МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СОВЕТ ПО СТАНДАРТИЗАЦИИ, МЕТРОЛОГИИ И СЕРТИФИКАЦИИ
(МГС)
INTERSTATE COUNCIL FOR STANDARDIZATION, METROLOGY AND CERTIFICATION
(ISC)

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

ГОСТ 32643— 2014

МЕТОДЫ ИСПЫТАНИЯ ПО ВОЗДЕЙСТВИЮ ХИМИЧЕСКОЙ ПРОДУКЦИИ НА ОРГАНИЗМ ЧЕЛОВЕКА

Токсичность подострая ингаляционная: 28-дневное исследование

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 бюджетным учреждением здравоохранения «Российский регистр потенциально опасных химических и биологических веществ» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ФБУЗ «Российский регистр потенциально опасных химических и биологических веществ» Роспотребнадзора); Федеральным государственным унитарным предприятием «Всероссийский научно-исследовательский центр стандартизации, информации и сертификации сырья, материалов и веществ» (ФГУП «ВНИЦСМВ»); Техническим комитетом по стандартизации № 339 «Безопасность сырья, материалов и веществ» 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 24 сентября 2014 г. № 1210-ст межгосударственный стандарт ГОСТ 32643—2014 введен в действие в качестве национального стандарта Российской Федерации с 1 июня 2015 г.

5 Настоящий стандарт идентичен международному документу OECD Test № 412:2009 «Подострая ингаляционная токсичность: 28-дневное исследование» («Subacute Inhalation Toxicity: 28-Day Study», 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

Введение

Настоящий стандарт был разработан с целью комплексного описания токсичности исследуемого вещества при вдыхании в результате повторного воздействия в течение ограниченного периода времени (28 дней).

В целях повышения качества исследования и минимизации числа привлеченных животных вся имеющаяся об исследуемом веществе информация должна быть рассмотрена в экспериментальной лаборатории до начала исследования. Информация, которая может помочь при выборе подходящих для испытания концентраций, включает в себя тождественность, химическую структуру и физико-химические свойства испытуемого препарата; результаты опытов на токсичность *in vivo* или *in vitro*; предполагаемую область применения и вероятность воздействия на человека; если имеются, то данные (Q)SAR и данные о токсичности структурно-родственных препаратов; а также данные, полученные в результате исследования острой токсичности при ингаляционном воздействии. Если в ходе исследования ожидаются или наблюдаются проявления нейротоксичности, руководитель исследования может принять решение о включении соответствующих анализов, таких как функциональная наблюдательная батарея (ФНБ) и измерение моторной активности. Хотя, если определение времени экспозиции относительно специфических осмотров может быть критичным, проведение дополнительных мероприятий не должно препятствовать целям базисного исследования.

Слабые растворы исследуемого препарата, обладающего разъедающим или раздражающим действием, могут тестироваться в концентрациях, которые приведут к заданному классу токсичности [2]. При воздействии на животных этими препаратами целевые концентрации должны быть достаточно низкими, чтобы не вызвать выраженную боль или дистресс, и достаточно высокими для того, чтобы расширить кривую «концентрация-отклик» до уровней, которые соответствуют нормативным и научным целям исследования. Данные концентрации должны быть выбраны в каждом отдельном случае, желательно с опорой на адекватно выполненное дальнометрическое исследование, которое позволит получить информацию о критичных конечных точках, любых порогах раздражения и времени проявления (см. пункт 2.3.1). Необходимо привести обоснование для выбора концентрации.

Агонизирующие животные или животные, очевидно испытывающие боль или демонстрирующие признаки страдания и истощения, должны быть гуманно умерщвлены. Агонизирующие животные рассматриваются как животные, погибшие во время испытания. Критерии для принятия решения об умерщвлении агонизирующих или жестоко страдающих животных, а также руководство по определению признаков прогнозируемой или приближающейся смерти изложены в руководстве [3].

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

МЕТОДЫ ИСПЫТАНИЯ ПО ВОЗДЕЙСТВИЮ ХИМИЧЕСКОЙ ПРОДУКЦИИ НА ОРГАНИЗМ ЧЕЛОВЕКА

Токсичность подострая ингаляционная: 28-дневное исследование

OECD guidelines for the testing of chemicals. Subacute inhalation toxicity: 28-day study

Дата введения — 2015—06—01

1 Область применения

Настоящий стандарт разработан с целью получить данные для количественной оценки рисков при ингаляции. Группы грызунов, состоящие из пяти самцов и пяти самок, 6 ч в день на протяжении 28 дней подвергают воздействию:

a) исследуемого вещества в трех или более уровнях концентрации;

b) отфильтрованного воздуха (негативный контроль);

c) среды (исследование среды).

Как правило, животных подвергают воздействию пять дней в неделю, но воздействие в течение семи дней в неделю также допустимо.

Испытанию всегда подвергают самцов и самок, но если известно, что один пол более восприимчив к действию исследуемого вещества, то самцов и самок подвергают воздействию разных уровней концентрации. Настоящий стандарт позволяет руководителю исследования включать в исследование вспомогательные (реверсивные группы), бронхоальвеолярный лаваж (БАЛ), неврологические тесты и добавочные исследования (анализы) клинической патологии и гистопатологические исследования для более полной характеристики токсичности исследуемого вещества.

Настоящий стандарт позволяет охарактеризовать вредные эффекты, возникающие вследствие повторного ежедневного воздействия исследуемым веществом в течение 28 дней. Данные, полученные в результате 28-дневного исследования подострой ингаляционной токсичности, могут быть применены для количественной оценки рисков (если за ним не следует 90-дневное исследование субхронической ингаляционной токсичности). Данные также могут предоставить информацию о выборе концентрации для более долгосрочного испытания, например, для 90-дневного исследования субхронической ингаляционной токсичности.

Настоящий стандарт по проведению испытаний не предназначен для испытания наноматериалов. Термины, использованные в настоящем стандарте, можно найти в документе [2].

2 Описание метода

2.1 Животные

2.1.1 Выбор видов

В качестве подопытных следует использовать молодых здоровых половозрелых грызунов из обычно применяемых лабораторных линий. Предпочтительно использовать крыс. Использование других видов необходимо обосновать.

2.1.2 Подготовка

Самки должны быть нерожавшими и небеременными. На день отбора для эксперимента животные должны быть в возрасте от семи до девяти недель. Диапазон колебания массы тела животных для каждого пола не должен превышать ± 20 % средней массы тела всех животных, применяемых в иссле-

Издание официальное

довании, отдельно каждого пола. Животных отбирают в случайном порядке и маркируют, что позволяет идентифицировать каждое из них, и содержат в клетках в течение пяти дней до начала испытания для адаптации к лабораторным условиям.

2.1.3 Условия содержания и кормления

Животных следует помечать индивидуальными идентификаторами, если возможно, подкожными маяками-ответчиками, чтобы облегчить процесс наблюдения и избежать путаницы. Температура в помещении с экспериментальными животными должна составлять (22 ± 3) °С. Относительная влажность должна варьироваться между 30 % и 70 %, но это может быть недостижимо, если в качестве растворителя используют воду. Перед и после воздействия животных, как правило, следует содержать в клетках группами одного пола и одной концентрации, но число животных в клетке не должно затруднять наблюдения за каждым животным и должно минимизировать вероятность потерь от каннибализма и борьбы. Если животные подвергаются воздействию только через нос, им может потребоваться привыкнуть к дыхательной трубке. Дыхательные трубки не должны вызывать у животных физический или температурный стресс или приводить к потере подвижности. Если данные показывают, что подобные изменения не являются значимыми, то адаптация к дыхательным трубкам не является необходимой. Животных, подвергающихся воздействию аэрозолем через все тело, следует содержать индивидуально на протяжении периода экспозиции, чтобы уберечь их от проникновения тестируемого аэрозоля через шерстку партнеров по клетке. Могут применять традиционные и проверенные лабораторные диеты за исключением периода экспозиции испытуемого препарата, во время которого для животного необходимо обеспечивать неограниченное количество питьевой воды. Освещение должно быть искусственным в режиме 12 ч при свете/12 ч в темноте.

2.2 Ингаляционная камера

Природа исследуемого препарата и предмет исследования должны быть учтены при выборе ингаляционной камеры. Предпочтительной моделью воздействия является воздействие через нос (данный термин обозначает воздействие «только через голову», «только через нос», «только через мордочку»). Экспозиция «только через нос», как правило, предпочтительна при исследованиях жидких или твердых аэрозолей, а также для паров, которые могут конденсироваться и образовывать аэрозоль. Специальные цели исследования могут быть достовернее достигнуты при модели воздействия «через все тело», но применение такой модели должно быть обосновано в отчете об исследовании. Чтобы обеспечить атмосферную стабильность при применении камеры для воздействия «через все тело», общий объем испытуемых животных не должен превышать 5 % объема камеры. Методики воздействий «только через нос» и «через все тело», а также их положительные и отрицательные особенности отражены в документе [2].

2.3 Исследование токсичности

2.3.1 Предельные концентрации

В отличие от исследований острой токсичности в исследованиях 28-дневной подострой ингаляционной токсичности уровень предельных концентраций не задан. Максимально тестируемая концентрация должна учитывать:

1) максимально достигаемую концентрацию;

2) при воздействии на человека уровень, при которым разворачивается наиболее неблагоприятный сценарий;

3) необходимость поддерживать соответствующий объем кислорода; и/или

4) соображения о защите животных.

В отсутствии данных о предельных концентрациях можно применять предельные концентрации для острой токсичности в соответствии с Согласованной на глобальном уровне системой классификации и маркировки химических веществ ООН (т. е. вплоть до максимальной концентрации 5 мг/л для аэрозолей, 20 мг/л для паров и 20,000 ppm для газов); см. документ [2]. Если при тестировании газов или высоко летучих исследуемых препаратов (например, жаропонижающие средства) возникла необходимость превысить предельные концентрации, следует привести обоснование. Предельная концентрация должна вызывать явную интоксикацию, не приводя к чрезмерному стрессу у животных и не влияя на продолжительность их жизни [3].

2.3.2 Исследование по определению доз

Прежде чем приступить к основному исследованию, может возникнуть необходимость в определении диапазона концентраций для исследования. Определение диапазона концентраций является более полным для исследования, нежели визуальное изучение, потому что оно не ограничено отбором

концентраций. Информация, полученная в результате определения диапазона концентраций для исследования, может помочь провести основное исследование более успешно. Определение диапазона концентраций для исследования может, например, дать информацию об аналитических методах, об измерении частиц, об обнаружении механизмов интоксикации, данные клинической патологии и гистопатологии, расчеты, какими могут быть концентрации NOAEL (уровень отсутствия наблюдаемого вредного воздействия после введения вещества, максимальной дозы, не вызывающей обнаруживаемого вредного воздействия на здоровье) и МТС (минимальная токсическая концентрация) в основном исследовании. Руководитель исследования по определению диапазона концентраций может применять для установления порога раздражения дыхательных путей (например, с помощью гистопатологии дыхательных путей, тестирования легочной функциональной пробы или бронхоальвеолярного лаважа), наивысшей концентрации, которая не вызывает стресса у животных и изменения параметров, которые наиболее полно характеризуют токсичность исследуемого вещества.

Определение диапазона концентраций может состоять из одного или более уровней концентрации. Не более трех самцов и трех самок следует подвергать воздействию каждого уровня концентрации. Определение диапазона концентраций должно длиться не менее пяти, но, как правило, не более 14 дней. Обоснование выбора концентрации для основного исследования необходимо отразить в отчете по основному исследованию. Цель основного исследования — выявление зависимости «концентрация-ответ», базирующейся на основе наиболее чувствительных показателей. Низкий уровень концентрации в идеале не должен вызывать наблюдаемого токсического эффекта, тогда как высокий уровень концентрации должен вызывать явную токсичность, не приводя к чрезмерному стрессу у животных и не влияя на продолжительность их жизни [3].

При выборе уровня концентрации для определения диапазона концентраций вся имеющаяся информация, включая данные о зависимости активности препарата от структуры вещества и данные по сходным химикатам, должны быть учтены (см. раздел 1). Определение диапазона концентраций может подтверждать/опровергать то, какие показатели являются наиболее чувствительными, например ингибирование холинэстеразы для органофосфатов, образование метагемоглобина путем эритроцитотоксических агентов, тиреоидные гормоны (T_3, T_4) для тиреотоксинов, белок, лактатдегидрогеназа (LDH) или нейтрофилы в бронхоальвеолярном лаваже для безвредных плохо растворимых частиц или аэрозолей с легочно-раздражающим действием.

2.3.3 Основное исследование

Основное исследование подострой токсичности, как правило, состоит из трех уровней концентрации, а также, при необходимости, из параллельно проводимого негативного контроля (воздушного) и/или исследования среды (см. пункт 2.3.4). Все имеющиеся данные следует применять для выбора надлежащего уровня экспозиции, включая результаты системных токсикологических исследований, метаболизма и кинетики (внимание необходимо уделить тому, чтобы избежать уровней высоких концентраций, которые усиливают кинетические процессы). Каждая испытуемая группа состоит из 10 грызунов (5 самцов и 5 самок), которых подвергают воздействию тестируемого вещества ежедневно на протяжении шести часов, пять дней в неделю в течение четырех недель (общая продолжительность исследования — 28 дней). Животных могут подвергать воздействию также семь дней в неделю (например при тестировании вдыхаемых фармацевтических продуктов). Если известно, что один пол более чувствителен к воздействию тестируемого вещества, животные разных полов могут подвергаться воздействию различных уровней концентраций с целью оптимизировать зависимость «концентрация-ответ». Если воздействию «только через нос» подвергают грызунов других видов, помимо крыс, то можно отрегулировать максимальную продолжительность воздействия для минимизации дистресса, характерного для данного вида. Если продолжительность экспозиции составляет менее шести часов в день или, при необходимости, применяют долгосрочное (например, 22 ч в день) исследование с воздействием «через все тело», следует привести обоснование (см. документ [2]). Во время экспозиции рекомендуется голодание животных, если только экспозиция не превышает шести часов. Во время воздействия «через все тело» животным можно давать воду.

Выбранные целевые концентрации должны идентифицировать органы-мишени и показывать четкую зависимость «концентрация-ответ»:

- высокий уровень концентрации должен вызывать токсический эффект, но не приводить к затяжным признакам интоксикации или летальности, что может препятствовать правильной оценке;
- средний(е) уровень(уровни) концентрации должен быть между низким и высоким уровнями концентрации для градации токсических эффектов;
- низкий уровень концентрации должен вызывать слабые эффекты или вообще не вызывать признаков интоксикации.

2.3.4 Вспомогательное (реверсивное) исследование

Вспомогательное (реверсивное) исследование можно применять для наблюдения за обратимостью, стойкостью или отдаленными проявлениями интоксикации после эксперимента в течение соответствующего времени, но не более 14 дней. Вспомогательные (реверсивные) группы состоят из пяти самцов и пяти самок, подвергаемых воздействию одновременно с экспериментальными животными в основном исследовании. Вспомогательные (реверсивные) испытуемые группы следует подвергать воздействию исследуемого вещества с максимальным уровнем концентрации, при необходимости следует провести параллельный воздушный контроль и/или контроль среды.

2.3.5 Контрольные животные

Животные в параллельной группе должны содержаться в условиях, идентичных тем, в которых содержатся животные в экспериментальной группе, за исключением того, что они подвергаются воздействию фильтрованного воздуха, а не исследуемого вещества. Если воду или другую субстанцию применяют в процессе генерации исследуемой атмосферы, в исследование следует включить группу по контролю среды вместо группы по негативному (воздушному) контролю. По возможности в качестве среды следует использовать воду. Если в качестве среды используют воду, контрольных животных следует подвергать воздействию воздуха при таком же уровне относительной влажности, что и в исследуемых группах. Выбор подходящей среды должен опираться на соответствующим образом полученные предыспытательные или ретроспективные данные. Если токсичность среды не общеизвестна, руководитель исследования может принять решение о применении негативного (воздушного) контроля и контроля среды, но это крайне нежелательно. Если ретроспективные данные показывают, что среда нетоксична, то в негативных (воздушных) контрольных группах нет необходимости и следует применять только контроль среды. Если предварительное исследование тестируемого вещества, введенного в среду, не выявляет токсичности, то из этого следует, что среда в тестируемой концентрации нетоксична и необходимо выполнение контроля среды.

2.4 Условия проведения исследования

2.4.1 Введение концентраций

Животных подвергают воздействию исследуемого вещества в виде газа, паров, аэрозоля или их смеси. Исследуемое физическое состояние зависит от физико-химических свойств тестируемого препарата, выбранной концентрации и/или физической формы, которые наиболее вероятно присутствуют во время применения исследуемого препарата. Зернистый материал для достижения требуемого гранулометрического состава может быть подвергнут механическим обработкам. Дальнейшие правила содержатся в документе [2].

2.4.2 Гранулометрический состав

Размеры частиц должны быть определены для всех аэрозолей и для паров, которые могут конденсироваться в форму аэрозоля. Чтобы обеспечить воздействие на все важные области дыхательных путей, рекомендуется применять аэрозоль с массовым средним аэродинамическим диаметром (MMAD) в диапазоне от 1 до 3 мкм с геометрическим стандартным отклонением σg в диапазоне от 1,5 до 3,0 [3].

Следует приложить должные усилия, чтобы соблюсти указанное требование; в случае, если это невозможно, необходимо предоставить экспертную оценку. Например, металлические частицы в воздухе могут быть меньшего размера, чем стандартные, заряженные частицы и волокна также могут превышать размер стандартных.

2.4.3 Приготовление исследуемого вещества в среде

Как правило, тестируемый препарат следует испытывать без применения среды. Среду необходимо применять для создания соответствующей концентрации исследуемого вещества и размера частиц, при этом предпочтение отдается воде. Если исследуемый препарат растворен в среде, его стабильность должна быть установлена.

2.5 Контроль условий экспозиции

2.5.1 Воздушные потоки в камере

Потоки воздуха, проходящие через камеру, в которой осуществляется испытание, следует тщательно проверять, постоянно измерять и фиксировать не реже чем один раз в час на протяжении всего времени экспозиции. Контроль за концентрацией тестируемой атмосферы (или температурной стабильности) в режиме реального времени является интегральным измерением всех динамических параметров и обеспечивает косвенные способы для контроля за всеми релевантными динамическими ингаляционными параметрами. Если концентрацию контролируют в режиме реального времени, частота измерений потоков воздуха может быть понижена до одного измерения в экспозицию в день. Особое внимание сле-

дует уделять тому, чтобы избежать возвратного дыхания в камере с воздействием «только через нос». Концентрация кислорода должна составлять не менее 19 %, а концентрация углекислого газа не должна превышать 1 %. Если есть причины полагать, что этим нормам нельзя удовлетворить, концентрации кислорода и углекислого газа следует замерять. Если измерения в первый день экспозиции покажут, что концентрации находятся на должном уровне, в дальнейших измерениях необходимости нет.

2.5.2 Температура и относительная влажность в камере

Температура в камере должна составлять (22 ± 3) °С. Относительную влажность в дыхательной зоне животных при воздействиях «через нос» и «через все тело» следует проверять постоянно и фиксировать каждый час в течение всего времени экспозиции, если это возможно. Относительная влажность должна предпочтительно составлять от 30 % до 70 %, но в определенных случаях (например, при тестировании препарата на водной основе) этот уровень может быть неприменим или не измеряем вследствие взаимовлияния исследуемого препарата и метода исследования.

2.5.3 Исследуемое вещество — номинальная концентрация

По возможности следует наблюдать и фиксировать номинальную концентрацию при экспозиции в клетке. Номинальная концентрация — это масса сгенерированного испытуемого вещества, разбавленная общим объемом воздуха, проходящего через ингаляционную систему камеры. Номинальную концентрацию не применяют при описании экспозиции на животных, но сравнение номинальной и фактической концентраций позволяет судить об эффективности генерирования концентрации в испытательной системе и вовремя выявить имеющиеся проблемы.

2.5.4 Исследуемое вещество — фактическая концентрация

Фактическая концентрация — это концентрация исследуемого препарата в зоне дыхания животных в ингаляционной камере. Значение фактической концентрации можно оценить прямым методом (например, методом непосредственного выбора, адсорбционным методом или методом химической реактивности и последующим анализом) или прямыми методами, например, гравиметрический капельный анализ. Применение гравиметрического анализа допустимо только для однокомпонентных порошкообразных веществ в аэрозольной упаковке или для жидких аэрозолей с низкой летучестью и должно быть подкреплено предварительно полученными соответствующими специальными характеристиками исследуемого препарата. Концентрацию аэрозоля с многокомпонентным порошком можно также определить с помощью метода гравиметрического анализа. В этом случае потребуются данные анализа, подтверждающие, что состав аэрозоля-вещества схож с составом исходного материала. Если подобной информации нет, может потребоваться повторный анализ исследуемого вещества (как правило, в воздушном состоянии) в определенные временные интервалы в течение всего исследования. Для аэрозолей, которые могут испаряться или сублимироваться, следует указать, что все фазы среды были исследованы выбранным методом.

Необходимо по возможности применять один и тот же препарат для тестирования; исследуемый образец должен храниться в условиях, которые позволяют сохранять его степень чистоты, однородность и стабильность. Перед началом исследования необходимо располагать описанием препарата включая его степень чистоты и, если это технически возможно, его обозначение и количество выявленных в нем примесей и загрязняющих веществ. Такие сведения можно наглядно показать с помощью следующих, но не ограничиваясь ими, данных: время удержания и относительная величина пика, молекулярная масса, полученная методом масс-спектроскопии или газохроматографии, или другие подсчеты. Хотя определение тестовых образцов не входит в обязанности испытательной лаборатории, возможно, целесообразно подтвердить спонсорские характеристики, по крайней мере, в ограниченном виде (например, цвет, физическая природа и т. д.).

Воздействующую атмосферу следует поддерживать в неизменном состоянии, насколько это возможно. Прибор для контроля в реальном времени, такой как фотометрический счетчик аэрозольных частиц для аэрозолей или общий гидрокарбонный анализатор для паров, могут применять для показателя стабильности условий экспозиции. Фактическую концентрацию в камере следует измерять не менее трех раз в каждый день экспозиции на каждом уровне экспозиции. Если это невозможно вследствие ограниченных воздушных потоков или низкой концентрации, за все время периода экспозиции допускается отбор одной пробы. Как правило, этот образец следует брать в течение всего периода экспозиции. Образцы концентрации для каждой камеры не должны отклоняться от средней концентрации более чем на ± 10 % для газов и паров, ± 20 % для жидких и твердых аэрозолей. Время для достижения равновесного состояния и перехода к распаду (t_{95}) нужно измерить и зафиксировать. Период воздействия охватывает время генерации исследуемого вещества. При этом учитывают время, необходимое для достижения равновесного состояния в камере (t_{95}) и перехода к распаду. Инструкция по расчету (t_{95}) содержится в документе [2].

Для сложных смесей из газов/паров или аэрозолей каждая фаза может демонстрировать разное поведение в ингаляционной камере. По этой причине для каждой фазы (газ/пар или аэрозоль) следует выбрать по меньшей мере одну индикаторную субстанцию (аналит), как правило, основную активную в лекарственной форме исследуемого препарата. Когда тестируемый препарат является смесью (например, по составу), аналитическая концентрация должна быть описана для общего состава и не только для активного ингредиента или компонента (вещества, определяемого при анализе). Дополнительная информация о фактической концентрации содержится в документе [2].

2.5.5 Исследуемое вещество — гранулометрический состав

Гранулометрический состав аэрозолей следует определять не реже раза в неделю для каждого уровня концентрации путем применения каскадного импактора или альтернативного прибора, например аэродинамического спектрометра (APS). Если удастся показать равнозначность результатов, полученных каскадным импактором и альтернативным прибором, то допускается применение альтернативного прибора в исследовании.

Второе устройство, такое как гравиметрический фильтр или импинджер/образователь газовых пузырьков, следует применять параллельно основному инструменту для подтверждения эффективности его работы. Массовая концентрация, полученная гранулометрическим анализом, должна быть в разумных пределах массовой концентрации, полученной в результате анализа работы фильтров (см. документ [2]). Если удается показать равнозначность результатов для всех концентраций, тестируемых на раннем этапе исследования, проведение дальнейших подтверждающих измерений можно избежать. Из соображений заботы о животных измерения следует проводить таким образом, чтобы минимизировать получение неубедительных данных, что может привести к повторному исследованию.

Определение размеров частиц следует выполнять для паров, если есть любая вероятность, что конденсация паров ведет к образованию аэрозоля или если частицы обнаружены в атмосфере паров с потенциалом смешанных фаз.

3 Наблюдения

Клинические наблюдения за животными следует проводить до, во время и после периода экспозиции. Более частые наблюдения могут потребоваться в зависимости от реакции животных во время экспозиции. Если наблюдения за животными затруднены из-за применения сдерживающих трубок, плохого освещения в камерах для воздействия через все тело или непрозрачной атмосферы, животных следует тщательно осматривать после экспозиции. Наблюдения накануне экспозиции могут зафиксировать реверсивность или обострение токсических эффектов.

Все наблюдения фиксируют отдельно по каждому животному. Когда животных умерщвляют из гуманных соображений или находят мертвыми, время смерти следует зафиксировать как можно точнее.

Наблюдения в клетке должны фиксировать изменения на коже и шерсти, глазах и слизистых оболочках, в дыхательной, кровеносной и в нервной системах, а также соматомоторной активности и в поведении. По возможности следует отмечать различия между локальными и оставшимися системными эффектами. Внимание следует направить на наблюдения за тремором, конвульсиями, слюноотделением, диареей, апатией, сном и комой. Измерение ректальной температуры позволяет удостовериться в рефлекторном брадипноэ или гипо/гипертермии, связанной с воздействием вещества или обездвиженностью. Дополнительные наблюдения, например, за кинетикой, биомониторингом, легочными функциями, ретенцией слабо растворимых материалов, которые накапливаются в легочных тканях, за поведенческими изменениями могут быть включены в протокол исследования.

3.1 Масса тела

Массу тела каждого животного следует зафиксировать незадолго до первого дня экспозиции (день 0) и затем дважды в неделю (например, по пятницам и понедельникам с целью продемонстрировать восстановление за субботу и воскресенье, когда экспозицию не проводят, или в такой временной интервал, который позволяет оценить системную токсичность), а также на момент смерти или умерщвления. Если воздействия нет в течение первых двух недель, массу тела можно взвешивать еженедельно на протяжении оставшегося срока исследования. Вспомогательных (реверсивных) животных (если применяют) следует продолжать взвешивать еженедельно на протяжении восстановительного периода. По окончании исследования всех животных следует взвесить незадолго до умерщвления для объективного вычисления соотношения массы органа к массе тела.

3.2 Потребление пищи и воды

Объем потребляемой пищи следует измерять еженедельно. Также может быть измерен объем потребляемой воды.

4 Клиническая патология

Определение клинических патологий должно быть выполнено для всех животных, в том числе животных в контрольных и вспомогательных (реверсивных) группах, когда они умерщвлены. Временной интервал между окончанием воздействия и сбором крови должен быть зафиксирован, особенно когда восстановление органов-мишений происходит быстро. Взятие проб после окончания экспозиции указано для параметров с коротким периодом полураспада плазмы (например, COHb, CHE и MetHb).

В таблице 1 приведены параметры клинической патологии, исследование которых, как правило, требуется во всех токсических испытаниях. Анализ мочи в общепринятой практике не является обязательным, но он может быть выполнен, если это будет полезным в целях предполагаемой или наблюдаемой токсичности. Руководитель исследования может выбрать для оценки дополнительные параметры, чтобы более полно охарактеризовать токсичность исследуемого вещества (например, холистераза, липиды, гормоны, кислотно-щелочной баланс, метгемаглобин или тельца Хайнца, креатинкиназа, миелоидно/эритроидное соотношение, тропонины, газы в артериальной крови, лактатдегидрогеназа, сорбитдегидрогеназа, глутамат дегидрогеназа и гамма глутамил транспептидаза).

Таблица 1 — Параметры стандартной клинической патологии

Гематология	
Подсчет эритроцитов Концентрация гемоглобина Средний эритроцитарный гемоглобин Среднее гематокритное число Концентрация среднего эритроцитарного гемоглобина Ретикулоциты	Подсчет общего количества лейкоцитов Подсчет дифференцированных лейкоцитов Подсчет тромбоцитов Потенциал свертывания (выбрать одно): Протромбированное время Время неполного тромбопластина
Клиническая биохимия	
Глюкоза* Общий холестерин Триглицериды Азот мочевины крови Общий билирубин Креатинин Общий белок Альбумин Глобулин	Аланинаминотрансфераза Аспартат-аминотрансфераза Щелочная фосфатаза Калий Натрий Кальций Фосфор Хлорид
Анализ мочи (факультативно)	
Внешний вид (цвет и мутность) Масса Удельный вес или осмотическое давление pH	Общий белок Глюкоза Кровь/клетки крови
* Так как период длительного голодания может привести к изменению в измерениях глюкозы у экспериментальных животных по сравнению с животными контрольной группы, руководитель исследования должен определить, целесообразно ли подвергать животных голоду. Если используется голодание, его длительность должна быть надлежащей для используемых видов; для крыс это может быть 16 ч. (ночное голодание). Исследование глюкозного голодания может быть выполнено после ночного голодания на протяжении последней экспозиционной недели или после ночного голодания перед вскрытием (в последнем случае вместе с другими клиническими патологическими параметрами).	

Если есть признаки, что нижний дыхательный тракт (например, альвеолы) является первичным очагом депонирования и сохранения, то бронхоальвеолярный лаваж (BAL) может быть предпочтительным методом выбора параметров количественного анализа, гипотетически основанных на «доза-эффект» и сфокусированных на альвеолите, пульмональном воспалении и фосфолипидах. Это позволяет

соответствующим образом исследовать альвеолярные повреждения, вызванные изменением дозы и периода воздействия препарата. Это допускает изменения дозировок и выдержек для надлежащего измерения альвеолярных повреждений. Флюид BAL может быть проанализирован на предмет общего и дифференцированного подсчета лейкоцитов, общего белка и лактатдегидрогеназы. Другие параметры, которые могут быть учтены, указывают на лизосомные повреждения, фосфолипиды, фиброзы и раздражение или аллергическое воспаление, которые могут включать в себя определения провоспалительного цитокинеза/хемокинеза. Измерения BAL, как правило, дополняют данные гистопатологических исследований, но не заменяют их. Руководство по проведению легочного лаважа можно найти в документе [2].

5 Значимые патологии и масса органов

Все экспериментальные животные, включая тех, которые погибли во время исследования или были изъяты из исследования по соображениям заботы о животных, должны быть подвергнуты полному обескровливанию (если выполнимо) и полному вскрытию. Для каждого животного следует зафиксировать время между окончанием последней экспозиции и его умерщвлением. Если невозможно провести вскрытие сразу после обнаружения погибшего животного, его следует охладить (не заморозить) при температуре достаточно низкой, чтобы минимизировать распад тканей. Вскрытие следует проводить как можно скорее, как правило, в течение одного-двух дней. Все значимые патологические изменения необходимо зафиксировать по каждому животному, обращая особое внимание на изменения в дыхательных путях.

В таблице 2 приведены органы и ткани, которые следует сохранить в соответствующей питательной среде во время полного вскрытия для гистопатологического исследования. Сохранение (упомянутых) органов и тканей и любых других органов осуществляется по решению руководителя исследования. Органы, наименования которых выделены жирным шрифтом, следует иссечь и взвесить во влажном состоянии как можно скорее после вскрытия, чтобы избежать высыхания. Щитовидную железу и эпидидимисы следует взвешивать только по необходимости, так как иссечение артефактов может затруднить гистопатологическое исследование. Ткани и органы следует зафиксировать в 10 %-ном растворе формалина или другого соответствующего фиксатора как можно скорее после вскрытия, но не менее чем за 24—48 ч до иссечения в зависимости от применяемого фиксатора.

Таблица 2 — Органы и ткани, сохраненные во время полного вскрытия

Надпочечники Костный мозг (и/или свежие аспираты) **Мозг** (включая части головного мозга, мозжечок и продолговатый мозг/варолиев мост) Глаза (сетчатка, зрительный нерв) и веки **Сердце** **Почки** Гортань (3 уровня, 1-й уровень включает в себя основание надгортанника) **Печень** **Легкое** (все доли на одном уровне, включая главные бронхи) Лимфатические узлы от ворот легких, особенно для исследуемых веществ с плохо растворимыми частицами. Для более исчерпывающего исследования и/или исследований с иммунологическим фокусом дополнительные лимфатические узлы могут быть рассмотрены, например, от медиастинальных, затылочных/подчелюстных и/или слуховых зон Носоглоточные ткани (не менее 4 уровней; 1-й уровень включает носоглоточный канал и назально ассоциированные лимфоидные ткани (НАЛТ) Пищевод Обонятельная луковица Яичники	Семенные пузырьки Спинной мозг (шейный, средне-грудной и поясничный) **Селезенка** Желудок **Семенники** **Тимус** Щитовидная железа Трахея (не менее 2 уровней, включая 1 продольную секцию через киль и 1 поперечную секцию) [Мочевой пузырь] Матка Все обширные повреждения

Легкие следует извлечь без повреждений, взвесить и зафиксировать соответствующим фиксатором под давлением в 20—30 см воды, чтобы обеспечить сохранность легочной структуры. Срезы легочных тканей должны быть собраны для всех долей на одном уровне, включая главные бронхи, но если был выполнен легочный лаваж, доля, в которой не был произведен лаваж, должна быть рассечена на три уровня (несерийные срезы).

Следует исследовать не менее четырех уровней носоглоточных тканей, одна из которых должна включать в себя носоглоточный канал [5]—[9], для адекватного обследования сквамозной кости, промежуточного (не-ресничного дыхательного), дыхательного (ресничного дыхательного) и обонятельного эпителия, а также дренажной лимфатической ткани (НАЛТ [9], [10]). Следует исследовать три уровня гортани, один из этих уровней должен включать в себя основание надгортанника [12]. Следует исследовать не менее двух уровней трахеи, включая продольное сечение через киль бифуркации главного бронха и одного поперечного среза.

6 Гистопатология

Гистопатологическая оценка всех органов и тканей, перечисленных в таблице 2, должна быть выполнена в контрольной группе и в группе с высокой концентрацией, а также в отношении животных, которые погибли или были умерщвлены в ходе исследования. Особое внимание следует уделять дыхательным путям, органам-мишеням и макроскопическим повреждениям. Органы и ткани, пораженные в группе с высокой концентрацией, должны быть исследованы во всех группах. Руководитель исследования может принять решение о проведении гистопатологических анализов для дополнительных групп с целью показать зависимость «концентрация-ответ». Если применяют вспомогательную (реверсивную) группу, гистопатологический анализ должен быть выполнен для всех пораженных тканей и органов в экспериментальных группах. Если в группе с высокой концентрацией наблюдается чрезмерная ранняя смертность или другие трудности, что дискредитирует значимость данных, следующая более низкая концентрация должна быть подвергнута гистопатологическому анализу. При этом следует попытаться сопоставить данные макроскопических наблюдений с микроскопическими данными.

7 Данные исследования и отчет

7.1 Данные исследования

Необходимо наличие информации о массе тела, потреблении пищи, клинической патологии, общей патологии, массе органов и гистопатологии для каждого животного. Данные клинических наблюдений следует подытожить в таблице, отражающей число животных в каждой подопытной группе, число животных со специфическими признаками интоксикации, число животных, найденных мертвыми в ходе исследования или умерщвленных по гуманным причинам, время смерти каждого животного, описание и динамику появления признаков токсичности и их обратимость, а также данные вскрытия. Все результаты, количественные и побочные, следует оценивать с помощью соответствующего метода статистического анализа. Все общепринятые статистические методы могут быть применены, и статистические методы следует выбрать во время планирования исследования.

7.2 Отчет об исследовании

Отчет об исследовании должен содержать следующую информацию.

Подопытные животные и их применение:

- описание условий содержания в клетке, включающее в себя: число (или изменения числа) животных в клетке, материал, из которого сделаны подстилки для животных, температура внешней среды и относительная влажность, световой период и описание питания;
- применяемые виды/линии и обоснование для применения других видов, кроме крыс. Источник и ретроспективные данные могут быть предоставлены, если они получены на животных, которые подвергались сходным экспозиции, условиям содержания и преднамеренному голоданию;
- число, возраст и пол животных;
- метод отбора;
- описание предыспытательных условий содержания включая питание, карантин и лечение при заболевании.

Исследуемое вещество:

- физические свойства, чистота и, если необходимо, физико-химические свойства (включая изомеризацию);
- идентификационные данные и номер CAS, если известно.

Среда:

- обоснование для применения среды и обоснование для выбора среды (если применялось иное, чем вода);
- статистические или сопутствующие данные, подтверждающие, что среда не влияет на результаты исследования.

Ингаляционная камера:

- подробное описание ингаляционной камеры, включая объем и диаграмму;
- поставщик и описание оборудования, использованного в экспозиции на животных, а также в создании газообразной среды;
- оборудование для измерения температуры, влажности, гранулометрического состава и актуальной концентрации;
- источник воздуха и системы, применяемой для кондиционирования;
- методы, применяемые для калибровки оборудования с целью обеспечить гомогенную испытуемую атмосферу;
- перепады давления (положительное или отрицательное);
- отверстия для экспозиции в камере (только «через нос»); размещение животных в камере (воздействие «через все тело»);
- стабильность исследуемой атмосферы;
- расположение датчиков температуры и влажности и отбор исследуемого воздуха в камере;
- обследование подаваемого/извлекаемого воздуха;
- скорость потоков воздуха, скорость потока воздуха/отверстия для экспозиции (только «через нос») или нагрузка на животных/клетку (для воздействия «через все тело»);
- время, рекомендуемое для достижения равновесия в ингаляционной камере (t_{95});
- число изменений объема в час;
- измерительные устройства (если применяли).

Данные об экспозиции:

- обоснование выбора целевой концентрации в основном исследовании;
- номинальные концентрации (общая масса исследуемого препарата, сгенерированного в ингаляционной камере, разделенная на объем воздуха, проходящего через камеру);
- фактические концентрации тестируемого препарата, собранные из зоны дыхания животных; для исследуемых смесей, который продуцируют гетерогенные физические формы (газы, пары, аэрозоли), каждая форма может быть проанализирована отдельно;
- все воздушные концентрации должны быть указаны в отчете в единицах массы (мг/л, мг/м^3 и т. д.), что предпочтительнее, нежели указание их в единицах объема (промилле, часть на млрд и т. д.);
- гранулометрический состав, средний аэродинамический диаметр массы (MMAD) и стандартные геометрические отклонения (Σg), включая методы их калькуляции. Следует также предоставить отчет об анализе индивидуальных размеров частиц.

Условия проведения исследования:

- подробное описание приготовления исследуемого вещества, включая описание любых процедур, применяемых для уменьшения размеров частиц твердых материалов или для приготовления растворов исследуемого вещества;
- описание (предпочтительно включающее диаграммы) оборудования, применяемого для создания тестируемой атмосферы и воздействия на животных тестируемой атмосферы;
- описание оборудования, применяемого для контроля температуры и влажности, а также воздушных потоков в камере (т. е. для разработки калибровочных кривых);
- подробные сведения об оборудовании, применяемом для сбора образцов для установления концентрации в клетке, и гранулометрический состав частиц;
- подробные сведения о применяемом химико-аналитическом методе и проверке достоверности метода (включая эффективность восстановления тестируемого препарата из питательной среды, в которую были помещены образцы);
- метод случайного отбора при распределении животных в экспериментальную и контрольную группы;

- детали о качестве пищи и воды (включая тип/источник диеты, источник воды);
- обоснование для выбора исследуемой концентрации.

Результаты:

- сведение в таблицу данных о температуре в камере, уровне влажности и воздушном потоке;
- сведение в таблицу данных о номинальной и фактической концентрации в камере;
- сведение в таблицу данных о размере частиц, включая собранные сведения об аналитических образцах, распределение размеров частиц, подсчеты ММАД и Σg;
- сведение в таблицу данных о реакции и уровне концентрации для каждого животного (т. е. признаки токсического отравления у животного, включая агонию, природу, степень тяжести, время появления и продолжительность эффектов);
- сведение в таблицу данных о массе тела каждого животного;
- сведение в таблицу данных о потреблении пищи;
- сведение в таблицу данных клинической патологии;
- данные вскрытия и гистопатологические данные для каждого животного, если имеются;
- сведение в таблицу других измеренных параметров.

Обсуждение и интерпретация результатов:

- особое внимание необходимо уделить описанию методов, применяемых для удовлетворения требованиям настоящего стандарта, например, предельно допустимые концентрации или размер частиц;
- пригодность частиц для вдыхания, принимая во внимание общие данные, должна быть адресной, особенно если требования к размерам частиц не выполнены;
- последовательность методов, применяемых для определения номинальной и фактической концентрации, а также зависимость фактической концентрации от номинальной должна быть включена в общую оценку исследования;
- вероятная причина смерти и доминирующий механизм действий (оказывающий системное действие или локальное влияние на организм) должны быть адресными;
- если была необходимость в гуманном умерщвлении животного, испытывающего боль или проявляющего признаки страдания и дистресса, следует привести объяснения в соответствии с документом [3];
- выявление органов-мишеней;
- определение NOAEL и LOAEL.

Библиография

[1] OECD (1981), Subchronic Inhalation Toxicity Testing, Original Test Guideline No 412, Environment Directorate, OECD, Paris

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

[3] OECD (2000), Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation, Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris

[4] Whalan J.E. and Redden J.C. (1994). Interim Policy for Particle Size and Limit Concentration Issues in Inhalation Toxicity Studies. Office of Pesticide Programs, United States Environmental Protection Agency

[5] Dungworth D.L., Tyler W.S. and Plopper C.E. (1985). Morphological Methods for Gross and Microscopic Pathology (Chapter 9) in Toxicology of Inhaled Material, Witschi H.P. and Brain J.D. (eds), Springer Verlag Heidelberg, p. 229—258

[6] Young J.T. (1981). Histopathological examination of the rat nasal cavity. Fundam. Appl. Toxicol. 1, p. 309—312

[7] Harkema J.R. (1990). Comparative pathology of the nasal mucosa in laboratory animals exposed to inhaled irritants. Environ. Health Perspect. 85, p. 231—238

[8] Woutersen R.A., Garderen-Hoetmer A. van, Slootweg P.J. and Feron V.J. (1994). Upper respiratory tract carcinogenesis in experimental animals and in humans. In: Waalkes MP and Ward JM (eds) Carcinogenesis. Target Organ Toxicology Series, Raven Press, New York, p. 215—263

[9] Mery S., Gross E.A., Joyner D.R., Godo M. and Morgan K.T. (1994). Nasal diagrams: A tool for recording the distribution of nasal lesions in rats and mice. Toxicol. Pathol. 22, p. 353—372

[10] Kuper C.F., Koornstra P.J., Hameleers D.M.H., Biewenga J., Spit B.J., Duijvestijn A.M., Breda Vriesman van P.J.C. and Sminia T. (1992). The role of nasopharyngeal lymphoid tissue. Immunol. Today 13, p. 219—224

[11] Kuper C.F., Arts J.H.E. and Feron V.J. (2003). Toxicity to nasal-associated lymphoid tissue. Toxicol. Lett. 140-141, p. 281—285

[12] Lewis D.J. (1981). Mitotic Indices of Rat Laryngeal Epithelia. Journal of Anatomy 132(3), p. 419—428

УДК 661:615.099 МКС 13.020.01

Ключевые слова: химическая продукция, воздействие на организм человека, метод испытаний, подострая ингаляционная токсичность, 28-дневное исследование

Редактор *Н.Е. Рагузина*
Технические редакторы *В.Н. Прусакова, И.Е. Черепкова*
Корректор *Е.Ю. Каболова*
Компьютерная верстка *Л.В. Софейчук*

Сдано в набор 23.09.2019. Подписано в печать 30.09.2019. Формат 60 × 84 1/8. Гарнитура Ариал.
Усл. печ. л. 1,86. Уч.-изд. л. 1,68.

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