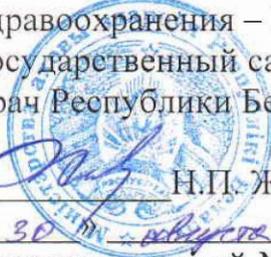


МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

«УТВЕРЖДАЮ»

Заместитель Министра
здравоохранения – Главный
государственный санитарный
врач Республики Беларусь


Н.П. Жукова
« 30 » августа 2016 г.
Регистрационный № 046-1215

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОСТРОЙ ТОКСИЧНОСТИ ХИМИЧЕСКОЙ
ПРОДУКЦИИ (ХИМИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ И ИХ СМЕСЕЙ)
ПРИ ВНУТРИЖЕЛУДОЧНОМ ПОСТУПЛЕНИИ

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК: Республиканское унитарное
предприятие «Научно-практический центр гигиены»

АВТОРЫ: к.м.н. Юркевич Е.С., к.м.н. Ильюкова И.И., Борис О.А.,
Грынчак В.А.

Минск, 2015

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ
Заместитель министра –
главный государственный
санитарный врач
Республики Беларусь

_____ Н.П. Жукова
30.08.2016
Регистрационный № 046-1215

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОСТРОЙ ТОКСИЧНОСТИ ХИМИЧЕСКОЙ
ПРОДУКЦИИ (ХИМИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ И ИХ СМЕСЕЙ) ПРИ
ВНУТРИЖЕЛУДОЧНОМ ПОСТУПЛЕНИИ**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК: РУП «Научно-практический центр гигиены»

АВТОРЫ: канд. мед. наук Е.С. Юркевич, канд. мед. наук И.И. Ильюкова,
О.А. Борис, В.А. Грынчак

Минск 2015

ГЛАВА 1 ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

1. В настоящей инструкции по применению (далее — инструкция) изложены гармонизированные с международными требованиями (OECD TG № 420 «Acute Oral Toxicity – Fixed Dose Procedure»/ОЭСР Руководство № 420 «Острая токсичность при внутрижелудочном поступлении — метод фиксированной дозы», OECD TG № 423 «Acute Oral Toxicity — Acute Toxic Class Method»/ОЭСР Руководство № 423 «Острая токсичность при внутрижелудочном поступлении – метод классов острой токсичности», OECD TG № 425 «Acute Oral Toxicity – Up-and – Down-Procedure (UDP)»/ОЭСР Руководство 425 «Острая пероральная токсичность — методика «вверх-вниз») методы определения острой токсичности химических веществ и их смесей, применяемые в комплексе медицинских услуг, направленных на медицинскую профилактику неблагоприятного действия потенциально опасной для человека продукции: чистые химические вещества, их растворы и смеси химических веществ, в т. ч. пестициды, доклинические формы лекарственных средств медицинского и ветеринарного применения, пищевые и кормовые добавки. Инструкция не распространяется на проведение испытаний токсичности наноматериалов, готовых лекарственных средств, препаратов ветеринарного назначения, готовой парфюмерно-косметической продукции.

2. Настоящая инструкция устанавливает подходы, схемы и методы проведения исследований по изучению острой токсичности при внутрижелудочном поступлении в организм, обеспечивает получение информации об острой токсичности и классе опасности вещества при проглатывании, позволяет оценить химическое вещество в соответствии с Согласованной на глобальном уровне системой классификации и маркировки химических веществ (далее — СГС) и минимизировать риск воздействия химического фактора на здоровье человека.

3. Методы, изложенные в настоящей инструкции, предназначены для специалистов организаций здравоохранения, осуществляющих государственный санитарный надзор, иных учреждений, занимающихся реализацией мероприятий по медицинской профилактике неблагоприятного воздействия химической продукции на здоровье человека.

ГЛАВА 2 ТЕРМИНЫ И ОПРЕДЕЛЕНИЯ

В настоящей инструкции используются следующие термины и определения:

- агония — состояние умирания или невозможности выжить даже при лечении;

- доза — количество вводимого тестируемого вещества, выраженное соотношением единицы тестируемого вещества на единицу массы тела подопытного животного (мг/кг);

- замедленная смерть — состояние животного, когда гибель или агония наступает не в течение 48 ч, а в течение 14-дневного периода наблюдения;
- острая оральная токсичность — токсические эффекты, проявляющиеся в течение 24 ч после одно- или многократного перорального введения испытуемой дозы;
- очевидная токсичность — наличие характерных признаков токсичности, наблюдаемых после введения исследуемого вещества;
- предельная доза (наивысшая, максимальная) — предельная доза при испытании (2000 или 5000 мг/кг);
- предсказуемая смерть (угроза смерти) — наличие клинических симптомов, указывающих, что гибель животного может наступить ранее запланированного окончания испытания (невозможность дотянуться до воды или пищи, конвульсии, лежачее положение, боковое положение, тремор и др.);
- СГС (GHS) — Согласованная на глобальном уровне система классификации опасности и маркировки химической продукции, разработанная Организацией экономического сотрудничества и развития (ОЭСР/ОЕСД), Подкомитетом экспертов по перевозке опасных грузов Экономического и социального сотрудничества ООН и Международной организацией труда (ILO, техническая координация), и функционирующая в рамках Межорганизационной программы по безопасному обращению с химическими веществами (ИОМС);
- смесевая химическая продукция (смесь химических веществ) — продукция преднамеренного механического смешения (соединения) двух или более химических веществ, не вступающих друг с другом в химическую реакцию;
- химическое вещество — химический элемент и (или) химическое соединение, находящиеся в естественном состоянии или полученные в результате производственного процесса, включая любую добавку, необходимую для обеспечения стабильности, и/или примеси, наличие которых обусловлено ходом производственного процесса, но исключая растворитель, который можно отделить без нарушения стабильности химического вещества или его состава;
- химическая продукция — химическое вещество или смесь химических веществ, предназначенные для дальнейшего использования в хозяйственно-бытовых и иных целях;
- DL_{50}/LD_{50} (средняя смертельная доза) — статистически установленная доза вещества, которая при однократном внутрижелудочном введении вызывает гибель 50% взятых в эксперимент животных, и выражается отношением единицы массы испытываемого вещества к единице массы подопытного животного (мг/кг).

ГЛАВА 3 ОБЩИЕ УСЛОВИЯ ПРОВЕДЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЙ

1. До испытаний необходимо провести анализ существующей информации по исследуемому веществу, включающий сведения о составе и химическом строении, физико-химических свойствах, результатах токсикологических испытаний *in vivo* и *in vitro*, токсикологические данные по структурно родственным веществам и предполагаемые пути использования вещества.

Полученная информация подтверждает необходимость проведения исследований и способствует выбору адекватной начальной дозы.

2. Исследуемые вещества не должны применяться в дозах, являющихся причиной возникновения выраженных болевых ощущений и недомоганий за счет разъедающего или сильно раздражающего действия. Агонизирующих и испытывающих непереносимую боль животных умерщвляют гуманным способом, при подведении итогов исследования их учитывают как погибших во время испытаний.

3. *Животные. Выбор вида.* Для исследований используют грызунов, предпочтительно не беременных и не рожавших самок белых крыс, которые являются наиболее чувствительными к воздействию токсикантов; использование других видов грызунов и/или самцов белых крыс должно быть подтверждено токсикологическими и токсикокинетическими данными для структурно родственных веществ.

4. В эксперименте используют здоровых молодых половозрелых особей от 8 до 12 недель, массой 160–200 г, составляющей $\pm 20\%$ от средней массы ранее исследуемых животных.

5. *Условия содержания и кормления.* Температурный режим в лабораторной комнате — $22 \pm 3^\circ\text{C}$, относительная влажность — 30–70% (оптимально 50–60%), за исключением времени уборки помещения, освещение — искусственное (последовательно 12 ч — день, 12 ч — ночь). При кормлении используется обычная лабораторная диета с неограниченным количеством питьевой воды.

6. *Подготовка животных.* Животных разделяют на группы методом случайной выборки, помечают и содержат в клетках не менее 5 дней до начала введения тестируемого вещества с целью их привыкания к лабораторным условиям.

Условия обращения, проведения экспериментов и выведения лабораторных животных из опыта должны соответствовать гуманистическим принципам надлежащей лабораторной практики, изложенным в технических нормативных правовых актах Республики Беларусь.

7. При проведении исследований используют следующее оборудование, материалы, реактивы:

- весы лабораторные общего назначения 2-го класса точности (по ГОСТ 24104) с пределом взвешивания 200 г; весы аналитические электронные с пределом допускаемой погрешности $\pm 0,0001$ г; стерилизатор сухожаровой с автоматической регулировкой температуры (100–220) $^\circ\text{C}$ (по ГОСТ 24437); анализатор потенциометрический с погрешностью измерений $\text{pH} \pm 0,1$ (pH-метр) с набором электродов (по ГОСТ 19881); холодильник бытовой (по ГОСТ 16317); морозильная камера; баня водяная с терморегулятором, позволяющая поддерживать температуру $(55 \pm 0,5)^\circ\text{C}$ (по ГОСТ 12026) или инактиватор; стаканы химические (50–100 см³), цилиндры (по ГОСТ 1770) и колбы (по ГОСТ 25336) разной вместимости (10, 100, 1000 см³); штативы для пробирок; шпатели стеклянные; стандарт-титры для приготовления образцовых буферных растворов для pH-метрии (по ГОСТ 8.135 ГСИ); бумага индикаторная универсальная (ТУ 6-

091181-76); бумага фильтровальная лабораторная (по ГОСТ 12026); вата медицинская гигроскопичная (по ГОСТ 5556); марля медицинская (по ГОСТ 9412); ножницы (по ГОСТ 21241);

-вода дистиллированная и бидистиллированная (по ГОСТ 6709); спирт этиловый ректификат (по ГОСТ 5962); диметилсульфоксид (х.ч.); раствор физиологический (изотонический, стерильный); масло растительное и др.

Возможно применение оборудования и материалов с аналогичными по назначению техническими и метрологическими характеристиками, а также других препаратов аналогичного назначения для проведения исследований; при их применении следует руководствоваться рекомендациями изготовителя.

8. Исследования проводят в помещениях, оснащенных приточно-вытяжной вентиляцией и водопроводной водой.

Приготовление растворов, подготовку проб и проведение исследований осуществляют при следующих условиях: температура окружающего воздуха — $20 \pm 5^\circ\text{C}$; относительная влажность воздуха не более 80% при $T = 25^\circ\text{C}$; атмосферное давление 84,0–106,7 кПа (630–800 мм рт. ст.).

9. До введения дозы животных ограничивают в пище (нельзя кормить с вечера перед введением дозы, но поить; мышей не кормить 3–4 ч перед введением дозы, но поить), взвешивают, затем вводят испытываемое вещество. После введения препарата крыс нельзя кормить 3–4 ч, мышей — 1–2 ч. При введении дозы порционно в зависимости от периода введения животным может потребоваться корм или питье.

Испытываемый препарат вводят разовой дозой через зонд: желудочную трубку или интубационную канюлю. Если введение разовой дозы невозможно, доза может быть введена частями в период, не превышающий 24 ч.

10. Наблюдение экспериментальных животных после введения дозы проводят индивидуально, не менее одного раза в первые 30 мин, регулярно — в течение первых 24 ч, особенно в первые 4 ч, и затем ежедневно — в течение 14 дней, кроме случаев, когда животных необходимо вывести из исследования по медицинским показаниям или они найдены мертвыми. Длительность наблюдения не зависит от токсических реакций, начала и продолжительности периода восстановления. Обязательным является фиксация времени появления и исчезновения симптомов токсичности, особенно тенденции к замедленному возникновению токсических симптомов, систематическая регистрация и ведение отдельных отчетов по каждому животному. При исчезновении у животных признаков токсичности проводят дополнительное наблюдение.

В ходе наблюдения за животными фиксируют изменения кожи, шерсти, зрительного анализатора, слизистых оболочек, респираторной, кровеносной, вегетативной и центральной нервной систем, нарушение соматомоторики и поведения; фокусируют внимание на явлениях тремора, конвульсий, слюноотделения, диареи, летаргии, сна и комы. Время смерти умерщвленных или найденных мертвыми животных должно быть зафиксировано максимально точно.

11. Животных взвешивают до введения тестируемого вещества, после испытания массу тела контролируют не реже одного раза в неделю и фиксируют

все изменения. Выживших по окончании испытания животных взвешивают и умерщвляют гуманным способом.

12. Патологоанатомическим исследованиям (общей аутопсии) подвергают всех подопытных животных, включая погибших во время испытаний и исключенных из опыта по медицинским показаниям. Патологические изменения и результаты микроскопического анализа органов животных, проживших 24 ч и более после первого приема тестируемого вещества, для каждого животного регистрируют индивидуально.

13. Эксперименты с лабораторными животными и изучаемыми препаратами должны производиться работниками в соответствии с требованиями охраны труда, в спецодежде, с использованием индивидуальных средств защиты кожи, органов зрения и дыхания.

ГЛАВА 4

ИЗУЧЕНИЕ ОСТРОЙ ТОКСИЧНОСТИ ПРИ ВНУТРИЖЕЛУДОЧНОМ ВВЕДЕНИИ МЕТОДОМ ФИКСИРОВАННОЙ ДОЗЫ

1. Метод основан на введении животным серий фиксированных доз (ОЕСД TG № 420); позволяет избежать гибели животных как конечной точки эксперимента и основывается на наблюдении выраженных признаков токсичности в одной из серий введенных фиксированных доз.

2. Принцип метода заключается в использовании в основной части исследования только средних токсичных доз, введение которых, предположительно, не может привести к летальному исходу.

3. Группе животных одного пола, используя пошаговую процедуру, вводят фиксированные дозы 5; 50; 300 и 2000 мг/кг (в особых случаях — дополнительную фиксированную дозу 5000 мг/кг). Начальная доза должна частично воспроизводить признаки токсичности, не причиняя сильных токсических эффектов или летального исхода. Основываясь на наличии/отсутствии признаков токсичности или летального исхода группам животных вводят более высокие/низкие дозы вещества до тех пор, пока выбранная доза не приведет к выраженной токсичности, и/или не будет зафиксирован один случай смерти, или не будет наблюдаться отсутствие реакции при введении наибольшей дозы, или пока не наступит смерть при минимальной дозе.

4. Изучаемые продукты в жидком состоянии используют для тестирования без разбавления, максимальный разовый объем вводимой жидкости зависит от веса животных и не должен превышать 1 мл/100 г массы тела/2 мл/100 г массы тела (для водных растворов). Предпочтительно использовать водные растворы/суспензии/эмульсии химических продуктов, для нерастворимых в воде веществ — масляные основы (растительные масла) или другие разбавители (растворители) с известными токсикологическими характеристиками.

5. *Предварительное исследование* проводят с целью подбора начальной дозы для основного исследования, препарат вводят одному животному (приложение 1–2). Начальная доза составляет: 5; 50; 300 или 2000 мг/кг; при

отсутствии информации о токсичности структурно родственных веществ начальная доза составляет 300 мг/кг; интервалы между введениями — 24 ч; наблюдение — не менее 14 дней. Введение доз 2000–5000 мг/кг (класс 5 СГС) нецелесообразно, вводят в случае предполагаемого риска здоровью человека. В исключительных случаях, и только когда это оправдано определенными условиями, может быть рассмотрено исследование дополнительно установленного уровня дозы в 5000 мг/кг.

6. В случае гибели одного и более животных на дозе 5 мг/кг исследования не проводят и присваивают веществу класс 1 согласно классификации СГС (приложение 2). Для дальнейшей классификации вещества проводят дополнительное исследование: второму животному вводят дозу 5 мг/кг, и если оно гибнет, то 1 класс СГС подтверждается, и исследование завершают, а если второе животное выживает, то проводят дополнительное исследование на трех животных с использованием дозы 5 мг/кг. В данном случае существует высокий риск смертности, поэтому дозирование проводят последовательным способом ради бережного отношения к животным; временной интервал между дозами для каждого животного должен быть достаточным, чтобы установить, что предыдущее животное выживет. При наступлении гибели второго животного дальнейшее тестирование не проводят. Факт гибели второго животного (независимо от количества протестированных к концу эксперимента животных) приравнивается к результату с двумя и более смертельными случаями. При классификации веществ по СГС факт гибели двух или более животных при установленной дозе 5 мг/кг соответствует 1 классу опасности, не более одного — 2 классу.

7. *Основное исследование* заключается в выполнении одного из трех действий (приложение 3–4):

- прекратить испытание и определить соответствующий класс опасности;
- провести испытание с более высоким уровнем дозы;
- провести испытание с меньшим фиксированным уровнем дозы.

8. Уровень дозы, который вызвал гибель животного в предварительном исследовании, повторно в основном исследовании не рассматривают. Как правило, наиболее вероятным результатом испытания с начальным уровнем дозы является возможность классификации вещества и отсутствие необходимости проводить дальнейшие исследования.

9. Для проведения эксперимента с каждым уровнем доз в общей сложности необходимо использовать по пять животных одного пола, из которых одно отбирают из предварительного исследования с выбранным уровнем дозы и четыре — дополнительно. Исключение составляют нестандартные случаи, когда рассматриваемый уровень дозы в основном испытании не был включен в предварительное исследование. Интервал между приемом доз каждого уровня определяется началом, продолжительностью и тяжестью токсических проявлений. Началом испытания очередной дозы является факт выживания одного животного из получивших предыдущую дозу. При наблюдении картины замедленной токсичности делают перерыв в три или четыре дня между введением

доз каждого уровня. Адекватным считают временной интервал в случае неубедительного ответа (реакции).

10. *Испытание предельной дозы.* При наличии относительно родственных по физико-химическим свойствам веществ, смесей или продуктов о том, что вещество не является токсичным или обладает токсичностью только в дозах, превышающих предельные уровни, проводят пороговое испытание предельной дозы.

При отсутствии или недостаточности информации о токсичности препарата, или когда исследуемый препарат, предположительно, является токсичным, проводят основное исследование. Изучение предельной дозы состоит из предварительного испытания препарата в дозе 2000 мг/кг (в особых случаях 5000 мг/кг) на одном животном и последующего тестирования этой дозы на других четырех животных.

11. *Испытание доз выше 2000 мг/кг.* В исключительных случаях, подтвержденных необходимой информацией, проводят исследование дополнительного уровня дозы в 5000 мг/кг.

12. *Предварительное исследование.* Правила проведения последовательной процедуры с использованием начальной дозы 5000 мг/кг приведены на схеме (приложения 1, 2).

В случае гибели животного (результат А) с начальной дозой в 5000 мг/кг проводят исследование на втором животном с дозой 2000 мг/кг; результаты В и С (явная токсичность или отсутствие токсичности) позволяют выбрать для основной части исследования дозу в 5000 мг/кг.

Если при использовании начальной дозы в 2000 мг/кг выявлены признаки явной токсичности или отсутствие токсичности (результаты В и С), то исследуют дозу 5000 мг/кг с целью умерщвления животных (результат А) и установления в качестве начальной дозы для основной части исследования 2000 мг/кг.

13. *Основное исследование.* Процедура отнесения вещества к классу 5 по СГС (приложения 3, 4) включает испытания уровня доз 5000 мг/кг и в случае результата А (≥ 2 гибелей) — исследования второй группы с дозой 2000 мг/кг; при получении результатов В (явная токсичность или ≥ 1 гибели) или С (отсутствие токсичности) — классификации вещества по системе СГС невозможна.

Если в качестве начальной используется доза, отличная от 5000 мг/кг, то при получении результата В (явная токсичность) испытания продолжают с дозой 5000 мг/кг как в случае результата В при 2000 мг/кг; последовательный результат А (гибель) при дозе 5000 мг/кг позволяет отнести вещество к классу 5 по СГС, а результаты В и С не дают возможности классифицировать вещество.

14. *Критерии для классификации* исследуемых веществ с ожидаемыми величинами DL_{50}/LD_{50} , превышающими 2000 мг/кг, без необходимости проведения испытания, изложены в приложении 9.

Критерии для определения класса опасности 5 позволяют идентифицировать исследуемые вещества, принадлежащие к относительно низкому классу острой токсической опасности, но при определенных условиях представляющие опасность для более уязвимых популяций. Для этих веществ уровень DL_{50}/LD_{50} предположительно находится в диапазоне концентраций 2000–

5000 мг/кг при пероральном или накожном воздействии и эквивалентных концентраций для других путей воздействия.

При получении диапазона доз $2000 \text{ мг/кг} < DL_{50}/LD_{50} < 5000 \text{ мг/кг}$ исследуемые вещества могут быть отнесены к 5 классу опасности по СГС (приложение 9).

ГЛАВА 5

ИЗУЧЕНИЕ ОСТРОЙ ТОКСИЧНОСТИ ПРИ ВНУТРИЖЕЛУДОЧНОМ ВВЕДЕНИИ МЕТОДОМ ОПРЕДЕЛЕНИЯ КЛАССОВ ОСТРОЙ ТОКСИЧНОСТИ

1. Метод определения класса острой токсичности (OECD TG № 423) основан на биометрических вычислениях с фиксированными дозами, адекватно разделенными для возможности оценки опасности вещества. Метод является поэтапным, проводится с использованием трех животных одного пола на каждом этапе. Количество этапов для определения класса острой токсичности вещества, как правило, равно 2–4 и зависит от смертности и/или клинической картины отравления животных. Метод требует небольшого числа животных и позволяет давать оценку веществам, сопоставимую с другими методами определения острой токсичности.

2. Метод не дает возможности точного расчета DL_{50}/LD_{50} , но позволяет определить диапазон воздействия, в котором ожидается летальный исход, т. к. гибель части опытных животных является конечной точкой эксперимента. Определение величины DL_{50}/LD_{50} возможно только в случае, когда минимум две дозы дают летальный исход выше 0% и ниже 100%. Использование определенных доз независимо от тестируемого вещества и классификации, связанной только с количеством животных, находящихся в разных состояниях, улучшает согласованность и воспроизводимость результатов, полученных в разных лабораториях.

3. *Принцип метода.* Группе животных из трех особей одного пола (предпочтительно самкам) вводят внутрижелудочно тестируемое вещество в одной из выбранных доз. Отсутствие или наличие гибели животных на одном этапе определяет последующие действия: вещество не нуждается в дальнейшем тестировании; необходимо тестирование этой же дозы еще на трех животных; следует протестировать большую или меньшую дозу еще на трех животных. Схема поэтапного тестирования представлена в приложениях 5–8. Метод дает возможность отнести тестируемое вещество к одному из классов по острой токсичности с фиксированными пределами DL_{50}/LD_{50} .

4. *Количество животных и уровень доз.* Для каждого этапа используют по три животных. Целесообразно выбрать такую начальную дозу (из четырех фиксированных уровней: 5; 50; 300 и 2000 мг/кг), которая приведет к гибели подопытных животных (приложения 5–8).

5. При наличии предварительной информации о тестируемом веществе, свидетельствующей о маловероятном смертельном эффекте при максимальном уровне дозирования (2000 мг/кг), проводят испытание с предельной дозой

5000 мг/кг. В случае отсутствия данных о токсичных свойствах тестируемого вещества в качестве начальной используют дозу 300 мг/кг.

6. Интервалы между введением тестируемых доз разным группам животных зависят от начала, длительности и выраженности признаков интоксикации. Началом введения вещества очередной группе животных является факт очевидной выживаемости предыдущей группы.

7. *Испытание предельной дозы.* Исследование доз 2000–5000 мг/кг (класс 5 СГС), основанное на принципах гуманного отношения к животным, нецелесообразно, и проводится в случае значимости полученных результатов для здоровья человека, животных или безопасности окружающей среды. Дополнительное изучение дозы в 5000 мг/кг должно быть обосновано и проводится в качестве исключения.

8. Испытанию предельной дозы предшествует наличие информации о вероятной токсичности вещества в дозах, превышающих предельные уровни, полученной из данных об исследовании родственных по физико-химическим свойствам веществ, смесей или продуктов, с учетом процентного содержания компонентов. При отсутствии или недостаточности информация о токсичности препарата или предполагаемой вероятной токсичности проводят основное исследование.

9. Испытание предельной дозы 2000 мг/кг проводят на 6 животных (по три животных на каждый этап). В качестве исключения может быть проведено испытание предельной дозы 5000 мг/кг с использованием трех животных (приложение 8). В случае гибели животных при необходимости проводят дальнейшее тестирование с более низкой дозой.

ГЛАВА 6 ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОСТРОЙ ТОКСИЧНОСТИ ПРИ ВНУТРИЖЕЛУДОЧНОМ ВВЕДЕНИИ МЕТОДОМ «ВВЕРХ-ВНИЗ»

1. Метод (OECD TG № 425) позволяет установить величину LD_{50} с доверительным интервалом, определить признаки и класс токсичности для классификации вещества в соответствии с СГС.

В основе метода использованы положения ОЭСР: наличие критических величин LD_{50} для классификации химических веществ; достаточность использования животных одного пола (обычно самок) для исследований; оценка доверительных интервалов для признания единичных исследований обоснованными.

При отсутствии предварительной информации о величине LD_{50} и наклоне кривой зависимости доза-ответ исследования начинают с дозы 175 мг/кг, которая, как правило, ниже предполагаемой величины LD_{50} , и увеличивают каждую последующую дозу на коэффициент 3,2 (половину логарифмической единицы), что позволяет более эффективно использовать животных и повышает точность прогнозирования величины LD_{50} .

При изучении летальности химических веществ с большой изменчивостью (пологие наклоны кривой зависимости доза-ответ) могут быть отклонения,

приводящие к статистической погрешности при оценке летальности LD_{50} , характерные для других методов определения острой токсичности. Во избежание сходных погрешностей основное исследование включает «правило остановки», соответствующее качеству оценки, а не фиксированному количеству наблюдений за процессом испытаний.

2. *Основное исследование* состоит из упорядоченной дозовой прогрессии, которую вводят животным однократно с минимальными 48-часовыми интервалами. Первое животное получает дозу на ступень ниже уровня наиболее надежной прогнозной величины LD_{50} . Если животное выживает, доза для следующей особи увеличивается в 3,2 раза от начальной дозы; если гибнет — дозу для следующей особи снижают в 3,2 раза. Время наблюдения за животным после введения, основанное на 48-часовой схеме выживания животных, составляет 48 ч и позволяет определить интервал введения и уровень следующей дозы (приложение 10).

3. «*Правило остановки*» используется: для соблюдения схемы дозирования на минимальном количестве экспериментальных животных; для снижения эффекта неправильной начальной дозы или низкого наклона кривой зависимости доза-ответ. Дозирование прекращают при соответствии одному из критериев остановки, затем рассчитывают LD_{50} и доверительный интервал, исходя из состояния всех животных во время остановки. Для большинства случаев использование 4 животных является достаточным, и испытание завершают после первоначального реверсирования результатов (приложения 12, 13).

LD_{50} рассчитывают с использованием метода максимального правдоподобия, который следует применять к веществам, вызывающим гибель животных в течение одного или двух дней. Метод не пригоден для веществ с предполагаемым эффектом замедленной смерти (гибель через 5 дней или более после введения).

4. Для повышения статистической точности исследований химических веществ с вероятной низкой токсичностью проводят последовательное испытание предельных доз 2000 мг/кг (как исключение, 5000 мг/кг) на 5 животных максимально.

5. Первоначально одному животному вводят дозу на ступень ниже наиболее надежной прогнозной величины LD_{50} , если животное выживает, то второе получает более высокую дозу. В случае гибели или стадии агонии первого животного второе получает более низкую дозу. Коэффициент прогрессии (регрессии) дозы выбирают как антилогарифм от $1/(\text{предполагаемый наклон кривой зависимости доза-ответ})$ и используют на протяжении всего испытания (прогрессия 3,2 соответствует наклону 2).

При отсутствии информации о наклоне используют коэффициент, равный 3,2 (приложение 11). При использовании стандартного коэффициента прогрессии дозы выбирают из последовательности 1,75; 5,5; 17,5; 55; 175; 550; 2000 (или 1,75; 5,5; 17,5; 55; 175; 550; 1750; 5000 по специальному требованию). При отсутствии данных о летальности вещества дозирование начинают со 175 мг/кг, так как для большинства веществ эта доза является сублетальной. При ожидаемой высокой переносимости химического вещества (наклон кривой зависимости доза-ответ

менее 2) до начала испытания повышают коэффициент прогрессии дозы выше стандартного. Если исследуемое вещество характеризуется крутыми наклонами, выбирают коэффициенты прогрессии дозы менее стандартных (приложение 11).

Введение доз продолжают в соответствии с ответами всех животных, полученными через фиксированные интервалы времени (например, 48-часовые). Испытание останавливают, если обнаруживают соответствие хотя бы одному из следующих критериев:

а) более 3 животных, последовательно введенных в эксперимент, выживают при введении максимальной дозы;

б) происходит 5 реверсирований у любых 6 последовательно испытываемых животных;

с) как минимум 4 животных проявляют реверсирование после первого наблюдавшегося, и соответствующие отношения правдоподобия превышают критическое значение (приложение 12). Расчеты выполняют после каждого введения дозы, после четвертого животного и первого реверсирования.

При широком разнообразии прогнозных значений LD_{50} и наклонов условие «правила остановки» (с) будет выполняться при наличии от 4 до 6 животных после реверсирования. В некоторых случаях для веществ с пологими кривыми зависимости доза–ответ могут понадобиться дополнительные животные (до 15).

Если критерии остановки соблюдены, LD_{50} следует рассчитывать на основании результатов, полученных на животных при остановке испытаний.

6. Агонизирующих и умерщвленных по причинам гуманности животных учитывают так же, как и павших в ходе испытания. В случае гибели животного в конце исследования при остальных выживших с этой или более высокой дозой введение вещества прекращают и учитывают все эффекты во время периода наблюдения. В случае последующей гибели животных, получивших дозу, превышающую LD_{50} , но выживших в начале эксперимента, испытание повторяют с дозы ниже на две ступени самой низкой из ранее испытанных, вызвавших летальный эффект, и увеличивают период наблюдения.

При введении последующему животному дозы, вызвавшей гибель предыдущего, или выше прогрессию дозы не изменяют; полученную информацию о погибшем животном включают в расчеты и учитывают как гибель при более низкой дозе, чем у последующих выживших, что в результате снизит расчетную величину LD_{50} .

7. Испытания *предельной дозы* проводят при наличии информации о мало(не)токсичном (ниже регулятивных предельных доз) веществе, полученной из сведений об аналогичных исследуемых составах, смесях или продуктах с учетом идентичности и процентного содержания компонентов, токсичность которых известна. При недостаточности и/или отсутствии информации о токсичности, или известной токсичности исследуемого материала необходимо выполнить *основное испытание*.

8. *Испытание предельной дозы 2000 мг/кг*. Исследуемую дозу вводят одному животному, при его гибели для определения LD_{50} проводят основное испытание. Если животное выживает — дозу вводят еще 4 животным последовательно, чтобы в итоге было исследовано 5 особей. При гибели 3

животных испытание на предельное содержание прекращают и выполняют основное испытание. LD₅₀ считают более 2000 мг/кг, если выживают 3 или более животных (приложения 14, 15). Если животное гибнет в конце исследования, а остальные выживают, введение вещества прекращают и наблюдают за всеми животными в течение аналогичного периода времени. Поздние смерти учитывают наравне с остальными, результаты оценивают следующим образом (О = выживание, Х = гибель):

LD₅₀ — менее 2000 мг/кг, если пало 3 или более животных.

О ХО ХХ

О ОХ ХХ

О ХХ ОХ

О ХХ Х

В случае гибели 3-го животного проводят основное испытание. Исследуют 5 животных. LD₅₀ — более 2000 мг/кг при выживании 3-х или более животных.

О ОО ОО

О ОО ХО

О ОО ОХ

О ОО ХХ

О ХО ХО

О ХО ОО/Х

О ОХ ХО

О ОХ ОО/Х

О ХХ ОО

9. *Испытание предельной дозы при 5000 мг/кг* проводят в исключительных случаях при обоснованной необходимости прямой связи с охраной здоровья человека или животных, или окружающей среды.

Исследуемую дозу вводят одному животному, при его гибели проводят основное испытание для определения LD₅₀. Если животное выживает, дозу вводят еще двум животным; и если оба выживают, то LD₅₀ считают более 5000 мг/кг, и испытание прекращают, не дожидаясь завершения 14-дневного наблюдения без введения дозы другим животным.

Если одно или два животных гибнут, дозу вводят еще двум животным последовательно. В случае гибели в конце эксперимента одного животного при выживших остальных введение вещества прекращают и наблюдают за всеми животными во время аналогичного периода.

Поздние смерти учитывают, как и предыдущие. Результаты оценивают следующим образом (О = выживание, Х = гибель):

LD₅₀ — менее 5000 мг/кг при гибели 3 или более животных:

О ХО ХХ

О ОХ ХХ

О ХХ ОХ

О ХХ Х

LD₅₀ — более 5000 мг/кг при выживании 3 или более животных:

О ОО

О ХО ХО

О ХО О
О ОХ ХО
О ОХ О
О ХХ ОО

ГЛАВА 7 ПОДГОТОВКА ОТЧЕТА

1. Данные собирают по каждому животному отдельно, оформляют в виде таблиц на каждую подопытную группу; они должны содержать сведения: о количестве животных, демонстрирующих признаки токсичности; погибших во время испытания или умерщвленных из соображений гуманности; время смерти каждого животного; описание и временной график токсического действия и восстановления; результаты вскрытия.

2. Отчет об испытании в обязательном порядке включает следующую информацию:

Исследуемое вещество: физическая природа, чистота и при необходимости, физико-химические свойства, включая изомеризацию; идентифицирующие данные, включая CAS-номер.

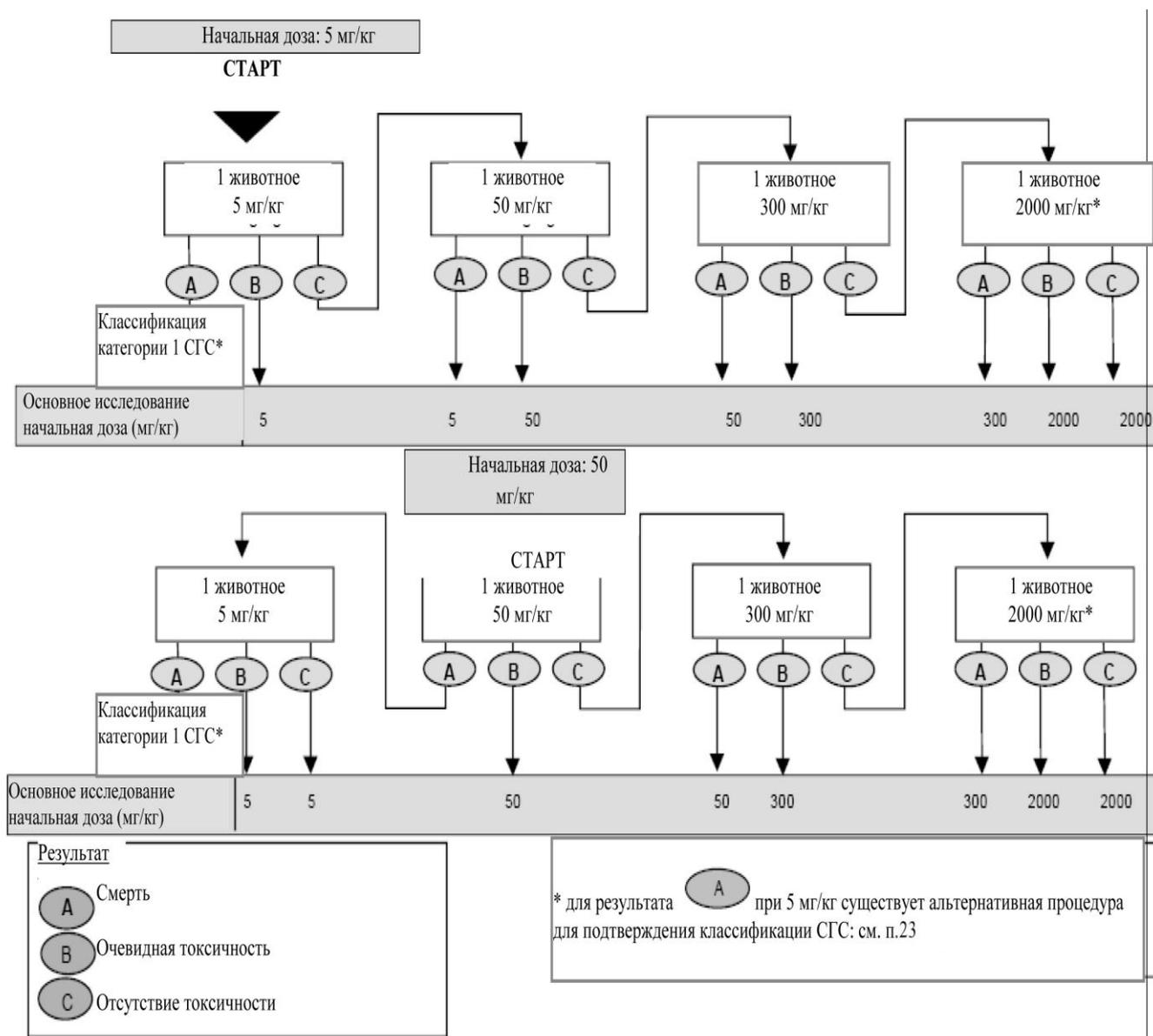
Растворитель (если используется): обоснование выбора растворителя в случае, если это не вода.

Подопытные животные: вид/род; микробиологический статус животных, если таковой известен; количество, возраст и пол животных (включая обоснование предпочтения самцов самкам); происхождение, условия содержания, кормление и пр.

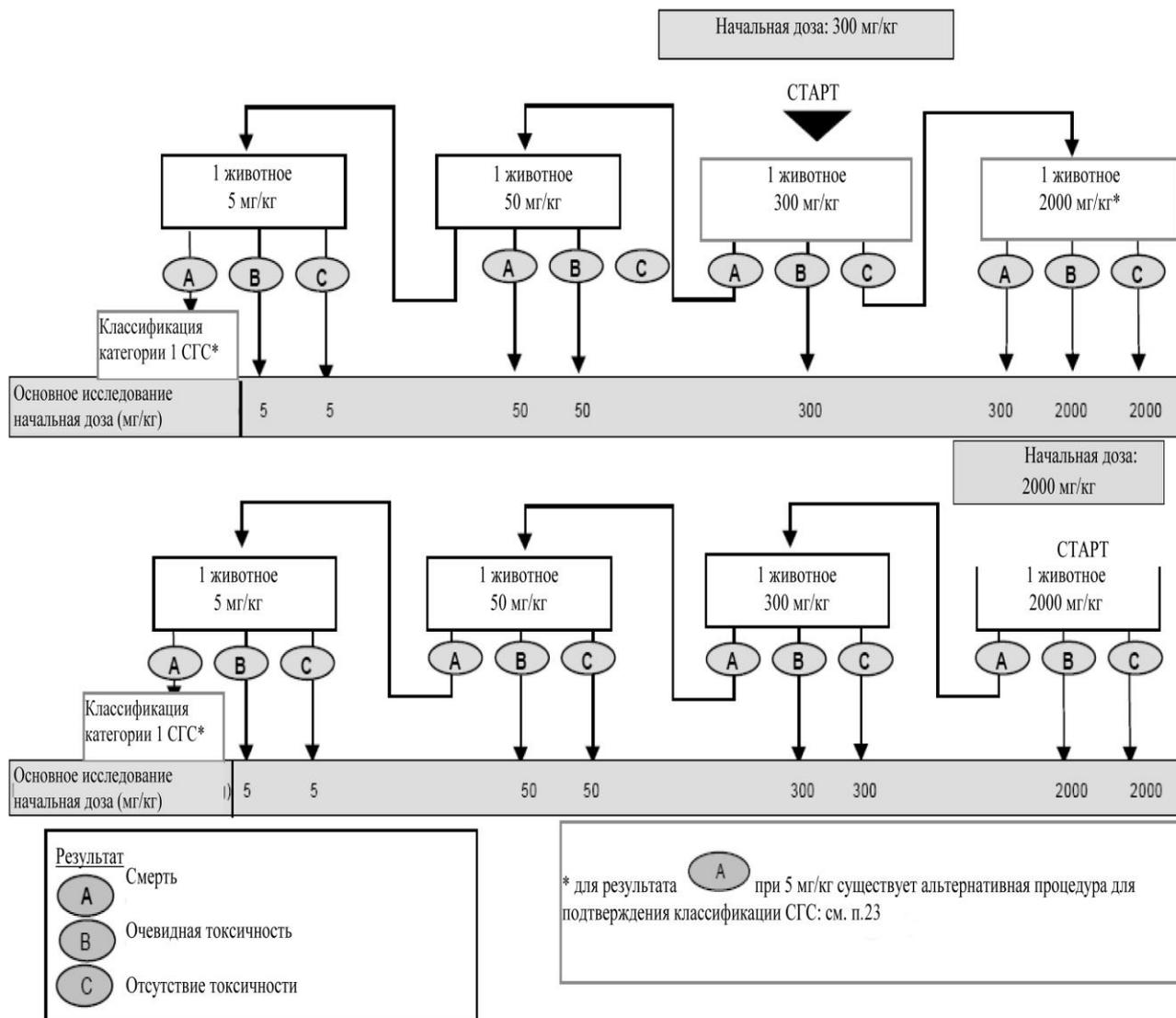
Условия испытания: технология приготовления испытываемого вещества, включая физические параметры используемых компонентов; подробности о введении тестируемого вещества, в т. ч. дозировка, объем и время приема; подробности о качестве корма и воды, включая способ/источник корма и воды; обоснование выбора начальной дозы.

Результаты должны отражать: реакцию каждого подопытного животного на уровень введенной дозы вещества (т. е. животные с признаками интоксикации, в т. ч. летальный исход, изменение основных свойств, интенсивность и продолжительность токсикологически значимого эффекта); вес тела и изменения в весе тела; индивидуальную массу тела животного в день введения вещества, спустя неделю после введения вещества, на момент гибели или умерщвления; дату и время гибели, если она произошла раньше запланированного умерщвления; временной график появления признаков токсичности; сведения об обратимости признаков токсичности для каждого животного; результаты вскрытия и гистопатологического исследования для каждого животного, если таковые имеются.

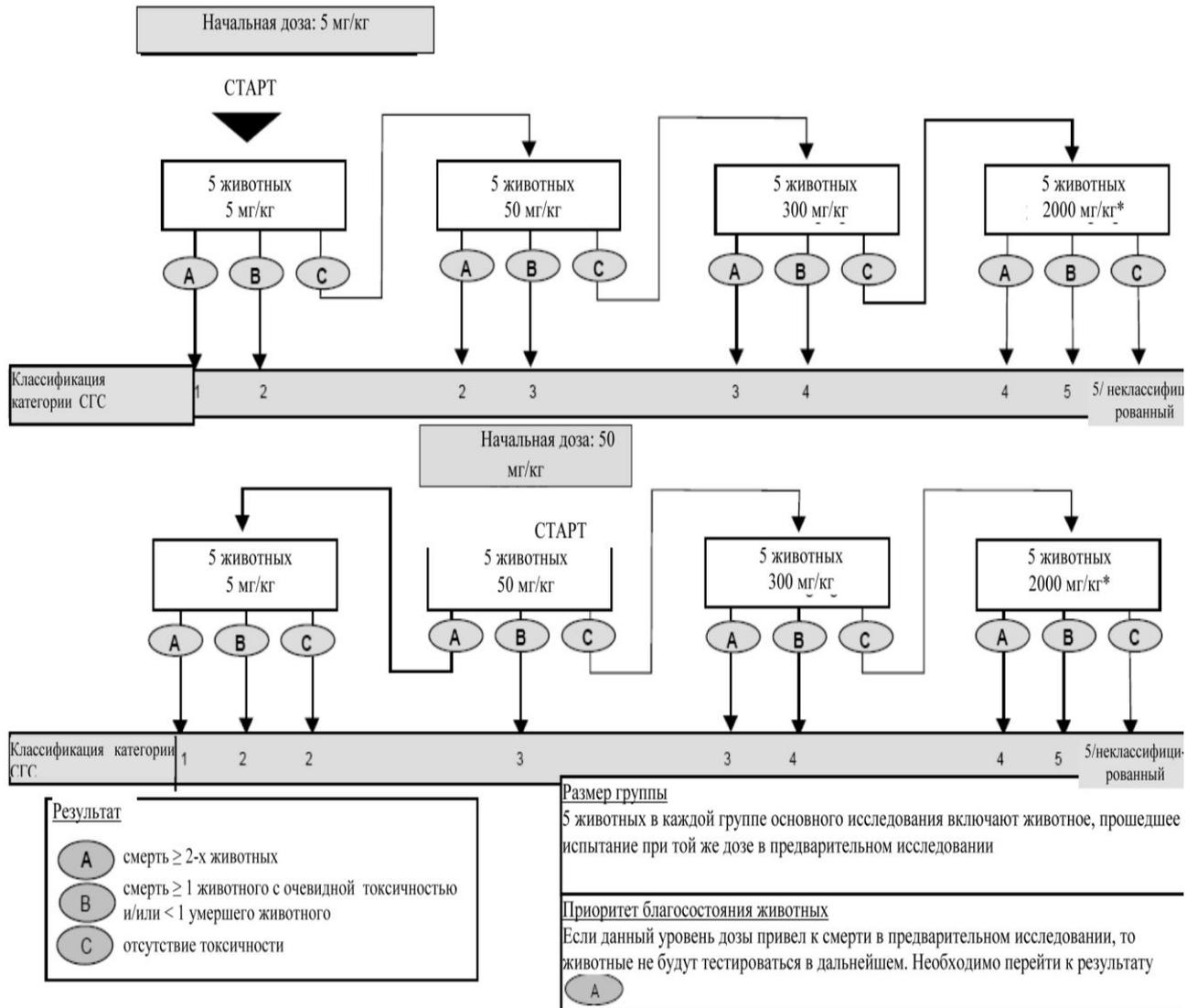
**Схема
предварительного исследования вещества
с использованием минимальной дозы**



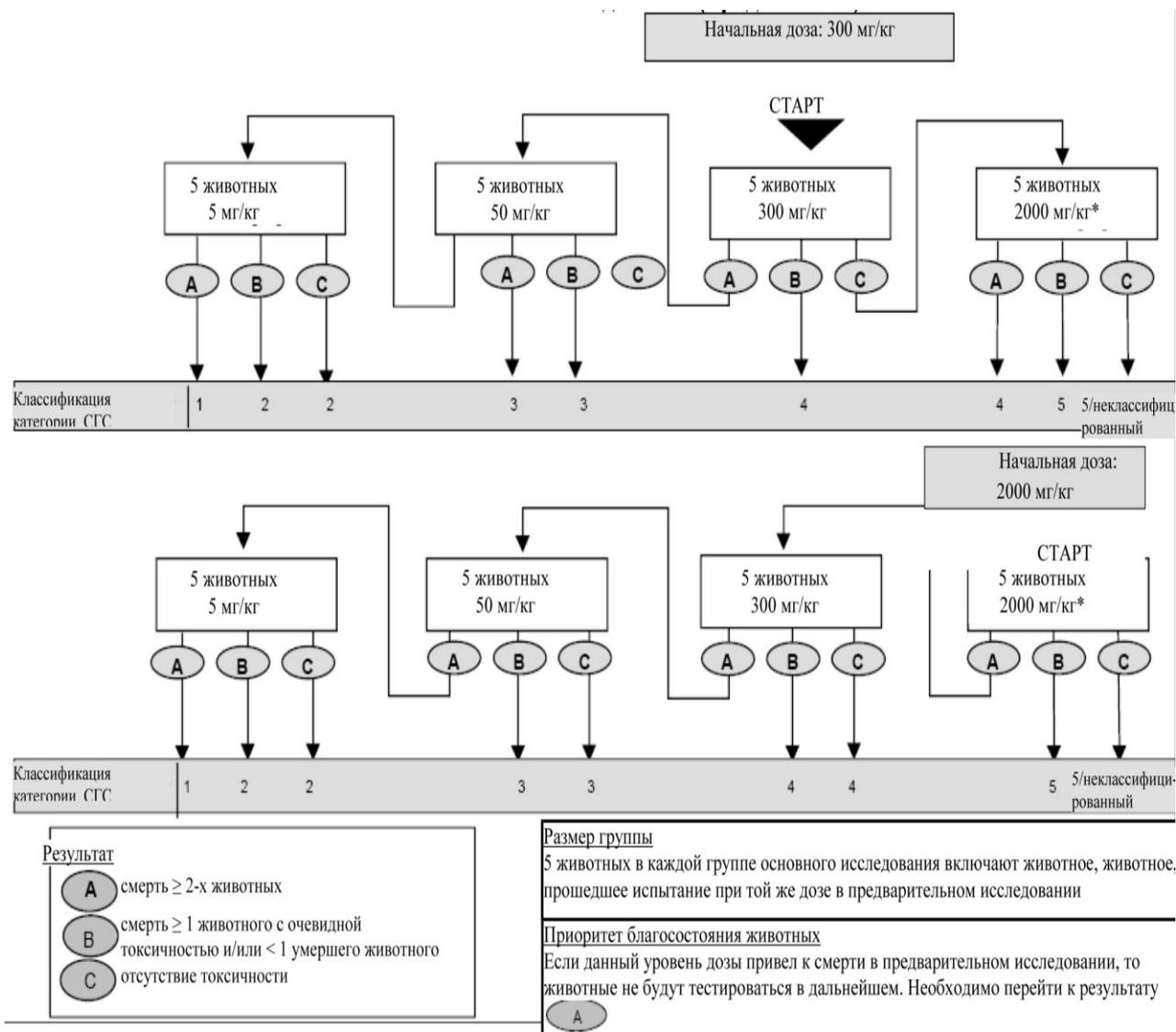
**Схема
предварительного исследования вещества
с использованием минимальной дозы
(продолжение)**



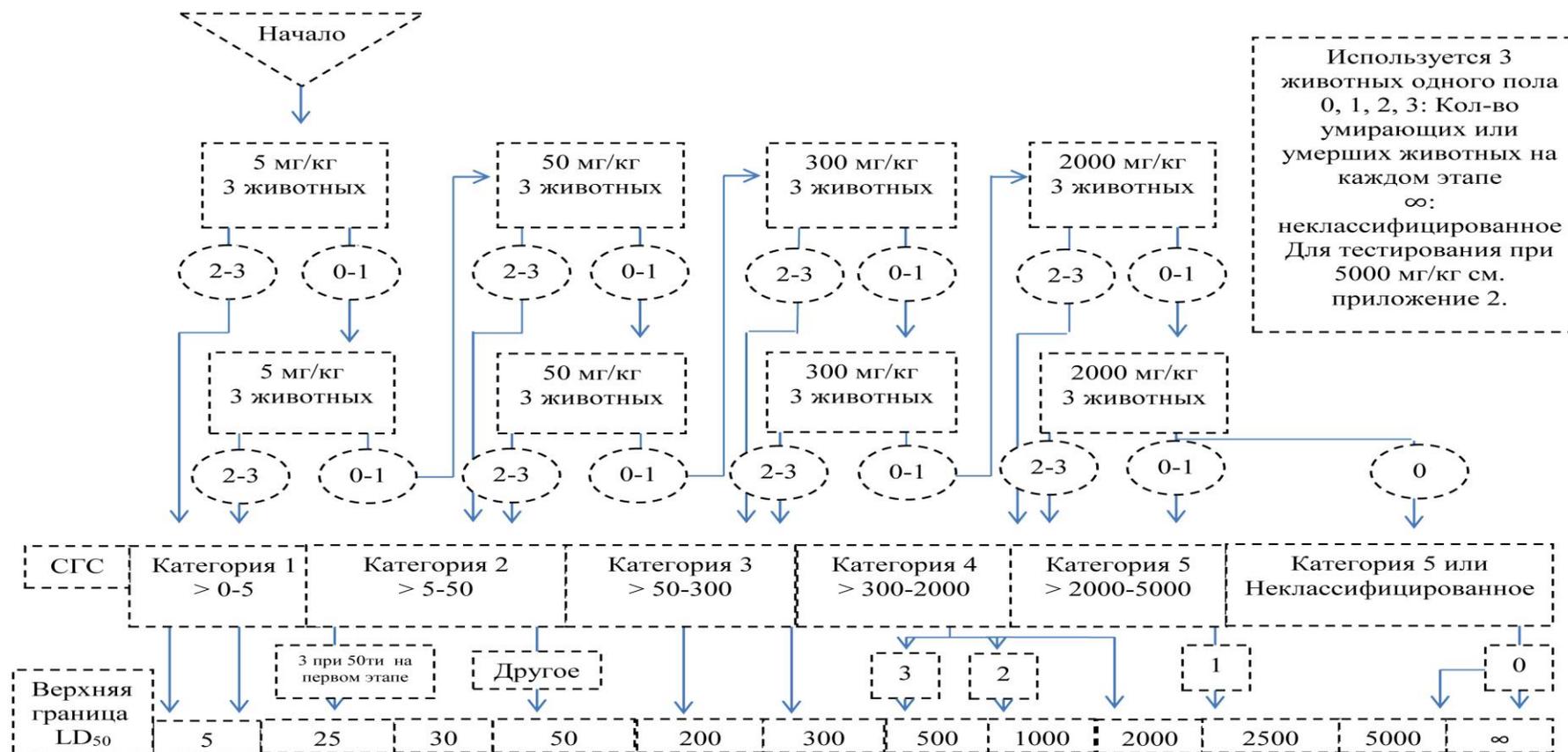
**Схема
основного исследования вещества**



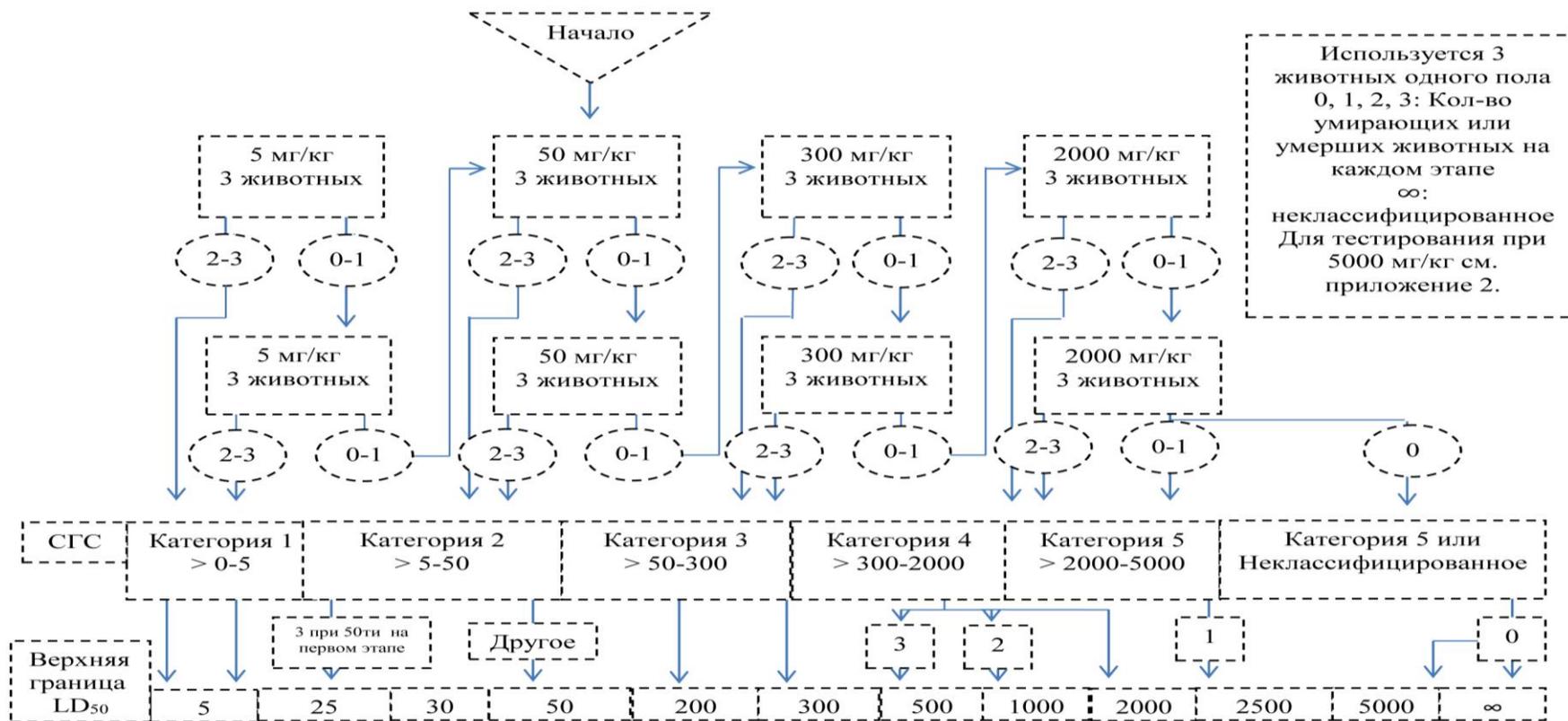
**Схема
основного исследования вещества
(продолжение)**



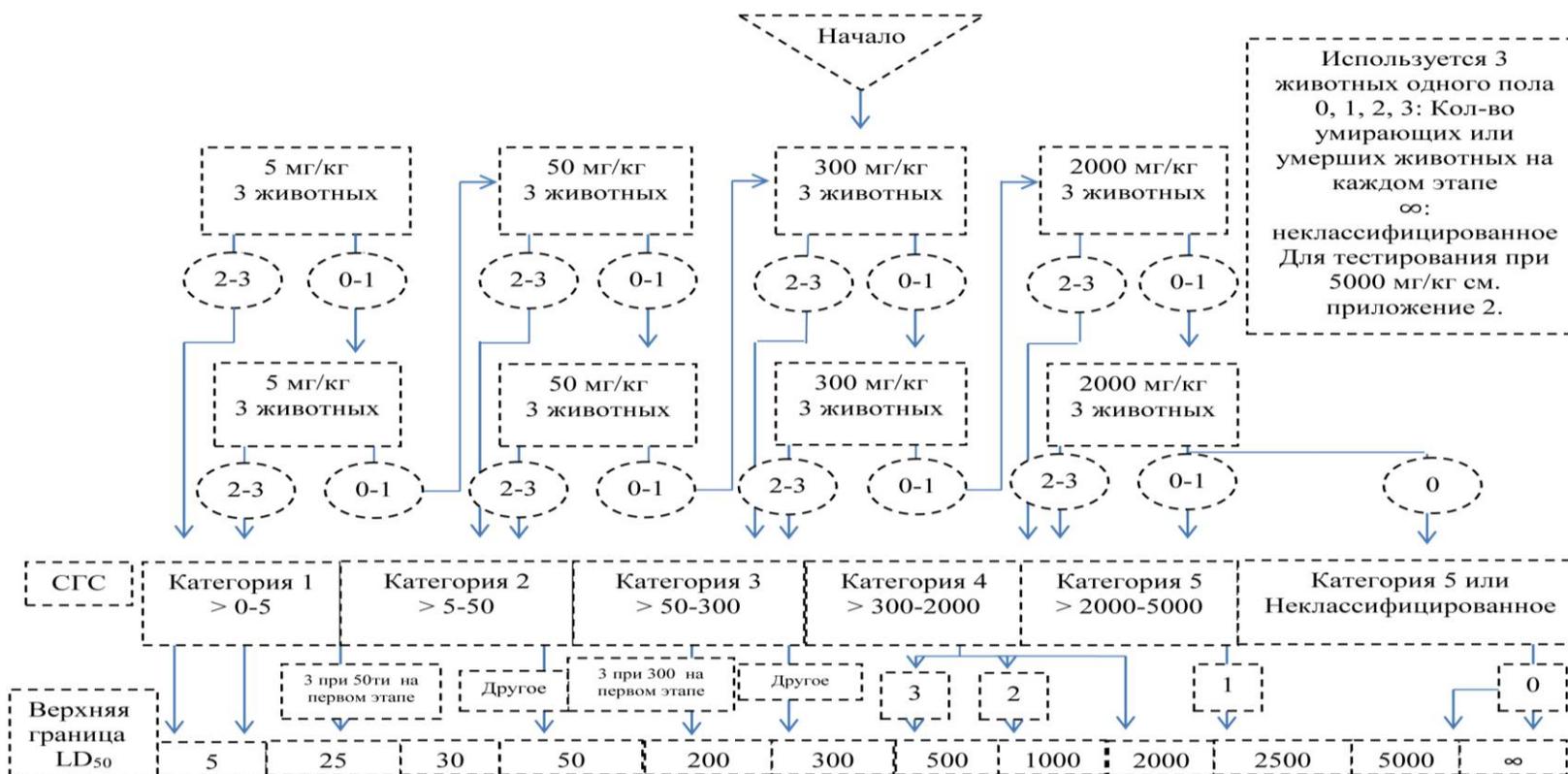
Процедура тестирования с начальной дозой 5 мг/кг



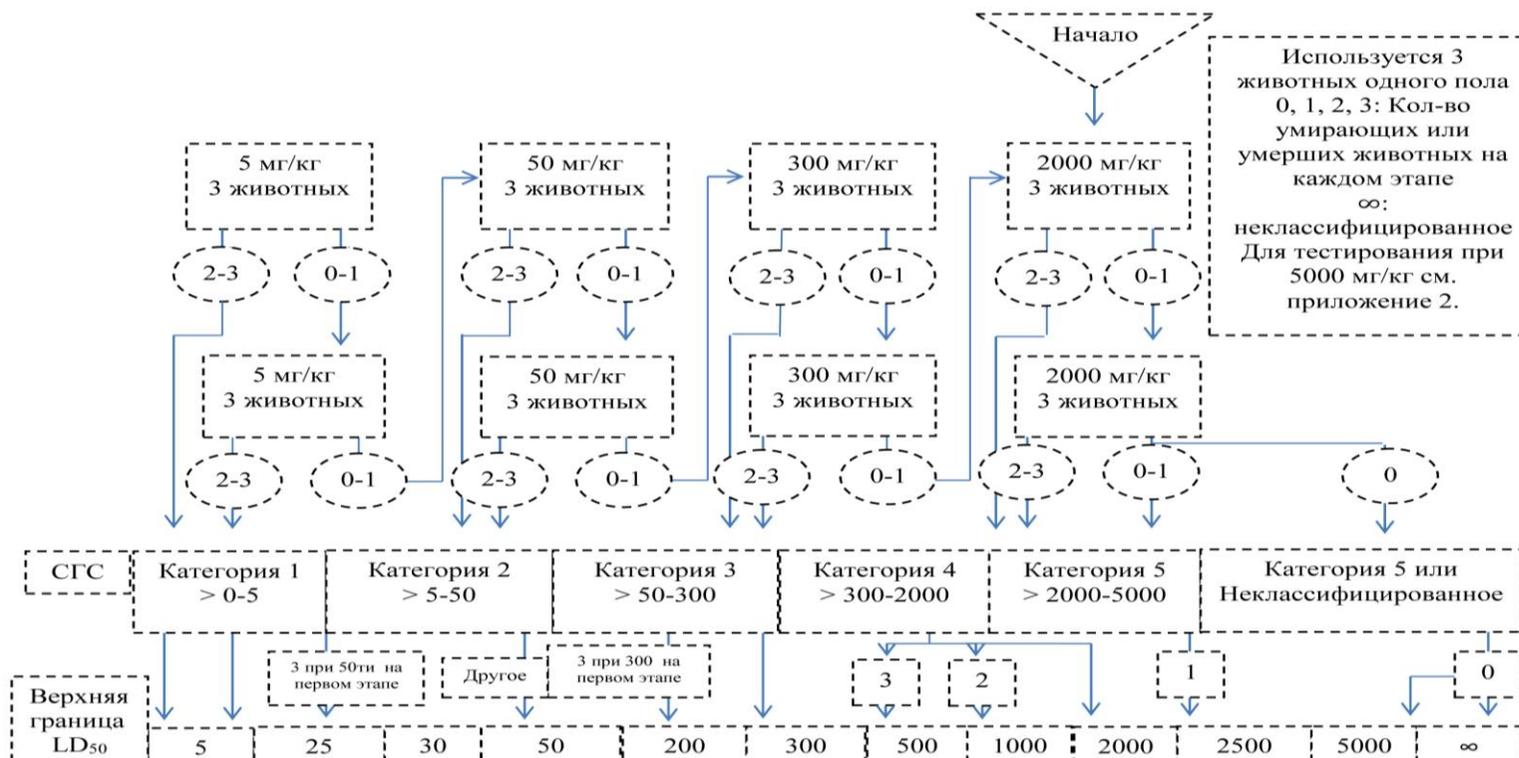
Процедура тестирования с начальной дозой 50 мг/кг



Процедура тестирования с начальной дозой 300 мг/кг



Процедура тестирования с начальной дозой 2000 мг/кг



Критерии для классификации исследуемых веществ с ожидаемыми величинами DL₅₀/LD₅₀, превышающими 2000 мг/кг, без необходимости проведения испытания

Критерии для класса опасности 5 предназначены для обеспечения возможности идентификации веществ, которые обладают относительно низкой опасностью по острой токсичности, но в некоторых обстоятельствах могут представлять опасность для групп риска среди населения

Предположительно, эти вещества имеют пероральную или дермальную DL₅₀/LD₅₀ в диапазоне 2000–5000 мг/кг массы тела и эквивалентные ингаляционные дозы

Критериями СГС для отнесения вещества к 5 классу опасности являются следующие случаи:

а) если при тестировании в соответствии со схемами исследования № 1–2 (приложения 1–4) вещества отнесены к 5 классу по СГС, основываясь на показателе уровня смертности;

б) если получены надежные доказательства, указывающие на отнесение DL₅₀/LD₅₀ к классу 5; или если другие исследования на животных или случаи острого токсического воздействия на человека свидетельствуют о влиянии на его здоровье;

в) если посредством экстраполяции, оценки и измерения данных нет показаний к отнесению к классу более высокой опасности, а также:

- доступна надежная информация, указывающая на значительную токсичность для человека, или

- наблюдался любой смертельный исход, зарегистрированный во время испытания веществ, входящих в классы опасности до класса 4, при введении в желудок, при нанесении на кожу или при ингаляционном пути поступления в организм, или

- если экспертная оценка подтверждает наличие клинических признаков токсичности при тестировании с дозами, превышающими указанные в классе 4, кроме случаев диареи, пилоэрекции, вялости, взъерошенного внешнего вида, или

- в случаях, когда экспертная оценка подтвердила надежность информации, указывающей на потенциальную значимость выраженного острого воздействия на основании других исследований на животных

Испытания доз свыше 2000 мг/кг:

1. Исследования доз 2000–5000 мг/кг (5 класс по СГС) нежелательны и могут проводиться только при обоснованной необходимости подобных исследований для здоровья человека или животных; исследование более высоких доз не допускается

2. При неизбежности испытаний дозы 5000 мг/кг их проводят в один этап (на трех животных). В случае гибели первого подопытного животного дозирование

продолжают при 2000 мг/кг в соответствии со схемой приложения 4. Если первое животное выживает — дозирование при 5000 мг/кг продолжают. Гибель одного из трех животных показывает, что значение DL_{50}/LD_{50} превышает 5000 мг/кг. При гибели двух животных эксперимент продолжают с дозой 2000 мг/кг

**Методика дозирования и
последовательность доз для основного исследования**

Методика дозирования «вверх-вниз» — эксперимент с изменяемым объемом выборки и возможностью изменения условий испытаний. В каждой серии опытов одному животному вводят однократно дозу, последующим животным — с 48-часовыми интервалами. Первое животное получает дозу на ступень ниже уровня наиболее обоснованной величины прогнозируемой LD_{50} . Такой подход отражает коррекцию на тенденцию к смещению LD_{50} от направления исходной начальной дозы к окончательной оценке, при котором вводимая доза корригируется для каждого последующего животного, и итоговая модель результатов стабилизируется

Стандартная прогрессия дозы. Перед началом эксперимента определяют начальную дозу, интервал между дозами, уточняют все возможные дозы, в т. ч. верхнюю границу (обычно 2000 или 5000 мг/кг). Дозы, близкие к верхней границе, в прогрессии не учитывают. Схема изучения ступенчатая, что обеспечивает последовательность введения вещества и коррекцию первых доз. Рекомендуемая начальная доза при отсутствии данных о веществе составляет 175 мг/кг и затем с каждым шагом увеличивается

При использовании для основного испытания стандартной методики дозирование начинают со 175 мг/кг, дозы разделяют с коэффициентом 0,5 по логарифмической шкале дозирования — 1,75; 5,5; 17,5; 55; 175; 550, 2000 либо 1,75; 5,5; 17,5; 55; 175; 550; 1750; 5000. Для определенных высокотоксичных веществ последовательность дозирования может быть продлена до более низких величин

В случае необходимости использования коэффициента прогрессии дозы, отличного от стандартного, возможно применение данных, приведенных в приложении 11 для выбора последовательности доз при различных значениях наклона кривой зависимости доза–ответ от 1 до 8

	55		55		55		55
						65	
				69			73
		81			82		
			99			91	97
				109	120		
						126	129
175	175	175	175	175	175	175	175
						240	230
				275	260		
			310			340	310
		375			375		
				440			410
						470	
	550		550		550		550
						650	
				690			730
		810			820		
			990			910	970
				1090	1200		
						1260	1260
1750	1750	1750	1750	1750	1750	1750	1750
						2400	2300
				2750	2600		
			3100				3100
					3750	3400	
							4100
5000	5000	5000	5000	5000	5000	5000	5000
* — если требуются более низкие дозы, продолжить прогрессии к более низкой дозе.							

Расчеты для «правила остановки» по отношению правдоподобия

Основное испытание может быть завершено при возникновении одного из трех критериев остановки

При отсутствии соответствия по всем критериям остановки введение дозы прекращают после получения дозы 15 животными

При отсутствии в начале исследований необходимой информации о токсических свойствах вещества используют рекомендуемую стандартную дозу 175 мг/кг и рекомендуемый стандартный коэффициент прогрессии дозы, равный 3,2

Основное исследование останавливают, если выжило 3 животных, получивших предельную дозу 2000 мг/кг. Возможно в исключительных случаях использование предельной дозы 5000 мг/кг, но оно не всегда считается адекватным

Наличие определенной последовательности 5 реверсирований у не менее 6 подопытных животных позволяет завершить испытание

В ситуации, когда нет соответствия по критериям (а, б), а реверсирование реакции произошло после 4 исследованных животных критерий (с) должен быть также оценен

Критерий (с) требует оценки «правила остановки» по отношению правдоподобия после исследования каждого животного, начиная с четвертого, испытанного после реверсирования. Вычисляют 3 «результата процесса испытания». Технически 3 результата процесса испытания являются настолько правдоподобными, насколько это рекомендуется для оценки максимального правдоподобия LD_{50} . Методика тесно связана с вычислением доверительного интервала с использованием методики, основывающейся на правдоподобии

Методика основана на том, что при достаточности данных расчетное значение LD_{50} будет более обоснованным, чем величины верхней и нижней границы, где статистическое обоснование измеряется с использованием правдоподобия

С этой целью вычисляют три величины правдоподобия: правдоподобие расчетной LD_{50} (называемое приблизительной оценкой или усредненной оценкой дозы) и правдоподобие величины, ниже и выше среднего значения

За нижнюю границу принимается среднее значение LD_{50} , деленное на 2,5, а в качестве верхней границы — умноженное на 2,5

Значения правдоподобия сравнивают путем вычисления отношения правдоподобия и последующего определения и учитывают, превышает ли отношение правдоподобия критическую величину

Испытание останавливают, если отношение правдоподобия для расчетной величины превышает каждое из других правдоподобий на коэффициент 2,5, который указывает на относительно сильное статистическое обоснование расчетной величины LD_{50}

<p>Для этого вычисляют два отношения правдоподобия: отношение правдоподобия для расчетной величины и величины, разделенной и умноженной на 2,5</p>
<p>Значения LD_{50} вычисляют с использованием соответствующей программы. Этапы вычисления начинаются с верхнего предела 5000 и 2000 мг/кг</p>
<p><i>Гипотетический пример с использованием верхней дозы 5000 мг/кг</i></p>
<p>В гипотетическом примере, использующем верхнюю дозу 5000 мг/кг, после 9 протестированных животных наблюдается соответствие «правилу остановки» по отношению правдоподобия. Первое реверсирование происходит при исследовании 3-го животного. Критерий остановки по отношению правдоподобия проверяется, когда 4 животных исследованы после реверсирования. В данном примере 4-е животное, исследованное после реверсирования, фактически является 7-м. Поэтому для этого примера вычисления нужны только после данных на 7-е животное, затем критерий остановки по отношению правдоподобия проверяют после исследования 7, 8 и 9-го животных.</p>
<p><i>Этап А. Ввод информации о зависимости доза–ответ для каждого животного</i></p>
<p>Этапы нумеруют, в тестировании не используют более 15 животных Отмечают информацию по каждому протестированному животному Вводят данные, полученные от i-го животного Учитывают реакции животных (положительный ответ помечается с помощью «Х», отрицательный — с помощью «О»)</p>
<p><i>Этап В. Объемы номинальной и фактической выборки</i></p>
<p>Номинальная выборка состоит из двух животных, которые представляют первое реверсирование, затем учитывают всех животных, исследованных впоследствии</p>
<p><i>Этап С. Ориентировочный расчет LD_{50}</i></p>
<p>Среднее геометрическое значение доз для животных в номинальной выборке используется как ориентировочный расчет LD_{50}, от которой начинается процесс; называется «усредненная оценка дозы». Данная оценка обновляется с каждым исследованным животным; среднее значение ограничивается номинальной выборкой, чтобы иметь возможность коррекции в случае неправильно выбранной исходной дозы; позволяет получить/не получить ответов; используется в вычислениях правдоподобия для окончательного расчета LD_{50} Среднее геометрическое n чисел является произведением n чисел, возведенных в степень $1/n$</p>
<p><i>Этап D. Правдоподобие ориентировочного расчета LD_{50}</i></p>
<p><i>Этап E. Вычисление правдоподобия для двух величин доз выше и ниже ориентировочного значения LD_{50}</i></p>
<p><i>Этап F. Вычисление отношения правдоподобия</i></p>
<p><i>Этап G. Определение, не превышают ли отношения правдоподобия критическую величину</i></p>

Пример критерия остановки по параграфу 33 (с) ОЭСР TG 425

Последовательность испытания	Идентификация животного	Доза, мг/кг	Краткосрочный результат	Долгосрочный результат	Сообщения ввода данных в программу
1	1	175	О	О	
2	2	550	О	О	
3	3	1750	Х	Х	
4	4	550	О	О	
5	5	1750	Х	Х	
6	6	550	О	О	
7	7	1750	О	О	
8	8	5000	Х	Х	
9	9	1750	Х	Х	
10	Прекратить дозирование				
11					
12					
13					
14					
15					

Основное испытание завершено.
 Есть соответствие критерию остановки: критерий отношения достоверности.
 Оценка LD₅₀ = 1750 (одна доза с частичной реакцией); 95% PL.
 Доверительный интервал от 651,9 до 2690.

Расчет LD₅₀ для основного испытания

LD₅₀ вычисляют с использованием метода максимального правдоподобия, кроме исключительных случаев. При выполнении предлагаемых расчетов максимального правдоподобия (с допустимой величиной σ) допускается пользоваться следующими статистическими элементами

Все смерти (немедленные, замедленные, умерщвления по причинам гуманности) объединяют для анализа максимального правдоподобия

По Диксону функция правдоподобия описывается следующим образом:

$$L = L_1 L_2 \dots L_n, \quad (1)$$

где L — правдоподобие результата эксперимента при данных μ и σ ,

а n — общее количество исследованных животных.

$L_1 = 1 - F(Z_i)$, если i -е животное выжило, либо

$L_2 = F(Z_i)$, если i -е животное погибло, где

F = кумулятивное стандартное нормальное распределение;

$Z_i = [\log(d_i) - \mu] / \sigma$;

d_i = доза, которую ввели i -му животному;

σ = стандартное отклонение в логарифмических единицах дозы (которое не является логарифмическим стандартным отклонением): обычно используют величину σ , равную 0,5, кроме случаев, когда имеется оптимальная общая или специфическая величина.

Правдоподобие LD₅₀ оценивают по величине μ , которая максимизирует правдоподобие L .

При некоторых обстоятельствах статистическое вычисление невозможно или, вероятно, приведет к ошибочным результатам. Для таких обстоятельств имеются специальные методы для определения/установления расчетной LD₅₀:

а) Если испытание остановлено на основании критерия (а), т. е. максимальная доза была испытана неоднократно, или если испытание заканчивалось максимальной дозой, то уведомляется, что LD₅₀ выше верхней границы. На этом основании классификация завершается

б) Если все погибшие животные получали более высокие дозы, чем выжившие (или в исключительных случаях все выжившие животные получили более высокие дозы, чем погибшие), то LD₅₀ находится между дозами для живых и погибших животных. Такие наблюдения не дают дополнительной информации о точной величине LD₅₀, но позволяют оценить максимальное правдоподобие при условии, что имеется величина для σ ; критерий остановки (б) описывает такие обстоятельства

с) Если живые и погибшие животные получили одну общую дозу, а остальные погибшие — более высокие/ выжившие — более низкие дозы, то LD₅₀ равняется их общей дозе. При последующих испытаниях сходных по структуре (составу) веществ исследования начинают с меньшей прогрессией дозы

Если ни одна из вышеперечисленных ситуаций не наблюдалась, то LD_{50} рассчитывают с использованием метода максимального правдоподобия

Вычисление максимального правдоподобия может выполняться с использованием компьютерных программных пакетов «SAS» («PROC NLIN») либо «BMPD» (программа «AR») или иных. Типовые инструкции к таким пакетам приведены в приложениях к Стандарту E 1163-87 Американского общества по испытанию материалов («ASTM»). Результатом программы является оценка $\lg(LD_{50})$ и ее стандартная погрешность

Правило остановки (с) по отношению правдоподобия основано на трех измерениях процесса испытания, которые имеют ту же форму правдоподобия, что и другие величины μ . Сравнения проводят после выполнения испытания на каждом животном, введенном в эксперимент после 6-го, если результаты не соответствуют критериям (а) или (b), и оформляют в виде таблицы. При соответствии критерию испытание останавливают и LD_{50} рассчитывают методом максимального правдоподобия

Расчет доверительного интервала

Расчет доверительных интервалов LD_{50} проводят после основного испытания и расчета LD_{50} с целью подтверждения достоверности и практичности полученной информации

Широкий доверительный интервал является признаком наличия значительных неопределенностей, связанных с расчетным значением LD_{50} , указывающим на низкую надежность расчетной LD_{50} и пограничную полезность оценки LD_{50}

Узкий интервал указывает на относительно небольшую определенность, связанную с оценкой LD_{50} , высокую надежность и практичность оценки LD_{50} , обозначающую, что при повторении основного испытания новое расчетное значение LD_{50} будет близким к первоначальному, обе оценки окажутся близкими к истинной LD_{50}

В зависимости от результатов основного испытания рассчитывают один из двух видов доверительных интервалов достоверной LD_{50}

Методика вычислений, основанная на профиле правдоподобия, позволяет получить LD_{50} с достоверностью в 95% только при исследовании не менее трех различных доз, когда среднюю дозу вводили не менее чем одному выжившему и не менее чем одному погибшему животному

Использование небольшого количества животных снижает фактический уровень достоверности. Правило случайной остановки повышает возможность эксперимента полностью реагировать на изменяющиеся основные условия, а также является причиной того, что зарегистрированный уровень достоверности и фактический уровень достоверности несколько различаются

В случае выживания всех животных на определенном уровне дозы или ниже него и гибели всех животных на следующей более высокой дозе интервал рассчитывают следующим образом: нижним пределом является самая высокая доза, на которой все животные выжили, а его верхним пределом — доза, вызвавшая гибель всех животных

Этот интервал считают «приблизительным», так как точный доверительный интервал не может быть определен

Учитывая, что данный тип реагирования наблюдается только при крутой кривой зависимости доза-ответ, в большинстве случаев ожидается, что истинная LD_{50} находится в пределах рассчитанного интервала или находится очень близко к нему. Подобный интервал является относительно узким и достаточно точным для практического использования

Бесконечными являются доверительные интервалы, которые включают либо ноль в качестве нижнего предела, либо бесконечность в качестве верхнего либо оба параметра. Такие интервалы наблюдаются при гибели или выживании всех животных. Для обработки результатов таких экспериментов используют вычисления с применением специальных программ (Управления по охране окружающей среды США (USEPA), ОЭСР и др.)