МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СОВЕТ ПО СТАНДАРТИЗАЦИИ, МЕТРОЛОГИИ И СЕРТИФИКАЦИИ
(МГС)

INTERSTATE COUNCIL FOR STANDARDIZATION, METROLOGY AND CERTIFICATION
(ISC)

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ
СТАНДАРТ

**ГОСТ
34553—
2019**

МЕТОДЫ ИСПЫТАНИЯ ПО ВОЗДЕЙСТВИЮ ХИМИЧЕСКОЙ ПРОДУКЦИИ НА ОРГАНИЗМ ЧЕЛОВЕКА

Токсикокинетические испытания

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 «Российским научно-техническим центром 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 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. № 471-ст межгосударственный стандарт ГОСТ 34553—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 № 417:2010 «Руководство по испытанию химических веществ. Токсикокинетика» («Guidelines for the testing of chemicals. Toxicokinetics», MOD), путем:

- включения в текст стандарта дополнительного раздела, фраз, сокращения, выделенных курсивом;
- изменения структуры документа для приведения в соответствие с правилами, установленными ГОСТ 1.5 (подразделы 4.2 и 4.3).

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

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

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 Термины, определения, обозначения и сокращения 1
3 Основные положения 4
4 Описание методов 5
5 Дополнительные подходы 12
6 Данные и представление отчета 13
7 Альтернативные способы воздействия 15
Приложение ДА (справочное) Сопоставление структуры настоящего стандарта со структурой примененного в нем международного документа 17
Библиография 20

Введение

Исследования токсикокинетики (ТК) химического вещества проводят с целью получения достоверной информации о его абсорбции, распределении, биотрансформации (т. е. метаболизме) и выведении для установления зависимости наблюдаемой токсичности от концентрации или дозы исследуемого вещества и понимания механизма токсического действия. ТК помогает правильно понять данные токсикологических исследований путем систематического воздействия исследуемого вещества на животных и выявления веществ, переносимых током крови (исходное вещество/метаболиты). Основные параметры ТК, определенные в этих исследованиях, также содержат информацию о потенциале аккумуляции исследуемого вещества в тканях и/или органах и о возможной индукции биотрансформации в результате его воздействия.

Данные ТК способствуют оценке достоверности и актуальности данных о токсическом воздействии на животных при экстраполяции оценки опасности и/или риска на человека. Кроме того, токсикокинетические исследования предоставляют важную информацию для определения уровней дозы при исследовании токсичности (линейная или нелинейная кинетика), влияния способа введения, биодоступности (биоаккумулирования) и для вопросов, связанных с планом клинического исследования. Определенные типы данных ТК могут использоваться в разработке, физиологически основанной токсикокинетической (PBTK) модели исследований.

Существуют важные области использования данных метаболит/ТК, такие как предполагаемые потенциальные токсичности и способы воздействия, а также их зависимость от уровня дозы и пути поступления в организм. Кроме того, данные метаболизма могут предоставить полезную информацию для оценки токсикологической значимости воздействия экзогенно продуцируемых метаболитов исследуемого вещества.

Соответствующие токсикокинетические данные будут полезны для подтверждения дальнейшей приемлемости и применимости количественной зависимости активности от структуры методом аналогий или определением принадлежности к группе при оценке безопасности веществ. Кинетические данные также могут быть использованы при оценке токсикологической значимости других исследований (например, *in vivo*/*in vitro*).

Если не указан другой способ введения (см. раздел 7), используют пероральное введение исследуемого вещества.

МКС 75.080
11.020
11.120.01

Поправка к ГОСТ 34553—2019 Методы испытания по воздействию химической продукции на организм человека. Токсикокинетические испытания

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

Токсикокинетические испытания

Methods of testing the chemicals of human hazard. Toxicokinetic tests

Дата введения — 2020—06—01

1 Область применения

Настоящий стандарт устанавливает основные требования к проведению токсикокинетических (ТК) исследований для разных классов химических веществ (например, пестициды, биоциды, промышленные химические вещества) с многократным измерением и конечными точками с учетом особенностей исследуемого вещества.

Настоящий стандарт не предназначен для использования в особых обстоятельствах, например для беременных или кормящих животных и их детенышей, или для оценки остатков токсичного вещества в животных, подвергшихся воздействию и употребляемых в пищу.

Настоящий стандарт не предназначен для исследования наноматериалов [1].

2 Термины, определения, обозначения и сокращения

В настоящем стандарте применены следующие термины, определения, обозначения и сокращения с соответствующими определениями:

2.1 **абсорбция** (absorption): Процесс поглощения вещества тканью или проникновение вещества через нее.

Примечание — Абсорбция относится к основному веществу и всем его метаболитам. Не следует путать с биодоступностью (см. 2.8).

2.2 **накопление (биоаккумуляция)** [accumulation (bioaccumulation)]: Увеличение со временем количества вещества в тканях (обычно в жировых тканях, после повторного воздействия); если поступление вещества в организм превышает скорость его удаления, организм накапливает вещество и возможно достижение токсических концентраций вещества.

2.3 **ADME:** Аббревиатура, применяемая для абсорбции, распределения, метаболизма и выведения.

2.4 **AUC** (area under the plasma concentration-time curve): Площадь под кривой зависимости концентрации вещества в плазме от времени.

Примечание — AUC представляет собой общее количество вещества, поглощаемого телом в течение определенного периода времени. В линейных условиях AUC (от начала отсчета времени до бесконечности) пропорциональна общему количеству вещества, поглощенного телом, независимо от скорости поглощения.

2.5 **авторадиография (радиоавтография)** (whole-body autoradiography): Метод, используемый для определения качественной и/или количественной локализации радиоактивного вещества в ткани

Издание официальное

исследуемого объекта путем регистрации испускаемого излучения на рентгеновской пленке или в последнее время путем цифрового формирования изображения на люминесцентном фосфорном покрытии для визуализации радиоактивно меченных молекул или фрагментов молекул.

Примечание — Количественная радиоавтография всего тела, по сравнению с препарированием органов, может иметь некоторые преимущества для оценки распределения исследуемого вещества и оценки общего восстановления и распределения радиоактивного материала в тканях. Одно из существенных преимуществ, например, заключается в том, что метод может быть использован на модели пигментированного животного для оценки возможного взаимодействия испытуемого вещества с меланином, который может связывать определенные молекулы. Однако, хотя авторадиография позволяет составить удобный обзор для всего тела по локализации участков с высокой емкостью, но малой аффинностью, этот метод малопригоден для определения специфических участков, таких как рецептор связывающих участков, для обнаружения которых необходимы достаточно высокое разрешение и высокая чувствительность. При использовании радиоавтографии эксперимент с целью определения баланса масс вводимого вещества следует проводить для отдельной группы животных или как исследование, независимое от эксперимента по тканевой локализации, где все экскреты (включая и выдыхаемый воздух), а также тушки животных гомогенизируют и анализируют методом жидкостно-сцинтилляционного счета.

2.6 **выделение с желчью** (biliary excretion): Выделение через желчные протоки.

2.7 **биоаккумуляция** (bioaccumulation): Способность химических веществ накапливаться в биологических объектах*.

Примечание — Термин «накопление» приведен в 2.2.

2.8 **биодоступность** (bioavailability): Часть введенной дозы, которая попадает в систему циркуляции или становится доступной в месте проявляемой физиологической активности.

Примечание — Обычно термин «биодоступность» относится к исходному веществу, но может относиться и к его метаболиту. При этом речь идет только об одной химической форме. Биодоступность и абсорбция — это не одно и то же. Различие между, например, оральной абсорбцией (то есть наличием вещества в стенках кишечника и в портальной циркуляции) и биодоступностью (то есть наличием в системной цикуляции и в тканях) может являться результатом химической деградации вещества, метаболизируемого в стенке кишечника, или обратного транспорта вещества в просвет кишечника, или результатом предсистемного метаболизма в печени, наряду с другими факторами [2]. Биодоступность токсичного компонента (исходного вещества или метаболита) является важнейшим параметром при оценке степени риска для человека (экстраполяции от высокой дозы к низкой, экстраполяции при разных путях поступления) и для перехода от внешней (используемой) NOAEL или BMD дозы к внутренней. Для оценки воздействия на печень при оральном поступлении достаточно знать оральную абсорбцию. Однако для любого удаленного воздействия, проявляющегося не в точке поступления вещества, именно биодоступность, а не абсорбция является более надежным параметром для использования при оценке степени риска.

2.9 **биологическая устойчивость** (biopersistence): Устойчивость (см. 2.33).

2.10 **биотрансформация** (biotransformation): Химическое преобразование (обычно ферментативное) изучаемого вещества в другое химическое соединение в теле животного. Синоним — метаболизм (см. 2.27).

2.11 C_{max}: Максимальная (пиковая) концентрация вещества в крови (плазме/сыворотке) или в выделениях (моче или фекалиях), наблюдаемая после введения вещества.

2.12 **клиренс** (clearance rate): Количественный показатель скорости, с которой вещество удаляется (выводится) из крови, плазмы или определенной ткани в единицу времени.

2.13 **компартмент** (compartment): Структурная или биохимическая часть (или единица) тела, ткани или клетки, которая отделена от остального.

2.14 **пути детоксикации** (detoxification pathways): Последовательность мер, ведущих к удалению токсичных веществ из организма путем метаболических изменений или выделения.

2.15 **распределение** (distribution): Распространение вещества и его производных по всему организму.

2.16 **ферменты/изоферменты** (enzymes/isozymes): Белки, катализирующие химические реакции; изоферменты — это ферменты, которые ускоряют сходные химические реакции, но отличаются по своим аминокислотным последовательностям.

2.17 **ферментативные параметры** (enzymatic parameters): Константа Михаэлиса K_m и максимальная скорость V_{max}.

---

* Определение к данному термину установлено в Техническом регламенте Евразийского экономического союза ТР ЕАЭС 041/2017 «О безопасности химической продукции» (утвержденном решением Совета Евразийского экономического союза от 3 марта 2017 г.).

2.18 **экскреция** (excretion): Процесс(ы), с помощью которого(ых) вводимое вещество и/или его метаболиты удаляются из организма.

2.19 **экзогенно** (exogenously): Внесенный извне или воспроизведенный вне организма или системы.

2.20 **экстраполяция** (extrapolation): Выведение одного или более неизвестных значений на основании известных значений или наблюдавшихся параметров.

2.21 **период полувыведения** [half-life ($t_{1/2}$)]: Время, необходимое для снижения в два раза концентрации исследуемого вещества в компартменте.

Примечание — Обычно это относится к концентрации в плазме или количеству исследуемого вещества во всем теле.

2.22 **индукция/индукция фермента** (induction/enzyme induction): Синтез фермента в ответ на внешний стимул или воздействие вещества-индуктора.

2.23 **линейность/линейная кинетика** (linearity/linear kinetics): С точки зрения кинетики процесс является линейным, когда все скорости переноса вещества между компартментами пропорциональны количеству вещества или его концентрации, т. е. первого порядка.

Примечание — Соответственно, клиренс и распределение, а также время полувыведения являются постоянными. Достигаемые концентрации пропорциональны скорости поступления вещества (экспозиции), и накопление вещества достаточно легко предсказуемо. Линейность/нелинейность можно оценить, сравнив соответствующие параметры, например AUC после введения разных уровней доз или после однократного и многократного воздействия. Отсутствие зависимости от дозы может свидетельствовать о насыщении ферментов, участвующих в метаболизме соединения, увеличение AUC после многократного воздействия по сравнению с однократным воздействием может быть показателем ингибирования метаболизма, а уменьшение AUC может быть показателем индукции метаболизма (см. также [3]).

2.24 **массовый баланс** (mass balance): Учет количества исследуемого вещества, входящего и выводимого из системы.

2.25 **материальный баланс** (material balance): Массовый баланс (см. 2.24).

2.26 **механизм (форма проявления) токсичности/механизм (способ) действия** [mechanism (mode) of toxicity/mechanism (mode) of action]: Механизм действия относится к специфическим биохимическим взаимодействиям, посредством которых вещество оказывает свое токсическое действие.

Примечание — Способ действия отражает общие пути, приводящие к токсичности вещества.

2.27 **метаболизм** (metabolism): Синоним — биотрансформация (см. 2.10).

2.28 **метаболиты** (metabolites): Продукты метаболизма или метаболических процессов.

2.29 **наноматериалы** (nanomaterials): Материалы с типичным размером от 1 до 100 нм, имеющие линейную, плоскую или трехмерную структуру или содержащие внутренние или поверхностные структурные элементы, геометрические размеры которых хотя бы в одном измерении не превышают указанных размеров.

2.30 **оральная абсорбция** (oral absorption): Процент дозы исследуемого вещества, усвоенного в месте его введения (т. е. через желудочно-кишечный тракт).

Примечание — Этот критический параметр может использоваться для оценки доли вводимого исследуемого вещества, которая попадает в портальную вену и затем в печень.

2.31 **коэффициент разделения** (partition coefficient): Также известный как коэффициент распределения, являющийся мерой различия растворимости вещества в двух растворителях.

2.32 **пиковая концентрация в (плазме/сыворотке) крови** [peak blood (plasma/serum) levels]: Максимальная (пиковая) концентрация вещества в (плазме/сыворотке) крови, наблюдаемая после введения вещества [см. также C_{max} (2.11)];

2.33 **устойчивость** (биологическая устойчивость) [persistence (biopersistence)]: Длительное присутствие вещества (в биологической системе) в связи с устойчивостью к деградации/выведению.

2.34 **метод аналогий** (read-across): Использование информации о конечной точке для одного или нескольких химических веществ с целью прогнозирования конечной точки для целевого химического вещества.

2.35 **микрорадиоавтография рецепторов** (или рецепторная микроавторадиография) [receptor microscopic autoradiography (or receptor microautoradiography]: Метод для исследования взаимодействия ксенобиотика с определенными участками ткани или клеточной популяции, например, в экспе-

риментах по связыванию с рецепторами или исследованиях по выявлению механизма действия, когда требуется одновременно и высокая чувствительность, и высокая разрешающая способность, которую другие методы, такие как авторадиография всего тела животного, не могут обеспечить.

2.36 **путь введения** (route of administration): Способ введения вещества в организм (пероральный, способ IV, кожный, ингаляционный и т. д.), например, через желудочный зонд, перорально с пищей, внутривенно, через кожные покровы, путем ингаляции, и т. д.

2.37 **насыщение** (saturation): Состояние, при котором один или несколько токсикокинетических процессов (например, абсорбция, метаболизм или клиренс) достигают своего максимума (насыщаются).

2.38 **чувствительность** (sensitivity): Возможность метода или прибора распознавать результаты измерений, отображающие разные уровни искомой переменной.

2.39 **установившийся уровень в крови (плазме)** [steady-state blood (plasma) levels]: Состояние открытой системы, в которой все силы, действующие на систему, точно уравновешены противоположно действующими силами таким образом, что концентрация всех компонентов остается постоянной, несмотря на прохождение вещества через систему.

2.40 **моделирование систем** (systems modeling): Абстрактная модель, использующая математический язык для описания поведения системы (например, физиологической токсикокинетической модели, основанной на фармакокинетике, фармакокинетика, основанная на физиологии, биологии и т. д.).

2.41 **ткань-мишень** (target tissue): Ткань, в которой проявляется основное неблагоприятное воздействие токсичного вещества.

2.42 **распределение в тканях** (tissue distribution): Обратимое перемещение вещества в организме из одного места в другое.

Примечание — Распределение в тканях может быть исследовано путем диссекции органов, гомогенизации, сжигания и подсчета жидкостно-сцинтилляционным методом или с помощью качественной и/или количественной авторадиографии всего тела животного. Первый метод применяют для определения концентрации вещества и процента извлечения из тканей и останков того же самого животного, но имеет недостаточное разрешение для всех тканей и недостаточное извлечение вещества (менее 90 %). См. 2.41.

2.43 T_{max}: Время достижения C_{max}.

2.44 **токсикокинетика (фармакокинетика)** [toxicokinetics (pharmacokinetics)]: Изучение поглощения, распределения, метаболизма и выделения веществ из организма с течением времени.

2.45 **валидация моделей** (validation of models): Процесс оценки способности модели согласованно описывать имеющиеся токсикокинетические данные.

Примечание — Модели могут быть оценены путем статистического и визуального сравнения предварительно оцененной модели с экспериментальными данными относительно общей независимой переменной (например, времени). Степень оценки должна быть обоснована в зависимости от предполагаемого использования модели.

3 Основные положения

3.1 Компетентные органы имеют разные требования к необходимости измерения конечных точек и параметров, связанных с токсикокинетикой для разных классов химических веществ (например, пестицидов, биоцидов, промышленных химических веществ). В отличие от большинства руководств по испытаниям (TG) в настоящем стандарте приведено токсикокинетическое испытание, которое включает в себя многократные измерения и конечные точки. В будущем может возникнуть необходимость разработки новых документов для более подробного описания каждой конечной точки. Проводимые по настоящему стандарту методы испытаний или их оценка определяются требованиями и/или потребностями каждого компетентного органа.

3.2 Существует ряд исследований, которые могут быть использованы для оценки ТК действия химического вещества. Однако в зависимости от конкретных требований для оценки химического вещества могут потребоваться не все исследования. При планировании токсикокинетических исследований необходимо учитывать характеристики исследуемого вещества. В некоторых случаях может потребоваться изучение только определенного набора вопросов для устранения опасностей и рисков, связанных с химическими веществами. В некоторых ситуациях ТК данные могут быть получены в рамках других токсикологических исследований. В некоторых случаях могут потребоваться дополнительные и/или

более подробные ТК исследования, в зависимости от требований регулирующих (законодательных) органов и/или при возникновении новых вопросов в рамках оценки химических веществ.

3.3 До проведения исследования должна быть изучена вся доступная информация о исследуемом веществе, его метаболитах и аналогах для повышения качества исследования и предотвращения избыточного использования животных. Информация может включать результаты других методов исследований [*in vivo*, *in vitro* и/или *in silico* (компьютерное моделирование)]. Для планирования исследований и интерпретации результатов могут быть полезны физико-химические свойства химического вещества, такие как коэффициент распределения октанол-вода (выражаемый log P_{OW}), pK_a, растворимость в воде, давление паров и молекулярная масса.

4 Описание методов

4.1 Предварительные исследования

Рекомендуется провести предварительные исследования для выбора экспериментальных параметров ТК исследований (например: метаболизм, массовый баланс, аналитические методы, подбор дозы, выдыхаемый CO_2 и т. д.). Оценка некоторых из этих параметров возможна без применения радиоактивно меченных веществ.

4.2 Выбор животных

4.2.1 Вид животных (и линий), используемых для ТК исследования, предпочтительно должен быть таким же, как и в других токсикологических исследованиях, проводимых с исследуемым веществом. Обычно используют крыс, поскольку они широко применяются в токсикологических исследованиях. Допускается использовать другие или дополнительные виды животных, если критические токсикологические исследования показали наличие значимой токсичности у этих видов или если их токсичность/токсикокинетика в большей степени применима к людям. Выбор видов животных и их линий должен быть обоснован.

4.2.2 В настоящем стандарте в качестве экспериментальных животных используют крыс, при использовании других видов животных следует привести подробное обоснование, поскольку может потребоваться изменение некоторых разделов настоящего стандарта.

4.3 Возраст и линия

Следует использовать молодых здоровых взрослых лабораторных животных (обычно 6—12 недель на момент начала эксперимента) (см. также 4.2). Необходимо обосновать использование животных большего возраста. На момент начала исследования все животные должны быть одного возраста, и различие массы отдельных животных не должно превышать ± 20 % от средней массы в группе. В идеале используемая линия животных должна быть такой же, как и при получении токсикологической базы данных для химического вещества.

4.4 Число и пол животных

Для исследования каждой дозы следует использовать не менее четырех животных одного пола. Необходимо обосновать выбор пола используемых животных. Следует предусматривать использование животных обоих полов (четырех самцов и четырех самок) при наличии доказательств о значительных различиях токсикологического воздействия, связанного с полом.

4.5 Условия содержания и кормления животных

Животные на время проведения эксперимента должны размещаться индивидуально. В особых случаях может быть оправдано групповое размещение. Освещение должно быть искусственным с чередованием: 12 ч света и 12 ч темноты. Температура в помещении, предназначенном для экспериментов на животных, должна составлять (22 ± 3) °С при относительной влажности от 30 % до 70 %. Для кормления можно использовать обычный лабораторный корм с неограниченным доступом к питьевой воде.

4.6 Исследуемое вещество

4.6.1 Для всех аспектов исследования баланса массы и метаболитов следует использовать исследуемое вещество, меченное радиоактивным изотопом ^{14}C; однако если подтверждено, что:

- баланс массы и идентификация метаболитов могут быть адекватно определены с использованием немеченого исследуемого вещества;

- аналитическая специфичность и чувствительность метода, используемого с нерадиоактивным испытуемым веществом, равна или больше той, которая может быть получена с помощью радиоактивно меченного исследуемого вещества, то нет необходимости использовать радиоактивно меченное соединение.

Могут быть использованы другие радиоактивные и стабильные изотопы, особенно если этот химический элемент является причиной или входит в состав токсичной части соединения. По возможности, радиоактивная метка должна располагаться в центральной части молекулы, которая является стабильной при метаболизме (она не подлежит обмену, не удаляется в виде CO_2 и не становится частью углеродного состава организма). Для отслеживания путей метаболизма соединения может потребоваться маркировка нескольких или конкретных участков молекулы.

4.6.2 Как радиоактивно меченные, так и немеченые исследуемые вещества должны быть проанализированы с использованием соответствующих методов для идентификации и определения чистоты. Радиоактивная чистота исследуемого вещества должна быть максимально достижимой для конкретного исследуемого вещества (в идеале это должно быть не менее 95 %), и следует приложить обоснованные усилия для определения примесей, присутствующих на уровне 2 % или более. Следует указывать чистоту исследуемого вещества, в том числе содержание любых идентифицированных примесей. Можно выбрать специальные зарегистрированные программы для получения дополнительных указаний и помощи в определении и характеристике исследуемых веществ, состоящих из смесей, и способов определения их чистоты.

4.7 Выбор дозы

4.7.1 Предварительное исследование

Обычно для предварительного исследования достаточно одной пероральной дозы. Доза должна быть нетоксичной, но достаточно высокой, чтобы можно было идентифицировать метаболит в экскретах (и при необходимости в плазме крови), а также для выполнения заявленной цели экспериментального исследования по 4.1.

4.7.2 Основные исследования

4.7.2.1 Для основных исследований предпочтительно использовать не менее двух уровней доз, поскольку информация, полученная в таком случае, может помочь в выборе дозы для других исследований токсичности и в оценке зависимости «доза — ответ» для уже проводившихся исследований токсичности.

4.7.2.2 При введении двух доз обе дозы должны быть достаточно высокими, чтобы можно было идентифицировать метаболит в экскретах (и при необходимости в плазме крови). При выборе дозы следует учитывать имеющиеся данные по токсичности. Если информация недоступна (например, при исследованиях острой оральной токсичности, при наличии записей клинических признаков токсического воздействия или при исследованиях токсичности повторных доз), могут быть рассмотрены значения для более высокой дозы, которая ниже значения LD50 (пероральное поступление или воздействие через кожу) или значения LC50 (ингаляционное воздействие), или ниже нижнего значения оценки острой токсичности. Более низкая доза должна быть в несколько раз меньше более высокой дозы.

4.7.2.3 Если исследуют только один уровень дозы, в идеальном случае доза должна быть достаточно высокой, чтобы можно было идентифицировать метаболит в экскретах (и при необходимости в плазме), при этом не вызывать выраженного токсического эффекта. Необходимо обосновать, почему не используется второй уровень дозы.

4.7.2.4 Если необходимо установить влияние дозы на кинетику процесса, то двух доз может оказаться недостаточно, и по крайней мере одна доза должна быть достаточно высокой, приводящей к насыщению. Если площадь под кривой зависимости концентрации в плазме от времени (AUC) не линейна в диапазоне между двумя дозами, используемыми в основном исследовании, это свидетельствует о том, что между двумя уровнями доз происходит насыщение одного или нескольких кинетических процессов.

4.7.2.5 Для исследуемых веществ с низкой токсичностью следует использовать максимальную дозу 1,000 мг/кг массы тела (перорально или через кожу) (если введение проводят путем ингаляции*, уровень дозы, как правило, не превышает 2 мг/дм^3). Аспекты определенных химических веществ могут потребовать введения более высокой дозы в зависимости от конкретной необходимости. Выбор дозы всегда должен быть обоснован.

4.7.2.6 Данные по токсикокинетике и распределению в тканях однократной дозы могут быть достаточными для определения потенциальной возможности аккумуляции и/или сохранения эффекта. Однако в некоторых случаях может потребоваться повторное введение дозы: 1) для более подробного рассмотрения потенциальной возможности накопления и/или сохранения эффекта или изменений ТК (то есть, например, индукцию и ингибирование ферментов) или 2) в соответствии с требованиями компетентного органа. В исследованиях, включающих повторное введение доз, обычно достаточным является повторное введение низкой дозы, в определенных обстоятельствах может потребоваться повторное введение высокой дозы (см. также 4.14.3.2).

4.8 Введение исследуемого вещества

4.8.1 Исследуемое вещество следует растворить или суспендировать до гомогенного состояния в том же носителе (растворителе), который использовался в других исследованиях токсичности исследуемого вещества при пероральном введении через желудочный зонд, если такая информация о носителе доступна. Необходимо представить обоснование выбора носителя. При разработке исследования следует учитывать выбор носителя и объем вводимой дозы. Обычный способ введения — через желудочный зонд; однако в определенных ситуациях может быть предпочтительно введение вещества в желатиновой капсуле или с кормом (в обоих случаях необходимо привести обоснование). Должна быть предусмотрена проверка фактической дозы, вводимой каждому животному.

4.8.2 Максимальный объем жидкости, который можно однократно вводить через зонд, зависит от размера испытуемых животных, типа носителя и ограничением или отсутствием ограничения в пище перед введением исследуемого вещества. Перед введением дозы вещества должно быть обосновано кормление или ограничение в пище. Обычно объем вводимого вещества, при использовании водного или неводного носителя, должен быть по возможности небольшим. Объем дозы для грызунов не должен превышать 10 см^3/кг массы тела. Объем носителя, используемого для липофильных исследуемых веществ, начинают с 4 см^3/кг массы тела. Для повторного введения дозы, когда ежедневное голодание будет противопоказано, нужно предусмотреть меньшие объемы дозы (например, 2—4 см^3/кг массы тела). При возможности следует использовать объем дозы, соответствующий объему, применявшемуся при оральном приеме исследуемого вещества в других исследованиях.

4.8.3 Для определения биодоступности или относительной пероральной абсорбции может быть использовано внутривенное (способ IV) введение исследуемого вещества и определение его содержания в крови и/или экскретах. При введении способом IV однократную дозу [обычно эквивалентна, но не должна превышать нижнюю пероральную дозу (см. 4.7)] исследуемого вещества вводят с использованием соответствующих носителей. Вещество вводят в определенном объеме (например, 1 см^3/кг массы тела) в заданное место не менее чем четырем животным соответствующего пола [при необходимости могут использоваться оба пола (см. 4.4)]. При внутривенном введении исследуемое вещество должно быть полностью растворено или суспендированно. Носитель (растворитель) при способе введения IV не должен нарушать целостность крови или мешать кровотоку. При проведении инфузии необходимо указать скорость введения дозы и поддерживать ее стандартной для всех животных при условии использования инфузионного насоса. Если для введения химического вещества и/или забора крови используют канюлю в яремной вене или бедренной артерии, следует применять анестезию. Следует уделять должное внимание виду анестезии, поскольку это может повлиять на токсикокинетику. Животным обеспечивают соответствующее восстановление перед введением исследуемого вещества.

4.8.4 Для определенных химических веществ с учетом их физико-химических свойств и предполагаемого способа применения или воздействия на человека могут применяться другие способы введения, такие как нанесение на кожу и ингаляция (см. раздел 7).

---

* Действует ГОСТ 32542—2013 «Методы испытания по воздействию химической продукции на организм человека. Основные требования к проведению испытаний по оценке острой токсичности при ингаляционном поступлении».

4.9 Измерения

4.9.1 Массовый баланс

Массовый баланс определяют суммированием процентных долей введенного (радиоактивного) вещества, выведенного с мочой, фекалиями и выдыхаемым воздухом, и процентных долей, присутствующих в тканях, останках тела и в смыве при мытье клетки (см. 4.13.3). Обычно суммарное обнаружение введенного исследуемого вещества (радиоактивности) более 90 % считают достаточным.

4.9.2 Абсорбция

4.9.2.1 Первоначальная оценка абсорбции может быть получена путем исключения из определенного массового баланса процента дозы в желудочно-кишечном тракте (GI) и/или фекалиях. Вычисление процента абсорбции приведено в 4.9.2.2. Исследование экскректов приведено в 4.13. Если после перорального дозирования при вычислении массового баланса не может быть установлена точная степень абсорбции (например, более 20 % введенной дозы присутствует в фекалиях), могут потребоваться дополнительные исследования. Эти исследования могут включать: 1) пероральное введение исследуемого вещества и измерение исследуемого вещества в желчи или 2) пероральное и внутривенное введение исследуемого вещества и измерение суммированием содержания исследуемого вещества, присутствующего в моче плюс в выдыхаемом воздухе, плюс в останках животного, по каждому из двух способов введения. В обоих исследованиях измерение радиоактивности проводится как замена метода специфического химического анализа исследуемого вещества и метаболитов.

4.9.2.2 При проведении исследования выделения с желчью обычно используют пероральный способ введения. При этом канюлируют желчные протоки не менее четырех животных соответствующего пола (или обоих полов, при необходимости) и вводят единственную дозу исследуемого вещества. После введения исследуемого вещества выведение радиоактивности/исследуемого вещества в желчь контролируют до тех пор, пока это необходимо для оценки процента от вводимой дозы, которая выводится этим путем. Полученные результаты могут быть использованы для непосредственного вычисления степени оральной абсорбции вещества по формуле

$$\text{Процент абсорбции} = (\text{количество в желчи} + \text{в моче} + \text{в выдыхаемом воздухе} + \text{в останках без содержимого желудочно-кишечного тракта})/\text{количество введенного вещества} \times 100 \quad (1)$$

4.9.2.3 Для некоторых классов исследуемых веществ может наблюдаться прямая секреция поглощенной дозы через мембраны кишечника. В таких случаях измерение процента дозы в фекалиях после перорального введения дозы крысе с канюлированным желчным протоком для определения неабсорбированной дозы является некорректным. Если предполагается, что происходит секреция дозы в кишечнике, тогда процент абсорбированной дозы рекомендуется определять на основе абсорбции, вычисленной как отношение выделения при пероральном введении вещества к выделению при способе введения IV (интактные крысы или крысы с канюлированным желчным протоком) (см. 4.10.1). Для определения секреции в кишечнике также рекомендуется измерять выделение вещества у крыс с канюлированным желчным протоком после введения вещества способом IV.

4.10 Биодоступность

4.10.1 Биодоступность может быть определена по кинетике вещества в плазме/крови у групп с введением вещества перорально и IV способом по 4.14.1, с помощью специального химического анализа исследуемого вещества и/или соответствующего(их) метаболита(ов), без использования радиоактивно меченного исследуемого вещества. Биодоступность F исследуемого вещества или соответствующего(их) метаболита(ов) вычисляют по формуле

$$F = (AUC_{exp}/AUC_{IV}) \cdot (Dose_{IV}/Dose_{exp}), \quad (2)$$

где AUC — площадь под кривой зависимости концентрации в плазме от времени;

exp — способ введения (пероральный, через кожу или ингаляцией);

IV — внутривенный способ введения.

4.10.2 Для определения степени риска системного воздействия предпочтительнее определять биодоступность токсического компонента, а не процент его абсорбции при сравнении исследований системных концентраций на животных с аналогичными данными биомониторинга рабочих экспозиций.

Ситуация может стать более сложной, если дозы находятся в нелинейном диапазоне, поэтому токсикокинетический скрининг следует проводить в линейном диапазоне.

4.11 Распределение в тканях

4.11.1 Данные о распределении исследуемого вещества и/или его метаболитов в тканях важны для идентификации тканей-мишеней, понимания основных механизмов токсичности и оценки способности исследуемого вещества и его метаболитов к накоплению и устойчивость. По завершении эксперимента по выведению из тканей (как правило, не более семи дней после введения дозы, в зависимости от особенностей воздействия исследуемого вещества) должен быть измерен суммарный процент (радиоактивной) дозы в тканях, а также в остатках тушки животного. Для предотвращения неправильного толкования данных следует соблюдать осторожность, если при завершении исследования вещество не обнаруживается в тканях (например, вещество могло быть полностью выведено еще до завершения исследования из-за короткого времени полувыведения). В таком случае необходимо исследовать распределение исследуемого вещества (и/или метаболита) в тканях во время пиковой концентрации в плазме/крови (T_{max}) или пикового уровня выделения в моче (см. 4.11.2). Кроме того, для определения массового баланса или в соответствии с требованиями регламентирующих организаций может потребоваться дополнительный забор ткани для определения количества исследуемого вещества и/или его метаболитов с целью оценки (при необходимости) его действия во времени. Забираемые ткани могут включать: печень, жир, желудочно-кишечный тракт, почки, селезенку, цельную кровь, остатки тушки, ткани органов-мишеней и другие виды тканей, потенциально значимых для токсикологической оценки исследуемого вещества, например щитовидную железу, эритроциты, репродуктивные органы, кожу, глаза (особенно у пигментированных животных). Анализ дополнительных тканей следует проводить одновременно, чтобы максимально использовать животных в том случае, если в исследованиях, не связанных с субхронической или хронической токсичностью, наблюдается токсичность для органов-мишеней. Следует также регистрировать данные о концентрации (радиоактивных) продуктов в тканях и их соотношениях в тканях и плазме (крови).

4.11.2 При необходимости и по требованию компетентных органов может проводиться оценка распределения исследуемого вещества в ткани в дополнительные моменты времени, например, во время пиковой концентрации в плазме/крови (например, T_{max}) или во время пикового выделения с мочой, по результатам соответствующих экспериментов по кинетике или выделению в плазме/крови. Эта информация может быть полезна для понимания механизмов токсического воздействия, потенциального накопления и устойчивости исследуемого вещества и метаболита. Необходимо предоставить обоснование выбора образцов тканей для анализа, приведенных в 4.11.1.

4.11.3 Количественная оценка распределения радиоактивности в тканях может быть выполнена путем диссекции органов, их гомогенизации, сжигания и/или солюбилизации, с последующим измерением жидкостным сцинтилляционным счетчиком (LSC). Для определения распределения исследуемого вещества в органах и/или тканях [4], [5] могут оказаться полезными некоторые методы, находящиеся в настоящее время на разных стадиях разработки, например количественная авторадиография всего тела и микроскопическая авторадиография рецепторов.

4.11.4 При использовании других путей введения вещества, отличных от орального, собирают и анализируют соответствующие ткани, например легкие при введении вещества методом ингаляции и кожу — при нанесении на кожу (см. раздел 7).

4.12 Метаболизм

4.12.1 Для идентификации и количественного определения неизменившегося исследуемого вещества и метаболитов собирают экскреты (и плазму, при необходимости) как приведено в 4.13. Для облегчения идентификации метаболита допускается объединять экскреты в пределах группы с одинаковой дозой. Рекомендуется профилирование метаболитов по времени. Однако при недостатке образца и/или радиоактивности допускается объединение мочи и фекалий, взятых в нескольких временных точках. При этом недопустимо объединение образцов от животных разного пола или при использовании разных доз. Для анализа мочи, фекалий, выдыхаемой радиоактивности и желчи у исследуемых животных при необходимости используют соответствующие качественные и количественные методы.

4.12.2 При установлении схемы метаболизма исследуемого вещества необходимо предпринять соответствующие усилия для выявления всех образовавшихся метаболитов, присутствующих в количестве 5 % и более от введенной дозы. Должны быть идентифицированы соединения, обнаруженные в экскретах и присутствующие в количестве 5 % и более от введенной дозы. Идентификация предпо-

лагает определение точной структуры компонентов. Обычно идентификацию проводят путем совместной хроматографии метаболита с известными стандартами, с использованием двух разных хроматографических систем, или методами, обеспечивающими четкую идентификацию структуры, например, масс-спектрометрия, ядерный магнитный резонанс (ЯМР) и т. д. Сочетание хроматографических методов, использующих одну и ту же неподвижную фазу, но два разных растворителя, не может считаться двумя разными методами идентификации метаболита, поскольку они не являются независимыми. Идентификация с помощью хроматографии должна быть получена с использованием двух разных, аналитически независимых хроматографических методов, таких как обращенно-фазовая и тонкослойная хроматография (TLC) и высокоэффективная жидкостная хроматография (HPLC). При условии, что обеспечивается соответствующее качество хроматографического разделения, дополнительное подтверждение спектроскопическими средствами не требуется. Альтернативно однозначную идентификацию можно также получить с использованием методов, обеспечивающих получение информации о структуре, таких как жидкостная хроматография/масс-спектрометрия (LC-MS) или жидкостная хроматография/тандемная масс-спектрометрия (LC-MS/MS), газовая хроматография/масс-спектрометрия (GC-MC) и ЯМР-спектроскопия (NMR).

4.12.3 Если идентифицировать метаболиты, присутствующие в количестве 5 % или более от введенной дозы, не представляется возможным, в окончательном отчете следует привести обоснование/объяснение. Для лучшего понимания путей метаболизма и оценки степени риска и/или опасности исследуемого вещества было бы целесообразно идентифицировать метаболиты, составляющие менее 5 % от использованной дозы. По возможности должно быть предоставлено подтверждение структуры, которое может включать анализ метаболита в плазме, крови или других тканях.

4.13 Экскреция

4.13.1 Скорость и степень экскреции введенной дозы определяют путем измерения процента обнаруженной (радиоактивной) дозы в моче, фекалиях и выдыхаемом воздухе. Эти данные также используют при определении массового баланса. Количество исследуемого вещества (радиоактивность), выделяемое с мочой, фекалиями и выдыхаемым воздухом, следует определять через установленные интервалы времени (см. 4.13.4—4.13.6). Эксперименты с повторным введением дозы планируют таким образом, чтобы обеспечить сбор данных об экскреции для достижения целей, приведенных в 4.7.2.6, что позволит сравнить эксперименты с однократным введением дозы.

4.13.2 Если предварительное исследование показало, что в выдыхаемый воздух выделяется незначительное количество исследуемого вещества (радиоактивности) (в соответствии с 4.13.6), то в окончательном исследовании не требуется сбор выдыхаемого воздуха.

4.13.3 Каждое животное должно быть помещено в отдельную метаболическую камеру для сбора экскретов (мочи, фекалий и выдыхаемого воздуха). В конце каждого периода сбора (см. 4.13.4—4.13.6) метаболические камеры должны быть промыты подходящим растворителем (это называют мытьем клеток) для обеспечения максимального извлечения исследуемого вещества (радиоактивности). Сбор экскретов следует прекратить через семь дней или после извлечения не менее 90 % введенной дозы, в зависимости от того, что произойдет раньше.

4.13.4 Общее количество вещества (радиоактивности) в моче определяют не менее чем в двух временных точках в первый день сбора, одна из которых должна быть через 24 ч после введения дозы и затем ежедневно до окончания исследования. В первый день рекомендуется выбрать более двух точек отбора проб (например, через 6, 12 и 24 ч). Должны быть проанализированы результаты предварительных исследований для получения информации об альтернативных или дополнительных контрольных моментах для сбора. План-график сбора должен быть обоснован.

4.13.5 Общее количество исследуемого вещества (радиоактивности) в фекалиях определяют ежедневно, начиная через 24 ч после введения дозы и до окончания исследования, если исследования не предполагают альтернативные или дополнительные контрольные моменты времени для сбора. Альтернативные планы-графики сбора также должны быть обоснованы.

4.13.6 Сбор выдыхаемого CO_2 и других летучих веществ может быть прекращен, если в течение 24 ч сбора данных в выдыхаемом воздухе обнаружено менее 1 % от введенной дозы.

4.14 Исследования кинетики

4.14.1 Кинетика в плазме/крови

4.14.1.1 Целью этих исследований является получение оценок основных ТК параметров исследуемого вещества [например, C_{max}, T_{max} периода полувыведения ($t_{1/2}$), AUC]. Эти исследования могут

проводиться при введении дозы однократно или, что более вероятно, с использованием двух или более доз. Выбор дозы должен определяться особенностью эксперимента и/или его задачей. Кинетические данные могут потребоваться для решения таких проблем, как биодоступность веществ и/или для выяснения влияния дозы на клиренс (например, происходит ли насыщение механизма очищения в зависимости от уровня дозы).

4.14.1.2 Для этих исследований для каждой проверяемой дозы используют не менее четырех животных одного пола. Необходимо привести обоснование выбора пола используемых животных. При наличии данных, подтверждающих значительные различия по токсичности для животных разного пола, рекомендуется использовать животных обоих полов (четырех самцов и четырех самок).

4.14.1.3 После введения исследуемого вещества (радиоактивного) проводят забор образцов крови у каждого животного в установленные моменты времени с использованием соответствующего метода забора. Объем и число образцов крови, которые можно взять при исследовании каждого животного, ограничены возможными последствиями повторного забора для здоровья/физиологии животных и/или чувствительностью метода анализа. Образцы каждого животного анализируют отдельно. В некоторых случаях (например, для характеристики метаболита) может потребоваться объединение образцов более чем одного животного. Объединенные образцы необходимо четко идентифицировать и представить обоснование для объединения. При использовании радиоактивно меченного вещества может быть достаточно анализа суммарной радиоактивности. В таком случае, суммарную радиоактивность определяют в цельной крови и плазме, плазме и эритроцитах, для того чтобы можно было вычислить соотношение радиоактивности кровь/плазма. В определенных случаях могут потребоваться более глубокие исследования, требующие идентификации исходного вещества и/или его метаболитов или оценки связывания с белками.

4.14.2 Кинетика в других тканях

4.14.2.1 Цель этих исследований состоит в определении уровня исследуемого вещества в разных тканях в зависимости от времени для получения информации о способе токсического воздействия, биоаккумуляции и биологической устойчивости. Выбор тканей и число временных точек зависит от цели исследования и имеющихся данных по токсикологии химического вещества. При планировании дополнительных исследований по кинетике вещества в тканях следует учитывать информацию, полученную по 4.11. Эти исследования могут включать однократное введение или повторное введение исследуемого вещества. Необходимо подробное обоснование используемого подхода.

4.14.2.2 Причиной для проведения других кинетических исследований тканей могут быть:

- увеличенный период полувыведения из крови, что предполагает накопление исследуемого вещества в разных тканях; или
- заинтересованность в наблюдении достижения плато концентрации в определенных тканях (например, в исследованиях с повторным введением вещества при достижении равновесного уровня исследуемого вещества в крови может заинтересовать достижение равновесного уровня в тканях-мишенях).

4.14.2.3 При исследовании динамики такого типа выбранную дозу исследуемого вещества вводят перорально не менее чем четырем животным и отслеживают динамику распределения вещества в исследуемых тканях. Можно использовать животных одного пола, если не наблюдается специфической гендерной токсичности. Постановка проблемы определяет, какой параметр анализируют — суммарную радиоактивность исходного вещества и/или его метаболитов. Оценку распределения вещества в тканях проводят с использованием соответствующих методов.

4.14.3 Индукция/ингибирование фермента

4.14.3.1 Исследования возможного влияния индукции/ингибирования ферментов или биотрансформации исследуемого вещества могут потребоваться в одном или нескольких из следующих случаев:

1) имеющиеся данные указывают на зависимость между биотрансформацией исследуемого вещества и повышенной токсичностью;

2) имеющиеся данные о токсичности указывают на нелинейную зависимость между дозой и метаболизмом;

3) в результате исследований по идентификации метаболитов выявлен потенциально токсичный метаболит, который, возможно, был произведен цепочкой ферментативных реакций, активированных исследуемым веществом;

4) при объяснении эффектов, связанных с индукцией фермента;

5) если наблюдаются токсикологически значимые изменения в метаболическом профиле исследуемого вещества в экспериментах *in vitro* или *in vivo* с разными животными или условиями, может потребоваться характеристика вовлеченных ферментов. Например, ферменты фазы I (такие как изоферменты системы цитохром Р450-зависимой монооксигеназы) и ферменты фазы II (такие как изоферменты сульфотрансферазы или уридиндифосфат-глюкуронозилтрансфераза, или другие ферменты). Эту информацию можно использовать для оценки возможности экстраполяции результатов между разными видами животных.

4.14.3.2 Для оценки изменений ТК, связанных с исследуемым веществом, используют соответствующие проверенные и обоснованные протоколы исследования. Примеры исследований состоят из повторного введения немеченого исследуемого вещества с последующим введением единственной радиоактивно меченной дозы на 14-й день, или повторного введения радиоактивно меченного исследуемого вещества и забора материала на 1, 7 и 14-й день для определения метаболитов. Повторное введение радиоактивно меченного исследуемого вещества может также быть информативным в плане биоаккумуляции (см. 7.4.2.6).

5 Дополнительные подходы

Дополнительные подходы, кроме экспериментов *in vivo*, приведенные в настоящем стандарте, могут дать полезную информацию об абсорбции, распределении, метаболизме или выведении химического вещества у определенных видов животных.

5.1 Использование информации, полученной при исследовании *in vitro*

5.1.1 Ответы на определенные вопросы относительно метаболизма химического вещества можно получить при исследованиях *in vitro* с использованием соответствующих экспериментальных систем. Свежевыделенные или культивированные гепатоциты и субклеточные фракции печени (например, микросомы, цитозоль или фракция S9) можно использовать для изучения предполагаемых метаболитов. Изучение локального метаболизма вещества в органе-мишени (например, в легком) может быть информативным для оценки риска. Для этих целей могут быть полезны микросомальные фракции тканей-мишеней. Исследования на микросомах могут быть полезны для устранения потенциальных возрастных и половых различий, для определения параметров активности фермента (K_m и V_{max}), которые помогают оценить уровень дозы, определяемой метаболизмом вещества, при разных уровнях экспозиции. Кроме того, микросомы можно использовать для идентификации конкретных микросомальных ферментов, участвующих в метаболизме вещества, что может найти применение в экстраполяции данных на другие виды организмов (см. также 4.14.3.1). Возможность индукции биотрансформации можно исследовать *in vitro* с использованием субклеточных фракций печени (например, микросом и цитозоля) животных, предварительно обработанных исследуемым веществом, путем исследования индукции гепатоцитов или определенных клеточных линий, экспрессией соответствующих ферментов. В некоторых случаях и при соответствующих условиях субклеточные фракции, взятые из тканей человека, могут быть использованы для определения потенциальных различий в биотрансформации. Результаты исследований *in vitro* могут быть полезны при разработке физиологически обоснованных токсикокинетических (PBTK) моделей [6].

5.1.2 Исследования дермальной абсорбции *in vitro* могут дать дополнительную информацию для характеристики абсорбции [7].

5.1.3 Первичные культуры клеток печени и свежеприготовленные срезы ткани можно использовать для исследования аналогичных вопросов, наряду с препаратами микросом печени. В некоторых случаях можно исследовать конкретные вопросы, используя клеточные линии с охарактеризованной экспрессией соответствующего фермента или специально созданные клеточные линии. В определенных случаях может быть полезным изучение *in vitro* ингибирования и индукции конкретных изоферментов цитохрома Р450 (например, CYP1A1, 2E1, 1A2 и др.) и/или ферментов фазы II, вызываемых исходным исследуемым веществом. Полученная информация может быть полезна для исследования химических веществ, имеющих сходную структуру.

5.2 Использование результатов токсикокинетических исследований в качестве дополнительной информации

5.2.1 Результаты анализов образцов крови, ткани и/или экскретов, полученные при проведении других исследований токсичности, могут содержать данные о биодоступности, изменении концентрации в плазме во времени (AUC, C_{max}), потенциале биоаккумуляции, скорости клиренса, а также о возрастных и половых различиях метаболизма и кинетики.

5.2.2 Планирование исследования может предусматривать поиск ответов на следующие вопросы: насыщение уровня абсорбции, биотрансформации или путей выведения при более высоких дозах исследуемого вещества; функционирование других метаболических путей при более высоких дозах и ограничение токсичных метаболитов при более высоких дозах.

5.2.3 Другие аспекты по оценке опасности могут включать:

- исследование возрастной чувствительности в результате изменений в состоянии гематоэнцефалического барьера, почек и/или способности к детоксикации;
- исследование субпопуляционной чувствительности из-за различий в способности к биотрансформации или других особенностей ТК;
- определение степени воздействия трансплацентарного переноса химических веществ на плод или новорожденного через лактацию.

5.3 Применение токсикокинетического моделирования

Токсикокинетическое моделирование может быть полезным при оценке разных аспектов опасности и риска, например для прогнозирования системного воздействия дозы на внутренние ткани. Кроме того, оно позволяет исследовать конкретные вопросы о способе воздействия вещества, путях экспозиции и схемах дозирования. Эти модели могут служить основанием для межвидовой экстраполяции результатов и оценки риска для человека. Данные, пригодные для разработки физиологически обоснованных токсикокинетических (PBTK) моделей для химического вещества любого вида, включают следующие параметры: 1) коэффициенты распределения; 2) биохимические константы и физиологические параметры; 3) параметры абсорбции для каждого способа поступления вещества; 4) кинетические данные *in vivo* для оценки модели [например, параметры выведения для соответствующих (более 10 %) путей экскреции, K_m и V_{max} для метаболизма]. Экспериментальные данные, используемые при разработке моделей, должны быть получены с применением надежных научных методов, а результаты моделирования утверждены. Химические и видоспецифичные параметры, такие как скорости абсорбции, распределение в ткани крови и константы скорости метаболизма, часто определяют для обеспечения разработки некомпартментного или физиологического моделирования [8].

6 Данные и представление отчета

Рекомендуется включить в отчет об исследовании содержание.

6.1 Основная часть отчета

Отчет должен включать информацию, упорядоченную по разделам и пунктам следующим образом:

6.1.1 Резюме

Включает краткое описание плана клинического исследования и используемых методов. Следует выделить основные выводы, касающиеся массового баланса, вида и числа образующихся метаболитов, остатка вещества в тканях, скорости выведения, уровня биоаккумуляции, половых различий и т. д. Резюме должно быть достаточно подробным, чтобы позволить оценить полученные результаты.

6.1.2 Введение

Включает цели исследования, обоснование исследования и планирование эксперимента, а также содержит обзор состояния вопроса и исходную информацию.

6.1.3 Материалы и методы

В этот раздел должны быть включены подробное описание всей соответствующей информации, в том числе:

6.1.3.1 Исследуемое вещество

Этот подраздел должен включать идентификацию исследуемого вещества: химическое название, структурную формулу, качественное и количественное определение его химического состава, химическую чистоту и, по возможности, тип и количество примесей. Приводят информацию о физических/химических свойствах вещества, включая физическое состояние, цвет, растворимость и/или коэффициент распределения, стабильность и, при необходимости, коррозионную (раздражающую) активность. Следует представить информацию об изомерах, при наличии. Для радиоактивно меченного исследуемого вещества следует включить информацию: о типе радионуклида, положении метки, удельной активности и радиохимической чистоте.

Указывают тип или описание носителя, растворителей, суспендирующих агентов и эмульгаторов или других материалов, используемых при введении исследуемого вещества.

6.1.3.2 Подопытные животные

Приводят информацию о подопытных животных, включая обоснование выбора вида и линии животного, возраст на момент начала исследования, пол, массу тела, состояние здоровья и условия содержания.

6.1.3.3 Методы

Должна быть приведена подробная информация о плане исследования и используемых методах, включая:

1) обоснование любой модификации способа введения вещества и условий воздействия, при применении;

2) обоснование выбора уровня дозы;

3) описание предварительных исследований, использованных при планировании эксперимента. Должны быть включены использовавшиеся результаты предварительного эксперимента;

4) процедура приготовления раствора для введения, тип растворителя или носителя, при использовании;

5) число групп животных и число животных в группе;

6) уровень дозы и ее объем (и удельная активность дозы, при использовании радиоактивности);

7) путь/пути и способы введения вещества;

8) частота введения дозы;

9) период воздержания от пищи (при использовании);

10) общая радиоактивность на одно животное;

11) уход за животными;

12) сбор и подготовка образцов;

13) аналитические методы, используемые для разделения, идентификации и количественного определения метаболитов;

14) предел обнаружения для используемых методов;

15) другие применявшиеся экспериментальные измерения и процедуры (включая валидацию методов анализа метаболита).

6.1.3.4 Статистический анализ

Если для анализа результатов исследования используется статистический анализ, необходимо включить достаточную информацию о методе анализа и используемой компьютерной программе, чтобы независимый рецензент/специалист по статистике мог провести переоценку и реконструировать проведенный анализ.

При исследовании моделирования систем, такого как PBTK, представление модели должно включать полное описание модели, позволяющее осуществлять независимое воспроизведение и валидацию модели (см. 5.3 и раздел 2).

6.1.4 Результаты

Все данные должны быть обобщены и сведены в таблицу с соответствующей статистической оценкой и описаны в тексте этого раздела. Данные подсчета радиоактивности должны быть суммированы и представлены в соответствии с исследованием, как правило, в виде микрограмм или миллиграмм эквивалентов на массу образца, но могут быть использованы другие единицы измерения. Этот раздел должен включать графические иллюстрации результатов, воспроизведение типовых хроматографических и спектрометрических данных, идентификацию/количественное определение метаболитов и предполагаемые метаболические пути, включая молекулярную структуру метаболитов. Кроме того, при необходимости в этот раздел следует включить следующую информацию:

1) количество и процент радиоактивности, выведенной с мочой, фекалиями, выдыхаемым воздухом, в смывах мочи и фекалий с клетки:

- в исследования кожи также включают данные по извлечению вещества из обработанной кожи, из смыва с кожи и остаточной радиоактивности с закрывающего кожу покрытия, и метаболической ячейки, а также результаты исследования смывов с кожи. Дальнейшее обсуждение приведено в разделе 7;
- в исследования с вдыханием исследуемого вещества также включают данные по извлечению исследуемого вещества из легких и тканей носа [9]. Дальнейшее обсуждение приведено в 7.2;

2) распределение вещества в тканях представляют в виде процента от введенной дозы и концентрации (микрограммы или эквиваленты микрограмма на грамм ткани), и в виде соотношения содержания ткань/кровь или ткань/плазма;

3) материальный баланс, полученный в каждом исследовании в результате анализа тканей и экскретов;

4) концентрация в плазме и токсикокинетические параметры (биодоступность, AUC, C_{max}, T_{max}, клиренс, период полувыведения) после введения исследуемого вещества соответствующим способом;

5) скорость и степень абсорбции исследуемого вещества после его введения соответствующим способом;

6) количество исследуемого вещества и метаболитов, собранные в экскретах (в процентах от введенной дозы);

7) справочные данные в приложениях, которые содержат данные обо всех измеряемых параметрах по каждому отдельному животному (например, введенная доза вещества, процент выделения вещества, концентрации, ТК-параметры и т. д.);

8) графические данные с предполагаемыми путями метаболизма и молекулярными структурами метаболитов.

6.1.5 Обсуждение результатов и выводы

6.1.5.1 В этом разделе следует привести:

1) предполагаемые пути метаболизма на основании результатов анализа метаболизма и мест локализации исследуемого вещества;

2) обсуждение потенциальных межвидовых и межполовых различий относительно локализации и/или путей биотрансформации исследуемого вещества;

3) в табличном виде и обсудить результаты идентификации и количественного определения метаболитов, скорости выведения, биоаккумуляции и уровня исходного вещества, и/или его метаболита(ов) в тканях, а также возможные изменения ТК-параметров в зависимости от дозы, при необходимости;

4) любые данные по ТК, полученные в ходе исследования токсичности;

5) краткое заключение на основе результатов исследования;

6) дополнительные разделы (при необходимости).

6.1.5.2 Дополнительные разделы следует использовать для включения библиографической информации, таблиц, рисунков, приложений и т. д.

7 Альтернативные способы воздействия

7.1 Воздействие через кожу

7.1.1 В этом разделе представлена конкретная информация об исследовании токсикокинетики исследуемого вещества при поступлении через кожу. Подробное описание всасывания через кожу, распределения и обмена веществ приведено в [10]. При воздействии через кожу следует использовать один или несколько уровней дозы исследуемого вещества. Исследуемое вещество (например, в чистом или разбавленном виде, или готовый материал, содержащий исследуемое вещество, которое наносится на кожу) должен быть таким же (или реальным заменителем), которому могут быть подвергнуты люди или другие возможные целевые виды. Уровень/уровни дозы выбирают в соответствии с 4.7. Факторы, которые могут быть приняты во внимание при выборе дозы для воздействия через кожу, включают предполагаемое воздействие на человека и/или дозы, при которых наблюдалась токсичность при других исследованиях токсичности при воздействии через кожу. Дозу(ы) для нанесения на кожу растворяют, при необходимости, в подходящем носителе и наносят в объеме, достаточном для обеспечения уровня дозы. Незадолго до испытания шерсть должна быть удалена с дорсальной области подопытных животных. Можно использовать бритье, но оно должно быть проведено примерно за 24 часа до испытания. При стрижке или бритье меха необходимо соблюдать осторожность для предотвращения поврежде-

ния кожи, что может изменить ее проницаемость. Для нанесения исследуемого вещества необходимо очистить приблизительно 10 % поверхности тела. При испытании высокотоксичных веществ площадь поверхности воздействия может составлять менее 10 %, но по возможности бóльшая площадь должна быть покрыта тонкой и однородной пленкой. Для всех групп подопытных животных следует обрабатывать одинаковую площадь поверхности кожи. Зоны с нанесенным исследуемым веществом должны быть защищены подходящим зафиксированным покрытием. Животные должны размещаться отдельно.

7.1.2 Для оценки количества поглощенной дозы исследуемого вещества проводят исследование дермальных смывов, которые получают промыванием обработанной поверхности кожи мягким мылом и водой. Это исследование может помочь в установлении массового баланса, при введении исследуемого вещества кожным путем. Для этого исследования однократно нанесенное исследуемое вещество смывают с двух животных. Уровень дозы выбирают по 4.7.2.3 (о времени контакта с кожей см. 7.1.3). Для оценки эффективности удаления исследуемого вещества с помощью смывания определяют количество исследуемого вещества в смывной воде.

7.1.3 Если не исключена разъедаемость кожи, исследуемое вещество наносят и выдерживают на коже не менее 6 ч. При удалении исследуемого вещества обработанную область промывают в соответствии с процедурой по 7.1.2. Как защищающее покрытие, так и смывные воды анализируют на наличие остатков исследуемого вещества. По окончании исследований каждое животное гуманно умерщвляют в соответствии с [1], а обработанную кожу удаляют. Для определения остатков вещества (радиоактивности) анализируют обработанную кожу.

7.1.4 Для токсикокинетической оценки фармацевтических препаратов могут потребоваться другие процедуры, соответствующие требованиям уполномоченных органов.

7.2 Ингаляция

Используют одну концентрацию (или больше, при необходимости) исследуемого вещества. Концентрацию(и) выбирают в соответствии с 4.7. Процедуры ингаляции следует проводить с использованием аппарата «носовой конус» или «только для головы» для предотвращения абсорбции альтернативными путями [9]. При использовании других условий воздействия при вдыхании необходимо задокументировать процедуру и обосновать модификацию. Должна быть установлена продолжительность воздействия при ингаляции; типичная экспозиция составляет от 4 до 6 ч.

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 № 417:2010
Введение (1—5)	Введение 1 2 3 4 5
1 Область применения (9)	Ограничения 9
2 Термины, определения, обозначения и сокращения (10, приложение)	Определения 10
3 Основные положения (6—8) 3.1 3.2 3.3	Основные положения 6 7 8
—	Аспекты благополучия животных 11
4 Описание методов (12—58) 4.1 Предварительные исследования	Описание методов Предварительные исследования 12
4.2 Выбор животных (13, 14) 4.2.1 4.2.2	Выбор животных Виды 13 14
4.3 Возраст и линия (15)	Возраст и линия 15
4.4 Число и пол животных (16)	Число и пол животных 16
4.5 Условия содержания и кормления животных (17)	Условия содержания и кормления животных 17
4.6 Исследуемое вещество (18, 19) 4.6.1 4.6.2	Исследуемое вещество 18 19
4.7 Выбор дозы (20—26) 4.7.1 Предварительное исследование 4.7.2 Основные исследования 4.7.2.1 4.7.2.2 4.7.2.3 4.7.2.4 4.7.2.5 4.7.2.6	Выбор дозы Предварительное исследование 20 Основные исследования 21 22 23 24 25 26
4.8 Введение исследуемого вещества (27—30) 4.8.1 4.8.2 4.8.3 4.8.4	Введение тестируемого вещества 27 28 29 30

Продолжение таблицы ДА.1

Структура настоящего стандарта	Структура международного документа OECD Test № 417:2010
4.9 Измерения (31) 4.9.1 Массовый баланс	Измерения Массовый баланс 31
4.9.2 Абсорбция (32—34) 4.9.2.1 4.9.2.2 4.9.2.3	Абсорбция 32 33 34
4.10 Биодоступность (35, 36) 4.10.1 4.10.2	Биодоступность 35 36
4.11 Распределение в тканях (37 — 40) 4.11.1 4.11.2 4.11.3 4.11.4	Распределение в тканях 37 38 39 40
4.12 Метаболизм (41—43) 4.12.1 4.12.2 4.12.3	Метаболизм 41 42 43
4.13 Экскреция (44—49) 4.13.1 4.13.2 4.13.3 4.13.4 4.13.5 4.13.6	Экскреция 44 45 46 47 48 49
4.14 Исследования кинетики (50—52) 4.14.1 Кинетика в плазме/крови 4.14.1.1 4.14.1.2 4.14.1.3	Исследования кинетики Кинетика в плазме/ крови 50 51 52
4.14.2 Кинетика в других тканях 4.14.2.1 4.14.2.2 4.14.2.3	Кинетика в других тканях 53 54 55
4.14.3 Индукция/ингибирование фермента (56, 57) 4.14.3.1 4.14.3.2	Индукция/ ингибирование фермента 56 57
5 Дополнительные подходы (58)	Дополнительные подходы 58
5.1 Использование информации, полученной при исследовании in vitro (59—61) 5.1.1 5.1.2 5.1.3	Использование информации, полученной при исследовании in vitro 59 60 61
5.2 Использование результатов токсикокинетических исследований в качестве дополнительной информации (62—64) 5.2.1 5.2.2 5.2.3	Использование результатов токсикокинетических исследований в качестве дополнительной информации 62 63 64
5.3 Применение токсикокинетического моделирования (65)	Применение токсикокинетического моделирования 65
6 Данные и представление отчета (66 —73)	Данные и представление отчета 66

Окончание таблицы ДА.1

Структура настоящего стандарта	Структура международного документа OECD Test № 417:2010
6.1 Основная часть отчета (67)	Основная часть отчета 67
6.1.1 Резюме (68)	Резюме 68
6.1.2 Введение (69)	Введение 69
6.1.3 Материалы и методы (70) 6.1.3.1 Исследуемое вещество 6.1.3.2 Подопытные животные	Материалы и методы 70 (a) (b)
6.1.3.3 Методы 6.1.3.4 Статистический анализ	(c) (d)
6.1.4 Результаты (71)	Результаты 71
6.1.5 Обсуждение результатов и выводы (72, 73) 6.1.5.1 6.1.5.2	Обсуждение результатов и выводы 72 73
7 Альтернативные способы воздействия (74—77) 7.1 Воздействие через кожу 7.1.1 7.1.2 7.1.3 7.1.4	Альтернативные способы воздействия Воздействие через кожу 74 75 76 77
7.2 Ингаляция (78)	Ингаляция 78
*	Библиография
**	Приложение Определения
Приложение ДА Сопоставление структуры настоящего стандарта со структурой примененного в нем международного документа	
Библиография	

* Данный раздел приведен в конце стандарта для приведения в соответствие с требованиями ГОСТ 1.5.

** Термины и определения приведены в разделе 2 настоящего стандарта для приведения в соответствие с требованиями ГОСТ 1.5.

Примечание — После заголовков разделов настоящего стандарта приведены в скобках номера аналогичных разделов международного документа. Приведено также соответствие подразделов настоящего стандарта разделам международного документа.

Библиография

[1] OECD (2009) Preliminary Review of OECD Test Guidelines for their Applicability to Manufactured Nanomaterials, Series on the Safety of Manufactured Nanomaterials No. 15, ENV/JM/MONO(2009)21, OECD, Paris

[2] Barton, H.A., et al. (2006), The Acquisition and Application of Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion (ADME) Data in Agricultural Chemical Safety Assessments, Critical Reviews in Toxicology, 36: 9—35

[3] Milo gibaldi and Donald Perrier, 1982, Pharmacokinetics, 2nd edition, Marcel Dekker, Inc., New York

[4] Solon E. G., Kraus L (2002), Quantitative whole-body autoradiography in the pharmaceutical industry; Survey results on study design, methods, and regulatory compliance, J Pharm and Tox Methods 46, 73—81

[5] Stumpf, W. E. (2005), Drug localization and targeting with receptor microscopic autoradiography. J. Pharmacological and Toxicological Methods, 51, 25—40

[6] Loizou G, Spendiff M, Barton HA, Bessems J, Bois FY, d'Yvoire MB, Buist H, Clewell HJ 3rd, Meek B, Gundert-Remy U, Goerlitz G, Schmitt W. (2008), Development of good modelling practice for physiologically based pharmacokinetic models for use in risk assessment: The first steps. Regulatory toxicology and pharmacology 50, 400—411

[7] OECD (2004), Skin Absorption: In Vitro Method, Test Guideline No. 428, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals*, OECD, Paris

[8] IPCS (2010) Characterizing and applying physiologically-based pharmacokinetic models in risk assessment. Geneva, World Health Organization, International Programme on Chemical Safety (in press)

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

[10] (9) OECD (2004), Skin Absorption: In Vivo Method, Test Guideline No. 427, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD, Paris

---

* Действует ГОСТ 32435—2013 «Методы испытания по воздействию химической продукции на организм человека. Кожно-резорбтивное действие: метод *in vitro*».

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

Ключевые слова: методы испытания по воздействию химической продукции на организм человека, токсикокинетические испытания

БЗ 7—2019/5

Редактор *Л.В. Коретникова*
Технический редактор *В.Н. Прусакова*
Корректор *О.В. Лазарева*
Компьютерная верстка *А.Н. Золотаревой*

Сдано в набор 16.08.2019. Подписано в печать 27.08.2019. 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