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

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ
СТАНДАРТ

**ГОСТ
34559—
2019**

МЕТОДЫ ИСПЫТАНИЯ ПО ВОЗДЕЙСТВИЮ ХИМИЧЕСКОЙ ПРОДУКЦИИ НА ОРГАНИЗМ ЧЕЛОВЕКА

Исследование нейротоксичности в процессе онтогенеза

Издание официальное

Москва
Стандартинформ
2019

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

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

Сведения о стандарте

1 ПОДГОТОВЛЕН Федеральным государственным унитарным предприятием «Российский научно-технический центр информации по стандартизации, метрологии и оценке соответствия и технологий» (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 июля 2019 г. № 120-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
Беларусь	BY	Госстандарт Республики Беларусь
Киргизия	KG	Кыргызстандарт
Россия	RU	Росстандарт
Таджикистан	TJ	Таджикстандарт
Узбекистан	UZ	Узстандарт

4 Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 8 августа 2019 г. № 477-ст межгосударственный стандарт ГОСТ 34559—2019 введен в действие в качестве национального стандарта Российской Федерации с 1 июня 2020 г.

5 Настоящий стандарт является модифицированным по отношению к международному документу OECD Test № 426:2007 «Руководство по исследованию химических веществ. Изучение нейротоксичности в процессе онтогенеза» («Guideline for the testing of chemicals. Developmental neurotoxicity study», MOD) путем:

- включения дополнительного раздела 1 и дополнительной фразы (6.5), 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 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

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, 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 Общие положения 1
3 Правила исследований 1
4 Подготовка к исследованию 2
5 Процедура испытаний 3
6 Результаты наблюдений 5
7 Данные и отчетность 11
Приложение А (справочное) Примеры схем исследования. 14
Приложение ДА (справочное) Сопоставление структуры настоящего стандарта со структурой примененного в нем международного документа 17
Библиография 20

Введение

В июне 1995 г. в Копенгагене рабочая группа OECD (Организации экономического сотрудничества и развития — ОЭСР) по репродуктивной и онтогенетической токсичности обсуждала необходимость внесения изменений в руководство ОЭСР по проведению исследования нейротоксичности в процессе онтогенеза и разработки новых руководств для определения конечных точек, ранее не охваченных [1]. Рабочая группа рекомендовала подготовить руководство по проведению исследования отдаленной нейротоксичности с использованием пересмотренного руководства Агентства по охране окружающей среды США (US EPA) [2]. В июне 1996 г. в Копенгагене было проведено второе консультативное совещание, на котором Секретариату были даны предложения по разработке нового руководства по испытаниям на отдаленную нейротоксичность, включая основные элементы, например подробное описание выбора видов животных, периода введения доз, периода исследования, конечных точек, подлежащих оценке, и критерии оценки результатов. Руководящий документ США по оценке рисков нейротоксичности был опубликован в 1988 г. [3]. В октябре 2000 г. на совещании экспертов ОЭСР и Семинаре Международного института биологических наук (ILSI) и в 2005 г. в Токио на очередном Консультативном совещании экспертов обсуждались научные и технические вопросы руководства по проведению испытаний в соответствии с рекомендациями по их применению, приведенными в [4] — [7]. Дополнительная информация о проведении, интерпретации результатов исследования и терминологии, используемых в настоящем стандарте, приведена в документах [8], [9].

МКС 75.080
11.020
11.120.01

Поправка к ГОСТ 34559—2019 Методы испытания по воздействию химической продукции на организм человека. Исследование эмбриональной нейротоксичности в процессе онтогенеза

В каком месте	Напечатано	Должно быть		
Предисловие. Таблица согласования	—	Казахстан	KZ	Госстандарт Республики Казахстан

(ИУС № 8 2020 г.)

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

МЕТОДЫ ИСПЫТАНИЯ ПО ВОЗДЕЙСТВИЮ ХИМИЧЕСКОЙ ПРОДУКЦИИ НА ОРГАНИЗМ ЧЕЛОВЕКА

Исследование нейротоксичности в процессе онтогенеза

Methods of testing the chemicals of human hazard. Study of neurotoxicity in the process of ontogenesis

Дата введения — 2020—06—01

1 Область применения

Настоящий стандарт устанавливает критерии оценки нейротоксического воздействия химических веществ на организм человека и животных в процессе онтогенеза и позволяют оценить и классифицировать исследуемое вещество в соответствии с согласованной на глобальном уровне системой классификации опасности и маркировки химической продукции (GHS).

2 Общие положения

2.1 Известно, что многие химические вещества оказывают нейротоксическое воздействие на человека и животных в процессе онтогенеза [10]—[13]. Исследование нейротоксичности в процессе онтогенеза необходимо для определения и оценки параметров токсичности химических веществ и смесей (исследуемое вещество). Исследования влияния нейротоксичности на процесс онтогенеза предназначены для получения данных, таких как «доза — ответ», возможные функциональные и морфологические отклонения в развитии нервной системы потомства в результате воздействия химических веществ на эмбрион в утробе матери и в раннем возрасте.

2.2 Исследование нейротоксичности в процессе онтогенеза может проводиться как отдельное исследование, включенное в изучение репродуктивной токсичности, и/или исследование нейротоксичности на взрослых животных (см. [14]—[16]) или добавлено к исследованию токсического воздействия на пренатальное развитие [17]. Если исследование нейротоксичности в процессе онтогенеза является частью другого исследования, необходимо сохранить целостность обоих исследований. Все исследования на лабораторных животных должны соответствовать рекомендациям и правилам (например, см. [18]).

2.3 До проведения исследования необходимо изучить всю доступную информацию об исследуемом веществе. Такая информация может включать идентификацию и химическую структуру вещества, его физико-химические свойства, результаты любых других испытаний *in vitro* или *in vivo* токсичности вещества; токсикологические данные для структурно родственных веществ; предполагаемое использование вещества. Эта информация необходима для подтверждения того, что испытание является важным для защиты здоровья человека и способствует обоснованному выбору начальной дозы.

3 Правила исследований

3.1 Исследуемое вещество вводят животным в период беременности и лактации. Для оценки нейротоксических эффектов у беременных и кормящих самок, а также для получения сравнительной информации о беременных самках и потомстве исследуют самок-матерей. Животных для оценки нейротоксичности у потомства выбирают случайным образом в пределах помета. Оценка нейротоксического действия заключается в наблюдении и выявлении грубых неврологических и поведенческих от-

Издание официальное

клонений, включая оценку физического развития, поведенческий онтогенез, двигательную активность, моторные и сенсорные функции, обучение и память, а также оценку массы мозга и невропатологий во время постнатального развития и зрелости.

3.2 Если испытания выполняют в виде отдельного исследования, в каждой группе можно использовать дополнительных животных для проведения конкретных нейробиологических, нейропатологических, нейрохимических или электрофизиологических исследований, которые могут дополнить данные, полученные в результате исследований, рекомендованных в [16], [19]—[21]. Дополнительные исследования могут иметь важное значение, когда эмпирические данные, предполагаемые эффекты или механизм/способ действия указывают на специфическую нейротоксичность. Для дополнительных исследований могут быть использованы как самки-матери, так и детеныши. Кроме того, могут быть проведены испытания *ex vivo* и *in vitro*, если они не нарушают целостность процедур *in vivo*.

4 Подготовка к исследованию

4.1 Выбор видов животных

Для проведения испытаний предпочтительным видом животных являются крысы, однако при необходимости можно использовать другие виды животных. Следует отметить, что приведенные в настоящем стандарте внутриутробные и послеродовые периоды являются специфическими для обычно используемых линий крыс и при использовании других видов или нетипичных линий животных следует выбирать сопоставимые периоды времени. Использование других видов животных должно быть обосновано токсикологическими, фармакокинетическими и/или другими данными. Обоснование должно включать наличие оценок видоспецифических постнатальных нейробиологических и невропатологических воздействий. Если ранее проведенное исследование выявило проблемы, следует рассмотреть вопрос о виде или линии животных, вызвавших сомнение. Из-за разных поведенческих характеристик разных линий крыс должны быть подтверждающие данные, что выбранная для испытания линия является достаточно плодовитой и чувствительной. Восприимчивость и чувствительность других видов к нейротоксическому воздействию должна быть подтверждена документально.

4.2 Условия содержания и кормления

4.2.1 Температура в помещении, в котором содержат животных, должна быть (22 ± 3) °С. Относительная влажность воздуха должна быть не менее 30 % и не должна превышать 70 % во время уборки помещения, предпочтительное значение — от 50 % до 60 %. Освещение в помещениях должно быть искусственным с соблюдением последовательности 12 ч света, 12 ч темноты. Возможно изменение светового цикла перед спариванием и на время исследования для оценки функциональных и поведенческих показателей в темное время (при красном свете), т. е. в течение времени, когда животные обычно активны [22]. Любые изменения в цикле свет — темнота должны быть достаточно продолжительными для адаптации животных к новому циклу. Для кормления животных используют обычный лабораторный корм с неограниченным потреблением питьевой воды. Регистрируют тип пищи и качество воды и анализируют их на наличие загрязнений.

4.2.2 Подопытных животных содержат в клетках индивидуально или небольшими группами одного пола. Процедуру спаривания проводят в клетках, подходящих для этой цели. После подтверждения копуляции или не позднее 15-го дня беременности спарившихся животных содержат в отдельных родовых или материнских клетках. Клетки должны быть расположены таким образом, чтобы возможные воздействия, связанные с перемещением клеток, были сведены к минимуму. Беременных самок при приближающихся родах необходимо обеспечить соответствующими материалами для обустройства гнезда. Известно, что неправильное обращение с животными или стресс во время беременности могут привести к неблагоприятным исходам, включая пренатальные потери и изменение эмбрионального и постнатального развития. Для предотвращения гибели плода от факторов, не связанных с введением исследуемого вещества, следует осторожно обращаться с животными во время беременности и ограждать их от стрессов, вызываемых внешними факторами, такими как чрезмерный внешний шум.

4.3 Подготовка животных

Используют только здоровых животных, адаптированных к лабораторным условиям и не подвергавшихся ранее экспериментальным воздействиям, за исключением случаев, когда исследование является частью другого исследования (см. 2.2). Подопытные животные должны быть охарактеризованы

по виду, линии, источнику, полу, весу и возрасту. Каждое животное маркируют уникальным идентификационным номером. По возможности, животные всех подопытных групп должны быть одинаковой массы и одного возраста в пределах нормального диапазона, характерного для данного вида и линии. Для каждого уровня дозы используют молодых половозрелых нерожавших самок. Не допускают спаривания братьев и сестер. День беременности (GD) 0 — это день, когда наблюдалась вагинальная пробка и/или сперма. При приобретении беременных животных предоставляют достаточное время для адаптации (например, 2—3 дня). Беременных самок по возможности объективно распределяют по контрольным и подопытным группам (например, рекомендуется использовать процедуру случайной стратифицированной выборки для обеспечения равномерного распределения между группами, например на основании массы тела). Самки, оплодотворенные одним и тем же самцом, должны быть равномерно распределены по группам.

5 Процедура испытаний

5.1 Число и пол животных

5.1.1 Подопытные и контрольные группы должны содержать достаточное число беременных самок для обеспечения достаточного количества потомства для оценки нейротоксичности. Для каждого уровня дозы рекомендуется использовать детенышей из 20 пометов. Допускается репликация и шахматный порядок дозирования в группах, если общее число детенышей в группе будет соответствовать статистической модели, используемой с учетом параллельных испытаний.

5.1.2 Для обеспечения одинакового числа детенышей во всех пометах [23] не позже четвертого послеродового дня (PND 4) (день родов является нулевым днем PND 0) размер каждого помета корректируют путем удаления избыточного количества детенышей случайным выбором. Размер помета не должен превышать средний размер помета для линии используемых грызунов [8]—[12]. Помет должен содержать по возможности равное число детенышей мужского и женского полов. Неприемлем выборочный отбор детенышей, например, основанный на массе тела. После нормирования пометов (выбраковки) и до проведения дальнейшего испытания по установлению функциональных конечных точек все детеныши, для которых планируется испытание до отъема или после отъема от матери, должны быть четко идентифицированы с использованием любого подходящего гуманного метода идентификации (см., например, [24]).

5.2 Распределение животных для функциональных и поведенческих испытаний, определения массы мозга и нейропатологических оценок

5.2.1 Допускается использовать разные подходы к назначению животных, подвергшихся воздействию внутриутробно и в период лактации, для функциональных и поведенческих испытаний, оценке полового созревания, определения массы мозга и невропатологической оценке [25]. Испытания нейропатологических функций (например, социальное поведение), нейрохимии и нейропатологии могут быть добавлены индивидуально (в каждом конкретном случае) при условии сохранения целостности исходных требований исследования.

5.2.2 Начиная с PND 4 из каждой дозовой группы выбирают детенышей для оценки конечных точек. Детенышей выбирают таким образом, чтобы в каждой дозовой группе были представлены детеныши обоих полов из каждого помета во всех испытаниях в равной степени. Для исследования двигательной активности проверяют одну и ту же пару детенышей мужского и женского полов в любом возрасте до отъема (см. 6.5). Для остальных испытаний также выделяют пары самцов и самок. Детенышам возможно необходимо назначать другие испытания по сравнению со взрослыми для изучения когнитивных функций, чтобы избежать смешения влияния возраста и предварительного обучения на эти измерения [26], [27]. Детенышей при отъеме (PND 21), не выбранных для других испытаний, подвергают эвтаназии. Документируют любые изменения в распределении детенышей. Статистической единицей измерения является помет, а не детеныш.

5.2.3 Существуют разные подходы к отбору детенышей для исследований до отъема и после отъема, в рамках когнитивных тестов, патологической экспертизы и т. д. На рисунке А.1 (см. приложение А) приведены примеры возможных схем исследований. Минимальное рекомендуемое число животных в каждой дозовой группе для исследования до отъема и после отъема приведено в таблице 1.

Таблица 1 — Примеры исследований и число животных в каждой дозовой группе

Параметр	Число животных
Клинические наблюдения и масса тела	Все животные
Подробные клинические наблюдения	20/пол (1 пол/из помета)
Масса мозга (после фиксирования) PND 11—22	10/пол (1 из помета)
Масса мозга (без фиксирования) ~ PND 70	10/пол (1 из помета)
Нейропатология (иммерсионная или перфузионная фиксация) PND 11—22	10/пол (1 из помета)
Нейропатология (перфузионная фиксация) ~ PND 70	10 /пол (1 из помета)
Половое созревание	20/пол (1 пол из помета)
Другие ориентиры развития (необязательно)	Все животные
Поведенческий онтогенез	20/пол (1 пол из помета)
Двигательная активность	20/пол (1 пол из помета)
Моторные и сенсорные функции	20/пол (1 пол из помета)
Обучение и память	10/пол[a)] (1 из помета)

[a)] В зависимости от чувствительности испытаний когнитивных функций следует предусмотреть исследование большего числа животных, например одного самца и одной самки из помета (см. приложение А). Дополнительные указания по размеру выборки приведены в [8].

5.3 Режим введения доз

5.3.1 Одновременно исследуют и осуществляют контроль не менее трех уровней доз. Уровни доз выбирают таким образом, чтобы выявить степень интенсивности токсических эффектов. При отсутствии ограничений по физико-химическим или биологическим свойствам вещества самая высокая доза должна оказывать выраженные токсические воздействия на организм матери [например, клинические признаки, снижение массы тела (не более 10 %) и/или доказательство дозозависимых изменений в органе-мишени]. Высокая доза может быть ограничена 1000 мг в день на 1 кг массы тела за некоторыми исключениями. Например, предполагаемое воздействие на человека может приводить к необходимости исследования более высокого уровня дозы. В предварительных исследованиях по выбору доз, а также в ходе других экспериментальных исследований определяют самую высокую дозу, которая будет использована и которая обладает минимальным токсическим воздействием на организм матери. Если исследуемое вещество оказывает токсическое действие на процесс развития при стандартном исследовании токсичности на процесс развития или в предварительном исследовании, максимальный уровень дозы должен быть максимальной дозой, которая не будет оказывать чрезмерной токсичности на потомство (внутриутробная или неонатальная смертность), и достаточной для предотвращения развития значительно выраженной нейротоксичности. Самый низкий уровень дозы не должен вызывать никакого токсического эффекта у матери или на эмбриофетальное развитие, включая нейротоксичность. Убывающая последовательность уровней доз должна быть выбрана таким образом, чтобы продемонстрировать любые проявления зависимости «доза — ответ», не вызывающей неблагоприятные воздействия (NOAEL), или дозы, близкие к пределу обнаружения, которые позволили бы определить ориентировочную дозу. Двух-, четырехкратные интервалы обычно являются оптимальными для установления снижения уровня дозы, и добавление четвертой дозовой группы предпочтительнее, чем использование очень больших интервалов (например, более чем в 10 раз) между дозами.

5.3.2 Уровни доз выбирают с учетом всех имеющихся данных о токсичности, а также дополнительной информации о метаболизме и токсикокинетике исследуемого вещества и родственных веществ. Эта информация также может помочь в обосновании выбора адекватного режима введения доз. Введение вещества детенышам следует проводить с учетом воздействия и фармакокинетической информации [28], [29]. Перед проведением экспериментов по непосредственному введению вещества необходимо провести тщательный анализ преимуществ и недостатков этого метода [30].

5.3.3 Параллельно с подопытной группой должна быть контрольная группа, получающая плацебо или растворитель, если растворитель используют при введении исследуемого вещества. Исследуемое вещество или растворитель вводят всем животным в одинаковом объеме в расчете на массу тела. Если для облегчения введения доз используют растворитель или другое вспомогательное вещество, следует учитывать характеристики применяемых веществ: воздействие на абсорбцию, распределение, метаболизм или удерживание исследуемого вещества; воздействие на химические свойства исследуемого вещества, которые могут изменить его токсические свойства; влияние на потребление пищи или воды или на пищевой статус животных. Растворитель не должен оказывать воздействий, которые могут повлиять на интерпретацию результатов исследования, не должен обладать нейроповеденческой токсичностью и влиять на репродуктивную функцию и развитие. Для новых вспомогательных веществ в дополнение к контрольной группе, получающей плацебо или растворитель, должна быть включена контрольная группа для вспомогательного вещества. Обращение с животными в контрольной(ых) группе(ах) и подопытных группах должно быть одинаковым.

5.4 Введение доз

5.4.1 Исследуемое вещество или растворитель вводят способом наиболее вероятного потенциального воздействия на человека и на основе имеющейся информации о метаболизме и распределении в организме подопытных животных. Обычно используют оральный способ введения (например, через желудочный зонд или с пищей, или с питьевой водой), также могут быть использованы другие способы введения (например, кожный или ингаляционный) в зависимости от характеристик и предполагаемых или известных путей воздействия на человека (подробные указания приведены в [8]). Выбранный способ введения должен быть документально обоснован. Исследуемое вещество вводят ежедневно примерно в одно и то же время.

5.4.2 Дозу каждому животному вводят на основе результатов определения индивидуальной массы тела. Однако следует соблюдать осторожность при корректировке доз в течение последней трети беременности. Если у подопытных самок отмечено превышение токсичности, эти животные должны быть умерщвлены гуманным способом.

5.4.3 Исследуемое вещество или растворитель вводят беременным самкам не менее одного раза в день с момента имплантации (GD 6) и на протяжении лактации (PND 21) для воздействия исследуемого вещества во время пре- и постнатального развития нервной системы детенышей. Возраст, при котором начинается введение доз, а также продолжительность и частота введения могут быть скорректированы на основании данных, свидетельствующих о том, что существует более релевантная схема исследования, имитирующая воздействие на человека. При использовании других видов животных длительность введения вещества необходимо скорректировать для обеспечения наблюдения нейротоксичности в ранние периоды развития мозга (т. е. соответствующие пренатальному и раннему постнатальному развитию мозга человека). Можно начинать введение вещества с начала беременности (GD 0), однако необходимо обратить внимание на потенциальную возможность исследуемого вещества вызвать потерю плода на предимплантационной стадии. Введение вещества, начиная с GD 6, позволяет избежать подобного риска, однако не будут рассмотрены стадии развития между GD 0 и GD 6. Если лаборатория приобрела животных, уже подвергшихся спариванию, начать введение вещества в GD 0 становится невозможным, поэтому в таком случае оптимальным сроком начала введения исследуемого вещества является срок GD 6. Учитывая информацию об эффектах исследуемого вещества, полученных в предшествующих экспериментах и на основании материально-технических возможностей лаборатории, устанавливают режим введения доз с увеличением срока введения в послеотъемный период. В день родов животным исследуемое вещество не вводят. Предполагают, что воздействие исследуемого вещества на потомство будет происходить через материнское молоко, однако при отсутствии доказательств постоянной близости с потомством возможно непосредственное введение вещества детенышам. Доказательством продолжающегося воздействия являются фармакокинетическая информация, данные о токсикологических эффектах у потомства или изменения в биомаркерах [28].

6 Результаты наблюдений

6.1 Наблюдения за самками

6.1.1 За состоянием здоровья всех самок проводят тщательное наблюдение не реже одного раза в день, включая заболеваемость и смертность.

6.1.2 Во время введения исследуемого вещества и наблюдения следует периодически проводить более подробные клинические наблюдения (не менее двух раз в течение беременности и два раза во время лактации), на один уровень дозы используют не менее десяти самок. Специально обученный технический персонал, который не знает о введении вещества животным, осматривает их вне клеток. При этом используют стандартные процедуры, обеспечивающие сведение к минимуму стресса у животных и исключение систематической ошибки наблюдателей, а также позволяющие максимально повысить надежность заключений разных исследователей. Желательно, чтобы в рамках одного исследования наблюдения проводил один и тот же специалист.

6.1.3 Должно быть зафиксировано наличие наблюдаемых симптомов. Также должна быть зарегистрирована степень проявления наблюдаемых эффектов, если это возможно. Клинические наблюдения включают (но не ограничиваются) наблюдения за: изменениями кожи (наружных покровов тела), шерсти, глаз, слизистых оболочек, появлением выделений и вегетативной активности (например, слезотечение, пилоэрекция, размер зрачка, необычный способ дыхания и/или дыхание через рот, а также любые симптомы нарушения мочеиспускания или дефекации).

6.1.4 Регистрируют любые необычные реакции в изменении положения тела: уровень активности (например, сужение или расширение стандартного ареала обитания), координацию движений. Регистрируют изменения походки (например, переваливающаяся, нарушение координации движения), позы (например, сгорбленность), нестабильность реакций во время обращения с животными (уход, размещение и т. д.), реакции на факторы окружающей среды, а также наличие клонических или тонических мышечных судорог (непроизвольные мышечные сокращения), спазмов, дрожания, стереотипии — неосознанного повторения движений (например, чрезмерный груминг, необычные движения головой, повторяющиеся круговые движения), необычного поведения (например, кусание или чрезмерное лизание, нанесение себе увечий, вокализация, движение задом наперед) или агрессии.

6.1.5 Регистрируют дату появления признаков токсичности, время суток, степень проявления и продолжительность.

6.1.6 Животных взвешивают во время введения доз не реже одного раза в неделю в течение всего исследования, в день или накануне родов и в PND 21 (отъем детенышей). При введении доз через желудочный зонд самок взвешивают не менее двух раз в неделю. При необходимости дозы корректируют при каждом определении массы тела. Потребление пищи во время беременности и лактации измеряют не менее одного раза в неделю. При введении вещества через питьевую воду измеряют потребление воды не менее одного раза в неделю.

6.2 Наблюдения за потомством

6.2.1 Для выявления признаков токсичности, заболеваемости и смертности все потомство обследуют не менее одного раза в день.

6.2.2 Во время введения вещества и в периоды наблюдения проводят подробные клинические наблюдения за потомством. За потомством (не менее одного детеныша одного пола из помета) должно быть установлено наблюдение с использованием стандартных процедур специально обученным персоналом, который не знает о введении вещества животным, для сведения к минимуму систематической ошибки и повышения согласованности заключений разных исследователей. По возможности наблюдения должен проводить один и тот же специалист. На стадии развития потомства должно быть организовано наблюдение и документирование как минимум конечных критериев оценки (конечных точек), в зависимости от конкретных случаев, приведенных в 6.1.3, 6.1.4.

6.2.3 Записывают дату проявления признаков токсичности у потомства, время суток, степень проявления и продолжительность.

6.3 Показатели физического развития

6.3.1 Изменения на основных этапах развития до отъема (например развертывание ушной раковины, открытие глаз, появление резцов) в значительной степени зависят от массы тела [30], [31]. Масса тела может быть лучшим показателем физического развития. Поэтому анализ показателей развития рекомендуется проводить только при наличии доказательств того, что эти показатели дадут дополнительную информацию. Сроки оценки этих параметров приведены в таблице 2. В зависимости от предполагаемого воздействия и результатов начальных измерений может быть целесообразным добавить дополнительные временные точки или выполнять измерения на других этапах развития.

Таблица 2 — Сроки оценки физических показателей и основных этапов развития, а также функциональных/поведенческих конечных точек[a]

Конечная точка	Возрастной период		
	перед отъемом[b]	пубертатный (половое созревание)[b]	молодой взрослый[b]
Показатели физического развития			
Масса тела и клиническое наблюдение	Еженедельно[c]	Не менее 1 раза в две недели	Не менее 1 раза в две недели
Масса мозга	PND 22[d]		Прекращение исследования
Нейропатология	PND 22[d]		Прекращение исследования
Половое развитие	—	При необходимости	—
Другие точки онтогенеза[e]	При необходимости	—	—
Функциональные/поведенческие конечные точки			
Поведенческий онтогенез	Не менее двух измерений	—	—
Двигательная активность (включая приобретение навыков)	1—3 раза[f]	—	1 раз
Моторные и сенсорные функции	—	1 раз	1 раз
Обучение и запоминание	—	1 раз	1 раз

[a] В настоящую таблицу включено минимальное количество необходимых исследований. В зависимости от ожидаемых эффектов и результатов начальных измерений можно добавить дополнительные временные точки (например, для взрослых животных) или для выполнения исследований на других стадиях развития.

[b] Не рекомендуется подвергать испытанию детенышей в течение двух дней после отъема (см. 6.3.2). Рекомендуемым возрастом для исследований в пубертатном периоде по показателю «Обучение и запоминание» является PND 25 ± 2; по показателю «Моторные и сенсорные функции» — PND 25 ± 2. Рекомендуемый возраст для исследования особей в молодом взрослом возрасте составляет PND 60—70.

[c] Массу тела детенышей определяют не менее двух раз в неделю перед введением доз; при быстром увеличении массы тела проводят корректировку дозы.

[d] При необходимости массу мозга и невропатологию (см. 6.8.2) оценивают на более ранних этапах (например, PND 11).

[e] При необходимости в дополнение к массе тела следует регистрировать другие этапы развития (например, открытие глаз) (см. 6.3.1).

[f] См. 6.5.

6.3.2 При оценке физического развития желательно использовать посткоитальный период вместо постнатального периода [33]. Если детеныши проходят обследование в день отъема, рекомендуется проводить это обследование до фактического отъема, чтобы избежать затрудняющих интерпретацию эффектов, связанных со стрессом в период отъема. Кроме того, в течение двух дней после отъема обследование детенышей не проводят.

6.3.3 Живых детенышей пересчитывают и определяют их пол визуальным осмотром или измерением анально-генительного расстояния [34]—[35]. Каждого детеныша в помете взвешивают индивидуально в момент рождения или вскоре после этого. Затем взвешивают во время грудного вскармливания не менее одного раза в неделю и после отъема — не менее одного раза в две недели. Для оценки полового созревания в каждом помете выбирают не менее одного самца и одной самки. При этом записывают возраст и вес каждого животного на момент раскрытия вагины у самки [36] и отделения слизистой оболочки препуция от основания полового члена.

6.4 Поведенческий онтогенез

Для исследования онтогенеза выбранных видов поведенческих реакций используют не менее чем по одному детенышу каждого пола из каждого помета соответствующего возраста, причем одних и тех же детенышей используют во все дни испытаний для оценки выбранных поведенческих реакций. Дни исследования распределяют равномерно в течение этого периода для определения нормального или связанного с введением доз изменения в онтогенезе поведенческих характеристик [38]. Ниже приведены примеры исследований, по которым может быть оценен онтогенез некоторых поведенческих реакций, например установочный рефлекс, отрицательный геотаксис и двигательная активность [38]—[40].

6.5 Двигательная активность

Двигательную активность детенышей контролируют в периоды до отъема и на молодых взрослых животных [41]—[45]. Рекомендации по проведению исследований в период отъема приведены в 6.3.2. Сеанс исследования должен быть достаточно продолжительным, чтобы продемонстрировать адаптацию животных контрольной группы к испытанию. Для оценки поведенческого онтогенеза настоятельно рекомендуется исследование двигательной активности. При его использовании в рамках поведенческого онтогенеза для исследования используют одних и тех же животных для всех сеансов исследования перед отъемом. Исследование должно проходить достаточно часто, чтобы оценить онтогенез адаптации к экспериментальным условиям [44]. Это может потребовать трех или более периодов исследования до отъема, включая день отъема (например, PND 13, 17, 21). Исследование также следует осуществлять на тех же животных или из того же помета и во взрослом возрасте, близко к завершению исследования (например, PND 60—70). При необходимости назначают дополнительные дни исследования. Двигательную активность следует контролировать устройством автоматической регистрации активности, которое должно обеспечивать обнаружение как увеличения, так и уменьшения активности (т. е. базовая активность, измеренная устройством, не должна быть настолько низкой, чтобы делать невозможным обнаружение ее снижения, и не настолько высокой, чтобы делать невозможным обнаружение повышения активности). Для обеспечения надежности работы на протяжении всего срока исследования каждое устройство проверяют с помощью стандартных процедур.

Для оценки двигательной активности допускается использовать системы автоматического распознавания поведенческих реакций крыс и мышей и регистрации параметров их движения, например «открытое поле» «LABORAS» (Metris, Нидерланды) и «Open field» (TSE, Германия) или установки типа вращающего стержня «Rotarod» (Ugo Basile, Италия).

Животные из подопытных групп сбалансированно распределяются между этими устройствами. Каждое животное исследуют индивидуально. Время исследования подопытных животных должно быть распределено таким образом, чтобы избежать смещения циркадных ритмов активности. Необходимо свести к минимуму изменение условий испытаний и зависимость от введения исследуемого вещества. На многие поведенческие реакции, включая двигательную активность, могут оказывать влияние уровень звука, размер и форма испытательной клетки, температура, относительная влажность, освещенность, запахи, использование привычной или новой испытательной клетки и отвлекающие факторы окружающей среды.

6.6 Моторные и сенсорные функции

Моторные и сенсорные функции тщательно анализируют не менее одного раза в пубертатном возрасте и один раз — в молодом взрослом возрасте (например, PND 60—70). Относительно проведения исследования в период отъема — см. 6.3.2. Должно быть выполнено достаточное количество испытаний для обеспечения адекватной количественной выборки сенсорных видов чувствительности (например, соматосенсорных, вестибулярных) и моторных функций (например, силы, координации). Примерами испытаний моторных и сенсорных функций являются: ответная реакция разгибателя [46], рефлекс переворачивания [47], [48], привыкание к слуховому испугу [40], [49]—[54] и вызванные потенциалы [55].

6.7 Испытания на обучение и память

Испытания на ассоциативное обучение и память проводят после отъема (например, PND 25 ± 2) и в молодом возрасте (PND 60 и старше). Рекомендации по проведению испытаний в период отъема приведены в 6.3.2. На этих двух стадиях развития проводят одни и те же или отдельные испытания. Допускается некоторая вариативность выбора испытаний на обучение и способность запоминать у отъе-

мышей и взрослых крыс. Однако испытания должны предусматривать соответствие двум критериям. Во-первых, обучение следует оценивать как динамику в некоторых повторяющихся испытаниях (обучаемость) или сеансах, или в исследованиях, включающих одно испытание, со ссылкой на условия, которые контролируют неассоциативные эффекты опыта обучения. Во вторых, испытания должны включать некоторый критерий памяти (краткосрочная или долгосрочная) в дополнение к первоначальному обучению (приобретению), но эта мера памяти не может быть документирована при отсутствии критерия усвоения, полученного из такого же испытания. Если испытания на обучение и способность запоминать демонстрируют влияние исследуемого вещества, то можно использовать дополнительные испытания для исключения альтернативных интерпретаций, основанных на изменениях сенсорной, мотивационной и/или двигательной способностей. В дополнение к двум вышеуказанным критериям рекомендуется добавить испытание на обучение и память на основе продемонстрированной чувствительности к классу исследуемого соединения (при наличии такой информации в литературе). При отсутствии такой информации примеры испытаний, которые можно выполнить для обеспечения соответствия вышеуказанным критериям, включают: пассивное избегание [43], [56], [57], задержку пространственной реакции для взрослой крысы [58] и для крысят [59], выработку обонятельного рефлекса [43], [60], водный лабиринт Морриса [61]—[63], лабиринт Биля или Цинциннати [64], [65], радиальный восьмирукавный лабиринт [66], Т-образный лабиринт [43], а также приобретение и сохранение навыков поведения, контролируемого графиком [26], [67], [68]. Дополнительные испытания приведены для отъемышей [26], [27] и взрослых крыс [19], [20].

6.8 Патологоанатомическое исследование

6.8.1 Самок животных подвергают эвтаназии после отъема потомства.

6.8.2 Нейропатологическую оценку потомства проводят с использованием тканей животных, гуманно умерщвленных на PND 22 или на более раннем этапе между PND 11 и PND 22, а также при завершении исследования. У потомства, подвергнутого эвтаназии на PND 22, исследуют ткани мозга. У животных, подвергнутых эвтаназии при завершении исследования, оценивают ткани центральной нервной системы (CNS) и периферической нервной системы (PNS). Животных, умерщвленных на PND 22 или в более ранние сроки, фиксируют методом погружения или перфузии. Животных, подвергшихся эвтаназии на стадии завершения исследования, фиксируют методом перфузии. Все процедуры подготовки образцов тканей животных после перфузии, проводки тканей и окрашивания слайдов выполняют таким образом, чтобы каждая партия содержала представительную выборку от каждой дозовой группы. Дополнительные указания по нейропатологии приведены в [9] и [103].

6.9 Подготовка образцов тканей

Документируют все выраженные макроскопические изменения, обнаруженные при вскрытии. Отобранные образцы тканей должны представлять все основные области нервной системы. Образцы тканей берут от всех основных отделов нервной системы, сохраняют в соответствующем фиксирующем растворе и обрабатывают в соответствии с опубликованными стандартными гистологическими протоколами [69]—[71], [103]. Заливка в парафин является приемлемой для тканей CNS и PNS, однако при постфиксации вместе с эпоксидной заливкой может быть целесообразным использование осмия, если требуется более высокая степень разрешения (например, для периферических нервов, когда предполагается периферическая нейропатия, и/или для морфометрического анализа периферических нервов). Мозговую ткань, отобранную для морфометрического анализа, фиксируют в соответствующих средах для всех уровней доз в одно и то же время во избежание артефактов усадки, которые могут быть связаны с длительным хранением срезов в фиксаторе [6].

6.10 Нейропатологические исследования

6.10.1 Целями качественного исследования являются:

- выявление отделов нервной системы, демонстрирующих невропатологические нарушения;
- идентификация типов нейропатологических нарушений, возникших в результате воздействия исследуемого вещества;
- определение диапазона тяжести нейропатологических нарушений.

Для подтверждения нейропатологических нарушений полученные гистологические срезы образцов тканей исследуют под микроскопом квалифицированные специалисты по лабораторной диагностике. Всем невропатологическим изменениям присваивают степень тяжести. Окрашивание гематоксили-

ном и эозином может быть достаточным для оценки срезов головного мозга животных, подвергшихся эвтаназии при PND 22 или ранее. Для оценки образцов тканей CNS и PNS животных, подвергнутых эвтаназии на завершающем этапе исследования, рекомендуется окрашивание миелина [например, прочным синим люксолом/крезиловым фиолетовым и серебром (окрашивание по Бильшовскому или Бодиану)]. В зависимости от профессиональной оценки патологоанатома и видов наблюдаемых нейропатологических изменений, для идентификации и характеристики конкретных типов изменений могут быть применены окрашивания других видов тканей (например, глиального фибриллярного кислого белка (GFAP) или лектина для оценки изменений глии и микроглии [72], окрашивание флюорохромом для обнаружения некроза [73], [74] или окрашивание серебром, специфичное при дегенерации нервной ткани [75]).

6.10.2 Должна быть выполнена морфометрическая (количественная) оценка. Результаты, полученные в ходе этой оценки, помогают выявить воздействия, связанные с введением исследуемого вещества, а также интерпретировать различия в массе или морфологии мозга [76], [77]. Образцы нервной ткани отбирают и специально готовят для морфометрической оценки. Морфометрическая оценка может включать, например, линейные или площадные измерения определенных областей мозга [78]. Проведение линейных или площадных измерений предусматривает использование гомологичных разделов, тщательно отобранных по надежным микроскопическим маркерам [6]. При определении воздействий, обусловленных введением исследуемого вещества, для определения объема или числа клеток конкретных нейроанатомических областей используют стереологию [79] —[84].

6.10.3 Ткани мозга должны быть исследованы на наличие нейропатологических изменений, обусловленных введением исследуемого вещества. Для обеспечения тщательного исследования тканей головного мозга необходимо провести забор тканей всех основных отделов мозга [например, обонятельных луковиц, коры головного мозга, гиппокампа, базальных ганглий (подкорковых ядер), таламуса (зрительного бугра), гипоталамуса (подбугровой области), среднего мозга (крыши, подкрыши и ножек), варолиевого моста, продолговатого мозга, мозжечка]. Срезы образцов тканей мозга у всех животных должны быть отобраны в одной плоскости. У взрослых особей, подвергшихся эвтаназии на стадии завершения исследования, отбирают репрезентативные срезы спинного мозга и PNS. Исследования должны включать следующие ткани: глаза со зрительным нервом и сетчаткой, шейный и поясничный отделы спинного мозга, дорсальный и вентральный корешки нерва, проксимальный седалищный нерв, проксимальный большеберцовый нерв (из коленного сустава) и ветви большеберцового нерва икроножной мышцы. Срезы спинного мозга и периферических отделов должны включать как поперечные, так и продольные срезы.

6.10.4 Нейропатологическая оценка включает определение наличия признаков поражения нервной системы [6], [85]—[89], а также клеточных нарушений (например, нейронная вакуолизация, дегенерация, некроз) и признаков изменения тканей (например, глиоз, лейкоцитарная инфильтрация, кистозные образования). Важно отличать эффекты, связанные с введением вещества, от эффектов, обычно происходящих в ходе эвтаназии [90]. Примеры значимых изменений, свидетельствующих о нарушении развития, включают (но не ограничиваются):

- изменения размеров или формы обонятельной луковицы, головного мозга или мозжечка;
- изменения относительных размеров разных отделов мозга, включая уменьшение или увеличение размера отделов в результате утраты или сохранения обычно транзиторных популяций клеток или аксонов (например, внешнего зародышевого слоя мозжечка, мозолистого тела);
- изменения пролиферации, миграции и дифференциации, о чем свидетельствуют участки чрезмерного апоптоза или некроза, кластеры или разбросанные популяции эктопичных, дезориентированных или недоразвитых нейронов, или изменения относительных размеров разных слоев корковых структур;
- изменения в структуре миелинизации, в том числе уменьшение общего размера или изменения окрашивания миелиновых структур;
- признаки гидроцефалии, в том числе расширение желудочков головного мозга, стеноз водопровода среднего мозга и истончение полушарий мозга.

6.11 Анализ зависимости «доза — ответ» при нейропатологических изменениях

Рекомендуется следующая поэтапная процедура для качественного и количественного нейропатологических анализов. В первую очередь образцы из групп с высокой дозой сравнивают с образцами контрольной группы. Если никаких доказательств нейропатологических изменений у животных в группе

с высокой дозой не обнаружено, дальнейший анализ не требуется. При обнаружении доказательств нейропатологических изменений в группе с высокой дозой исследуют животных из групп со средней и низкой дозами. Если испытание группы с высокой дозой было прекращено в связи со смертью животных или проявлением другой токсичности, искажающей результаты, группы с высокой и промежуточной дозой исследуют на наличие нейропатологической альтерации. При обнаружении нейротоксичности в группах с низкими дозами следует провести нейропатологический анализ в этих группах. При обнаружении нейропатологических изменений, связанных с введением вещества, при качественном или количественном исследовании определяют частоту и степень тяжести поражений или морфометрических альтераций в зависимости от введенной дозы на основании оценки всех животных всех дозовых групп. В анализ включают все отделы мозга, в которых обнаружено наличие каких-либо нейропатологических альтераций. Характеристики, используемые для определения каждой степени тяжести для поражения любого типа, описывают с указанием специфических признаков дифференциации каждой степени. Регистрируют частоту и степень тяжести поражений каждого типа и выполняют статистический анализ для оценки характера зависимости «доза — ответ». Рекомендуется использовать кодирование образцов [91].

7 Данные и отчетность

7.1 Данные

Все данные регистрируют индивидуально и обобщают в табличной форме с указанием для каждой подопытной группы типов изменений и числа самок-матерей, пола потомства и отображением изменений каждого типа в пометах. При прямом постнатальном воздействии на потомство необходимо представить также способ, продолжительность и период воздействия.

7.2 Оценка и интерпретация результатов

7.2.1 Исследование нейротоксичности в процессе онтогенеза обеспечит информацию о последствиях многократного воздействия вещества во время внутриутробного развития и раннего постнатального развития. Поскольку в рамках исследования акцент делается как на конечные точки общей токсичности, так и на конечные точки нейротоксичности в процессе онтогенеза, то результаты исследования позволяют разграничить нейропатологические явления, происходящие при отсутствии токсичности для беременной самки, и те, которые проявляются только на уровнях, являющихся токсичными также и для беременной самки. Из-за сложной взаимосвязи между схемой исследования, статистическим анализом и биологической значимостью результатов адекватная интерпретация данных по развитию нейротоксичности должна включать в себя экспертную оценку [107], [109]. Интерпретацию результатов испытаний следует проводить на основе оценки совокупности представленных доказательств [20], [92] — [94]. Следует обсудить закономерности поведенческих или морфологических результатов при наличии, а также подтверждении зависимости «доза — ответ». В отчет включают данные всех доступных исследований, связанных с оценкой нейротоксичности в онтогенезе, включая эпидемиологические исследования на людях или описания клинических случаев, а также результаты экспериментальных исследований на животных (например, токсикокинетические данные, информацию о зависимости активности от структуры, данные других исследований токсичности). Отчет также включает взаимосвязь между дозами исследуемого вещества, наличием или отсутствием, частотой и степенью любого нейротоксического эффекта для каждого пола [20], [95].

7.2.2 Оценка данных должна включать обсуждение как биологической, так и статистической значимости. Статистический анализ следует рассматривать как инструмент, обеспечивающий, а не определяющий интерпретацию данных. Недостаточность статистической значимости не должна быть единственным обоснованием для вывода, что исследуемое вещество не оказывает соответствующего эффекта, также как статистическая значимость не должна быть единственным подтверждением наличия эффекта от введения исследуемого вещества. Имеющиеся позитивные и исторические контрольные данные должны быть приняты во внимание во время обсуждения и интерпретации данных, чтобы исключить возможные ложноотрицательные результаты и трудности при применении метода «доказательство обратного», особенно когда в ходе исследования не было выявлено эффектов, связанных с введением вещества [102], [106]. Вероятность ложноположительных результатов исследований должна обсуждаться с учетом общей статистической оценки полученных данных [96]. В ходе оценки данных

должна быть принята во внимание зависимость, если она обнаружена, между наблюдаемыми нейропатологическими и поведенческими изменениями.

7.2.3 Все результаты должны быть проанализированы с использованием статистических моделей, соответствующих схеме проведения эксперимента [108]. Выбор параметрического или непараметрического метода анализа должен быть обоснован с учетом таких факторов, как характер данных (преобразованные или непреобразованные) и их распределение, следует также учитывать относительную устойчивость выбранного статистического анализа. При выборе метода статистического анализа и схемы исследования необходимо руководствоваться тем, чтобы свести к минимуму ошибки типа I (ложноположительный результат) и типа II (ложноотрицательный результат) [96], [97], [104], [105]. При проведении исследований с использованием многоплодных видов животных, в рамках которых исследованию подвергают большое количество детенышей из помета, необходимо включать помет в статистическую модель для предотвращения повышения вероятности ошибок при оценке типа I [98]—[101]. При этом статистической единицей измерения должен быть помет, а не детеныш. Эксперименты должны быть разработаны таким образом, чтобы испытание детенышей одного помета не рассматривалось как независимое испытание. Любая конечная точка, неоднократно измеренная в одном и том же эксперименте, должна быть проанализирована с использованием статистических моделей, учитывающих независимость этих измерений.

7.3 Отчет об исследовании

Отчет должен содержать следующую информацию.

Исследуемое вещество:

- физические свойства и, при необходимости, физико-химические свойства;
- идентификационные данные, в том числе источник;
- чистоту препарата, а также известные и/или предполагаемые примеси.

Носитель (растворитель), при необходимости:

- обоснование выбора растворителя, если это не вода или физиологический солевой раствор.

Подопытные животные:

- используемый вид и линию; обоснование применения другого вида животных, если это не крыса;
- поставщика подопытных животных;
- число, возраст в начале эксперимента, пол животных;
- источник, условия содержания, питание, воду и т. д.;
- индивидуальную массу животных в начале эксперимента.

Условия испытаний:

- обоснование выбора уровня дозы;
- обоснование способа введения и продолжительность исследования;
- условия введения доз вещества, включая подробную информацию о носителе (растворителе), объем и физическую форму вводимого вещества;
- подробную рецептуру исследуемого вещества/способ подготовки для введения в пищу, расчетную концентрацию, стабильность и гомогенность препарата;
- метод, используемый для уникальной идентификации самок и потомства;
- подробное описание процедур(ы) рандомизации самок по подопытным группам, выбраковки детенышей и распределения детенышей по подопытным группам;
- подробности введения исследуемого вещества;
- пересчет концентрации исследуемого вещества (ppm) в пище/питьевой воде или при ингаляционном воздействии в фактическую дозу (мг/кг массы тела в сутки), при необходимости;
- условия окружающей среды;
- подробную информацию о качестве пищи и воды (например, воду из крана, дистиллированную);
- даты начала и окончания исследования.

Наблюдения и процедуры исследования:

- подробное описание процедур для стандартных наблюдений и процедур, а также для рабочих определений и оценки результатов наблюдений;
- перечень всех методов исследования и обоснование их использования;
- подробную информацию о применяемых поведенческих/функциональных, патологических, нейрохимических и электрофизиологических процедурах, в том числе информацию об автоматизированных устройствах;

- процедуры калибровки и обеспечения эквивалентности аппаратуры и равномерного распределения подопытных групп в процедуре исследования;

- краткое обоснование любых выводов, связанных с профессиональной оценкой.

Результаты (индивидуальные и обобщенные, включая средние значения и дисперсии, при необходимости):

- число животных в начале и в конце исследования;

- число животных и пометов, используемых для каждого метода испытаний;

- идентификационный номер каждого животного и помета, из которого отобрано животное;

- число детенышей в помете, средний вес при рождении в зависимости от пола детенышей;

- массу тела и данные по изменению массы тела, включая массу тела самок и потомства на стадии завершения исследования;

- данные о потреблении пищи и данные о потреблении воды, при необходимости (например, если химические вещества вводят с питьевой водой);

- данные по токсической реакции в зависимости от пола животного и уровня дозы, включая признаки токсичности или смертности, включая время и причину смерти, при необходимости;

- характер, степень тяжести, продолжительность, день начала, время суток и дальнейший ход подробных клинических наблюдений;

- критерии оценки по каждому показателю развития (массу тела, половое созревание и поведенческий онтогенез) на каждом этапе наблюдения;

- подробное описание результатов всех поведенческих, функциональных, невропатологических, нейрохимических, электрофизиологических исследований в зависимости от пола животного, в том числе отклонения в сторону уменьшения или увеличения от контрольных параметров;

- результаты вскрытия;

- массу мозга;

- любые диагнозы, установленные по неврологическим симптомам и поражениям, в том числе заболевания или состояния, наступившие естественным путем;

- изображения примеров выявленных патологий;

- изображения с малым увеличением для оценки гомологии участков, используемых для морфометрии;

- данные по адсорбции и метаболизму, включая дополнительные результаты отдельного токсико-кинетического исследования, если имеются;

- статистическую обработку результатов, включая статистические модели, используемые для анализа данных, и результаты, независимо от того, являются ли они статистически значимыми или нет;

- список исследовательского персонала, включая профессиональную подготовку.

Обсуждение результатов:

- информацию о зависимости «доза — ответ» от пола и группы;

- взаимосвязь любых других токсических эффектов с выводом о наличии нейротоксического потенциала исследуемого химического вещества в зависимости от пола и группы;

- влияние любой токсико-кинетической информации на выводы;

- сходства эффектов с любыми известными нейротоксикантами;

- данные, подтверждающие надежность и чувствительность выбранного метода испытания (т. е. положительные и исторические контрольные данные);

- взаимосвязь, если обнаружена, между нейропатологическими и функциональными эффектами;

- максимальную дозу, не вызывающую обнаруживаемого вредного воздействия на здоровье (NOAEL) или ориентировочную дозу для спариваемых самок и потомства в зависимости от пола и группы.

Выводы:

- обсуждение интерпретации всех данных на основе полученных результатов, в том числе заключение о том, вызывает ли химическое вещество нейротоксичность в процессе онтогенеза и максимальную дозу, не вызывающую обнаруживаемого вредного воздействия на здоровье (NOAEL).

Приложение А
(справочное)

Примеры схем исследования

А.1 Общая схема проведения функциональных/поведенческих испытаний, оценки нейропатологии и массы мозга приведена на рисунке А.1. Схема распределения животных изложена в разделе 5.2 настоящего стандарта (PND — послеродовой день).

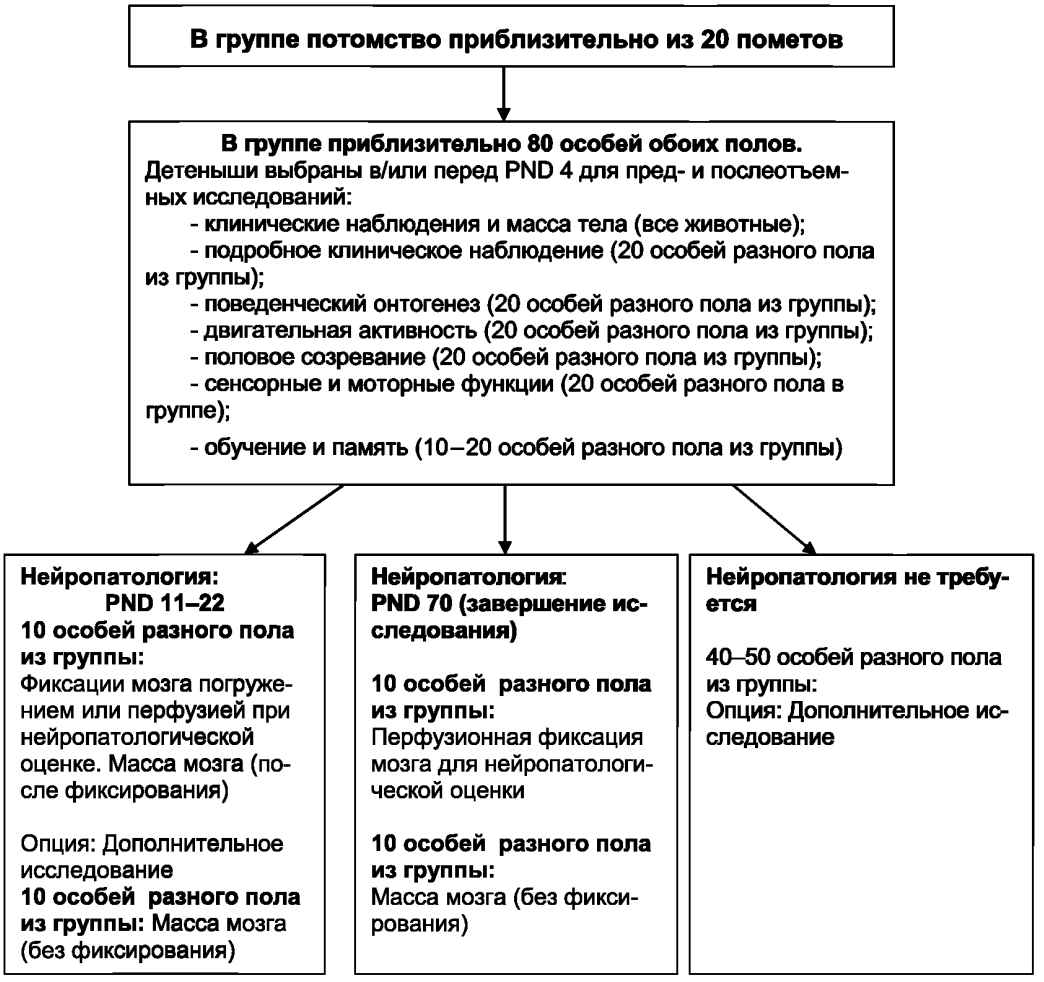

Рисунок А.1 — Общая схема исследования функционально-поведенческих, нейропатологических показателей и массы мозга

А.2 Ниже приведены примеры возможных способов распределения животных и сведения данных в таблицу. Примеры приведены для иллюстрации того, что распределение подопытных животных в соответствии с разными моделями испытаний может быть выполнено несколькими способами.

А.3 Пример 1 (см. таблицу А.3.1)

А.3.1 Одну группу из 20 детенышей разного пола/уровня дозы (т. е. одного самца и одну самку из помета) используют для испытания предотъемного поведенческого онтогенеза. Из этих животных 10 детенышей разного пола/уровня дозы (т. е. одного самца или одну самку из помета) гуманно умерщвляют в PND 22. Мозг извлекают, взвешивают и обрабатывают для патологогистологической оценки. Дополнительно собирают данные по массе мозга, используя нефиксированный мозг оставшихся 10 самцов и 10 самок из каждого уровня дозы.

А.3.2 Другую группу из 20 детенышей разного пола/уровня дозы (т. е. одного самца и одну самку из помета) используют для функциональных/поведенческих исследований после отъема (подробные клинические наблюде-

ния, двигательная активность, слуховой испуг и когнитивные функции у молодых животных) и оценки возраста полового созревания. Из этой группы 10 животных разного пола/уровня дозы (т. е. одного самца или одну самку из помета) вводят в наркоз и фиксируют методом перфузии на завершающей стадии исследования (примерно на PND 70). После дополнительной фиксации *in situ* извлекают мозг и подготавливают его для дальнейшей нейропатологической оценки.

А.3.3 Для исследования когнитивных функций у особей на молодой взрослой стадии (например, на PND 60—70) используют третью группу из 20 детенышей разного пола/уровня дозы (например, одного самца и одну самку из помета). Из этой группы животных 10 детенышей разного пола/группы (одного самца или одну самку из помета) на завершающей стадии исследования умерщвляют, мозг извлекают и взвешивают.

А.3.4 Оставшихся 20 животных разного пола/группы резервируют для возможных дополнительных испытаний.

Таблица А.3.1

Номер детеныша[a]		Число детенышей для испытания	Обследование/испытание
m	f		
1	5	20 m + 20 f 10 m + 10 f 10 m + 10 f	Поведенческий онтогенез PND 22 масса мозга/нейропатология/морфометрия PND 22 масса мозга
2	6	20 m + 20 f 20 m + 20 f 20 m + 20 f 20 m + 20 f 20 m + 20 f 10 m + 10 f	Подробные клинические наблюдения Двигательная активность Половое созревание Моторные и сенсорные функции Обучение и память (PND 25) Масса мозга/нейропатология/морфометрия молодых взрослых животных ~ PND 70
3	7	20 m + 20 f 10 m + 10 f	Обучение и память (молодых взрослых животных) Масса мозга молодых взрослых животных ~ PND 70
4	8	—	Зарезервированные животные для замены или дополнительных исследований
[a] В этом примере из пометов отбирают по 4 самца (m) и 4 самки (f), детенышам-самцам присваивают номера с 1 по 4, детенышам-самкам — с 5 по 8.			

А.4 Пример 2 (см. таблицу А.4.1)

А.4.1 Одну группу из 20 детенышей разного пола/уровня дозы (т. е. одного самца и одну самку из помета) используют для испытания предотъемного поведенческого онтогенеза. Из этих животных 10 детенышей разного пола/уровня дозы (т. е. одного самца или одну самку из помета) гуманно умерщвляют в PND 11. Мозг извлекают, взвешивают и обрабатывают для патологогистологической оценки.

А.4.2 Другую группу из 20 детенышей разного пола/уровня дозы (одного самца и одну самку из помета) используют для постотъемных исследований (подробные клинические наблюдения, двигательная активность, оценка возраста полового созревания, моторные и сенсорные функции). Из животных этой группы 10 животных разного пола/уровня дозы (т. е. одного самца или одну самку из помета) вводят в наркоз и фиксируют методом перфузии на завершающей стадии исследования (примерно PND 70). После дополнительной фиксации *in situ* мозг извлекают, взвешивают и обрабатывают для нейропатологической оценки.

А.4.3 Для исследования когнитивных функций у подростков и особей на молодой взрослой стадии отбирают 10 детенышей разного пола/уровня дозы (например, одного самца или одну самку из помета). Для исследования когнитивной функции в PND 23 и на молодой взрослой стадии используют разных животных. По завершении исследования 10 молодых взрослых особей разного пола/подопытной группы умерщвляют, извлекают мозг и взвешивают.

А.4.4 Оставшихся 20 животных разного пола/группы, не отобранных для исследования, при отъеме умерщвляют и утилизируют.

Таблица А.4.1

Номер детеныша[a]		Число детенышей для испытания	Обследование/испытание
m	f		
1	5	20 m + 20 f 10 m + 10 f	Поведенческий онтогенез PND 11 масса мозга/невропатология/морфометрия

Окончание таблицы А.4.1

Номер детеныша[a]		Число детенышей для испытания	Обследование/испытание
m	f		
2	6	20 m + 20 f 20 m + 20 f 20 m + 20 f 20 m + 20 f 10 m + 10 f	Подробные клинические наблюдения Двигательная активность Половое созревание Моторные и сенсорные функции Масса мозга/нейропатология/морфометрия молодых взрослых животных ~ PND 70
3	7	10 m + 10 f[b]	Обучение и память (PND 23)
3	7	10 m + 10 f[b]	Обучение и память (на молодой взрослой стадии) Масса мозга у молодых взрослых особей
4	8	—	Животных умерщвляют, тушки утилизируют в PND 21

[a] В этом примере из пометов отбирают по 4 самца (m) и 4 самки (f), детенышам-самцам присваивают номера с 1 по 4, детенышам-самкам — с 5 по 8.

[b] Для когнитивных тестов в PND 23 и на молодой взрослой стадии используют разных детенышей (например, четные или нечетные пометы из общего числа 20).

А.5 Пример 3 (см. таблицу А.5.1)

А.5.1 Одну группу из 20 детенышей разного пола/уровня дозы (т. е. одного самца и одной самки из помета) исследуют для оценки массы мозга и невропатологии в PND 11. Из этих животных 10 детенышей разного пола/уровня дозы (одного самца или одну самку из помета) гуманно умерщвляют в PND 11, извлекают мозг, взвешивают и обрабатывают для патологогистологической оценки. Дополнительно собирают данные по массе мозга, используя нефиксированный мозг оставшихся 10 самцов и 10 самок из каждого уровня дозы.

А.5.2 Другую группу из 20 детенышей разного пола/уровня дозы (одного самца и одну самку из помета) используют для оценки поведенческого онтогенеза (двигательной активности) в период после отъема (двигательной активности и возраста полового созревания) и испытания когнитивной функции молодого животного.

А.5.3 Другую группу из 20 детенышей разного пола/уровня дозы (одного самца и одну самку из помета) используют для испытания моторной и сенсорной функций (слуховой испуг) и проведения подробных наблюдений. Из животных этой группы 10 животных разного пола/уровня дозы (т. е. одного самца и одну самку из помета) анестезируют и фиксируют методом перфузии на стадии завершения исследования (примерно в PND 70). После дополнительной фиксации *in situ* мозг извлекают, взвешивают и обрабатывают для нейропатологической оценки.

А.5.4 Для исследования когнитивных функций на молодой взрослой стадии отбирают еще 20 детенышей разного пола/уровня дозы (например, одного самца и одну самку из помета). Из них 10 животных разного пола/уровня дозы (например, одного самца или одну самку из помета) умерщвляют по завершении исследования, мозг извлекают и взвешивают.

Таблица А.5.1

Номер детеныша[a]		Число детенышей для испытания	Обследование/испытание
m	f		
1	5	10 m + 10 f 10 m + 10 f	PND 11 масса мозга/нейропатология/морфометрия PND 11 масса мозга
2	6	20 m + 20 f 20 m + 20 f 20 m + 20 f 20 m + 20 f	Поведенческий онтогенез (двигательная активность) Двигательная активность Половое созревание Обучение и память (PND 27)
3	7	20 m + 20 f 20 m + 20 f 10 m + 10 f	Слуховой испуг (половое созревание и молодые взрослые животные) Подробные клинические наблюдения Молодые взрослые животные — масса мозга/нейропатология/морфометрия ~ PND 70
4	8	20 m + 20 f 10 m + 10 f	Обучение и память (молодые взрослые животные) Масса мозга молодых взрослых животных

[a] В этом примере из пометов отбирают по 4 самца (m) и 4 самки (f), детенышам-самцам присваивают номера с 1 по 4, детенышам-самкам — с 5 по 8.

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 № 426:2007
Введение (1.)	Введение 1.
1 Область применения (—)	—
2 Общие положения (2.—4.) 2.1 2.2 2.3	Общие положения 2. 3. 4.
3 Правила исследований (5., 6.) 3.1 3.2	Правила исследований 5 6.
4 Подготовка к исследованию (7.—10.) 4.1 Выбор видов животных	Подготовка к исследованию Выбор видов животных 7.
4.2 Условия содержания и кормления 4.2.1 4.2.2	Условия содержания и кормления 8. 9.
4.3 Подготовка животных	Подготовка животных 10.
5 Процедура испытаний (11.—21.) 5.1 Число и пол животных 5.1.1 5.1.2	Процедура Число и пол животных 11. 12.
5.2 Распределение животных для функциональных и поведенческих испытаний, определения массы мозга и нейропатологических оценок 5.2.1 5.2.2 5.2.3	Распределение животных для функциональных и поведенческих испытаний, определения массы мозга и нейропатологических оценок 13. 14. 15.
5.3 Режим введения доз 5.3.1 5.3.2 5.3.3	Дозирование 16. 17. 18
5.4 Введение доз 5.4.1 5.4.2 5.4.3	Введение доз 19. 20. 21.

Продолжение таблицы ДА.1

Структура настоящего стандарта	Структура международного документа OECD Test № 426:2007
6 Результаты наблюдений (22.—45.) 6.1 Наблюдения за самками 6.1.1 6.1.2 6.1.3 6.1.4 6.1.5 6.1.6	Наблюдения Наблюдения за самками 22. 23. 24. 25. 26. 27.
6.2 Наблюдения за потомством 6.2.1 6.2.2 6.2.3	Наблюдения за потомством 28. 29. 30.
6.3 Показатели физического развития 6.3.1 6.3.2 6.3.3	Показатели физического развития 31. 32. 33.
6.4 Поведенческий онтогенез	Поведенческий онтогенез 34.
6.5 Двигательная активность	Двигательная активность 35.
6.6 Моторные и сенсорные функции	Моторные и сенсорные функции 36.
6.7 Испытания на обучение и память	Испытания на обучение и память 37.
6.8 Патологоанатомическое исследование 6.8.1 6.8.2	Патологоанатомическое исследование 38. 39.
6.9 Подготовка образцов тканей	Подготовка образцов тканей 40.
6.10 Нейропатологические исследования 6.10.1 6.10.2 6.10.3	Нейропатологические исследования 41. 42. 43.
6.10.4	44.
6.11 Анализ зависимости «доза — ответ» при нейропатологических изменениях	Анализ зависимости «доза — ответ» при нейропатологических изменениях 45.
7 Данные и отчетность (46.—50.) 7.1 Данные	Данные и отчетность Данные 46.
7.2 Оценка и интерпретация результатов 7.2.1 7.2.2 7.2.3	Оценка и интерпретация результатов 47. 48. 49.

Окончание таблицы ДА.1

Структура настоящего стандарта	Структура международного документа OECD Test № 426:2007
7.3 Отчет об исследовании	Отчет об исследовании 50.
*	Библиография
Приложение А Примеры схем исследования	Приложение 1
Приложение ДА Сопоставление структуры настоящего стандарта со структурой примененного в нем международного документа	—
Библиография	—

* Библиография размещена после всех приложений.

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

Библиография

[1] OECD (1995) Draft Report of the OECD Ad Hoc Working Group on Reproduction and Developmental Toxicity. Copenhagen, Denmark, 13—14 June 1995

[2] US EPA (1998) U.S. Environmental Protection Agency Health Effects Test Guidelines. OPPTS 870.6300. Developmental Neurotoxicity Study. US EPA 712-C-98-239. Available: [gost.e-ecolog.ru OPPTS_Harmonized/870_Health_Effects_Test_Guidelines/Series/]

[3] US EPA (1998) Guidelines for Neurotoxicity Risk Assessment. US EPA 630/R-95/001F. Available: [gost.e-ecolog.ru gov/ncea/cfm/recordisplay.cfm?PrintVersion=True&deid=12479]

[4] Cory-Slechta, D.A., Crofton, K.M., Foran, J.A., Ross, J.F., Sheets, L.P., Weiss, B., Mileson, B. (2001) Methods to identify and characterize developmental neurotoxicity for human health risk assessment: I. Behavioral effects. Environ. Health Perspect., 109:79—91

[5] Dorman, D.C., Allen, S.L., Byczkowski, J.Z., Claudio, L., Fisher, J.E. Jr., Fisher, J.W., Harry, G.J., Li, A.A., Makris, S.L., Padilla, S., Sultatos, L.G., Mileson, B.E. (2001) Methods to identify and characterize developmental neurotoxicity for human health risk assessment: III. Pharmacokinetic and pharmacodynamic considerations. Environ. Health Perspect., 109:101—111

[6] Garman, R.H., Fix,A.S., Jortner, B.S., Jensen, K.F., Hardisty, J.F., Claudio, L., Ferenc, S. (2001) Methods to identify and characterize developmental neurotoxicity for human health risk assessment: II. Neuropathology. Environ. Health Perspect., 109:93—100

[7] OECD (2003) Report of the OECD Expert Consultation Meeting on Developmental Neurotoxicity Testing. Washington D.C., US, 23—25 October 2000

[8] OECD (draft) OECD Environment, Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 43. Draft Guidance Document on Mammalian Reproductive Toxicity Testing and Assessment. Environment Directorate, OECD, Paris. Available [gost.e-ecolog.ru].

[9] OECD (2003) OECD Environment, Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 20. Guidance Document for Neurotoxicity Testing. Environment Directorate, OECD, Paris, September 2003. Available: [http:// gost.e-ecolog.ru]

[10] Kimmel, C.A., Rees, D.C., Francis, E.Z. (1990) Qualitative and quantitative comparability of human and animal developmental neurotoxicity. Neurotoxicol. Teratol., 12: 173—292

[11] Spencer, P.S., Schaumburg, H.H., Ludolph, A.C. (2000) Experimental and Clinical Neurotoxicology, 2nd Edition, ISBN 0195084772, Oxford University Press, New York

[12] Mendola, P., Selevan, S.G., Gutter, S., Rice, D. (2002) Environmental factors associated with a spectrum of neurodevelopmental deficits. Ment. Retard. Dev. Disabil. Res. Rev. 8:188—197

[13] Slikker, W.B., Chang, L.W. (1998) Handbook of Developmental Neurotoxicology, 1st Edition, ISBN 0126488606, Academic Press, New York

[14] OECD (1983) Test Guideline 415. OECD Guideline for Testing of Chemicals. One-generation reproduction toxicity study. Available: [gost.e-ecolog.ru

[15] OECD (2001) Test Guideline 416. OECD Guideline for Testing of Chemicals. Two-generation reproduction toxicity study. Available: [gost.e-ecolog.ru]

[16] OECD (1997) Test Guideline 424. OECD Guideline for Testing of Chemicals. Neurotoxicity Study in Rodents**. Available: [gost.e-ecolog.ru]

[17] OECD (2001) Test Guideline 414. OECD Guideline for Testing of Chemicals. Prenatal developmental toxicity study. Available: [gost.e-ecolog.ru

[18] ILAR (1996) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, Institute of Laboratory Animal Research, Commission on Life Sciences, National Research Council, ISBN 0309053773, National Academies Press, Washington DC

[19] WHO (1986) Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals, (Environmental Health Criteria 60), Albany, New York: World Health Organization Publications Center, USA. Available: [gost.e-ecolog.ru]

---

* Действует ГОСТ 32378—2013 «Методы испытания по воздействию химической продукции на организм человека. Испытания по оценке репродуктивной токсичности одного поколения».

** Действует ГОСТ 32645—2014 «Методы испытания по воздействию химической продукции на организм человека. Испытание нейротоксичности на грызунах».

*** Действует ГОСТ 32380—2013 «Методы испытания по воздействию химической продукции на организм человека. Испытания по оценке токсического воздействия на пренатальное развитие.

[20] WHO (2001) Neurotoxicity Risk Assessment for Human Health: Principles and Approaches, (Environmental Health Criteria 223), World Health Organization Publications, Geneva. Available: [gost.e-ecolog.ru supplem/supp/ehc223.htm]

[21] Chang, L.W., Slikker, W. (1995) Neurotoxicology: Approaches and Methods, 1st Edition, ISBN 012168055X, Academic Press, New York

[22] De Cabo, C., Viveros, M.P. (1997) Effects of neonatal naltrexone on neurological and somatic development in rats of both genders. Neurotoxicol. Teratol., 19:499—509

[23] Agnish, N.D., Keller, K.A. (1997) The rationale for culling of rodent litters. Fundam. Appl. Toxicol., 38:2—6

[24] Avery, D.L., Spyker, J.M. (1977) Foot tattoo of neonatal mice. Lab. Animal Sci., 27:110—112

[25] Wier, P.J., Guerriero, F.J., Walker, R.F. (1989) Implementation of a primary screen for developmental neurotoxicity. Fundam. Appl. Toxicol., 13:118—136

[26] Spear, N.E., Campbell, B.A. (1979) Ontogeny of Learning and Memory. ISBN 0470268492, Erlbaum Associates, New Jersey

[27] Krasnegor, N.A., Blass, E.M., Hofer, M.A., Smotherman, W. (1987) Perinatal Development: A Psychobiological Perspective. Academic Press, Orlando

[28] Zoetis, T., Walls, I. (2003) Principles and Practices for Direct Dosing of Pre-Weaning Mammals in Toxicity Testing and Research. ILSI Press, Washington, DC

[29] Moser, V., Walls, I., Zoetis, T. (2005) Direct dosing of preweaning rodents in toxicity testing and research: Deliberations of an ILSI RSI expert working group. Int. J. Toxicol., 24:87—94

[30] Conolly, R.B., Beck, B.D., Goodman, J.I. (1999) Stimulating research to improve the scientific basis of risk assessment. Toxicol. Sci., 49: 1—4

[31] ICH (1993) ICH Harmonised Tripartite Guideline: Detection of Toxicity to Reproduction for Medical Products (S5A). International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Phamaceuticals for Human Use. Available: [gost.e-ecolog.ru]

[32] Lochry, E.A. (1987) Concurrent use of behavioral/functional testing in existing reproductive and developmental toxicity screens: Practical considerations. J. Am. Coll. Toxicol., 6:433—439

[33] Tachibana, T., Narita, H., Ogawa, T., Tanimura, T. (1998) Using postnatal age to determine test dates leads to misinterpretation when treatments alter gestation length, results from a collaborative behavioral teratology study in Japan. Neurotoxicol. Teratol., 20:449—457

[34] Gallavan, R.H. Jr., Holson, J.F., Stump, D.G., Knapp, J.F., Reynolds, V.L. (1999) Interpreting the toxicologic significance of alterations in anogenital distance: potential for confounding effects of progeny body weights. Reprod. Toxicol., 13:383—390

[35] Gray, L.E. Jr., Ostby, J., Furr, J., Price, M., Veeramachaneni, D.N., Parks, L. (2000) Perinatal exposure to the phthalates DEHP, BBP, and DINP, but not DEP, DMP, or DOTP, alters sexual differentiation of the male rat. Toxicol. Sci., 58:350—365

[36] Adams, J., Buelke-Sam, J., Kimmel, C.A., Nelson, C.J., Reiter, L.W., Sobotka, T.J., Tilson, H.A., Nelson, B.K. (1985) Collaborative behavioral teratology study: Protocol design and testing procedure. Neurobehav. Toxicol. Teratol., 7:579—586

[37] Korenbrot, C.C., Huhtaniemi, I.T., Weiner, R.W. (1977) Preputial separation as an external sign of pubertal development in the male rat. Biol. Reprod., 17:298—303

[38] Spear, L.P. (1990) Neurobehavioral assessment during the early postnatal period. Neurotoxicol. Teratol., 12:489—95

[39] Altman, J., Sudarshan, K. (1975) Postnatal development of locomotion in the laboratory rat. Anim. Behav., 23:896—920

[40] Adams, J. (1986) Methods in Behavioral Teratology. In: Handbook of Behavioral Teratology. Riley, E.P., Vorhees, C.V. (eds.) Plenum Press, New York, pp. 67—100

[41] Reiter, L.W., MacPhail, R.C. (1979) Motor activity: A survey of methods with potential use in toxicity testing. Neurobehav. Toxicol., 1:53—66

[42] Robbins, T.W. (1977) A critique of the methods available for the measurement of spontaneous motor activity, Handbook of Psychopharmacology, Vol. 7, Iverson, L.L., Iverson, D.S., Snyder, S.H., (eds.) Plenum Press, New York, pp. 37—82

[43] Crofton, K.M., Peele, D.B., Stanton, M.E. (1993) Developmental neurotoxicity following neonatal exposure to 3,3'-iminodipropionitrile in the rat. Neurotoxicol. Teratol., 15:117—129

[44] Ruppert, P.H., Dean, K.F., Reiter, L.W. (1985) Development of locomotor activity of rat pups in figure-eight mazes. Dev. Psychobiol., 18:247—260

[45] Crofton, K.M., Howard, J.L., Moser, V.C., Gill, M.W., Reiter, L.W., Tilson, H.A., MacPhail, R.C. (1991) Interlaboratory comparison of motor activity experiments: Implications for neurotoxicological assessments. Neurotoxicol. Teratol., 13:599—609

[46] Ross, J. F., Handley, D. E., Fix, A. S., Lawhorn, G. T., Carr, G. J. (1997) Quantification of the hind-limb extensor thrust response in rats. Neurotoxicol. Teratol., 19:1997. 405—411

[47] Handley, D.E., Ross, J.F., Carr, G.J. (1998) A force plate system for measuring low-magnitude reaction forces in small laboratory animals. Physiol. Behav., 64:661—669

[48] Edwards, P.M., Parker, V.H. (1977) A simple, sensitive, and objective method for early assessment of acrylamide neuropathy in rats. Toxicol. Appl. Pharmacol., 40:589—591

[49] Davis, M. (1984) The mammalian startle response. In: Neural Mechanisms of Startle Behavior, Eaton, R.C. (ed), Plenum Press, New York, pp. 287—351

[50] Koch, M. (1999) The neurobiology of startle. Prog. Neurobiol., 59:107—128

[51] Crofton, K.M. (1992) Reflex modification and the assessment of sensory dysfunction. In Target Organ Toxicology Series: Neurotoxicology, Tilson, H., Mitchell, C. (eds). Raven Press, New York, pp. 181—211

[52] Crofton, K.M., Sheets, L.P. (1989) Evaluation of sensory system function using reflex modification of the startle response. J. Am. Coll. Toxicol., 8:199—211

[53] Crofton, K.M, Lassiter, T.L, Rebert, C.S. (1994) Solvent-induced ototoxicity in rats: An atypical selective mid-frequency hearing deficit. Hear. Res., 80:25—30

[54] Ison, J.R. (1984) Reflex modification as an objective test for sensory processing following toxicant exposure. Neurobehav. Toxicol. Teratol., 6:437—445

[55] Mattsson, J.L., Boyes, W.K., Ross, J.F. (1992) Incorporating evoked potentials into neurotoxicity test schemes. In: Target Organ Toxicology Series: Neurotoxicity, Tilson, H., Mitchell, C., (eds.), Raven Press, New York. pp. 125—145

[56] Peele, D.B., Allison, S.D., Crofton, K.M. (1990) Learning and memory deficits in rats following exposure to 3,3'-iminopropionitrile. Toxicol. Appl. Pharmacol., 105:321—332

[57] Bammer, G. (1982) Pharmacological investigations of neurotransmitter involvement in passive avoidance responding: A review and some new results. Neurosci. Behav. Rev., 6:247—296

[58] Bushnell, P.J. (1988) Effects of delay, intertrial interval, delay behavior and trimethyltin on spatial delayed response in rats. Neurotoxicol. Teratol., 10:237—244

[59] Green, R.J., Stanton, M.E. (1989) Differential ontogeny of working memory and reference memory in the rat. Behav. Neurosci., 103:98—105

[60] Kucharski, D., Spear, N.E. (1984) Conditioning of aversion to an odor paired with peripheral shock in the developing rat. Develop. Psychobiol., 17:465—479

[61] Morris, R. (1984) Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. J. Neurosci. Methods, 11:47—60

[62] Brandeis, R., Brandys, Y., Yehuda, S. (1989) The use of the Morris water maze in the study of memory and learning. Int. J. Neurosci., 48:29—69

[63] D'Hooge, R., De Deyn, P.P. (2001) Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory. Brain Res. Rev, 36:60—90

[64] Vorhees, C.V. (1987) Maze learning in rats: A comparison of performance in two water mazes in progeny prenatally exposed to different doses of phenytoin. Neurotoxicol. Teratol., 9:235—241

[65] Vorhees, C.V. (1997) Methods for detecting long-term CNS dysfunction after prenatal exposure to neurotoxins. Drug Chem. Toxicol., 20:387—399

[66] Akaike, M., Tanaka, K., Goto, M., Sakaguchi, T. (1988) Impaired Biel and Radial arm maze learning in rats with methyl-nitrosurea induced microcephaly. Neurotoxicol. Teratol., 10:327—332

[67] Cory-Slechta, D.A., Weiss, B., Cox, C. (1983) Delayed behavioral toxicity of lead with increasing exposure concentration. Toxicol. Appl. Pharmacol., 71:342—352

[68] Campbell, B.A., Haroutunian, V. (1981) Effects of age on long-term memory: Retention of fixed interval responding. J. Gerontol., 36:338—341

[69] Fix, A.S, Garman, R.H. (2000) Practical aspects of neuropathology: A technical guide for working with the nervous system. Toxicol. Pathol., 28: 122—131

[70] Prophet, E.B., Mills, B., Arrington, J.B., Sobin, L.H. (1994) Laboratory Methods in Histotechnology, American Registry of Pathology, Washington, DC, pp. 84—107

[71] Bancroft, J.D., Gamble, M. (2002) Theory and Practice of Histological Techniques, 5th edition, Churchill Livingstone, London

[72] Fix, A.S., Ross, J.F., Stitzel, S.R., Switzer, R.C. (1996) Integrated evaluation of central nervous system lesions: stains for neurons, astrocytes, and microglia reveal the spatial and temporal features of MK-801-induced neuronal necrosis in the rat cerebral cortex. Toxicol. Pathol., 24: 291—304

[73] Schmued, L.C., Hopkins, K.J. (2000) Fluoro-Jade B: A high affinity tracer for the localization of neuronal degeneration. Brain Res., 874:123—130

[74] Krinke, G.J., Classen, W., Vidotto, N., Suter, E., Wurmlin, C.H. (2001) Detecting necrotic neurons with fluoro-jade stain. Exp. Toxic. Pathol., 53:365—372

[75] De Olmos, I.S., Beltramino, C.A., and de Olmos de Lorenzo, S. (1994) Use of an amino-cupric-silver technique for the detection of early and semiacute neuronal degeneration caused by neurotoxicants, hypoxia and physical trauma. Neurotoxicol. Teratol., 16, 545—561

[76] De Groot, D.M.G., Bos-Kuijpers, M.H.M., Kaufmann, W.S.H., Lammers, J.H.C.M., O'Callaghan, J.P., Pakkenberg, B., Pelgrim, M.T.M., Waalkens-Berendsen, I.D.H., Waanders, M.M., Gundersen, H.J. (2005a) Regulatory developmental neurotoxicity testing: A model study focusing on conventional neuropathology endpoints and other perspectives. Environ. Toxicol. Pharmacol., 19:745—755

[77] De Groot, D.M.G., Hartgring, S., van de Horst, L., Moerkens, M., Otto, M., Bos-Kuijpers, M.H.M., Kaufmann, W.S.H., Lammers, J.H.C.M., O'Callaghan, J.P., Waalkens-Berendsen, I.D.H., Pakkenberg, B., Gundersen, H.J. (2005b) 2D and 3D assessment of neuropathology in rat brain after prenatal exposure to methylazoxymethanol, a model for developmental neurotoxicity. Reprod. Toxicol., 20:417—432

[78] Rodier, P.M., Gramann, W.J. (1979) Morphologic effects of interference with cell proliferation in the early fetal period. Neurobehav. Toxicol., 1:129—135

[79] Howard, C.V., Reed, M.G. (1998) Unbiased Stereology: Three-Dimensional Measurement in Microscopy, Springer-Verlag, New York

[80] Hyman, B.T., Gomez-Isla, T., Irizarry, M.C. (1998) Stereology: A practical primer for neuropathology. J. Neuropathol. Exp. Neurol., 57: 305—310

[81] Korbo, L., Andersen, B.B., Ladefoged, O., Møller, A. (1993) Total numbers of various cell types in rat cerebellar cortex estimated using an unbiased stereological method. Brain Res., 609: 262—268

[82] Schmitz, C. (1997) Towards more readily comprehensible procedures in disector stereology. J. Neurocytol., 26:707—710

[83] West, M.J. (1999) Stereological methods for estimating the total number of neurons and synapses: Issues of precision and bias. Trends Neurosci., 22:51—61

[84] Schmitz, C., Hof, P.R. (2005) Design-based stereology in neuroscience. Neuroscience, 130: 813—831

[85] Gavin, C.E., Kates, B., Gerken, L.A., Rodier, P.M. (1994) Patterns of growth deficiency in rats exposed in utero to undernutrition, ethanol, or the neuroteratogen methylazoxymethanol (MAM). Teratology, 49:113—121

[86] Ohno, M., Aotani, H., Shimada, M. (1995) Glial responses to hypoxic/ischemic encephalopathy in neonatal rat cerebrum. Develop. Brain Res., 84:294—298

[87] Jensen KF, Catalano SM. (1998) Brain morphogenesis and developmental neurotoxicology. In: Handbook of Developmental Neurotoxicology, Slikker, Jr. W., Chang, L.W. (eds) Academic Press, New York, pp. 3—41

[88] Ikonomidou, C., Bosch, F., Miksa, M., Bittigau, P., Vöckler, J., Dikranian, K., Tenkova, T.I., Stefovska, V., Turski, L., Olney, J.W. (1999) Blockade of NMDA receptors and apoptotic neurodegeneration in the developing brain. Science, 283:70—74

[89] Ikonomidou, C., Bittigau, P., Ishimaru, M.J., Wozniak, D.F., Koch, C., Genz, K., Price, M.T., Sefovska, V., Hörster, F., Tenkova, T., Dikranian, K., Olney, J.W. (2000) Ethanol-induced apoptotic degeneration and fetal alcohol syndrome. Science, 287:1056—1060

[90] Friede, R. L. (1989) Developmental Neuropathology. Second edition. Springer-Verlag, Berlin

[91] House, D.E., Berman, E., Seeley, J.C., Simmons, J.E. (1992) Comparison of open and blind histopathologic evaluation of hepatic lesions. Toxicol. Let., 63:127—133.

[92] Tilson, H.A., MacPhail, R.C., Crofton, K.M. (1996) Setting exposure standards: a decision process. Environ. Health Perspect., 104:401—405

[93] US EPA (2005) Guidelines for Carcinogen Risk Assessment. US EPA NCEA-F-0644A. Available: [gost.e-ecolog.ru gov/ncea/raf/recordisplay.cfm?deid=116283].

[94] US EPA (1996) Guidelines for Reproductive Toxicity Risk Assessment, Federal Register 61(212): 56274-56322. Available: [gost.e-ecolog.ru]

[95] Danish Environmental Protection Agency (1995) Neurotoxicology. Review of Definitions, Methodology, and Criteria. Miljøprojekt nr. 282. Ladefoged, O., Lam, H.R., Østergaard, G., Nielsen, E., Arlien-Søborg, P

[96] Muller, K.E., Barton, C.N., Benignus, V.A. (1984). Recommendations for appropriate statistical practice in toxicologic experiments. Neurotoxicology, 5:113—126

[97] Gad, S.C. (1989) Principles of screening in toxicology with special emphasis on applications to Neurotoxicology. J. Am. Coll. Toxicol., 8:21—27

[98] Abby, H., Howard, E. (1973) Statistical procedures in developmental studies on a species with multiple offspring. Dev. Psychobiol., 6:329—335

[99] Haseman, J.K., Hogan, M.D. (1975) Selection of the experimental unit in teratology studies. Teratology, 12:165—172

[100] Holson, R.R., Pearce, B. (1992) Principles and pitfalls in the analysis of prenatal treatment effects in multiparous species. Neurotoxicol. Teratol., 14: 221—228

[101] Nelson, C.J., Felton, R.P., Kimmel, C.A., Buelke-Sam, J., Adams, J. (1985) Collaborative Behavioral Teratology Study: Statistical approach. Neurobehav. Toxicol. Teratol., 7:587—90

[102] Crofton, K.M., Makris, S.L., Sette, W.F., Mendez, E., Raffaele, K.C. (2004) A qualitative retrospective analysis of positive control data in developmental neurotoxicity studies. Neurotoxicol. Teratol., 26:345—352

[103] Bolon, B., Garman, R., Jensen, K., Krinke, G., Stuart, B., and an ad hoc working group of the STP Scientific and Regulatory Policy Committee. (2006) A 'best practices' approach to neuropathological assessment in developmental neurotoxicity testing — for today. Toxicol. Pathol. 34:296—313

[104] Tamura, R.N., Buelke-Sam, J. (1992) The use of repeated measures analysis in developmental toxicology studies. Neurotoxicol. Teratol., 14(3):205—210

[105] Tukey, J.W., Ciminera, J.L., Heyse, J.F. (1985) Testing the statistical certainty of a response to increasing doses of a drug. Biometrics, 41:295—301

[106] Crofton, K.M., Foss, J.A., Haas, U., Jensen, K., Levin, E.D., and Parker, S.P. (2007) Undertaking positive control studies as part of developmental neurotoxicity testing. Neurotoxicology and Teratology (in press)

[107] Raffaele, K.C., Fisher, E., Hancock, S., Hazelden, K., and Sobrian, S.K. (2007) Determining normal variability in a developmental neurotoxicity test. Neurotoxicology and Teratology (in press)

[108] Holson, R.R., Freshwater, L., Maurissen, J.P.J., Moser, V.C., and Phang, W. (2007) Statistical issues and techniques appropriate for developmental neurotoxicity testing. Neurotoxicology and Teratology (in press)

[109] Tyl, R.W., Crofton, K.M., Moretto, A., Moser, V.C., Sheets, L.P., and Sobotka, T.J. (2007) Identification and interpretation of treatment-related effects in developmental neurotoxicity testing. Neurotoxicology and Teratology (in press)

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, исследование нейротоксичности в процессе онтогенеза

БЗ 7—2019/70

Редактор *Л.И. Нахимова*
Технический редактор *В.Н. Прусакова*
Корректор *О.В. Лазарева*
Компьютерная верстка *Л.А. Круговой*

Сдано в набор 16.08.2019. Подписано в печать 10.09.2019. Формат 60×84 1/8. Гарнитура Ариал.
Усл. печ. л. 3,72. Уч.-изд. л. 3,45.
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