

(8) In Teil B werden die folgenden Kapitel angefügt:

„B.63 SCREENING-PRÜFUNG ZUR BEWERTUNG DER REPRODUKTIONS-/ENTWICKLUNGSTOXIZITÄT

EINLEITUNG

1. Diese Prüfmethode entspricht der OECD-Prüfrichtlinie (TG) 421 (2016). Die OECD-Richtlinien für die Prüfung von Chemikalien werden regelmäßig unter Berücksichtigung des wissenschaftlichen Fortschritts überarbeitet. Die ursprüngliche Screening-Prüfrichtlinie 421 wurde im Jahr 1995 angenommen. Sie beruhte auf einem Protokoll für einen Vorversuch zur Bewertung der Reproduktionstoxizität, der in zwei Expertensitzungen im Jahr 1990 in London (1) und im Jahr 1992 in Tokio (2) erörtert wurde.
2. Diese Prüfmethode wurde als Folgemaßnahme der 1998 bei der OECD eingeleiteten prioritären Maßnahme zur Änderung bestehender Prüfrichtlinien und zur Entwicklung neuer Prüfrichtlinien für das Screening und die Prüfung potenzieller endokriner Disruptoren unter Festlegung von für einen endokrinen Disruptor relevanten Endpunkten aktualisiert (3). OECD TG 407 (28-Tage-Toxizitätsstudie mit wiederholter oraler Verabreichung an Nagern, Kapitel B.7 dieses Anhangs) beispielsweise wurde 2008 um geeignete Parameter zum Nachweis einer endokrinen Wirkung von Prüfchemikalien aktualisiert. Ziel der Aktualisierung von TG 421 war die Einbeziehung einiger für endokrine Disruptoren relevanter Endpunkte in Screening-TGs, bei denen die Expositionszeiträume einige der empfindlichsten Entwicklungszeiträume (Zeiträume vor oder kurz nach der Geburt) beinhalten.
3. Die ausgewählten für endokrine Disruptoren relevanten zusätzlichen Endpunkte, die Bestandteil auch von TG 443 (Erweiterte Eingenerationen-Prüfung auf Reproduktionstoxizität, Kapitel B.56 dieses Anhangs) sind, wurden auf der Grundlage einer Machbarkeitsstudie zur Untersuchung wissenschaftlicher und technischer Fragen im Zusammenhang mit deren Berücksichtigung sowie mit möglichen Anpassungen des für deren Einbeziehung erforderlichen Prüfprotokolls in TG 421 aufgenommen (4).
4. Mit dieser Prüfmethode sollen begrenzte Informationen über die Wirkungen einer Prüfchemikalie auf die Reproduktionsleistung männlicher und weiblicher Tiere (Funktion der Keimdrüsen, Paarungsverhalten, Empfängnis, Entwicklung des Conceptus, Geburt usw.) ermittelt werden. Sie ist nicht als alternative Prüfmethode und auch nicht als Ersatz für die bereits existierenden Prüfmethoden B.31, B.34, B.35 und B.56 zu betrachten.

AUSGANGSÜBERLEGUNGEN

5. Diese Screening-Prüfmethode kann verwendet werden, um erste Informationen über mögliche reproduktions- und/oder entwicklungsrelevante Auswirkungen entweder bereits früh bei der Bewertung toxikologischer Eigenschaften von Chemikalien oder bei Besorgnis erregenden Chemikalien zu erhalten. Außerdem kann sie als Teil einer Reihe von Vorversuchen für existierende Chemikalien verwendet werden, für die nur wenig oder keinerlei toxikologische Informationen verfügbar sind, oder beispielsweise als Dosisfindungsstudie im Zusammenhang mit umfassenderen Reproduktions-/Entwicklungsstudien dienen. Bei der Prüfung sollten die im ‚OECD Guidance Document no 19 on the recognition, assessment, and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation‘ (5) genannten Grundsätze und Erwägungen beachtet werden.
6. Diese Prüfmethode liefert keine umfassenden Informationen über sämtliche Reproduktions- und Entwicklungsaspekte. Insbesondere bietet sie nur beschränkte Möglichkeiten zur Erkennung postnataler Ausprägungen einer pränatalen Exposition oder zur Feststellung von Wirkungen, die bei postnataler Exposition induziert werden können. Aufgrund (unter anderem) der verhältnismäßig geringen Anzahl an Versuchstieren in den Dosisgruppen sowie der Selektivität der Endpunkte und der kurzen Dauer der Studie werden mit dieser Methode keine Nachweise dafür erlangt, dass keine Wirkungen eintreten. Wenn keine Daten aus anderen Prüfungen zur Bewertung der Reproduktions-/Entwicklungstoxizität vorliegen, sind positive Ergebnisse zudem hilfreich für eine erste Gefährdungsabschätzung und können in Entscheidungen über die Notwendigkeit und die zeitliche Gestaltung weiterer Prüfungen beitragen.
7. Die Ergebnisse in Bezug auf die endokrinen Parameter sind im Kontext des ‚OECD Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals‘ (6) auszuwerten. Dieser Conceptual Framework enthält die verbesserte OECD TG 421 in Niveau 4 als *In-vivo*-Prüfung zur Erlangung von Daten über negative Wirkungen auf endokrin relevante Endpunkte. Ein endokrin relevantes Signal kann jedoch nicht an sich als hinreichender Beleg dafür betrachtet werden, dass die betreffende Prüfchemikalie als endokriner Disruptor wirkt.
8. Bei dieser Prüfmethode wird angenommen, dass die Prüfchemikalie oral verabreicht wird. Bei anderen Expositionswegen können Änderungen erforderlich sein.

9. Bevor die Prüfmethode an einem Gemisch für die Generierung von Daten für einen bestimmten Regulierungszweck verwendet wird, ist zu prüfen, ob sie für den beabsichtigten Zweck angemessene Ergebnisse liefern kann und, wenn dem so ist, warum. Solche Erwägungen entfallen, wenn die Prüfung des Gemischs rechtlich vorgeschrieben ist.
10. Die Definitionen der verwendeten Begriffe sind Anlage 1 zu entnehmen.

PRINZIP DER PRÜFMETHODE

11. Die Prüfchemikalie wird verschiedenen Gruppen von männlichen und weiblichen Tieren in abgestuften Dosen verabreicht. Männlichen Tieren sollte die Prüfchemikalie mindestens vier Wochen bis zum Tag vor der vorgesehenen Tötung (einschließlich) verabreicht werden. (Dieser Zeitraum umfasst mindestens zwei Wochen vor der Paarung, die Paarungszeit und etwa zwei Wochen nach der Paarung). Wegen des begrenzten Verabreichungszeitraums vor der Paarung ist die Fruchtbarkeit bei männlichen Tieren möglicherweise kein besonders empfindlicher Indikator für eine testikuläre Toxizität. Daher ist eine eingehende histologische Untersuchung der Hoden von wesentlicher Bedeutung. Die Kombination eines Verabreichungszeitraums von zwei Wochen mit anschließenden Beobachtungen des Paarungsverhaltens und der Fertilität mit einem Verabreichungszeitraum von insgesamt mindestens vier Wochen und einer anschließenden detaillierten Histopathologie der männlichen Keimdrüsen wird als ausreichend für den Nachweis der meisten Wirkungen auf die männliche Fruchtbarkeit und die Spermatogenese betrachtet.
12. Weiblichen Tieren sollte die Prüfchemikalie während der gesamten Dauer der Studie verabreicht werden. Dazu zählen zwei Wochen vor der Paarung (damit mindestens zwei vollständige Östruszyklen erfasst werden), die variable Zeit bis zur Empfängnis und die Dauer der Gravidität sowie mindestens 13 Tage nach der Geburt bis zum Tag vor der vorgesehenen Tötung (einschließlich).
13. Die Dauer der Studie nach der Eingewöhnung und einer Bewertung des Östruszyklus vor der Verabreichung der Prüfchemikalie hängt von der Leistungsfähigkeit des weiblichen Tiers ab; im Allgemeinen beträgt sie etwa 63 Tage [mindestens 14 Tage vor der Paarung, (bis zu) 14 Tage Paarungszeit, 22 Tage Gravidität, 13 Tage Laktation].
14. Während des Verabreichungszeitraums werden die Tiere täglich sorgfältig auf Toxizitätszeichen beobachtet. Tiere, die während der Dauer der Prüfung sterben, und vorzeitig getötete Tiere werden seziert; die nach Abschluss der Prüfung überlebenden Tiere werden getötet und ebenfalls seziert.

BESCHREIBUNG DER METHODE

Auswahl von Versuchstierarten

15. Diese Prüfmethode ist für die Verwendung von Ratten ausgelegt. Wenn die in dieser Prüfmethode genannten Parameter an einer anderen Nagetierart untersucht werden, ist dies ausführlich zu begründen. Im internationalen Validierungsprogramm für den Nachweis von endokrinen Disruptoren in OECD TG 407 (entsprechend Kapitel B.7 in diesem Anhang) wurden ausschließlich Ratten als Versuchstiere verwendet. Stämme mit geringer Fruchtbarkeit oder bekannter hoher Häufigkeit von Entwicklungsdefekten sind nicht zu verwenden. Es sind gesunde jungfräuliche Tiere zu verwenden, die zuvor nicht in anderen Versuchen eingesetzt wurden. Die Versuchstiere sind nach Tierart, Tierstamm, Geschlecht, Gewicht und Alter auszuwählen. Bei Beginn der Studie sollten die Gewichtsunterschiede der Tiere möglichst gering sein und 20 % des geschlechtsspezifischen Durchschnittsgewichts nicht überschreiten. Wenn die Studie als Vorstudie zu einer Langzeitstudie oder einer Eingenerationsstudie durchgeführt wird, sollten in beiden Studien vorzugsweise Tiere desselben Stamms und derselben Herkunft verwendet werden.

Haltung und Fütterung

16. Bei allen Verfahren sind die örtlichen Standards der Versuchstierpflege einzuhalten. Die Temperatur im Tierversuchsraum muss 22 °C (± 3 °) betragen. Die relative Luftfeuchtigkeit sollte mindestens 30 % betragen und – außer beim Reinigen des Raums – 70 % nicht überschreiten; anzustreben ist ein Wert von 50-60 %. Die Beleuchtung sollte künstlich sein, und die Hell- und Dunkelphasen sollten sich im Abstand von 12 Stunden abwechseln. An die Versuchstiere kann herkömmliches Laborfutter verfüttert werden, wobei eine unbegrenzte Trinkwasserversorgung zu gewährleisten ist. Die Auswahl des Futters wird eventuell dadurch beeinflusst, dass eine geeignete Beimischung der Prüfchemikalie sichergestellt werden muss, wenn die Prüfchemikalie auf diese Art verabreicht werden soll.

17. Die Tiere sollten in kleinen gleichgeschlechtlichen Gruppen untergebracht werden; sie können auch einzeln gehalten werden, wenn dies wissenschaftlich gerechtfertigt ist. Bei Gruppenhaltung sollten maximal fünf Tiere in einem Käfig untergebracht sein. Die Verpaarung erfolgt in für diesen Zweck geeigneten Käfigen. Trächtigen weiblichen Tieren sollte in Einzelhaltung Material für den Nestbau bereitgestellt werden. Säugende weibliche Tiere werden in Käfigen einzeln mit ihren Nachkommen gehalten.
18. Das Futter ist regelmäßig auf Schadstoffe zu analysieren. Eine Probe des Futters ist bis zur Fertigstellung des Abschlussberichts aufzubewahren.

Vorbereitung der Versuchstiere

19. Gesunde und geschlechtsreife junge Tiere werden randomisiert und den einzelnen Kontroll- bzw. Behandlungsgruppen zugeteilt. Die Käfige sind so aufzustellen, dass etwaige standortbedingte Auswirkungen möglichst gering sind. Die Tiere werden eindeutig gekennzeichnet und vor Beginn der Studie in ihren Käfigen über einen Zeitraum von mindestens fünf Tagen unter Laborbedingungen eingewöhnt.

Vorbereitung der Dosierung

20. Die Prüfchemikalie sollte oral verabreicht werden, wenn nicht andere Verabreichungswege als besser geeignet erscheinen. Auf oralem Weg wird die Prüfchemikalie gewöhnlich mit einer Sonde verabreicht. Alternativ können Prüfchemikalien aber auch über die Nahrung oder das Trinkwasser zugeführt werden.
21. Bei Bedarf wird die Prüfchemikalie in einem geeigneten Vehikel gelöst oder suspendiert. Es empfiehlt sich, nach Möglichkeit zunächst die Verwendung einer wässrigen Lösung/Suspension, dann eine Lösung/Emulsion in Öl (z. B. Maisöl) und erst dann eine Lösung in einem anderen Vehikel in Betracht zu ziehen. Bei anderen Vehikeln als Wasser müssen deren toxische Merkmale bekannt sein. Die Stabilität und die Homogenität der Prüfchemikalie in dem Vehikel sind zu bestimmen.

VERFAHREN

Anzahl und Geschlecht der Versuchstiere

22. Jede Gruppe sollte mit mindestens 10 männlichen und 12-13 weiblichen Tieren begonnen werden. Bei den weiblichen Tieren wird vor der Exposition der Östruszyklus untersucht, und Tiere, bei denen nicht der typische Zyklus von 4-5 Tagen festzustellen ist, werden nicht in die Studie einbezogen. Daher wird die Vorhaltung weiterer weiblicher Tiere empfohlen, damit pro Gruppe tatsächlich 10 weibliche Tiere verfügbar sind. Außer bei ausgeprägten toxischen Wirkungen dürften dann pro Gruppe mindestens 8 Graviditäten entstehen; dies ist gewöhnlich die erforderliche Mindestzahl an trächtigen Tieren pro Gruppe. So soll gewährleistet werden, dass genügend Graviditäten und Nachkommen erzeugt werden, um eine aussagekräftige Bewertung des Schädigungspotenzials der Prüfchemikalie in Bezug auf die Fertilität, die Gravidität, das Verhalten des Muttertiers, das Säugen, das Wachstum und die Entwicklung der F₁-Generation von der Empfängnis bis zu Tag 13 nach der Geburt vornehmen zu können.

Dosierung

23. Im Allgemeinen sollten mindestens drei Versuchsgruppen und eine Kontrollgruppe gewählt werden. Die Dosierungen können auf Informationen aus akuten Toxizitätsprüfungen oder auf Ergebnissen von Studien mit Wiederholungsdosen beruhen. Abgesehen von der Behandlung mit der Prüfchemikalie sollen die Tiere in der Kontrollgruppe unter identischen Bedingungen behandelt werden wie die Versuchstiere in der Prüfgruppe. Wird die Prüfchemikalie mit einem Vehikel verabreicht, muss die Kontrollgruppe das Vehikel mit dem höchsten verwendeten Volumen erhalten.
24. Bei der Wahl der Dosisstufen sollten sämtliche vorliegenden Daten zur Toxizität und (Toxiko)kinetik berücksichtigt werden. Außerdem sollte berücksichtigt werden, dass trächtige und nicht trächtige Tiere unterschiedlich empfindlich sein können. Die höchste Dosis sollte so gewählt werden, dass zwar toxische Wirkungen, aber keine Todesfälle oder schweres Leiden hervorgerufen werden. Anschließend soll eine absteigende Folge von Dosierungsstufen ausgewählt werden, um dosisabhängige Wirkungen und die niedrigste Dosis ohne zu beobachtende schädliche Wirkungen (NOAEL) zu bestimmen. Zwei- bis vierfache Abstände erweisen sich häufig als optimale Dosisabstufungen, gegenüber der Verwendung sehr großer Intervalle (z. B. mehr als Faktor 10) ist die Hinzunahme einer vierten Prüfgruppe häufig vorzuziehen.

25. Bei allgemeiner Toxizität (z. B. vermindertes Körpergewicht, Wirkungen auf Leber, Herz, Lungen oder Nieren usw.) oder anderen Veränderungen, die möglicherweise keine toxischen Reaktionen darstellen (z. B. verminderte Futteraufnahme, Lebervergrößerung), sind die beobachteten Wirkungen auf endokrine Endpunkte mit Vorsicht zu bewerten.

Limit-Prüfung

26. Ergibt eine orale Prüfung mit einer einzigen Dosierung von mindestens 1 000 mg/kg Körpergewicht/Tag oder bei Verabreichung in Futter oder Trinkwasser ein gleichwertiger prozentualer Anteil im Futter oder Trinkwasser nach den für diese Studie beschriebenen Verfahren keine wahrnehmbare Toxizität und ist aufgrund von Daten strukturverwandter Stoffe keine Toxizität zu erwarten, kann auf eine vollständige Studie mit verschiedenen Dosisabstufungen gegebenenfalls verzichtet werden. Die Limit-Prüfung kann angebracht sein, es sei denn, die Exposition beim Menschen lässt die Prüfung bei einer höheren oralen Dosis angezeigt erscheinen. Bei anderen Verabreichungsformen, z. B. Inhalation oder dermale Applikation, wird die maximal erzielbare Konzentration in vielen Fällen durch die physikalisch-chemischen Eigenschaften der Prüfchemikalien bestimmt.

Verabreichung der Dosen

27. Den Tieren wird die Prüfchemikalie für die Dauer einer Woche (7 Tage) täglich verabreicht. Wird die Prüfchemikalie über eine Sonde verabreicht, so sollte dies in einer einmaligen Dosis unter Verwendung einer Magensonde oder einer geeigneten Intubationskanüle erfolgen. Das maximale Flüssigkeitsvolumen, das einem Versuchstier jeweils verabreicht werden kann, hängt von der Größe des Versuchstiers ab. Das Volumen sollte 1 ml/100 g Körpergewicht nicht überschreiten, bei wässrigen Lösungen kommen aber auch 2 ml/100 g Körpergewicht in Betracht. Außer für Reizungen auslösende oder ätzende Prüfchemikalien, die in der Regel bei höheren Konzentrationen eine Verschlimmerung bewirken, sollte die Variabilität des Prüfvolumens durch Anpassung der Konzentration möglichst gering gehalten werden, um ein konstantes Volumen bei allen Dosen zu gewährleisten.
28. Bei mit dem Futter oder dem Trinkwasser verabreichten Prüfchemikalien ist unbedingt sicherzustellen, dass die Mengen der jeweiligen Prüfchemikalie die normale Nahrungsaufnahme oder den Wasserhaushalt nicht beeinträchtigen. Wenn die Prüfchemikalie im Futter verabreicht wird, kann entweder eine konstante Konzentration im Futter (ppm) oder eine konstante Dosis, bezogen auf das Körpergewicht des Tieres, verwendet werden; die jeweils gewählte Verfahrensweise sollte angegeben werden. Eine mit einer Magensonde verabreichte Dosis soll jeweils zu denselben Tageszeiten gegeben und mindestens einmal pro Woche so angepasst werden, dass eine konstante Dosis im Verhältnis zum Körpergewicht aufrechterhalten wird.

Versuchsplan

29. Die Verabreichung sollte für beide Geschlechter mindestens 2 Wochen vor der Paarung beginnen, nachdem sich die Tiere mindestens 5 Tage lang eingewöhnt haben und nachdem die weiblichen Tiere auf einen normalen Östruszyklus (in einem 2-wöchigen Zeitraum vor der Behandlung) untersucht wurden. Die Studie sollte so geplant werden, dass mit der Bewertung des Östruszyklus bald nach Erreichen der vollständigen Geschlechtsreife begonnen wird. Der Beginn dieser Zeiträume kann je nach Rattenstämmen in den einzelnen Labors leicht variieren und beispielsweise bei Sprague-Dawley-Ratten bei einem Alter von 10 Wochen und bei Wistar-Ratten etwa bei einem Alter von 12 Wochen liegen. Muttertiere sollten an Tag 13 nach der Geburt oder kurz darauf getötet werden. Der Tag der Geburt (d. h. der Tag, an dem der Geburtsvorgang abgeschlossen wurde) wird als Tag 0 nach der Geburt bezeichnet. Weibliche Tiere, bei denen keine Besamung festgestellt ist, werden 24-26 Tage nach dem letzten Tag der Paarungszeit getötet. Die Verabreichung wird bei beiden Geschlechtern während der Paarungszeit fortgesetzt. Männliche Tiere werden auch nach der Paarungszeit noch mindestens über den vollständigen Verabreichungszeitraum von 28 Tagen behandelt. Anschließend werden sie getötet oder alternativ weiter gehalten und behandelt, damit eine zweite Paarung erfolgen kann, wenn dies als angemessen betrachtet wird.
30. Die tägliche Behandlung der weiblichen Muttertiere sollte während der Gravidität sowie mindestens bis zu Tag 13 nach der Geburt bzw. zum Tag vor der Tötung (einschließlich) fortgesetzt werden. Bei Studien, bei denen die Prüfchemikalie durch Inhalation oder dermal verabreicht wird, sollte die Verabreichung mindestens bis zu Tag 19 der Trächtigkeit (einschließlich) fortgesetzt und so bald wie möglich (spätestens PND 4) wieder aufgenommen werden.
31. Der Versuchsplan ist in Anlage 2 in einem Diagramm dargestellt.

Verpaarung

32. In der Regel sollten bei dieser Studie männliche und weibliche Tiere im Verhältnis 1:1 (ein männliches auf ein weibliches Tier) eingesetzt werden. Ausnahmen können sich gelegentlich ergeben, wenn männliche Tiere sterben. Das weibliche Tier sollte mit demselben männlichen Tier gehalten werden, bis Anzeichen für eine Paarung festgestellt werden bzw. bis zwei Wochen vergangen sind. Jeden Morgen werden die weiblichen Tiere auf Sperma oder Vaginalpfropfe untersucht. Tag 0 der Trächtigkeit wird als der Tag festgelegt, an dem die Besamung (durch Vaginalpfropf oder Spermaspuren) nachgewiesen werden kann. Bei einer erfolglosen Verpaarung kann gegebenenfalls die erneute Verpaarung weiblicher Tiere mit bewährten männlichen Tieren der gleichen Gruppe erwogen werden.

Wurfgröße

33. Am PND 4 kann die Größe eines jeden Wurfs angepasst werden, indem überschüssige Jungtiere nach dem Zufallsprinzip aussortiert werden, um je nach normalem Umfang eines Wurfs beim verwendeten Rattenstamm pro Wurf nach Möglichkeit vier oder fünf Jungtiere pro Geschlecht und Wurf zu erhalten. Von zwei der überschüssigen Jungtiere sollten Blutproben entnommen, in Pools zusammengefasst und zur Bestimmung von Serumspiegeln (T4) verwendet werden. Die selektive Eliminierung von Jungtieren, z. B. auf der Grundlage des Körpergewichts oder des anogenitalen Abstands (AGD), wird nicht empfohlen. Wenn es wegen der Anzahl männlicher bzw. weiblicher Jungtiere nicht möglich ist, pro Wurf jeweils vier oder fünf Jungtiere eines jeden Geschlechts zu erhalten, ist auch eine grobe Anpassung (beispielsweise sechs männliche und vier weibliche Tiere) akzeptabel. Wenn die Anzahl der Tiere eines Wurfs die Eliminierungsgrenze (8 oder 10 Jungtiere pro Wurf) unterschreitet, werden keine Jungtiere aussortiert. Wenn die Anzahl der Jungtiere um nur ein Tier über der Eliminierungsgrenze liegt, wird nur ein Jungtier aussortiert und zur Blutentnahme für mögliche Bewertungen der Serumspiegel (T4) verwendet.
34. Wenn die Größe des Wurfs nicht geändert wird, werden an Tag 4 nach der Geburt zwei Jungtiere pro Wurf human getötet und Blutproben zur Bestimmung der Konzentration der Schilddrüsenhormone im Serum entnommen. Nach Möglichkeit sollten diese zwei Jungtiere je Wurf weibliche Jungtiere sein, damit männliche Jungtiere zur Prüfung der Brustwarzenretention für den Fall aufgespart werden können, dass nach dem Aussortieren dieser Jungtiere keine weiblichen Tiere zur abschließenden Bewertung mehr verbleiben würden. Wenn ein Wurf weniger als 8 bzw. 10 Jungtiere hat (je nach Größe eines normalen Wurfs beim betreffenden Rattenstamm), werden keine Jungtiere aussortiert. Wenn die Anzahl der Jungtiere um nur ein Tier über der normalen Größe eines Wurfs liegt, wird nur ein Jungtier aussortiert und zur Blutentnahme für mögliche Bewertungen der Serumspiegel (T4) verwendet.

Beobachtungen am lebenden Tier

Klinische Beobachtungen

35. Während der gesamten Versuchsdauer sollten allgemeine klinische Beobachtungen mindestens einmal täglich durchgeführt werden, bei Anzeichen für Toxizität häufiger. Die Beobachtungen sollen vorzugsweise jeden Tag zur gleichen Uhrzeit erfolgen, wobei die Zeit der nach der Verabreichung erwarteten maximalen Wirkungen zu berücksichtigen ist. Auffallende Verhaltensstörungen und Anzeichen einer schweren oder verzögerten Geburt sowie alle Vergiftungserscheinungen einschließlich Mortalität sind aufzuzeichnen. In den Aufzeichnungen sind auch der Zeitpunkt des erstmaligen Auftretens, des Umfangs und der Dauer der Anzeichen für eine Toxizität zu vermerken.

Körpergewicht und Futter-/Trinkwasserverbrauch

36. Männliche und weibliche Tiere der P-Generation müssen am ersten Tag der Behandlung und anschließend mindestens in wöchentlichen Abständen sowie bei Versuchsende gewogen werden. Während der Gravidität sollten weibliche Tiere an den Tagen 0, 7, 14 und 20 sowie innerhalb von 24 Stunden nach der Geburt (Tag 0 oder Tag 1 nach der Geburt) und mindestens an den Tagen 4 und 13 nach der Geburt gewogen werden. Diese Beobachtungen sind für jedes ausgewachsene Tier einzeln zu protokollieren.
37. Vor der Paarung, vor der Gravidität und vor der Laktation sollte die Futtermittelaufnahme mindestens einmal wöchentlich gemessen werden. Die Messung der Futtermittelaufnahme während der Paarungszeit ist fakultativ. Wenn die Prüfchemikalie mit dem Trinkwasser verabreicht wird, sollte in diesen Zeiträumen auch die Wasseraufnahme gemessen werden.

Östruszyklen

38. Östruszyklen sollten vor Beginn der Behandlung überwacht werden, damit für die Studie weibliche Tiere mit regelmäßigem Zyklus ausgewählt werden können (Nummer 22). Außerdem sollten ab Beginn des Behandlungszeitraums bis zu Anzeichen für eine Besamung täglich vaginalabstriche untersucht werden. Wenn Bedenken hinsichtlich akuter Auswirkungen von Stress bestehen, die bei Beginn der Verabreichung die Östruszyklen verändern könnten, können die Versuchstiere in den Labors zwei Wochen behandelt werden, um anschließend die Östruszyklen vor der Paarungszeit über mindestens zwei Wochen und anschließend bis zu Anzeichen für eine Besamung in der Paarungszeit anhand täglicher vaginalabstriche zu überwachen. Bei der Entnahme vaginaler/zervikaler Zellen ist sorgfältig darauf zu achten, dass die Schleimhaut nicht gereizt und eine Pseudogravidität eingeleitet werden könnte (7) (8).

Parameter für die Nachkommen

39. Die Trächtigkeitsdauer wird vom Tag 0 der Gravidität an berechnet und sollte vermerkt werden. Jeder Wurf ist so bald wie möglich nach der Geburt zu untersuchen, um die Anzahl und das Geschlecht der Nachkommen, Totgeburten, Lebendgeburten und Kümmerlinge (Jungtiere, die erheblich kleiner sind als Jungtiere einer vergleichbaren Kontrollgruppe) sowie auffallende Anomalien feststellen zu können.

40. Innerhalb von 24 Stunden nach der Geburt (Tag 0 oder Tag 1 nach der Geburt) und mindestens an den Tagen 4 und 13 nach der Geburt sollten lebende Jungtiere gezählt und nach Geschlechtern unterschieden und die Würfe jeweils gewogen werden. Zusätzlich zu den in Nummer 35 genannten Beobachtungen sollte ungewöhnliches Verhalten der Nachkommen vermerkt werden.
41. Der anogenitale Abstand (AGD) sollte bei jedem Jungtier zwischen PND 0 und PND 4 am selben Tag gemessen werden. Das Körpergewicht des Jungtiers wird am Tag der Messung des AGD erfasst, der auf Jungtiergröße – vorzugsweise die Quadratwurzel des Körpergewichts – genormt sein sollte (9). Die Anzahl Brustwarzen/Warzenhöfe bei männlichen Jungtieren ist wie in OECD GD 151 empfohlen am PND 12 oder 13 zu kontrollieren (10).

Klinisch-biochemische Untersuchungen

42. Nach dem folgenden Plan werden Blutproben an einer vorgegebenen Stelle entnommen:
 - von mindestens zwei Jungtieren pro Wurf an Tag 4 nach der Geburt, wenn die Anzahl der Jungtiere dies zulässt (Nummern 33 und 34),
 - von allen Muttertieren und von mindestens zwei Jungtieren pro Wurf bei Beendigung des Versuchs an Tag 13 und
 - von allen adulten männlichen Tieren bei Beendigung des Versuchs.

Alle Blutproben werden unter geeigneten Bedingungen gelagert. Bei Blutproben der Jungtiere vom Tag 13 sowie bei Blutproben der adulten männlichen Tiere werden die Serumspiegel auf Schilddrüsenhormone (T4) untersucht. Wenn relevant, wird außerdem eine Bewertung von T4 bei Blutproben der Muttertiere sowie bei Jungtieren an Tag 4 vorgenommen. Ebenfalls wenn relevant können auch weitere Hormone gemessen werden. Das Blut der Jungtiere kann zur Analyse der Schilddrüsenhormone nach Würfen zu Pools zusammengefasst werden. Die Schilddrüsenhormone (T4 und TSH) sollten vorzugsweise „insgesamt“ gemessen werden.

43. Die folgenden Faktoren können die Variabilität und die absoluten Konzentrationen der Hormonbestimmungen beeinflussen:
 - der Zeitpunkt der Tötung wegen Schwankungen der Hormonkonzentrationen im Tagesverlauf,
 - Methode der Tötung, die gewählt wird, um übermäßigen Stress für die Tiere zu vermeiden, der die Hormonkonzentrationen beeinflussen könnte,
 - Prüfkits für Hormonbestimmungen mit unterschiedlichen Standardkurven.
44. Plasmaproben, die speziell zur Hormonbestimmung vorgesehen sind, sollten immer zur gleichen Tageszeit gewonnen werden. Die verschiedenen im Handel erhältlichen Assay-Kits können bei der Analyse der Hormonkonzentration unterschiedliche numerische Werte ergeben.

Pathologie

Autopsie

45. Zum Zeitpunkt der Tötung oder bei vorzeitigem Tod im Verlauf der Studie sind die adulten Tiere makroskopisch auf etwaige Anomalien oder pathologische Veränderungen zu untersuchen. Dabei ist besonders auf die Organe des Fortpflanzungssystems zu achten. Die Anzahl der Implantationsstellen sollte vermerkt werden. Am Morgen des Tags der Sektion ist ein Vaginalabstrich zu untersuchen, um das Stadium des Östruszyklus zu bestimmen und eine Korrelation zur histopathologischen Untersuchung der Ovarien zu ermöglichen.
46. Die Hoden und die Nebenhoden sowie die Prostata und die Samenbläschen zusammen mit den Koagulationsdrüsen aller adulter männlicher Tiere sollten ggf. von anhaftendem Gewebe befreit und möglichst umgehend nach der Sektion gewogen werden, bevor das Material eintrocknet. Als Organgewichte können ferner die Gewichte des Muskelkomplex Levator ani/bulbospongiosus, der Cowperschen Drüsen und der Glans penis bei männlichen Tieren sowie der Ovarien (Nassgewicht) und des Uterus mit Zervix bei weiblichen Tieren gemessen werden; wenn diese Gewichte berücksichtigt werden sollen, sollten die Messungen möglichst umgehend nach der Sektion vorgenommen werden.
47. Tote Jungtiere und Jungtiere, die an Tag 13 nach der Geburt oder kurz danach getötet wurden, sollten zumindest äußerlich sorgfältig auf auffallende Anomalien untersucht werden. Besondere Beachtung erfordern die externen Genitalien, die auf Anzeichen für eine veränderte Entwicklung zu untersuchen sind. An Tag 13 sollte die Schilddrüse eines männlichen und eines weiblichen Jungtieres pro Wurf konserviert werden.

48. Bei allen adulten Tieren sollten die Ovarien, Hoden, akzessorischen Geschlechtsorgane (Uterus und Zervix, Nebenhoden, Prostata, Samenbläschen und Koagulationsdrüsen), Schilddrüse und alle Organe mit makroskopischen Veränderungen konserviert werden. Eine Fixation in Formalin ist für die regelmäßige Prüfung von Hoden und Nebenhoden nicht zu empfehlen. Eine annehmbare Methode besteht in der Verwendung von Bouinscher Lösung oder modifizierter Davidson-Lösung für diese Gewebe (11). Um ein rasches Eindringen des Fixierungsmittels zu ermöglichen, kann die Tunica albuginea an beiden Enden des Organs vorsichtig und flach mit einer Nadel punktiert werden.

Histopathologie

49. Bei den Tieren der höchsten Dosisgruppe und der Kontrollgruppe sollten die Ovarien, Hoden und Nebenhoden (unter besonderer Berücksichtigung der Stadien der Spermatogenese und der Histopathologie der interstitiellen testikulären Zellstruktur) einer detaillierten histologischen Untersuchung unterzogen werden. Die übrigen konservierten Organe einschließlich der Schilddrüse von Jungtieren und von adulten Tieren können erforderlichenfalls untersucht werden. Das Gewicht der Schilddrüse kann nach der Fixierung bestimmt werden. Anhaftendes Gewebe ist sehr vorsichtig und erst nach der Fixierung zu entfernen, um Gewebeschäden zu vermeiden. Eine Gewebeschädigung könnte die histopathologische Analyse beeinträchtigen. Die Untersuchungen sind auch auf die Tiere anderer Dosisgruppen auszudehnen, wenn in der Gruppe mit der höchsten Dosis Veränderungen festgestellt werden. Der Leitfaden zur Histopathologie (11) enthält zusätzliche Informationen zur Sektion, Fixierung, Schnittherstellung und Histopathologie endokriner Gewebe.

DATEN UND BERICHTERSTATTUNG

Daten

50. Es sollen Daten zu den einzelnen Tieren bereitgestellt werden. Außerdem sollten sämtliche Daten in tabellarischer Form zusammengefasst werden; dabei werden für jede Prüfgruppe die Anzahl der Tiere zu Beginn der Prüfung, die Anzahl der während der Prüfung tot aufgefundenen Tiere beziehungsweise der aus humanen Gründen getöteten Tiere, der jeweilige Zeitpunkt des Todes beziehungsweise der Tötung, die Anzahl der fruchtbaren Tiere, die Anzahl der trächtigen weiblichen Tiere, die Anzahl der Tiere mit Anzeichen von Toxizität, eine Beschreibung der beobachteten Anzeichen von Toxizität, einschließlich des Zeitpunkts, zu dem die toxischen Wirkungen eingetreten sind, deren Dauer und Schweregrad, die Arten von histopathologischen Veränderungen und alle relevanten Daten zu den Würfen angegeben. Anlage 3 enthält ein tabellarisches Berichtsformat, das sich als sehr hilfreich für die Evaluierung der reproduktions- bzw. entwicklungstoxischen Auswirkungen erwiesen hat.
51. Wegen des begrenzten Umfangs der Studie sind statistische Analysen in Form von „Signifikanztests“ für viele Endpunkte, insbesondere für reproduktionsbezogene Endpunkte, nur von begrenzter Bedeutung. Wenn statistische Analysen durchgeführt werden, sollte die gewählte Methode der Verteilung der zu untersuchenden Variable angemessen sein und vor Beginn der Studie festgelegt werden. Statistische Analysen des AGD und der Brustwarzenretention sollten auf den Daten einzelner Jungtiere unter Berücksichtigung wurfbedingter Auswirkungen beruhen. Gegebenenfalls sind die jeweiligen Würfe als Analyseeinheit anzunehmen. Statistische Analysen des Körpergewichts der Jungtiere sollten auf den Daten einzelner Jungtiere unter Berücksichtigung der Wurfgröße beruhen. In Anbetracht des geringen Umfangs der Gruppe kann ggf. auch die Einbeziehung historischer Kontrolldaten (z. B. für die Wurfgröße) bei der Auswertung der Studie hilfreich sein.

Auswertung der Ergebnisse

52. Die Befunde dieser Toxizitätsstudie sind im Hinblick auf die beobachteten Wirkungen sowie auf Nekropsie- und Mikroskopiebefunde zu bewerten. Die Bewertung beinhaltet den vorhandenen beziehungsweise nicht vorhandenen Zusammenhang zwischen der Dosierung der Prüfchemikalie und vorhandenen Anomalien sowie deren Häufigkeit und Schwere, einschließlich makroskopischer Läsionen, identifizierter Zielorgane, Unfruchtbarkeit, klinischer Anomalien, beeinträchtigter Reproduktions- und Wurfleistungen, Körpergewichtsveränderungen, Auswirkungen auf die Mortalität und etwaiger sonstiger toxischer Auswirkungen.
53. Wegen der kurzen Dauer der Behandlung der männlichen Tiere sollte bei der Bewertung der reproduktionstoxischen Auswirkungen die Histopathologie der Hoden und der Nebenhoden zusammen mit den Fertilitätsdaten berücksichtigt werden. Die Einbeziehung verfügbarer historischer Kontrolldaten zur Reproduktions-/Entwicklungstoxizität (z. B. für Wurfgröße, AGD, Brustwarzenretention und Serumspiegel (T4)) kann bei der Auswertung der Studie ebenfalls hilfreich sein.
54. Für die Qualitätskontrolle wird vorgeschlagen, historische Kontrolldaten zu sammeln und Variationskoeffizienten für numerische Daten zu berechnen, insbesondere für die Parameter, die mit dem Nachweis der Störung des endokrinen Systems zusammenhängen. Diese Daten können für Vergleichszwecke verwendet werden, wenn tatsächliche Studien bewertet werden.

Prüfbericht

55. Der Prüfbericht sollte folgende Angaben enthalten:

Prüfchemikalie:

- Herkunft, Chargennummer, ggf. begrenztes Verwendungsdatum;
- Stabilität der Prüfchemikalie, falls bekannt.

Einkomponentiger Stoff:

- physikalisches Erscheinungsbild, Wasserlöslichkeit und weitere relevante physikalisch-chemische Eigenschaften;
- chemische Bezeichnung, wie z. B. IUPAC- oder CAS-Bezeichnung, CAS-Nummer, SMILES- oder InChI-Code, Strukturformel, Reinheit, chemische Zusammensetzung von Verunreinigungen, soweit zutreffend und praktisch durchführbar, usw.

Mehrkomponentiger Stoff, UVCB-Stoffe und Gemische:

- so weit wie möglich charakterisiert durch die chemische Zusammensetzung (siehe oben), das quantitative Vorkommen und die relevanten physikalisch-chemischen Eigenschaften der einzelnen Komponenten.

Vehikel (wenn verwendet):

- Begründung der Auswahl des Vehikels, falls kein Wasser verwendet wurde;

Versuchstiere:

- Tierart/Stamm;
- Anzahl, Alter und Geschlecht der Tiere;
- Herkunft der Tiere, Haltungsbedingungen, Futter usw.;
- Gewicht der einzelnen Tiere bei Versuchsbeginn;
- Begründung für die Wahl einer anderen Art als der Ratte.

Prüfbedingungen:

- Begründung der gewählten Dosisstufen;
- Angaben zur Zubereitungsform der Prüfchemikalie/des Futters, der erreichten Konzentrationen, Stabilität und Homogenität der Zubereitung,
- Angaben zur Verabreichung der Prüfchemikalie;
- gegebenenfalls Angaben zur Umrechnung der Konzentration der Prüfchemikalie im Futter/Wasser (ppm) in die entsprechende Dosis (mg/kg Körpergewicht/Tag),

- Angaben über Futter- und Wasserqualität;
- genaue Beschreibung des Verfahrens für die Zufallsauswahl von Jungtieren zwecks Tötung (wenn Jungtiere getötet werden).

Ergebnisse:

- Körpergewicht/Änderungen des Körpergewichts,
- Angaben zur Futter- und Wasseraufnahme (wenn verfügbar);
- Daten über toxische Reaktionen nach Geschlecht und Dosierung, einschließlich Fruchtbarkeit, Trächtigkeit und sonstige Anzeichen von Toxizität;
- Graviditätslänge;
- toxische oder sonstige Wirkungen auf Reproduktion, Nachkommen, postnatales Wachstum usw.;
- Art, Schweregrad und Dauer der klinischen Beobachtungen (mit Angaben zur Reversibilität);
- Zahl adulter weiblicher Tiere mit normalem oder abnormalem Östruszyklus sowie Zyklusdauer;
- Anzahl der Lebendgeburten und der Postimplantationsverluste;
- Angaben zum Körpergewicht der Jungtiere;
- AGD aller Jungtiere (und Körpergewicht am Tag der AGD-Messung);
- Brustwarzenretention bei männlichen Jungtieren;
- Schilddrüsenhormonspiegel, Jungtiere an Tag 13 und adulte männliche Tiere (sowie Muttertiere und Jungtiere an Tag 4, wenn gemessen)
- Anzahl der Jungtiere mit sichtbaren erheblichen Anomalien, allgemeine Bewertung externer Genitalien, Anzahl der Kümmerlinge;
- Zeitpunkt des Todes im Verlauf der Studie oder Angabe, ob Tiere bis zum Schluss überlebt haben;
- Anzahl der Implantate, Wurfgröße und Wurfgewichte zum Zeitpunkt der Aufzeichnung;
- Körpergewicht bei Tötung sowie Organgewichtsdaten für die Elterntiere;
- Sektionsbefunde,
- ausführliche Beschreibung aller histopathologischen Befunde;

- Absorptionsdaten, soweit vorhanden;
- statistische Auswertung der Ergebnisse, wenn möglich.

Erörterung der Ergebnisse.

Schlussfolgerungen

Auswertung der Ergebnisse

56. Mit der Studie wird die Reproduktions-/Entwicklungstoxizität bei wiederholter Verabreichung (Nummern 5 und 6) bewertet. Die Studie könnte Aufschluss über die Notwendigkeit der Durchführung weiterer Untersuchungen geben und zu Empfehlungen für die Gestaltung von Folgestudien führen. Als Hilfe bei der Auswertung der reproduktions- und entwicklungstoxischen Ergebnisse ist das OECD Guidance Document Nr. 43 zu Rate zu ziehen (12). OECD Guidance Document Nr. 106 über die histologische Auswertung von Prüfungen zur Feststellung endokriner und reproduktionstoxischer Wirkungen bei Nagern (11) enthält Informationen zur Vorbereitung und Auswertung von (endokrinen) Organen und von Vaginalabstrichen, die für diese TG hilfreich sein könnten.

LITERATUR

- (1) OECD (1990). Room Document No 1 for the 14th Joint Meeting of the Chemicals Group and Management Committee. Auf Anfrage erhältlich bei der Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung, Paris.
- (2) OECD (1992). Chairman's Report of the ad hoc Expert Meeting on Reproductive Toxicity Screening Methods, Tokio, 27.-29. Oktober 1992. Auf Anfrage erhältlich bei der Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung, Paris.
- (3) OECD (1998). Report of the First Meeting of the OECD Endocrine Disrupter Testing and Assessment (EDTA) Task Force, 10. und 11. März 1998. Auf Anfrage erhältlich bei der Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung, Paris.
- (4) OECD (2015). Feasibility Study for Minor Enhancements of TG 421/422 with ED Relevant Endpoints. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 217), Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung, Paris.
- (5) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (No 19), Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung, Paris.
- (6) OECD (2011). Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 150), Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung, Paris.
- (7) Goldman, J.M., Murr, A.S., Buckalew, A.R., Ferrell, J.M. und Cooper, R.L. (2007). The Rodent Estrous Cycle: Characterization of Vaginal Cytology and its Utility in Toxicological Studies, Birth Defects Research, Part B, 80 (2), S. 84-97.
- (8) Sadleir, R.M.F.S (1979). Cycles and Seasons, in Auston, C.R. und Short, R.V. (Hrsg.), Reproduction in Mammals: I. Germ Cells and Fertilization, Cambridge, New York.
- (9) Gallavan, R.H. Jr, Holson, J.F., Stump, D.G., Knapp, J.F. und Reynolds, V.L. (1999). Interpreting the Toxicologic Significance of Alterations in Anogenital Distance: Potential for Confounding Effects of Progeny Body Weights, Reproductive Toxicology, 13: 383-390.

-
- (10) OECD (2013). Guidance Document in Support of the Test Guideline on the Extended One Generation Reproductive Toxicity Study. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 151), Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung, Paris.
 - (11) OECD (2009). Guidance Document for Histologic Evaluation of Endocrine and Reproductive Tests in Rodents. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No106.), Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung, Paris.
 - (12) OECD (2008). Guidance Document on Mammalian Reproductive Toxicity Testing and Assessment. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 43), Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung, Paris.

Anlage 1

BEGRIFFSBESTIMMUNGEN (SIEHE AUCH OECD GD 150 (6))

Androgene Wirkung: Die Fähigkeit einer Chemikalie, in einem Säugetierorganismus wie ein natürliches androgenes Hormon zu wirken (z. B. Testosteron).

Antiandrogene Wirkung: Die Fähigkeit einer Chemikalie, die Wirkung eines natürlichen androgenen Hormons (z. B. Testosteron) in einem Säugetierorganismus zu unterdrücken.

Antiöstrogene Wirkung: Die Fähigkeit einer Chemikalie, die Wirkung eines natürlichen östrogenen Hormons (z. B. Östradiol 17 β) in einem Säugetierorganismus zu unterdrücken.

Antithyroide Wirkung: Die Fähigkeit einer Chemikalie, die Wirkung eines natürlichen Schilddrüsenhormons (z. B. T₃) in einem Säugetierorganismus zu unterdrücken.

Chemikalie: Ein Stoff oder Gemisch.

Dosierung: Ein allgemeiner Begriff, der die Dosis, ihre Häufigkeit und die Dauer der Verabreichung umfasst.

Dosis: Die Menge der verabreichten Prüfchemikalie. Die Dosis wird ausgedrückt als Masse der Prüfchemikalie je Einheit Körpergewicht des Versuchstiers pro Tag (z. B. mg/kg Körpergewicht/Tag) oder als konstante Konzentration im Futter.

Entwicklungstoxizität: Das Auftreten einer reproduktionstoxischen Wirkung mit prä-, peri- und postnatalen, strukturellen oder funktionellen Störungen bei der Nachkommenschaft.

Fertilitätsstörungen: Störungen der männlichen oder weiblichen Reproduktionsfunktionen oder -fähigkeit.

Maternale Toxizität: Schädliche Wirkungen auf trächtige weibliche Tiere, die entweder spezifisch (direkte Wirkungen) oder nicht spezifisch (indirekte Wirkungen) auftreten.

NOAEL: Abkürzung für No Observed Adverse Effect Level. Dies ist die höchste Dosis, bei der keine schädigenden behandlungsbedingten Wirkungen festgestellt werden.

Offensichtliche Toxizität: Ein allgemeiner Begriff zur Beschreibung deutlicher Toxizitätszeichen nach Verabreichung einer Prüfchemikalie. Diese Zeichen sollten für eine Bewertung der Gefährdung ausreichen und so schwerwiegend sein, dass bei einer Steigerung der verabreichten Dosis die Entwicklung schwerer Toxizitätszeichen und der wahrscheinliche Tod zu erwarten wären.

Östrogene Wirkung: Die Fähigkeit einer Chemikalie, in einem Säugetierorganismus wie ein natürliches östrogenes Hormon zu wirken (z. B. Östradiol 17 β).

Prüfchemikalie: Ein beliebiger Stoff oder eine beliebige Mischung, der/die nach dieser Methode geprüft wird.

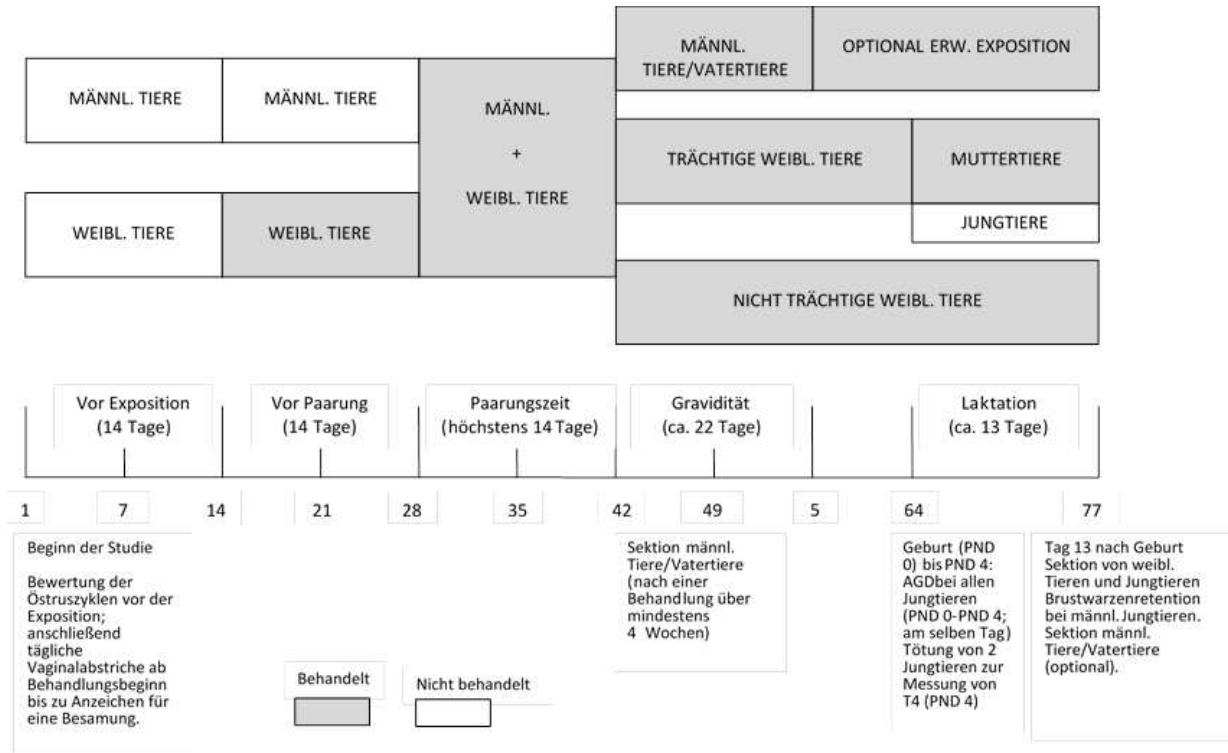
Reproduktionstoxizität: Schädliche Wirkungen auf die Nachkommenschaft und/oder Beeinträchtigung der männlichen und weiblichen Reproduktionsfunktionen oder -kapazität.

Thyroide Wirkung: Fähigkeit einer Chemikalie, in einem Säugetierorganismus wie ein natürliches Schilddrüsenhormon (z. B. T₃) zu wirken.

Validierung: Ein wissenschaftlicher Prozess zur Beschreibung der operationellen Anforderungen und Grenzen einer Prüfmethode und zum Nachweis ihrer Zuverlässigkeit und Eignung für einen bestimmten Zweck.

Anlage 2

DIAGRAMM ZUM VERSUCHSPLAN MIT ANGABEN ZUR MAXIMALEN DAUER DER STUDIE AUSGEHEND VON DER VOLLSTÄNDIGEN 14-TÄGIGEN PAARUNGSZEIT



Anlage 3

TABELLARISCHE ZUSAMMENFASSUNG DER AUSWIRKUNGEN AUF DIE REPRODUKTION/ENTWICKLUNG

BEOBACHTUNGEN	WERTE				
	0 (Kontrolle)
Dosierung (Einheiten)					
Ausgangspaarungen (N)					
Östruszyklus (mindestens mittlere Dauer und Häufigkeit unregelmäßiger Zyklen)					
Weibliche Tiere mit Anzeichen für eine Besamung (N)					
Trächtige weibliche Tiere (N)					
Empfängnistage 1-5 (N)					
Empfängnistage 6- (N).. ⁽¹⁾ (N)					
Gravidität ≤ 21 Tage (N)					
Gravidität = 22 Tage (N)					
Gravidität ≥ 23 Tage (N)					
Muttertiere mit lebenden Jungtieren (N)					
Muttertiere mit lebenden Jungtieren an Tag 4 pp (N)					
Implantate/Muttertier (Mittelwert)					
Lebende Jungtiere/Muttertiere bei Geburt (Mittelwert)					
Lebende Jungtiere/Muttertiere an Tag 4 (Mittelwert)					
Geschlechterverhältnis (m/w) bei Geburt (Mittelwert)					
Geschlechterverhältnis (m/w) an Tag 4 (Mittelwert)					
Wurfgewicht bei Geburt (Mittelwert)					
Wurfgewicht an Tag 4 (Mittelwert)					
Gewicht der Jungtiere bei Geburt (Mittelwert)					
Gewicht der Jungtiere zum Zeitpunkt der AGD-Messung (Mittelwert männliche Jungtiere, Mittelwert weibliche Jungtiere)					

BEOBACHTUNGEN	WERTE				
Dosierung (Einheiten)	0 (Kontrolle)
AGD der Jungtiere am selben Tag nach der Geburt, Geburt – Tag 4 (Mittelwert männliche Jungtiere, Mittelwert weibliche Jungtiere, PND vermerken)					
Gewicht der Jungtiere an Tag 4 (Mittelwert)					
Brustwarzenretention bei männlichen Jungtieren an Tag 13 (Mittelwert)					
Gewicht der Jungtiere an Tag 13 (Mittelwert)					
JUNGTIERE MIT ANOMALIEN					
Muttertiere mit 0					
Muttertiere mit 1					
Muttertiere mit ≥ 2					
VERLUST AN NACHKOMMEN					
Pränatal / nach der Implantation (Implantationen abzüglich Lebendgeburten)					
Weibliche Tiere mit 0					
Weibliche Tiere mit 1					
Weibliche Tiere mit 2					
Weibliche Tiere mit ≥ 3					
Postnatal (Lebendgeburten abzüglich lebender Tiere an Tag 13 nach der Geburt)					
Weibliche Tiere mit 0					
Weibliche Tiere mit 1					
Weibliche Tiere mit 2					
Weibliche Tiere mit ≥ 3					
(!) letzter Tag der Paarungszeit					