

## Multitoxicitási tesztrendszer javaslat

A multitoxicitási tesztrendszer alapja a 28-napos ismételt kezelésű toxicitási vizsgálat patkányokon, amely nemzetközileg elfogadott és a hatósági engedélyeztetési folyamatokban általánosan használt kísérlet típus. A kísérletben minimálisan, de feltétlenül szükséges módszertani elemeket az OECD útmutató tartalmazza (Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4: Health Effects, Test No. 407: Repeated Dose 28-day Oral Toxicity Study in Rodents). A pályázat során ebben az útmutatóban leírt alapkövetelmények figyelembevételével továbbfejlesztettük a módszert a pályázat céljainak is megfelelő multitoxicitási vizsgálati rendszerré, amely alkalmas a toxinok egyedi és kombinációs hatásainak vizsgálatára, a hatásmechanizmusok tisztázására. A kapott eredmények lehetőséget adnak a hatóságok számára a vizsgált toxinok és kombinációik egészségügyi határértékeinek meghatározására.

A kísérletek megkezdése előtt részletes vizsgálati terveket szükséges kidolgozni mindegyik kísérlethez. Az OECD útmutató vizsgálati alapkövetelményei mellett szatellit állatokat vonunk be a vizsgálatokba, amelyek az integrált neurobiológiai mérések elvégzésére szolgálnak, illetve a kialakult toxikus elváltozások reverzibilitásának, gyógyulásának vizsgálatára maradnak a kísérletben a 28 ismételt kezelést követően még 14 napig.

A vizsgálati tervben nagy figyelmet kell fordítani a különböző csoportok kezelésének lépcsőzetes indítására, mert a neurobiológiai méréseket korlátozott számú állaton lehet hetente elvégezni. Így egy-egy toxinnal illetve toxin kombinációval indított 28 kezelést tartalmazó sorozat 6-8 hét alatt indul el a lépcsőzetes kezdések miatt és 2 hónap után fejeződik be a neurobiológiai mérésekkel. Azonban minden kísérleti állat csak 28 egymást követő napon kap kezelést, és a neurobiológiai mérések előtti napon még kezelést kell kapnia.

Az OECD útmutató alapján az általános munkálatok (állattartás körülményei, tünetek megfigyelése, táp és testtömeg mérés, klinikai patológia, kórbonctan, szövettani feldolgozás) a különböző toxinok és kombinációik esetén azonosak.

A kísérletek állatait külön erre a célra kijelölt állatszobában kell tartani a kereszt kontamináció megelőzésére. Az állatszobák optimális hőmérséklete 22 °C ( $\pm 3$  °C), páratartalma 30-70 %. A megvilágítás mesterséges volt, 12 óra világos és 12 óra sötét váltakozott ciklikusan. Ezeket a környezeti paramétereket rendszeresen regisztrálni szükséges a kísérletek során.

Etetésre javasolt a konvencionális laboratóriumi táp, és csapvíz alkalmas az itatásra ad libitum. A táp analízisének (beltartalom, aflatoxin, peszticide maradványok, nehézfémek) és mikrobiológiai vizsgálatának eredményét, ugyanígy a víz analízisének és mikrobiológiai vizsgálatának eredményeit a vizsgálat nyersadataival együtt meg kell őrizni a kísérlet dokumentumai között.

A kísérleti fázis legalább 5 nap akklimatizációs periódusból, 28 nap kezelési időszakból és az erre kijelölt állatoknál ezen túl még 14 napos utómegfigyelési, úgynevezett gyógyulási fázisból áll.

A kísérleti anyagokat naponta (hét nap/hét) adjuk a kísérleti csoportok állatainak, csoportonként más-más dózisban, 28 napon keresztül. A kontroll csoport állatait vivőanyaggal kezeljük párhuzamosan. A vizsgálat során az állatokat folyamatosan gondosan megfigyeljük (klinikai tünet vizsgálata, testtömeg, tápfogyasztás mérése).

Általános klinikai megfigyelést naponta egyszer kell végezni a kezelési napokon, megközelítően ugyanabban az időben, figyelembe véve a kezelést követően várható tünetek megjelenésének idejét.

A megfigyelés az állatok általános állapotának (bőr, szőrzet, szemek, nyálkahártyák, légzés, keringés, vegetatív és központi idegrendszer, a szomatomotoros aktivitás és viselkedési minták, különös tekintettel a remegés, görcsök, nyálzás, hasmenés, letargia, alvás és kóma jelenlétére) vizsgálatát foglalja magába.

Az elhullásokat és a moribund állapotot naponta kétszer (rendszerint a munkanap elején és végén) szükséges ellenőrizni.

Az első kezelést megelőzően, azt követően pedig hetente egyszer az összes állatot részletes klinikai vizsgálatnak vetjük alá. Ez alól csak a neurobiológiai mérésre kerülő szatellit állatok képeztek kivételt. E megfigyeléseket az állattartó dobozokon kívül, minden alkalommal a nap hasonló időszakában kell elvégezni. Vizsgálni szükséges a bőr, a szőrzet, a szemek és a nyálkahártyák állapotát, a vizeletet, az ürüléket, a váladékozást, az autonóm funkciókat (pl. könnyezés, szőrborzolás, pupilla mérete, szabálytalan légzés), meg kell figyelni a testtartást, a járást, a kézbevitelre adott reakciókat, különös figyelmet kell fordítani a görcsök (tónusos vagy klónusos) jelenlétére, sztereotip viselkedés és bármilyen bizarr viselkedésmód megjelenésére.

A kezelés negyedik hetében funkcionális megfigyeléseket kell végezni (FOB) a különböző típusú (hallászervi, vizuális, proprioceptív) ingerekre mutatott reakciók, a fogási/szorítási erő és a motoros aktivitás vizsgálatával.

A vizsgálat befejezésekor, a 28. kezelés utáni napon klinikai patológiai (hematológia, klinikai kémia) és szervpatológiai (kórboncolás, szervtömeg, szövettan) vizsgálatokat kell elvégezni. Az elpusztult, illetve a moribund állapot miatt a vizsgálat során humánusan túlaltatott állatokat, ugyanúgy, mint a vizsgálat befejezése után a túlélő állatokat, fel kell boncolni és részletes bonctani leletet kell készíteni.

A multitoxicitási tesztrendszerben el kell végezni a vizsgálandó toxinok egyedi toxikológiai hatásainak vizsgálatát különböző dózisok 28 napig tartó adagolásával, beleértve a neurobiológiai hatások vizsgálatát is. Majd az egyedi, több dózisú toxicitási vizsgálatok eredményei alapján meg kell határozni az egyes toxinok alkalmazandó dózisait a különböző kombinációk együttes multitoxikus hatásainak vizsgálatához. Egy hatásos és egy hatástalan dózist célszerű kiválasztani. E további kombinációs vizsgálatokban két-két toxin együttes hatásait vizsgálhatjuk keverékként adagolt toxinok 28 napos beadása után. Ezen vizsgálatokon belül is kiegészítő 28 napos kezelést kell végezni (szatellit csoportokban) a toxin kombinációkkal. A szatellit állatokat szintén neurobiológiai vizsgálatoknak kell alávetni, valamint 14 napos kezelés nélküli utómegfigyelést kell végezni a kialakult tünetek gyógyulásának ellenőrzésére.

Az egyes toxinok hatása ezen multitoxikus tesztrendszerben összevethető a különböző kombinációk hatásával, így az esetleges szinergizmusok, együttes hatások felderíthetők. Hatásos és hatástalan koncentrációk (LOAEL, NOAEL) szintén megállapíthatók az egyes toxinokra és kombinációkra, melyek az egészségügyi határértékek alapját képezhetik.

A multitoxicitási tesztrendszer kidolgozása során megvalósul az az Uniós állatvédelmi irányelv, hogy csökkentjük a kísérletekben felhasznált állatok számát. Azáltal, hogy egy-egy kezelés sorozatban kombináljuk a standard toxicitási vizsgálatot neurobiológiai mérésekkel, kevesebb állat feláldozásával lényegesen több adatot, információt kapunk a multitoxikus hatásokról, mintha mindegyik mérés-sorozat egy-egy különálló vizsgálatból származott volna.