МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СОВЕТ ПО СТАНДАРТИЗАЦИИ, МЕТРОЛОГИИ И СЕРТИФИКАЦИИ
(МГС)

INTERSTATE COUNCIL FOR STANDARDIZATION, METROLOGY AND CERTIFICATION
(ISC)

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ
СТАНДАРТ

**ГОСТ
32636—
2020**

МЕТОДЫ ИСПЫТАНИЯ ПО ВОЗДЕЙСТВИЮ ХИМИЧЕСКОЙ ПРОДУКЦИИ НА ОРГАНИЗМ ЧЕЛОВЕКА

Субхроническая ингаляционная токсичность: 90-дневное исследование

Издание официальное

Москва
Стандартинформ
2020

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

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

Сведения о стандарте

1 ПОДГОТОВЛЕН Федеральным государственным унитарным предприятием «Российский научно-технический центр информации по стандартизации, метрологии и оценке соответствия» (ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ») 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 30 июня 2020 г. № 131-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
Армения	AM	ЗАО «Национальный орган по стандартизации и метрологии» Республики Армения
Беларусь	BY	Госстандарт Республики Беларусь
Казахстан	KZ	Госстандарт Республики Казахстан
Киргизия	KG	Кыргызстандарт
Россия	RU	Росстандарт
Таджикистан	TJ	Таджикстандарт
Узбекистан	UZ	Узстандарт

4 Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 21 октября 2020 г. № 889-ст межгосударственный стандарт ГОСТ 32636—2020 введен в действие в качестве национального стандарта Российской Федерации с 1 июля 2021 г.

5 Настоящий стандарт является модифицированным по отношению к международному документу OECD Test № 413:2018 «Руководство по испытанию химических веществ. Субхроническая ингаляционная токсичность: 90-дневное исследование» («Guideline for testing of chemicals — Subchronic inhalation toxicity: 90-day study», MOD) путем:

- включения дополнительного раздела 1, дополнительных фраз, слов, выделенных в тексте курсивом;
- изменения его структуры для приведения в соответствие с правилами, установленными в ГОСТ 1.5 (подразделы 4.2 и 4.3).

Сопоставление структуры настоящего стандарта со структурой указанного международного документа приведено в дополнительном приложении ДА.

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

6 ВЗАМЕН ГОСТ 32636—2014

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, 2020

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 Основные положения 1
3 Описание метода 2
4 Исследование токсичности 3
5 Условия проведения испытаний 6
6 Контроль условий проведения испытаний 6
7 Наблюдения 9
8 Масса тела 9
9 Потребление пищи и воды 9
10 Клиническая патология 9
11 Бронхоальвеолярный лаваж 10
12 Нагрузка на легкие 11
13 Офтальмологическое исследование 11
14 Макропатология и масса органов 11
15 Гистопатология 13
16 Исследование функции легких 14
17 Данные исследований и отчет 14
Приложение А (обязательное) Схемы проведения исследований 17
Приложение ДА (справочное) Сопоставление структуры настоящего стандарта со структурой примененного в нем международного документа 19
Библиография 21

Краткое описание

Настоящее пересмотренное руководство OECD Test № 413:2018 разработано для полной характеристики токсичности исследуемого химического вещества при ингаляционном поступлении в субхроническом исследовании продолжительностью 90 дней, а также для обеспечения надежными данными для количественных оценок риска вдыхания. Основной причиной для пересмотра указанного руководства было включение в испытания наноматериалов, а также отражение новейших достижений в области испытаний вдыхаемых газов, паров и аэрозолей. В измененной редакции прежде всего рассматриваются фактический план основного исследования, его зависимость от агрегатного состояния исследуемого химического вещества (газ, пар, жидкий аэрозоль или твердый аэрозоль) и от данных по определению диапазона доз или другой информации, указывающей на то, что исследуемое химическое вещество оседает и удерживается в легких, вызывая неблагоприятные локальные или системные эффекты. Основное исследование включает группы грызунов, состоящие не менее чем из 10 самцов и 10 самок, подвергающихся воздействию исследуемого химического вещества в течение 6 ч в день на протяжении 90-дневного (13-недельного) периода для трех или более уровней концентрации, а также отфильтрованного воздуха (отрицательный контроль) и среды (носителя) [контроль среды (носителя)]. Затем животных умерщвляют в течение 24 ч после окончания периода воздействия. Как правило, животных подвергают воздействию пять дней в неделю, но также допустимо воздействие в течение семи дней в неделю. Для всех исследуемых химических веществ проводят анализ жидкости бронхоальвеолярного лаважа (BALF). Для этого легкие разделяют: левое легкое используется для гистопатологии, правое — для анализа жидкости бронхоальвеолярного лаважа (BALF). Если планируются группы восстановления, их также подвергают бронхоальвеолярному лаважу (BAL) при разделении легких. Если исследуемое химическое вещество остается в легких, руководитель исследования может рассмотреть дополнительные периоды наблюдения после воздействия (PEO), включающие измерения нагрузки на легкие, для получения информации о динамике очищения легких и перемещении веществ, причем последнее особенно актуально, если исследуемое химическое вещество представляет собой твердый наноматериал.

Для более полной характеристики токсичности исследуемого вещества настоящее руководство предлагает включать дополнительные необязательные исследования, такие как токсикокинетика и/или оценка системной токсичности (например, оценка иммунных, печеночных, неврологических и/или сердечно-сосудистых эффектов). Более подробные указания по проведению дополнительных наблюдений и их анализу приведены в [1].

Введение

Руководства Организации экономического сотрудничества и развития (OECD) периодически пересматривают с учетом научного прогресса или изменения норм оценки токсикологических реакций, необходимости гуманного отношения к животным и изменяющихся нормативных требований. Исходное руководство по исследованию субхронической ингаляционной токсичности OECD Test № 413 было принято в 1981 г. [2]. В 2009 г. оно было пересмотрено с учетом полученных научных данных для удовлетворения текущих и будущих потребностей нормативного регулирования. Основной причиной последнего пересмотра является обеспечение возможности испытания аэрозольных частиц, включая наноматериалы. Отмечено, что наночастицы и тонкодисперсные частицы существуют одновременно в виде непрерывной совокупности, и поэтому образцы искусственных наночастиц имеют тенденцию к агломерации в исследуемой атмосфере в зависимости от способа их получения, физических свойств и химического состава. Наиболее значимые особенности последней версии:

- пересмотренная редакция предусматривает выполнение соответствующих измерений жидкости бронхоальвеолярного лаважа (BALF) для всех исследуемых химических веществ путем разделения легких для гистопатологии и бронхоальвеолярного лаважа (BAL). Запланированная группа восстановления также должна включать анализ BALF;

- если исследование по подбору диапазона доз или другая соответствующая информация свидетельствуют, что частицы вдыхаемого исследуемого вещества плохо растворимы и будут удерживаться в легких, следует проводить измерение нагрузки на легкие, которые подтверждают осаждение и задержку частиц в легких. Анализ BALF и измерение нагрузки на легкие выполняют для всех исследуемых химических веществ в течение 24 ч после прекращения воздействия, а также могут быть проведены через один или два дополнительных интервала времени после воздействия (PEO). Руководитель исследования определяет необходимость проведения дополнительных исследований после воздействия химических веществ и время проведения в соответствии с целями исследования и результатами определения диапазона доз и/или другой соответствующей информации (например, PEO-1 — для определения удерживания в легких и PEO-1, PEO-2 и PEO-3, если для оценки кинетики очищения необходимы результаты трех измерений нагрузки на легкие (см. приложение А и [1]);

- исследование (или исследования) по определению диапазона доз, которое проводят в основном исследовании для определения уровней концентрации, должно включать анализ BALF и дополнительно может включать измерения нагрузки на легкие. Оно может быть предназначено для получения информации о чувствительности функции легких в зависимости от пола животных, температуры тела и т. д., но должно быть тщательно спланировано и сбалансировано для предотвращения ошибок;

- по версии руководства OECD, Test № 413:2009 было необходимо, чтобы масс-медианный аэродинамический диаметр (MMAD) частиц аэрозоля был от 1 до 3 мкм с геометрическим стандартным отклонением (σg или GSD) от 1,5 до 3,0. Для обеспечения исследования аэрозолей нанодиапазона и повышения способности к осаждению в легких следует по возможности соблюдать новый норматив: MMAD должен быть не более 2 мкм, а σg — от 1 до 3. Если этот норматив не может быть обеспечен, в отчете об исследовании должно быть представлено обоснование, включая описание мер, принятых для его достижения, таких как размол [1].

Результаты исследований субхронической ингаляционной токсичности используют в основном для установления нормативных требований к концентрации веществ при оценке профессиональных рисков для здоровья работников. Их также используют для определения и оценки рисков для человека при использовании в жилых помещениях, при транспортировании и для окружающей среды. Это руководство позволяет характеризовать побочные эффекты после многократного ежедневного вдыхания испытуемого химического вещества в течение 90 дней. Данные, полученные в исследовании субхронической ингаляционной токсичности, могут быть использованы для количественной оценки риска и выбора концентраций в хронических исследованиях. Определения специальных терминов, используемых в данном руководстве, приведены в [1].

М Е Ж Г О С У Д А Р С Т В Е Н Н Ы Й С Т А Н Д А Р Т

МЕТОДЫ ИСПЫТАНИЯ ПО ВОЗДЕЙСТВИЮ ХИМИЧЕСКОЙ ПРОДУКЦИИ НА ОРГАНИЗМ ЧЕЛОВЕКА

Субхроническая ингаляционная токсичность: 90-дневное исследование

Methods of testing the impact of chemical products on the human body. Subchronic inhalation toxicity: 90-day study

Дата введения — 2021—07—01

1 Область применения

Настоящий стандарт устанавливает метод 90-дневного исследования субхронической ингаляционной токсичности для получения полной характеристики токсичности исследуемого химического вещества при ингаляционном поступлении и представления надежных данных для количественной оценки риска при вдыхании газов, паров и аэрозолей.

Настоящий стандарт может быть также применен для исследования наноматериалов.

2 Основные положения

2.1 Для повышения качества исследования и минимизации числа подопытных животных в испытательной лаборатории до начала исследования должна быть проанализирована вся имеющаяся информация об исследуемом химическом веществе. При выборе концентраций вещества для исследования следует использовать информацию, включающую идентификацию, химическую структуру и физико-химические свойства исследуемого химического вещества, результаты любых исследований токсичности *in vitro* или *in vivo*, предполагаемое(ые) использование(я) и вероятность воздействия на человека, имеющиеся данные количественной зависимости структура — активность [(Q)SAR] и данные о токсичности структурно родственных химических веществ, а также результаты других исследований повторного воздействия. При исследовании твердого аэрозоля необходимо иметь информацию о его задержке и кинетике в легких. Если в ходе исследования предполагают или наблюдают проявление системной токсичности (например, иммунотоксичность, нейротоксичность, гепатотоксичность, воздействие на сердечно-сосудистую систему), руководитель исследования может принять решение о необходимости включения оценки соответствующих токсикологических конечных точек. Несмотря на то, что для проведения дополнительных исследований может понадобиться значительное время, это не должно быть помехой для плана основного исследования.

2.2 Если исследуемое химическое вещество представляет собой аэрозоль из плохо растворимого(ых) материала(ов), следует по возможности определить размер частиц, морфологические и физико-химические характеристики, включая определение растворимости. Определение характеристик наноматериалов приведено в [3] и [4].

2.3 Вдыхаемая (или альвеолярная) фракция плохо растворимых частиц, которые медленно выводятся, может накапливаться с каждым последующим периодом воздействия. Степень задержки в легких можно оценить путем измерения нагрузки на легкие. Часть этих частиц может перемещаться и широко распространяться в организме. Измерения нагрузки на лимфатические узлы, связанные с легкими (LALN), могут указывать на транслокацию, что может быть дополнительно подтверждено измерениями нагрузки на орган-мишень. Эффекты любой транслокации могут быть оценены с учетом системной токсичности. Данные по нагрузке на легкие не исключают значимости результатов

Издание официальное

токсикологических исследований на подопытном животном для оценки риска для человека. Подробные указания приведены в [1].

2.4 Агрессивные или раздражающие химические вещества могут быть исследованы при разбавлении в концентрациях, обеспечивающих заданную степень токсичности. При воздействии исследуемых химических веществ на животных целевые концентрации должны быть достаточно низкими, чтобы не вызывать явной боли и дистресса, но достаточными для распространения кривой зависимости концентрация — ответ до уровней, которые достигают регуляторной и научной цели испытания. Концентрации следует выбирать в каждом конкретном случае, предпочтительно на основе надлежащим образом запланированного исследования по определению диапазона, которое позволит получить информацию о критической конечной точке, любом пороге раздражения и времени проявления (4.2.1, 4.2.2 и 4.3). Необходимо привести обоснование выбора концентрации.

2.5 Животные в состоянии агонии или животные, очевидно испытывающие боль или демонстрирующие признаки серьезного и стойкого дистресса, должны быть гуманно умерщвлены. Животных в состоянии агонии учитывают как животных, погибших во время испытания. Критерии для принятия решения об умерщвлении агонизирующих или тяжело страдающих животных, а также руководство по определению признаков предсказуемой или неминуемой смерти приведены в [5].

3 Описание метода

3.1 Выбор видов животных

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

3.2 Подготовка животных

Самки должны быть нерожавшими и небеременными. На день отбора для проведения исследований возраст животных должен быть от семи до девяти недель. Масса тела должна быть в пределах ± 20 % средней массы тела животных каждого пола. Животных отбирают случайным образом, маркируют для индивидуальной идентификации и содержат в клетках не менее 5 дней до начала испытания для акклиматизации к лабораторным условиям.

3.3 Условия содержания животных

Животных следует идентифицировать индивидуально (предпочтительно с использованием подкожных микрочипов) для облегчения наблюдения и предотвращения путаницы. Температура в помещении с подопытными животными должна быть (22 ± 3) °С. Относительная влажность должна поддерживаться в диапазоне от 30 % до 70 %. До и после воздействия животных, как правило, содержат в клетках группами одного пола и одной концентрации, но число животных в клетке не должно затруднять наблюдение за каждым животным и сводить к минимуму потери от каннибализма и грызни. Если животных подвергают воздействию только через нос, им может потребоваться привыкание к дыхательной трубке. Дыхательные трубки не должны вызывать у животных физический стресс или повышение температуры или приводить к потере подвижности. Если данные показывают, что подобные изменения не вызывают затруднений, то адаптация к дыхательным трубкам не является необходимой. Животных, все тело которых подвергают воздействию аэрозоля в камере, на время экспозиции следует размещать индивидуально для предотвращения фильтрования исследуемого аэрозоля через наружные покровы тела партнеров по клетке. Можно использовать обычные и проверенные лабораторные диеты, за исключением периода экспозиции исследуемого вещества, когда животное необходимо обеспечить неограниченным количеством питьевой воды. Освещение должно быть искусственным с чередованием периодов света (12 ч) и темноты (12 ч).

3.4 Ингаляционные камеры

Исследования субхронической ингаляционной токсичности обычно проводят в динамических ингаляционных камерах. Не допускается использовать статические ингаляционные камеры, в которых отсутствует воздушный поток. При выборе ингаляционной камеры следует учитывать свойства исследуемого химического вещества и цель испытания. Для исследования жидких или твердых аэрозолей и паров, которые могут конденсироваться с образованием аэрозолей, предпочтительный

способ воздействия — только через нос (этот термин означает также: только через голову, только через нос или только через мордочку). Специальные цели исследования могут быть лучше достигнуты при использовании динамического режима воздействия на все тело, но такой способ воздействия должен быть обоснован в отчете об исследовании. Для обеспечения стабильности атмосферы при использовании камеры для всего тела общий объем подопытных животных не должен превышать 5 % объема камеры. Способ воздействия только через нос и через все тело, а также их конкретные преимущества и недостатки приведены в [1].

4 Исследование токсичности

4.1 Предельные концентрации

В отличие от исследований острой токсичности в исследованиях субхронической ингаляционной токсичности уровень предельных концентраций не установлен. При выборе максимальной концентрации исследуемого вещества следует учитывать:

1) максимально достижимую концентрацию,
2) необходимость поддержания достаточного количества кислорода и/или
3) рекомендации о гуманном обращении с животными.

При отсутствии пределов, основанных на результатах исследований, могут быть использованы концентрации для хронической токсичности в соответствии с Согласованной на глобальном уровне системой классификации и маркировки химических веществ ООН (т. е. вплоть до максимальной концентрации 5 мг/дм^3 — для аэрозолей, 20 мг/дм^3 — для паров и 20,000 ppm — для газов). Если при испытании газов или легколетучих химических веществ (например, хладагентов) возникла необходимость превысить предельные концентрации, то следует привести обоснование. Испытание частиц аэрозолей концентрацией более 2 мг/дм^3 можно проводить только в том случае, если можно обеспечить/поддерживать размер частиц, пригодный для вдыхания [1].

4.2 Исследование по определению диапазона доз

4.2.1 План основного исследования в значительной степени зависит от информации, полученной в ходе исследования по определению диапазона доз. При отсутствии достаточной информации для обеспечения надежности проведения основного исследования должно быть выполнено исследование по определению диапазона доз. Несмотря на то, что основной целью исследования по определению диапазона доз является представление информации для выбора уровней концентрации для основного исследования, оно также может представить дополнительную информацию, обеспечивающую надежность основного исследования. Это в первую очередь относится к исследованию плохо растворимых твердых аэрозолей. Исследование по определению диапазона доз может дать информацию относительно аналитических методов, распределения частиц по размерам, системной токсичности, токсикокинетики, растворимости химических веществ в легких, транслокации частиц, механизмов токсического действия, клинической патологии (гематологии/клинической химии), гистопатологии, биомаркеров повреждения легких, чувствительности в зависимости от пола, данных BALF и оценки максимальной концентрации, не вызывающей неблагоприятного воздействия (NOAEC), минимальной концентрации, не вызывающей неблагоприятного воздействия (LOAEC), максимально допустимой концентрации (МТС) и/или стандартной концентрации (ВМС) в основном исследовании. Руководитель исследования должен использовать исследование по определению диапазона доз для определения наивысшей допустимой концентрации, не вызывающей чрезмерного стресса для животных, и параметров, которые лучше всего будут характеризовать токсичность исследуемого химического вещества. BAL может выполняться после прекращения исследований по определению диапазона концентраций и через определенные промежутки времени после прекращения воздействия. При исследовании твердого аэрозоля выполняют оценку растворимости химического вещества и нагрузки на легкие после воздействия для принятия решения о продолжительности основного исследования после воздействия и временных точках наблюдения после прекращения воздействия (PEO). Кроме того, измерения нагрузки на лимфатические узлы, связанные с легкими (LALN), могут предоставить информацию о транслокации.

4.2.2 Исследование по определению диапазона доз может включать группы для одного или более уровней концентрации исследуемого химического вещества и контрольную группу. Воздействию каждого уровня концентрации подвергают не более пяти самцов и пяти самок. Определение диапазона концентраций должно продолжаться не менее 5 дней, но, как правило, не более 28 дней и может включать период после воздействия, поэтому количество животных должно быть соответствующим

образом скорректировано. При исследовании плохо растворимых частиц может потребоваться, чтобы исследование по определению диапазона концентраций длилось более 28 дней для обеспечения надежной оценки растворимости химического вещества и нагрузки на легкие. Обоснование выбора концентрации для основного исследования необходимо отразить в отчете по основному исследованию. Подробные указания по определению диапазона концентраций приведены в [1].

4.3 Основное исследование

4.3.1 Основное исследование включает не менее трех уровней концентрации исследуемого химического вещества и одновременный отрицательный контроль (воздуха) или носителя (растворителя) (см. 5.1). В настоящем стандарте рассматриваются два плана исследования в зависимости от природы исследуемого химического вещества (см. приложение А). В дополнение к варианту А, обычно используемому для исследования химических веществ (таких, как газ, пар, аэрозоль или их смесь), для исследования химических веществ, которые могут оставаться в легких, предусмотрено использование варианта В. Несмотря на то, что схемы вариантов А и В, приведенные в приложении А, демонстрируют типичные планы исследования, фактический план исследования остается на усмотрение руководителя исследования. При планировании исследования и выбора надлежащего уровня воздействия (см. 4.2.1) следует использовать информацию, полученную в ходе исследования по определению диапазона концентраций, и все имеющиеся соответствующие данные.

4.3.2 Каждая подопытная группа состоит не менее чем из 10 самцов и 10 самок грызунов, которых подвергают воздействию исследуемого химического вещества в течение 6 ч в день 5 дней в неделю в течение 13 недель (общая продолжительность исследования — не менее 90 дней). Животные также могут подвергаться воздействию 7 дней в неделю. При исследовании химического вещества, которое предположительно удерживается в легких (см. вариант В, приложение А), одновременно подвергают воздействию и животных вспомогательных групп, состоящих из пяти самцов на концентрацию (т. е. не менее 20 животных), в тех же условиях, что и группы основного исследования, и для представления информации об удерживаемой дозе оценивают РЕО-1 измерением нагрузки на легкие после прекращения воздействия. Если исследование по определению диапазона концентраций показывает, что животные одного пола более восприимчивы к воздействию исследуемого вещества, то воздействию разных уровней концентраций подвергают животных разных полов, чтобы оптимизировать ответ на концентрацию, как указано в 4.3.5.

4.3.3 Если воздействию только через нос подвергают грызунов других видов, кроме крыс, то можно скорректировать максимальную продолжительность воздействия для сведения к минимуму дистресса, характерного для данного вида. При использовании продолжительности воздействия менее 6 ч в день или необходимости проведения длительного (например, 22 ч в день) исследования воздействия на все тело должно быть представлено обоснование.

4.3.4 Во время экспозиции следует воздержаться от кормления, если время воздействия не превышает 6 ч. Во время воздействия на все тело животным можно давать воду.

4.3.5 Выбранные целевые концентрации должны обеспечивать идентификацию органов-мишеней и показывать четкую зависимость «концентрация — ответ»:

- высокий уровень концентрации должен вызывать токсический эффект, но не приводить к летальному исходу или устойчивым признакам интоксикации, которые могут привести к летальному исходу, либо могут препятствовать обоснованной оценке результатов. При испытании аэрозолей максимальная концентрация может быть максимально достижимым уровнем, который обусловлен соблюдением стандартного распределения частиц по размерам (см. 6.5.1);
- промежуточный уровень (уровни) концентрации должен быть выбран таким образом, чтобы обеспечить классификацию токсического эффекта при воздействии низких и высоких концентраций;
- низкий уровень концентрации, который в идеале будет равен NOAEC, будет вызывать слабые эффекты или вообще не вызывать признаков интоксикации.

4.4 Промежуточные умерщвления

Если запланированы промежуточные умерщвления во время основного исследования воздействия вещества, число животных на каждом уровне воздействия должно быть увеличено на число животных, которые будут умерщвлены до завершения исследования. При использовании промежуточных умерщвлений необходимо представить обоснование и учитывать их должным образом в статистическом анализе.

4.5 Вспомогательные группы

4.5.1 К основному исследованию могут быть добавлены дополнительные вспомогательные группы для оценки выведения, персистенции, отдаленного проявления интоксикации или нагрузки на легкие в течение соответствующего периода после воздействия.

Примеры основных исследований со вспомогательными группами приведены в приложении А. Руководитель исследования может изменить план исследования на основе физико-химических характеристик и кинетики исследуемого химического вещества для получения наиболее достоверных данных. Животных всех вспомогательных групп одновременно с подопытными животными в основном исследовании подвергают воздействию одинаковых уровней концентрации и при необходимости проводят одновременный контроль воздуха или носителя (растворителя) (см. 4.6). Планирование и метод исследований во вспомогательных группах зависят от того, является ли исследуемое химическое вещество твердым аэрозолем и может ли оно привести к задержке в легких (см. блок-схему принятия решений в отношении нагрузки на легкие, приведенную в приложении А). Если исследуемое химическое вещество может удерживаться в легких, основное исследование проводят по варианту В. В остальных случаях основное исследование проводят по варианту А. Вспомогательные группы могут быть включены для оценки выведения в варианте А. Вариант В предусматривает использование вспомогательных групп для оценки выведения и/или измерения нагрузки на легкие.

4.5.2 Вспомогательные группы восстановления *(для исследования выведения)* в РЕО-2 по вариантам А и В состоят из пяти самцов и пяти самок на концентрацию. Животные этих групп одновременно с подопытными животными в основном исследовании подвергаются воздействию тех же уровней концентраций. При необходимости параллельно проводят контроль воздуха и/или носителя (растворителя) (см. 4.6).

4.5.3 При исследовании плохо растворимых твердых аэрозолей, которые могут задерживаться в легких (см. вариант В, приложение А), можно добавить одну или две дополнительные вспомогательные группы из пяти самцов на концентрацию для измерения нагрузки на легкие в разные моменты времени после воздействия. Дополнительные измерения нагрузки на легкие (т. е. РЕО-2 и/или РЕО-3) могут быть добавлены к проекту, если руководитель исследования хочет понять кинетику очищения после воздействия исследуемого вещества. Для получения информации о кинетике клиренса обычно требуются результаты трех измерений нагрузки на легкие в разные моменты времени: первое измерение выполняют в течение 24 ч после прекращения воздействия (РЕО-1) и два измерения проводят после определенных периодов времени — РЕО-2 и РЕО-3. Однако в некоторых случаях для получения информации может быть достаточным использование двух временных точек, например когда основная цель состоит в установлении того, что очищение является очень медленным. Измерения нагрузки на легкие предпочтительно проводят на самцах, которые имеют больший минутный объем, чем самки, и, следовательно, могут иметь бóльшую нагрузку на легкие.

4.5.4 На основании результатов исследования по определению диапазона доз и другой доступной соответствующей информации руководитель исследования должен определить продолжительность периода после воздействия, а также сроки проведения РЕО-2 для групп восстановления и (в случае варианта В) РЕО-3 — для вспомогательных групп с нагрузкой на легкое (см. приложение А). График РЕО-2 и РЕО-3 в варианте В будут зависеть от ожидаемой скорости очищения легких и продолжительности периода восстановления после воздействия. Ниже приведены другие возможные варианты:

- при необходимости руководитель исследования может выбрать схему РЕО-3 перед исследованием группы восстановления (РЕО-2) (если предусмотрено);
- в случае согласованности сроков оценки восстановления и очищения легких может считаться достаточным использование двух временных точек после воздействия исследуемого вещества и измерения нагрузки на легкие, которые могут проводиться только в РЕО-1 (основное исследование) и в РЕО-2 (группа восстановления). Вспомогательная группа в РЕО-3 может быть исключена из исследования;
- руководитель исследования может выбрать измерение нагрузки на легкие в РЕО-1 (основное исследование) и в РЕО-3 (вспомогательная группа) и использовать животных обоих полов в группах восстановления (РЕО-2) для анализа BALF.

4.5.5 Необходимо соблюдать осторожность с выбором и сроками РЕО, чтобы гарантировать, что не потребуются повторные исследования. Руководитель исследования должен обосновать выбор и сроки проведения РЕО, четко указав эти моменты.

4.5.6 Анализ BALF требуется при прекращении воздействия (PEO-1) и при дополнительных PEO, если они запланированы. При измерении нагрузки на легкие (вариант B) анализ BALF в группе восстановления (PEO-2) будет проводиться только у самок, поскольку самцов из этих групп будут использовать для измерения нагрузки на легкие (см. 4.5.3).

4.5.7 Несмотря на то, что в варианте B дополнительные группы запланированы только для измерения нагрузки на легкие (основное исследование — PEO-1 и для вспомогательной группы — PEO-2 и PEO-3), можно рассмотреть возможность использования животных этих групп для определения дополнительных параметров, которые могут помочь в понимании токсикокинетики и интоксикации (включая восстановление) исследуемого химического вещества [1]. Эти дополнительные параметры в приложении A обозначены как подлежащие определению (TBD). Результаты, полученные при PEO-1, могут быть использованы для выбора дополнительных параметров, которые следует проверить в PEO-3, если промежуток времени между PEO-1 и PEO-3 позволяет это сделать. В PEO-3 может быть выполнена дополнительная гистопатология, например для левого легкого или других органов.

4.6 Животные контрольной группы

Животных параллельной группы отрицательного контроля содержат в условиях, идентичных условиям, в которых содержат животных подопытной группы, за исключением того, что их подвергают воздействию фильтрованного воздуха, а не исследуемого вещества. Если в процессе генерации исследуемой атмосферы используют другой носитель (среду) кроме воды, в исследование включают контрольную группу, на которую воздействуют носителем вместо группы отрицательного контроля (фильтрованного воздуха). По возможности в качестве носителя (среды) следует использовать воду. При использовании воды в качестве носителя животных контрольной группы подвергают воздействию воздуха с таким же уровнем относительной влажности, что и животных подопытных групп. Выбор подходящей среды (носителя) должен быть основан на результатах соответствующих предварительных исследований или исторических данных. Если не известна токсичность среды, не рекомендуется использовать одновременно отрицательный контроль воздуха и среды. Если предварительное исследование химического вещества в виде готовой смеси в среде не выявило токсичности, из этого следует, что носитель (среда) не является токсичным в испытуемой концентрации и следует использовать результаты этого контроля среды.

5 Условия проведения испытаний

5.1 Введение концентраций

Животных подвергают воздействию исследуемого вещества в виде газа, паров, аэрозоля или их смеси. Физическое состояние исследуемого химического вещества зависит от его физико-химических свойств, выбранных концентраций и/или агрегатного состояния, наиболее приемлемых для его подготовки и использования. Испытания гигроскопичных и химически активных веществ проводят в условиях сухого воздуха. Следует проявлять осторожность для предотвращения образования взрывоопасных концентраций. Твердые материалы для уменьшения размера частиц могут подвергаться механической обработке для обеспечения соответствия нормам, приведенным в 6.5. Дополнительные указания по механической обработке (размалыванию) приведены в [1].

5.2 Приготовление исследуемого вещества в растворителе

По возможности испытания исследуемого химического вещества следует проводить без растворителя (среды, носителя), а твердые аэрозоли должны быть получены в сухом виде. Если для получения соответствующей концентрации химического вещества и размера частиц необходимо использовать растворитель (среду, носитель), то по возможности используют воду. При растворении исследуемого химического вещества должна быть подтверждена его стабильность в растворителе (носителе).

6 Контроль условий проведения испытаний

6.1 Воздушные потоки в камере

Поток воздуха через ингаляционную камеру следует тщательно контролировать, постоянно измерять и регистрировать не реже одного раза в час во время каждого воздействия. Контроль

концентрации исследуемой атмосферы (или стабильности температуры) в режиме реального времени является неотъемлемой частью измерений всех динамических параметров и обеспечивает косвенные способы контроля всех важных динамических ингаляционных параметров. Если концентрацию контролируют в режиме реального времени, частоту измерений потоков воздуха можно сократить до одного измерения за экспозицию в день. Особое внимание следует уделять предотвращению повторного вдыхания в камере с воздействием только через нос. Концентрация кислорода должна быть не менее 19 %, а концентрация углекислого газа не должна превышать 1 %. Если есть основания полагать, что эти требования не могут быть выполнены, следует измерять концентрации кислорода и углекислого газа. Если измерения в первый день экспозиции покажут, что эти концентрации находятся на должном уровне, то нет необходимости проводить дальнейшие измерения концентраций кислорода и углекислого газа.

6.2 Температура и относительная влажность в камере

Температура в камере должна быть (22 ± 3) °С. Относительную влажность в зоне дыхания животных при воздействии через нос и через все тело следует контролировать непрерывно и регистрировать каждый час в течение всего воздействия при возможности. Относительная влажность предпочтительно должна составлять от 30 % до 70 %, но в определенных случаях (например, при испытании препаратов на водной основе) этот уровень может быть неприменимым или измерение его может быть невозможным вследствие влияния содержания воды в исследуемом химическом веществе на условия метода испытания.

6.3 Исследуемое химическое вещество: номинальная концентрация

Номинальная концентрация — это масса сгенерированного исследуемого химического вещества, деленная на общий объем воздуха, прошедшего через систему ингаляционной камеры. По возможности следует вычислить и зарегистрировать номинальную концентрацию в ингаляционной камере. Номинальную концентрацию не используют для характеристики воздействия на животных, но сравнение номинальной концентрации и аналитической концентрации дает представление об эффективности генерации испытательной системы и может быть использовано для выявления проблем генерации.

6.4 Исследуемое химическое вещество: аналитическая концентрация

6.4.1 Аналитическая концентрация — это концентрация химического вещества в пробе, отобранной в зоне дыхания животных в ингаляционной камере. Значения аналитических концентраций могут быть получены прямыми методами (например, методом прямого отбора проб, адсорбционными методами или методами химического взаимодействия с последующим аналитическим определением) или неспецифическими методами, такими как гравиметрический анализ фильтров. Использование гравиметрического анализа приемлемо только для аэрозолей с однокомпонентным составом твердых частиц или аэрозолей легколетучих жидкостей и должно быть подтверждено предварительными исследованиями соответствующих химических характеристик. Концентрацию аэрозоля с многокомпонентным составом твердых частиц также можно определить гравиметрическим анализом. В этом случае потребуются данные анализа, подтверждающие, что химический состав частиц аэрозоля соответствует составу исходного материала. При отсутствии подобной информации может потребоваться повторный анализ исследуемого вещества (как правило, распыленного в воздухе) через определенные промежутки времени во время исследования. Для аэрозолей, которые могут испаряться или сублимироваться, следует показать, что все фазы исследуемого вещества были собраны выбранным методом.

6.4.2 Следует по возможности использовать исследуемое химическое вещество одной партии в течение всего периода, и исследуемый образец необходимо хранить в условиях, обеспечивающих поддержание степени его чистоты, однородность и стабильность. До начала исследования следует определить характеристики исследуемого химического вещества, включая его чистоту и, если это технически возможно, идентифицировать и определить содержание загрязняющих веществ и примесей. Это может быть подтверждено (но не ограничивается) временем удерживания и относительной площадью пика, молекулярной массой, определенными методами масс-спектроскопии, или методами газовой хроматографии, или другими методами. Несмотря на то, что идентификация исследуемого образца не является обязанностью испытательной лаборатории, может быть целесообразным, чтобы испытательная лаборатория подтвердила характеристики поставщика хотя бы в ограниченном объеме (например, цвет, физические свойства и т. д.).

6.4.3 По возможности следует поддерживать постоянной воздействующую атмосферу (среду). Для подтверждения стабильности условий воздействия могут быть использованы устройства контроля в режиме реального времени, такие как фотометрический счетчик аэрозольных частиц или анализатор общего количества углеводородов для веществ в газообразном состоянии. Концентрацию исследуемого вещества в камере измеряют не менее трех раз в день воздействия для каждого уровня дозы. Если это невыполнимо из-за ограниченной скорости потока воздуха при дыхании или низких концентраций, допускается отбор одной пробы за время воздействия. Предпочтительно, чтобы проба была собрана в течение всего периода воздействия. Концентрации образцов исследуемых веществ в каждой камере не должны отличаться от средней концентрации более чем на ± 10 % для газов и паров и ± 20 % для аэрозолей жидкостей или твердых частиц. Должно быть определено и зарегистрировано время достижения равновесного состояния в камере (*t*95). Период воздействия включает время генерации исследуемого вещества. При этом учитывают время, необходимое для достижения равновесного состояния в камере (*t*95) и период выветривания. Руководство по оценке *t*95 приведено в [1].

6.4.4 Для сложных смесей, состоящих из газов/паров и аэрозолей (например, воздушной среды продуктов горения и исследуемых химических веществ, выделяющихся из целевых и конечных продуктов/компонентов), каждая фаза в ингаляционной камере может вести себя по-разному. Поэтому для каждой фазы (газ/пар или аэрозоль) следует выбрать не менее одного индикаторного вещества (аналита), обычно это основное активное вещество в составе исследуемого продукта. Когда исследуемое химическое вещество является смесью (например, по составу), аналитическая концентрация должна быть описана для всего состава, а не только для активного ингредиента или компонента (вещества, определяемого при анализе). Дополнительная информация по аналитической концентрации приведена в [1].

6.5 Исследуемое химическое вещество: распределение частиц аэрозоля по размерам

6.5.1 Для обеспечения достаточного воздействия на нижние дыхательные пути аэрозоль должен по возможности соответствовать следующим требованиям: масс-медианный аэродинамический диаметр (MMAD) должен быть не более 2 мкм с геометрическим стандартным отклонением (σg или GSD) от 1 до 3 [1]. Если, несмотря на приложенные усилия, обеспечить соответствие вышеуказанному критерию практически невозможно, используют экспертную оценку. Следует проводить измерение размера частиц для паров, которые могут конденсироваться с образованием аэрозоля. Для оценки количества аэрозоля, достигшего определенных частей дыхательных путей, используют модели отложения. Это также может быть подтверждено данными о нагрузке на легкие после однократного воздействия [1]. При испытании на других видах животных (кроме крыс) применяют аналогичные критерии к требованиям по распределению частиц аэрозоля по размерам для обеспечения достаточного воздействия на нижние дыхательные пути, и диапазон размеров частиц должен быть обоснован и выбран на этой основе. Если требования MMAD не могут быть соблюдены, в отчете об исследовании должно быть представлено обоснование.

6.5.2 Распределение частиц аэрозоля по размерам определяют не реже одного раза в неделю для каждого уровня концентрации с использованием каскадного импактора или альтернативного прибора, измеряющего эквивалентный диаметр частиц (термодинамическим или оптическим методом). Если продемонстрирована равнозначность результатов, полученных каскадным импактором и альтернативным прибором, то допускается применять альтернативный прибор на протяжении всего исследования.

6.5.3 Для измерения размеров подвижных частиц неволокнистых и изометрических наноматериалов предпочтительно использовать сканирующие устройства, анализаторы дифференциальной подвижности или устройства для измерения аэродинамических размеров частиц как для подсчета количества частиц, подвергшихся воздействию аэрозоля, так и для распределения их по размерам. Для всех материалов, включая волокнистые материалы, можно использовать унифицированные импакторы с равномерным распределением микроотверстий для определения воздействующих концентраций с точки зрения распределения массы и размеров. Следует использовать не менее двух разных методов определения количественного воздействия частиц (то есть количества частиц и их распределения по размеру или массе). Аэрозоли, полученные с использованием наноматериалов, обычно состоят из агломерированных частиц, и распределение частиц по размерам включает как микрочастицы, так и наночастицы. Поэтому может быть необходимым охарактеризовать аэрозоли с использованием комбинации методов, указанных выше. Кроме того, периодически (например, ежемесячно) следует использовать сканирующую и/или просвечивающую электронную микроскопию

для мониторинга и качественного подтверждения размера и формы всех частиц, а не только частиц наноматериалов. Измерение других показателей, например площади поверхности частиц, может быть важным дополнением.

6.5.4 Для подтверждения эффективности основного прибора параллельно с ним следует использовать дополнительное устройство, такое как гравиметрический фильтр или импинджер/газовый барботер. Массовая концентрация, полученная при анализе размера частиц, должна находиться в разумных пределах по сравнению с массовой концентрацией, полученной с использованием анализа фильтров [1]. Если может быть продемонстрирована эквивалентность результатов при всех концентрациях, исследованных на раннем этапе, то дальнейшие подтверждающие измерения можно не проводить. Из соображений гуманного отношения к животным измерения следует проводить таким образом, чтобы свести к минимуму получение неубедительных результатов, что может привести к необходимости повторного исследования.

7 Наблюдения

7.1 Клинические наблюдения за животными проводят до, во время и после каждого воздействия, а также в течение периода (периодов) после воздействия. В зависимости от реакции животных на воздействие могут потребоваться более частые наблюдения. Когда наблюдения за животными затруднены из-за использования трубок для удерживания животных, плохого освещения камер при воздействии на все тело или непрозрачной атмосферы камеры, следует внимательно наблюдать за животными сразу после воздействия. Проведение наблюдений на следующий день перед очередным воздействием поможет оценить обратимость или обострение токсических эффектов. Если план исследования включает период наблюдения после воздействия, то наблюдения за животными следует проводить не менее одного раза в день в течение этого периода.

7.2 Все наблюдения регистрируют по каждому животному индивидуально. Время смерти животных, умерщвленных по соображениям гуманности или обнаруженных мертвыми, следует зафиксировать как можно точнее.

7.3 При наблюдении за животными в клетке следует фиксировать изменения кожи и шерсти, глаз и слизистых оболочек, изменения в дыхательной, кровеносной и нервной системах, а также изменения соматомоторной активности и моделей поведения. Внимание должно быть направлено на выявление тремора, конвульсий, слюноотделения, диареи, вялости, сна и комы. Измерение ректальной температуры может представить подтверждающие доказательства рефлекторной брадипноэ или гипо/гипертермии, связанных с воздействием химического вещества или ограничением подвижности. В протокол исследования могут быть включены дополнительные исследования, такие как биомониторинг (сбор мочи/фекалий), оценка функции легких и изменения поведения.

8 Масса тела

Индивидуальную массу тела животных регистрируют непосредственно перед первым воздействием (день 0), затем два раза в неделю (например, по пятницам и понедельникам, чтобы продемонстрировать восстановление за выходные дни без воздействия или временной интервал, позволяющий оценить системную токсичность), а также во время смерти или эвтаназии. Если в первые четыре недели не наблюдают значительного изменения массы тела, до конца исследования массу тела можно измерять один раз в неделю. После завершения воздействия животных следует взвешивать еженедельно. По окончании исследования все животные перед умерщвлением должны быть взвешены для обеспечения объективного вычисления соотношения массы тела и массы органа.

9 Потребление пищи и воды

Потребление пищи следует определять еженедельно. Также может быть определено потребление воды. Эти измерения продолжают, если протокол исследования включает период после воздействия.

10 Клиническая патология

10.1 Оценку клинической патологии всех животных, подвергшихся воздействию, и контрольных групп проводят, по меньшей мере, в конце фаз воздействия и восстановления, во время и после

воздействия, а также при умерщвлении животных. Определение клинической патологии не требуется для животных вспомогательных групп, используемых для измерения нагрузки на легкие, но если установлено, что нагрузка на легкие помогает оценить степень токсичности (включая восстановление), то выбранные параметры могут быть оценены в PEO-2 и PEO-3 (см. 4.6). Должно быть зарегистрировано время между окончанием воздействия и сбором крови. Отбор проб после окончания воздействия рекомендуется для параметров, характеризующих короткий период полувыведения из плазмы (например, COHb, CHE и MetHb).

10.2 В таблице 1 приведены параметры для оценки клинической патологии, определение которых обычно предусматривается для всех токсикологических исследований. Постоянный общий анализ мочи не требуется, но может быть сделан, если это важно, с учетом ожидаемой или наблюдаемой токсичности. Для более полной характеристики токсичности исследуемого вещества руководитель исследования может предусмотреть оценку дополнительных параметров (например, холинэстеразы, липидов, гормонов, кислотно-щелочного баланса, метгемоглобина или телец Гейнца, креатинкиназы, цитологии костного мозга, тропонинов, лактатдегидрогеназы, сорбитдегидрогеназы, глутамата дегидрогеназы и гамма-глутамилтранспептидазы).

Таблица 1 — Стандартные параметры для оценки клинической патологии

Параметр	
Гематология	
Определение количества эритроцитов Гематокрит Концентрация гемоглобина Среднее содержание гемоглобина в эритроците Средний объем эритроцита Средняя концентрация гемоглобина в эритроците Ретикулоциты	Определение общего количества лейкоцитов Дифференциальный подсчет лейкоцитов Определение количества тромбоцитов Потенциал свертывания крови (выбрать одно): - протромбиновое время; - время свертывания; - частичное тромбопластиновое время
Клиническая биохимия	
Глюкоза* Общий холестерин Триглицериды Азот мочевины в 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) Объем Удельный вес или осмотическое давление pH	Общий белок Глюкоза Кровь/клеточные элементы крови

* Поскольку длительное голодание может привести к изменению содержания глюкозы у подопытных животных по сравнению с животными контрольной группы, руководитель исследования должен определить целесообразность голодания животных. При использовании голодания его длительность должна соответствовать используемым видам животных [например, для крыс длительность может составлять 16 ч (ночное голодание)]. Исследование содержания глюкозы в крови натощак может быть выполнено после ночного голодания в течение последней недели воздействия или после ночного голодания перед вскрытием (вместе с другими клиническими патологическими параметрами).

11 Бронхоальвеолярный лаваж

Бронхоальвеолярный лаваж (BAL) должен быть выполнен в PEO-1 (в течение 24 ч после прекращения воздействия) и через один интервал после воздействия (PEO-2) (см. вариант A, приложение A). При исследовании плохо растворимого аэрозоля (см. вариант B, приложение A) BAL сле-

дует проводить в РЕО-1 (в течение 24 ч после прекращения воздействия) у животных обоих полов и в РЕО-2 у самок животных группы восстановления, если он запланирован. Обычно для проведения лаважа используют предпочтительно правое легкое. Продолжительность периода после воздействия и сроки проведения РЕО определяет руководитель исследования на основании результатов исследований по подбору диапазона доз и другой доступной информации. Конкретные рекомендации по проведению испытаний факультативных параметров BAL и способам выполнения анализа жидкости бронхоальвеолярного лаважа (BALF) приведены в [1]. BALF предусматривает определение следующих обязательных параметров:

- лактатдегидрогеназы (LDH);
- общего белка или альбумина;
- количества клеток дифференцированных альвеолярных макрофагов, лимфоцитов, нейтрофилов и эозинофилов.

12 Нагрузка на легкие

При исследовании труднорастворимых твердых аэрозолей измерение нагрузки на легкие может дать четкое представление об удерживаемой дозе. Измерения нагрузки на легкие проводят, когда исследование по определению доз или другая соответствующая информация дают основание предполагать, что исследуемое вещество откладывается или может удерживаться в легком (при наличии соответствующего аналитического метода). Для исследования используют предпочтительно самцов, поскольку они имеют бóльший объем вдыхаемого воздуха за 1 мин, чем самки, и могут иметь бóльшую нагрузку на легкие. Для обязательных измерений нагрузки на легкие при прекращении воздействия (РЕО-1) к основному исследованию добавляют группы из пяти самцов на концентрацию (см. вариант В, приложение А). Проведение РЕО-1 следует планировать приблизительно через 24 ч после прекращения воздействия для возможности учета быстрого очищения проводящих дыхательных путей от исследуемого химического вещества через мукоцилиарный транспорт. У руководителя исследования есть возможность обеспечить измерение нагрузки на легкие в сопутствующих группах восстановления в РЕО-2 и РЕО-3 (см. 4.3.2, 4.5.2 и 4.5.3). Для получения точной информации о кинетике очищения легкого измеряют нагрузку на одно легкое (рекомендуется использовать правое легкое) во все контрольные моменты времени после воздействия. Руководитель исследования определяет продолжительность периода после воздействия и интервалы между РЕО на основе результатов исследования по определению доз и другой соответствующей информации. Дополнительные рекомендации по измерению и оценке нагрузки на легкие приведены в [1] и 4.5.3.

13 Офтальмологическое исследование

Всех животных подопытных групп до воздействия исследуемого химического вещества, а также животных всех групп с высокой концентрацией и контрольных групп по окончании основного исследования подвергают офтальмологическому обследованию глазного дна, преломляющей среды, радужной оболочки и конъюнктивы с использованием офтальмоскопа или эквивалентного устройства. При обнаружении изменений в глазах должны быть обследованы все животные других групп, включая вспомогательную группу.

14 Макропатология и масса органов

14.1 Все подопытные животные, включая тех, которые погибли во время исследования или были исключены из исследования по причинам гуманного отношения к животным, должны быть подвергнуты полному обескровливанию (при возможности) и макроскопическому исследованию при вскрытии. Для каждого животного фиксируют время между окончанием последнего воздействия и его умерщвлением. Если невозможно провести вскрытие сразу после обнаружения погибшего животного, его следует охладить (но не заморозить) при достаточно низкой температуре для сведения к минимуму распада тканей. Вскрытие проводят в возможно короткий срок, как правило, в течение одного-двух дней. Для каждого животного регистрируют все макропатологические изменения, обращая особое внимание на изменения дыхательных путей. В таблице 2 перечислены органы и ткани, которые следует зафиксировать в соответствующей среде во время общего вскрытия для гистопатологического исследования.

Таблица 2 — Органы и ткани, консервируемые в ходе общей некропсии

Наименование органов и тканей
Надпочечники
Аорта
Костный мозг (и/или свежий пунктат)
Мозг (включая отделы головного мозга, мозжечок и медулла/варолиев мост)
Слепая кишка
Коагулирующие (свертывающие) железы
Толстая кишка
Двенадцатиперстная кишка
Придатки яичка*
[Глаза (сетчатка, зрительный нерв) и веки]
Бедро и коленный сустав
Желчный пузырь (при наличии)
[Гардеровы железы]
Сердце
Подвздошная кишка
Тонкая кишка
Почки
[Слезные железы (экстраорбитальные)]
Гортань (3 уровня, включая основание надгортанника)
Печень
Легкое (обычно левое легкое, включая главные бронхи и плевру, но может быть использовано правое легкое, обсуждение приведено в тексте ниже)
Лимфатические узлы из области корня легкого, особенно для плохо растворимых частиц исследуемых химических веществ. Для более тщательного изучения и/или исследований с иммунологическим фокусом дополнительно могут быть исследованы дренирующие лимфатические узлы, например, из задних медиастинальных, внутренних яремных, паратимических, цервикальных, околоушных и/или цервикальных/подчелюстных областей.
Лимфатические узлы (периферические от места попадания в организм)
Молочная железа (самца и самки)
Мышца (бедра)
Носоглоточные ткани [не менее четырех уровней; 1-й уровень, включающий носоглоточный проток и нозально-ассоциированную лимфоидную ткань (NALT)]
Пищевод
Обонятельная луковица
Яичники
Поджелудочная железа
Паращитовидная железа
Периферический нерв (седалищный или большеберцовый, по возможности, близко к мышце)
Гипофиз
Предстательная железа
Пищевод
Прямая кишка
Слюнные железы
Семенные пузырьки
Шкурка (кожа)
Спинной мозг (шейный, среднегрудной и поясничный)
Селезенка
Грудина
Желудок
Зубы
Яички
Тимус (вилочковая железа)
Щитовидная железа*
[Язык]
Трахея (не менее двух уровней, включая один продольный срез через киль и один поперечный срез)
[Мочеточник]
[Мочеиспускательный канал (уретра)]

Окончание таблицы 2

Наименование органов и тканей
Мочевой пузырь Матка Органы-мишени Влагалище (вагина) Все макроскопические поражения и массы
* См. [6]. Примечание — Сохранение органов и тканей, приведенных в квадратных скобках, и любых других органов и тканей осуществляют в соответствии с решением руководителя исследования. Органы, наименования которых выделены полужирным шрифтом, иссекают и взвешивают во влажном состоянии по возможности сразу после вскрытия для предотвращения высыхания. Ткани и органы фиксируют в 10 %-ном растворе нейтрального забуференного формалина или другого подходящего фиксатора сразу после вскрытия и не менее чем за 24—48 ч до иссечения (в зависимости от используемого фиксатора).

14.2 Левое легкое сохраняют для гистопатологического исследования, а правое легкое используют для BAL, но этот порядок может быть изменен. Левое легкое следует удалить без его повреждения, взвесить и залить подходящим фиксирующим раствором под давлением слоя воды, поднятого на высоту от 20 до 30 см для обеспечения сохранения структуры легкого [7]. *Для этого фиксирующий раствор вливают в легкое через канюлю, введенную в бронх и соединенную с резервуаром, наполненным раствором и поднятым на высоту от 20 до 30 см над препаратом.* Если план исследования предусматривает использование вспомогательных групп животных для измерения нагрузки на легкие, то могут быть взвешены оба легких этих животных.

14.3 Следует исследовать не менее четырех уровней носоглоточных тканей, одна из которых должна включать носоглоточный канал (см. [8]—[12]), для обеспечения адекватного исследования сквамозного, переходного (не реснитчатого респираторного), дыхательного (реснитчатого респираторного) и обонятельного эпителия и назально-ассоциированной лимфоидной ткани (NALT) (см. [13], [14]). Исследуют три уровня гортани, один из которых должен включать основание надгортанника (см. [15]). Следует исследовать не менее двух уровней трахеи, включая продольный срез главного бронха через киль бифуркации и один поперечный срез. Должны быть исследованы не менее трех уровней левого (или правого) легкого, которые должны представлять разные области долей легкого. Дополнительные указания можно найти в [8].

14.4 При необходимости оценки перемещения частиц исследуемого химического вещества их нагрузку на соответствующие органы можно определить в сохраненном гистопатологическом образце ткани. Поэтому важно рассмотреть соответствующие методы фиксации тканей, чтобы обеспечить возможность применения широкого спектра аналитических методов. Независимо от сохраненных образцов, накопление частиц в LALN всегда следует рассматривать как подтверждение перемещения при исследовании плохо растворимых частиц.

15 Гистопатология

Гистопатологическую оценку всех органов и тканей, приведенных в таблице 2, проводят у животных контрольных групп и групп с высокой концентрацией, а также у всех животных, которые погибли или были умерщвлены во время 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 гистопатологической оценки для дополнительных групп животных с целью определения четкой зависимости ответа на концентрацию. Если в группе с высокой экспозицией наблюдают чрезмерно ранние случаи смерти или другие проблемы, которые ставят под сомнение достоверность полученных данных, следует провести гистопатологическое исследование животных, подвергавшихся воздействию следующей, более низкой концентрации. Особое внимание следует уделить дыхательным путям, органам-мишеням и макроскопическим поражениям. Органы и ткани, имеющие поражения в группе животных с высокой концентрацией, должны быть исследованы во всех группах. При использовании группы восстановления гистопатологическая оценка должна быть

выполнена для всех тканей и органов, для которых установлены эффекты в подопытных группах. Может быть рассмотрена возможность гистопатологии для животных сопутствующих групп, используемых для измерения нагрузки на легкие, как указано в 4.5.7. Для гистопатологической оценки рекомендуется использовать левое легкое. Следует попытаться сопоставить результаты макроскопических наблюдений и микроскопических исследований.

16 Исследование функции легких

Если руководитель исследования обнаруживает у грызунов в исследованиях по определению доз признаки рефлекторной брадипноэ или Paintal рефлекса или имеются данные (например, гипотермии), указывающие на то, что могут возникнуть эти рефлексы, тогда в основном исследовании путем периодического измерения функции легких и температуры тела должна быть количественно определена степень этих рефлексов. Дополнительная информация об этих рефлексах и выполнении исследования функции легких приведена в [1].

17 Данные исследований и отчет

17.1 Данные исследований

По результатам проведенных исследований по определению диапазона и основного исследования должны быть предоставлены индивидуальные данные о массе тела животных, потреблении пищи, клинической патологии, анализе BALF, общей патологии, массе органов, нагрузке на легкие (при оценке) и гистопатологии. Данные клинических наблюдений должны быть приведены в табличной форме с указанием для каждой подопытной группы числа использованных животных, числа животных со специфическими признаками токсичности, числа животных, обнаруженных мертвыми во время испытаний или умерщвленных по причине гуманности, времени смерти каждого животного, динамики появления признаков токсичности и их обратимости, а также результатов вскрытия. Можно использовать любые общепринятые статистические методы, которые должны быть выбраны во время планирования исследования.

17.2 Отчет об исследовании

Отчет об исследовании должен содержать следующую информацию.

17.2.1 Подопытные животные и условия содержания:

- описание условий содержания в клетке, включая число (или изменения числа) животных в клетке, подстилочный материал, температуру окружающей среды и относительную влажность, длительность освещения в течение суток и описание пищевого рациона;
- используемые виды/линии и обоснование использования других видов животных, кроме крыс. Могут быть предоставлены исходные данные и результаты предыдущих исследований, если они были получены на животных, подвергшихся аналогичным воздействиям, условиям содержания и условиям воздействия натощак;
- число, возраст и пол животных;
- метод отбора;
- описание предварительных условий подготовки или отбора, включая питание, карантин, офтальмологическое обследование и лечение при заболевании.

17.2.2 Исследуемое вещество:

- агрегатное состояние, чистота и, при необходимости, физико-химические свойства (включая изомеризацию или радиоактивную метку). Для наноматериалов приводят дополнительную информацию о характеристиках частиц, включающую форму, площадь поверхности/удельную поверхность, химический состав поверхности, состав, включая обработку и модифицирование поверхности; поверхностный заряд, растворимость частиц и состояние агрегации/агломерации;
- идентификационные данные и номер CAS (при наличии).

17.2.3 Носитель (растворитель, среда):

- обоснование для применения растворителя и обоснование выбора растворителя (за исключением воды);
- статистические или сопутствующие данные, подтверждающие, что растворитель не влияет на результаты исследования.

17.2.4 Ингаляционная камера:

- подробное описание ингаляционной камеры, включая ее объем;
- поставщик и описание оборудования, используемого для воздействия на животных, а также для генерации газообразной среды;
- оборудование для измерения температуры, влажности, размера частиц и аналитической концентрации;
- источник воздуха и система, применяемая для кондиционирования;
- методы, используемые для калибровки оборудования с целью обеспечения однородной атмосферы испытания;
- перепады давления (положительное или отрицательное);
- порт для камеры при экспозиции (воздействие только через нос), размещение животных в камере (воздействие через все тело);
- стабильность исследуемой атмосферы;
- расположение датчиков температуры и влажности и отбор исследуемой атмосферы в камере;
- обработка подаваемого/удаляемого воздуха;
- скорость потоков воздуха через порт (при воздействии только через нос) или изменение нагрузки на животных (при воздействии через все тело);
- время достижения равновесия в ингаляционной камере (*t*95);
- число изменений объема в час;
- дозирующие устройства (при использовании).

17.2.5 Данные об экспозиции (воздействии):

- обоснование выбора целевой концентрации в основном исследовании;
- номинальные концентрации (общая масса исследуемого химического вещества, сгенерированного в ингаляционной камере, деленная на объем воздуха, проходящего через камеру);
- аналитические концентрации исследуемого химического вещества, отобранного из зоны дыхания животных для исследуемых смесей, которые продуцируют гетерогенные агрегатные состояния (газы, пары, аэрозоли); каждое из них может быть проанализировано отдельно;
- все концентрации в воздухе следует указывать в единицах массы (мг/дм^3, мг/м^3 и т. д.), а не в единицах объема [ppm (см^3/м^3), ppb (мкм^3/мм^3) и т. д.];
- распределение частиц по размерам, масс-медианный аэродинамический диаметр (MMAD) и стандартное геометрическое отклонение (σg), включая методы их вычисления. Следует также представить отчет об анализе индивидуальных размеров частиц. Для аэрозолей исследуемой атмосферы, содержащих частицы менее 100 нм, также следует сообщать термодинамический эквивалентный диаметр (вычисленный или масс-медианный диаметр);
- анализ степени агломерации NP наночастиц в аэрозоле.

17.2.6 Условия проведения исследования:

- подробное описание приготовления исследуемого химического вещества, включая описание любых процедур, применяемых для уменьшения размеров частиц твердых материалов или для приготовления растворов исследуемого вещества;
- описание (предпочтительно включающее схему) оборудования, применяемого для создания исследуемой атмосферы и воздействия на животных в исследуемой атмосфере;
- описание оборудования, применяемого для контроля температуры, влажности и воздушных потоков в камере (т. е. для разработки калибровочной кривой);
- описание оборудования, применяемого при отборе образцов для определения концентрации в камере и распределения частиц по размеру;
- подробная информация об используемом химико-аналитическом методе и валидации метода (включая эффективность извлечения исследуемого химического вещества из отобранной среды);
- метод случайного отбора при разделении животных по подопытным и контрольным группам;
- сведения о качестве пищи и воды (включая состав рациона и изготовителя, источник воды);
- описание метода, использованного для анализа BALF и измерений нагрузки на легкие;
- *обоснование для выбора концентрации исследуемого химического вещества.*

17.2.7 Результаты:

- оформляют в виде таблицы данные о температуре в камере, влажности и потоке воздуха;
- оформляют в виде таблицы данные о целевой, аналитической и номинальной концентрации исследуемого вещества в камере;

- для аэрозолей в воздухе с MMAD более 1 мкм (т. е. мелкодисперсных) приводят информацию о распределении аэродинамического диаметра частиц по размерам наряду с масс-медианным аэродинамическим диаметром (MMAD) и связанным с ним геометрическим стандартным отклонением (σg). Для аэрозолей преимущественно менее 100 нм требуется информация о распределении термодинамического эквивалентного диаметра, а также вычисление медианного диаметра (CMD) и соответствующего геометрического стандартного отклонения (σg). Для полной характеристики аэрозолей с комбинациями компонентов в диапазонах как наночастиц, так и бо́льших размеров потребуется сочетание вышеприведенных данных и информации о фракции частиц размером менее 100 нм;

- оформляют в виде таблицы данные об ответной реакции и уровне концентрации для каждого животного (т. е. животных, демонстрирующих признаки токсичности, включая смерть; характер, тяжесть, время появления и продолжительность эффектов);

- оформляют в виде таблицы данные о массе тела каждого животного;

- оформляют в виде таблицы данные о потреблении пищи;

- оформляют в виде таблицы данные клинической патологии;

- оформляют в виде таблицы данные анализа жидкости бронхоальвеолярного лаважа (BALF);

- оформляют в виде таблицы данные измерений нагрузки на легкие (при измерении);

- оформляют в виде таблицы данные функции легких и температуры тела (при измерении);

- для каждого животного приводят массу органов, результаты макропатологии и гистопатологии (при наличии);

- приводят результаты факультативных оценок системной токсичности (например, иммунотоксичность, нейротоксичность, гепатотоксичность, реакции сердечно-сосудистой системы).

17.2.8 Обсуждение и интерпретация результатов:

- особое внимание следует уделить описанию методов, применяемых для соответствия критериям настоящего стандарта;

- должна быть рассмотрена пригодность аэрозольных частиц для вдыхания с учетом общих результатов, особенно если норматив MMAD не может быть выполнен;

- в общую оценку исследования должна быть включена сопоставимость методов, используемых для определения аналитических и номинальных концентраций, а также зависимость аналитических концентраций от номинальных;

- должны быть рассмотрены вероятная причина смерти и преобладающий механизм действия (системное или локальное);

- при необходимости гуманного умерщвления животных, испытывающих боль или проявляющих признаки страдания и дистресса, следует привести обоснование в соответствии с [5];

- следует определить органы-мишени;

- следует определить значения BMC или NOAEC и LOAEC;

- описание любых осложнений, возникших в основном исследовании, которые могут повлиять на результаты исследования;

- подробное обоснование для включения, план и метод определения нагрузки на легкие после исследования (если предусмотрено).

Приложение А
(обязательное)

Схемы проведения исследований

Схема А.1 — Вариант А (газы, пары, жидкие аэрозоли и растворимые твердые аэрозоли)

Исследование животных подопытных групп в основном исследовании в РЕО-1 и животных вспомогательных групп в РЕО-2:	Концентрации действующего вещества	Основное исследования (обязательное исследование) РЕО-1	Вспомогательные группы (факультативно) РЕО-2	Общее число животных
- клинические наблюдения; - измерения массы тела; - потребление пищи и воды; - клиническая патология; - макроскопическая патология и масса органов; - масса легкого — LL; - гистопатология — LL; - BALF — RL	0	HP (LL) + BAL (RL) 10 f/10 m	HP (LL) + BAL (RL) 5 f/5 m	
	C_1	HP (LL) + BAL (RL) 10 f/10 m	HP (LL) + BAL (RL) 5 f/5 m	
	C_2	HP (LL) + BAL (RL) 10 f/10 m	HP (LL) + BAL (RL) 5 f/5 m	
	C_3	HP (LL) + BAL (RL) 10 f/10 m	HP (LL) + BAL (RL) 5 f/5 m	
		Число животных — 80	Число животных — 40	120

Сокращения: 0 — концентрации действующего вещества в контрольной группе; C_1, C_2, C_3 — уровни концентрации действующего вещества; BAL — бронхоальвеолярный лаваж; HP — гистопатология; LB — нагрузка на легкие; LL — левое легкое; RL — правое легкое; f — самка; m — самец; РЕО-1 — исследование не позднее одного дня после последнего воздействия; РЕО-2 — исследование через *x* недель после последнего дня воздействия; РЕО-3 — исследование через *y* недель после последнего дня воздействия (РЕО-3 может быть до или после РЕО-2).

Примечание — Успешность основного исследования зависит от информации, полученной в исследованиях по выбору диапазона доз, или результатов предшествующих исследований. Для исследования всех химических веществ, кроме плохо растворимых твердых аэрозолей, используют вариант А. Вариант В используют для исследования плохо растворимых твердых аэрозолей. В [1] приведены примеры адаптации руководителем исследования этих вариантов для оптимизации оценки опасности исследуемого химического вещества.

Схема А.2 — Вариант В (исследование плохо растворимых твердых аэрозолей)

Обследования в основном исследовании в PEO-1 (f и m):	Уровень концентрации	Основное исследование в PEO-1 (обязательное исследование)	
		Подопытные группы	Вспомогательные группы
- клинические наблюдения; - измерения массы тела; - потребление пищи и воды; - клиническая патология; - макроскопическая патология и масса органов; - масса легкого LL (f и m); - гистопатология LL (f и m); - BALF RL (f и m); **PEO-1** вспомогательные группы (только m): - нагрузка на легкие RL; - другие параметры определяет руководитель исследования (TBD)	0	HP (LL) + BAL (RL) 10 f и 10 m	LB (RL) (+TBD) 5 m
	C_1	HP (LL) + BAL (RL) 10 f и 10 m	LB (RL) (+TBD) 5 m
	C_2	HP (LL) + BAL (RL) 10 f и 10 m	LB (RL) (+TBD) 5 m
	C_3	HP (LL) + BAL (RL) 10 f и 10 m	LB (RL) (+TBD) 5 m
		Число животных — 80	Число животных — 20

Обследования животных вспомогательных групп в PEO-2 и/или PEO-3:	Уровень концентрации	Вспомогательные группы в PEO-2 (факультативно)		Вспомогательные группы в PEO-3 (факультативно)	Общее число животных
PEO-2 (f и m): - масса легкого LL (f и m); - гистопатология LL (f и m); - BALF RL (только f); - нагрузка на легкие RL (только m); **PEO-3** (только m): - нагрузка на легкие RL; - другие параметры определяет руководитель исследования (TBD)	0	HP(LL) + BAL(RL) 5 f	HP(LL)+LB(RL) 5 m	LB(RL)(+TBD) 5m	
	C_1	HP(LL) + BAL(RL) 5 f	HP(LL)+LB(RL) 5 m	LB(RL)(+TBD) 5m	
	C_2	HP(LL) + BAL(RL) 5 f	HP(LL)+LB(RL) 5 m	LB(RL)(+TBD) 5m	
	C_3	HP(LL) + BAL(RL) 5 f	HP(LL)+LB(RL) 5 m	LB(RL)(+TBD) 5m	
		Число животных — 40		Число животных — 20	60

Сокращения: 0 — концентрации действующего вещества в контрольной группе; C_1, C_2, C_3 — уровни концентрации действующего вещества; BAL — бронхоальвеолярный лаваж; HP — гистопатология; LB — нагрузка на легкие; LL — левое легкое; RL — правое легкое; f — самка; m — самец; PEO-1 — исследования не позднее одного дня после последнего воздействия; PEO-2 — исследование через *x* недель после последнего дня воздействия; PEO-3 — исследование через *y* недель после последнего дня воздействия (PEO-3 может быть до или после PEO-2); TBD — определяет руководитель исследования.

Примечание — Потребность в дополнительных вспомогательных группах в PEO-2 и/или PEO-3, продолжительность интервала после воздействия исследуемого химического вещества и сроки проведения PEO определяет руководитель исследования на основании цели исследования и данных по определению диапазона доз и/или другой соответствующей информации. Например, если PEO-1, PEO-2 и/или PEO-3 используют для оценки кинетики очищения легких, то необходимы многократные измерения нагрузки на легкие ([1]).

Приложение ДА
(справочное)

Сопоставление структуры настоящего стандарта со структурой примененного в нем международного документа

Таблица ДА.1

Структура настоящего стандарта	Структура международного документа OECD Test № 413:2018
Краткое описание (1)	Краткое описание 1
Введение (2, 3)	Введение 2 3
1 Область применения (—)	
2 Основные положения (4—8) 2.1 2.2 2.3 2.4 2.5	Основные положения 4 5 6 7 8
3 Описание метода (9—12) 3.1 Выбор видов животных 3.2 Подготовка животных 3.3 Условия содержания животных 3.4 Ингаляционные камеры	Описание метода Выбор видов животных 9 Подготовка животных 10 Условия содержания животных 11 Ингаляционные камеры 12
4 Исследование токсичности (13—29) 4.1 Предельные концентрации 4.2 Исследование по определению диапазона доз 4.2.1 4.2.2 4.3 Основное исследование 4.3.1 4.3.2 4.3.3 4.3.4 4.3.5 4.4 Промежуточные умерщвления 4.5 Вспомогательные группы 4.5.1 4.5.2 4.5.3 4.5.4 4.5.5 4.5.6 4.5.7 4.6 Животные контрольной группы	Исследование токсичности Предельные концентрации 13 Исследование по определению диапазона доз 14 15 Основное исследование 16 17 18 19 20 Промежуточные умерщвления 21 Вспомогательные группы 22 23 24 25 26 27 28 Животные контрольной группы 29

Продолжение таблицы ДА.1

Структура настоящего стандарта	Структура международного документа OECD Test № 413 2018
5 Условия проведения испытаний (30, 31) 5.1 Введение концентраций 5.2 Приготовление исследуемого вещества в растворителе	Условия проведения испытаний Введение концентраций 30 Приготовление исследуемого вещества в растворителе 31
6 Контроль условий проведения испытаний (32—42) 6.1 Воздушные потоки в камере 6.2 Температура и относительная влажность в камере 6.3 Исследуемое химическое вещество: номинальная концентрация 6.4 Исследуемое химическое вещество: аналитическая концентрация 6.4.1 6.4.2 6.4.3 6.4.4 6.5 Исследуемое химическое вещество: распределение частиц аэрозоля по размерам 6.5.1 6.5.2 6.5.3 6.5.4	Контроль условий проведения испытаний Воздушные потоки в камере 32 Температура и относительная влажность в камере 33 Исследуемое химическое вещество: номинальная концентрация 34 Исследуемое химическое вещество: аналитическая концентрация 35 36 37 38 Исследуемое химическое вещество: распределение частиц аэрозоля по размерам 39 40 41 42
7 Наблюдения (43—45) 7.1 7.2 7.3	Наблюдения 43 44 45
8 Масса тела (46)	Масса тела 46
9 Потребление пищи и воды (47)	Потребление пищи и воды 47
10 Клиническая патология (48—49) 10.1 10.2	Клиническая патология 48 49
11 Бронхоальвеолярный лаваж (50)	Бронхоальвеолярный лаваж 50
12 Нагрузка на легкие (51)	Нагрузка на легкие 51
13 Офтальмологическое исследование	Офтальмологическое исследование 52
14 Макропатология и масса органов (53—56) 14.1 14.2 14.3 14.4	Макропатология и масса органов 53 54 55 56
15 Гистопатология (57)	Гистопатология 57
16 Исследование функции легких (58)	Исследование функции легких 58

Окончание таблицы ДА.1

Структура настоящего стандарта	Структура международного документа OECD Test № 413:2018
17 Данные исследований и отчет (59, 60) 17.1 Данные исследований 17.2 Отчет об исследовании 17.2.1 17.2.2 17.2.3 17.2.4 17.2.5 17.2.6 17.2.7 17.2.8	Данные исследований и отчет Данные исследований 59 Отчет об исследовании 60
*	Библиография
Приложение А Схемы проведения исследований	Приложение Схемы проведения исследований
Приложение ДА Сопоставление структуры настоящего стандарта со структурой примененного в нем международного документа	
Библиография	

* Библиография размещена в конце настоящего стандарта.

Примечание — После заголовков разделов настоящего стандарта приведены в скобках номера аналогичных им параграфов международного документа.

Библиография *

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

[2] OECD (1981). Subchronic Inhalation Toxicity Testing, Original Test Guideline No 413, Environment Directorate, OECD, Paris

[3] OECD (2009). Preliminary Review of OECD Test Guidelines for their Applicability to Manufactured Nanomaterials. Series on the Safety of Manufactured Nanomaterials №. 15, OECD, Paris

[4] OECD (2012). Guidance on Sample Preparation and Dosimetry for the Safety Testing of Manufactured Nanomaterials. Series on the Safety of Manufactured Nanomaterials №. 36, OECD, Paris

[5] 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 №. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris

[6] OECD (2008) test 407 Guidelines for the testing of chemicals. Repeated Dose 28-Day Oral Toxicity Study in Rodents, № 407*

[7] 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, pp. 229—258.

[8] OECD (2010). Guidance document on histopathology for inhalation toxicity studies supporting TG 412 (subacute inhalation toxicity: 28 day study) and TG 413 (subchronic inhalation toxicity: 90-day study). Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment №. 125. ENV/JM/MONO(2010)16, OECD, Paris

* Действует ГОСТ 32641—2014. «Методы испытания по воздействию химической продукции на организм человека. Определение токсичности при повторном/многократном пероральном поступлении вещества на грызунах. 28-дневный тест».

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

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

[11] 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, 215—263

[12] 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, 353—372

[13] 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, 219—224

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

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

УДК 615.038/615.012/615.014/615.2:006.354 МКС 75.080 11.020 11.120.01 MOD

Ключевые слова: методы испытания, воздействие химической продукции на организм человека, субхроническая ингаляционная токсичность, 90-дневное исследование

БЗ 11—2020/264

Редактор *Л.И. Нахимова*
Технический редактор *И.Е. Черелкова*
Корректор *Л.С. Лысенко*
Компьютерная верстка *А.Н. Золотаревой*

Сдано в набор 22.10.2020. Подписано в печать 17.11.2020. Формат 60×84 1/8. Гарнитура Ариал.
Усл. печ. л. 3,26 Уч.-изд. л. 2,95.
Подготовлено на основе электронной версии, предоставленной разработчиком стандарта

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