МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СОВЕТ ПО СТАНДАРТИЗАЦИИ, МЕТРОЛОГИИ И СЕРТИФИКАЦИИ
(МГС)

INTERSTATE COUNCIL FOR STANDARDIZATION, METROLOGY AND CERTIFICATION
(ISC)

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

**ГОСТ 32647— 2014**

# МЕТОДЫ ИСПЫТАНИЯ ПО ВОЗДЕЙСТВИЮ ХИМИЧЕСКОЙ ПРОДУКЦИИ НА ОРГАНИЗМ ЧЕЛОВЕКА

## Комбинированные исследования хронической токсичности и канцерогенности

Издание официальное

Москва
Стандартинформ
2019

gost.e-ecolog.ru

## Предисловие

Цели, основные принципы и общие правила проведения работ по межгосударственной стандартизации установлены ГОСТ 1.0 «Межгосударственная система стандартизации. Основные положения» и ГОСТ 1.2 «Межгосударственная система стандартизации. Стандарты межгосударственные, правила и рекомендации по межгосударственной стандартизации. Правила разработки, принятия, обновления и отмены»

**Сведения о стандарте**

1 ПОДГОТОВЛЕН Федеральным государственным унитарным предприятием «Всероссийский научно-исследовательский центр стандартизации, информации и сертификации сырья, материалов и веществ» (ФГУП «ВНИЦСМВ»), Техническим комитетом по стандартизации ТК 339 «Безопасность сырья, материалов и веществ» Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии на основе собственного перевода на русский язык англоязычной версии документа, указанного в пункте 5

2 ВНЕСЕН Федеральным агентством по техническому регулированию и метрологии

3 ПРИНЯТ Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации (протокол от 28 марта 2014 г. № 65-П)

За принятие проголосовали:

| Краткое наименование страны по МК (ИСО 3166) 004—97 | Код страны по МК (ИСО 3166) 004—97 | Сокращенное наименование национального органа по стандартизации |
|---|---|---|
| Азербайджан | AZ | Азстандарт |
| Армения | AM | Минэкономики Республики Армения |
| Беларусь | BY | Госстандарт Республики Беларусь |
| Казахстан | KZ | Госстандарт Республики Казахстан |
| Киргизия | KG | Кыргызстандарт |
| Молдова | MD | Молдова-Стандарт |
| Россия | RU | Росстандарт |
| Таджикистан | TJ | Таджикстандарт |
| Туркмения | TM | Главгосслужба «Туркменстандартлары» |
| Узбекистан | UZ | Узстандарт |
| Украина | UA | Минэкономразвития Украины |

4 Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 6 октября 2014 г. № 1274-ст межгосударственный стандарт ГОСТ 32647—2014 введен в действие в качестве национального стандарта Российской Федерации с 1 июня 2015 г.

5 Настоящий стандарт идентичен международному документу OECD Test № 453:2009 «Комбинированные исследования хронической токсичности и канцерогенности» («Combined Chronic Toxicity/Carcinogenicity Studies», IDT).

Наименование настоящего стандарта изменено относительно наименования указанного международного документа для приведения в соответствие с ГОСТ 1.5 (подраздел 3.6)

6 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

7 ПЕРЕИЗДАНИЕ. Сентябрь 2019 г.

*Информация о введении в действие (прекращении действия) настоящего стандарта и изменений к нему на территории указанных выше государств публикуется в указателях национальных стандартов, издаваемых в этих государствах, а также в сети Интернет на сайтах соответствующих национальных органов по стандартизации.*

*В случае пересмотра, изменения или отмены настоящего стандарта соответствующая информация будет опубликована на официальном интернет-сайте Межгосударственного совета по стандартизации, метрологии и сертификации в каталоге «Межгосударственные стандарты»*

© Стандартинформ, оформление, 2015, 2019

В Российской Федерации настоящий стандарт не может быть полностью или частично воспроизведен, тиражирован и распространен в качестве официального издания без разрешения Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии

## Содержание

1 Область применения . . . . . 1
2 Принцип исследования . . . . . 2
3 Описание метода . . . . . 3
4 Наблюдение . . . . . 8
5 Данные и отчет . . . . . 13
Библиография . . . . . 15

## Введение

Руководства ОЭСР по испытаниям химических веществ (TG) периодически пересматриваются с учетом научного прогресса, изменения норм оценивания и из соображений благополучия животных. Первоначальный проект Руководства 453 был принят в 1981 году. Расширение обновленного TG 453 было необходимо для того, чтобы отразить последние изменения в сфере благополучия животных и норм регулирования [2], [3], [4], [5], [6]. Обновление TG 453 осуществлялось параллельно с исправлениями в TG 451: исследования канцерогенности и 452: исследования хронической токсичности с целью получения дополнительных данных от использованных в исследовании животных и обеспечения дальнейшей информацией по выбору дозы.

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

# МЕТОДЫ ИСПЫТАНИЯ ПО ВОЗДЕЙСТВИЮ ХИМИЧЕСКОЙ ПРОДУКЦИИ НА ОРГАНИЗМ ЧЕЛОВЕКА

## Комбинированные исследования хронической токсичности и канцерогенности

OECD guidelines for the testing of chemicals.
Combined chronic toxicity/carcinogenicity studies

**Дата введения — 2015—06—01**

## 1 Область применения

Настоящий стандарт предназначен для тестирования широкого спектра химических веществ, включая пестициды и промышленные химикаты. Следует отметить, однако, что некоторые детали и требования могут отличаться для фармацевтических препаратов (см. Руководство S1B по тестированию канцерогенности фармацевтических препаратов Международной конференции по гармонизации).

Большая часть исследований хронической токсичности и канцерогенности осуществлялась на грызунах, и поэтому данный стандарт предназначен прежде всего для исследований, осуществляемых на особях этого вида. Если бы такие исследования потребовались для особей другого вида, изложенные принципы и методы также могли бы быть использованы, с надлежащими изменениями, вместе с теми, что описаны в ОЭСР TG 409, 90-дневное исследование пероральной токсичности повторяющейся дозы у негрызунов [7], как изложено в документе № 116 Руководства ОЭСР по разработке и проведению исследований хронической токсичности и канцерогенности [8].

В исследованиях хронической токсичности/канцерогенности используются три основных способа введения: пероральный, дермальный и ингаляторный. Выбор способа введения зависит от физических и химических свойств тестируемого вещества, а также от основного пути введения в организм человека. Дополнительная информация по выбору способа введения приведена в Руководстве № 116 [8].

В настоящем стандарте основное внимание уделяется пероральному способу введения как наиболее распространенному в исследованиях хронической токсичности и канцерогенности. Хотя долгосрочные исследования, включающие накожный или ингаляционный пути введения, также могут быть востребованы для оценки риска здоровью человека и/или по определенным нормативным требованиям, оба способа введения предполагают значительную техническую сложность. Такие исследования нужно разрабатывать для каждого случая отдельно, хотя руководство, составленное здесь для оценки и анализа хронической токсичности и канцерогенности при пероральном введении, могли бы лечь в основу документа для ингаляционного и/или дермального исследований (в отношении рекомендаций по срокам терапии, клиническим и патологическим показателям и т. д.). Имеются руководства ОЭСР по введению тестируемых веществ ингаляционным [8], [9] и накожным способами [8]. TG 412 [10] и TG 413 [11] вместе с методическим документом ОЭСР по исследованию острой аспирации [9] должны быть приняты во внимание при разработке более длительных исследований, затрагивающих ингаляционный способ введения. TG 410 [12] должен быть принят во внимание в случае тестирования, осуществляемого дермальным путем.

Комбинированные исследования хронической токсичности/канцерогенности дают информацию о возможной опасности для здоровья, которая может возникнуть в результате повторяющегося воздействия в течение всего жизненного цикла подопытных видов.

Исследование обеспечит получение данных о токсическом воздействии вещества, включая потенциальную канцерогенность, определит органы-мишени и возможность кумуляции. Оно может дать

**Издание официальное**

оценку наименьшего уровня наблюдаемого вредного воздействия для токсичных воздействий и, в случае негенотоксичных канцерогенов, для опухолевых реакций, которые могут быть использованы для установления критериев безопасности для введения человеку. Следует также подчеркнуть необходимость тщательного клинического наблюдения за животными для получения максимально возможного количества информации.

Цели исследований хронической токсичности/канцерогенности, охватываемые данным стандартом, включают:

- установление канцерогенных свойств химических веществ, проявляющихся в повышении процента новообразований, в увеличении доли злокачественных новообразований или сокращении времени появления новообразований, по сравнению с параллельными контрольными группами;
- определение времени появления новообразований;
- определение хронической токсичности химических веществ;
- определение органов-мишеней хронической токсичности и канцерогенности;
- описание зависимости «доза — реакция»,
- определение наименьшего уровня наблюдаемого вредного воздействия (NOAEL) или исходной точки для установления минимальной дозы (BMD);
- экстраполяция канцерогенного влияния на человека при низких уровнях воздействия;
- прогнозирование воздействия хронической токсичности на уровне человеческого организма;
- предоставление данных для проверки гипотез относительно механизма действия [3], [8], [13], [14], [15], [16].

## 2 Принцип исследования

Схема исследования состоит из двух параллельных фаз: хронической фазы и фазы канцерогенности (относительно продолжительности см. пункты 34 и 35 соответственно). Тестируемое вещество обычно вводится перорально, хотя возможно также тестирование ингаляторным или дермальным способом. Для хронической фазы тестируемое вещество вводят ежедневно градуированными дозами нескольким группам тестируемых животных, один уровень дозы на группу, как правило, в течение 12 месяцев, хотя может быть выбрана большая или меньшая продолжительность в зависимости от нормативных требований (см. пункт 34). Такая продолжительность была выбрана потому, что она достаточна для любых проявлений кумулятивной токсичности, не смешиваясь при этом с проявлениями возрастных изменений. План исследования может также включать одно или несколько промежуточных умерщвлений, например к трем и шести месяцам. Для этого можно добавить дополнительные группы животных (см. пункт 20). Во время канцерогенной фазы исследуемое вещество вводят ежедневно нескольким группам подопытных животных в течение большей части их жизненного цикла. Животные в обеих фазах тщательно изучаются относительно признаков токсичности и развития опухолевых поражений. Животным, которые умерли или были умерщвлены в ходе тестирования, проводится аутопсия. По окончании исследования выживших животных умерщвляют и также проводят аутопсию.

В оценке и анализе возможной канцерогенности и хронической токсичности химического вещества, до начала проведения исследования, испытательной лабораторией должна быть рассмотрена вся доступная информация по исследуемому веществу с тем, чтобы сфокусировать план исследования для более успешного тестирования его токсикологических свойств и минимизировать использование животных. Информация и рассмотрение способа действия предполагаемого канцерогена [3], [8], [13], [14], [15], [16] особенно важна, так как оптимальный план может отличаться в зависимости от того, известно ли, что вещество является генотоксическим канцерогеном или это только предполагается. Дальнейшие указания по оценке способа действия можно найти в Руководстве № 116 [8].

Данные, которые будут содействовать разработке исследования, включают: идентичность, химическую структуру и физико-химические свойства исследуемого вещества; любую информацию о механизме действия; результаты любых in vitro и in vivo исследований токсичности, включая тесты на генотоксичность; предполагаемое использование и вероятное воздействие на человеческий организм; доступные данные испытаний (Q)SAR на мутагенность/генотоксичность, канцерогенность и другие токсикологические свойства структурно родственных веществ; имеющиеся токсикокинетические данные (однократная доза, а также кинетика повторной дозы, при наличии) и данные, полученные из других исследований повторного воздействия. Измерение хронической токсичности может быть проведено после получения первоначальных данных о токсичности от 28-дневного и 90-дневного тестирования токсичности повторной дозы. Также полезную информацию дают краткосрочные исследования

стимуляции и активизации рака. Поэтапный подход к исследованию на канцерогенность следует рассматривать как часть общей оценки возможного неблагоприятного воздействия на здоровье определенного химического вещества [17], [18], [19], [20].

Статистические методы, наиболее подходящие для анализа результатов, с учетом экспериментального плана и цели, должны быть установлены до начала исследования. Вопросы для рассмотрения включают: должна ли статистика включать в себя корректировку для выживаемости, анализ рисков кумулятивной опухоли относительно продолжительности выживания, анализ времени возникновения опухоли и анализ в случае преждевременного прекращения жизни одной или нескольких групп. Руководство по соответствующим статистическим исследованиям и ключевые ссылки на международно признанные статистические методы приведены в документе № 116 [8] Руководства, а также в документе № 35 по анализу и оценке исследования хронической токсичности и канцерогенности [21].

При проведении исследования канцерогенности, руководящие принципы и соображения, изложенные в стандарте по вопросам распознавания, оценки и использования клинических симптомов, как гуманных критериев оценки для подопытных животных, используемых в оценке безопасности [22], в частности его пункт 62, всегда должен выполняться. В этом пункте говорится, что «в исследованиях с многократным введением дозы, когда животное демонстрирует прогрессирующие клинические признаки, что приводит к дальнейшему ухудшению состояния, необходимо принять решение умерщвлять животное из гуманных соображений или нет. Решение должно учитывать соотношение ценности информации, которая будут получена при дальнейшем использовании этого животного в исследовании, к его общему состоянию. Если будет принято решение оставить животное в исследовании, частота наблюдений должна быть увеличена по мере необходимости. Также можно без ущерба для целей тестирования временно прекратить введение дозы, если это облегчит боль или мучение, или уменьшить тест-дозу».

Подробные правила и обсуждение принципов выбора дозы для исследований хронической токсичности и канцерогенности можно найти в Руководстве № 116 [8], а также в публикациях двух Международных институтов биологических наук [23], [24]. Метод выбора основной дозы зависит от первоначальных целей или задач исследования (см. пункт 6). В выборе подходящего уровня дозы должен быть достигнут баланс между риском отсева с одной стороны и характеристикой ответных реакций на низкие дозы и их значимость — с другой. Это особенно актуально в случае такого комбинированного исследования хронической токсичности и канцерогенности.

Проведение комбинированного исследования хронической токсичности и канцерогенности требует большего анализа в сравнении с исследованиями хронической токсичности (TG 452) и канцерогенности (TG 451), проводимыми раздельно. Комбинированное исследование дает большую эффективность с точки зрения времени и стоимости и небольшое сокращение подопытных животных, в сравнении с проведением двух отдельных исследований, без ущерба для качества данных, как в хронической фазе, так и в фазе канцерогенности. Тем не менее необходимо внимательно отнестись к принципам выбора дозы (параграф 11 и 22—26) при проведении комбинированного исследования хронической токсичности и канцерогенности. Раздельные исследования могут являться необходимыми по определенным нормативным требованиям. Дальнейшие указания по разработке исследования комбинированной хронической токсичности и канцерогенности для достижения максимальной эффективности исследования с точки зрения возможности сокращения численности подопытных животных, а также через упорядочение различных экспериментальных методик можно найти в Руководстве № 116.

## 3 Описание метода

### 3.1 Животные

#### 3.1.1 Выбор видов

Данный стандарт охватывает главным образом оценку и анализ хронической токсичности и канцерогенности у грызунов (см. пункт 2). Использование негрызунов может рассматриваться, если имеющиеся данные позволяют предположить, что они являются более значимыми для прогнозирования воздействия на здоровье человека. Выбор вида должен быть обоснован. Предпочтительным видом грызунов являются крысы, хотя могут использоваться и другие виды, например мыши. Хотя использование мышей в тестировании на канцерогенность может иметь ограниченное применение [25], [26], [27], по некоторым действующим нормативным документом все же требуется исследование канцерогенности на мышах. Крысы и мыши были выбраны в качестве экспериментальных моделей за их сравнительно

короткую продолжительность жизни, широкое применение в фармакологических и токсикологических исследованиях, их восприимчивость к индукции новообразований и доступность этих хорошо исследованных видов. Вследствие этих качеств имеется большое количество информации об их психологии и патологии. Разработка и проведение исследований хронической токсичности и канцерогенности на видах негрызунов, когда это необходимо, должны быть основаны на принципах, содержащихся в этом стандарте, а также в ОЭСР TG 409: исследование токсичности повторной дозы, введенной перорально через 90 дней у негрызунов [7]. Дополнительная информация по выбору видов и рода содержится в Руководстве № 116 [8].

Следует использовать молодых здоровых половозрелых животных лабораторных видов. Комбинированные исследования хронической токсичности и канцерогенности следует проводить на животных того же рода и того же происхождения, что и животные, использовавшиеся в предварительных токсикологических исследованиях небольшой продолжительности, хотя, если известно, что животные этого вида и происхождения имеют проблемы в достижении общепринятых критериев выживаемости для долгосрочных исследований (см. Руководство № 116 [8]), следует рассмотреть использование рода животного, имеющего приемлемый уровень выживаемости для долгосрочного исследования. Женские особи должны быть нерожавшими и небеременными.

**3.1.2 Условия содержания и кормления**

Животные могут жить отдельно или содержаться в клетках небольшими группами одного пола. Отдельное проживание следует применять, только если это научно обоснованно [17], [18], [19]. Клетки надо размещать таким образом, чтобы свести к минимуму возможное влияние их местоположения. Температура в помещении с экспериментальными животными должна быть (22 ± 3) °С. Хотя относительная влажность должна быть как минимум 30 % и не должна превышать 70 % (если только не проводится уборка помещения), оптимальная влажность составляет 50 % — 60 %. Свет должен быть искусственным, с последовательностью 12 часов — свет, 12 часов — темнота. Для кормления могут использоваться традиционные лабораторные диеты с неограниченным количеством питьевой воды. Диета должна отвечать всем требованиям питания тестируемого вида. Содержание загрязняющих веществ, которые могут повлиять на результаты исследования, включая остатки пестицидов, стойкие органические загрязнители, фитоэстрогены, тяжелые металлы и микотоксины и т. д., должно быть по возможности минимизировано. Аналитические данные по питанию и уровню загрязняющих веществ в пище должны собираться периодически, как минимум в начале исследования и когда меняется используемая партия, и их следует включать в заключительный отчет. Должны также предоставляться аналитические данные по питьевой воде, используемой в исследовании. На выбор пищи могут влиять необходимость введения примеси и удовлетворение пищевых потребностей животных, когда исследуемое вещество вводится в диетический рацион.

**3.1.3 Подготовка**

Должны использоваться здоровые животные, которые прошли адаптацию в лабораторных условиях как минимум в течение семи дней и над которыми прежде не ставились эксперименты. В случае с грызунами введение доз следует начинать как можно раньше, после отлучения от матери и адаптации, желательно до того как животным исполнится восемь недель. Тестируемые животные должны быть описаны по роду, виду, происхождению, полу, массе тела и возрасту. В начале исследования разница в массе подопытных животных должна быть минимальна и не превышать ± 20 % от средней массы всех животных, задействованных в исследовании, отдельно каждого пола. Животные должны быть случайным образом распределены на контрольную и экспериментальные группы. После распределения заметной разницы в средней массы тела между группами каждого пола быть не должно. Если же она имеется, следует по возможности повторить распределение. Каждое животное должно быть помечено индивидуальным идентификационным номером, и этот номер следует нанести на перманентной основе, с помощью татуировки, вживления микрочипа или другим подходящим способом.

**3.2 Основное испытание**

**3.2.1 Количество и пол животных**

Должны использоваться животные обоих полов. Следует использовать такое количество животных, чтобы была возможна статистическая и биологическая оценка. Для грызунов каждая дозируемая группа (как это предусмотрено в пункте 22) и параллельная ей контрольная группа, предназначенные для канцерогенной фазы исследования, должны содержать не менее 50 животных каждого пола. В зависимости от цели исследования можно увеличить статистическую значимость основных оценок, разместив животных неравномерно по разным уровням дозы, с более чем 50 животными в низкодозируемых

группах, например для оценки канцерогенного потенциала в малых дозах. Однако следует признать, что умеренное повышение размера группы будет обеспечивать сравнительно небольшое увеличение статистической значимости исследования. Каждая дозируемая группа (как изложено в пункте 22) и параллельная ей контрольная группа, предназначенные для фазы хронической токсичности исследования, должны содержать не менее 10 животных каждого пола, если это грызуны. Следует отметить, что это число меньше, чем в исследовании хронической токсичности TG 452. Интерпретация данных от сокращенного количества животных в группе фазы хронической токсичности, однако, будет подкрепляться большим числом животных канцерогенной фазы исследования. В исследованиях с использованием мышей дополнительные животные могут быть необходимы в каждой группе фазы хронической токсичности, чтобы провести все необходимые гематологические анализы. Более подробную информацию о статистических методах исследования и выборе уровня доз для максимальной статистической мощности можно найти в руководстве № 116 [8].

**3.2.2 Резерв для промежуточных умерщвлений, вспомогательные группы и индикаторные животные**

При исследовании можно сделать резерв для промежуточных умерщвлений, например в шесть месяцев, для получения данных о развитии токсикологических изменений и данных о механизме воздействия, если это научно обоснованно. Когда такая информация уже имеется от предыдущих исследований токсичности повторной дозы, промежуточные умерщвления не могу считаться научно обоснованными. Животные, используемые в фазе исследования хронической токсичности, длящейся, как правило, 12 месяцев (см. пункт 34), предоставляют данные промежуточного умерщвления для канцерогенной фазы исследования, что позволяет сократить количество животных, используемых в целом.

Также в исследование в фазе хронической токсичности могут включаться вспомогательные группы для отслеживания обратимости любых токсикологических изменений, вызванных химическими веществами при исследовании. Они могут быть ограничены группой с самым высоким уровнем дозы в исследовании и контрольной группой. Если потребуется, в ходе исследования может быть добавлена группа индикаторных животных (обычно, по пять особей каждого пола) для отслеживания стадии заболевания [31]. Дальнейшие указания по разработке исследования, включающего промежуточные умерщвления, вспомогательных и индикаторных животных, при сведении к минимуму количества животных, используемых в целом, содержатся в Руководстве № 116 [8].

Если вспомогательные животные и/или промежуточные умерщвления включены в схему исследования, количество животных, входящее в каждую из этих групп, как правило, составляет 10 животных каждого пола, а общее количество животных, включенных в исследование, должно быть увеличено на количество животных, которое должно быть умерщвлено до конца исследования. Промежуточное умерщвление и вспомогательные животные, как правило, проходят те же обследования, что и животные фазы хронической токсичности основного исследования, в том числе контроль массы тела, продуктов питания/потребления воды, измерения гематологической и клинической биохимии и исследования на патологию, хотя также может быть сделан резерв (в группе промежуточного умерщвления) для измерений, ограничивающихся конкретными, ключевыми параметрами, такими как нейротоксичность или иммунотоксичность.

**3.2.3 Группы доз и дозировка**

Указания по всем аспектам выбора дозы и интервалов между дозами содержится в Руководстве № 116 [8]. Следует использовать как минимум три уровня доз и параллельный контроль для хронической и канцерогенной фаз. Чаще всего уровни дозы основываются на результатах краткосрочных исследований повторной дозы или исследованиях обнаружения диапазона. Необходимо принимать во внимание любые существующие токсикологические и токсикокинетические данные по тестируемому или родственным тестируемому веществам.

В фазе исследования хронической токсичности полное исследование с использованием трех уровней доз не является необходимым, если можно предполагать, что тестирование на одной дозе, эквивалентной не менее 1000 мг/кг массы тела/сутки, вряд ли даст эффекты воздействия. Это предположение должно быть основано на информации из предварительных исследований и из оценки, что токсичность не предполагается, исходя из данных по структурно родственным веществам. Может применятся ограничение 1000 мг/кг массы тела/сутки, за исключением тех случаев, когда воздействие на человека указывает на необходимость использования более высокого уровня дозы.

Если нет ограничений по физико-химической природе или биологическому воздействию исследуемого вещества, должна быть выбрана самая высокая доза для определения основных органов-мишеней и токсических эффектов. Однако следует избегать страданий, тяжелой токсичности, болей или

смерти. Самый высокий уровень дозы следует выбрать для получения доказательств токсичности, как, например, о токсичности свидетельствуют невозможность набрать массу теля (примерно 10 %). Однако в зависимости от целей исследования (см. пункт 6) верхняя доза ниже, чем доза, подтверждающая наличие токсичности, может быть выбрана, например, если доза вызывает токсическое действие, которое тем не менее слабо отражается на продолжительности жизни или массе тела.

Уровни доз и интервалы между дозами могут быть выбраны для установления дозозависимого эффекта и, в зависимости от механизма действия испытуемого вещества, NOAEL или других предполагаемых результатов исследования, например BMD (см. пункт 27). Условия, которые должны быть приняты во внимание при установлении нижней дозы, включают: предполагаемый наклон кривой дозовой зависимости; дозы, при которых могут происходить важные изменения в метаболизме или механизме токсического действия, когда пороговая величина предполагается или когда предполагается исходная точка для экстраполяции низкой дозы. При проведении комбинированного исследования канцерогенности/хронической токсичности основная цель заключается в получении информации об оценке рисков канцерогенности, а информация о хронической токсичности, как правило, является вторичной задачей. Это должно быть учтено при выборе доз и интервалов между дозами для исследования.

Избранная разница в уровне доз будет зависеть от целей исследования и параметров тестируемого вещества и не может быть прописана в этом стандарте. Но интервалы доз, отличающиеся в 2—4 раза, оптимальны для установления уровней более низких доз, а при использовании очень больших интервалов (например, диапазон примерно 6—10) между дозировками предпочтительно добавление четвертой тестируемой группы. В целом следует избегать использования диапазона выше 10, а его применение должно быть обоснованно.

Как изложено далее в руководстве № 116 [8], вопросы, которые следует учитывать при выборе дозы, включают:

- знания или предположения о нелинейностях или точках перегиба в зависимости «доза — ответ»;
- токсикокинетику и диапозон доз, когда имеет место или отсутствует метаболическая индукция, насыщение или нелинейность между внешними и внутренними дозами;
- признаки поражения, влияния или показатели воздействия на основные биологические процессы;
- основные (или предполагаемые) проявления механизма действия, такие как дозы, от которых начинает увеличиваться цитотокичность, нарушается гормональный уровень, подавляется гомеостатический механизм и т. д.;
- интервалы кривой «доза — эффект», где необходима чрезвычайно надежная оценка, например в пределах ожидаемых BMD (исходная точка для установления минимальной дозы) или предполагаемых пороговых величин;
- уровни анализа предполагаемого воздействия на организм человека, особенно в выборе средних и низких доз.

Контрольная группа не должна получать исследуемое вещество или может получать, если она используется при введении тестируемого вещества. За исключением введения исследуемого вещества, с животными из контрольной группы следует обращаться тем же способом, что и с экспериментальными группами. Если используется среда, контрольная группа должна получать ее в максимальном объеме от используемого в экспериментальных группах. Если исследуемое вещество вводится с пищей и тем самым заметно снижает потребление пищи из-за снижения ее вкусовых качеств, будет полезна контрольная, получающая такое же питание и служащая для более адекватного контроля.

**3.2.4 Подготовка доз и введение исследуемого вещества**

Как правило, исследуемое вещество вводится перорально, через пищу, или питьевую воду, или зонд. Дополнительная информация о способах и методах введения содержится в Руководстве № 116 [8]. Способ и метод введения зависят от цели исследования, физических/химических свойств вещества, его биологической усвояемости и основного способа и метода введения в человеческий организм. Должно быть дано обоснование выбранного способа и метода введения. Как правило, в интересах благополучия животных способ введения с помощью зонда следует выбирать только для тех веществ, которые предполагают данный способ и метод введения человеку (например, лекарственные препараты). Для веществ в составе продуктов питания или загрязняющих химических веществ, включая пестициды, введение обычно осуществляется через пищу или питьевую воду. Однако для некоторых сценариев воздействия, например при профессиональном воздействии, введение другими способами может быть более подходящим.

При необходимости исследуемое вещество растворяется или вносится в соответствующую среду. Следует при необходимости уделить внимание следующим характеристикам среды или других

вспомогательных веществ: влияние на абсорбцию, распределение, метаболизм или задержку исследуемого вещества; влияние на химические свойства исследуемого вещества, которые могут повысить его токсические свойства; влияние на потребление пищи или воды или обусловленное питанием состояние животных. Рекомендуется, где возможно, использовать в первую очередь водные растворы/суспензии, затем рассматривать раствор эмульсии в масле (например, кукурузное масло) и затем искать возможное использование других сред. Для сред, отличных от воды, должны быть известны их токсические свойства. Должна иметься информация о стабильности исследуемого вещества и однородности растворов с дозой или пищей (при необходимости) в условиях введения (например, пища).

Для веществ, вводимых с пищей или питьевой водой, важно убедиться, что включенное количество исследуемого вещества не препятствует нормальному питанию или потреблению воды. В долгосрочных исследованиях токсичности, использующих введение с пищей, концентрация химического вещества в пище не должна в норме превышать ограничение в 5 % от общего количества потребляемой пищи, чтобы избежать пищевого дисбаланса. Когда тестируемое вещество вводится в пищу, могут использоваться или постоянная концентрация в пище (мг/кг или ppm), или постоянный уровень дозы в показателях массы тела животного, подсчитываемых еженедельно. Другое использование должно быть описано.

В случае перорального введения животные получают дозу исследуемого вещества ежедневно (семь дней в неделю), как правило, в течение 12 месяцев (хроническая фаза) или 24 месяцев (фаза канцерогенности). Любой другой режим дозирования, например пять дней в неделю, должен быть обоснован. В случае нанесения на кожу животные, как правило, подвергаются воздействию исследуемого вещества в течение не менее шести часов в сутки семь дней в неделю, как указано в TG 410 [12], сроком на 12 месяцев (хроническая фаза) или 24 месяца (фаза канцерогенности). Воздействие ингаляционным способом длится шесть часов в день семь раз в неделю, но может быть использовано воздействие пять часов в день, если это обоснованно. Общая длительность воздействия обычно составляет 12 месяцев (хроническая фаза) или 24 месяца (фаза канцерогенности). Если воздействию «только через нос» подвергаются виды грызунов, отличные от крыс, длительность воздействия может быть изменена, чтобы минимизировать видоспецифичные тяжелые недомогания. Воздействие продолжительностью менее шести часов должно быть обоснованно. См. также TG 412 [10].

Когда исследуемое вещество вводится животным через зонд, следует использовать желудочный зонд или подходящую полую трубку в одно и то же время ежедневно. Как правило, одна доза будет вводиться раз в день. Когда состав вызывает раздражение, можно поддерживать ежедневную дозировку путем введения небольших доз (дважды в день). Максимальный объем жидкости, который может быть введен единовременно, зависит от размеров подопытного животного. Объем должен держаться как можно ниже и не превышать 1мл/100 г массы грызунов. 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. Тестирований при концентрациях, которые могут разъедать или раздражать желудочно-кишечный тракт, следует избегать.

**3.2.5 Продолжительность исследования**

Период дозирования и продолжительность хронической фазы этого исследования, как правило, 12 месяцев, хотя метод исследования позволяет сокращать (например, шесть или девять месяцев) или увеличивать (например, 18 или 24 месяца) продолжительность исследования, в зависимости от определенных нормативных требований или для конкретных целей. Отклонения от продолжительности воздействия в 12 месяцев должны быть обоснованны, особенно в случае сокращения сроков. Введение доз, отнесенных к этой фазе, должно быть завершено в назначенное время для оценки хронической токсичности и неопухолевых патологий. Вспомогательные группы, включенные для наблюдения за обратимостью любых токсикологических изменений и стимулируемые химическим веществом, следует держать без дозировок не менее четырех недель, но не более одной трети от общего периода исследования после прекращения воздействия.

Продолжительность фазы канцерогенности этого исследования будет, как правило, длиться 24 месяца для грызунов, являясь большей частью нормального жизненного цикла подопытных животных. Более короткие или более длительные исследования могут быть использованы в зависимости от продолжительности жизни видов животных в исследовании, но должны быть обоснованны. Для определенных видов мышей, например виды AKR/J, C3H/J или C57BL/6J, продолжительность в 18 месяцев может являться наиболее подходящей. Ниже приводятся некоторые рекомендации по продолжительности,

окончании исследования и выживаемости; дальнейшие указания, включая рассмотрение вопроса о приемлемости исследования отрицательной канцерогенности, относящейся к выживаемости в исследовании, приведены в Руководстве № 116 [8]:

- следует рассмотреть прекращение исследования, если число выживших в группах с низкой дозой или контрольной группе ниже 25 %;
- в случае, когда только в группах с высокой дозой умирают преждевременно вследствие токсичности, исследование не прекращается;
- выживаемость каждого пола следует рассматривать отдельно;
- исследование не должно длиться дольше того момента, когда данные, получаемые от него, уже недостаточны для статистически достоверной оценки.

## 4 Наблюдение

### 4.1 Фаза хронической токсичности

В начале и в конце каждого дня, включая выходные и праздники, необходимо осуществлять контроль заболеваемости и смертности всех животных, а также токсикологически значимые признаки. Общее клиническое наблюдение должно осуществляться как минимум один раз в день, предпочтительно в одно и то же время, принимая во внимание период максимума предполагаемого воздействия дозы в случае применения введения через зонд.

Подробное клиническое обследование должно быть проведено как минимум один раз до начала воздействия (учитывая предмет исследования), к концу первой недели исследования и впоследствии ежемесячно. Протокол наблюдений должен быть согласован так, чтобы обеспечить минимальную разницу между отдельными наблюдателями и независимость от тестовой группы. Эти обследования необходимо делать вне клетки постоянного пребывания, каждый раз в одном месте в одно и то же время. Их следует тщательно фиксировать, желательно использовать систему количественных показателей, четко оговоренную испытательной лабораторией. Необходимо следить за тем, чтобы варьирование в условиях наблюдения было минимальным. Отмеченные признаки должны включать: изменения кожи, шерсти, глаз, слизистых оболочек, возникновение секреции и экскреции и автономной активности (например, слезоотделение, пилоэрекция, размер зрачка, аномальный способ дыхания) и т. д. Изменения в походке, положении тела, реакции на прикосновение, как и наличие клонических или тонических движений, стереотипы поведения (например, чрезмерное умывание, однообразные движения по кругу) или аномальное поведение (например, членовредительство, хождение задом наперед) также должны регистрироваться [33].

Офтальмологический осмотр с использованием офтальмоскопа или другого подходящего инструмента следует проводить всем животным до первого введения исследуемого вещества. По окончании исследования этот осмотр желательно провести всем животным, но как минимум группе с высокой дозой и контрольной группе. Если обнаружены изменения, имеющие отношение к терапии, следует осмотреть всех животных. Если структурный анализ или другие данные говорят об офтальмологической токсичности, тогда частота офтальмологических осмотров должна быть увеличена.

Для химических веществ, для которых предварительные исследования на токсичность с повторным приемом дозы через 28 дней и/или 90 дней показали потенциальную возможность оказывать нейротоксическое воздействие, сенсорную реактивность к раздражителям различного типа (например, слуховые, визуальные и проприоцептивные раздражители) [34], [35], [36], оценку силы схвата [37] и двигательной активности [38] можно проводить, по выбору, до начала исследования и в 3-месячный период после начала исследования, вплоть до 12 месяцев, а также по окончании исследования (если оно длится более 12 месяцев). Дополнительные сведения о возможных последующих процедурах приведены в списке литературы соответственно. Однако можно использовать и другие, не приведенные в списке процедуры.

Для химических веществ, где предварительные исследования на токсичность с повторным приемом дозы через 28 и/или 90 дней показали потенциальную возможность оказывать иммунотоксическое воздействие, дальнейшие исследования этого результата могут, по желанию, проводиться по окончании исследования.

#### 4.1.1 Масса тела, потребление пищи/воды

Все животные должны взвешиваться в начале эксперимента, как минимум раз в неделю первые 13 недель и как минимум ежемесячно в дальнейшем. Измерения потребления пищи и питательности

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

**4.1.2 Гематология и клиническая биохимия**

В исследованиях, при которых задействуются грызуны, гематологические исследования необходимо проводить всем исследуемым животным (10 самцам и 10 самкам каждой группы), на третий, шестой и 12 месяцы, а также при прекращении исследования (если оно длится более 12 месяцев). В случае с мышами могут потребоваться вспомогательные животные для того, чтобы проводить все необходимые гематологические исследования (см. пункт 19). В исследованиях с негрызунами, пробы будут браться у меньшего количества животных (например, четыре особи каждого пола каждой группы в случае с исследованием собак), во время промежуточного взятия проб и по окончании исследования, как описано для грызунов. Нет необходимости проводить измерения ни у грызунов, ни у негрызунов в три месяца, если за предыдущие 90 дней при аналогичном уровне дозы не наблюдалось воздействия на гематологические параметры. Пробы крови следует брать из указанных мест, например сердечная пункция или из ретро-глазной пазухи, под анестезией.

Необходимо исследовать приведенный список параметров [39]: общая и дифференциальная лейкоцитарная формула, содержание эритроцитов, содержание 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. Другие гематологические параметры, такие как тельца Гейнца или другая атипичная морфология эритроцитов и метгемоглобина, могут быть измерены по мере необходимости в зависимости от токсичности вещества. В целом в зависимости от наблюдаемого и/или ожидаемого эффекта от данного вещества должен использоваться гибкий подход. Если химические вещества оказывают влияние на кроветворительную систему, можно также измерить число ретикулярных клеток и сделать цитологию костного мозга, хотя они не обязательны для регулярного проведения.

Клинические биохимические измерения для исследований основного токсического воздействия на ткани и особенно влияние на почки и печень следует проводить на пробах крови, полученных от как минимум 10 самцов и 10 самок каждой группы за одинаковые временные интервалы, как предписано для гематологических исследований, всегда используя одних и тех же животных. В случае с мышами могут потребоваться вспомогательные животные для того, чтобы провести все необходимые клинические биохимические исследования. В исследованиях с негрызунами образцы будут браться у меньшего количества животных (например, четырех животных каждого пола в каждой группе при исследованиях собак), во время промежуточного взятия проб и по окончании исследования, как описано для грызунов. Нет необходимости проводить измерения в три месяца ни у грызунов, ни у негрызунов, если за предыдущие 90 дней при аналогичном уровне дозы не наблюдалось воздействия на клинические биохимические параметры. Рекомендуется[1)] голодание для животных (за исключением мышей) вечером накануне забора крови. Необходимо исследовать приведенный список параметров [38]: глюкоза, моча (азот мочевины), креатинин, общий белок, альбумин, кальций, натрий, калий, общий холестерин, как минимум два анализа на гепатоцеллюлярный анализ (аланин-аминотрансфераза, аспартат-аминотрансфераза, глютаминат дегидрогеназа, желчные кислоты) [39] и как минимум два анализа на гепатобилиарный анализ (щелочная фосфатаза, гамма-глутаминтрансфераза, 5'-нуклеотидаза, общий билирубин, желчные кислоты) [40]. Другие клинические химические показатели, такие как триглицерид натощак, специфические гормоны и холинэстераза, могут быть измерены в случае необходимости в зависимости от токсичности вещества. В целом необходим гибкий подход в зависимости от наблюдаемого и/или ожидаемого воздействия каждого конкретного вещества.

---

[1)] Для ряда измерений в сыворотке и плазме, особенно глюкозы, ночное голодание является предпочтительным. Основной причиной этого предпочтения является то, что увеличение изменчивости, которое неизбежно возникло бы без голодания, маскировало бы более слабовыраженные эффекты и усложнило бы интерпретацию. Однако следует отметить, что ночное голодание может влиять на общий обмен веществ животных и, в частности, в исследованиях питания, может нарушить ежедневное воздействие исследуемого вещества. Все животные должны осматриваться в одном и том же физиологическом состоянии и желательно запланировать детальный или неврологический осмотр на день, отличный от дня клинических биохимических проб.

Анализ мочи должен проводиться у всех исследуемых животных (10 самцов и 10 самок каждой группы) на образцах, собранных за одинаковые промежутки времени, как и в случае с гематологией и клинической химией. Нет необходимости проводить измерения в три месяца, если за предыдущие 90 дней при аналогичном уровне дозы не наблюдалось воздействия на мочу. В экспертные рекомендации по исследованию клинической патологии был включен следующий список параметров [27]: 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.

Как правило, считается, что основные гематологические и клинические биохимические параметры необходимо определять до начала терапии при исследованиях собак, но нет необходимости их определять в исследованиях грызунов [39]. Однако если исторические исходные данные (см. пункт 58) недостаточны, следует уделить внимание созданию таких данных.

**4.1.3 Патология (макроскопическая аутопсия)**

Все животные в исследовании, как правило, подвергаются полной, детальной макроскопической аутопсии, которая включает тщательное исследование наружной поверхности тела, всех отверстий, черепных, грудных и брюшных полостей и их содержимого. При этом мог быть сделан резерв (в группах для промежуточных умерщвлений или во вспомогательных группах) для измерений, ограниченных отдельными, важными показателями, такими как нейротоксичность или иммунотоксичность (см. пункт 21). Этих животных не нужно подвергать аутопсии и дальнейшим процедурам, описанным в последующих пунктах. Индикаторные животные могут требовать аутопсии в каждом отдельном случае, на усмотрение руководителя исследования.

Значимые органы следует собрать у всех животных, исключая тех, которые упомянуты выше. Надпочечник, мозг, придатки яичка, сердце, почки, печень, яичники, селезенка, яички, щитовидная железа (оценив постфиксацию, с паращитовидной железой) и матка всех животных (кроме тех, что были найдены умершими и/или были промежуточно умерщвлены) должны быть отсечены, если необходимо, от прилегающих тканей и взвешены как можно быстрее после отсечения для предотвращения высыхания.

Следующие ткани должны быть законсервированы в наиболее подходящем средстве фиксации в качестве образца ткани и для запланированного дальнейшего микроскопического исследования [41] (ткани в квадратных скобках являются необязательными):

| | | | |
|---|---|---|---|
| все макроскопические повреждения | сердце | поджелудочная железа | желудок (кардиальный отдел желудка, железистый желудок) |
| поджелудочная железа | подвздошная кишка | паращитовидная железа | [зубы] |
| аорта | тонкая кишка | периферический нерв | яичко |
| мозг (включая полушария головного мозга, мозжечок и мозговой слой/варолиев мост) | почки | слизистая | вилочковая железа |
| слепая кишка | слезные железы (не обязательно) | предстательная железа | щитовидная железа |
| шея | печень | [прямая кишка] | [язык] |
| свертывающая железа | легкие | слюнные железы | трахея |
| толстая кишка | лимфатические узлы (и поверхностные, и глубокие) | семенной пузырек | мочевой пузырь |
| двенадцатиперстная кишка | молочные железы самок | скелетные мышцы | матка (включая шейку) |
| придаток семенника | [назальные ткани] | кожа | [мочеточник] |
| глазные яблоки (включая сетчатку) | пищевод | спинной мозг (трех уровней: шейный, среднегрудной и поясничный) | [уретра] |

| | | | |
|---|---|---|---|
| [бедро с суставами] | [обонятельная луковица] | селезенка | влагалище |
| желчный пузырь (для видов, отличных от крыс) | яичники | [грудная кость] | часть костного мозга и/или свежий пунктат костного мозга |
| гардерова железа | | | |

В случае с парными органами, например почки, надпочечники, следует сохранять оба органа. Клинические и другие данные могут потребовать изучения дополнительных тканей. Любые другие органы, считающиеся на основе известных свойств исследуемого вещества возможными органами-мишенями, также следует сохранить. В исследованиях, где используется дермальный способ введения, должны быть сохранены те же органы, что установлены в списке для перорального введения, а также необходимо сохранить образцы кожи с места нанесения. В ингаляторных исследованиях список сохраняемых и исследуемых тканей дыхательных путей должен следовать рекомендациям TG 412 [9] и TG 413 [10]. Для других органов/тканей (и в дополнение к отдельно сохраняемым тканям из дыхательных путей) список органов, как он установлен для перорального введения, должен быть пересмотрен.

**4.1.4 Гистопатология**

Имеется руководство по наработанным методам в рамках токсикологических патологических исследований [41]. Минимальными 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, демонстрирующие связанные с проводимой терапией изменения, в группе с высокой дозировкой и всех животных всех других групп;
- в случае с парными органами, например почки, надпочечники, должны быть исследованы оба органа.

**4.2 Фаза канцерогенности**

Должны контролироваться заболеваемость или смерть всех животных, а также особые токсикологически значимые признаки, обычно в начале и в конце каждого дня, включая выходные и праздники. Животные должны дополнительно проверяться раз в день для выявления конкретных признаков токсикологического значения. В случае исследований с использование зонда животные должны быть проверены непосредственно после введения дозы. Особое внимание следует обратить на развитие опухолей. Время появления опухоли, расположение, размеры, внешний вид и развитие каждой видимой или ощутимой опухоли должны быть зарегистрированы.

Все животные должны взвешиваться в начале терапии, как минимум раз в неделю первые 13 недель и как минимум ежемесячно в дальнейшем. Измерения потребления пищи и питательности пищи следует производить еженедельно первые 13 недель и как минимум ежемесячно в дальнейшем. Измерения потребления воды следует проводить еженедельно первые 13 недель и как минимум ежемесячно в дальнейшем, когда вещество вводится через питьевую воду. Необходимо также учитывать потребление воды для исследований, в которых активность потребления воды изменяется.

**4.2.1 Гематология, клиническая биохимия и другие измерения**

В целях извлечения как можно большего количества информации, полученной в исследовании, особенно для анализа способа воздействия, для гематологии и клинической биохимии могут браться образцы крови, хотя это остается на усмотрение руководителя исследования. Целесообразным может быть анализ мочи. Данные по животным, используемым в фазе исследования хронической токсичности, как правило, длящегося 12 месяцев (см. пункт 34), обеспечат информацию по этим параметрам. Дальнейшие рекомендации по важности сбора таких образцов, как части исследования канцерогенности, содержатся в Руководстве № 116 [8]. Если решено брать образцы крови, они должны быть собраны в конце периода исследования, непосредственно перед или как часть процедуры умерщвления животных. Они должны быть взяты из указанного места, например путем сердечной пункции или из ретро-орбитальной пазухи, под наркозом. Также может быть подготовлен для изучения клинический анализ крови, особенно если органом-мишенью оказался костный мозг, хотя значение исследования клинического анализа крови в фазе канцерогенности для оценки канцерогенных/онкогенных потенциалов находится под сомнением [39].

**4.2.2 Патология (макроскопическая аутопсия)**

Все животные, участвующие в исследовании, кроме пробных животных и других вспомогательных животных (см. пункт 20), как правило, подвергаются полной, детальной макроскопической аутопсии, которая включает тщательное исследование наружной поверхности тела, всех отверстий, черепных, грудных и брюшных полостей и их содержимого. Индикаторным животным и другим вспомогательным животным в отдельных случаях может требоваться аутопсия, по усмотрению руководителя исследования. Взвешивание органов обычно не является частью исследования канцерогенеза, так как возрастные изменения, а на более поздних стадиях развитие опухолей, искажают ценность измерения веса органов. Они, однако, могут иметь решающее значение для определения оценки обоснованности доказательства и особенно для анализа способа воздействия. Если они являются частью вспомогательного исследования, они должны собираться не позднее одного года после начала исследования.

Следующие ткани должны быть законсервированы в наиболее подходящем средстве фиксации и в качестве образца ткани, и для запланированного дальнейшего микроскопического исследования [41] (ткани в квадратных скобках являются необязательными):

| | | | |
|---|---|---|---|
| все макроскопические повреждения | сердце | поджелудочная железа | желудок (кардиальный отдел желудка, железистый желудок) |
| поджелудочная железа | подвздошная кишка | паращитовидная железа | [зубы] |
| аорта | тонкая кишка | периферический нерв | яичко |
| мозг (включая полушария головного мозга, мозжечок и мозговой слой/варолиев мост) | почки | слизистая | вилочковая железа |
| слепая кишка | слезные железы (не обязательно) | предстательная железа | щитовидная железа |
| шея | печень | [прямая кишка] | [язык] |
| свертывающая железа | легкие | слюнные железы | трахея |
| толстая кишка | лимфатические узлы (и поверхностные, и глубокие) | семенной пузырек | мочевой пузырь |
| двенадцатиперстная кишка | молочные железы самок | скелетные мышцы | матка (включая шейку) |
| придаток семенника | [назальные ткани] | кожа | [мочеточник] |
| глазные яблоки (включая сетчатку) | пищевод | спинной мозг (трех уровней: шейный, среднегрудной и поясничный) | [уретра] |
| [бедро с суставами] | [обонятельная луковица] | селезенка | влагалище |
| желчный пузырь (для видов, отличных от крыс) | яичники | [грудная кость] | часть костного мозга и/или свежий пунктат костного мозга |
| гардерова железа | | | |

В случае с парными органами, например почки, надпочечники, следует сохранять оба органа. Клинические и другие данные могут потребовать изучения дополнительных тканей. Любые другие органы, считающиеся на основе известных свойств исследуемого вещества, возможными органами-мишенями, также следует сохранить. В исследованиях, где используется дермальный способ введения, должны быть сохранены те же органы, что указаны в списке для перорального введения, а также необходимо сохранить образцы кожи с места нанесения. В ингаляторных исследованиях список сохраняемых и исследуемых тканей дыхательных путей должен следовать рекомендациям TG 412 [9] и TG 413 [10].

Для других органов/тканей (и в дополнение к отдельно сохраняемым тканям из дыхательных путей) список органов, как он установлен для перорального введения, должен быть пересмотрен.

**4.2.3 Гистопатология**

Имеется руководство по наработанным методам в рамках токсикологических патологических исследований [41]. Минимальными 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, демонстрирующие связанные с проводимой терапией изменения, в группе с высокой дозировкой и всех животных всех других групп;
- в случае с парными органами, например почки, надпочечники, должны быть исследованы оба органа.

## 5 Данные и отчет

### 5.1 Данные

Данные по каждому животному должны быть представлены по всем оцениваемым параметрам. Кроме того, все данные должны быть представлены в табличной форме с указанием для каждой исследуемой группы: количества животных в начале исследования; количества животных, найденных мертвыми во время исследования или умерщвленных по гуманным соображениям, и времени смерти или любого гуманного умерщвления; количества демонстрируемых признаков токсичности; описания наблюдаемых признаков токсичности, в том числе времени начала, продолжительности и тяжести любого токсического воздействия; количества животных с поражениями, типов поражений и процента животных относительно каждого типа поражения. Сводные данные таблицы должны обеспечить средние и стандартные отклонения (для непрерывных данных теста) животных, показывающие токсические эффекты или повреждения, в дополнение к классификации поражений.

Данные контроля предыдущих исследований могут быть полезны при интерпретации результатов исследования, например в случае, когда имеются признаки того, что данные, представленные параллельными наблюдениями, существенно отличаются от последних данных контрольных животных той же исследовательской лаборатории/колонии.

Данные контроля предыдущих исследований, если оцениваются, должны предоставляться из той же лаборатории, относиться к животным того же возраста и вида, быть созданы в течение пяти лет, предшествовавших спорному исследованию.

При необходимости численные результаты должны быть оценены надлежащим и в целом приемлемым статистическим методом. Статистические методы и данные для анализа должны выбираться в ходе разработки исследования (см. пункт 9). Выбор должен предусматривать корректировки для выживаемости, если это необходимо.

### 5.2 Отчет

Отчет об исследовании должен содержать следующую информацию:

Исследуемое вещество:

- физические природа, чистота и физико-химические свойства;
- идентификационные данные;
- источник вещества;
- номер партии;
- сертификат химического анализа.

Среда (при необходимости):

- обоснование выбора среды (если это не вода).

Подопытные животные:

- вид/род и обоснование сделанного выбора;
- число, возраст, пол в начале исследования;
- происхождение, условия содержания, питание и т. д.;
- вес каждого животного в начале исследования.

Данные об условиях проведения исследования:

- обоснование метода введения и выбора дозы;

- по необходимости статистические методики, используемые для анализа данных;
- подробное описание приготовления состава тестируемого вещества/пищи;
- аналитические данные по достигнутой концентрации, стабильности и гомогенности препарата;
- способ введения вещества и подробное описание введения исследуемого вещества;
- при ингаляционных исследованиях: был ли задействован только нос или все тело;
- фактическая доза (мг/кг в день) и переводной коэффициент от концентрации исследуемого вещества в пище/питьевой воде к фактической дозе, если возможно;
- качество пищи и воды.

**Результаты (сводные таблицы данных и персональных данных животных должны быть представлены)**

Общие:

- данные о выживших;
- масса/изменения массы;
- потребление еды, подсчет энергетической ценности, если проведен, и потребление воды, если возможно;
- токсикокинетические данные (если возможно);
- офтальмология (если возможно);
- гематология (если возможно);
- клиническая химия (если возможно).

Клинические результаты:

- признаки токсичности;
- охват (и, если выявлена, тяжесть) любой аномалии;
- характер, точность и продолжительность клинических наблюдений (были они промежуточными или постоянными).

Данные аутопсии:

- конечная масса тела;
- вес органов и их соотношения, если это необходимо;
- результаты аутопсии; распространенность и тяжесть нарушений.

Гистопатология:

- неопухолевые гистопатологические данные;
- опухолевые гистопатологические данные;
- корреляция между общими и микроскопическими данными;
- детальное описание всех связанных с лечением гистопатологических результатов, в том числе строгость градуировки;
- информация о любом сравнительном исследовании мазков.

**Статистическая обработка результатов (при необходимости)**

Изучение результатов включает:

- изучение возможности моделирования;
- соотношение зависимости «доза — ответ»;
- данные исторического контроля;
- рассмотрение любой формы воздействия;
- определение BMD, NOAEL или LOAEL;
- значимость для человека.

Выводы.

## Библиография


[1] Руководящий документ OECD Test № 453 «Combined Chronic Toxicity/Carcinogenicity Studies»

[2] OECD (1995), Report of the Consultation Meeting on Sub-chronic and Chronic Toxicity/Carcinogenicity Testing (Rome, 1995), internal working document, Environment Directorate, OECD, Paris

[3] EPA (2005). Guidelines for Carcinogen Risk Assessment Risk Assessment Forum U.S. Environmental Protection Agency Washington, DC

[4] Combes RD, Gaunt, I, Balls M (2004). A Scientific and Animal Welfare Assessment of the OECD Health Effects Test Guidelines for the Safety Testing of Chemicals under the European Union REACH System. ATLA 32, 163—208

[5] Barlow S.M., Greig J.B., Bridges J.W. et al (2002). Hazard identification by methods of animalbased toxicology. Food. Chem. Toxicol. 40, 145—191

[6] Chhabra R.S., Bucher J.R., Wolfe M., Portier C. (2003). Toxicity characterization of environmental chemicals by the US National Toxicology Programme: an overview. Int. J. Hyg. Environ. Health 206, 437—445

[7] OECD (1998), Repeat Dose 90-day Oral Toxicity Study in Non-Rodents. Test Guideline № 409, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD, Paris

[8] OECD (2009), Draft Guidance Document on the Design and Conduct of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Series on Testing and Assessment No. 116, available on the OECD public website for Test Guidelines

[9] OECD (2009), Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing. Series on Testing and Assessment № 39, ENV/JM/MONO (2009) 28, OECD, Paris

[10] OECD (2009), Subacute Inhalation Toxicity: 28-Day Study, Test Guideline №. 412, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD, Paris

[11] OECD (2009), Subchronic Inhalation Toxicity: 90-Day Study, Test Guideline No. 413, OECD, Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD, Paris

[12] OECD (1981), Repeated Dose Dermal Toxicity: 21/28-day Study, Test Guideline No. 410, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD, Paris

[13] Boobis A.R., Cohen S.M., Dellarco V., McGregor D., Meek M.E., Vickers C., Willcocks D. & Farland, W. IPCS Framework for analyzing the Relevance of a Cancer Mode of Action for Humans. Crit. Rev. in Toxicol, (2006) 36:793—801

[14] Cohen S.M., Meek M.E., Klaunig J.E., Patton D.E., and Fenner-Crisp P.A. (2003). The human relevance of information on carcinogenic Modes of Action: An Overview. Crit. Rev. Toxicol. 33:581—589

[15] Holsapple M.P., Pitot H.C., Cohen S.N., Boobis A.R., Klaunig J.E., Pastoor T., Dellarco V.L. & Dragan Y.P. (2006). Mode of Action in Relevance of Rodent Liver Tumors to Human Cancer Risk. Toxicol. Sci. 89:51—56

[16] Meek E.M., Bucher J.R., Cohen S.M., Dellarco V., Hill R.N., Lehman-McKemmon L.D., Longfellow D.G., Pastoor T., Seed J. & Patton D.E. (2003). A Framework for Human Relevance analysis of Information on Carcinogenic Modes of Action. Crit. Rev. Toxicol. 33:591—653

[17] Carmichael N.G., Barton H.A., Boobis A.R. et al (2006). Agricultural Chemical Safety Assessment: A Multisector Approach to the Modernization of Human Safety Requirements. Crit. Rev. Toxicol. 36, 1—7

[18] Barton H.A., Pastoor T.P., Baetcke T. et al (2006). The Acquisition and Application of Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion (ADME) Data in Agricultural Chemical Safety Assessments. Crit. Rev. Toxicol. 36, 9—35

[19] Doe J.E., Boobis A.R., Blacker A. et al (2006). A Tiered Approach to Systemic Toxicity Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. Crit. Rev. Toxicol. 36, 37—68

[20] Cooper R.L., Lamb J.S., Barlow S.M. et al (2006). A Tiered Approach to Life Stages Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. Crit. Rev. Toxicol. 36, 69—98

[21] OECD (2002), Guidance Notes for Analysis and Evaluation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Series on Testing and Assessment No. 35 and Series on Pesticides № 14, ENV/JM/MONO(2002)19, OECD, Paris.

[22] OECD (2000), Guidance Document on the recognition, assessment, and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation, Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris

[23] Rhomberg L.R., Baetcke K., Blancato J., Bus J., Cohen S., Conolly R., Dixit R., Doe J., Ekelman K., Fenner-Crisp P., Harvey P., Hattis D., Jacobs A., Jacobson-Kram D., Lewandowski T., Liteplo R., Pelkonen O., Rice J., Somers D., Turturro A., West W., Olin S. Issues in the Design and Interpretation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies in Rodents: Approaches to Dose Selection Crit Rev. Toxicol. 37 (9) 729—837 (2007)

[24] ILSI (International Life Sciences Institute) (1997). Principles for the Selection of Doses in Chronic Rodent Bioassays. Foran J.A. (Ed.). ILSI Press, Washington, DC

[25] Griffiths S.A., Parkinson C., McAuslane J.A.N. and Lumley C.E. (1994). The utility of the second rodent species in the carcinogenicity testing of pharmaceuticals. The Toxicologist 14(1):214

[26] Usui T., Griffiths S.A. and Lumley C.E. (1996). The utility of the mouse for the assessment of the carcinogenic potential of pharmaceuticals. In D'Arcy POF & Harron DWG (eds). Proceedings of the Third International Conference on Harmonisation. Queen's University Press, Belfast. pp. 279—284

[27] Carmichael N.G., Enzmann H., Pate I., Waechter F. (1997). The Significance of Mouse Liver Tumor Formation for Carcinogenic Risk Assessment: Results and Conclusions from a Survey of Ten Years of Testing by the Agrochemical Industry. Environ Health Perspect 105:1196—1203

[28] EEC Council Directive 86/609/EEC on the approximation of laws, regulations and administrative provisions of the Member States regarding the protection of animals used for experimental and other scientific purposes. Official Journal, 29, L358, 18th December 1986

[29] National Research Council, 1985. Guide for the care and use of laboratory animals. NIH Publication No. 86-23. Washington D.C., US. Dept. of Health and Human Services

[30] GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, December, 1989). Publication on the Planning and Structure of Animal Facilities for Institutes Performing Animal Experiments. ISBN 3-906255-06-9

[31] GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, 2006). Microbiological monitoring of laboratory animals in various housing systems

[32] Diehl K-H., Hull R., Morton D., Pfister R., Rabemampianina Y., Smith D., Vidal J-M., van de Vorstenbosch C. 2001. A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. Journal of Applied Toxicology, 21:15—23

[33] IPCS (1986). Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals. Environmental Health Criteria Document № 60

[34] Tupper D.E., Wallace R.B. (1980). Utility of the Neurologic Examination in Rats. Acta Neurobiol. Exp., 40, 999—1003

[35] Gad S.C. (1982). A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. J. Toxicol.Environ. Health, 9, 691—704

[36] Moser V.C., McDaniel K.M., Phillips P.M. (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of Amitraz. Toxicol. Appl. Pharmacol., 108, 267—283

[37] Meyer O.A., Tilson H.A., Byrd W.C., Riley M.T. (1979). A Method for the RoutineAssessment of Fore- and Hind-limb Grip Strength of Rats and Mice. Neurobehav. Toxicol., 1, 233—236

[38] Crofton K.M., Howard J.L., Moser V.C., Gill M.W., Reiter L.W., Tilson H.A., MacPhail R.C. (1991). Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. Neurotoxicol. Teratol., 13, 599—609

[39] Weingand K., Brown G., Hall R. et al. (1996). Harmonisation of Animal Clinical Pathology Testing in Toxicity and Safety Studies. Fundam. & Appl. Toxicol., 29: 198—201

[40] EMEA (draft) document 'Non-clinical guideline on drug-induced hepatotoxicity' (Doc. Ref. EMEA/CHMP/SWP/a50115/2006)

[41] Crissman J.W., Goodman D.G., Hildebrandt P.K. et al. (2004). Best Practices Guideline: Toxicological Histopathology. Toxicologic Pathology 32, 126—131

УДК 661:615.099 МКС 13.020.01

Ключевые слова: химическая продукция, воздействие на организм человека, метод испытаний, комбинированные исследования, хроническая токсичность, канцерогенность

Редактор переиздания *Н.Е. Рагузина*
Технические редакторы *В.Н. Прусакова, И.Е. Черепкова*
Корректор *Е.Р. Ароян*
Компьютерная верстка *А.В. Софейчук*

Сдано в набор 23.09.2019. Подписано в печать 03.10.2019. Формат 60 × 84 1/8. Гарнитура Ариал.
Усл. печ. л. 2,79. Уч.-изд. л. 2,30.

Подготовлено на основе электронной версии, предоставленной разработчиком стандарта

ИД «Юриспруденция», 115419, Москва, ул. Орджоникидзе, 11.
gost.e-ecolog.ru gost.e-ecolog.ru

Создано в единичном исполнении во ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ»
для комплектования Федерального информационного фонда стандартов,
117418 Москва, Нахимовский пр-т, д. 31, к. 2.
gost.e-ecolog.ru gost.e-ecolog.ru

gost.e-ecolog.ru