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

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

ГОСТ 32542— 2013

МЕТОДЫ ИСПЫТАНИЙ ПО ВОЗДЕЙСТВИЮ ХИМИЧЕСКОЙ ПРОДУКЦИИ НА ОРГАНИЗМ ЧЕЛОВЕКА

Основные требования к проведению испытаний по оценке острой токсичности при ингаляционном поступлении

(OECD, Test No 403:2008, IDT)

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») 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 14 ноября 2013 г. № 44)

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
Армения	AM	Минэкономики Республики Армения
Беларусь	BY	Госстандарт Республики Беларусь
Киргизия	KG	Кыргызстандарт
Молдова	MD	Молдова-Стандарт
Россия	RU	Росстандарт
Таджикистан	TJ	Таджикстандарт

4 Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 22 ноября 2013 г. № 796-ст межгосударственный стандарт ГОСТ 32542—2013 введен в действие в качестве национального стандарта Российской Федерации с 1 августа 2014 г.

5 Настоящий стандарт идентичен международному документу OECD Test № 403:2008 «Острая токсичность при ингаляционном поступлении» («Acute Inhalation Toxicity», IDT)

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, 2014, 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 Термины и определения 1
3 Описание метода 2
4 Процедура испытания 6
Приложение А (обязательное) Протокол C×t 12
Библиография 15

Введение

В настоящее время одним из основных путей поступления загрязнителей в организм является ингаляционный. Поэтому в комплексе исследований по воздействию химической продукции на организм человека изучение острой токсичности при вдыхании является ведущим.

Испытания острой ингаляционной токсичности призваны стать более гибким, направлены на сокращение использования животных и выполнение нормативных требований [4], [5]. Испытания острой ингаляционной токсичности содержат два вида исследований: Традиционный CL_{50}/LC_{50} протокол и Протокол Концентрация×Время (Протокол C×t) [1].

Главной особенностью является способность обеспечить отношения «концентрация — ответ» в диапазоне от нелетального к летальному исходу, чтобы вывести среднюю летальную (CL_{50}/LC_{50}), нелетальную пороговую концентрацию (CL_{01}/LC_{01}), а также определить возможную гендерную чувствительность. Протокол C×t используется в особых регулятивных или научных интересах, которые требуют испытаний на животных при различной продолжительности воздействия, например в целях планирования неотложного ответа реакции [получение значений Руководства по установлению уровней острого воздействия (AEGL), Руководства по планированию ответных действий в чрезвычайных обстоятельствах (ERPG) или Американской испытательной лаборатории на воздействие загрязнителей на окружающую среду (AETL)], территориального планирования.

Данные испытания позволяют охарактеризовать исследуемый препарат и дать количественную оценку его опасности, а также ранжировать и классифицировать вещество в соответствии с Согласованной на глобальном уровне Системой классификации и маркировки химических веществ СГС (GHS) ООН.

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

МЕТОДЫ ИСПЫТАНИЯ ПО ВОЗДЕЙСТВИЮ ХИМИЧЕСКОЙ ПРОДУКЦИИ НА ОРГАНИЗМ ЧЕЛОВЕКА

Основные требования к проведению испытаний по оценке острой токсичности при ингаляционном поступлении

Testing of chemicals of health hazard. Acute inhalation toxicity

Дата введения — 2014—08—01

1 Область применения

Настоящий стандарт устанавливает процедуру испытания химической продукции по оценке острой токсичности при ингаляционном поступлении в организм.

2 Термины и определения

В настоящем стандарте применены следующие термины с соответствующими определениями:

2.1 **агония:** Состояние умирания или невозможности выжить даже при лечении [2].

2.2 **аэрозоль:** Относительно стабильная во времени суспензия, газообразная среда, в которой рассредоточены мелкие твердые или жидкие частицы. Диаметр аэрозольных частиц составляет примерно от 0,001 до 100 μm.

2.3 **гуманная конечная точка:** Гуманную конечную точку в испытаниях над животными можно определить как наиболее ранний показатель, указывающий на сильную боль, дистресс, страдания или приближающуюся гибель.

2.4 **дымка (или туман):** Жидкие аэрозоли, которые, как правило, образуются путем конденсации перенасыщенных паров или физической деформации жидкости: пульверизация, распыление или образование пузырьков. Густая дымка, затрудняющая видимость, называется туманом.

2.5 **испытание на предельное содержание:** Ингаляционное исследование, выполненное с использованием единственной группы животных, которые были подвергнуты испытанию предельной концентрацией.

2.6 **концентрация:** Масса тестируемого препарата на единицу объема воздуха (например, мг/л, мг/м^3) или единица объема тестируемого препарата на единицу объема воздуха (например, промилле, частей на млрд).

2.7 **острая ингаляционная токсичность:** Вредный эффект, вызванный воздействием тестируемого препарата после непрерывной ингаляционной экспозиции на протяжении менее 24 ч. Продолжительность большинства исследований острой ингаляционной токсичности составляет 4 ч.

2.8 **пар:** Фаза газообразного состояния исследуемого вещества, включая смеси, которые, как правило, находятся в жидком или твердом состоянии при комнатной температуре и давлении. Переход из газообразного состояния в жидкое зависит от баланса испарения и конденсации. Как следствие поверхностного натяжения паровое давление больше для маленьких жидких капель нежели для плоских поверхностей (см. эффект Кельвина).

2.9 **предварительное исследование:** Предварительное изучение с использованием минимального количества животных для выбора концентраций, которые затем будут использоваться в главном исследовании.

2.10 **предельная возможная концентрация (предельная концентрация):** Максимальная концентрация, рекомендуемая для исследований ингаляционной токсичности, которая зависит от физического

Издание официальное

состояния испытываемого препарата. Согласно Классификационной схеме СГС/GHS, предельная или максимально возможная концентрация составляет 20 000 ppm для газов, 20 мг/л для паров и 5 мг/л для аэрозолей.

2.11 **пыль:** Сухие твердые частицы, рассредоточенные в газообразной среде в результате механического разрушения сыпучего материала или порошка, однокомпонентного или смеси. Частицы пыли, как правило, нерегулярны, диаметр их превышает 0,5 мкм.

2.12 **скорая гибель:** Агония и смерть, которые ожидаются до наступления следующего запланированного наблюдения. Признаки, указывающие на такое состояние, у грызунов могут включать конвульсии, горизонтальное положение, опрокинутое положение и тремор [2].

2.13 **средний аэродинамический диаметр массы (MMAD):** Среднемассовое распределение масс относительно аэродинамического диаметра. Средний аэродинамический диаметр и геометрическое стандартное отклонение используются для описания гранулометрического состава аэрозоля, основанного на массе и размере частиц аэрозольного облака. Масса пятидесяти процентов частиц будет меньше, чем средний аэродинамический диаметр массы, и 50 % частиц будут больше среднего аэродинамического диаметра. Для исследований острой ингаляционной токсичности рекомендуется MMAD в размере 1—4 μm.

2.14 **СГС/GHS (Согласованная на глобальном уровне Система классификации и маркировки химических веществ):** Система классификации химических веществ в зависимости от вида и уровня опасности для здоровья человека и окружающей среды, включающая согласованные элементы системы информирования, такие как пиктограммы, сигнальные слова, заявления об опасности, предупредительные заявления и спецификации по безопасности, с целью передать информацию об опасности и защитить людей и окружающую среду. Сотрудничает с ОЭСР (здоровье человека и охрана окружающей среды), Комитетом экспертов по перевозке опасных грузов при ООН (физико-химические особенности) и Международной организации труда (МОТ) (система передачи информации о вредности) в рамках Межорганизационной программы по обоснованному управлению химическими веществами (IOMC).

2.15 **CL_{50}/LC_{50} (средняя смертельная концентрация):** Обусловленная временем статистически выверенная оценка концентрации исследуемого вещества, которая предположительно может являться причиной смерти 50 % животных, подвергшихся определенному воздействию препарата во время экспозиции или в течение определенного промежутка времени после экспозиции. Значение CL_{50}/LC_{50} выражается как масса исследуемого препарата на единицу объема воздуха (мг/л, мг/м^3) или как единица объема исследуемого препарата на единицу объема воздуха (промилле, частей на млрд). Продолжительность выдержки всегда должна быть установлена (например, четырехчасовая CL_{50}/LC_{50}).

3 Описание метода

3.1 Принципы

Вся имеющаяся информация об исследуемом препарате должна находиться в распоряжении экспериментальной лаборатории до начала эксперимента в целях повышения качества исследования и минимизации количества привлеченных животных. Информация, которая может помочь при выборе подходящих для испытания концентраций, включает тождественность, химическую структуру и физико-химические свойства испытываемого вещества; результаты опытов на токсичность in vivo или in vitro; предполагаемую область применения и вероятность воздействия на человека; если имеются, то данные (Q)SAR и сведения о токсичности структурно родственных препаратов.

При изучении коррозионных и/или раздражающих продуктов следует избегать концентраций, которые могут вызвать сильную боль и страдания.

Коррозионный/раздражающий потенциал должен быть оценен при экспертизе имеющейся информации о воздействии на человека, экспериментальных животных, имеющихся данных в опытах in vitro, величине pH, информации для близких по структуре веществ или любых других данных с целью изучения целесообразности дальнейшего тестирования или его отмены.

При воздействии на животных целевые концентрации должны быть достаточно низкими для того, чтобы не вызвать боль или нарушения, и достаточно высокими для того, чтобы расширить кривую «концентрация — ответ» до уровней, которые соответствуют нормативным и научным целям исследования. Данные концентрации должны быть выбраны отдельно в каждом случае; выбор концентрации должен быть обоснован.

Испытания призваны обеспечить получение информации об острой токсичности исследуемого препарата с целью его классификации и получения данных о летальности (CL_{50}/LC_{50}, CL_{01}/LC_{01}) для

одного или обоих полов как необходимой для определения количественной оценки риска. Предлагается два метода проведения испытаний. Первый метод — Традиционный протокол, где группы животных подвергаются воздействию предельной концентрации (тест на предельную концентрацию) или серии концентраций поэтапно в заранее установленную продолжительность времени; она составляет менее 24 ч (как правило, 4 ч). Второй метод — Протокол Концентрация × Время (C × t), применяется в группах животных, которые подвергаются воздействию одной концентрации (тест на предельно допустимую концентрацию) или серии концентраций при различной продолжительности времени.

Агонизирующие животные или животные, очевидно испытывающие боль или демонстрирующие признаки страдания и истощения, должны быть гуманно умерщвлены, если нет веских оснований для другого (такие причины должны быть отражены в отчете по исследованию). Агонизирующие животные рассматриваются как животные, погибшие во время испытания. Критерии для принятия решения об умерщвлении агонизирующих или тяжело страдающих животных, а также определение признаков прогнозируемой или приближающейся смерти.

3.2 Животные

3.2.1 Выбор вида

Следует использовать молодых здоровых особей из обычно используемых лабораторных линий. Предпочтительно использовать крыс. В случае использования других видов необходимо привести обоснование.

3.2.2 Подготовка

Самки должны быть нерожавшими и небеременными. На день экспозиции испытываемого препарата животные должны быть в возрасте от 8 до 12 нед, диапазон колебания массы животных для каждого пола не должен превышать ± 20 % от средней массы животных, участвовавших в предыдущем испытании, в такой же отрезок времени. Животные отбираются в случайном порядке и маркируются, что позволит идентифицировать каждое из них. Животных следует содержать в клетках в течение не менее пяти дней до начала испытания, чтобы позволить им адаптироваться к лабораторным условиям. Животным также необходимо дать короткое время приспособиться к исследуемому прибору до начала испытания с целью уменьшить стресс от попадания в новую среду.

3.2.3 Содержание

Температура в помещении, где содержатся экспериментальные животные, должна составлять (22 ± 3) °С, оптимальный уровень относительной влажности от 30 % до 70 %. В исследовании одного уровня концентрации животных можно поместить в одну камеру, но число животных в камере не должно затруднять возможность наблюдать за каждым из них, а также должно сократить вероятность потерь из-за каннибализма и борьбы. Свойства исследуемого препарата или токсичность (способность вызывать заболевание, возбуждать ЦНС) могут указывать на необходимость содержания животного в индивидуальной камере, чтобы предотвратить каннибализм. Допустимо использование стандартных лабораторных режимов питания, за исключением периода экспозиции испытываемого препарата, во время которого для животного необходимо обеспечить неограниченное потребление питьевой воды. Освещение должно быть искусственным в режиме 12 ч при свете/12 ч в темноте.

3.3 Ингаляционные камеры

При выборе ингаляционной камеры следует учитывать природу исследуемого препарата и нормативные требования. По умолчанию используется интраназальная модель экспозиции (данный термин включает в себя воздействие только через голову, только через нос и только через мордочку). Экспозиция только через нос предпочтительна для изучения аэрозолей жидких и твердых и для паров, которые могут конденсироваться в форме аэрозолей. При этом для решения отдельных задач исследования целесообразно применять воздействие через все тело. Использование другой модели экспозиции, помимо той, что применяется по умолчанию, должно быть обусловлено целями исследования и обосновано в отчете.

Для обеспечения атмосферы стабильности при использовании камеры объем, занимаемый телами тестируемых животных, не должен превышать 5 % объема камеры.

3.4 Условия экспозиции

3.4.1 Введение концентраций

Воздействие только через нос на крысах может длиться до 6 ч. Если подопытные животные — мыши, период выдержки не должен превышать 4 ч. Если требуется более длительный период экспозиции,

необходимо привести обоснования. Животных, которые подвергаются воздействию препарата в камерах на все тело, следует содержать по отдельности, чтобы предотвратить проглатывание исследуемого препарата соседями по камере во время чистки. Пища во время экспозиции не дается. Воду можно давать в течение всего времени экспозиции на все тело.

Животные могут подвергаться воздействию исследуемого препарата 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 приближены к реальным условиям использования изучаемого продукта. Гигроскопичный и химически реактивный препарат следует тестировать в условиях минимальной влажности, в отсутствие паров воды. Особое внимание следует уделять тому, чтобы не создавать взрывоопасные концентрации.

3.4.2 Гранулометрический состав

Определение размера частиц необходимо для всех аэрозолей и всех паров, которые могут конденсироваться и превращаться аэрозоль. Чтобы обеспечить воздействие на все важные области дыхательных путей, рекомендуется использование аэрозоля с массовым средним аэродинамическим диаметром (MMAD) в диапазоне от 1 до 4 мкм с геометрическим стандартным отклонением (Σg) в диапазоне от 1,5 до 3,0. В случае, если данное требование невозможно соблюсти, необходимо предоставить экспертную оценку. Например, металлические частицы в воздухе могут быть меньшего размера, чем стандартные, также заряженные частицы, волокна и гигроскопичные материалы (которые увеличиваются в размерах во влажной среде в респираторном тракте) могут превышать размер стандартных.

Растворитель можно использовать для создания необходимой концентрации и размера частиц исследуемого препарата в атмосфере. Как правило, в качестве растворителя предпочтительнее использовать воду. Зернистый материал может быть подвергнут механическим процессам, чтобы добиться требуемого гранулометрического состава, при этом необходимо позаботиться о том, чтобы состав исследуемого препарата не разложился и не изменился. Если есть опасение, что в результате механических процессов состав тестируемого препарата претерпит изменения (например, чрезмерно высокая температура в процессе сильного дробления вследствие трения), то состав тестируемого препарата необходимо проверить при помощи анализа. При этом необходимо проследить, чтобы не занести в препарат загрязняющие вещества.

3.4.3 Контрольные животные

В параллельном использовании отрицательных (воздухом) контрольных групп необходимости нет. В случае, если для получения нужной концентрации испытываемого вещества в воздухе используется какой-либо растворитель, помимо воды, то контрольную группу следует использовать только в случае отсутствия справочных данных о токсичности растворителя при ингаляционном воздействии. Если исследование токсичности препарата, содержащего растворитель, показывает отрицательный результат, то из этого следует, что растворитель нетоксичен при исследуемых концентрациях; следовательно, в испытании растворителя нет нужды.

3.4.4 Воздушные потоки в камере

Воздушные потоки, проходящие через камеру, необходимо тщательно контролировать, непрерывно наблюдать и фиксировать по меньшей мере раз в час на протяжении всего периода выдержки. Наблюдение за концентрацией исследуемого вещества в газовой среде (или устойчивостью) представляет собой интегральное вычисление всех динамических параметров и обеспечивает косвенные способы контроля всех значимых параметров для формирования динамической атмосферы. Необходимо избегать возвратного дыхания в камерах, предназначенных для воздействия через нос в случаях, когда воздушные потоки через установку экспонирования недостаточны для динамических потоков исследуемого вещества в газовой среде. Существуют методы, при помощи которых можно установить, что возвратное дыхание при данных условиях эксперимента не имеет места. Концентрация кислорода должна составлять не менее 19 %, концентрация углекислого газа — не менее 1 %. Если есть основание полагать, что эти требования не удовлетворяются, концентрации кислорода и углекислого газа необходимо измерить.

3.4.5 Температура и относительная влажность в камере

Температура в камере должна составлять (22 ± 3) °С. Относительную влажность в зоне дыхания животных, находящихся в камерах, предназначенных как для воздействия только через нос, так и через все тело, необходимо наблюдать и фиксировать не менее трех раз в течение периода выдержки. Идеальная относительная влажность составляет 30 % — 70 %, но в определенных случаях (например, тестирование препарата на водной основе) данный уровень может быть неприменим или неизмеряем вследствие взаимовлияния исследуемого препарата и метода исследования.

3.4.6 Исследуемый препарат

3.4.6.1 Номинальная концентрация

По возможности следует наблюдать и фиксировать номинальную концентрацию при экспозиции в клетке. Номинальная концентрация — это масса сгенерированного испытываемого вещества, разбавленная общим объемом воздуха, проходящего через систему клетки. Номинальная концентрация не используется при описании экспозиции на животных, но сравнение номинальной и фактической концентраций позволит судить об эффективности генератора в испытательной системе и позволит вовремя выявить проблемы в нем.

3.4.6.2 Фактическая концентрация

Фактическая концентрация — это концентрация исследуемого препарата в зоне дыхания животных в ингаляционной камере. Фактическая концентрация может быть получена специальными методами (например, методом непосредственного выбора, адсорбционным методом или методом химической реактивности и последующим анализом) или неспециальными методами (например, гравиметрический капельный анализ). Использование гравиметрического анализа допустимо только для однокомпонентных порошкообразных веществ в аэрозольной упаковке или для жидких аэрозолей с невысокой 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 аэрозольного препарата аналогичен составу исходного материала. Если подобной информации не имеется, может потребоваться повторный анализ исследуемого вещества (в воздухе) в определенные временные интервалы в течение исследования. Для аэрозольных агентов, которые могут испаряться или сублимироваться, необходимо указать, что для сбора всех этапов был использован выбранный метод. Цели, номинальная и фактическая концентрации должны быть указаны в отчете исследования, но в статистическом анализе для подсчета значения смертельной концентрации используется только фактическая концентрация.

Необходимо использовать только один препарат для тестирования, если это возможно, и исследуемый образец должен храниться в условиях, которые позволят сохранить его чистоту, однородность и стабильность. Перед началом исследования необходимо располагать описанием препарата, включая степень его чистоты, и, если это технически возможно, указать количество выявленных в нем примесей. Такие сведения можно наглядно показать с помощью следующих, но не ограничиваясь ими, данных: времени удержания и относительной площади пика, молекулярной массы, полученной методом масс-спектроскопии или газовой хроматографии и т. п. Хотя определение тестовых образцов не входит в обязанности испытательной лаборатории, возможно, целесообразно подтвердить поддерживающие характеристики, по крайней мере в ограниченном виде (цвет, физическая природа и т. д.).

Воздушную среду нужно поддерживать максимально постоянной и проверять непрерывно и/или регулярно в зависимости от метода анализа. При регулярном контроле образцы проб атмосферы в камере нужно забирать не реже двух раз в 4 ч во время исследования. Если это невозможно вследствие ограниченных воздушных потоков или низкой концентрации, за все время проведения исследования допускается отбор одной пробы. Если образцы демонстрируют разные показатели, для следующих исследуемых концентраций нужно забирать четыре образца/экспозиции. Образцы концентрации для каждой камеры не должны отклоняться от средней концентрации более чем на ± 10 % для газов и паров или ± 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 учитывается время, необходимое для достижения равновесного состояния в камере (t_{95}) и перехода к распаду.

Сложные смеси из газов/паров и аэрозолей (атмосфера горения и тестируемый препарат, выталкиваемые из программного изделия/прибора конечного пользователя) на каждом этапе могут демонстрировать разное поведение в ингаляционной камере, поэтому по меньшей мере одна индикаторная субстанция (аналит), как правило, основная активная в исследуемом препарате, должна быть выбрана на всех этапах (газ/пар или аэрозоль). Когда тестируемый препарат является смесью (по составу), аналитическая концентрация должна быть описана для общего состава, а не только для активного ингредиента или компонента (вещества, определяемого при анализе).

Гранулометрической состав аэрозолей должен определяться не менее двух раз за 4 ч выдержки при помощи каскадного импактора (пробоотборник частиц) или альтернативным инструментом [например, аэродинамическим спектрометром (APS)]. Гравиметрический фильтр или импинджер (прибор для измерения запыленности и загазованности) нужно использовать для подтверждения эффективности

работы основного прибора, используемого для определения гранулометрического состава исследуемого вещества. Массовая концентрация, полученная ситовым анализом, должна находиться в разумных пределах массовой концентрации, полученной в результате анализа работы фильтров. Если удастся показать равнозначность результатов, полученных каскадным импактором и альтернативным инструментом, то допускается использование альтернативного инструмента в исследовании. Размеры частиц должны быть определены для паров, если есть вероятность, что их конденсация приведет к образованию аэрозоля, или если в парах обнаружены частицы с потенциалом смешанных фаз.

4 Процедура испытания

Существуют два вида исследования: Традиционный протокол и Протокол C × t. Оба включают визуальное наблюдение, основное исследование и/или тест на предельное содержание. Если данные показывают, что один пол восприимчивее другого, руководитель исследования может предпочесть продолжить испытание с более восприимчивым полом. Если грызуны, за исключением крыс, подвергаются воздействию только через нос, то максимальный период экспозиции должен минимизировать видоспецифические различия. Перед тем как начать, все имеющиеся данные необходимо рассмотреть, чтобы минимизировать количество вовлеченных в эксперимент животных.

4.1 Традиционный протокол

4.1.1 Общие положения

В Традиционном протоколе группы животных подвергаются воздействию препарата определенный период времени (как правило, 4 ч) в камерах, предназначенных для воздействия только при вдыхании через все тело. Животных подвергают испытанию предельной концентрацией или испытанию воздействием трех концентраций поэтапно (основное исследование). Основному исследованию предшествует предварительное, за исключением случаев, когда информация о тестируемом веществе имеется.

4.1.2 Предварительное исследование

Предварительное исследование используется для оценки эффективности исследуемого препарата, для определения различий в гендерной восприимчивости и помогает выбрать уровень концентрации для экспозиции в основном исследовании или в тесте на предельную концентрацию. При выборе уровня концентрации для предварительного исследования нужно использовать всю имеющуюся информацию, включая данные QSAR, схожих химикатов. Воздействию каждого уровня концентрации должны быть подвержены не более трех самцов и трех самок (три животных/пол может понадобиться для того, чтобы установить различие в гендерной восприимчивости). Предварительное исследование может быть ограничено наблюдением за одним уровнем концентрации, но при необходимости можно включить больше концентраций. В предварительном исследовании не следует использовать такое же большое количество животных и концентраций, как в основном. Вместо предварительного исследования допустимо использовать результаты ранее выполненного исследования.

Выбор предельной концентрации, как правило, зависит от нормативных требований. При использовании Классификационной системы СГС предельная (максимально разрешенная) концентрация для газов, паров и аэрозолей составляет 20 000 промилле, 20 мг/л и 5 мг/л соответственно. Генерация предельных концентраций для некоторых препаратов, особенно для паров и аэрозолей, может быть технически затруднена. При испытании аэрозоля целью является получение размеров частиц, пригодных для вдыхания (MMAD — от 1 до 4 μm) при предельной концентрации 2 мг/л. Такое возможно с большинством исследуемых препаратов. Тестирование аэрозоля при предельной концентрации больше чем 2 мг/л нужно осуществлять только в случае, если величина частиц пригодна для вдыхания. СГС не одобряет испытаний на излишне высоких предельных концентрациях из соображений заботы о животных. Предельная концентрация может быть превышена только по исключительно веской причине (охрана здоровья человека), в таких случаях причина должна быть отражена в отчете. В случае если тестируемый продукт потенциально взрывоопасен, нужно избегать условий, благоприятных для взрыва. Чтобы избежать ненужного использования животных, перед испытанием предельной концентрации необходимо провести пробный тест, чтобы удостовериться, что в камере обеспечены условия для проведения теста с предельной концентрацией.

Если при испытании с предельной концентрацией наблюдаются смертность или агония, результаты испытания могут заменить предварительное исследование при испытаниях других концентраций (см. 4.1.3). Если физические или химические свойства исследуемого препарата не позволяют достичь

уровня предельной концентрации, нужно исследовать максимально достижимую концентрацию. Если при испытании максимально достижимой концентрации летальность составляет более 50 %, дальнейшее исследование не требуется. Отчет по исследованию должен содержать пояснения и данные, обосновывающие, почему невозможно достичь уровня предельно допустимой концентрации. Если максимально достижимая концентрация паров не вызывает токсического эффекта, необходимо сгенерировать исследуемый препарат в виде жидкого аэрозоля.

4.1.3 Основное исследование

Основное исследование, как правило, выполняется с использованием пяти самцов и пяти самок (или пять животных наиболее восприимчивого пола, если таковой известен) на каждый уровень концентрации. Для проведения достоверного статистического анализа нужно использовать достаточный уровень концентрации. Временной интервал между тестами в подопытных группах определяется появлением, длительностью и тяжестью токсических признаков. Экспозицию последующего уровня концентрации нужно отложить, пока не появится уверенность в том, что прошедшие испытание животные выживут. Это позволит руководителю исследования скорректировать целевую концентрацию для следующей подопытной группы. Такое в ингаляционных исследованиях не всегда может быть практичным из-за зависимости от сложных современных технологий, поэтому экспозиция на животных следующего уровня концентрации должна основываться на предыдущем опыте и научном суждении.

4.2 Протокол Концентрация × Время (C × t)

4.2.1 Общие положения

Пошаговое исследование Концентрация × Время (C × t) может быть рассмотрена как альтернатива Традиционному протоколу при оценке ингаляционной токсичности. Такой подход позволит подвергнуть животных воздействию нескольких уровней концентрации исследуемого вещества и многочисленным периодам воздействия. Все испытания проводятся в камере, предназначенной для воздействия через нос (камеры для воздействия через все тело не используются в настоящем протоколе). Результатом исследований в соответствии с Традиционным протоколом и Протоколом C × t являются значения CL_{50}/LC_{50}, но испытания по Протоколу C × t предпочтительнее для получения значений CL_{01}/LC_{01} и CL_{10}/LC_{10}.

Исследование методом моделирования показало, что использование двух животных в установленном интервале C × t (по одному каждого пола или два наиболее восприимчивого пола) может быть целесообразным при испытании четырех или пяти концентраций в основном исследовании. В некоторых случаях руководитель исследования может решить использовать по две крысы каждого пола на интервал C × t. Использование двух животных каждого пола на каждый уровень концентрации/момент времени может уменьшить систематическую ошибку оценки и изменчивость, увеличить коэффициент результативности и улучшить охват доверительного интервала. Тем не менее в случае неполного использования данных (при использовании по одному животному каждого пола или двух наиболее восприимчивого пола) пятой экспозиции может быть достаточно.

4.2.2 Предварительное исследование

Так же как и в Традиционном протоколе, предварительное исследование может предшествовать основному исследованию или испытанию предельной концентрации для оценки эффективности испытываемого вещества, определения гендерных различий в чувствительности и помощи в выборе уровня концентрации для экспозиции в основном исследовании. При выборе уровня концентрации для предварительного исследования нужно использовать всю имеющуюся информацию, включая структурно-активные отношения и данные о близких по структуре веществах. Воздействию каждого уровня концентрации должны быть подвержены не более трех самцов и трех самок (это количество может понадобиться для того, чтобы установить различие в гендерной восприимчивости). Животных нужно подвергнуть воздействию одной продолжительности, как правило, на 240 мин. Вместо предварительного исследования допустимо использование результатов ранее выполненного исследования.

4.2.3 Испытание начальной концентрации (C × t-протокол)

Начальная концентрация может быть предельной концентрацией или концентрацией, выбранной руководителем исследований на основании предварительных исследований.

Группы 1 животное/пол подвергаются воздействию этой концентрации в течение различной продолжительности времени (например, 15, 30, 60, 120 или 240 мин), всего общее количество животных — 10 (Экспозиционная сессия I, пункт 4.2.5.2).

Выбор предельной концентрации, как правило, зависит от нормативных требований. При использовании Классификационной системы СГС (GHS) предельная концентрация для газов, паров и аэрозолей

составляет 20 000 промилле, 20 мг/л и 5 мг/л соответственно (или максимально разрешенная концентрация). Генерация предельных концентраций для некоторых препаратов, особенно для паров и аэрозолей, может быть технически затруднена. При испытании аэрозоля целью является получение размеров частиц, пригодных для вдыхания (MMAD — от 1 до 4 μm) при предельной концентрации 2 мг/л. Такое возможно для большинства исследуемых препаратов. Тестирование аэрозоля воздействию предельной концентрации более 2 мг/л нужно осуществлять только в случае, если величина частиц пригодна для вдыхания. СГС не одобряет испытаний на излишне высокие предельные концентрации из соображений заботы о животных. Предельная концентрация может быть превышена только по исключительно веской причине (охрана здоровья человека), в таких случаях причина должна быть отражена в отчете. В случае, если тестируемый препарат потенциально взрывоопасен, нужно избегать условий, благоприятных для взрыва. Чтобы избежать ненужного использования животных, перед воздействием предельно разрешенной концентрацией необходимо провести пробный тест, чтобы удостовериться, что в камере обеспечены условия для проведения теста на предельно разрешенную концентрацию.

Если при испытании на предельно допустимую концентрацию наблюдаются смертность или агония, результаты испытания могут заменить визуальное исследование при испытаниях других концентраций. Если физические или химические свойства исследуемого препарата не позволяют достичь уровня предельно допустимой концентрации, нужно исследовать максимально достижимую концентрацию. Если при испытании максимально достижимой концентрации летальность составляет более 50 %, дальнейшее исследование не требуется. Отчет по исследованию должен содержать пояснения и данные, обосновывающие, почему невозможно достичь уровня предельно допустимой концентрации. Если максимально достижимая концентрация паров не вызывает токсического эффекта, необходимо сгенерировать исследуемый препарат в виде жидкого аэрозоля.

4.2.4 Основное исследование

Начальная концентрация, испытываемая в основном исследовании (Экспозиционная сессия I, пункт 4.2.5.2), будет являться либо предельной концентрацией, либо концентрацией, выбранной руководителем исследования на основе предварительного исследования. Если во время или после Экспозиционной сессии I наблюдалась летальность, то для определения уровня концентрации и периода воздействия в Экспозиционной сессии II нужно руководствоваться минимальной экспозицией (время × концентрация), которая привела к летальности во время испытания предельной концентрации. Каждая последующая сессия воздействия будет зависеть от предыдущей.

Для многих исследуемых препаратов результатов теста на предельно допустимую концентрацию с тремя дополнительными экспозиционными сессиями с меньшей временной сеткой будет достаточно для определения отношений C × t и летальности, но может быть целесообразным осуществить пятую экспозицию (см. приложение А).

4.3 Наблюдения

Во время экспозиции животные систематически должны подвергаться клиническому осмотру. После экспозиции клинические наблюдения необходимо проводить не менее двух раз и чаще в день экспозиции, при наличии реакции у животных на воздействие, и в последующие 14 дней не реже одного раза в день. Продолжительность периода наблюдения не фиксирована, но определяется природой и временем появления клинических признаков, а также периодом восстановления. Важность представляет время появления и исчезновения признаков интоксикации, особенно если в появлении признаков интоксикации наблюдается тенденция к запаздыванию. Все наблюдения систематически фиксируются для каждого животного индивидуально. Помимо случаев, когда существуют веские причины поступать иначе, животные в состоянии агонии, а также испытывающие сильную боль и/или устойчивые признаки сильного поражения, должны быть умерщвлены гуманным способом без промедления. Принципы и критерии по определению гуманной конечной точки должны быть учтены. Время умерщвления животного по гуманным соображениям или время, когда оно было найдено мертвым, нужно зафиксировать максимально точно.

При наблюдении за животными в клетке должны фиксировать изменения в коже и шерсти, глазах и слизистых, а также в респираторной, кровеносной, вегетативной и центральной нервной системах, в соматомоторной активности и поведении. По возможности нужно отмечать различие между локальными и системными эффектами. Внимание должно фокусироваться на явлениях тремора, конвульсий, слюноотделения, диареи, летаргии, сна и комы. Измерение ректальной температуры позволит удостовериться в рефлекторном брадипноэ или гипо/гипертермии, связанной с лечением или обездвиженностью.

4.3.1 Масса тела

Индивидуальную массу тела каждого животного следует зафиксировать один раз во время акклиматизационного периода, в день экспозиции перед экспозицией (день 0), в первый, третий и седьмой дни и затем еженедельно, а также в день гибели или умерщвления, если они наступают после первого дня. Масса тела является важным индикатором интоксикации, поэтому необходимо внимательно наблюдать животных, которые непрерывно теряют > 20 % по сравнению с показателями на начало исследования. Выжившие животные должны быть взвешены и умерщвлены гуманным способом по истечение постэкспозиционного периода.

4.3.2 Патология

Все подопытные животные, включая тех, кто погиб во время исследования или был удален из него по гуманным соображениям, должны быть подвергнуты общему вскрытию. Если вскрытие нельзя осуществить сразу после обнаружения мертвого животного, его следует охладить (не заморозить) при температуре, достаточно низкой, чтобы не допустить аутолиза. Вскрытие следует осуществлять как можно скорее, как правило, в течение одного-двух дней. Все большие патологические изменения следует зафиксировать для каждого животного, обращая особое внимание на любые изменения в респираторном тракте.

Дополнительные осмотры могут повысить значимость полученных в ходе исследования результатов, например измерение массы легкого у выжившей крысы и/или обнаружение раздражения в дыхательных путях вследствие микроскопического анализа. Среди осмотренных органов могут быть органы с симптомами выраженных патологических изменений у животных, выживших 24 или более часов, или органы, которые очевидно или предположительно поражены. Микроскопическое исследование всего респираторного тракта позволит получить полезную информацию об исследуемых препаратах, реагирующих с водой, таких как кислоты и гигроскопические исследуемые препараты.

4.4 Данные и отчеты

Необходимо предоставить данные о массе тела и результаты вскрытия по каждому животному индивидуально. Данные клинического осмотра должны быть сведены в таблицу, отражающую количество животных в каждой подопытной группе, количество животных со специфическими признаками интоксикации, количество животных, найденных мертвыми или умерщвленных по гуманным причинам, время смерти каждого животного, описание и динамика появления признаков токсичности и их обратимость, а также данные вскрытия.

4.4.1 Отчет об испытании

Отчет об испытании должен включать следующие данные:

Подопытные животные и их содержание:

- описание условий содержания в клетке, включая количество (или изменения в количестве) животных в клетке, материал подстилки, температуру окружающей среды и относительную влажность, световой период и обозначение диеты;
- используемые виды/линии и обоснование для использования других видов, кроме крыс;
- количество, возраст и пол животных;
- метод рандомизации;
- подробности о качестве пищи и воды (включая тип/источник диеты, источник воды);
- описание условий содержания перед началом испытания, включая диету, карантин и лечение от болезни.

Исследуемый препарат:

- физическая природа, наличие примесей и, если значимо, физико-химические свойства (включая изомеризацию);
- идентификационные данные и регистрационный номер в Реферативной службе по химии (CAS), если таковой имеется.

Растворитель:

- обоснования для использования растворителя и обоснование для выбора растворителя (если это иное, чем вода);
- справочные или совпадающие данные, подтверждающие, что растворитель не влияет на результаты исследования.

Ингаляционная камера:

- описание ингаляционной камеры, включая размеры и объем;

- описание и поставщик оборудования, используемого для экспозиции животных, а также генерация атмосферы;
- оборудование для измерения температуры, относительной влажности, размера частиц и фактической концентрации;
- источник поступления воздуха, обработка поступившего/извлеченного воздуха и система кондиционирования;
- методы, используемые для поверки оборудования с целью обеспечить гомогенность в тестируемой атмосфере;
- перепады давления (положительные или отрицательные);
- отверстия для экспозиции в камере («только через нос»); размещение животных в системе (воздействие «через все тело»);
- временная гомогенность/стабильность тестируемой атмосферы;
- место размещения датчиков, определяющих температуру и относительную влажность, отбор образцов тестируемой атмосферы в клетке;
- 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});
- количество изменений объема в час;
- приборы, снимающие показания (если применены).

Данные экспозиции:

- обоснование для выбора целевой концентрации в основном исследовании;
- номинальные концентрации (общая масса исследуемого препарата, сгенерированного в ингаляционной камере, разделенная на объем воздуха, проходящего через камеру);
- фактическая концентрация тестируемого препарата, собранная из зоны дыхания животных; для исследуемых смесей, которые продуцируют гетерогенные физические формы (газы, пары, аэрозоли), каждая форма может быть проанализирована отдельно;
- все воздушные концентрации должны быть указаны в отчете в единицах массы (например, мг/л, мг/м^3 и т. д.); в скобках допускается указание их в единицах объема (например, промилле, часть на млрд и т. д.);
- гранулометрический состав, средний аэродинамический диаметр (MMAD) и геометрическое стандартное отклонение (Σg), включая методы из вычисления. Индивидуальный гранулометрический анализ должен быть изложен в отчете.

Условия проведения испытания:

- подробные сведения о приготовлении тестируемого препарата, включая данные о мероприятиях по уменьшению размера частиц для твердых материалов или по приготовлению растворов исследуемого препарата. В случае, когда есть вероятность, что механические процессы изменят состав исследуемого вещества, необходимо включить результаты анализов для подтверждения состава тестируемого вещества;
- описание оборудования (предпочтительно с диаграммой), используемого для генерации исследуемой атмосферы и для экспозиции животных в этой атмосфере;
- подробные сведения об оборудовании, используемом для наблюдения за температурой в камере, относительной влажностью, воздушными потоками;
- подробные сведения об оборудовании, используемом для забора образцов для вычисления концентрации в камере и гранулометрического состава;
- подробные сведения об используемом химико-аналитическом методе и проверке достоверности метода (включая эффективность восстановления тестируемого препарата из питательной среды, в которую были помещены образцы;
- метод случайной выборки животных для включения в испытательную и контрольную группы;
- 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;
- 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, тяжесть, время появления и продолжительность эффектов);

- индивидуальная масса тела животных, полученная в дни проведения эксперимента; дата и время смерти, если предшествовали умерщвлению, динамика появления признаков токсичности и были ли они обратимы для каждого животного;

- данные вскрытия и гистопатологические данные для каждого животного, если имеются;

- оценка летальности (CL_{50}/LC_{50}, CL_{01}/LD_{01}), включая 95 % доверительного предела, и скошенная питательная среда (если установлена методом оценки);

- статистические отношения, включая оценку экспоненты n (Протокол C × t). Необходимо указать название используемого программного обеспечения для статистической обработки данных.

Обсуждение и интерпретация результатов:

- особое внимание необходимо уделить описанию методов, используемых в целях удовлетворения требованиям Руководства по проведению испытаний, например, таким как к предельно допустимой концентрации или размерам частиц;

- пригодность частиц для вдыхания, принимая во внимание общие данные, должна быть адресной, особенно если требования к размерам частиц не соблюдены;

- если на основании критериев по определению гуманной конечной точки была необходимость в гуманном умерщвлении животного, испытывающего боль или проявляющего признаки страдания, нужно привести объяснения;

- последовательность методов, используемых 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 образ действий (оказывающий общее или локальное влияние на организм) должны быть адресными.

Приложение А
(обязательное)

Протокол С × t

А.1 Поэтапное исследование Концентрация × Время (С × t)

Поэтапное исследование взаимосвязи Концентрация × Время (С × t) может рассматриваться методом установления как альтернатива исследованиям по традиционному протоколу по оценке ингаляционной токсичности. Оно может быть выполнено, если есть необходимость в индивидуальном нормативном или научном исследовании, для которого требуются испытания на животных в течение множественных временных сроков, такие как планирование ответных действий при чрезвычайных обстоятельствах (emergency response planning). Такой подход обычно начинается с ограниченного испытания (Экспозиционные сессии I), при котором на животное воздействует испытываемое вещество в течение пяти временных сроков (15, 30, 60, 120 и 240 мин), реализованных в течение одного сеанса воздействия. При использовании глобальной системы классификации СГС (GHS) предельная концентрация составляет 20 000 ppm для газов, 20 мг/л для паров и 5 мг/л для аэрозолей. Эти уровни могут быть превышены только при наличии нормативной или научной необходимости проведения испытания на этих уровнях.

При использовании Классификационной системы СГС предельная концентрация составляет 20 000 ppm для газов, 20 мг/л для паров и 5 мг/л для аэрозолей. Эти уровни могут быть превышены только при наличии нормативной или научной необходимости испытания на этих уровнях.

В ситуации, когда об исследуемом препарате мало или не имеется информации, предварительное исследование нужно провести в группах не более трех животных/пол, подвергая воздействию целевых концентраций, выбранных руководителем исследования, как правило, продолжительностью 240 мин.

Если в Экспозиционной сессии I тестируется предельная концентрация и при этом наблюдается менее 50 % случаев смертельного исхода, необходимости в дополнительных исследованиях нет. В нормативных или научных интересах следует проводить соотношения концентрация/время/ответ на уровне, превышающем уровень предельной концентрации, следующая экспозиция должна быть выполнена на более высоком уровне, например в два раза выше предельной концентрации.

Если в испытании предельной концентрации наблюдается токсичность, необходимо провести дополнительное испытание (основное исследование). Дополнительная экспозиция выполняется либо с более низкой концентрацией (Экспозиционные сессии II, III или IV), или с более высокой концентрацией (Экспозиционная сессия IV), при соответствующих продолжительностях и при меньшей разнесенности.

Исследования (тест с предельно концентрацией и основное исследование) выполняются с использованием одного животного/пола на концентрацию/момент времени или двух животных наиболее восприимчивого пола на концентрацию/момент времени. В некоторых случаях руководитель исследования может решить использовать по две крысы обоих полов на концентрацию/момент времени (или четырех животных восприимчивого пола на концентрацию/момент времени). Использование двух животных каждого пола на каждый уровень концентрации/момент времени может уменьшить систематическую ошибку оценки и изменчивость, увеличить коэффициент результативности и улучшить охват доверительного интервала относительно протокола.

В идеале каждая экспозиционная сессия выполняется в течение одного дня. Это позволяет отложить следующую экспозицию до тех пор, пока не будет уверенности в том, что уже подвергнутые воздействию животные выживут, а также дает возможность руководителю исследования выверить целевую концентрацию и продолжительность воздействия для следующей экспозиционной сессии. Рекомендуется начинать каждую сессию с группы, которая подвергнется наиболее продолжительному воздействию, например 240 мин, затем группа, которая подвергнется воздействию в 120 мин, и т. д. Если животные, подвергшиеся воздействию 240 мин, погибают через 90 мин или демонстрируют признаки сильного отравления (например, резкое изменение ритма дыхания, затрудненное дыхание), то нецелесообразно подвергать группу воздействию в 120 мин: вероятно, смертность в ней составит 100 %. Поэтому руководитель исследования должен выбрать более короткую продолжительность для воздействия этой концентрацией (90, 65, 45, 33 и 25 мин).

Концентрацию в камере нужно измерять часто, чтобы установить средневзвешенную по времени концентрацию для продолжительности каждого воздействия. По возможности необходимо использовать время смерти (предпочтительнее, чем продолжительность воздействия) каждого животного в статистическом анализе.

А.2 Пример поэтапной процедуры

Экспозиционная сессия I — Тест с предельной концентрацией:

- 1 животное/пол на концентрацию/момент времени; всего 10 животных;
- целевая концентрация = тест на предельную концентрацию;
- воздействие на пять групп животных целевой концентрацией на протяжении 15, 30, 60, 120 или 240 мин.

Экспозиционная сессия II — Основное исследование:

- 1 животное/пол на концентрацию/момент времени; всего 10 животных;

- воздействие на пять групп животных более низкой концентрацией (1/2 предельной концентрации) с чуть большей продолжительностью (множитель √2 разнесения).

Экспозиционная сессия III — Основное исследование:

- 1 животное/пол на концентрацию/момент времени; всего 10 животных;
- воздействие на пять групп животных более низкой концентрацией (1/4 предельной концентрации) с чуть большей продолжительностью (множитель √2 разнесения).

Экспозиционная сессия IV′ — Основное исследование:

- 1 животное/пол на концентрацию/момент времени; всего 10 животных;
- воздействие на пять групп животных более низкой концентрацией (1/8 предельной концентрации) с чуть большей продолжительностью (множитель √2 разнесения)

или

Экспозиционная сессия IV — Основное исследование:

- 1 животное/пол на концентрацию/момент времени; всего 10 животных;
- воздействие на пять групп животных более высокой концентрацией (второй предельной концентрации) с чуть меньшей продолжительностью (множитель √2 разнесения).

В случае недостаточных совпадений можно осуществить дополнительную экспозицию (Экспозиционная сессия V). Результаты первых четырех экспозиций должны быть изучены для выявления недостающих данных в зависимости «концентрация — время». Концентрация и продолжительность экспозиции в Экспозиционной сессии V должны быть выбраны с учетом того, чтобы покрыть недостающие промежутки в данных.

Все экспозиционные сессии (включая первую или тест с предельной концентрацией) будут использованы для расчета соотношения «концентрация — время — отклик» методом статистического анализа. По возможности для каждого интервала C × t нужно использовать средневзвешенную по времени концентрацию и продолжительность воздействия до момента смерти (если смерть наступила во время воздействия).

Примечания

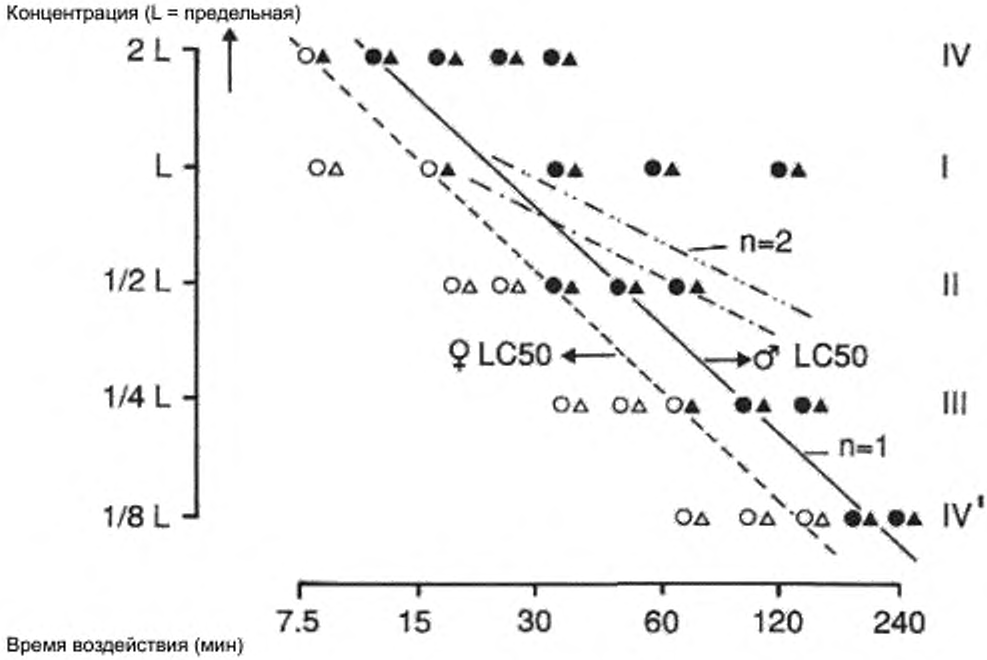
1 Если информация о гендерной восприимчивости отсутствует, следует использовать крыс обоих полов, т. е. по одному животному/пол на концентрацию. При последующих испытаниях для каждого уровня концентрации следует использовать 10 животных чувствительного пола (по два животных обоих полов на концентрацию/момент времени); факт большей чувствительности одного пола может быть зафиксирован прежде или установлен во время экспозиционной сессии. В некоторых обстоятельствах руководитель исследования может решить использовать по две крысы обоих полов на концентрацию/момент времени (или четыре животных восприимчивого пола на концентрацию/момент времени).

2 При использовании СГС предельная разрешенная концентрация для газов, паров и аэрозолей составляет 20 000 промилле, 20 мг/л и 5 мг/л соответственно. В случае предполагаемой токсичности в качестве начальной необходимо выбрать более низкую концентрацию. В нормативных и научных интересах допустимо использование более высокой концентрации.

3 В идеале воздействие на животных следующим уровнем концентрации необходимо приостановить до тех пор, пока не появится обоснованная уверенность в том, что прежде испытуемые животные выживут. Это позволит руководителю исследования отрегулировать целевую концентрацию и продолжительность воздействия для следующих экспозиционных сессий.

4 Для определения последующего соотношения концентрации и продолжительности воздействия необходимо руководствоваться минимальной дозой (время × концентрация), которая привела к летальности во время теста с предельной концентрацией (первая экспозиция). Как правило, концентрация будет уменьшаться вдвое (1/2 предельной концентрации), и животные подвергнутся воздействию в новом временном диапазоне в по-прежнему крупном масштабе, используя геометрическое деление периода воздействия на коэффициент 1,4 (√2) в том промежутке времени, когда во время первой экспозиции наблюдался уровень минимальной летальной концентрации (время × концентрация). В данном случае летальность во время Экспозиционной сессии была обнаружена на 15-й мин; продолжительность во время сессии II по этой причине была ориентирована на 30 мин и составила 15, 21, 30, 42 и 60 мин. После первых двух экспозиций настоятельно рекомендуется схематично отобразить данные указанным выше образом, а также проверить, могут ли соотношение концентрации и времени иметь угол 45 градусов (n = 1) или соотношение «концентрация — время» — отклик меньше (например, n = 2) или больше (например, n = 0,8). В последующих случаях настойчиво рекомендуется адаптировать друг к другу концентрацию и время воздействия.

5 В определенных случаях может возникнуть необходимость увеличить концентрацию (второй предельной концентрации) в новом временном диапазоне в по-прежнему крупном масштабе, используя геометрическое деление периода воздействия на коэффициент 1,4 (√2) в том промежутке времени, когда во время первой экспозиции наблюдался уровень минимальной летальной концентрации. Минимальная продолжительность воздействия, желательно, должна превышать 5 мин; максимальная продолжительность не может превышать 8 ч.



где незакрашенный символ — выжившие животные, закрашенный символ — умершие животные;
треугольники — самки, окружности — самцы;
жирные линии — величины CL_{50}/LC_{50} (диапазон — от 7,5 до 240 мин) для самцов при n = 1;
штриховые линии — величины CL_{50}/LC_{50} (диапазон — от 7,5 до 240 мин) для самок при n = 1;
пунктирные линии — линия гипотетических величин CL_{50}/LC_{50} для самцов и самок, если n было равно двум

Рисунок А.1 — Возможная иллюстрация отношения «концентрация — время — смертность у крыс»

А.3 Математическая обработка результатов для Протокола C × t

Процедура C × t с четырьмя или пятью концентрациями воздействия и пятью длительностями выдает 20 или 25 информационных точек соответственно. С этими информационными точками отношение C × t может быть вычислено с применением статистического анализа:

$$(\text{Единица вероятности})\ \text{Probit}\ (P) = b_0 + b_1 \ln C + b_2 \ln t, \quad (1)$$

где C — концентрация;
t — длительность воздействия, или

$$(\text{Реакция})\ \text{Response} = f(C^n t), \quad (2)$$

где $n = b_1/b_2$.

Применяя уравнение (1), величину CL_{50}/LC_{50} можно рассчитать для заданного периода времени (например, 4 ч, 1 ч, 30 мин или для любого временного периода в диапазоне испытываемых временных периодов), используя P = 5 (50 % ответных реакций). Следует отметить, что правило Хабера применимо только при n = 1. Величина CL_{01}/LC_{01} может быть рассчитана, используя P = 2,67.

Библиография

[1] Руководящий документ ОЭСР Test № 403 «Acute Inhalation Toxicity Testing»

[2] Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals used in Safety Evaluation No. 19, (1999)

[3] United Nations (UN)(2007). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), ST/SG/AC.10/30, UN New York and Geneva

[4] Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment № 39

[5] OECD (draft) Test Guideline 436. OECD Guideline for Testing of Chemicals. Acute Inhalation Toxicity — Acute Toxic Class

[6] Finney D.J. (1977). Probit Analysis, 3rd ed. Cambridge University Press, London/New York

УДК 661:615.099 МКС 13.100

Ключевые слова: химическая продукция, воздействие на организм человека, метод испытаний, острая токсичность, ингаляционное поступление

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

Сдано в набор 24.09.2019. Подписано в печать 30.09.2019. Формат 60 × 84 1/8. Гарнитура Ариал.
Усл. печ. л. 2,33. Уч.-изд. л. 2,10.

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