ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО

ПО ТЕХНИЧЕСКОМУ РЕГУЛИРОВАНИЮ И МЕТРОЛОГИИ

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ГОСТ Р 57689— 2017

ЛЕКАРСТВЕННЫЕ СРЕДСТВА ДЛЯ МЕДИЦИНСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ

Выявление токсического действия на репродуктивную функцию и мужскую репродуктивную функцию

(ICH S5, Detection of toxicity to reproduction for medicinal products and toxicity to male reproductivity, IDT)

Издание официальное

Москва
Стандартинформ
2017

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

1 ПОДГОТОВЛЕН Государственным бюджетным образовательным учреждением высшего профессионального образования Первым Московским государственным медицинским университетом имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Первым МГМУ имени И.М. Сеченова) на основе собственного перевода на русский язык англоязычной версии документа, указанного в пункте 4

2 ВНЕСЕН Техническим комитетом по стандартизации ТК 458 «Разработка, производство и контроль качества лекарственных средств»

3 УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 20 сентября 2017 г. № 1181-ст

4 Настоящий стандарт идентичен Руководству ICH S5 «Выявление токсического действия медицинской продукции на репродуктивную функцию и мужскую репродуктивную функцию» (ICH S5 «Detection of toxicity to reproduction for medicinal products and toxicity to male reproductivity», IDT) Международной конференции по гармонизации технических требований для регистрации лекарственных средств для медицинского применения (International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use; ICH)[1)].

Наименование настоящего стандарта изменено по отношению к наименованию международного документа в связи с особенностями построения межгосударственной системы стандартизации в соответствии с ГОСТ 1.5—2012 (пункт 3.5)

5 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

*Правила применения настоящего стандарта установлены в статье 26 Федерального закона от 29 июня 2015 г. № 162-ФЗ «О стандартизации в Российской Федерации». Информация об изменениях к настоящему стандарту публикуется в годовом (по состоянию на 1 января текущего года) информационном указателе «Национальные стандарты», а официальный текст изменений и поправок — в ежемесячном информационном указателе «Национальные стандарты». В случае пересмотра (замены) или отмены настоящего стандарта соответствующее уведомление будет опубликовано в ближайшем выпуске ежемесячного информационного указателя «Национальные стандарты». Соответствующая информация, уведомление и тексты размещаются также в информационной системе общего пользования — на официальном сайте Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии в сети Интернет (*gost.e-ecolog.ru

---

[1)] С 25 октября 2015 года переименована в Международный совет по гармонизации.

© Стандартинформ, 2017

Настоящий стандарт не может быть воспроизведен, тиражирован и распространен в качестве официального издания без разрешения Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии

Содержание

1 Область применения 1
2 Цель исследований 1
3 Выбор исследований 2
4 Критерии выбора животных 3
5 Общие рекомендации относительно выбора режима воздействия 4
6 Предлагаемый дизайн исследований — комбинация исследований 6
7 Статистика 12
8 Представление данных 13
9 Изучение токсического действия на мужскую репродуктивность 13
10 Терминология 14

Введение

Цель исследований репродуктивной токсичности состоит в выявлении любого эффекта одного или нескольких активных веществ на репродуктивную функцию млекопитающих. С этой целью сами исследования и интерпретация их результатов должны быть взаимосвязаны со всеми другими фармакологическими и токсикологическими данными, чтобы установить, насколько потенциальный репродуктивный риск для человека выше, ниже, либо равен таковому при других проявлениях токсичности. Кроме того, исследования токсичности многократных доз обеспечивают получение важной информации о потенциальных рисках для репродукции, особенно оплодотворяющей функции самцов. Для того, чтобы экстраполировать результаты на человека (оценка релевантности) могут потребоваться данные о возможном воздействии на человека, сравнительной кинетике и механизмах репродуктивной токсичности.

Имеются значительные пересечения методологии исследований потенциальной репродуктивной токсичности химических веществ и лекарственных средств. В качестве первого этапа на пути к использованию более широкой методологии эффективных испытаний данное руководство ставит целью консолидировать стратегию на основании дизайна исследований лекарственных средств. В руководстве должна быть отражена полная оценка безопасности лекарственных средств с точки зрения развития потомства. Предполагается, что испытания, в которых животные получают терапию на определенных этапах процесса репродукции, лучше отражают воздействие лекарственных средств на человека и обеспечивают более специфичную идентификацию рискованных этапов. Хотя данный подход может быть применен к большинству лекарственных средств, длительное воздействие низких доз также оправдано и может быть организовано в виде исследований на одном или двух поколениях животных.

Фактическая стратегия испытаний должна быть обусловлена следующими обстоятельствами:

- предполагаемое применение препарата, особенно в контексте репродукции;
- форма лекарственного вещества и путь введения;
- препарат предназначен для применения у человека;
- использование существующих данных о токсичности, фармакодинамике, кинетике и сходства по структуре/активности с другими лекарственными веществами.

Для успешной реализации данной концепции необходим гибкий подход (примечание 1). Ни в одном руководстве не может быть представлено информации, способной охватить все возможные случаи. Все участники обсуждения должны быть готовы к обсуждению и рассмотрению поправок в стратегию проведения испытаний в соответствии с современными этическими стандартами проведения исследований на человеке и животных. В области оценки воздействия на оплодотворяющую способность самцов, характеристик кинетики и метаболизма беременных и кормящих самок для оптимизации дизайна исследований требуется проведение дополнительных фундаментальных исследований.

Примечание 1 (1.1) — Научная гибкость подхода.

Данные рекомендации не обязательны к исполнению, они представляют собой скорее начальную, чем конечную точку в процессе обсуждения. Они являются основой для создания исследователем стратегии исследований в соответствии с имеющимися знаниями исследуемого материала и современных тенденций. В качестве дополнительного стимула в данном документе упомянуты альтернативные варианты дизайна исследований, однако при разработке стратегии можно воспользоваться и другими имеющимися либо собственными вариантами. Основная цель исследований — определить и выявить потенциальное токсическое действие на репродуктивную функцию.

Мелкие детали дизайна исследований и технических процедур не вошли в текст. Подобные решения справедливо лежат в области работы исследователя, поскольку технологии, подходящие для одной лаборатории, могут быть непригодны для другой. Исследователь должен использовать штатные возможности и ресурсы для оптимального выполнения задачи, и он знает как это сделать лучше, чем любой внешний специалист. Человеческие качества, отношение к делу, способности и последовательность в данном вопросе важнее, чем материальные ресурсы. В целях соблюдения требований GLP в тексте стандарта дана ссылка на соответствующие нормы.

Настоящий стандарт идентичен Руководству ICH S5 по оценке токсического действия на репродуктивную функцию и мужскую репродуктивную функцию (ICH S5 Detection of toxicity to reproduction for medicinal products and toxicity to male reproductivity) Международной конференции по гармонизации технических требований для регистрации лекарственных средств для медицинского применения (International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use; ICH)[2)].

[2)] С 25 октября 2015 года переименована в Международный совет по гармонизации. (Council for Harmonization ICH).

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ЛЕКАРСТВЕННЫЕ СРЕДСТВА ДЛЯ МЕДИЦИНСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ

Выявление токсического действия на репродуктивную функцию и мужскую репродуктивную функцию

Medicines for medical applications. Detection of toxicity to reproduction and male reproductivity

Дата введения — 2018—08—01

1 Область применения

Настоящий стандарт содержит описание дизайна исследований, направленных на определение любого воздействия одного или нескольких активных веществ на размножение млекопитающих и оценку безопасности лекарственного средства в отношении воспроизводства и мужской репродуктивной функции.

2 Цель исследований

Цель исследований репродуктивной токсичности состоит в выявлении любого эффекта одного или нескольких активных веществ на репродуктивную функцию млекопитающих. С этой целью сами исследования и интерпретация их результатов должны быть взаимосвязаны со всеми другими фармакологическими и токсикологическими данными, чтобы установить, насколько потенциальный репродуктивный риск для человека выше, ниже, либо равен таковому при других проявлениях токсичности. Кроме того, исследования токсичности многократных доз обеспечивают получение важной информации о потенциальных рисках для репродукции, особенно оплодотворяющей функции самцов. Для того, чтобы экстраполировать результаты на человека (оценка релевантности) могут потребоваться данные о возможном воздействии на человека, сравнительной кинетике и механизмах репродуктивной токсичности.

Сочетание выбранных исследований должно учитывать воздействие зрелых взрослых особей и все стадии развития от зачатия до половой зрелости. Для определения непосредственных и латентных эффектов воздействия наблюдение должно продолжаться в течение полного жизненного цикла, т. е. от зачатия в одном поколении до зачатия в следующем поколении. Для удобства испытаний интегрированная последовательность может быть разделена на следующие этапы.

A. От периода до спаривания до зачатия (репродуктивная функция взрослых самцов и самок, развитие и созревание гамет, поведение при спаривании, оплодотворение).

B. От зачатия до имплантации (репродуктивные функции взрослых самок, предимплантационный период, развитие, имплантация).

C. От имплантации до закрытия твердого неба (репродуктивные функции взрослых самок, эмбриональное развитие, формирование основных органов).

D. От закрытия твердого неба до конца беременности (репродуктивные функции взрослых самок, развитие плода и рост, развитие органов и рост).

E. От рождения до отнятия от груди (репродуктивные функции взрослых самок, адаптация новорожденного к внематочной жизни, рост и развитие до отнятия от груди).

F. От отнятия от груди до полового созревания (развитие и рост после отнятия от груди, адаптация к самостоятельной жизни, достижение полной половой зрелости).

Временные рамки представлены в примечании 2.

Примечание 2 (1.2) — Временные рамки.

Издание официальное

В рамках настоящих рекомендаций время наступления беременности условно определено как день получения положительного вагинального мазка на наличие спермы и/или обнаружение пробки считается 0 днем беременности даже если спаривание произошло ночью. Если не указано иного, предполагается, что у крыс, мышей и кроликов имплантация происходит на 6—7-й день беременности, а закрытие твердого неба — на 15—18-й день беременности.

Другие условные предположения также допустимы, но они ДОЛЖНЫ быть определены в отчетах. Кроме того, исследователь должен быть последовательным и во всех исследованиях обеспечивать непрерывность терапии. Это рекомендуемая мера предосторожности во избежание перекрытия периода воздействия соответствующих исследований минимум на один день.

Точность времени спаривания должна быть четко установлена, поскольку это может повлиять на вариабельность эмбриональных и неонатальных параметров.

Аналогичным образом для разводимого потомства день рождения будет считаться нулевым постнатальным днем или днем лактации, если не указано иного. Однако в части задержки либо продления родов может быть дана ссылка на посткоитальное время.

3 Выбор исследований

В стандарте представлен дизайн исследований, в первую очередь, направленных на определение воздействия на репродуктивную функцию. При обнаружении подобного действия следует в индивидуальном порядке разрабатывать дальнейшие исследования, направленные на полную характеристику ответа (примечание 3). Должно быть дано обоснование выбранного набора исследований, которое должно включать объяснение выбора дозировок.

Исследования следует планировать в соответствии с современными методами и учетом существующих знаний воздействия на репродуктивную функцию препаратов данного класса. Участие в исследованиях не должно причинять страдания животным и должно проводиться на минимальном количестве животных, необходимом для достижения общих целей. В случае, когда проводится предварительное исследование, его результаты должны учитываться и обсуждаться в рамках общей оценки (примечание 4).

Примечание 3 (1.3) — Первичные и вторичные испытания.

В той или иной степени, все первичные испытания (руководство) имеют поверхностную природу, т. е. эффект в отношении одной конечной точки может иметь различное происхождение. Снижение размера помета может быть обусловлено сниженной овуляцией (меньшее число желтых тел), более высокой смертностью до имплантации, более высокой постимплантационной смертностью либо непосредственной постнатальной смертностью. В свою очередь, случаи смерти могут являться следствием имевшегося ранее физического порока развития, который может более не проявляться в связи с последующими вторичными изменениями и т. д. Особенно в отношении эффектов, возникающих с естественно низкой частотой среди контрольных животных, возможность различения эффектов, возникших в результате терапии или случайно зависит от связи с другими типами эффектов.

Токсическое вещество обычно вызывает эффекты нескольких типов, носящие дозозависимый характер. Например, индуцированный порок развития почти всегда сочетается с повышением смертности в эмбриональном периоде развития и повышением частоты менее тяжелых структурных изменений. Учитывая воздействие в рамках одной конечной точки следует рассмотреть возможность проведения вторичных исследований возможных связей, т. е. должна быть дана характеристика природы, масштаба и источника происхождения токсичности вещества. Характеристика также должна включать в себя идентификацию взаимосвязи доза/ответ в целях оценки риска, что отличает данную ситуацию от первичных тестов, где наличие либо отсутствие связи доза/ответ позволяет отличить различия, связанные с терапией от случайных различий.

Примечание 4 (1.3) — Предварительные исследования.

На этапе планирования либо начала исследований репродукции обычно уже имеется информация, полученная в ходе исследований острой токсичности либо токсичности при многократном введении доз продолжительностью не менее одного месяца. Данной информации может быть достаточно для определения доз для исследований репродуктивной токсичности.

При проведении адекватных предварительных исследований их результаты включают в обоснование выбора дозы в рамках основного исследования. Такие исследования следует подавать независимо от их статуса GLP. Это может позволить избежать необходимости использовать лишних животных для анализа.

4 Критерии выбора животных

Используемые животные должны быть четко определены с точки зрения состояния здоровья, фертильности, плодовитости, распространенности аномалий развития, эмбриофетальной смертности и стабильности характеристик от исследования к исследованию. В рамках одного и нескольких исследований животные должны быть сравнимого возраста, массы тела и количества приплодов на начало исследования. Самый простой способ удовлетворить этим критериям — использовать молодых животных, достигших половой зрелости на момент спаривания, а самки должны быть неоплодотворенными.

4.1 Выбор вида и количество животных

Исследования надлежит проводить на млекопитающих. Как правило, желательно использовать животных того же вида и линии, что и в других токсикологических исследованиях. Самым распространенным биологическим видом при проведении исследований являются крысы в силу практичности, сравнимости с другими результатами, полученными для данного вида животных, и большой базе накопленных знаний по данному биологическому виду.

В исследованиях эмбриотоксичности традиционно использовался второй вид млекопитающих, чаще всего, кролики, поскольку они не относятся к отряду грызунов. Причины использования кроликов для исследований эмбриотоксичности включают обширный запас накопленных знаний, а также доступность и практичность данного биологического вида. Если кролики для данного вида испытаний не подходят, в индивидуальном порядке подбирается другой вид животных, не относящихся к отряду грызунов либо другой вид грызунов (примечание 5).

Примечание 5 (2.1) — Выбор вида и линии животных.

При выборе вида и линии животного для проведения исследований репродуктивной токсичности следует с осторожностью подходить к выбору подходящей модели. Правильный выбор вида и линии животного для других токсикологических исследований может позволить избежать необходимости проведения дополнительных предварительных исследований. Если по результатам кинетических, фармакологических и токсикологических данных видно, что выбранный вид животного представляет собой подходящую модель для человека, может быть достаточно использования животных одного вида. Использовать второй вид животных нецелесообразно, если он не имеет аналогичных черт сходства с характеристиками человека. Преимущества и недостатки каждого вида (линии) животных следует рассматривать в контексте исследуемого вещества, выбранного дизайна исследования и последующей интерпретации результатов.

Все виды имеют свои преимущества. Крысы и в меньшей степени мыши — удачные модели для исследований общего характера. Кроликов, как вид не относящийся к отряду грызунов, реже используют для проведения исследований токсичности многократных доз и других исследований репродукции, в отличие от испытаний эмбриотоксичности. У кролика есть характеристики, которые способны сделать его удачной моделью для исследований фертильности, особенно оплодотворяющей способности самцов. При исследованиях на кроликах и собаках (которые часто используются в качестве второго вида в испытаниях хронической токсичности) целесообразно получать образцы спермы, не прибегая к болезненным методам (электроэякуляция) при проведении динамического анализа спермы. Большинство других видов животных нельзя назвать удачными универсальными моделями, их лучше всего использовать только для специфических исследований.

У всех животных имеются свои преимущества, например:

Крысы: чувствительны к половым гормонам, непригодны для анализа агонистов допамина в связи с зависимостью от пролактина в качестве основного гормона для установления и поддержания беременности на ранних сроках, высокочувствительны к нестероидным противовоспалительным препаратам на поздних сроках беременности.

Мыши: высокая скорость метаболизма, чувствительность к стрессу, наиболее заметны кластеры мальформаций (возникающие у всех видов животных), малый размер плода.

Кролики: часто недостаточно данных о кинетике и токсичности, восприимчивы к некоторым антибиотикам и к нарушению на уровне пищеварительного тракта, клинические признаки бывает трудно интерпретировать.

Морские свинки: часто отсутствие данных о кинетике и токсичности, восприимчивость к некоторым антибиотикам и нарушение пищеварительного тракта, длительный эмбриональный период, недостаточность исторических данных.

Домашние свиньи и/или мини-свиньи: кластеры мальформации с различной фоновой частотой, большое количество необходимого вещества, необходимо большое пространство для содержания, недостаточно исторических данных.

Хорьки: животные с ограниченным периодом спаривания при отсутствии специальных систем ухода (успех во многом зависит от взаимодействия между человеком и животным), недостаточность исторических данных.

Хомяки: внутривенный путь введения затруднен и почти невозможен, дозы могут оставаться в щечных мешках, животные могут быть очень агрессивны, для них характерны нарушения работы кишечника, дают чрезмерный тератогенный ответ на многие препараты, малый размер плода.

Собаки: животные с ограниченным периодом спаривания, имеются факторы инбридинга, недостаточно исторических данных.

Приматы: по кинетическим характеристикам они могут отличаться от человека не менее, чем другие виды, недостаточно исторических данных, зачастую их слишком мало для выявления риска. Лучше всего их использовать скорее для характеристики относительно известных веществ с токсическим воздействием на репродуктивную систему, чем для того, чтобы выявить опасность.

4.2 Другие тест-системы

Другие тест-системы считают любыми развивающимися клеточными системами из клеток млекопитающих или не млекопитающих тканей, органов либо культур организмов, развивающихся независимо *in vitro* либо *in vivo*. В интеграции с исследованиями на животных либо в целях приоритетного выбора с гомологичными сериями либо в качестве вторичных исследований для определения механизмов действия эти системы способны дать бесценную информацию и косвенно снизить количество животных, использованных в эксперименте. Однако им недостает сложности процессов развития и динамического обмена между организмами матери и плода. Эти системы не могут обеспечить отсутствие эффекта либо обеспечить перспективу с точки зрения риска/воздействия. Иными словами, не существует тест-систем альтернативных животным, доступным в настоящее время в рамках проведения тестов репродуктивной токсичности, проводимых в целях, изложенных в введении (примечание 6).

Примечание 6 (2.2) — Использование других тест-систем.

Другие тест-системы были разработаны и использовались в рамках предварительных исследований («прескрининг» либо выбор приоритетов) и вторичных испытаний.

Для предварительного исследования различных аналоговых серий веществ важно, чтобы потенциальный исход для целых животных был известен хотя бы для одного члена изучаемой серии (подразумевается, что эффекты ожидаемы). При помощи данной стратегии можно осуществлять выбор веществ для испытаний более высокого уровня.

Для вторичных испытаний либо дальнейшей характеристики другие тест-системы обеспечивают возможность более подробного изучения некоторых наблюдаемых процессов развития, например, для выявления специфических механизмов токсичности, установления взаимосвязи между концентрацией и ответом, выбора «чувствительных» периодов либо выявления эффектов определенных метаболитов.

5 Общие рекомендации относительно выбора режима воздействия

5.1 Дозировки

Выбор дозировок — одна из наиболее критичных проблем при составлении дизайна исследования репродуктивной токсичности. Выбор высоких доз следует основывать на данных существующих исследований (исследования фармакологии, острой и хронической токсичности и кинетических исследований, примечание 7). Исследование токсичности при многократном введении продолжительностью около 2—4 недель обеспечивает близкую аппроксимацию продолжительности терапии в исследованиях репродуктивной функции с сегментированным дизайном. В случае, если не существует достаточной информации, рекомендуется проведение предварительных исследований (см. примечание 4).

Примечание 7 (3.1) — Выбор дозировок.

Использование в исследованиях репродуктивной токсичности аналогичных доз как и в исследованиях токсичности многократных доз позволит осуществить интерпретацию любых потенциальных эффектов на фертильность в контексте общей системной токсичности.

Ожидается индукция минимальной токсичности у матерей, получающих высокие дозы.

В зависимости от специфического вещества факторы, ограничивающие высокую дозировку, определенные в исследованиях токсичности высоких доз либо в предварительных исследованиях репродукции, могут включать в себя:

- снижение темпов прибавки массы тела;
- рост темпа увеличения массы тела, особенно в связи с нарушением механизмов гомеостаза;
- специфическая токсичность целевого органа;
- результаты общего анализа крови, биохимического анализа;
- чрезмерно увеличенный фармакологический ответ, который может быть определен или не определен в виде выраженных клинических реакций (например, седация, судороги);
- физико-химические свойства исследуемого вещества или дозированной лекарственной формы, которая, в сочетании с путем введения, может накладывать практические ограничения на вводимое вещество. Во многих случаях адекватной предельной дозой может быть 1 г/кг/сут.;
- кинетические свойства могут принести пользу при определении воздействия высоких доз веществ с низкой токсичностью. Однако имеется мало смысла в повышении дозировки, если это не приводит к повышению концентрации в плазме либо ткани;
- выраженный рост эмбриофетальной летальности в предварительных исследованиях.

После определения высокой дозы следует определять более низкие дозировки в нисходящем порядке. Их интервалы должны зависеть от кинетических и иных факторов токсичности. Несмотря на то, что желательно определить «уровень дозы без наблюдаемых нежелательных эффектов», приоритет следует отдавать установлению интервалов достаточно близких для определения возможного характера изменений, связанного с дозировками (примечание 8).

Примечание 8 (3.1) — Определение взаимосвязи доза—ответ.

Для многих переменных в исследованиях репродукции снижена способность различения случайных колебаний и эффекта терапии, и присутствие либо отсутствие тенденции в отношении дозировки может быть критически важным способом определения вероятности эффекта терапии. Следует учитывать, что в данных исследованиях дозозависимый ответ может быть резким, а введение интервалов между дозами — нежелательным. Если в рамках одного исследования предполагается попытка проведения анализа взаимосвязи доза—ответ для наблюдаемых эффектов, рекомендуется использовать минимум три уровня доз и соответствующие контрольные группы. В случае сомнений должна быть добавлена четвертая группа дозирования во избежание чрезмерно больших интервалов между дозами. Такая стратегия приведет к достижению «уровня отсутствия наблюдаемых видимых эффектов» для репродуктивных аспектов исследования. В противном случае предполагается, что исследуемое вещество требует более глубокого изучения и проведения дальнейших исследований.

5.2 Путь и частота введения

В целом путь или пути введения должны быть аналогичны предполагаемым путям введения у человека. Один путь введения может быть приемлем, если можно показать аналогичные характеристики распределения (кинетический профиль) по сравнению с другими путями введения (примечание 9).

Обычная частота введения — один раз в сутки, но следует учитывать возможность использования более или менее частой кратности введения с учетом кинетических переменных (см. также примечание 10).

Примечание 9 (3.2) — Воздействие разных путей введения.

Если по существующим данным один путь введения приводит к более высокой нагрузке на организм, например, площади под кривой (AUC), нерационально проводить исследования других путей введения, приводящих к меньшей нагрузке на организм или представляющих серьезные практические трудности (например, ингаляционный путь введения). Прежде чем планировать новые исследования другого пути введения следует использовать имеющиеся данные о кинетике для установления необходимости проведения еще одного исследования.

5.3 Кинетика

Желательно иметь некоторую информацию по кинетическим характеристикам до начала исследований репродуктивной функции, поскольку это может свидетельствовать о необходимости коррекции выбора животного, дизайна исследования и схемы дозирования. На данном этапе информацию не следует подделывать или получать у самок в период беременности или лактации.

На этапе оценки исследования может потребоваться дополнительная информация о кинетических характеристиках у самок в период беременности или лактации в соответствии с полученными результатами (примечание 10).

Примечание 10 (3.3) — Кинетика у беременных животных.

Кинетические исследования на самках в период беременности и лактации могут повлечь за собой определенные проблемы, связанные с быстрыми изменениями физиологических характеристик. Лучше всего решить эту проблему в рамках двух- или трехфазного подхода. При планировании исследований кинетики (часто на небеременных самках) следует рассмотреть информацию об общей пригодности вида, что может помочь в разработке дизайна исследования и выбора дозировки. В рамках исследования кинетические исследования обеспечивают возможность точного дозирования и указывают на выраженные отклонения от ожидаемых значений.

5.4 Контрольная группа

Рекомендовано использовать для контрольных животных ту же схему дозирования основы, что и для группы испытуемых животных. Если основа может вызвать эффекты либо повлиять на действие испытуемого вещества, следует рассмотреть возможность использования второй контрольной группы животных (симуляция либо не получающие терапии животные).

6 Предлагаемый дизайн исследований — комбинация исследований

При определении наиболее подходящей стратегии и выборе дизайна исследования следует учитывать все существующие фармакологические, кинетические или токсикологические данные для исследуемого вещества и аналогичных веществ. Предположительно изначально предпочтение будет отдаваться дизайну без чрезмерных отличий от установленного руководства медицинских препаратов (наиболее вероятный вариант). Для большинства лекарственных средств дизайна, включающего 3 исследования, обычно бывает достаточно. Другие стратегии, комбинации исследований и дизайны исследований могут быть столь же применимы либо более применимы, чем «наиболее вероятный вариант», в зависимости от обстоятельств. Ключевой фактор заключается в том, что в целом они не оставляют никаких зазоров между этапами и позволяют проводить прямую либо косвенную оценку всех этапов процесса репродукции (примечание 11).

Следует предоставить обоснование дизайна.

Примечание 11 (4) — Примеры выбора других вариантов.

В случае компонентов, не вызывающих летальности при дозировке 2 г/кг и отсутствии признаков токсичности при многократном приеме в дозе 1 г/кг видится достаточным проведение одного исследования на животных двух поколений с одним контрольным препаратом и 2 исследуемыми группами (0,5 и 1,0 г/кг). Однако может возникнуть вопрос о правильном выборе биологического вида и об эффективности препарата.

Для веществ, применяемых однократно, один раз в жизни (например, диагностические препараты, препараты, используемые при операциях) может оказаться невозможным введение повторных доз более чем в два раза превышающих терапевтическую дозировку для человека в течение любого периода времени. Сокращенный период терапии с возможностью введения более высокой дозы видится более целесообразным. Для самок учет обстоятельств воздействия на человека предполагает отсутствие необходимости воздействия на организм после эмбрионального периода развития плода.

Для агонистов допамина либо веществ, снижающих уровень циркулирующего пролактина самки крыс — неудачные модели. Для всех исследований репродуктивной токсичности более удачным вариантом выбора являются кролики, но таких попыток не предпринималось. Это также относится к другим типам веществ, в случае которых характеристики метаболизма у кроликов значительно ближе к человеческим, чем у крыс.

Для препаратов, в отношении которых изменение кинетических свойств в плазме наблюдается после многократного приема, потенциальное нежелательное воздействие на эмбриофетальное развитие может быть не полностью проанализировано в исследованиях, в соответствии с пунктом 4.1.3 В таких случаях может потребоваться продление периода терапии препаратом самок в п. 4.1.1 исследования до 17 дней. При умерщвлении самок к сроку родов можно провести анализ фертильности и эмбриофетального развития.

6.1 Наиболее вероятный дизайн

Наиболее вероятный вариант может быть отождествлен с комбинацией исследований для изучения воздействия на:

- фертильность и раннее эмбриональное развитие;

- пренатальное и постнатальное развитие, включая материнскую функцию;
- эмбриофетальное развитие.

6.1.1 Исследование фертильности от раннего эмбрионального развития до имплантации

ЦЕЛЬ

Исследовать токсические эффекты/нарушения, связанные с лечением накануне спаривания (самок/самцов), во время спаривания и имплантации. Сюда входит оценка этапов А и В процесса репродукции (см. 1.2). Для самок надлежит определять воздействие на течный цикл, прохождение через маточные трубы, имплантацию и развитие на предимплантационной стадии эмбрионального развития. Для самцов следует обеспечить возможность выявления функциональных эффектов (например, на либидо, созревание сперматозоидов эпидидимиса), которые могут быть не выявлены в ходе гистологического исследования репродуктивных органов самцов (примечание 12).

ОЦЕНКА

- созревания гамет;
- брачного поведения;
- фертильности;
- предимплантационных стадий развития эмбриона;
- имплантации.

ЖИВОТНЫЕ

Минимум один вид, предпочтительно крысы.

КОЛИЧЕСТВО ЖИВОТНЫХ

Количество животных каждого пола в группе должно быть достаточным для обеспечения полноценной интерпретации данных (примечание 13).

ПЕРИОД ВВЕДЕНИЯ

Дизайн предполагает, что особенно в отношении воздействия на сперматогенез, будут использоваться данные исследований токсичности многократных доз подолжительностью не менее одного месяца. Учитывая отсутствие эффектов, препятствующих этому, можно проводить терапию в период перед спариванием продолжительностью 2 недели для самок и 4 недели для самцов (примечание 12). Выбор продолжительности периода перед спариванием должен быть утвержден и обоснован (см. также главу, с указанием на необходимость исследований). Терапия должна продолжаться в течение всего периода спаривания до конца периода спаривания у самцов и минимум до конца имплантации у самок. Это позволит оценить функциональное воздействие на способность к оплодотворению самцов, которую невозможно определить методом гистологического анализа в рамках исследований токсичности многократных доз, а также воздействие на поведение при спаривании животных обоих полов. Если данные других исследований показывают на наличие влияния на массу тела либо гистологические характеристик репродуктивных органов самцов или самок, либо при сомнительном качестве обследований, при отсутствии данных других исследований, следует провести более полное исследование (примечание 12).

СПАРИВАНИЕ

Соотношение при спаривании 1:1 оптимально, процедуры должны обеспечивать возможность идентификации обоих родителей в одном помете (примечание 14).

УМЕРЩВЛЕНИЕ ПО ЗАВЕРШЕНИИ ИССЛЕДОВАНИЯ

Самок можно умертвить на любом этапе после середины беременности.

Самцов можно умерщвлять в любой момент после спаривания, но прежде чем идти на этот бесповоротный шаг, желательно убедиться в успешности зачатия (примечание 15).

НАБЛЮДЕНИЯ

Во время исследования:

- признаки изменений и смертность минимум один раз в сутки;
- масса тела и изменение массы тела минимум два раза в неделю (примечание 16);
- прием пищи минимум один раз в неделю (кроме периода спаривания);
- регистрация результатов вагинальных мазков ежедневно, как минимум во время периода спаривания, чтобы установить наличие воздействия на спаривание либо прекоитальный период;
- наблюдения, которые были значимыми в рамках других исследований токсичности.

На этапе последнего осмотра:

- некропсия (макроскопическое обследование) всех взрослых животных;
- сохранение органов благодаря макроскопическому обследованию возможной гистологической оценки, сохранение соответствующих органов контрольных животных для сравнения;

- сохранение семенников, придатков яичек, яичников и матки всех животных на предмет возможного гистологического анализа и оценки в индивидуальном порядке. После завершения исследования и подготовки отчета ткани можно уничтожить;
- количество сперматозоидов в придатках яичек и семенниках, а также жизнеспособность сперматозоидов;
- количество желтых тел, участки имплантации (примечание 16);
- живые и мертвые оплодотворенные яйцеклетки.

Примечание 12 (4.1.1) — Терапия в период до спаривания.

Дизайн исследования фертильности, особенно в части сокращения периода до спаривания у самцов основан на накопленных данных и переоценке основного исследования процесса сперматогенеза, изначально приведшего к повышению спроса на период терапии в период до спаривания. Вещества, индуцирующие селективное воздействие на репродуктивную функцию самцов, встречаются редко, а спаривание с самками — нечувствительный способ выявления воздействия на сперматогенез, надлежащий патологический и гистопатологический анализ (например, методом фиксации Буэна, заливки парафином, поперечных срезов толщиной 2—4 микрон для яичек, продольных срезов для придатков яичек, PAS и окрашивания гематоксилином) репродуктивных органов самцов представляет собой более чувствительное и быстрое средство выявления воздействия на сперматогенез, вещества, оказывающие воздействие на сперматогенез, практически неизменно повлияют на постмейотические этапы. Отсутствуют безусловные примеры вещества с токсическим воздействием на репродуктивную функцию самцов, воздействие которых может быть выявлено только путем терапии самцов в течение 9—10 недель и спаривания их с самками.

Информация о потенциальном воздействии на сперматогенез может быть получена на основании исследований токсичности многократных доз. Это позволяет сконцентрировать исследования в рамках анализа фертильности на других более прямых причинах эффекта. Предполагается, что продолжительность сперматогенеза (включая созревание сперматозоидов) у крыс составляет 63 дня. При наличии или отсутствии свидетельств размер исследования в рамках исследования фертильности должен быть увеличен или расширен от выявления до характеристики, для дальнейшей характеристики эффектов должны быть разработаны соответствующие исследования.

Примечание 13 (4.1.1, 4.1.2, 4.1.3) — Количество животных.

Существует очень мало научных оснований для определения размера групп в прошлых и нынешних руководствах, включая это. Указанные количества представляют собой обоснованные предположения, учитывающие максимальный размер исследования, которое может быть проведено без неконтролируемой потери контроля над исследованием. На это указывает тот факт, что чем дороже животное в покупке или содержании, тем меньше предположительный размер группы. В идеале размер группы должен быть одинаков для всех видов животных и должно отдаваться предпочтение использованию большего количества животных менее часто используемым видам, таким как приматы.

Также следует пояснить, что необходимое количество зависит от того, ожидается ли эффект в группе или нет. Для эффектов, проявляющихся с высокой частотой необходимо мало животных. Для подтверждения отсутствия эффекта необходимое количество животных зависит от анализируемой переменной (конечной точки), а распространенности анализа в контрольных популяциях (редкие или категоричные явления) либо дисперсия вокруг основной тенденции (непрерывные либо полунепрерывные переменные). См. также примечание 23.

Во всех явлениях, кроме наиболее редких (таких как пороки развития, аборты, полная потеря помета), оценка 16—20 пометов грызунов и кроликов обеспечивает необходимую степень соответствия между исследованиями. При количестве пометов менее 16 для каждой оценки между результатами исследований нет соответствия, а при количестве пометов свыше 20—24 на группу не удается добиться повышения соответствия между исследованиями. Количество связано с оценкой. При делении групп для различных оценок количество животных на начало исследования должно быть удвоено. Аналогично в исследованиях с 2 поколениями необходимо 16—20 пометов для финальной оценки пометов поколения F1. Для учета естественной убыли изначальный размер группы в поколении F0 должен быть выше.

Примечание 14 (4.1.1) — Спаривание.

Соотношение при спаривании: если терапию получают животные обоих полов или если они одинаково учитываются в отдельных исследованиях на самцах и самках, оптимальное соотношение при спаривании составляет 1:1, поскольку это наиболее безопасный способ достижения надлежащей частоты беременности во избежание неправильного анализа и интерпретации результатов.

Период и практика спаривания: в большинстве лабораторий период спаривания составляет 2—3 недели, некоторые исследователи изымают самок как только будет достигнут положительный результат вагинального мазка или пробка, а другие оставляют пары вместе. Большинство крыс спариваются в первые 5 дней совместного нахождения (т. е. во время первой течки), но в некоторых случаях у самок может отмечаться псевдобеременность. При оставлении таких самок с самцом приблизительно на 20 дней у самок начинается новый течный цикл и наступает беременность.

Примечание 15 (4.1.1) — Умерщвление по завершении исследования.

САМКИ

В случае, если воздействие на самок снижается на этапе имплантации, самок умерщвляют на 13—15-й день беременности, что достаточно для оценки воздействия на фертильность или репродуктивную функцию, например, для дифференцирования между участками имплантации и резорбции.

В целом для выявления нежелательных эффектов в исследованиях фертильности считается нецелесообразным умерщвлять самок на 21 день беременности для получения информации о поздней потере эмбриона, внутриутробной смерти и структурных пороках развития.

САМЦЫ

Желательно отложить умерщвление самцов до момента, когда станет известен исход спаривания. В случае неоднозначного результата самцов спаривают с не получавшими терапии самками для подтверждения их способности или неспособности к оплодотворению. Самцы, получавшие терапию в рамках части исследования 4.1.1 также могут использоваться для оценки токсичности репродуктивной системы, если дозирование продолжается после спаривания и умерщвление откладывается на более позднее время.

Примечание 16 (4.1.1, 4.1.2, 4.1.3) — Наблюдения.

Ежедневное взвешивание беременных самок в течение всего периода терапии обеспечивает получение полезной информации. Для некоторых веществ также рекомендуется взвешивание животных чаще чем два раза в неделю в течение других периодов, кроме беременности (до спаривания, во время спаривания, в период лактации).

Для очевидно не беременных крыс или мышей (но не кроликов) окрашивание матки аммония сульфидом может быть целесообразно для определения смертности эмбрионов в период имплантации.

6.1.2 Исследование эффектов на пре- и постнатальное развитие, включая функции матери

ЦЕЛЬ

Выявить нежелательные эффекты у самок в период беременности/лактации и на развитие плода и потомства после воздействия на самку препарата от времени имплантации до отлучения потомства от матери. Поскольку проявления воздействия, индуцированного в данный период, могут привести к отложенным эффектам, наблюдение должно продолжаться до половой зрелости (т. е. этапов C-F в разделе 1.2) (примечания 17, 18).

НЕЖЕЛАТЕЛЬНЫЕ ЭФФЕКТЫ, ПОДЛЕЖАЩИЕ ОЦЕНКЕ:

- более высокая токсичность, по сравнению с не беременными самками;
- пред- и постнатальная смертность потомства;
- изменение характеристик роста и развития;
- функциональный дефицит потомства, включая поведение, созревание (половая зрелость) и репродукция (F1).

ЖИВОТНЫЕ

Минимум один вид, предпочтительно крысы;

КОЛИЧЕСТВО ЖИВОТНЫХ

Количество животных каждого пола, в каждой группе должно быть достаточным для значимой интерпретации данных (примечание 13).

ПЕРИОД ВВЕДЕНИЯ ПРЕПАРАТОВ

Самкам вводят исследуемое вещество от имплантации до конца периода лактации (т. е. этапы C-E, пункт 1.2)

ПРОЦЕДУРА ПРОВЕДЕНИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Самкам дают возможность родить и вырастить потомство до момента отлучения от матери, после чего один самец и одна самка из потомства каждого помета должны быть выбраны (в соответствии с методом документации) для выращивания до взрослого возраста и периода спаривания для оценки способности к спариванию (примечание 19).

НАБЛЮДЕНИЯ

Во время исследования (самки животных):

- признаки изменений и смертность минимум один раз в сутки;
- масса тела и изменение массы тела минимум два раза в неделю (примечание 16);
- прием пищи минимум один раз в неделю минимум до родов;
- наблюдения, которые были значимыми в рамках других исследований токсичности;
- продолжительность беременности;
- роды.

На этапе последнего осмотра (для самок-матерей и, если это применимо, для потомства):

- некропсия (макроскопическое обследование) всех взрослых животных;
- сохранение органов благодаря макроскопическому обследованию возможной гистологической оценки, сохранение соответствующих органов контрольных животных для сравнения;
- количество имплантаций (примечание 16);
- пороки развития;
- живое потомство при рождении;
- мертвое потомство при рождении;
- масса тела при рождении;
- выживаемость до и после отлучения от матери и рост/масса тела (примечание 20);
- половое созревание и фертильность;
- физическое развитие (примечание 21);
- сенсорные функции и рефлексы (примечание 21);
- поведение (примечание 21).

Примечание 17 (4.1.2) — Терапия потомства.

Вследствие составления на основе существующих рекомендаций для лекарственных средств, настоящий стандарт полностью не охватывает воздействие препарата от момента отлучения от матери до достижения половой зрелости и не касается темы вероятного снижения продолжительности репродуктивного периода жизни.

Для выявления нежелательных явлений вследствие применения лекарственных средств, предназначенных для применения у младенцев и детей младшего возраста, следует рассмотреть возможность проведения специальных исследований (индивидуальный дизайн) с прямым терапевтическим воздействием на потомство во всех установленных возрастных категориях.

Примечание 18 (4.1.2) — Отдельные исследования эмбриотоксичности и пре- постнатальные исследования.

Если пре- или постнатальное исследование разделено на два исследования, одно из которых охватывает эмбриональный период, а другое — плодный период, рождение и лактацию. В обоих исследованиях необходима постнатальная оценка потомства.

Примечание 19 (4.1.2) — Животные поколения F1.

Руководство предполагает выбор одного самца и одной самки в каждом помете на основании целесообразности выполнения анализов поведения и других функциональных тестов на тех же животных поколения F1, что и используемые для оценки репродуктивной функции. Это предполагает наличие преимущества перекрестных ссылок на результаты различных тестов в индивидуальном порядке. Однако признается, что некоторые лаборатории предпочитают выбирать отдельные группы животных для анализа поведения и оценки репродуктивной функции. Какие животные оптимально подходят для индивидуальной лаборатории зависит от сочетания используемых тестов и доступных ресурсов.

Примечание 20 (4.1.2) — Снижение размера помета.

Ценность отбора или отсутствия отбора животных для выявления воздействия на репродуктивную функцию по-прежнему подлежит обсуждению. Проводится отбор или нет, исследователь должен предоставить соответствующее обоснование.

Примечание 21 (4.1.2) — Физическое развитие, сенсорные функции, рефлексы и поведение.

Лучшим индикатором физического состояния здоровья является масса тела. Прохождение определенных этапов развития, предшествующих отлучению от матери, таких как развертывание ушной раковины, рост шкуры, прорезывание резцов и т. д. в высокой степени коррелирует с массой тела помета. Данный показатель в большей степени коррелирует с посткоитальным временем, чем с постнатальным временем, по крайней мере, в случае возникновения существенных различий в продолжительности

гестационного периода. Рефлексы, установочный осязательный рефлекс, слуховой рефлекс испуга, лабиринтный установочный рефлекс и световой рефлекс также зависят от физического развития.

Два рекомендуемых для оценки этапа развития после отлучения от матери — открытие влагалища у самок и сегментация железы крайней плоти у самцов. Последнее связано с повышением уровня тестостерона в отличие от опущения яичек. Эти контрольные точки свидетельствуют о наступлении половой зрелости, и предполагается, что массу тела регистрируют на этапе достижения определенного возраста с целью установления специфичности или соотнесенности с общим ростом возможных отличий от контрольных животных.

Функциональные тесты: до настоящего времени функциональные тесты почти полностью были направлены на оценку поведения. Несмотря на то, что было потрачено огромное количество усилий в данном направлении, не представляется возможным давать рекомендации специфических методик проведения тестов. Исследователям рекомендуют находить методы, которые позволят оценить сенсорные функции, моторную активность, обучаемость и память.

6.1.3 Исследование воздействия на эмбриофетальное развитие

ЦЕЛЬ

Выявить нежелательное воздействие на беременных самок и развитие эмбриона и плода вследствие воздействия на самку от этапа имплантации до закрытия твердого неба (т. е. стадии C-D, представленные в разделе 1.2).

НЕЖЕЛАТЕЛЬНЫЕ ЭФФЕКТЫ, ПОДЛЕЖАЩИЕ ОЦЕНКЕ:

- более высокая токсичность, по сравнению с небеременными самками;
- эмбриофетальная смертность;
- изменение характеристик роста;
- структурные изменения.

ЖИВОТНЫЕ

Обычно используют два вида животных — грызунов, предпочтительно — крыс и одного вида, не относящегося к отряду грызунов, предпочтительно кроликов (примечание 5). При использовании одного вида животных должно быть дано обоснование.

КОЛИЧЕСТВО ЖИВОТНЫХ

Количество животных должно быть достаточным для полноценной интерпретации данных (примечание 13).

ПЕРИОД ВВЕДЕНИЯ

Период введения продолжается от момента имплантации до закрытия твердого неба (т. е. конец стадии C) — см. раздел 1.2.

ПРОЦЕДУРА ПРОВЕДЕНИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Самки должны быть умерщвлены, их обследование должно быть проведено приблизительно за день до родов. Все плоды должны быть обследованы на предмет жизнеспособности и пороков развития. В целях последующей оценки взаимосвязи между наблюдениями, сделанными при помощи различных технологий, идентификацию плодов следует проводить в индивидуальном порядке (примечание 22).

При использовании технологий, требующих распределения для проведения отдельных исследований мягких тканей или скелетных изменений, оптимальнее всего 50 % плодов из каждого помета распределять в группу обследования скелета. Минимум 50 % плодов должны пройти исследование на предмет пороков развития внутренних органов независимо от использовавшейся технологии. При использовании технологий свежего микрохирургического надреза на предмет порока развития мягких тканей, что является предпочтительным методом для кроликов, 100 % приплода кроликов следует исследовать на предмет пороков развития мягких тканей или скелета.

НАБЛЮДЕНИЯ

Во время исследования (самки животных):

- признаки изменений и смертность минимум один раз в сутки;
- масса тела и изменение массы тела минимум два раза в неделю (примечание 16);
- прием пищи минимум один раз в неделю;
- наблюдения, которые были значимыми в рамках других исследований токсичности.

На этапе последнего осмотра:

- некропсия (макроскопическое обследование) всех взрослых животных;
- сохранение органов благодаря макроскопическому обследованию возможной гистологической оценки, сохранение соответствующих органов контрольных животных для сравнения;
- количество желтых тел, количество живых и мертвых имплантаций (примечание 16);
- масса тела отдельных плодов;

- пороки развития плодов (примечание 22);
- макроскопическое обследование плаценты.

Примечание 22 (4.1.3) — Индивидуальная идентификация и оценка плодов.

Должна быть возможность связать все результаты при помощи разных технологий (т. е. масса тела, внешний осмотр, анализ внутренних органов и/или скелета) с отдельными образцами для выявления характеристик пороков развития. Осмотр плодов, получавших препарат в средних и низких дозах, на предмет нарушений внутренних органов и/или скелета может не потребоваться, если оценка животных, получавших препарат в высокой дозе и контрольных групп животных не выявила значимых различий. Однако желательно хранить зафиксированные образцы для возможного последующего анализа. Если в норме используются технологии свежего иссечения, предположительно могут возникнуть трудности с дальнейшими сравнениями с использованием фиксированных плодов.

6.2 Дизайн единственного исследования (грызуны)

Если период дозирования в рамках исследования фертильности, пре- и постнатального исследования сочетают в рамках единого расследования, это включает оценку этапов A-F процесса репродукции (см. раздел 1.2). Если подобное исследование, при условии включения в него исследований плодов, дало бы определенно отрицательные результаты при достаточно высоком уровне воздействия, дополнительных исследований на крысах не требуется. Исследования плодов на предмет структурных пороков развития также можно дополнить исследованием (или исследованиями) эмбриофетального развития в рамках подхода, включающего 2 исследования (примечания 3, 11).

Предполагается получение результатов исследования воздействия на эмбриофетальное развитие второго вида (см. также 4.1.3).

6.3 Дизайн двойного исследования (грызуны)

Простейший двухсегментный дизайн состоит из исследования фертильности и исследования пре- и постнатального развития, включающего исследование плодов. Однако можно предположить, что если исследование пре- и постнатального развития не давало указаний на пренатальные эффекты при достаточном уровне воздействия сверх воздействия на человека, дополнительные исследования плодов (4.1.3) скорее всего не обеспечат серьезных изменений оценки риска.

В качестве альтернативы, терапия самок в исследовании фертильности (4.1.1) может быть продолжена до закрытия твердого неба, плоды могут быть исследованы в соответствии с процедурами исследования эмбриофетального развития (4.1.2). Следует обеспечить все необходимые исследования в рамках «наиболее вероятного варианта», но с использованием значительно меньшего числа животных (примечания 3, 11).

Должны быть получены результаты исследования эффектов эмбриофетального развития у второго вида животных (см. также раздел 4.1.3).

7 Статистика

Интерпретация результатов исследования проводится при помощи статистического анализа. Самая важная часть анализа состоит в установлении взаимосвязи между различными переменными и их распределение (описательная статистика), поскольку при помощи данных методик можно определить принципы сравнения групп. Распределение конечных точек, наблюдаемое в испытаниях репродуктивной токсичности, обычно является неправильным и продолжается от почти непрерывного до предельно категорического.

При использовании статистики вывода (определение статистической значимости), в качестве основной единицы сравнения должны использоваться пара животных либо помет, но не плоды или новорожденные. Используемые испытания должны быть обоснованными (примечание 23).

Примечание 23 (5) — Статистика вывода.

Анализы «значимости» (статистика вывода) могут быть использованы только в качестве вспомогательного средства при интерпретации результатов. Интерпретация результатов должна быть основана на биологической связи. Неразумно предполагать, что отличие от контрольных значений не является биологически значимым просто потому, что не является «статистически значимым». В меньшей степени неразумно предполагать, что «статистически значимое» различие должно быть биологически значимым. Особенно в отношении явлений, возникающих с низкой частотой (например, смерть в эмбриональный период развития, пороки развития). При одностороннем распределении статистическая мощность исследований низка. Доверительные интервалы для аналогичного количества могут указывать на воз-

можный масштаб эффекта. При применении статистических процедур следует рассматривать экспериментальные единицы сравнения: помет, а не индивидуальные плоды зачатия, пары спаривания, а при терапии животных обоих полов спаривающаяся пара поколения отцов в рамках исследования двух поколений.

8 Представление данных

Для надлежащего отчета необходимо четкое и краткое табличное представление индивидуальных значений, учитывающее показатели всех животных, вошедших в исследование. Читатель должен иметь возможность проследить историю отдельных животных от начала до конца исследования и должен с легкостью вычислить тот вклад, который внесло каждое животное в сводные результаты группы. Сводные результаты для группы должны быть представлены в биологически обоснованной форме (т. е. без ложной прецизионности), с отражением распределения переменных. Приложения или табличное представление индивидуальных значений, таких как масса тела, потребление пищи, размер помета, должны быть краткими и по возможности включать абсолютные значения, а не расчетные величины. Следует избегать ненужного дублирования данных.

Для табличного представления наблюдений, отмечавшихся с низкой частотой, таких как клинические признаки, результаты аутопсии, пороки развития и т. д. желательно сгруппировать вместе (нескольких) животных с положительными результатами. В частности, представление данных о структурных изменениях (пороки развития плода) основной список (табулированный) должен четко отражать пометы с плодами с врожденными пороками, с указанием плодов с нарушениями и с отражением всех изменений, наблюдавшихся у пораженных плодов. По этой информации при необходимости можно создать вторичный список по типу изменений.

9 Изучение токсического действия на мужскую репродуктивность

9.1 Исследование фертильности и периода от раннего эмбрионального развития до имплантации

ПЕРИОД ВВЕДЕНИЯ

Предполагается, что особенно в части воздействия на сперматогенез, будут использованы существующие данные об исследованиях токсичности (например, гистопатологические анализы, масса репродуктивных органов, в некоторых случаях гормональные анализы и данные генотоксичности). Учитывая отсутствие эффектов в рамках исследований токсичности многократных доз продолжительностью минимум 2 недели, препятствующих этому, может быть использован интервал терапии до спаривания продолжительностью 2 недели для самок и 2 недели для самцов (примечание 12). Выбор продолжительности периода введения до спаривания должен быть установлен и обоснован. Терапия должна продолжаться в течение всего периода спаривания до окончания процесса спаривания у самцов и минимум до имплантации у самок. Это позволит провести оценку функционального воздействия на мужскую фертильность, неопределимую по результатам гистопатологического исследования в исследованиях токсичности повторных доз и влияние поведения при спаривании для участников обоих полов. Если данные других исследований указывают на наличие воздействия на массу и гистологические характеристики репродуктивных органов у самцов и самок либо в случае сомнительного качества других исследований следует рассмотреть возможность проведения более полного исследования (примечание 12).

НАБЛЮДЕНИЕ

На этапе последнего исследования:

- некропсия (макроскопическое обследование) всех взрослых животных;
- сохранение органов благодаря макроскопическому обследованию возможной гистологической оценки, сохранение соответствующих органов контрольных животных для сравнения;
- сохранение семенников, придатков яичек, яичников и матки всех животных на предмет возможного гистологического анализа и оценки в индивидуальном порядке. После завершения исследования и подготовки отчета ткани можно уничтожить;
- количество желтых тел, участки имплантации (примечание 16);
- живые и мертвые оплодотворенные яйцеклетки.

Анализ спермы может использоваться в качестве необязательной процедуры подтверждения либо более эффективной характеристики наблюдаемых эффектов (примечание 12).

Примечание 12 (4.1.1) — Терапия до спаривания.

Дизайн исследования фертильности, особенно сокращение периода до спаривания у самцов, основано на полученных данных о пересмотре основного исследования процесса сперматогенеза. Вещества, индуцирующие селективное воздействие на репродуктивные функции самцов, встречаются редко. Вещества, влияющие на сперматогенез почти неизменно оказывают влияние на постмейотические этапы и массу семенников. Спаривание с самками — нечувствительный метод выявления эффектов на сперматогенез. Гистопатологический анализ яичек — наиболее чувствительный метод выявления эффектов на сперматогенез. Надлежащее патологическое и гистопатологическое исследование (например, методом фиксации Буэна, заливки парафином, поперечных срезов толщиной 2—4 микрон для яичек, продольных срезов для придатков яичек, PAS и окрашивания гематоксилином) мужских репродуктивных органов представляет собой прямое средство выявления. Анализ спермы (количество сперматозоидов, подвижность, морфологические характеристики спермы) могут использоваться в качестве альтернативного метода для подтверждения результатов, полученных другими методами и дальнейшей характеристики эффектов. Данные об анализе спермы считают более актуальными для оценки фертильности при взятии образцов из семевыводящих протоков или хвостов придатков яичек. Информация о потенциальном воздействии на сперматогенез (и репродуктивные органы самок) могут быть получены в рамках исследований токсичности многократных доз либо исследований репродуктивной токсичности.

Для выявления воздействий, не определимых по результатам гистопатологического анализа репродуктивных органов самцов и анализа сперматозоидов, анализ спаривания с самками после предварительной терапии до спаривания продолжительностью 4 недели оказалось как минимум не менее эффективным, чем спаривание после терапии большей продолжительности. Поскольку исследование продолжительностью 2 недели было валидировано как не менее эффективное, чем исследование продолжительностью 4 недели, терапия до спаривания в течение 2 недель также допустима. В случае, если имеющиеся данные свидетельствуют о том, что размер исследований фертильности должен быть увеличен, должны быть разработаны соответствующие исследования для получения более подробной характеристики свойств.

10 Терминология

Помимо воздействия на репродуктивную компетентность взрослых животных токсичное воздействие на репродуктивную функцию включает в себя:

Токсическое воздействие на внутриутробное развитие: Любой нежелательный эффект, возникший до достижения взрослого возраста. Данное понятие включает в себя эффекты, индуцируемые либо проявляющиеся в эмбриональном либо в фетальном периоде, а также индуцируемые и проявляющиеся в постнатальный период.

Эмбриотоксичность, фетотоксичность, эмбриофетальная токсичность: Любое нежелательное воздействие на плод зачатия вследствие потенциального воздействия, включая структурные либо функциональные нарушения либо постнатальные проявления этих эффектов. Такие термины как «эмбриотоксичность», «фетотоксичность» связаны с точкой времени/периодом индукции нежелательных эффектов независимо от времени обнаружения.

Исследования на одном, двух или трех поколениях: определяют в соответствии с количеством взрослых поколений, напрямую подверженных воздействию исследуемого материала. Например, в исследованиях на животных одного поколения используется прямое воздействие на поколение F0 и косвенное воздействие (через мать) на поколение F1, и исследование обычно прекращают на момент отлучения от матери поколения F1. В исследовании на двух поколениях агрохимикатов и промышленных химикатов поколение F0 подвергается прямому воздействию, поколение F1 прямому и косвенному воздействию и поколение F2 — косвенному воздействию. Определение исследований на трех поколениях выглядит соответствующим образом.

Суммарная доза: Общая внутренняя дозировка у отдельного животного вследствие введения вещества, включая исходное вещество и его метаболиты, с учетом распределения и накопления.

Кинетика: Термин «кинетика» в рамках данного руководства используется последовательно, независимо от того, имеется ли в виду фармако- и/или токсикокинетика. Более удачного единого термина подобрать не удалось.

УДК 615.038:615.0121.014:615.2:006.354 ОКС 11.120

Ключевые слова: лекарственные средства, воспроизведение, токсическое действие, репродуктивная функция, мужская репродуктивная функция

БЗ 5—2017/22

Редактор *А.А. Кабанов*
Технический редактор *И.Е. Черепкова*
Корректор *И.А. Королева*
Компьютерная верстка *И.А. Налейкиной*

Сдано в набор 21.09.2017. Подписано в печать 06.10.2017. Формат 60 × 84 1/8. Гарнитура Ариал.
Усл. печ. л. 2,32. Уч.-изд. л. 2,10. Тираж 21 экз. Зак. 1738.
Подготовлено на основе электронной версии, предоставленной разработчиком стандарта

Издано и отпечатано во ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ», 123001 Москва, Гранатный пер., 4.
gost.e-ecolog.ru gost.e-ecolog.ru

gost.e-ecolog.ru