

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

«УТВЕРЖДАЮ»

Заместитель Министра  
здравоохранения – Главный  
государственный санитарный  
врач Республики Беларусь



Н.П. Жукова

« 30 » августа 2016 г.

Регистрационный № 052-1215

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТОКСИЧНОСТИ ХИМИЧЕСКОЙ ПРОДУКЦИИ  
(ХИМИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ И ИХ СМЕСЕЙ) ПРИ ПОВТОРНОМ  
И ХРОНИЧЕСКОМ 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 № 052-1215

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТОКСИЧНОСТИ ХИМИЧЕСКОЙ ПРОДУКЦИИ  
(ХИМИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ И ИХ СМЕСЕЙ)  
ПРИ ПОВТОРНОМ И ХРОНИЧЕСКОМ 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 № 407 «Repeated Dose 28-Day Oral Toxicity Study in Rodents» / ОЭСР Руководство № 407 «Изучение пероральной токсичности при повторном воздействии в 28-дневных опытах на грызунах», OECD TG № 408 «Repeated Dose 90-Day Oral Toxicity Study in Rodents» / ОЭСР Руководство № 408 «Изучение пероральной токсичности при повторном воздействии в 90-дневных опытах на грызунах», OECD TG № 452 «Chronic Toxicity Studies»/ ОЭСР Руководство № 452 «Исследования хронической токсичности») методы определения токсичности химических веществ и их смесей при повторном / хроническом воздействии, 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 лекарственных средств, препаратов ветеринарного назначения, готовой парфюмерно-косметической продукции.

2. Метод (OECD TG № 407) не распространяется на изучение эндокринных разрушителей из-за низкой биологической чувствительности по выявлению (анти) андрогенных или (анти) эстрогенных эффектов.

3. Настоящая инструкция устанавливает подходы, схемы и методы проведения исследований по изучению хронической / кумулятивной токсичности при внутрижелудочном поступлении в организм, обеспечивает получение информации о хронической 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.

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

## ГЛАВА 2 ТЕРМИНЫ И ОПРЕДЕЛЕНИЯ

В настоящей Инструкции используются следующие термины и определения:

- андрогенность — способность химического вещества действовать подобно естественному андрогенному гормону (например, тестостерону) в организме млекопитающих;

- антиандрогенность — способность химического вещества подавлять активность естественного андрогенного гормона (например, тестостерона) в организме млекопитающих;

- анти tiroидная активность — способность химического вещества подавлять активность естественного гормона щитовидной железы (например, Т3) в организме млекопитающих;

- антиэстрогенность — способность химического вещества подавлять активность естественного эстрогенного гормона (например, эстрадиола 17) в организме млекопитающих;

- валидизация — научное направление, разработанное для характеристики требований к функционированию и ограничений методов исследования и для доказательства их надежности и применимости для конкретных целей;

- выраженная токсичность — собирательный термин, характеризующий явные признаки токсичности, появляющиеся после введения изучаемого вещества, которые должны быть достаточными для оценки опасности, и быть такими, чтобы в результате увеличения вводимой дозы можно было ожидать развития тяжелых признаков токсичности и, возможно, гибели животных;

- доза — количество вводимого тестируемого вещества, которое выражается или по массе (г, мг), или массой тестируемого вещества на единицу массы тела животного (мг/кг), или постоянной концентрацией в пище (ppm);

- дозировка — основное понятие, включающее в себя дозу, частоту и продолжительность введения;

- пороговая доза (минимально действующая доза, порог вредного воздействия / LOEL — Lowest observed effect level — наименьшее количество вещества, которое вызывает в организме изменения, определяемые наиболее чувствительными физиологическими и биохимическими тестами; доза, ниже которой отсутствуют внешние признаки отравления животного; наименьшая доза вещества, способная дать определенный биологический эффект (термин, аналогичный принятому ранее «минимальная действующая доза»/«пороговая доза»);

- реперная доза (BMD) — доза вещества, рассчитанная методом вероятностной оценки нижней части кривой зависимости «доза – ответ», которая вызывает изменения наиболее чувствительных показателей у 10% животных;

- tiroидная активность — способность химического вещества действовать подобно естественному гормону щитовидной железы (например, Т3) в организме млекопитающих;

- уровень воздействия, при котором не наблюдается вредный эффект (NOAEL – No Observable Adverse Effects Level/ NOEL - No Observable Effects Level) — максимальный уровень дозы, при которой не наблюдается отрицательный вредный эффект / отсутствие эффекта (отрицательного и положительного), связанный с воздействием вещества (термин, аналогичный принятому ранее «максимальная недействующая доза» / «подпороговая доза»);

- эстрогенность — способность химического вещества действовать подобно естественному эстрогенному гормону (например, эстрадиолу 17β) в организме млекопитающих.

### ГЛАВА 3 ОБЩИЕ УСЛОВИЯ ПРОВЕДЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЙ

1. До испытаний необходимо провести анализ существующей информации об исследуемом веществе, включающий сведения о составе и химическом строении, физико-химических свойствах, результатах токсикологических испытаний *in vivo* и *in vitro*, токсикологические данные о структурно родственных веществах и предполагаемых путях 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 их учитывают как погибших во время исследования.

3. *Животные. Выбор вида.* Для исследований используют грызунов широко применяемых линий, 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 детально обосновано. Использование более мелких видов грызунов допустимо, но может увеличить вариабельность из-за технической сложности препарирования более мелких органов. В международной программе по апробации выявления эндокринных разрушителей в качестве единственного вида испытываемых животных рекомендованы крысы.

4. В эксперименте используют здоровых молодых половозрелых особей от 8 до 9 недель массой 160–180 г, составляющей  $\pm 20\%$  от средней массы ранее исследуемых животных. Если повторное 28-дневное воздействие вещества проводится как предварительное к долговременному исследованию, предпочтительно, чтобы в последующих исследованиях использовались животные одной и той же линии из одного и того же питомника.

5. Условия содержания и кормления.

5.1. 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).

5.2. При кормлении используется обычная лабораторная диета с неограниченным количеством питьевой воды. На выбор диеты может повлиять необходимость обеспечить хорошее смешивание изучаемого вещества, если оно вводится с кормом. Корм должен регулярно анализироваться на загрязняющие вещества. Образцы корма должны сохраняться до завершения отчета.

5.3. Животные должны содержаться небольшими группами одного пола, но могут быть размещены индивидуально, если это научно обосновано. При групповом содержании в одной клетке желательнее размещать не более 5 животных. Все процедуры должны соответствовать местным стандартам ухода за животными.

6. *Подготовка животных.* Животных разделяют на группы (контроль, опытные) методом случайной выборки, помечают и содержат в клетках не менее пяти 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. *Подготовка доз.* Изучаемое вещество вводят желудочным зондом, с диетой или питьевой водой. Метод перорального введения зависит от физических / химических / токсико-кинетических свойств изучаемого вещества.

В случае необходимости изучаемое вещество растворяют или суспензируют в соответствующем растворителе, при этом в порядке приоритетных используют водные растворы / суспензии, затем — растворы / суспензии в масле (например, в кукурузном) и только потом — возможное растворение в других растворителях, для которых должны быть известны токсикологические характеристики и определена стабильность изучаемого вещества.

8. При исследованиях 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)°С (по ГОСТ 24437); анализатор потенциометрический с погрешностью измерений  $\text{pH} \pm 0,1$  (рН-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 см<sup>3</sup>), цилиндры (по ГОСТ 1770) и колбы (по ГОСТ 25336) разной вместимости (10; 100; 1000 см<sup>3</sup>); штативы для пробирок; шпатели стеклянные; стандарт-титры для приготовления образцовых буферных растворов для рН-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.

9. 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±5)°С; относительная влажность воздуха не более 80% при T = 25°С; атмосферное давление 84,0–106,7 кПа (630–800 мм рт. ст.).

10. До введения дозы животных ограничивают в пище (нельзя кормить перед введением дозы), взвешивают, затем вводят испытуемое вещество.

11. 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 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 ПЕРОРАЛЬНОЙ ТОКСИЧНОСТИ ПРИ ПОВТОРНОМ ВОЗДЕЙСТВИИ В 28-ДНЕВНЫХ ОПЫТАХ НА ГРЫЗУНАХ

1. Метод по изучению пероральной токсичности при повторном воздействии в 28-дневных опытах на грызунах (OECD TG № 407) предназначен для получения информации о возможном вреде для здоровья при повторном введении вещества в течение относительно небольшого периода времени, включая общетоксическое действие и влияние на нервную, иммунную и эндокринную системы. Метод может использоваться для веществ, не требующих 90-дневных исследований (например, когда объемы производства не превышают определенных пределов) или как предварительное исследование перед проведением 90-дневных опытов.

2. Метод (OECD TG № 407) не распространяется на стадии жизни, наиболее уязвимые для эндокринных разрушителей, так как чувствительность данного биологического испытания недостаточна для выявления всех веществ с (анти) андрогенным или (анти) эстрогенным видом действия, и не может быть охарактеризован как скрининговый для оценки эндокринной активности.

3. Данные, полученные с использованием метода, следует принимать во внимание при характеристике токсичности изучаемого вещества, при выявлении зависимостей доза – эффект и при определении уровня, при котором не наблюдаются неблагоприятные эффекты вещества (NOAEL).

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

5. Изучаемое вещество вводят ежедневно перорально в градуированных дозах нескольким группам экспериментальных животных в одном дозовом уровне на группу в течение 28 дней.

6. Процедура испытания, количество и пол животных.

6.1. В каждой дозе используют по 10 животных (5 самцов и 5 самок); при планируемом умерщвлении животных в течение эксперимента общее число животных увеличивают на количество, предназначенное для умерщвления до завершения исследования.

6.2. Целесообразно предусмотреть дополнительные сателлитные группы из 10 животных (по 5 каждого пола) для наблюдения за обратимостью, устойчивостью или отсроченным проявлением токсических эффектов, по крайней мере, в течение 14 дней после прекращения воздействия вещества.

7. Выбор доз.

7.1. Обычно используют три экспериментальные и контрольную группы; допускается сокращенное исследование при прогнозировании отсутствия эффектов в дозе 1000 мг/кг массы/день. С целью определения доз для 28-дневного эксперимента возможно проведение исследований по подбору диапазона доз (на животных той же линии и из того же источника). Контрольных и опытных животных содержат в идентичных условиях; при использовании в опыте растворителя контрольная группа должна получать растворитель в максимальном из используемых объемов.

7.2. Уровни исследуемых доз выбирают с учетом всех имеющихся токсикологических и (токсико-) кинетических данных для тестируемого препарата или родственных веществ. Максимальную дозу подбирают с целью вызвать токсические эффекты, а не гибель или сильные страдания животных; последовательность снижения дозовых уровней выбирают с перспективой обнаружения любых дозозависимых реакций и установления уровня, при котором не наблюдаются неблагоприятные эффекты вещества (NOAEL). Как правило, 2- или 4-кратные интервалы обычно оптимальны для установления убывающих дозовых уровней, а добавление четвертой опытной группы животных иногда предпочтительнее использования больших интервалов (например, более чем 10-кратных) между дозами.

7.3. Интерпретация видимой общей токсичности (снижение массы тела, действие на печень, сердце, легкие или почки и др.) на иммунные, неврологические и эндокринные показатели должна даваться с осторожностью.

8. Ограниченное исследование допустимо при отсутствии токсических эффектов на одной дозе при введении не менее 1000 мг/кг массы тела/день внутривентрикулярно или с диетой или питьевой водой (на основе определения массы тела) эквивалентного содержания вещества, при наличии данных о низкой / отсутствии токсичности у структурно связанных веществ и воздействии на людей.

## 9. Введение доз.

9.1. Животные получают изучаемое вещество 7 дней в неделю в течение 28 дней внутрижелудочно в одноразовой дозе с использованием желудочного зонда или интубационной канюли. Максимальный объем однократно вводимой жидкости зависит от массы животного и не должен превышать 1 мл/100 г массы тела, за исключением водных растворов, которые допустимо вводить в объеме 2 мл/100 г массы тела.

Для изучаемых веществ вариabельность объема минимизируют подбором концентраций, чтобы все дозовые уровни вводить в одном объеме, за исключением едких и раздражающих, у которых при увеличении концентрации раздражающие эффекты усугубляются.

9.2. При введении веществ с диетой или питьевой водой используемые количества изучаемого вещества не должны нарушать нормальное питание или водный баланс. В случае введения вещества с диетой используют либо постоянную концентрацию (ppm), либо постоянный уровень доз в пересчете на массу тела животного. При введении вещества с помощью зонда необходимо поддерживать постоянный уровень дозы в пересчете на массу тела животного, рассчитанную дозу вводить ежедневно в одно и то же время.

## 10. Наблюдения.

10.1. Период наблюдения составляет 28 дней. Животные сателлитной группы, предназначенные для последующих наблюдений, должны содержаться не менее 14 дней без воздействия вещества для выявления отсроченного действия, устойчивости токсических эффектов или их исчезновения.

10.2. Общие клинические наблюдения с обязательной фиксацией проводят один раз в день, желательно в одно и то же время, с учетом периода максимального проявления ожидаемых после введения вещества эффектов. Осмотр животных на предмет выявления заболеваемости или гибели проводят не реже двух раз в день.

10.3. Детальные клинические наблюдения для всех животных проводят однократно перед первым введением вещества (для внутригрупповых сравнений), затем после начала воздействия — не реже одного раза в неделю; манипуляции осуществляют вне клетки на стандартной арене, предпочтительно в одно и то же время дня; все полученные данные тщательно регистрируют с использованием принятых в исследовательской лаборатории систем оценки. Необходимо сводить к минимуму возможные вариации в условиях исследования и использование наблюдателей, не осведомленных о воздействии вещества.

Оценке и регистрации подлежат все симптомы, включая изменения кожи, шерсти, глаз, слизистых оболочек, наличие секрета и экскреции и автономной активности (слезотечение, пилоэрекция, размер зрачка, необычные типы дыхания); изменения в походке, позе, отношении к уходу, наличие клонических или тонических движений, стереотипия (например, слишком интенсивный груминг, повторяющиеся круговые движения) или странное поведение (например, самоповреждение, движение задом наперед) и др.

10.4. На четвертой неделе эксперимента должна быть изучена способность реагировать на различные стимулы (например, световые и проприоцептивные

стимулы), оценены сила схвата и моторная активность (используют описанные в литературе методы). Набор используемых процедур может быть различным.

10.5. На четвертой неделе эксперимента проводят обязательные функциональные исследования, за исключением случаев, когда 28-дневный эксперимент проводят как предварительный перед последующим субхроническим (90-дневным) экспериментом, в который и включают функциональные исследования. Кроме того, данные функциональных исследований, полученные при 28-дневном повторном введении вещества, позволяют облегчить выбор дозовых уровней для последующего субхронического опыта.

10.6. Как исключение функциональные наблюдения могут также не проводиться для групп животных, в которых проявляются другие признаки токсичности вещества, а их выраженность может повлиять на результаты функциональных тестов.

10.7. При некропии эстральные циклы всех самок могут быть исследованы (при необходимости) с помощью вагинальных мазков, чтобы получить информацию о стадии эстрального цикла на момент умерщвления, необходимую для гистологической оценки эстрогенчувствительных тканей.

11. *Масса тела и потребление пищи/воды.* Измерение массы тела животных проводят не реже одного раза в неделю. Если изучаемое вещество вводят с пищей или питьевой водой, то потребление воды и пищи также измеряют еженедельно.

## 12. Гематология.

12.1. По окончании эксперимента проводят следующие гематологические исследования: гематокрит, количество гемоглобина, эритроцитов, лейкоцитов (и лейкоцитарная формула), тромбоцитов и время / потенциал свертываемости крови и др., если вещество или его предполагаемые метаболиты имеют или могут иметь окислительные свойства, например, определение концентрации метгемоглобина и телец Гейнца.

12.2. Образцы крови отбирают непосредственно до или в процессе умерщвления животных и сохраняют в соответствующих условиях. Животных лишают корма за 12 ч до умерщвления<sup>1</sup>.

## 13. Клиническая биохимия.

13.1. Биохимические исследования по выявлению токсических эффектов в тканях, особенно действие на почки и печень, проводят в образцах крови, взятых у животных непосредственно перед / во время процедуры умерщвления животных (за исключением животных, найденных агонизирующими и / или умерщвленных до завершения эксперимента).

При исследовании плазмы и / или сыворотки определяют натрий, калий, глюкозу, общий холестерин, мочевины, креатинин, общий белок, альбумин и не менее 2 ферментов-индикаторов гепатоцеллюлярных эффектов: аланинаминотрансфераза (АЛТ), аспартатаминотрансфераза (АСТ), щелочная фосфатаза,  $\gamma$ -глутамил / транспептидаза и глутамат / дегидрогеназа, а также желчные кислоты. При необходимости дополнительно определяют ферменты (печеночного или другого происхождения) и билирубин.

13.2. Сбор и анализ мочи проводят на последней неделе эксперимента с определением следующих показателей: внешний вид, объем, осмотическое давление и удельный вес, рН, белок, глюкоза, кровь и клетки крови.

13.3. Дополнительно в случае необходимости исследуют сывороточные маркеры общего повреждения тканей или иные показатели, характеризующие воздействие определенного класса химических веществ, например, метаболический профиль — кальций, фосфаты, триглицериды, специфические гормоны и холинэстеразу.

13.4. При изучении тироидных гормонов (Т3, Т4 и TSH) необходимо исключить факторы, влияющие на вариабельность определения и абсолютные концентрации гормонов:

- время умерщвления из-за суточных колебаний концентраций гормонов;
- метод умерщвления, предотвращающий неоправданный стресс у животных, который может влиять на концентрации гормонов;
- диагностические комплекты для определения гормонов, которые могут различаться по калибровочным кривым.

Для точного выявления тироидактивных веществ более надежен гистопатологический метод, чем определение гормонов (приложение).

## ГЛАВА 5

### ИЗУЧЕНИЕ ПЕРОРАЛЬНОЙ ТОКСИЧНОСТИ ПРИ ПОВТОРНОМ ВОЗДЕЙСТВИИ В 90-ДНЕВНЫХ ОПЫТАХ НА ГРЫЗУНАХ

1. Метод по изучению пероральной токсичности при повторном воздействии в 90-дневных опытах на грызунах (OECD TG № 408) предназначен для получения информации о возможном вреде для здоровья при повторном введении вещества в течение длительного периода времени, включая период после прекращения материнского вскармливания, рост и взросление. Исследование выполняется после полученной первичной информации о токсичности в условиях острого опыта и 28-дневного опыта с изучением токсичности при повторном введении вещества.

Данное исследование позволяет получить информацию об основных токсических эффектах, выявить критические органы и способность вещества к аккумуляции; возможно получение данных по оценке уровня, при котором не наблюдаются неблагоприятные эффекты вещества (NOAEL); он может использоваться при выборе доз для проведения хронических опытов и установления критериев безвредности воздействия вещества на человека.

2. Особое внимание уделяется нейрологическим показателям, дается представление об иммунологических и репродуктивных эффектах. Обязательным является необходимость тщательных клинических наблюдений за состоянием животных для получения максимального объема информации.

3. При 90-дневном изучении токсичности должна создаваться возможность для выявления способности химических веществ вызывать нейротоксический, иммунотоксический эффекты, а также воздействовать на репродуктивные органы, что может служить основанием для дальнейших углубленных исследований.

4. Изучаемое вещество вводят ежедневно перорально в градуированных дозах нескольким группам экспериментальных животных в одном дозовом уровне на группу в течение 90 дней.

5. Процедура испытания, количество и пол животных.

5.1. В каждой дозе используют по 20 животных (10 самцов и 10 самок); при планируемом умерщвлении животных в течение эксперимента общее число животных увеличивают на количество, предназначенное для умерщвления до завершения исследования.

5.2. Целесообразно предусмотреть дополнительные сателлитные группы из 10 животных (по 5 каждого пола) для наблюдения за обратимостью, устойчивостью или отсроченным проявлением токсических эффектов, по крайней мере, в течение 14 дней после прекращения воздействия вещества.

6. Выбор доз.

6.1. Используют три экспериментальные и контрольную группы, если только не проводится изучение вещества в сокращенном объеме. Контрольных и опытных животных содержат в идентичных условиях; при использовании в опыте растворителя контрольная группа должна получать растворитель в максимальном из используемых объемов.

6.2. Уровни исследуемых доз выбирают на основании результатов эксперимента с повторным введением вещества, исследований по поиску диапазона доз с учетом всех имеющихся токсикологических и (токсико-) кинетических данных для тестируемого препарата или родственных веществ.

6.3. Максимальную дозу подбирают с целью вызвать токсические эффекты, не вызывая гибели или сильных страданий животных; последовательность снижения дозовых уровней выбирают с перспективой обнаружения любых дозозависимых реакций и установления уровня, при котором не наблюдаются неблагоприятные эффекты вещества (NOAEL). Как правило, 2- или 4-кратные интервалы обычно оптимальны для установления убывающих дозовых уровней, а добавление четвертой опытной группы животных иногда предпочтительнее использования больших интервалов (например, 6–10-кратных) между дозами.

6.4. Контрольная группа остается интактной или получает растворитель (в максимальном объеме), если он используется для введения изучаемого вещества, при этом условия содержания контрольных и опытных животных должны быть идентичными. При введении изучаемого вещества с диетой, приводящей к снижению потребления пищи, допустимо использование второй контрольной группы с целью отличить снижение аппетита животных от токсикологических изменений экспериментальной модели.

6.5. При использовании растворителя или других добавок учитывают эффекты, оказывающие влияние на абсорбцию, распределение, метаболизм или накопление изучаемого вещества; эффекты, влияющие на химические свойства изучаемого вещества, которые могут изменять характеристики его токсичности; эффекты, влияющие на потребление пищи и воды или пищевой статус животных.

7. Введение доз.

7.1. Животные получают изучаемое вещество 7 дней в неделю в течение 90 дней, иной режим введения (например, 5 дней в неделю) должен быть обоснован.

7.2. Максимальный объем однократно вводимой жидкости зависит от массы животного и не должен превышать 1 мл/100 г массы тела, за исключением водных растворов, которые допустимо вводить в объеме 2 мл/100 г массы тела.

7.3. Для изучаемых веществ вариabельность объема минимизируют подбором концентраций, чтобы все дозовые уровни вводить в одном объеме, за исключением едких и раздражающих, у которых при увеличении концентрации раздражающие эффекты усугубляются.

7.4. При введении веществ с диетой или питьевой водой используемые количества изучаемого вещества не должны нарушать нормальное питание или водный баланс. В случае введения вещества с диетой используют либо постоянную концентрацию (ppm), либо постоянный уровень доз в пересчете на массу тела животного.

7.5. При введении вещества с помощью зонда необходимо поддерживать постоянный уровень дозы в пересчете на массу тела животного, рассчитанную дозу вводить ежедневно в одно и то же время.

Если 90-дневное исследование проводится как предварительное к долговременному хроническому исследованию, в обоих исследованиях должны использоваться одинаковые диеты.

## 8. Наблюдения.

8.1. Период наблюдения составляет 90 дней. Для выявления отсроченного действия, длительности сохранения токсических эффектов или их исчезновения животных сателлитной группы содержат в течение соответствующего периода без воздействия вещества.

8.2. Общие клинические наблюдения проводят один раз в день в одно и то же время, учитывая период максимального проявления ожидаемых эффектов после введения вещества; состояние животных фиксируют. Не реже двух раз в день (в начале и конце каждого дня) животных осматривают для выявления клинических симптомов или гибели.

8.3. Детальные клинические наблюдения всех животных проводят перед первым введением вещества (для возможности внутригрупповых сравнений) и один раз в неделю после начала воздействия; наблюдения осуществляют вне клетки, на стандартном месте и в одно и то же время.

8.4. Наблюдения проводят опытные специалисты, все отмеченные эффекты тщательно регистрируют и оценивают с использованием принятой исследовательской лабораторией практики.

Оценке подлежат следующие параметры: изменения кожи, шерсти, глаз, слизистых оболочек, наличие секрета и экскреции и автономной активности (например, слезотечение, пилоэрекция, размер зрачка, необычные типы дыхания); изменения в походке, позе, груминг; наличие клонических или тонических движений, стереотипия (например, слишком интенсивный груминг, повторяющиеся круговые движения) или странное поведение (например, самоповреждение, движение задом наперед).

8.5. Офтальмологическое исследование с использованием офтальмоскопа или иного эквивалентного оборудования проводят до начала введения и в конце эксперимента, у всех животных или, в крайнем случае, в группе с максимальной

дозой и контрольной группе. При обнаружении изменений исследованию подлежат все экспериментальные животные.

8.6. По окончании введения, но не ранее 11-й недели воздействия у животных изучают реакции на различные внешние раздражители (слуховые, зрительные и проприоцептивные), оценивают мышечную силу и моторную активность, используя описанные в литературных источниках или альтернативные методы.

8.7. Функциональные исследования по окончании эксперимента не проводят:

- при наличии данных из других экспериментов;
- при отсутствии функциональных нарушений при ежедневных клинических наблюдениях;
- в группах животных с выявленными признаками токсичности степень выраженности может повлиять на проведение функциональных исследований.

9. Масса тела и потребление пищи / воды.

9.1. Всех животных взвешивают не реже одного раза в неделю.

9.2. Если изучаемое вещество вводят с пищей или питьевой водой, то потребление воды и пищи также измеряют еженедельно.

10. Гематология и клиническая биохимия.

10.1. Образцы крови отбирают в запланированные периоды эксперимента, при необходимости сохраняют в специальных условиях. По окончании исследования образцы крови отбирают непосредственно перед умерщвлением или во время процедуры умерщвления животных (за исключением животных, найденных агонизирующими и / или умерщвленных до завершения эксперимента).

10.2. Проводят следующие гематологические исследования: гематокрит, концентрация гемоглобина, количество эритроцитов, общий лейкоцитоз и лейкоцитарная формула, количество тромбоцитов и время / потенциал свертываемости крови.

10.3. Образцы крови для клинических биохимических исследований для выявления основных токсических эффектов в тканях, особенно на почки и печень, берут у животных перед умерщвлением или во время процедуры умерщвления; отбирают так же, как и для гематологических исследований. Животных лишают корма за 12 ч до умерщвления.

10.4. Анализы плазмы или сыворотки должен включать определение натрия, калия, глюкозы, общего холестерина, мочевины, креатинина, общего белка, альбумина и не менее двух ферментов – индикаторов гепатоцеллюлярных эффектов (АЛТ, АСТ), щелочная фосфатаза,  $\gamma$ -глутамилтранспептидаза и сорбитолдегидрогеназа). Измерения других ферментов (печеночного и иного происхождения) и желчных кислот, которые при определенных обстоятельствах могут дать полезную информацию, также можно включать в исследование. При необходимости дополнительно проводят определение ферментов печеночного (или другого происхождения) и билирубина.

10.5. Сбор и анализ мочи проводят на последней неделе эксперимента с определением следующих показателей: внешний вид, объем, осмотическое давление и удельный вес, рН, белок, глюкоза, кровь и клетки крови.

10.6. Дополнительно при необходимости исследуют сывороточные маркеры общего повреждения тканей или иные показатели, характеризующие воздействие определенного класса химических веществ, например, метаболический профиль — кальций, фосфаты, триглицериды, специфические гормоны и холинэстеразу.

## ГЛАВА 6 ИССЛЕДОВАНИЕ ХРОНИЧЕСКОЙ ТОКСИЧНОСТИ

1. Метод по изучению пероральной токсичности при хроническом воздействии в 12-месячном (и / или более) опыте на грызунах (OECD TG № 452) предназначен для получения информации о возможной опасности для здоровья, возрастающей от повторяющихся воздействий в течение большей части продолжительности жизни грызунов. Позволяет получить данные о токсическом воздействии вещества, определить органы-мишени, установить наивысший уровень воздействия, при котором не наблюдается вредный эффект воздействия (NOAEL), необходимый для установления критерия безопасности воздействия на организм человека.

2. Исследование выполняется поэтапно, на основании анализа всей доступной информации по испытуемому веществу (идентификация, химическая структура, физико-химические свойства, механизм действия, результаты любых *in vitro* и *in vivo* исследований токсичности, предполагаемое использование и вероятное воздействие на человеческий организм, доступные данные испытаний (Q)SAR и токсические свойства структурно родственных веществ, имеющиеся токсикокинетические данные (однократное и повторное введение) и данных, полученных при других исследованиях по изучению повторного воздействия (28 и / или 90 дней).

3. Целью исследований хронической токсичности является определение: опасных свойств химических веществ; органов-мишеней; зависимости «концентрация-ответ»; наивысшего уровня воздействия, при котором не наблюдается вредный эффект (NOAEL) или исходной точки для установления статистически достоверного нижнего предела концентрации, которая предопределяет изменения в ответных реакциях на вредное воздействие (EC<sub>10</sub> / BMC); прогнозирование хронической токсичности на уровне организма человека; предоставление данных для проверки гипотез относительно механизма действия. Обязательными являются тщательные клинические наблюдения за состоянием животных для получения максимально возможного количества информации.

4. Исследуемое вещество вводят ежедневно перорально в градуированных дозах нескольким группам экспериментальных животных в одном дозовом уровне на группу в течение 12 мес., так как этот период считается достаточным для выявления безусловных симптомов кумулятивной токсичности,

дифференцированных с проявлениями возрастных изменений. Изменение продолжительности 12-месячного воздействия, особенно в сторону сокращения, необходимо обосновать.

5. План исследований должен включать одно или несколько промежуточных умерщвлений, например, через 3 и 6 мес., для чего в начале опыта предусматривают дополнительные группы животных. В течение эксперимента животных тщательно и постоянно обследуют на предмет выявления признаков интоксикации; погибших или умерщвленных в ходе эксперимента животных подвергают аутопсии. По окончании исследования выживших животных умерщвляют и также проводят аутопсию.

6. Процедура испытания, количество и пол животных.

6.1. В каждой дозе используют такое количество животных, чтобы по окончании исследования в каждой группе оставалось достаточное для биологического и статистического анализа количество — минимум 20 животных для грызунов (10 самцов и 10 самок); при планируемом умерщвлении животных в течение эксперимента общее число животных увеличивают на количество, предназначенное для умерщвления до завершения исследования.

6.2. Вспомогательные (сателлитные) группы формируют, как правило, для опытной группы с максимальным уровнем воздействия и контроля (минимум по 10 животных; по 5 каждого пола для наблюдения за обратимостью, устойчивостью или отсроченным проявлением токсических эффектов не менее 4 недель, но не более одной трети от общего периода исследования после прекращения воздействия).

6.3. Используют три экспериментальные и контрольную группы, за исключением исследования с максимально возможной дозой. Контрольных и опытных животных содержат в идентичных условиях; при использовании в опыте растворителя контрольная группа должна получать растворитель в максимальном из используемых объемов.

6.4. Уровни исследуемых доз выбирают на основании результатов эксперимента с повторным введением вещества, исследований по поиску диапазона доз с учетом всех имеющихся токсикологических и (токсико-) кинетических данных для тестируемого препарата или родственных веществ.

6.5. Максимальную дозу подбирают для определения основных органов-мишеней и получения токсичных эффектов воздействия (например, изменения уровня сывороточного фермента, снижение более чем на 10% массы и др.), не вызывая гибели или сильных страданий животных. Максимальная доза должна быть ниже дозы, подтверждающей наличие токсичности, и превышать 1000 мг/кг в день.

6.6. Последовательность снижения дозовых уровней выбирают с перспективой обнаружения любых дозозависимых изменений и установления уровня, при котором не наблюдаются неблагоприятные эффекты вещества (NOAEL) или другие предполагаемые результаты исследования (BMD при минимальном уровне дозы). При установлении нижних пределов доз необходимо учитывать предполагаемый наклон кривой зависимости «доза-ответ» и дозы, вызывающие изменения в метаболизме, и / или вид токсического действия, когда

предполагается пороговая величина / исходная точка для экстраполяции низкой дозы.

6.7. При выборе дозы для исследований хронической токсичности и канцерогенности необходимо учитывать:

- знания или предположения о нелинейностях или точках изгиба и зависимости «доза-ответ»;

- токсикокинетические закономерности, а также уровни доз, при которых происходят или не происходят метаболическая индукция, насыщение или нелинейность между введенными и поглощенными дозами;

- признаки поражения, влияния или показатели воздействия на основные биологические процессы;

- основные (или предполагаемые) проявления механизма действия, как дозы, при введении которых начинает увеличиваться цитотоксичность, нарушается гормональный уровень, подавляется гомеостатический механизм и т. д.;

- интервалы кривой «доза-эффект», где необходима чрезвычайно надежная оценка, например, в пределах ожидаемых BMD или предполагаемых пороговых величин;

- уровни анализа предполагаемого воздействия на организм человека.

6.8. Контрольная группа остается интактной или получает растворитель (в максимальном объеме), если он используется для введения изучаемого вещества, при этом условия содержания контрольных и опытных животных должны быть идентичными. При введении изучаемого вещества с диетой, приводящего к снижению потребления пищи, допустимо использование второй контрольной группы с целью отличить снижение аппетита животных от токсикологических изменений экспериментальной модели.

6.9. При использовании растворителя или других добавок учитывают эффекты, оказывающие влияние на абсорбцию, распределение, метаболизм или накопление изучаемого вещества; эффекты, влияющие на химические свойства изучаемого вещества, которые могут изменять характеристики его токсичности; эффекты, влияющие на потребление пищи и воды или пищевой статус животных.

6.10. Исследование с использованием трех уровней доз не проводят, если в выполненных ранее тестах на одном уровне дозы ( $\leq 1000$  мг/кг массы тела/сут) отрицательных эффектов не установлено, и токсичность является маловероятной (по данным близких по структуре веществ). Максимальную дозу 1000 мг/кг массы тела/сут применяют только при наличии вероятности воздействия на людей более высоких доз.

7. Введение доз.

7.1. Животные получают изучаемое вещество 7 дней в неделю в течение 12 месяцев; иной режим введения (например, 5 дней в неделю) и/или более короткий (6 или 9 мес.) или более длинный (18 или 24 мес.) период исследований, должны быть обоснованы.

7.2. Максимальный объем однократно вводимой жидкости зависит от массы животного и не должен превышать 1 мл/100 г массы тела, за исключением водных растворов, которые допустимо вводить в объеме 2 мл/100 г массы тела. Колебания

в тестовом объеме должны быть сведены к минимуму путем корректировки концентрации до обеспечения постоянного объема всех уровней дозы. Потенциально разъедающие или раздражающие вещества являются исключительным случаем. Их необходимо разбавлять, чтобы избежать тяжелых локальных поражений. Щелочной баланс растворов, содержащих дозу, должен быть в интервале от 4 до 9 рН.

7.3. При введении с диетой или питьевой водой используют постоянную концентрацию (ppm) или постоянный уровень доз в пересчете на массу тела животного, которые не должны нарушать нормальное питание или водный баланс.

7.4. При введении вещества с помощью зонда необходимо поддерживать постоянный уровень дозы в пересчете на массу тела животного, рассчитанную дозу вводить ежедневно в одно и то же время.

## 8. Наблюдения.

8.1. Период наблюдения составляет 90 дней. Для выявления отсроченного действия, длительности сохранения токсических эффектов или их исчезновения животных сателлитной группы содержат в течение соответствующего периода без воздействия вещества.

8.2. Общие клинические наблюдения проводят один раз в день в одно и то же время, учитывая период максимума предполагаемого воздействия дозы; состояние животных фиксируют. Не реже двух раз в день (в начале и конце каждого дня) животных осматривают для выявления гибели или клинических симптомов с особым вниманием к токсикологически значимым признакам, в частности нейрофункциональным и нейроповеденческим реакциям.

8.3. Детальные клинические наблюдения всех животных проводят до начала воздействия (для внутригрупповых сравнений), к концу первой недели исследования и впоследствии ежемесячно; наблюдения осуществляют вне клетки, на стандартном месте и в одно и то же время.

8.4. Наблюдения проводят опытные специалисты, все отмеченные эффекты тщательно регистрируют и оценивают с использованием системы количественных показателей, четко оговоренных испытательной лабораторией. Необходимо следить за тем, чтобы варьирование в условиях наблюдения было минимальным.

8.5. Оценке подлежат следующие параметры: изменения кожи, шерсти, глаз, слизистых оболочек, наличие секрета и экскреции и автономной активности (например, слезотечение, пилоэрекция, размер зрачка, необычные типы дыхания); изменения в походке, положении тела, реакции на прикосновение, наличие клонических или тонических движений, стереотипия (например, чрезмерное умывание, однообразные движения по кругу) или аномалии поведения (например, членовредительство, хождение задом наперед).

8.6. Офтальмологическое исследование с использованием офтальмоскопа или иного эквивалентного оборудования проводят до начала введения и в конце эксперимента, у всех животных или, в крайнем случае, в группе с максимальной дозой и контрольной группе. При обнаружении изменений исследованию подлежат все экспериментальные животные. Частоту офтальмологических

осмотров увеличивают, если на основании структурного анализа или иных данных имеются сведения об офтальмологической токсичности.

8.7. У химических веществ с установленной в предварительных исследованиях (28 и/или 90 дней, повторное введение) потенциальной возможностью оказывать нейротоксическое воздействие изучают сенсорную химическую активность к различным внешним раздражителям (слуховые, зрительные и проприоцептивные), оценивают мышечную силу и моторную активность до начала исследования и затем в 3, 6, 9 и 12 мес., используя описанные в литературных источниках или альтернативные методы.

8.8. Для химических веществ, у которых в предварительных исследованиях на токсичность с повторным приемом дозы через 28 и/или 90 дней установлена потенциальная способность оказывать иммунотоксическое воздействие, дальнейшее изучение этих эффектов при необходимости проводят до 12 мес.

Измерения потребления пищи и питательности пищи следует производить еженедельно первые 13 недель и как минимум ежемесячно в дальнейшем.

Необходимо также учитывать потребление воды для исследований, в которых активность потребления воды изменяется. Измерения потребления воды следует проводить еженедельно первые 13 недель и как минимум ежемесячно в дальнейшем, когда вещество вводится через питьевую воду.

#### 9. Масса тела и потребление пищи / воды.

9.1. Всех животных взвешивают в начале исследования, минимум 1 раз в неделю первые 13 недель, затем ежемесячно.

9.2. Если изучаемое вещество вводят с пищей или питьевой водой, то потребление воды и пищи также измеряют еженедельно первые 13 недель и как минимум ежемесячно в дальнейшем. Необходимо также учитывать потребление воды для исследований, в которых активность потребления воды изменяется.

10. Образцы крови отбирают как минимум на 10 самцах и 10 самках каждой группы в 3, 6 и 12 мес., всегда используя одних и тех же животных, в запланированные периоды эксперимента, при необходимости — сохраняют в специальных условиях. По окончании исследования образцы крови отбирают принятым методом (сердечная пункция, из ретроглазной пазухи и др.) непосредственно перед умерщвлением или во время процедуры умерщвления животных (за исключением животных, найденных агонизирующими, и/или умерщвленных до завершения эксперимента), и по возможности хранят в специальных условиях.

11. Сбор и анализ мочи проводят, как минимум, у 10 самцов и 10 самок каждой группы в пробах, собранных за одинаковые промежутки времени, как и в случае с гематологией и клинической химией.

Измерения в 3 мес. не проводят в случае, если при идентичном уровне доз в 90-дневном эксперименте изменений в моче не отмечено.

## ГЛАВА 7

### ДАННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЙ И ПОДГОТОВКА ОТЧЕТА

#### 1. Гематология и клиническая биохимия.

1.1. При гематологических исследованиях в обязательном порядке изучаются следующие параметры: общая и лейкоцитарная формула, содержание эритроцитов и тромбоцитов, концентрация гемоглобина, гематокрит (гематокритное число), среднее гематокритное число (MCV), среднее содержание гемоглобина в эритроцитах (MCH), концентрация гемоглобина в эритроцитах (MCHC), протромбиновое время и время образования и активности тромбопластина; при наличии признаков анемии или других нарушений кроветворения — тельца Гейнца и/или другая атипичная морфология эритроцитов и метгемоглобин; при влиянии на кроветворную систему — ретикулярные клетки и цитология костного мозга.

1.2. Клинические биохимические показатели при исследовании токсического воздействия на ткани, особенно на почки и печень, определяют в пробах крови, полученных от минимум 10 самцов и 10 самок каждой группы за одинаковые временные интервалы, используя одних и тех же животных. Рекомендуется голодание для животных (за исключением мышей) вечером накануне забора крови.

Измерения в 3 мес. не проводят в случае, если при идентичном уровне доз в 90-дневном эксперименте изменений клинических биохимических параметров не отмечено.

1.3. Необходимый список изучаемых биохимических параметров включает: глюкозу, азот, мочевины, креатинин, общий белок, альбумин, кальций, натрий, калий, общий холестерин, минимум два анализа на гепатобилиарный статус (АЛТ, АСТ, глутаминат / дегидрогеназа, желчные кислоты), минимум два исследования на гепатобилиарный анализ (щелочная фосфатаза,  $\gamma$ -глутаминтрансфераза, 5-нуклеотидаза, общий билирубин, желчные кислоты). При необходимости определяют триглицериды, специфические гормоны, холинэстеразу или иные показатели в зависимости от наблюдаемого и/или ожидаемого воздействия изучаемого вещества.

1.4. Список изучаемых параметров при анализе мочи: внешний вид, объем, осмотическая концентрация раствора или относительная плотность, pH, общий белок и глюкоза. Другие исследования включают кетон, уробилиноген, билирубин и скрытую кровь. Дополнительные исследования могут быть использованы при необходимости расширить изучение наблюдаемых воздействий.

1.5. Дополнительно при необходимости исследуют сывороточные маркеры общего повреждения тканей или иные показатели, характеризующие воздействие определенного класса химических веществ, например, метаболический профиль — кальций, фосфаты, триглицериды, специфические гормоны и холинэстеразу.

#### 2. Патология.

##### 2.1. Некрозия.

2.1.1. Всех экспериментальных животных подвергают полной, детальной некропсии, включающей тщательное исследование наружной поверхности тела, всех отверстий, черепных, грудных, абдоминальных полостей и их содержимого.

При необходимости из животных (группы для промежуточных умерщвлений или вспомогательные), которых не подвергают аутопсии и дальнейшим процедурам, создают резерв, предназначенный для измерения отдельных важных показателей — нейро- или иммунотоксичность. Индикаторные животные подвергаются аутопсии в каждом отдельном случае по усмотрению руководителя исследования.

Значимые органы исследуют у всех животных, исключая описанных выше: надпочечник, мозг, придатки яичка, сердце, почки, печень, яичники, селезенка, яички, щитовидная железа (с оценкой постфиксации, с парашитовидной железой), матка (кроме найденных павшими и/или умерщвленных в промежуточных периодах). Все изучаемые органы отсекают при необходимости от прилегающих тканей и взвешивают в максимально быстрое время для предотвращения высыхания; парные органы (почки, надпочечники и др.) взвешивают отдельно. В исследованиях с использованием мышей взвешивание надпочечных желез необязательно.

2.1.2. Сохранению, предварительной обработке, фиксации в соответствующей среде и последующему гистопатологическому исследованию подвергают следующие ткани: все макроскопические повреждения, поджелудочная железа, аорта, мозг (включая полушария головного мозга, мозжечок и мозговой слой/варолиев мост), слепая кишка, шея, свертывающая железа, толстая кишка, двенадцатиперстная кишка, придаток семенника, глазные яблоки (включая сетчатку), бедро с суставами, желчный пузырь (для видов, отличных от крыс), гардерова железа, сердце, подвздошная кишка, тонкая кишка, почки, слезные железы (необязательно), печень, легкие, лимфатические узлы (поверхностные и глубокие), молочные железы самок, [назальные ткани], пищевод, [обонятельная луковица], яичники, поджелудочная железа, парашитовидная железа, периферический нерв, слизистая оболочка, предстательная железа, [прямая кишка], слюнные железы, семенной пузырек, скелетные мышцы, кожа, спинной мозг (трех уровней: шейный, среднегрудной и поясничный), селезенка, [грудная кость], желудок (кардиальный отдел желудка, железистый желудок), [зубы], яички, вилочковая железа, щитовидная железа, [язык], трахея, мочевой пузырь, матка (включая шейку), [мочеточник], [уретра], влагалище и часть костного мозга и / или свежий пунктат костного мозга (ткани, приведенные в квадратных скобках, не являются обязательными). В случае с парными органами (почки, надпочечники) следует сохранять оба органа. Любые другие органы, считающиеся на основе известных свойств исследуемого вещества возможными органами-мишенями, также следует сохранить.

Дополнительному исследованию подлежат другие органы и ткани, на необходимость изучения которых указывают клинические и другие данные. Консервации подлежат любые органы, которые на основании известных свойств изучаемого вещества, могут рассматриваться как мишени.

## 2.2. Гистопатология

### 2.2.1. Минимальные гистопатологическими анализами должны быть:

- все ткани из группы с высокой дозой и контрольной группы;
- все ткани животных, умерших или умерщвленных в течение исследования;
- все ткани, имеющие макроскопические аномалии;
- ткани органов-мишеней или ткани животных, имеющие изменения, связанные с проводимым исследованием, из группы, получавшей наивысшую дозу, и из всех других групп;
- в случае с парными органами (почки, надпочечники) должны быть исследованы оба органа.

Данные для каждого отдельного животного должны содержать все параметры по оценке воздействия, которые сводят в табличную форму, отражающую для каждой тестовой группы количество животных на начало исследования; количество животных, умерших во время исследования или умерщвленных по гуманным соображениям и время каждой смерти или умерщвления; количество обнаруженных признаков токсичности; описание наблюдаемых признаков токсичности, включая время начала, продолжительность и тяжесть любых токсических воздействий; количество животных, демонстрирующих патологию, тип патологии и процент животных, демонстрирующих каждый тип патологии.

Кроме данных, полученных в контроле исследования, в интерпретации результатов эксперимента важны данные контроля предыдущих исследований. Данные контроля предыдущих исследований должны использоваться, только если в текущем контроле имеются значительные отклонения, но приоритет над данными контроля предыдущих исследований должен иметь текущий контроль. Данные контроля предыдущих исследований должны предоставляться из той же лаборатории; должны соответствовать род, вид животных и направление исследований. Использование данных предыдущих исследований должно быть соотнесено с данными, накопленными в течение трех / пяти лет, предшествующих спорному исследованию.

По возможности, численные результаты должны быть оценены специальными и общепринятыми статистическими методами. Статистические методы и данные для анализа должны быть выбраны во время разработки исследования. При необходимости этот выбор должен предусматривать корректировку выживаемости.

## 3. Данные и отчет.

### 3.1. Данные.

3.1.1. Данные должны быть представлены для животных индивидуально. Дополнительно все данные обобщаются в табличной форме, где для каждой экспериментальной группы приводят число животных в начале исследования; число животных, найденных погибшими в течение эксперимента или умерщвленных из гуманных соображений с указанием времени гибели или умерщвления; число животных с выявленными признаками токсичности; описание наблюдавшихся признаков токсичности, включая время появления, продолжительность и тяжесть каждого токсического эффекта; число животных

с выявленными патологическими изменениями; типы этих изменений и процент животных, у которых наблюдался каждый из типов патологических изменений.

3.1.2. Если возможно, количественные результаты должны быть оценены соответствующим и в целом приемлемым статистическим методом. Статистические методы и анализируемые данные должны выбираться при планировании эксперимента.

### 3.2. Отчет.

3.2.1. Отчет о проведенных исследованиях должен включать следующую информацию.

#### *Изучаемое вещество:*

- физическая природа, чистота и физико-химические свойства;
- идентификационные данные.

#### *Растворитель (если применялся):*

- обоснование выбора растворителя, если это не вода.

#### *Экспериментальные животные:*

- вид и линия, использованные в эксперименте;
- число, возраст и пол животных;
- источник, условия содержания, диета и т. д.;
- индивидуальная масса животных в начале эксперимента.

#### *Условия эксперимента:*

- обоснование выбора уровней доз;
- детали технологии подготовки изучаемого вещества/приготовление диеты, полученные концентрации, стабильность и гомогенность препарата;
- детали введения изучаемого вещества;
- фактическая доза вещества (мг/кг массы/день), коэффициент пересчета концентраций изучаемого вещества в корме / питьевой воде (ppm) на фактическую дозу (мг/кг массы/день), если требуется;
- детали качества корма и воды.

#### *Необязательные для изучения показатели:*

- перечень изученных необязательных показателей.

#### *Результаты:*

- масса тела и изменения массы тела;
- потребление пищи и воды, если требуется;
- данные о токсических реакциях в зависимости от пола и дозовых уровней, включая признаки токсичности;
- природа, тяжесть и длительность клинических проявлений (обратимых или необратимых);
- результаты офтальмологических исследований;
- сенсорная активность, оценка силы схвата и моторной активности (если требуется);
- гематологические исследования с соответствующими исходными уровнями;
- клинические биохимические исследования с соответствующими исходными уровнями;

- масса тела при умерщвлении, масса внутренних органов и относительная масса внутренних органов;
- данные некропсии;
- детальное описание всех гистопатологических изменений;
- данные абсорбции, если имеются;
- статистическая обработка результатов при необходимости.

*Обсуждение результатов.*

**Рекомендуемые конечные точки  
для обнаружения эндокринных разрушителей (EDs) в TG 407**

Обязательные конечные точки	Опциональные конечные точки
<b>Масса</b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Яички</li> <li>- Придатки яичек</li> <li>- Надпочечник</li> <li>- Простата + семенные пузырьки с коагулирующими железами</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Яичники</li> <li>- Матка, включая шейку</li> <li>- Щитовидная железа</li> </ul>
<b>Гистопатология</b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Половые железы:               <ul style="list-style-type: none"> <li>- Яички и</li> <li>- Яичники</li> </ul> </li> <li>- Добавочные половые органы:               <ul style="list-style-type: none"> <li>- Придатки яичек,</li> <li>- Простата + семенные пузырьки с коагулирующими железами</li> <li>- Матка, включая шейку</li> </ul> </li> <li>- Надпочечник</li> <li>- Щитовидная железа</li> <li>- Влагалище</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Влагалищные мазки</li> <li>- Молочные мужские железы</li> <li>- Гипофиз</li> </ul>
<b>Измерение гормонов</b>	
	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Циркуляционные уровни T3, T4</li> <li>- Циркуляционные уровни TSH</li> </ul>