вещество, както при наличие, така и при липса на подходяща система за метаболична активация. Най-често използваната система е постмитохондрична фракция (S9) с добавка на ко-фактор, приготвена от черните дробове на гризачи, третирани с ензимно-индуциращи реактиви като Ароклор 1254 (1) (2) или смес от фенобарбитон и β -нафтофлафон (18) (20) (21). Постмитохондричната фракция обичайно се използва с концентрации в обхвата от 5 до 30% v/v в сместа S9. Изборът и състоянието на системата за метаболична активация може да зависи от класа на тествания химикал. В някои случаи е подходящо да се използва повече от една концентрация на постмитохондрична фракция. За азо багрила и диазо съединения може да е по-подходяща редуцираща система за метаболична активация (6) (13).

1.5.1.4. Тествано вещество/приготвяне

Твърдите вещества за теста следва да се разтворят или суспендират в подходящи разтворители или носители, и, при необходимост, да се разреждат преди третиране на клетките. Течните вещества за теста могат да се добавят директно към системите за тестване и/или да разреждат преди третиране. Следва да се използват пресни препарати на тестваното вещество, освен ако данните за устойчивостта му не показват, че може да се съхранява.

Не следва да има съмнения за химическа реакция на разтворителя/носителя с тестваното вещество и той следва да е съвместим с оцеляването на бактериите и активността на S9 (22). Ако се използват други освен добре познатите разтворители/носители, включването им в теста следва да се подкрепи от данни за съвместимостта им. Препоръчва се, винаги когато е възможно, първо да се разглежда възможността за прилагането на воден разтворител/носител. При тестването на вещества, нестабилни във вода, използваните органични разтворители не следва да съдържат вода.

1.5.2. Условия за провеждане на теста

1.5.2.1. Тествани щамове (Вж. 1.5.1.1)

1.5.2.2. Концентрация на излагането

Измежду критериите, които следва да се вземат предвид при определянето на най-високото количество на тестваното вещество са цитотоксичността и разтворимостта в окончателната смес за третиране.

Полезно би било да се определи токсичността и неразтворимостта в предварителен опит. Цитотоксичността може да се открие чрез намаляване на броя на ревертантните колонии, почистване или намаляване на фона, или степента на оцеляване на третираните култури. Цитотоксичността на едно вещество може да се промени в присъствието на системи за метаболитна активация. Неразтворимостта следва да се оценява като утаяване в крайната смес при реални условия за провеждане на теста и е видима с просто око.

Препоръчителната максимална тестова концентрация за разтворими нецитотоксични вещества е 5 mg/блюдо или 5µl/блюдо. За нецитотоксични вещества, които не са разтворими при 5 mg/блюдо или 5µl/блюдо, една или повече тествани концентрации следва да са неразтворими в крайната смес за третиране. Тествани вещества, които вече са цитотоксични под 5 mg/блюдо или 5µl/блюдо, следва да се тестват до границата на цитотоксична концентрация. Преципитатът не следва да влияе на отчитането.

Използват се най-малко пет различни, даващи възможност за анализ концентрации на тестваното вещество на приблизително полулогаритмични (i.e. $\sqrt{10}$) интервали между тестваните точки за начален опит. Могат да бъдат подходящи и по-малки интервали, когато се изследва реакция на концентрация. Тестване над концентрацията от 5 mg/блюдо или 5µl/блюдо може евентуално да се извършва, когато се изследват вещества, съдържащи значителни количества потенциално мутагенни примеси.

1.5.2.3. Отрицателни и положителни контроли

Във връзка с анализа на всеки отделен опит следва да се включват паралелни положителни и отрицателни (разтворител или носител) контроли със специфичен щам, както със, така и без метаболитна активация. Следва да се избират положителните контролни концентрации, показващи ефективно провеждане на всеки опит.

За тестове със система за метаболитна активация, референтното вещество(а) за положителни контроли се избира въз основа на вида на използваните бактериални щамове.

Следните вещества са примери за подходящи положителни контроли за тестове с метаболитна активация:

Вещество	CAS No	Einecs No
9,1 0-диметилантрацен	781-43-1	212-308-4
7,1 2-диметилбенз[a]антрацен	57-97-6	200-359-5
бензо[a]пирен	50-32-8	200-028-5
2-аминоантрацен	613-13-8	210-330-9
циклофосфамид	50-18-0	200-015-4
циклофосфамид монохидрат	6055-19-2	

Следното вещество е подходяща положителна контрола за метода с редуцираща метаболитна активация:

Вещество	CAS No	Einecs No
Конгочервено	573-58-0	209-358-4

Не следва да се използва 2-аминоантрацен като единствен показател за ефикасността на сместа S9. Ако се използва 2-аминоантрацен, всяка партида от S9 следва също да се характеризира с мутаген, изискващ метаболитна активация от микрозомни ензими, напр., бензо[а]пирен, диметилбензантрацен.

Следните вещества са примери на специфични по щам положителни контроли за тестове без система за екзогенна метаболитна активация:

Вещество	CAS No	Einecs No	Щам
Натриев азид	26628-22-8	247-852-1	ТА 1535 и ТА 100
2-нитрофлуорен	607-57-8	210-138-5	ТА 98
9-амноакридин	90-45-9	201-995-6	ТА 1537, ТА 97 и ТА 97a
ICR 191	17070-45-0	241-129-4	ТА 1537, ТА 97 и ТА 97a
кумол хидропероксид	80-15-9	201-254-7	ТА 102
митомицин С	50-07-7	200-008-6	WP2 uvrA и ТА 102
N-етил-N-нитро-N-нитрозогуанидин	70-25-7	200-730-1	WP2, WP2uvrA и WP2uvrA(pKM101)
4-нитрохинолин - 1 -оксид	56-57-5	200-281-1	WP2, WP2uvrA и WP2uvrA(pKM101)
фурилфурамид (AF2)	3688-53-7		Щамове, съдържащи плазмид

Могат да се използват други референтни вещества за положителни контроли. За положителна контрола следва да се разглежда използването на химикали, принадлежащи към химичен клас, когато такива са налични.

Следва да бъдат включени отрицателните контроли, състоящи се само от разтворител или носител в средата за третиране, и третирани по същия начин както опитните групи. В допълнение към това следва също да се използват нетретирани контроли, освен ако няма исторически контролни данни от предишни изследвания, показващи, че избраният разтворител не причинява вредни или мутагенни ефекти.

1.5.3. Процедура

При метода на посяване в блюдо (1) (2) (3) (4) без метаболитна активация се смесват обичайно 0,05ml или 0,1ml тестовите разтвори, 0,1ml свежа бактериална култура (съдържаща около 10^5 жизнеспособни клетки) и 0,5ml стерилен буфер с 2,0ml слой от агар. За тест с метаболитна активация се смесват обикновено 0,5ml от сместа за метаболитна активация, съдържаща адекватно количество постмитохондрична фракция (в границите от 5 до 30% v/v в сместа за метаболитна активация), със слой от агар (2,0ml) заедно с бактериите и тестваното вещество/тестван разтвор. Съдържанието на всяка епруветка се смесва и изсипва върху повърхността на блюдо с минимален агар. Слой от агар се оставя да се втвърди преди инкубацията.

При прединкубационния метод (2) (3) (5) (6), тестваното вещество/тестван разтвор се инкубира предварително с тествания щам (съдържащ около 10^5 жизнеспособни клетки) и стерилен буфер или система за метаболитна активация (0,5ml) обичайно за 20 или повече минути при 30-37°C преди смесването със слоя от агар и изливането върху повърхността на блюдо с минимален агар. Обикновено 0,05 или 0,1ml от тестваното вещество/тестван

разтвор, 0,1ml бактерии и 0,5ml от S9 или стерилен буфер се смесват с 2,0ml слой от агар. Епруветките се аерират по време на предварителната инкубация с шейкър.

За адекватна оценка на променливостта при всяко ниво на дозиране се използват по три блюда. Използването на две блюда е приемливо, когато е научно обосновано. Загубата по невнимание на блюдо, не обезсилва опита по необходимост.

Газообразни или летливи вещества се изпитват чрез подходящи методи, като например в запечатани съдове (12) (14) (15) (16).

1.5.4. Инкубация

Всички блюда на даден тест се инкубират при 37°C за 48-72 часа. След инкубационния период се преброяват ревертантните колонии на блюдо.

2. ДАННИ

2.1. ОБРАБОТКА НА РЕЗУЛТАТИТЕ

Данните се представят като брой ревертантни колонии на блюдо. Също се дава броят ревертантни колонии както върху блюдата за отрицателни (контрола на разтворител и нетретирана контрола, ако се използва), така и за положителните контроли. Представят се броя на отделните блюда, средният брой ревертантни колонии на блюдо и стандартното отклонение за тестваното вещество и положителните и отрицателни (третирани и/или разтворител) контроли.

Няма изискване за потвърждаване на явно положителна реакция. Резултатите, които не са категорични, следва да се изяснят с още тестове, като за предпочитане е да се изменят условията на експеримента. Отрицателните резултати следва да се потвърдят за всеки случай поотделно. В случаите, когато не се счита необходимо потвърждаването на отрицателни резултати, следва да се даде обосновка. Изменението на параметрите на изследването с цел разширяване на обхвата на оценяваните условия следва да се вземе под внимание при следващите експерименти. Параметрите на изследването, които биха могли да се променят, включват границите на концентрацията, метода на третиране (посев върху блюдо или течна прединкубация) и условията на метаболитна активация.

2.2. ОЦЕНКА И ТЪЛКУВАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ

Има няколко критерия за определяне на положителен резултат, като например увеличение на концентрацията спрямо тествания обхват и/или репродуцируемо увеличение при една или повече концентрации на броя на ревертантни колонии на блюдо в поне един щам с или без система за метаболитна активация (23). Първо следва да се разгледа биологичната значимост на резултатите. При оценката на резултатите от теста биха могли да се използват статистически методи(24). Статистическата значимост не следва да е единственият решаващ фактор за положителна реакция.

Тествано вещество, за което резултатите не отговарят на горните критерии, се счита за немутагенно в настоящия тест.

Въпреки че повечето експерименти дават ясно положителни или отрицателни резултати, в редки случаи наборът данни изключва изключва възможността да се направи категорична

преценка за активността на тестваното вещество. Резултатите могат да останат двусмислени или под въпрос, независимо от това колко пъти е повторен опитът.

Положителните резултати от бактериалния тест за обратни мутации показват, че веществото индуцира точкови мутации чрез заместване на бази или фреймшифтове в генома на *Salmonella typhimurium* и/или *Escherichia coli*. Отрицателните резултати показват, че при условията за провеждане на теста, тестваното вещество не е мутагенно в тествания вид.

ДОКЛАДВАНЕ

ДОКЛАД ЗА ТЕСТА

Докладът за теста трябва да включва следната информация:

Разтворител/носител:

- обосновка за избора на носител,
- разтворимост и стабилност на тестваното вещество в разтворител/носител, ако са известни.

Щамове:

- използвани щамове,
- брой на клетки на култура,
- характеристики на щама,

Условия за провеждане на теста:

- количество тествано вещество на блюдо (mg/ блюдо или µl/plate) с основна причина за избора на доза и брой на блюдата на концентрация,
- използвани среди,
- тип и състав на системата за метаболитна активация, в т.ч. критерии за приемливост,
- процедури на третиране .

Резултати:

- признаци на токсичност,
- признаци на утаяване,
- брой отделни блюда,
- средният брой на ревертантните колонии на блюдо и стандартно отклонение,
- взаимоотношение доза-реакция, където е възможно,
- статистическа оценка, ако има такава,
- паралелни отрицателни (разтворител/носител) и положителни контролни данни с обхват, средни стойности и стандартни отклонения,
- отрицателни (разтворител/носител) и положителни контролни данни от предишни изследвания с обхват, средни стойности и стандартни отклонения,

Обсъждане на резултатите.

Заклучения.

БИБЛИОГРАФИЯ

- (1) Ames, B. N., McCann, J. and Yamasaki E. (1975), Methods of Detecting

Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian-Microsome Mutagenicity Test, *Mutation Res.*, 31, pp. 347-364.

- (2) Maron, D. M. and Ames, B. N. (1983), Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test, *Mutation Res.*, 113, pp. 173-215.
- (3) Gatehouse, D., Haworth, S., Cebula, T., Gocke, E., Kier, L., Matsushima, T., Melcion, C., Nohmi, T., Venitt, S. and Zeiger, E. (1994), Recommendations for the Performance of Bacterial Mutation Assays, *Mutation Res.*, 312, pp. 217-233.
- (4) Kier, L. D., Brusick D. J., Auletta, A. E., Von Halle, E. S., Brown, M. M., Simmon, V. F., Dunkel, V., McCann, J., Mortelmans, K., Prival, M., Rao, T. K. and Ray V. (1986), *The Salmonella typhimurium/Mammalian Microsomal Assay: A Report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program*, *Mutation Res.*, 168, pp. 69-240.
- (5) Yahagi, T., Degawa, M., Seino, Y. Y., Matsushima, T., Nagao, M., Sugimura, T. and Hashimoto, Y. (1975), Mutagenicity of Carcinogen Azo Dyes and their Derivatives, *Cancer Letters* 1, pp. 91-96.
- (6) Matsushima, M., Sugimura, T., Nagao, M., Yahagi, T., Shirai, A. and Sawamura, M. (1980), Factors Modulating Mutagenicity Microbial Tests, w: *Short-term Test Systems for Detecting Carcinogens*, ed. Norpoth K. H. and Garner, R. C., Springer, Berlin-Heidelberg-New York, pp. 273-285.
- (7) Gatehouse, D. G., Rowland, I. R., Wilcox, P., Callender, R. D. and Foster, R. (1980), Bacterial Mutation Assays, w: *Basic Mutagenicity TestS: UKEMS Part 1 Revised*, ed. D. J. Kirkland, Cambridge University Press, pp. 13-61.
- (8) Aeschacher, H. U., Wolleb, U. and Porchet, L. (1987), Liquid Preincubation Mutagenicity Test for Foods, *J. Food Safety*, 8, pp. 167-177.
- (9) Green, M. H. L., Muriel, W. J. and Bridges, B. A. (1976), Use of a simplified fluctuation test to detect low levels of mutagens, *Mutation Res.*, 38, pp. 33-42.
- (10) Hubbard, S. A., Green, M. H. L., Gatehouse, D. and Bridges, J. W. (1984), The Fluctuation Test in Bacteria, w: *Handbook of Mutagenicity Test Procedures*, 2nd Edition, ed. Kilbey, B. J., Legator, M., Nichols, W. and Ramel, C., Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford, pp. 141-161.
- (11) Thompson, E. D. and Melampy, P. J. (1981), An Examination of the Quantitative Suspension Assay for Mutagenesis with Strains of *Salmonella typhimurium*, *Environmental Mutagenesis*, 3, pp. 453-465.
- (12) Araki, A., Noguchi, T., Kato, F. and Matsushima, T. (1994), Improved Method for Mutagenicity Testing of Gaseous Compounds by Using a Gas Sampling Bag, *Mutation Res.*, 307, pp. 335-344.
- (13) Prival, M. J., Bell, S. J., Mitchell, V. D., Reipert, M. D. and Vaughan, V. L. (1984), Mutagenicity of Benzidine and Benzidine-Congener Dyes and Selected Monoazo Dyes in a Modified Salmonella Assay, *Mutation Res.*, 136, pp. 33-

- (14) Zeiger, E., Anderson, B. E., Haworth, S., Lawlor, T. and Mortelmans, K. (1992), Salmonella Mutagenicity Tests. V. Results from the Testing of 311 Chemicals, *Environ. Mol. Mutagen.*, 19, pp. 2-141.
- (15) Simmon, V., Kauhanen, K. and Tardiff, R. G. (1977), Mutagenic Activity of Chemicals Identified in Drinking Water, in *Progress in Genetic Toxicology*, D. Scott, B. Bridges and F., Sobels (eds.) Elsevier, Amsterdam, pp. 249-258.
- (16) Hughes, T. J., Simmons, D. M., Monteith, I. G. and Claxton, L. D. (1987), Vaporisation Technique to Measure Mutagenic Activity of Volatile Organic Chemicals in the Ames / Salmonella Assay, *Environmental Mutagenesis*, 9, pp. 421-441.
- (17) Matsushima, T., Matsumoto, A., Shirai, M., Sawamura, M., and Sugimura, T. (1979), Mutagenicity of the Naturally Occurring Carcinogen Cycasin and Synthetic Methylazoxy Methane Conjugates in *Salmonella typhimurium*, *Cancer Res.*, 39, pp. 3780-3782.
- (18) Tamura, G., Gold, C., Ferro-Luzzi, A. and Ames, B. N. (1980), Fecalase: A Model for Activation of Dietary Glycosides to Mutagens by Intestinal Flora, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77, pp. 4961-4965.
- (19) Wilcox, P., Naidoo, A., Wedd, D. J. and Gatehouse, D. G. (1990), Comparison of *Salmonella typhimurium* TA 102 with *Escherichia coli* WP2 Tester strains, *Mutagenesis*, 5, pp. 285-291.
- (20) Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K. and Sugimura, T. (1976), A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer or Metabolic Activation Systems, w: *In vitro Metabolic Activation in Mutagenesis Testing*, eds. F. J. de Serres et al. Elsevier, North Holland, pp. 85-88.
- (21) Elliot, B. M., Combes, R. D., Elcombe, C. R., Gatehouse, D. G., Gibson, G. G., Mackay, J. M. and Wolf, R. C. (1992), Alternatives to Aroclor 1254-induced S9 in *in vitro* Genotoxicity Assays, *Mutagenesis*, 7, pp. 175-177.
- (22) Maron, D., Katzenellenbogen, J. and Ames, B. N. (1981), Compatibility of Organic Solvents with the Salmonella/Microsome Test, *Mutation Res.*, 88, pp. 343-350.
- (23) Claxton, L. D., Allen, J., Auletta, A., Mortelmans, K., Nestmann, E. and Zeiger, E. (1987), Guide for the *Salmonella typhimurium*/Mammalian Microsome Tests for Bacterial Mutagenicity, *Mutation Res.*, 189, pp. 83-91.
- (24) Mahon, G. A. T., Green, M. H. L., Middleton, B., Mitchel, I., Robinson, W. D. and Tweats, D. J. (1989), Analysis of Data from Microbial Colony Assays, w: *UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing, Part II. Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data*, ed. Kirkland, D. J., Cambridge University Press, pp. 28-65."

ПРИЛОЖЕНИЕ 4 Д

Б.17. МУТАГЕННОСТ — ИН ВИТРО ТЕСТ ЗА КЛЕТЪЧНИ ГЕННИ МУТАЦИИ ПРИ БОЗАЙНИЦИ

1. МЕТОД

Настоящият метод е изцяло подобен тест *in vitro* за клетъчни генни мутации при бозайници OECD TG 476 от 1997 г.

1.1. ВЪВЕДЕНИЕ

Тестът *in vitro* за клетъчни генни мутации при бозайници може да се използва за откриване на генни мутации, индуцирани от химични вещества. Подходящи клетъчни линии са L5178Y на миши лимфомни клетки, линиите CHO, CHO-AS52 и V79 на клетките на китайски хамстер и ТК6 на човешки лимфобластоидни клетки (1). В тези клетъчни линии най-често използваните генетични крайни точки измерват мутацията на киназата на тимидина (ТК) и трансферазата на хипокснтин-гуанин фосфорибозил (HPRT), както и трансген от трансферазата на ксантин-гуанин фосфорибозил (XPRT). Тестовите за мутации на ТК, HPRT и XPRT откриват различни спектри на генетични събития. Автозомното разполагане на ТК и XPRT може да даде възможност за откриването на генетични събития (напр. големи делеции), които не се забелязват на локуса на HPRT върху X хромозоми (2)(3)(4)(5)(6).

В теста *in vitro* за клетъчни генни мутации при бозайници могат да се използват култури на установени клетъчни линии или клетъчни щамове. Клетките се избират въз основа на способността за растеж в дадена култура и устойчивостта в честотата на спонтанните мутации.

Тестовите *in vitro* по принцип изискват екзогенен източник на метаболитна активация. Тази система за метаболитна активация не може изцяло да имитира условията *in vivo* при бозайниците. Следва да се избягват условия, които биха довели до резултати, неотразяващи присъща мутагенност. Положителни резултати, които не отразяват присъща мутагенност, могат да възникнат от промени в рН, осмотично налягане или високи нива на цитотоксичност (7).

Настоящият тест се използва за откриване на евентуални мутагени и канцерогени. Много съединения, които са положителни в настоящия тест, са канцерогени за бозайници; все пак, няма идеално съответствие между настоящия тест и канцерогенността. Съответствието зависи от химичния клас, а има все повече доказателства за това, че съществуват канцерогени, които не се откриват чрез настоящия тест, защото вероятно те действат чрез други, негенотоксични механизми или механизми, отсъстващи в бактериалните клетки(6).

Вижте също “Общо въведение”, Част Б.

1.2. ДЕФИНИЦИИ

Мутация в поколението напред: генна мутация от родителския тип на мутанта, от който възниква изменение или загуба на ензимна активност на функцията на кодиращия протеин.

Мутагени-заместители на основна двойка: вещества, които причиняват заместване на една или няколко основни двойки в ДНК.

Фреймшифт мутагени: Вещества, които причиняват добавяне или делеция на една или много основни двойки в ДНК молекула.

Време на фенотипно изразяване: период, през който непроменените генни продукти са изчерпани от новомутиралите клетки.

Мутантна честота: броят на наблюдаваните мутантни клетки, разделен на броя на жизнеспособните клетки.

Относителен общ растеж: увеличение в броя на клетките за период време в сравнение контролна популация клетки; изчислен като продукта от суспензионния растеж спрямо в отрицателната контрола, умножен по ефективността (к.п.д.) на клониране спрямо отрицателна контрола.

Относителен суспензионен растеж: увеличение в броя клетките за период на изразяване спрямо отрицателната контрола.

Жизнеспособност: ефективността на клониране на третираните клетки по време на посяването в блюдо в селективни условия след периода на изразяване.

Оцеляване: ефективността на клониране на третираните клетки, когато са посети в блюдо в края на периода на третиране; оцеляването обикновено се изразява по отношение на оцеляването в контролната клетъчна популация.

1.2. ПРИНЦИП НА МЕТОДА НА ТЕСТА

Клетките с дефицит от тимидин киназа (ТК) поради мутацията $TK^{+/-} \rightarrow TK^{-/-}$ са устойчиви на цитотоксичните ефекти на пиримидиновия аналог трифлуороитимидин (ТФТ). Клетките с изобилие от тимидин киназа са чувствителни към ТФТ, което причинява инхибиране на клетъчния метаболизъм и спира по-нататъшното клетъчно деление. Така мутантните клетки са способни да пролиферират в присъствието на ТФТ, докато нормални клетки, съдържащи тимидин киназа, не са. Аналогично, клетките с дефицит от HPRT или XRPT се избират според устойчивостта им към 6-тиогуанин (ТГ) или 8-азагуанин (АГ). Следва внимателно да се подходи към свойствата на тестваното вещество, ако базов аналог или съединение се тестват в някой от тестовете за клетъчни генни мутации при бозайници. Например, следва всяка съмнителна селективна токсичност, предизвикана от тестваното вещество за мутантни или немутантни клетки да бъде проучена. Следователно, характеристиките на селекционната система/агент трябва да се потвърдят, когато се тестват химикали, структурно свързани със селективния агент (8).

Клетки в суспензия или еднослойна култура се излагат на тестваното вещество, с и без метаболитна активация, за подходящ период от време и се субкултивират, за да се определи цитотоксичността и да се даде възможност за фенотипно изразяване преди селекцията на мутанти (9) (10) (11) (12) (13). Цитотоксичността обикновено се определя чрез измерване на относителната ефективност на клониране (оцеляване) или относителен общ растеж на културите след периода на третиране. Третираните култури се поддържат в среда на растеж за достатъчен период от време, характерен за всеки избран локус и клетъчен тип, за да се осигури почти оптимално фенотипно изразяване на индицираните мутации. Мутантната честота се определя чрез посяване на известни количества клетки в среда, съдържаща селективния агент, за да се открият мутантни клетки, и в среда без селективен агент, за да се определи ефективността на клониране (оцеляване). След подходящ инкубационен период колонии се преброяват. Мутантната честота се получава от броя на мутантни колонии в селективна среда и броя на колонии в неселективна среда.

1.4. ОПИСАНИЕ НА МЕТОДА НА ТЕСТА

1.4.1. ПОДГОТОВКА

1.4.1.1. Клетки

За настоящия тест има в наличност разнообразни клетъчни типове включително и субклони на L5171Y, CHO, CHO-AS52, V79 или ТК6 клетки. Типовете клетки, използвани в настоящия тест, следва да са показали чувствителност към химични мутагени, висока ефективност на клониране и стабилна честота на спонтанни мутации. Клетките следва да се проверят за замърсяване на микоплазмата, и ако са замърсени, не следва да се използват.

Тестът следва да се провежда с предварително определена чувствителност и енергия. Броят клетки, култури и концентрации на тестваното вещество следва да отразяват тези дефинирани параметри (14). Минималният брой жизнеспособни клетки, оцеляващи от третирането и използвани на всеки етап на теста, следва да се базира на честотата на спонтанни мутации. Една принципна насока е да се използва брой клетки, който е равен най-малко на 10 пъти реципрочната стойност на честотата на спонтанни мутации. Все пак, препоръчително е да се използват поне 10^6 клетки. Следва да има съответстващи данни от предишни изследвания за използваната клетъчна система, които да свидетелстват за последователност при провеждането на теста.

1.4.1.2. Среда и условия за отглеждане на културите

Следва да се използват подходяща хранителна среда и инкубационни условия (носител на културата, температура, концентрация на CO_2 и влажност на въздуха). Видовете хранителна среда следва да се подберат в съответствие със селективните системи и типа клетки на теста. Особено важно е условията за отглеждане на културите да се подберат така, че да осигуряват оптимален растеж на клетките по време на периода на изразяване и способност за образуване на колонии както за мутантни, така и за немутантни клетки.

1.4.1.3. Приготвяне на културите

Размножават се клетки от изходни култури, посяват се в хранителна среда и се инкубират при 37°C . Преди употребата им в настоящия тест може да се окаже необходимо културите да се почистят от съществуващи преди това мутантни клетки.

1.4.1.4. Метаболична активация

Клетките следва да се експонират на тестваното вещество както в наличието, така и в отсъствието на подходяща система за метаболична активация. Най-често използваната система е постмитохондрична фракция (S9) с добавка на ко-фактор, приготвена от черните дробове на гризачи, третирани с ензимно-индуциращи реактиви като Ароклор 1254 (15) (16) (17) (18) или смес от фенобарбитон и β -нафтофлафон (19) (20).

Постмитохондричната фракция обикновено се използва с концентрации в обхвата от 1—10% v/v в последната среда на теста. Изборът и състоянието на системата за метаболична активация може да зависи от класа на тествания химикал. В някои случаи би било подходящо да се използва повече от една концентрация на постмитохондрична фракция.

Редица разработки, включително и създаването на генно конструирани клетъчни линии, изразяващи специфични активизиращи ензими, могат да осигурят потенциал за ендогенна активация. Изборът на клетъчни линии за теста следва да е научно обоснован (напр. чрез значението на изоензим цитохром P450 за метаболизма на тестваното вещество).

1.4.1.4. Подготовка на тестваното вещество

Твърдите вещества за теста следва да се разтворят или суспендират в подходящи разтворители или носители, и, ако трябва, да се разреждат преди третиране на клетките. Течните вещества за теста могат да се добавят директно или да разреждат преди третиране. Следва да се използват пресни препарати на тестваното вещество, освен ако данните за стабилността му не показват, че може да се съхранява.

1.4.2 Условия за провеждане на теста

1.4.2.1. Разтворител/носител

Не следва да съществуват съмнения за химическа реакция на разтворителя/носителя с тестваното вещество и той следва да е съвместим с оцеляването на клетките и активността на S9. Ако се използват други освен добре познатите разтворители/носители, включването им в теста трябва да се подкрепи от данни за съвместимостта им. Препоръчва се, винаги когато е възможно, първо да се разглежда възможността за прилагането на воден разтворител/носител. При тестването на вещества, нестабилни във вода, използваните органични разтворители не следва да съдържат вода. Водата може да се отстрани чрез добавянето на молекулно сито.

1.4.2.2. Концентрации на излагане

Измежду критериите, които следва да се имат предвид при определянето на най-високите концентрации, са цитотоксичността, разтворимостта в тестовата система и промените в рН или осмотичното налягане.

Цитотоксичността следва да се определи със и без метаболитна активация в главния експеримент, като се използва подходяща индикация на клетъчната цялост и растеж като относителна ефективност на клониране (оцеляване) или относителен общ растеж. Може би ще е полезно да се определи цитотоксичността и разтворимостта в предварителен експеримент.

Следва да се използват най-малко четири анализируеми концентрации. Там, където се среща цитотоксичност, тези концентрации следва да покриват обхват от максимална до слаба токсичност или липса на токсичност; това обикновено означава, че концентрациите следва да се различават с коефициент не повече от 2 до $\sqrt{10}$. Ако максималната концентрация е базирана на цитотоксичност, то резултатът следва да е приблизително 10—20% (но не по-малко от 10%) относително оцеляване (относителна ефективност на клониране) или относителен общ растеж. За относително нецитотоксични вещества, максималната тестова концентрация следва да е 5 mg/ml, 5 μ l/ml, или 1,01 M, в зависимост от това коя е най-ниска.

Относително неразтворимите вещества следва да се тестват до или над границата им на разтворимост при условията на отглеждане на културата. Доказателствата за неразтворимост следва се определят в последната среда на третиране, на която са експонирани клетките. Може да бъде да се определи разтворимостта в началото и края на третирането, тъй като тя може да се промени в течение на експонирането в тестваната система поради присъствието на клетки, S9, серум и др. Неразтворимостта може да се установи с просто око. Утайката не следва да пречи на отчитането.

1.4.2.3. Контроли

Паралелни положителни и отрицателни (разтворител или носител) контроли, както със, така и без метаболитна активация, следва да се включат във всеки експеримент. Когато се използва метаболитна активация, химикалът за положителните контроли следва да е от такъв вид, че да изисква активация, за да произведе мутагенна реакция.

Примерите за положителни контролни вещества включват:

Състояние на метаболитна активация	Локус	Вещество	CAS No	Einecs No	
Отсъствие на екзогенна метаболитна активация	HPRT	Етил метансулфонат	62-50-0	200-536-7	
		Етил нитрозокарбамид	759-73-9	212-072-2	
	TK (малки и големи колонии)	Метил метансулфонат	66-27-3	200-625-0	
		XPRT	Етил метансулфонат	62-50-0	200-536-7
	Наличие на екзогенна метаболитна активация	HPRT	3-метилхолантрен	56-49-5	200-276-4
			N-нитрозодиметиламин	62-75-9	200-549-8
7,1 2-диметилбензантрацен			57-97-6	200-359-5	
TK (малки и големи колонии)		Циклофосфамид	50-18-0	200-015-4	
		Циклофосфамид монохидрат	6055-19-2		
		Бензо[а]пирен	50-32-8	200-028-5	
		3-метилхолантрен	56-49-5	200-276-5	
XPRT		N-нитрозодиметиламин (за високи нива на S-9)	62-75-9	200-549-8	
		Бензо[а]пирен	50-32-8	200-028-5	

Могат да се използват други подходящи референтни вещества за положителни контроли, напр. ако една лаборатория има база данни от предишни изследвания за 5-бромо 2'-

деоксиуридин (CAS No 59-14-3, Einesc No 200-415-9), това референтно вещество би могло също да се използва. Следва да се има предвид използването на химикали за положителна контрола, принадлежащи към химичен клас, когато такива са налични.

Следва да се включат отрицателните контроли, състоящи се само от разтворител или носител в средата за третиране, и третирани по същия начин както опитните групи. В допълнение към това, следва също да се използват нетретирани контроли, освен ако няма контролни данни от предишни изследвания, показващи, че избраният разтворител не причинява делеционни или мутагенни ефекти.

1.4.3. Процедура

1.4.3.1. Третиране с тестваното вещество

Пролифериращи клетки се експонират на въздействието на тестваното вещество, както със, така и без метаболитна активация. Излагането следва да е за подходящ период от време (обикновено 3—6 часа е ефективен период). Времето на излагане може да обхване един или повече клетъчни цикли.

За всяка тествана концентрация може да се използват две или една третирани култури. Когато се използва по една култура, броят на концентрациите следва да се увеличи, за да се осигури адекватен брой култури за анализ (напр. най-малко осем анализируеми концентрации). Отрицателните (разтворител) контролни култури следва да са две.

Газообразните или летливи вещества следва да се тестват чрез подходящи методи, като например в запечатани носители на културата (21) (22).

1.4.3.2. Измерване на оцеляването, жизнеспособността и честотата на мутантите

В края на периода на излагане, клетките се промиват и култивират, за да се определи оцеляването и да се даде възможност за изразяване на мутантния фенотип. Измерването на цитотоксичността чрез определяне на относителната ефективност на клониране (оцеляване) или относителния общ растеж на културите обикновено започва след периода на третиране.

Всеки локус изисква точно определено минимално време за почти оптимално изразяване на фенотипа на новоиндуцираните мутанти (HPRT и XPRT изискват поне 6-8 дена, а ТК поне два дена). Клетките се отглеждат в среда с и без селективен агент(и) за определяне на бройките мутанти и съответно на ефективността на клониране. Измерването на жизнеспособността (използвано за изчисляване на честотата на мутантите) започва в края на времето на изразяване чрез култивиране в блюдо в неселективна среда.

Ако тестваното вещество е положително в L5178Y ТК^{+/-}-теста, сортирането на колонии следва да се извърши поне на една от тестваните култури (най-високата положителна концентрация) и на отрицателните и положителни контроли. Ако тестваното вещество е отрицателно в L5178Y ТК^{+/-}-теста, сортирането на колонии трябва да се извърши на отрицателните и положителни контроли. В изследвания, използващи ТК6ТК^{+/-} може също да се направи сортиране на колонии.

2. ДАННИ

2.1. ОБРАБОТКА НА РЕЗУЛТАТИТЕ

Данните следва да обхващат цитотоксичността и жизнеспособността, броя на колонии и честотите на мутантите за третираните и контролни култури. В случай на положителна реакция в L5178Y ТК^{+/-} теста, колонии се отчитат като се използват критериите за малки и големи колонии при поне една концентрация на тестваното вещество (най-високата положителна концентрация) и на отрицателните и положителни контроли. Молекулното и цитогенетично естество на мутантите, както от големите, така и от малките колонии е изследвано в детайли (23) (24). В ТК^{+/-} теста колонии се отчитат с помощта на критериите за колонии с нормален растеж (големи) и бавен растеж (малки) (25). Мутантните клетки, претърпели най-обширното генетично увреждане имат удължен времена за удвояване и поради това образуват малки колонии. Това увреждане типично варира по мащаб от загубите на целия ген до кариотипно видими хромозомни аберации. Индуцирането на мутанти на малки колонии се свързва с химикали, индуциращи едри хромозомни аберации (26). По-малко засегнатите мутантни клетки растат с темпове, подобни на тези на родителските клетки и формират големи колонии.

Следва да се посочи оцеляването (относителни ефективности на клониране) или относителен общ растеж. Честотата на мутантите следва да се изрази като брой на мутиралите клетки спрямо броя на оцеляващите клетки.

Посочват се данните за отделните култури. Освен това, всички данни се резюмират в таблица.

Няма изискване за потвърждаване на ясна положителна реакция. Двухзначните резултати следва да се изяснят чрез допълнително тестване, като за предпочитане е да бъдат изменени условията на извършване на опита. Отрицателните резултати следва да се потвърдят за всеки случай поотделно. В случаите, когато не се счита необходимо потвърждаването на отрицателни резултати, трябва да се даде обосновка. Няма изискване за потвърждаване на ясна положителна реакция. Следва да се предвиди изменение в параметрите на изследване, за да се разширят условията, при които се прави оценка, при последващи опити или двухзначните или отрицателните резултати. Параметрите на изследването, които биха могли да се изменят, обхващат границите на концентрацията и условията на метаболитна активация.

2.2. ОЦЕНКА И ТЪЛКУВАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ

Има няколко критерия за определяне на положителен резултат като например увеличение, свързано с концентрацията, или репродуцируемо увеличение на честотата на мутантите. Първо трябва да се разгледа биологичната значимост на резултатите. При оценката на резултатите от теста биха могли да се използват статистически методи. Статистическата значимост не следва да е единственият решаващ фактор за положителна реакция.

Тествано вещество, за което резултатите не удовлетворяват горните критерии, се счита немутагенно в настоящата система.

Въпреки че повечето опити дават ясно положителни или отрицателни резултати, в редки случаи наборът данни изключва правенето на категорична преценка за активността на тестваното вещество. Резултатите могат да останат двухзначни или под въпрос, независимо от това колко пъти е повторен опитът.

Положителните резултати от теста *in vitro* за клетъчни генни мутации при бозайници показват, че тестваното вещество индуцира генни мутации в използваните в теста култивирани клетки на бозайници. Най-значима е положителната реакция на концентрация, която е репродуцируема. Отрицателните резултати показват, че при условията на теста тестваното вещество не предизвиква генни мутации в използваните в теста култивирани клетки на бозайници.

3. ДОКЛАДВАНЕ

ДОКЛАД ЗА ТЕСТА

Докладът за теста трябва да включва следната информация:

Разтворител/носител:

- обосновка за избора на носител,
- разтворимост и стабилност на тестваното вещество в разтворител/носител, ако са известни.

Клетки:

- тип и източник на клетки,
- брой клетъчни култури,
- брой клетъчни пасажи, ако е приложим,
- методи за поддържане на клетъчна култура, ако е приложим,
- отсъствие на микопlasма.

Условия за провеждане на теста:

- основна причина за избора на концентрации и броя на култури, в т.ч. напр. данни за цитотоксичността и граници на разтворимост, ако са налични,
- състав на средите, CO₂ концентрация,
- концентрация на тестваното вещество,
- обем на носителя и тестваното вещество сумарно,
- температура на инкубация,
- време на инкубация,
- времетраене на третирането,
- гъстота на клетките по време на третиране,
- тип и състав на системата за метаболитна активация, в т.ч. критерии за приемливост,
- положителни и отрицателни контроли,
- продължителност на периода на изразяване (в т.ч. брой на посетите клетки и субкултури и графици на подхранване, ако са уместни),
- селективни агенти,
- критерии за считане на тестовите положителни, отрицателни или двузначни,
- използвани методи за преброяване на жизнеспособните и мутирала клетки,
- кои дефиниции за размера и типа на колониите са взети предвид (в т.ч. критерии за "малки" и "големи" колонии, както е уместно).

Резултати:

- признаци на токсичност,
- признаци на угаяване,
- данни за рН и осмотичното налягане по време на излагането към тестваното вещество, ако са определени,
- размер на колониите, ако са отчетени поне за отрицателни и положителни контроли,

- адекватност на лабораторията за откриване на мутанти от малки колонии със системата L5178Y TK⁺, когато е уместно,
- взаимоотношение доза-реакция, където е възможно,
- статистически анализи, ако има такива,
- паралелни отрицателни (разтворител/носител) и положителни контролни данни,
- отрицателни (разтворител/носител) и положителни контролни данни от предишни изследвания с обхвати, средни стойности и стандартни отклонения,
- честота на мутантите.

Обсъждане на резултатите.

Заклучения.

БИБЛИОГРАФИЯ

- (1) Moore, M.M., DeMarini, D.M., DeSerres, F.J. and Tindal, K.R. (eds.) (1987), *Banbury Report 28; Mammalian Cell Mutagenesis*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- (2) Chu, E.H.Y. and Malling H.V. (1968), Mammalian Cell Genetics. II. Chemical Induction of Specific Locus Mutations in Chinese Hamster Cells *In Vitro*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 61, pp. 1306-1312.
- (3) Liber, H.L. and Thilly, W.G. (1982), Mutation Assay at the Thymidine Kinase Locus in Diploid Human Lymphoblasts, *Mutation Res.* 94, pp. 467-485.
- (4) Moore, M.M., Harington-Brock, K., Doerr, C.L. and Dearfield, K.L. (1989), Differential Mutant Quantitation at the Mouse Lymphoma TK and CHO HGPRT Loci, *Mutagenesis*, 4, pp. 394-403.
- (5) Aaron, C.S., and Stankowski, Jr. L.F., (1989), Comparison of the AS52/XPRT and the CHO/HPRT Assays: Evaluation of Six Drug Candidates, *Mutation Res.* 223, pp. 121-128.
- (6) Aaron, C.S., Bolcsfoldi, G., Glatt, H.R., Moore, M., Nishi, Y., Stankowski, Jr. L.F., Theiss, J. and Thompson, E. (1994), Mammalian Cell Gene Mutation Assays Working Group Report. Report of the International Workshop on Standardisation of Genotoxicity Test Procedures. *Mutation Res.* 312, pp. 235-239.
- (7) Scott, D., Galloway, S. M., Marshall, R. R., Ishidate, M., Brusick, D., Ashby, J. and Myhr, B.C. (1991), Genotoxicity Under Extreme Culture Conditions. A report from ICPEMC Task Group 9, *Mutation Res.* 257, pp. 147-204.
- (8) Clive, D., McCuen, R., Spector, J. F. S., Piper, C. and Mavournin, K. H. (1983), Specific Gene Mutations in L5178Y Cells in Culture. A Report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program, *Mutation Res.*, 115, pp. 225-251.
- (9) Li, A. P., Gupta, R. S., Heflich, R. H. and Wasson, J. S. (1988), A Review and Analysis of the Chinese Hamster Ovary/Hypoxanthine Guanine Phosphoribosyl Transferase System to Determine the Mutagenicity of

Chemical AgentS: A Report of Phase III of the U.S. Environmental Protections Agency Gene-Tox Program, *Mutation Res.*, 196, pp. 17-36.

- (10) Li, A. P., Carver, J. H., Choy, W. N., Hsie, A. W., Gupta, R. S., Loveday, K. S., ÓNeill, J. P., Riddle, J. C., Stankowski, L. F. Jr. and Yang, L. L. (1987), A Guide for the Performance of the Chinese Hamster Ovary Cell/Hypoxanthine-Guanine Phosphoribosyl Transferase Gene Mutation Assay, *Mutation Res.*, 189, pp. 135-141.
- (11) Liber, H. L., Yandell, D. W. and Little, J. B. (1989), A Comparison of Mutation Induction at the TK and HPRT Loci in Human Lymphoblastoid Cells: Quantitative Differences are Due to an Additional Class of Mutations at the Autosomal TK Locus, *Mutation Res.*, 216, pp. 9-17.
- (12) Stankowski, L. F. Jr., Tindal, K. R., and Hsie, A. W. (1986), Quantitative and Molecular Analyses of Ethyl Methanosulphonate - and ICR 191-Induced Molecular Analyses of Ethyl Methanosulphonate - and ICR 191 Induced Mutation in AS52 Cells, *Mutation Res.*, 160, pp. 133-147.
- (13) Turner, N. T., Batson, A. G. and Clive, D. (1984), Procedure for the L5178Y/TK⁺ - TK⁺ Mouse Lymphoma Cell Mutagenicity Assay, w: Kilbey, B. J. et al (eds.) Handbook of Mutagenicity Test Procedures, Elsevier Science Publishers, New York, pp. 239-268.
- (14) Arlett, C. F., Smith, D. M., Clarke, G. M., Green, M. H. L., Cole, J., McGregor, D. B. and Asquith S. C. (1989), Mammalian Cell Gene Mutation Assays Based upon Colony Formation, w: *Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data*, Kirkland, D. J., ed., Cambirdge University Press, pp. 66-101.
- (15) Abbondandolo, A., Bonatti, S., Corti, G., Fiorio, R., Loprieno, N. and Mazzacoro, A. (1977), Induction of 6-Thioguanine-Resistant Mutants in V79 Chinese Hamster Cells by Mouse-Liver Microsome- Activated Dimethylnitrosamine, *Mutation Res.* 46, pp. 365-373.
- (16) Ames, B. N., McCann, J. and Yamasaki, E. (1975), Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian-Microsome Mutagenicity Test, *Mutation Res.* 31, pp. 347-364.
- (17) Clive, D., Johnson, K. O., Spector, J. F. S., Batson A. G. and Brown M. M. M. (1979), Validation and Characterisation of the L5178Y/TK⁺ - Mouse Lymphoma Mutagen Assay System, *Mutat. Res.* 59, pp. 61-108.
- (18) Maron, D. M. and Ames, B. N. (1983), Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test, *Mutation Res.* 113, pp. 173-215.
- (19) Elliott, B. M., Combes, R. D., Elcombe, C. R., Gatehouse, D. G., Gibson, G. G., Mackay, J. M. and Wolf, R. C. (1992), Alternatives to Aroclor 1254-Induced S9 in: *In Vitro Genotoxicity Assays, Mutagenesis* 7, pp. 175-177.
- (20) Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K. and Sugimura, T. (1976), A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation

Systems, in: *In Vitro Metabolic Activation in Mutagenesis Testing*, de Serres, F. J., Fouts, J. R., Bend, J. R. and Philpot, R. M. (eds), Elsevier, North-Holland, pp. 85-88.

- (21) Krahn, D. F., Barsky, F. C. and McCooey, K. T. (1982), CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids, in: Ticc, R. R., Costa, D. L., Schaich, K. M. (eds), *Genotoxic Effects of Airborne Agents*, New York, Plenum, pp. 91-103.
- (22) Zamora, P. O., Benson, J. M., Li, A. P. and Brooks, A. L. (1983), Evaluation of an Exposure System Using Cells Grown on Collagen Gels for Detecting Highly Volatile Mutagens in the CHO/HGPRT Mutation Assay, *Environmental Mutagenesis*, 5, pp. 795-801.
- (23) Applegate, M. L., Moore, M. M., Broder, C. B., Burrell, A. and Hozier, J. C. (1990), Molecular Dissection of Mutations at the Heterozygous Thymidine Kinase Locus in Mouse Lymphoma Cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, pp. 51-55.
- (24) Moore, M. M., Clive, D. Hozier, J. C., Howard, B. E., Batson, A. G., Turner, N. T. and Sawyer, J. (1985), Analysis of Trifluoronthymidine, Resistant (TFT+) Mutants of L5178Y/TK^{+/-} - Mouse Lymphoma Cells, *Mutation Res.* 151, pp. 161-174.
- (25) Yandell, D. W., Dryja, T. P. and Little, J. B. (1990), Molecular Genetic Analysis of Recessive Mutations at a Heterozygous Autosomal Locus in Human Cells, *Mutation Res.* 229, pp. 89-102.
- (26) Moore, M. M. and Doerr, C. L. (1990), Comparison of Chromosome Aberration Frequency and Small Colony TK-Deficient Mutant Frequency in L5178Y/TK^{+/-} - 3.7.2C Mouse Lymphoma Cells, *Mutagenesis*, 5, pp. 609-614.”

ПРИЛОЖЕНИЕ 4Е

Б.23. ТЕСТ ЗА СПЕРМАТОГОНИАЛНИ ХРОМОЗОМНИ АБЕРАЦИИ ПРИ БОЗАЙНИЦИ

1. МЕТОД

Настоящият метод е изцяло подобен на Тест за сперматогониални хромозомни аберации при бозайници OECD TG 483 от 1997 г.

1.1. ВЪВЕДЕНИЕ

Целта на теста *in vivo* за сперматогониални хромозомни аберации при бозайници е да се идентифицират веществата, причиняващи структурни хромозомни аберации в сперматогониалните клетки на бозайници (1) (2) (3) (4) (5). Структурните аберации могат да бъдат два типа: хромозомни и хроматидни. При повечето химични мутагени индуцираните аберации са от хроматиден тип, но се срещат също и аберации от хромозомен тип. Настоящият метод не е предназначен да измерва геномни аберации и не се използва обикновено за тази цел. Хромозомните мутации и свързаните с тях събития са причината за много генетични болести при човека

Настоящият тест измерва хромозомните събития в сперматогониалните зародишни клетки и следователно от него се очаква да предсказва индуцирането на унаследяеми мутации в зародишни клетки.

В настоящия тест се използват обикновено гризачи. Този цитогенетичен тест *in vivo* открива хромозомни аберации в сперматогониални митози. Други прицелни клетки на са обект на настоящия метод.

За да се открият аберации от хроматиден тип в сперматогониални клетки, следва да се изследва първото митотично клетъчно деление след третиране преди тези увреждания да се загубят в следващите клетъчни деления. Допълнителна информация от третирани сперматогониални стволови клетки може да се получи чрез мейотичен хромозомен анализ за аберации от хромозомен тип на диакинезисна метафаза I, когато третираните клетки стават сперматоцити.

Настоящият тест *in vivo* е предназначен да изследва дали мутагените на соматични клетки са също така активни в зародишни клетки. Освен това сперматогониалният тест е от значение за оценката на опасността от с това, че позволява разглеждането на фактори като *in vivo* метаболизма, фармакокинетиката и процесите на ДНК репарация.

В тестиса съществува редица генерации сперматогони със спектър на чувствителност към химично третиране. Следователно, откритите аберации представляват съвкупна реакция на третираните популации сперматогониални клетки, като преобладаващи са по-многобройните диференцирани сперматогониални клетки. В зависимост от положението им в границите на тестиса, различните генерации сперматогони биха могли или не да бъдат експонирани на общото кръвообращение поради физическата и физиологична клетъчна бариера на Сертоли и бариерата кръв-тестис.

Ако има доказателства, че тестваното вещество или реактивен метаболит няма да достигнат до прицелната тъкан, не е подходящо да се използва настоящият тест.

Вижте също “Общо въведение”, Част Б.

1.2 ДЕФИНИЦИИ

Хроматиден тип аберация: структурно увреждане на хромозомата, изразяващо се в скъсване на единични хроматиди или скъсване и повторно съединяване между хроматиди.

Хромозомен тип аберация: структурно увреждане на хромозомата, изразяващо се в скъсване, или скъсване и повторно съединяване на двата хроматида на една и съща страна.

Ендоредупликация: процес, при който след период S на ДНК репликация ядрото не навлиза в митоза, а започва друг S период. Резултатът е хромозоми с 4, 8, 16, ... хроматиди.

Празнина: ахроматично увреждане, по-малко от ширината на един хроматид с минимално отклонение в реда на хроматида-(ите).

Геномна аберация: промяна в броя на хромозоми в сравнение с нормалния брой, характерен за използваните животни.

Полиплоидия: множество на хаплоидния брой хромозоми (n), различно от диплоидния брой (т.е. 3n, 4n, и т.н.).

Структурна аберация: промяна в хромозомната структура, откриваема чрез наблюдение с микроскоп на етапа на метафаза на клетъчното деление, наблюдавана като делеции и фрагменти, вътрешнохромозомни или междухромозомни промени.

1.3 ПРИНЦИП НА МЕТОДА НА ТЕСТА

Животни се експонират на тестваното вещество по подходящ начин и се убиват в подходящи моменти след третирането. Преди убиването, животните се третират с блокиращ метафазата агент (напр. колхицин или Колцеמיד®). След това се приготвя хромозомен препарат от клетки на зародиш, оцветява се и клетките в метафаза се анализират за хромозомни аберации.

1.4 ОПИСАНИЕ НА МЕТОДА НА ТЕСТА

1.4.1. ПОДГОТОВКА

1.4.1.1. Подбор на животинския вид

Мъжките китайски хамстери и мишки са общо използваните. Обаче, мъжки индивиди от и друг подходящ вид бозайници биха могли да се използват. За теста следва да се вземат общо използваните лабораторни щамове на млади, здрави, пораснали животни. В началото на изследването, вариациите в теглото на животните следва да са минимални и да не превишават $\pm 20\%$ от средното тегло.

1.4.1.2. Условия на отглеждане и хранене

Прилагат се общите условия в Общото въведение към част Б, въпреки че целта е влажността на въздуха да е 50-60%.

1.4.1.3. Подготовка на животните

Здрави, млади, пораснали животни от мъжки пол се отделят на произволен принцип за контролните и опитни групи. Клетките трябва да се подредят така, че да се намалят до

минимум евентуалните ефекти от разполагането им. На животните се дава уникална идентификация. Животните се аклиматизират към лабораторните условия поне пет дена преди началото на изследването.

1.4.1.4. Приготвяне на дози

Твърдите вещества за теста следва да се разтворят или суспендират в подходящи разтворители или носители, и, ако трябва, да се разреждат преди даване на дозата на животните. Течните вещества за теста могат да се дават директно или да разреждат преди дозиране. Следва да се използват пресни препарати на тестваното вещество, освен ако данните за стабилността му не показват, че може да се съхранява.

1.4.2. Условия за провеждане на теста

1.4.2.1 Разтворител/носител

Разтворителят/носителят не следва да има токсично въздействие с използваните нива на дозиране, а също така не следва да има съмнения за химическа реакция между него и тестваното вещество. Ако се използват други, освен добре познатите разтворители/носители, включването им в теста следва да се подкрепи от данни за съвместимостта им. Препоръчва се, винаги когато е възможно, първо да се разглежда възможността за прилагането на воден разтворител/носител.

1.4.2.2. Контроли

Във всеки тест следва да се включват паралелни положителни и отрицателни (разтворител/носител) контроли. Като се изключи третирането с тестваното вещество, с животните в контролните групи следва да се борави по един и същи начин, както с животните от опитните групи.

Положителните контроли следва да произвеждат структурни хромозомни аберации *in vivo* в сперматогониални клетки, когато се администрират при нива на излагане, при които се очаква да се постигне забележимо увеличение спрямо фона.

Положителните контролни дози следва да са така избрани, че ефектите да са ясни, но да не разкриват непосредствено на четеца идентичността на кодираните предметни стъкла.

Приемливо е положителните контроли, да се администрират по различен начин от тестваното вещество и да им се взема проба само еднократно. Освен това, за положителна контрола трябва да се разглежда използването на химикали, принадлежащи към химичен клас, когато такива са налични.

Примерите за положителни контролни вещества включват:

Вещество	CAS No	Einecs No
циклофосфамид	50-18-0	200-015-4
циклофосфамид монохидрат	6055-19-2	
Циклохексамин	108-91-8	203-629-0
митомицин С	50-07-7	200-008-6
Акриламид мономер	79-06-1	201-173-7

Триетиленмеламин	51-18-3	200-083-5
------------------	---------	-----------

За всяко вземане на проби следва да се включват отрицателните контроли, третирани само с разтворител или носител, а за всички останали неща третирани както опитните групи, освен ако няма приемлива изменчивост между животните и честотите на клетки хромозомни аберации са доказани с исторически контролни данни от предишни изследвания. Освен това, следва също да се използват нетретирани контроли, освен ако няма данни от предишни контролни изследвания или публикувани контролни данни, показващи, че няма никакви делеционни или мутагенни ефекти, индуцирани от избрания разтворител/носител.

1.5. ПРОЦЕДУРА

1.5.1 Брой на животните

Всяка опитана и контролна група трябва да включва най-малко пет анализируеми мъжки животни.

1.5.2. График на третиране

За предпочитане е тестваните вещества да се администрират веднъж или два пъти (т.е. като еднократно или две третириания). Тестваните вещества могат също да администрират като разделена доза, т.е. две третириания в един и същи ден, разделени от не повече от няколко часа, за да се улесни даването на голям обем материал. Други режими на дозиране следва да се обосноват научно.

В групата с най-висока доза проби се вземат два пъти след третирането. Тъй като кинетиката на клетъчния цикъл може да се повлияе от тестваното вещество, практикува се едно ранно и едно късно вземане на проба около 24 и 48 часа след третирането. За дози, различни от най-високата, проба се взема на 24 часа или 1,5 пъти продължителността на клетъчния цикъл, освен ако не е известно друго време за вземане на проба, по-подходящо за откриване на ефектите (6).

Освен това, могат да се използват други времена на вземане на проби. Например, когато се използват химикали, които могат да индуцират хромозомно изоставане или могат да предизвикат S-независими ефекти, по-ранните периоди на вземане проби могат да бъдат по-подходящи (1).

Доколко е уместно използването на повторен график на третиране следва да се идентифицира за всеки случай поотделно. След повторен график на третиране животните следва да бъдат убити след 24 часа (1,5 пъти от продължителността на клетъчния цикъл) след последното третиране. При необходимост, могат да се прилагат допълнителни периоди на вземане на проби.

Преди убиването животните се инжектират интраперитонеално с подходящо блокиращо метафазата вещество (напр. Колцемид® или колхицин). След това, след подходящ интервал от животните се взема проба. За мишки този интервал е приблизително 3—5 часа, за китайски хамстери той е около 4—5 часа.

1.5.3 Нива на дозиране

Ако се извършва изследване за обхват поради това, че няма в наличност подходящи данни, то следва да се извърши в същата лаборатория, като се използва същия вид, щам, пол и режим на третиране, както в главното изследване (7). Ако има токсичност, за първото вземане на проба се използват три нива на дозиране. Тези нива на дозиране следва да обхващат обхват от максимална до слаба или липса на токсичност. При вземане на проба на по-късен етап следва да се прилага само най-високата доза. Най-високата доза се дефинира като доза, създаваща признаци на такава токсичност, че по-високи нива на дозиране, базирани на същия режим, би могло да се очаква да доведат до леталност. Вещества със специфични биологични активности при ниски, нетоксични дози (като хормони и митогени) могат да бъдат изключения за критериите за определяне на дозата и трябва да се оценяват за всеки конкретен случай. Най-високата доза може също да се дефинира като доза, която показва известни признаци на токсичност в сперматогониалните клетки (напр. намаляване на съотношението на сперматогониални митози спрямо първата и втора метафаза на клетъчното деление, това намаляване не следва да надвишава 50%).

1.5.4. Граничен тест

Ако тест с едно ниво на дозиране от минимум 2 000 mg/kg телесно тегло/ден при еднократно третиране или две третирания в един и същи ден, не дава забележими токсични ефекти, а генотоксичност не би могла да се очаква на базата на данни от структурно свързани вещества, то тогава пълно изследване с три нива на дозиране може да не се счита за необходимо. Очакваното излагане на хора може да покаже, че е необходимо в граничния тест да се използва по-високо ниво на дозиране.

1.5.5. Администриране на дозите

Тестваното вещество обикновено се дава със стомашна сонда като се използва тръба или подходяща интубационна канюла, или чрез интраперитонална инжекция. Други начини на излагане са приемливи, ако могат да бъдат обосновани. Максималният обем течност, който може да се вкара еднократно със стомашна сонда или инжекция зависи от големината на опитното животно. Обемът не следва да превишава 2ml/100g телесно тегло. Обеми, по-високите от тези, трябва да се обосноват. С изключение на дразнещи или корозивни вещества, които нормално дават изострящи ефекти при по-високи концентрации, променливостта на тестовия обем следва да се сведе до минимум чрез регулиране на концентрацията с цел осигуряване на постоянен обем на всички нива на дозиране.

1.5.6. Подготовка на хромозомите

Незабавно след убиване на животните от един или двата тестиса се приготвят клетъчни суспензии, експонират се на хипотоничен разтвор и се фиксират. Клетките се разнасят по предметни стъкла и се оцветяват.

1.5.7 Анализ

За всяко животно следва да се анализират най-малко 100 добре разнесени метафази (т.е. минимум 500 метафази на група). Този брой може да се намали, когато се наблюдават голям брой аберации. Всички предметни стъкла, включително и тези на положителни и отрицателни контроли, следва да се кодират независимо едно от друго преди микроскопския анализ. Тъй като процедурите по фиксиране водят до разкъсване на част

от метафазите със загуба на хромозоми, отчетените клетки следва да съдържат известен брой центромери, равни на броя $2n \pm 2$.

2. ДАННИ

2.1. ОБРАБОТКА НА РЕЗУЛТАТИТЕ

Индивидуалните данни за животните следва да се представят в таблица. Експерименталната единица е животното. За всяко изследвано животно отделно се оценява броя клетки със структурни хромозомни аберации и хромозомни аберации на клетка. Следва да се попоказват различните типове структурни хромозомни аберации с броя и честотата им за опитните и контролните групи. Празнините се записват отделно и докладват, но принципно не се включват в общата честота на аберациите.

Ако се наблюдава митоза, както и мейоза, следва да се определи съотношението на сперматогониалните митози спрямо първата и втора мейотични метафази като мярка за цитотоксичността за всички опитни животни и тези от отрицателните контроли в обща проба от 100 дялящи клетки на животно, за да се установи евентуален цитотоксичен ефект. Ако се наблюдава само митоза, митозният индекс следва да се определи в минимум 1 000 клетки за всяко животно.

2.2. ОЦЕНКА И ТЪЛКУВАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ

Има няколко критерия за определяне на положителен резултат, като свързано с дозата увеличение в броя клетки хромозомни аберации или явно увеличение в броя на клетки с аберации при еднократна доза и еднократно вземане на проба. Първо следва да се вземе предвид биологичната значимост на резултатите. При оценката на резултатите от теста като помощно средство е възможно използването на статистически методи (8). Статистическата значимост не следва да е единственият решаващ фактор за положителна реакция. Двухазните резултати следва да се изяснят чрез допълнителни тестове, като за предпочитане е да се изменят условията на експеримента.

Въпреки че повечето експерименти дават ясно положителни или отрицателни резултати, в редки случаи наборът данни изключва възможността да се направи категорична преценка за активността на тестваното вещество. Резултатите могат да останат двухазни или под въпрос, независимо от това колко пъти е повторен опитът.

Положителните резултати от теста *in vivo* за сперматогониални хромозомни аберации показват, че тестваното вещество индуцира структурни хромозомни аберации в зародишните клетки на тествания вид. Отрицателните резултати показват, че при условията за провеждане на теста, че тестваното вещество не индуцира хромозомни аберации в зародишните клетки на тествания вид.

Следва да се обсъди вероятността тестваното вещество или метаболитите му да достигнат тъканта, която е обект на изследването.

ДОКЛАДВАНЕ

ДОКЛАД ЗА ТЕСТА

Докладът за теста трябва да включва следната информация:

Разтворител/носител:

- обосновка за избора на носител,
- разтворимост и стабилност на тестваното вещество в разтворител/носител, ако са известни.

Опитни животни:

- вид/щам,
- брой и възраст на животните,
- източник, условия на отглеждане, начин на хранене и др.
- индивидуално тегло на животните в началото на теста, в т.ч. обхват на телесното тегло, средни стойности и стандартно отклонение за всяка група.

Условия за провеждане на теста:

- основна причина за определяне времето на убиване на животните,
- данни от изследването за установяване на обхват, ако е проведено,
- основна причина за избора на нивото на дозата,
- подробности за приготвянето на тестваното вещество,
- подробности за администрирането тестваното вещество,
- основна причина за определяне на момента на убиване на животните
- преминаване от концентрация (ppm) на тестваното вещество в храната/питейната вода към действителната доза (mg/kg телесно тегло), ако е приложимо,
- подробности за качеството на храната и водата,
- подробно описание на графици на третиране и вземане на проби,
- методи на измерване на токсичността,
- идентичност на блокиращото метафазата вещество, концентрация и времетраене на третирането,
- методи на приготвяне на предметно стъкло,
- критерии за отчитане на аберации,
- брой анализирани клетки/животно,
- критерии за считане на изследванията положителни, отрицателни или двусмислени.

Резултати:

- признаци на токсичност,
- митотичен индекс,
- съотношение на сперматогониалните митозни клетки към първата и втора мейотична метафаза,
- тип и брой на аберациите, дадени отделно за всяко животно,
- общ брой аберации на група,
- брой на клетки с аберации на група,
- взаимоотношение доза-реакция, където е възможно,
- статистически анализи, ако има такива,
- паралелни отрицателни контролни данни,
- отрицателни контролни данни от предишни изследвания с обхвати, средни стойности и стандартни отклонения,
- паралелни положителни контролни данни,
- промени в пloidията, ако се забелязват.

Обсъждане на резултатите.

Заклучения.

БИБЛИОГРАФИЯ

- (1) Adler, I. D. (1986), Clastogenic Potential in Mouse Spermatogonia of Chemical Mutagens Related to their Cell-Cycle Specifications, in: Genetic Toxicology of Environmental Chemicals, Part B: Genetic Effects and Applied Mutagenesis, Ramel, C., Lambert B., and Magnusson, J. (eds.) Liss, New York, pp. 477-484.
- (2) Adler, I. D. (1984), Cytogenic tests in Mammals, in: Mutagenicity Testing: a Practical Approach, ed. S. Venitt and J. M. Parry, IRL Press, Oxford, Washington DC, pp. 275-306.
- (3) Evans, E. P., Breckon, G. and Ford, C. E. (1964), An Air-Drying Method for Meiotic Preparations from Mammalian Testes, Cytogenetics and Cell Genetics, 3, pp. 289-294.
- (4) Richold, M., Ashby, J., Chandley, A., Gatehouse, D. G. and Henderson L. (1990), In Vivo Cytogenetic Assays, in: D. J. Kirkland (ed.), Basic Mutagenicity Tests, UKEMS Recommended Procedures. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report. Part I revised, Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 115-141.
- (5) Yamamoto, K. and Kikuchi, Y. (1978), A New Method for Preparation of Mammalian Spermatogonial Chromosomes, Mutation Res., 52, pp. 207-209.
- (6) Adler, I. D., Shelby, M. D., Bootman, J., Favor, J., Generoso, W., Pacchierotti, F., Shibuya, T. and Tanaka, N. (1994), International Workshop on Standardisation of Genotoxicity Test Procedures. Summary Report of the Working Group on Mammalian Germ Cell Tests, Mutation Res., 312, pp. 313-318.
- (7) Fielder, R. J., Allen, J. A., Boobis, A. R., Botham, P. A., Doe, J., Esdaile, D. J., Gatehouse, D. G., Hodson-Walker, G., Morton, D. B., Kirkland D. J. and Richold, M. (1992), Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working group: Dose setting in In Vivo Mutagenicity Assays, Mutagenesis, 7, pp. 313-319.
- (8) Lovell, D. P., Anderson, D., Albanese, R., Amphlett, G. E., Clare, G., Ferguson, R., Richold, M., Papworth, D. G. and Savage, J. R. K. (1989), Statistical Analysis of In Vivo Cytogenetic Assays, in: D. J. Kirkland (ed.), Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing, report, Part III, Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 184-232.

ПРИЛОЖЕНИЕ 4Ж

Б.39. ТЕСТ ЗА НЕРЕПАРАТИВЕН СИНТЕЗ НА ДНК (НСД) С ЧЕРНОДРОБНИ КЛЕТКИ ОТ БОЗАЙНИЦИ *ИН ВИВО*

1. МЕТОД

Настоящият метод е изцяло подобен на Тест за нерепаративен синтез на ДНК (НСДГ) с чернодробни клетки от бозайници *ин vivo* OECD TG 486 от 1997 г.

1.1 ВЪВЕДЕНИЕ

Целта на теста за нерепаративен синтез на ДНК (НСД) с чернодробни клетки от бозайници *ин vivo* е да се идентифицират тествани вещества, които индуцират репарация на ДНК в чернодробните клетки на третираните животни (1), (2), (3), (4).

Настоящият *ин vivo* тест осигурява метод за изследване на генотоксичните ефекти на химикали в черния дроб. Измерената крайна точка показва увреждане на ДНК и последваща репарация в чернодробни клетки. По принцип черният дроб е главната площадка на метаболизма на абсорбираните съединения. Ето защо той е подходящото място за измерване на увреждане на ДНК *ин vivo*.

Ако има доказателства, че тестваното вещество няма да достигне тъкан, която е обект на изследването, не е уместно да се използва настоящият тест.

Крайната точка на нерепаративния синтез на ДНК (НСД) се измерва чрез определяне на поглъщането на радиоактивно маркирани нуклеозиди в клетки, които не претърпяват репаративен синтез на ДНК (S-фаза). Най-широко използваният способ е определянето на поглъщането на маркирания с тритий тимидин ($^3\text{H-TdR}$) чрез автордиография. За НСД тестове *ин vivo* се предпочита черен дроб на плъхове. Освен черен дроб могат да се използват други тъкани, но те не са обект на настоящия метод.

Откриването на НСД реакция зависи от ДНК базите, изрязани и заместени от страната на увреждането. Следователно тест НСД е особено ценен за откриване на "репарация с дълги парчета" (20 до 30 бази), индуцирана от вещество. И обратното, "репарация с къси парчета" (една до три бази) се открива с много по-ниска чувствителност. Освен това, мутагенните събития могат да се случат поради липса на репарация, погрешна репарация или погрешна репликация на ДНК поражения. Степента на НСД реакция изобщо не показва надеждността на процеса на репарация. В допълнение на това възможно е мутаген да реагира с ДНК, но увреждането на ДНК не се коригира чрез процеса на ексцизионна репарация. Липсата на конкретна информация за мутагенната активност от НСД теста се компенсира от потенциалната чувствителност на тази крайна точка, тъй като се измерва в целия геном.

Вижте също "Общо въведение", част Б.

1.2. ДЕФИНИЦИИ

Клетки в репарация: нето ядрено зрънце (НЯЗ), по-голямо от предварително определена стойност, която се доказва в лабораторията, провеждаща теста.

Нето ядрени зрънца (НЯЗ): количествена мярка за НСД активност на клетки автордиографни НСД тестове, изчислявана чрез изваждане на средния брой of

цитоплазмени зрънца на цитоплазмени зони, еквивалентни на ядрото (ЦЗ), от броя на ядрени зрънца (ЯЗ): $\text{НЯЗ} = \text{ЯЗ} - \text{ЦЗ}$. НЯЗ количества се изчисляват за отделните клетки и след това се групират за клетките в култура, паралелни култури и др.

Нерепаративен синтез на ДНК (НСД): ДНК репаративен синтез след ексцизията и отстраняването на участък от ДНК, съдържащ област на увреждане, индуцирано от химични вещества или физически агенти.

1.3. ПРИНЦИП НА МЕТОДА НА ТЕСТА

НСД тестът *in vivo* с чернодробни клетки от бозайници показва ДНК репаративен синтез след ексцизията и отстраняването на участък от ДНК, съдържащ област на увреждане, индуцирано от химични вещества или физически агенти. Обикновено тестът се базира на включването на $^3\text{H-TdR}$ в ДНК на чернодробни клетки, които имат ниска честота на клетки в S-фазата на клетъчния цикъл. Поглъщането на $^3\text{H-TdR}$ обикновено се определя чрез автордиография, тъй като този способ не е чувствителен към интерференцията от страна на клетки в S-фаза, както например течното сцинтилационно броене.

1.4. ОПИСАНИЕ НА МЕТОДА

1.4.1. ПОДГОТОВКА

1.4.1.1. Избор на животински вид

Най-често се използват плъхове, въпреки че всеки подходящ вид от бозайници може да се използва. Следва да се вземат общо използваните лабораторни щамове на млади, здрави, пораснали животни. В началото на изследването вариациите в теглото на животните следва да е минимално и да не превишават $\pm 20\%$ от средното тегло на всеки пол.

1.4.1.2. Условия на отглеждане и хранене

Прилагат се общите условия в Общото въведение към Част Б, въпреки че целта е влажността на въздуха да е 50 до 60%.

1.4.1.3. Подготовка на животните

Здрави, млади, пораснали животни се определят на произволен принцип за контролните и опитни групи. Клетките следва да се подредят така, че да се намалят до минимум евентуалните ефекти от разполагането им. На животните се дава уникална идентификация и се държат в клетките поне пет дни преди началото на изследването, за да се аклиматизират към лабораторните условия.

1.4.1.3. Тествано вещество/приготвяне

Твърдите вещества за теста следва да се разтворят или суспендират в подходящи разтворители или носители, и, ако е необходимо, да се разреждат преди даване на дозата на животните. Течните вещества за теста могат да се дават директно или да разреждат преди дозиране. Следва да се използват пресни препарати на тестваното вещество, освен ако данните за стабилността му не показват, че може да се съхранява.

1.4.2. Условия за провеждане на теста

1.4.2.1.Разтворител/носител

Разтворителят/носителят не трябва да има токсично въздействие с използваните нива на дозиране, а също така не трябва да има съмнения за химическа реакция между него и тестваното вещество. Ако се използват други, освен добре познатите разтворители/носители, включването им в теста следва да се подкрепи от данни за съвместимостта им. Препоръчва се, винаги когато е възможно, първо да се разглежда възможността за прилагането на воден разтворител/носител.

1.4.2.2.Контроли

Паралелни положителни и отрицателни контроли (разтворител/носител) следва да се включат във всяка отделно провеждана част от експеримента. С изключение на третирането с тестваното вещество, с животните в контролните групи следва да борави по същия начин, както с животните от опитните групи.

Положителните контроли следва да са вещества, за които се знае, че генерират НСД, когато се администрират на нива на излагане, от които се очаква да се получи забележимо увеличение спрямо общия фон. Положителните контроли, които имат нужда от метаболитна активация, следва да се използват с дози, предизвикващи умерена реакция (4). Дозите могат да са така избрани, че ефектите да са ясни, но да не разкриват непосредствено на четеца идентичността на кодираните предметни стъкла.

Примерите за положителни контролни вещества включват:

Времетраене на вземането на проби	Вещество	CAS-No	Einecs No
Ранни (2 до 4 часа)	N-нитрозодиметиламин	62-75-9	200-249-8
Късни (12 до 16 часа)	N-2-флуоренилацетамид (2-AAF)	53-96-3	200-188-6

Могат да се използват други подходящи положителни контролни вещества. Приемливо е положителните контроли да се администрират по начин, различен от тестваното вещество.

1.5. ПРОЦЕДУРА

1.5.1. Брой и пол на животните

Следва да се използва адекватен брой животни, за да се вземе предвид естественото биологично вариране на реакцията към теста. Броят на животните следва да е минимум три анализируеми животни на група. Когато има натрупана значителна база данни от предишни изследвания, за паралелните отрицателни и положителни контролни групи се изисква само едно или две животни.

Ако в момента на изследването има налични данни от изследвания, поведени със същия вид и със същия начин на излагане, показващи, че няма съществени разлики по отношение токсичността между половете, тогава тестването на един пол, за предпочитане мъжки, е достатъчно. Когато излагане на хора към химикали може да е специфична в зависимост от

пола, като например към някои фармацевтични агенти, тестът следва да се проведе с животни от подходящия пол.

1.5.2 График на третиране

Тестваните вещества по принцип се администрират като еднократно третиране.

1.5.3. Нива на дозиране

Нормално се използват две нива на дозиране. Най-високата доза се дефинира като доза, създаваща признаци на такава токсичност, че от по-високи нива на дозиране, базирани на същия режим, би могло да се очаква да доведат до леталност. По принцип по-ниската доза трябва да бъде от 50% до 25% от високата доза. Вещества със специфични биологични активности при ниски, нетоксични дози (като хормони и митогени) могат да бъдат изключения от критериите за определяне на дозата и следва да се оценяват за всеки конкретен случай. Ако се извършва изследване за обхват поради това, че няма подходящи данни в наличност, то трябва да е в същата лаборатория, като се използва същия вид, щам, пол и режим на третиране, както в главното изследване.

Най-високата доза може също да се дефинира като доза, показваща известни признаци на токсичност в черния дроб (напр. пикнотични ядра).

1.5.4. Граничен тест

Ако тест с едно ниво на дозиране от минимум 2 000 mg/kg телесно тегло при еднократно третиране или две третираня в един и същи ден, не дава забележими токсични ефекти, а не би могла да се очаква генотоксичност на базата на данни от структурно свързани вещества, то тогава пълно изследване може да не се счита за необходимо. Очакваното излагане на хора може да покаже необходимост в граничния тест да се използва по-високо ниво на дозиране.

1.5.5. Администриране на дозите

Тестваното вещество обикновено се дава със стомашна сонда като се използва тръба или подходяща интубационна канюла. Други начини на излагане са приемливи, ако могат да бъдат обосновани. Все пак, интраперитонеалният път не се препоръчва, тъй като той би изложил черния дроб директно на въздействието на тестваното вещество, а не през системата на кръвообращението. Максималният обем течност, който може да се вкара еднократно със стомашна сонда или инжекция зависи от големината на опитното животно. Обемът не трябва да превишава 2ml/100g телесно тегло. Обеми, по-високите от тези, трябва да се обосноват. С изключение на дразнещи или корозивни вещества, които нормално дават изострящи ефекти при по-високи концентрации, променливостта на тестовия обем следва да се сведе до минимум чрез регулиране на концентрацията с цел осигуряване на постоянен обем на всички нива на дозиране.

1.5.6. Подготовка на чернодробните клетки

Чернодробните клетки се подготвят от третирани животни нормално от 12 до 16 часа след дозиране. По принцип необходимо е по-ранно вземане на проба (нормално от два до четири часа след третиране), освен ако няма ясна положителна реакция на 12 до 16 часа.

Все пак, може да се практикува вземане на проби и по друго време, когато това е обосновано на базата на токсикокинетични данни.

Краткосрочни култури на чернодробни клетки от бозайници обикновено се създават чрез обливане на черния дроб *in situ* с колагеназа, като прясно дисоциираните клетки се оставят да се прикрепят към подходяща повърхност. Чернодробните клетки от отрицателни контролни животни следва да имат жизнеспособност (5) минимум 50%.

1.5.7. Определяне на НСД

Прясно изолираните чернодробни клетки от бозайници се инкубират обикновено със среда, съдържаща $^3\text{H-TdR}$ за подходящ период от време, напр. от три до осем часа. В края на инкубационното време средата следва да се отстрани от клетките, които след това се инкубират със среда, съдържаща голямо количество немаркиран тимидин, за да се намали неабсорбираната радиоактивност ("студено отстраняване"). След това клетките се изплакват, фиксират и изсушават. При по-продължително инкубационно време студено отстраняване може и да не е необходимо. Предметните стъкла се потопяват в автордиографична емулсия, експонират се на тъмно (напр. държат се в хладилник от 7 до 14 дни, проявяват се, оцветяват се и експонираниите сребърни зрънца се преброяват. Две до три предметни стъкла се подготвят от всяко животно.

1.5.8. Анализ

Препаратът на предметното стъкло следва да съдържа достатъчно клетки с нормална морфология, за да може да се направи пълноценна оценка на НСД. Препаратите се изследват под микроскоп за признаци на явно изразена цитотоксичност (напр. пикноза, намалени нива на радиоактивно маркиране).

Предметните стъкла се кодират преди преброяването на зрънцата. Нормално 100 клетки се изследват от всяко животно от най-малко две предметни стъкла; база за отчитане на резултатите от по-малко 100 клетки/животно следва да бъде обоснована. Не се отчитат количествата зрънца за ядра в S-фаза, но пропорцията клетки в S-phase клетки може да регистрира.

Количеството на $^3\text{H-TdR}$, въведено в ядрата и цитоплазмата на морфологично нормални клетки, по начина, по който се проявява чрез отлагането на сребърни зрънца, следва да се определи чрез подходящи методи.

2. ДАННИ

2.1. ОБРАБОТКА НА РЕЗУЛТАТИ

Следва да се представят индивидуални данни за всяко предметно стъкло и животно. В допълнение на това, всички данни следва да се резюмират в таблица. Следва да се изчислят количествата на нето ядрените зрънца (НЯЗ) за всяка клетка, за всяко животно и всяка доза и време чрез изваждане на ЦЗ бройки от ЯЗ бройки. Ако се броят "клетки в репарация", критериите за дефиниране на "клетки в репарация" следва да се обосноват и да се базират на паралелни отрицателни контролни данни или на такива от предишни изследвания. Цифровите резултати могат да се оценяват чрез статистически методи. Ако се използват, статистическите тестове следва да се подберат и обосноват преди провеждане на изследването.

2.2. ОЦЕНКА И ТЪЛКУВАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ

Примерите на критерии за положителни/отрицателни реакции включват :
положителни (i) НЯЗ стойности над зададен праг, обоснован на базата на лабораторни данни от предишни изследвания;

или (ii) НЯЗ стойности, значително по-високи от паралелни контроли;

отрицателни (i) НЯЗ стойности в границите на/под контролен праг от предишни изследвания;

или (ii) НЯЗ стойности, незначително по-високи от паралелни контроли.

Следва да се разгледа биологическата значимост на данните: т.е. параметри като изменчивост между животните, взаимодействие между дозата-реакцията и цитотоксичността следва да вземат под внимание. При оценката на резултатите от теста като помощно средство биха могли да се използват статистически методи. Статистическата значимост не следва да е единственият решаващ фактор за положителна реакция.

Въпреки че повечето експерименти дават ясно положителни или отрицателни резултати, в редки случаи наборът данни изключва правенето на категорична преценка за активността на тестваното вещество. Резултатите могат да останат двузначни или под въпрос, независимо от това колко пъти е повторен опитът.

Положителен резултат от теста за нерепаративен синтез на ДНК (НСД) с чернодробни клетки от бозайници *ин vivo* показва, че увреждането на ДНК с чернодробни клетки от бозайници *ин vivo* може да се репарира чрез нерепаративен синтез на ДНК *ин vivo*. Отрицателният резултат показва, че при условията за провеждане на теста, тестваното вещество не индуцира ДНК увреждане, което се открива с настоящия тест.

Следва да се обсъди вероятността тестваното вещество да достигне общото кръвообращение или конкретно прицелната тъкан (напр. системна токсичност).

ДОКЛАДВАНЕ

ДОКЛАД ЗА ТЕСТА

Докладът за теста трябва да включва следната информация:

Разтворител/носител:

— обосновка за избора на носител,

— разтворимост и стабилност на тестваното вещество в разтворител/носител, ако са известни.

Опитни животни:

— вид/щам,

— брой, възраст и пол на животните,

— източник, условия на отглеждане, начин на хранене и др.,

— индивидуално тегло на животните в началото на теста, в т.ч. обхват на телесното тегло, средно и стандартно отклонение за всяка група.

Условия за провеждане на теста:

— положителни и отрицателни носител/разтворител контроли,

— данни от изследването за установяване на обхват, ако е проведено,

- основна причина за избора на нивото на дозата,
- подробности за приготвянето на тестваното вещество,
- подробности за администрирането тестваното вещество,
- основна причина за начина на администриране,
- методи за проверка дали тестваният агент е достигнал общото кръвообращение или тъканта, която е обект на изследването, ако са приложими,
- преминаване от концентрация (ppm) на тестваното вещество в храната/питейната вода към действителната доза (mg/kg телесно тегло), ако е приложимо,
- подробности за качеството на храната и водата,
- подробно описание на графици на третиране и вземане на проби,
- методи на измерване на токсичността,
- метод на подготовка на чренодробни клетки и култура,
- използван автордиографичен способ,
- брой на подготвените предметни стъкла и брой на отчетените клетки,
- критерии за оценка,
- критерии за считане на изследванията положителни, отрицателни или двузначни.

Резултати:

- средни стойности на индивидуално предметно стъкло, животно и група за ядрени зрънца, цитоплазмени зрънца и нето ядрени зрънца,
- взаимоотношение доза-реакция, където е възможно,
- статистическа оценка, ако има такава,
- признаци на токсичност,
- паралелни отрицателни (разтворител/носител) и положителни контролни данни,
- отрицателни (разтворител/носител) от предишни изследвания и положителни контролни данни с обхват, средни стойности и стандартни отклонения,
- брой на "клетки в репарация", ако е определен,
- брой клетки в S-фаза, ако е определен,
- жизнеспособност на клетките.

Обсъждане на резултатите.

Заклучения.

БИБЛИОГРАФИЯ

- (1) Ashby, J., Lefevre, P. A., Burlinson, B. and Penman, M. G. (1985), An Assessment of the In Vivo Rat Hepatocyte DNA Repair Assay, *Mutation Res.*, 156, pp. 1-18.
- (2) Butterworth, B. E., Ashby, J., Bermudez, E., Casciano, D., Mirsalis, J., Probst G. and Williams, G. (1987), A Protocol and Guide for the In Vivo Rat Hepatocyte DNA-Repair Assay, *Mutation Res.*, 189, pp. 123-133.
- (3) Kennelly, J. C., Waters, R., Ashby, J., Lefevre, P. A., Burlinson B., Benford, D. J., Dean, S. W. and Mitchell I. de G. (1993), In Vivo Rat Liver UDS Assay, in: Kirkland D. J. and Fox M., (eds.), *Supplementary Mutagenicity Tests: UKEM Recommended Procedures. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing Report. Part II revised*, Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 52-77.
- (4) Madle, S., Dean, S. W., Andrae, U., Brambilla, G., Burlinson, B., Doolittle, D. J., Furihata, C., Hertner, T., McQueen, C. A. and Mori, H. (1993), *Recommendations*

for the Performance of UDS Tests In Vitro and In Vivo, Mutations Res., 312, pp. 263-285.

- (5) Fautz, R., Hussain, B., Efstathiou, E. and Hechenberger-Freudl, C. (1993), Assessment of the Relation Between the Initial Viability and the Attachment of Freshly Isolated Rat Hepatocytes Used for the In Vivo/In Vitro DNA Repair Assay (UDS), Mutation Res., 291, pp. 21-27.
- (6) Mirsalis, J. C., Tyson, C. K. and Butterworth, B. E. (1982), Detection of Genotoxic Carcinogens in the In Vivo/In Vitro Hepatocyte DNA Repair Assay, Environ Mutagen, 4, pp. 553-562.

ПРИЛОЖЕНИЕ 5

SV

Вреден

R65 Farligt: kan ge lungskador vid förtäring.

BG: Вреден: може да причини увреждане на белите дробове при поглъщане.

Flytande ämnen och beredningar som på grund av sin låga viskositet utgör en fara för människa vid aspiration

- a) För ämnen och beredningar som innehåller alifatiska, alicykliska och aromatiska kolväten i en total koncentration an 10% eller mer och
- har en flödestid mindre än 30 sekunder, uppmätt med en 3 mm utlopps bägare enligt ISO 2431, eller
 - har en kinematisk viskositet lägre än 7×10^{-6} m²/s vid 40°C, uppmätt med en kalibrerad kapillärviskosimeter av glas, enligt ISO 3104 och ISO 3105, eller
 - har en kinematisk viskositet lägre än 7×10^{-6} m²/s vid 40°C, bestämd från rotationsviskosimetri enligt ISO 3219.

Ämnen och beredningar, som uppfyller dessa kriterier, behöver dock inte klassificeras om de har en genomsnittlig ytspänning högre än 33 mN/m vid 25°C, uppmätt med du Noüytensiometer eller enligt de testmetoder som finns beskrivna i bilaga V del A.5.

- b) För ämnen och beredningar, baserat på praktiska erfarenheter från människa.

(Не засяга ES версия)

(Не засяга DA версия)

(Не засяга DE версия)

(Не засяга EL версия)

(Не засяга EN версия)

(Не засяга FR версия)

(Не засяга IT версия)

(Не засяга NL версия)

(Не засяга PT версия)

(Не засяга FI версия)

FI:

3.2.6.1. Ihon tulehtuminen

Seuraava vaaraa osoittava lauseka määräytyy alla esiteltävien perusteitten mukaan:

R38 Ärsyttää ihoa

BG: Дразни кожата.

- Aineet ja valmisteet aiheuttavat ihon merkittävän tulehtumisen enintään neljän tunnin altistuksessa määritettynä kanilla liitteessä V mainitulla ihoärsyttestillä. Tulehdus kestää vähintään 24 tuntia.

Ihon tulehdus on merkittävä, jos:

- a) punoituksen ja ruvenmuodostuksen tai turvotuksen voimakkuutta kuvaavien lukuarvojen keskiarvo laskettuna kaikista koe-eläimistä on vähintään 2;
- b) tai kun liitteessä V tarkoitettua testiä on täydennetty käyttämällä kolmea koe-eläintä, vähintään kahden koe-eläimen ihon punoituksen ja ruvenmuodostuksen tai turvotuksen voimakkuutta kuvaavien lukuarvojen keskiarvo on, jokaiselle koe-eläimelle laskettuna erikseen, vähintään 2.

Kummassakin tapauksessa keskiarvojen lasekmiseen on käytettävä kaikkia niitä lukuarvoja, jotka saadaan arvioitaessa vaikutusta 24 tunnin, 48 tunnin ja 72 tunnin välein.

Tulehdusta pidetään myös merkittävänä, jos ihon tulehtuminen jatkuu ainakin kahdella koe-eläimellä havainnointiajan päättymiseen asti. Erityiset vaikutukset kuten esimerkiksi hyperplasia, hilseileminen, värin muutokset, halkeamat, ruvet ja karvojenlähtö on otettava huomioon.

Tähän liittyviä tietoja voidaan saada myös eläimillä tehtävistä ei-akuuttisista (katso lauseketta R 48 koskevat huomautukset jaksossa 2.d). Vaikutuksia pidetään merkittävänä, jos ne vastaavat edellä kuvattuja vaikutuksia.

- Aineet ja valmisteet, jotka aiheuttavat ihmisillä merkittävää ihotulehdusta, kun kosketus on ollut välitön, jatkuva tai toistuva.
- Orgaaniset peroksidit, paitsi jos on olemassa näyttöä siitä, että tällaista vaikutusta ei ole.

Tuntoharha („paresthesia”):

Pyretroiditorjunta-aineen ihokosketuksen aiheuttamaa tuntoharhaa ihmisessä ei pidetä ärsytysvaikutuksena, joka oikeuttaisi luokituksen Xi; R38, S-lauseketta S24 on kuitenkin sovellettava aineisiin, joilla on tällainen vaikutus.

(Не засяга ES версия)

(Не засяга DA версия)

(Не засяга DE версия)

(Не засяга EL версия)

(Не засяга EN версия)

(Не засяга FR версия)

(Не засяга IT версия)

(Не засяга NL версия)

(Не засяга PT версия)

(Не засяга SV версия)

Точка 6.2 (Съвети за безопасност при вещества и препарати):

DE:

S 28 Bei Berührung mit der Haut sofort mit viel...abwaschen (vom Hersteller anzugeben)
S28 След контакт с кожата веднага да се измие обилно с ... (посочва се от производителя).

– Anwendungsbereich:

– Sehr giftige, giftige oder ätzende Stoffe und Zubereitungen;

– Verwendung:

– *obligatorisch* für sehr giftige Stoffe und Zubereitungen;

– empfohlen für sonstige obengenannte Stoffe und Zubereitungen, insbesondere, wenn Wasser nicht die geeignete Spülflüssigkeit ist;

– empfohlen für ätzende Stoffe und Zubereitungen, die an die allgemeine Öffentlichkeit abgegeben werden.

(Не засяга ES версия)

(Не засяга DA версия)

(Не засяга EL версия)

(Не засяга EN версия)

(Не засяга FR версия)

(Не засяга IT версия)

(Не засяга NL версия)

(Не засяга PT версия)

(Не засяга FI версия)

(Не засяга SV версия)

FI:

S 29 Ei saa tyhjentää viemäriin

S29 Да не се изпуска в канализацията.

– Soveltamisala:

- erittäin helposti syttyvät tai helposti syttyvät veteen sekoittumattomat nesteet,
- erittäin myrkylliset tai myrkylliset aineet ja valmisteet,
- ympäristölle vaaralliset aineet.

– Käytön perusteet:

- *pakollinen* yleisessä kulutuksessa todennäköisesti käytettäville ympäristölle vaarallisille ja tunnuksella N luokitelluille aineille, jollei kyseessä ole aineen tarkoitettu käyttö,
- suositeltava yleisessä kulutuksessa todennäköisesti käytettäville muille edellä mainituille aineille tai valmisteille, jollei kyseessä ole kemikaalin tarkoitettu käyttö.

(Не засяга ES версия)

(Не засяга DA версия)

(Не засяга DE версия)

(Не засяга EL версия)

(Не засяга EN версия)

(Не засяга FR версия)

(Не засяга IT версия)

(Не засяга NL версия)

(Не засяга PT версия)

(Не засяга SV версия)

ПРИЛОЖЕНИЕ 6

„ПРИЛОЖЕНИЕ IX

ЧАСТ А

Разпоредби относно затварянето, безопасно за деца

В допълнение към разпоредбите в член 22, параграф 1, буква е от настоящата директива контейнери с всякакъв обем, които съдържат вещества, представляващи опасност при вдишване (Xn; R65) и са класифицирани и етикетирани съгласно параграф 3.2.3 от приложение VI към настоящата директива, с изключение на веществата, пуснати на пазара под формата на аерозоли или в контейнер, оборудван със запечатано приспособление за пръскане, следва да бъде снабдено със закопчалки за обезопасяване при достъп на деца.

1. *Опаковки за многократно използване*

Закопчалки за обезопасяване при достъп на деца, използвани при опаковки за многократно използване съответстват на стандарта ISO 8317 (в изданието му от 1 юли 1989 г.) относно “ Опаковки, предпазващи от деца – Изисквания и методи на изследване на опаковки за многократно използване”, приети от Международния комитет по стандартизация (ISO).

2. *Опаковки, които не може да се използват многократно*

Закопчалки, обезопасяващи от деца при опаковките, които не се използват многократно отговарят на стандарта CEN EN 862 (издание от март 1997 г.) относно “Опаковки- Опаковки, безопасни за деца - Изисквания и процедури на изследване при опаковки, които не се използват многократно за не-фармацевтични продукти, приет от Европейската комисия по стандартизация(CEN).

3. *Забележка*

1. Свидетелство за съответствие с посочените по-горе стандарти може да бъде издадено от лабораториите, които отговарят на Европейските стандарти серия EN 45 000.

2. *Особени случаи*

Ако е очевидно, че опаковката е безопасна за деца, защото те не могат да имат достъп до нейното съдържание без помощта на някакъв инструмент, не е необходимо да се извършва изследване.

Във всички други случаи, когато има достатъчно основания за съмнение във връзка със сигурността на запечатването по отношение на децата, националните власти могат да поискат от лицето отговорно за пускането на продукта на пазара да представи сертификат от лаборатория, както се посочва в 3.1, който декларира или че видът на затварянето е такъв, че не е необходимо да се изследват спрямо стандартите ISO и CEN, посочени по-горе, или че затварянето е било изследвано и се приема, че отговаря на посочените по-горе стандарти.

ЧАСТ Б

Разпоредби относно осезаемите средства за предупреждение

Техническите спецификации при осезаемите средства за предупреждение съответстват на стандарта ISO EN 11683 (издание от 1997 г.) относно “Опаковки – Осезаеми средства за предупреждение - Изисквания”.