ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО

ПО ТЕХНИЧЕСКОМУ РЕГУЛИРОВАНИЮ И МЕТРОЛОГИИ

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ГОСТ Р 56698— 2015

МЕТОДЫ ИСПЫТАНИЯ ПО ВОЗДЕЙСТВИЮ ХИМИЧЕСКОЙ ПРОДУКЦИИ НА ОРГАНИЗМ ЧЕЛОВЕКА

Изучение репродуктивной токсичности на двух поколениях лабораторных животных

**(OECD Test № 416:2001
Two-Generation Reproduction Toxicity Study, IDT)**

Издание официальное

Москва
Стандартинформ
2016

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

1 ПОДГОТОВЛЕН Техническим комитетом по стандартизации ТК 458 «Разработка, производство и контроль качества лекарственных средств» 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 11 ноября 2015 г. № 1759-ст

4 Настоящий стандарт идентичен международному документу ОЭСР Тест № 416:2001 «Исследование репродуктивной токсичности на двух поколениях» (OECD Test № 416:2001 «Two-Generation Reproduction Toxicity Study»).

Наименование настоящего стандарта изменено относительно наименования указанного международного документа для увязки с наименованиями, принятыми в существующем комплексе стандартов «Методы испытания по воздействию химической продукции на организм человека»

5 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

*Правила применения настоящего стандарта установлены в ГОСТ Р 1.0—2012 (раздел 8). Информация об изменениях к настоящему стандарту публикуется в ежегодном (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

© Стандартинформ, 2016

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

Введение

В Копенгагене в июне 1995 г., Рабочая группа ОЭСР по репродуктивной и эмбриональной токсичности обсуждала необходимость актуализации существующих руководств ОЭСР по репродуктивной и эмбриональной токсичности и разработке новых руководств по конечным точкам исследования. Рабочая группа рекомендовала пересмотр руководства по исследованию репродуктивной токсичности на двух поколениях, с учетом предложений, полученных из США и Германии. Рабочая группа достигла согласия по основным элементам пересмотра данного руководства.

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

МЕТОДЫ ИСПЫТАНИЯ ПО ВОЗДЕЙСТВИЮ ХИМИЧЕСКОЙ ПРОДУКЦИИ НА ОРГАНИЗМ ЧЕЛОВЕКА

Изучение репродуктивной токсичности на двух поколениях лабораторных животных

Methods of testing the chemicals of human hazard.
Reproductive toxicity studies on two generations of laboratory animals

Дата введения — 2016—07—01

1 Область применения

Настоящий стандарт устанавливает порядок проведения исследований репродуктивной токсичности на двух поколениях лабораторных животных с целью предоставления основной информации в отношении воздействия исследуемого вещества на состояние и функционирование мужской и женской репродуктивных систем, включая функцию гонад, овариальный цикл, сексуальное поведение, зачатие, беременность, роды, лактацию и вскармливание, рост и развитие потомства, а также получения предварительных данных о влиянии исследуемого вещества на неонатальную заболеваемость и смертность, об эффекте на пренатальное и постнатальное развитие.

Настоящий стандарт предназначен для изучения роста и развития поколения F1, а также для оценки сохранности и работоспособности мужской и женской репродуктивных систем, роста и развития поколения F2, при этом дальнейшая информация по эмбриональной токсичности и функциональным нарушениям может быть получена или с помощью дополнительных элементов, которые могут быть включены в рассматриваемый план исследования с учетом руководств по эмбриональной токсичности и/или эмбриональной нейротоксичности, или при отдельном изучении данных параметров с учетом соответствующих руководств.

2 Принципы исследования

Исследуемое вещество вводят в градуированных (пошагово увеличиваемых) дозах нескольким группам животных мужского и женского полов. Самцы поколения Р должны получать вещества в процессе роста и в течение одного полного цикла сперматогенеза (приблизительно 56 дней у мышей и 70 дней у крыс), чтобы обнаружить какой-либо нежелательный эффект на сперматогенез. Влияние на сперму определяется по ряду параметров спермы (например, морфология спермы и подвижности сперматозоидов) и с помощью тщательной гистопатологии препаратов ткани. Если данные по сперматогенезу получены в ранее проведенном исследовании с многократным введением вещества в течение достаточного периода времени, например при 90-дневном исследования, то самцов поколения Р можно не включать в план данного исследования. Однако рекомендуется организовать хранение образцов или цифровых изображений спермы поколения Р для последующего возможного изучения. Самки поколения Р должны получать исследуемое вещество в процесс роста и на протяжении нескольких полных овариальных циклов, чтобы обнаружить какой-либо нежелательный эффект исследуемого вещества на нормальное течение овариального цикла. Исследуемое вещество вводится первому (родительскому, Р) поколению животных во время периода спаривания, в течение последующей беременности и на протяжении вскармливания их потомства, поколения F1. После вскармливания введение исследуемого вещества продолжается у животных поколения F1 в течение их роста до взросления, спаривания и получения поколения F2 и в период вскармливания поколения F2.

Наблюдение за животными и патологические исследования проводятся на всех животных с целью обнаружения токсических эффектов с основной целью – обнаружить влияние на состояние и функционирование мужской и женской репродуктивных систем, рост и развитие их потомков.

Издание официальное

3 Описание метода / подготовительных работ к проведению исследования

3.1 Выбор вида лабораторных животных

Наиболее подходящими для данного вида исследования являются крысы. Если используют другие виды лабораторных животных, то следует обосновать сделанный выбор и внести соответствующие изменения в план исследования. Не следует использовать в исследовании линии животных с низкой плодовитостью или широко подтвержденной высокой вероятностью врожденных пороков развития. На начало исследования вариабельность массы тела лабораторных животных должна быть минимальной и не превышать 20 % средней массы тела животных обоих полов.

3.2 Условия содержания и кормления

Температура в помещении для содержания лабораторных животных должна составлять (22 ± 3) °С. Хотя относительная влажность должна быть не менее 30 % и желательно не превышать 70 %, за исключением периодов мойки помещения, оптимальным режимом является 50 %—60 %. Освещение должно быть искусственным, с периодичностью света и темноты в 12 ч. Для кормления может быть использован стандартный лабораторный корм с неограниченной подачей питьевой воды. Выбор корма зависит от возможности его приемлемого смешивания с исследуемым веществом, если введение вещества осуществляется вместе с кормом.

Лабораторные животные могут содержаться в отдельных клетках небольшими группами одного пола. Процедуры спаривания следует проводить в клетках, позволяющих проведение данных процедур. После получения доказательства копуляции осемененные самки должны содержаться в индивидуальных клетках или клетках для беременных животных. Также животные могут содержаться небольшими группами и разделяться за 1—2 дня до родов. Лабораторные животные должны быть снабжены приемлемым и достаточным количеством материала для гнезда во время, предстоящее родам.

3.3 Подготовка лабораторных животных

В исследовании должны использоваться здоровые молодые особи, которые прошли период адаптации к лабораторным условиям в течение 5 дней и не подвергались ранее другим экспериментальным процедурам. Лабораторные животные должны быть описаны с указанием вида, линии, источника происхождения, пола, массы тела и/или возраста. Должны быть известны любые родственные отношения между включенными в исследование животными, чтобы исключить спаривание животных одного помета. Случайным образом животных распределяют в контрольную и испытуемую группы (рекомендуется метод стратификации по массе тела). Расположение клеток должно минимизировать какие-либо эффекты, связанные с их положением. Каждому животному должен быть присвоен уникальный идентификационный номер. Для животных поколения Р присвоение номера должно быть проведено до начала введения исследуемого вещества. Идентификацию животных поколения F1 проводят при вскармливании особей, предназначенных для последующего спаривания. Записи о происхождении щенков должны вестись для всех выбранных животных поколения F1. Дополнительно рекомендуется организовать индивидуальную идентификацию всех щенков непосредственно после рождения, если план исследования предусматривает индивидуальное взвешивание или проведение функциональных тестов.

На начало исследования возраст животных поколения Р должен составлять от 5 до 9 недель. По возможности животные во всех испытуемых группах должны быть одинакового возраста и массы тела.

4 Процедура

4.1 Количество и пол животных

Все испытуемые группы и контрольная группа должны состоять из количества животных, достаточного для получения предпочтительно не менее 20 беременных самок, достигших родов или практически достигших родов. При испытании веществ, которые вызывают токсический эффект (то есть стерилизацию, избыточный токсический эффект при высокой дозе) это может быть недостижимо. Основная задача – получить достаточное количество беременных животных для обеспечения информативной (достоверной) оценки возможного влияния вещества на фертильность, беременности, после-

родовое поведение и вскармливание, рост и развитие поколения F1 от зачатия до полового созревания и развитие их потомства (поколения F2) до окончания грудного вскармливания. Таким образом, невозможность получить желаемого количества беременных самок (то есть 20) не обязательно требует прекращения исследования и должна оцениваться индивидуально для каждого случая.

4.2 Подготовка вещества для введения

4.2.1 Рекомендуется вводить исследуемое вещество внутрь (с кормом, питьевой водой или через желудочный зонд), если другой путь введения (например, накожный или ингаляционный) не будет сочтен более приемлемым.

4.2.2 При необходимости исследуемое вещество растворяют или суспензируют в пригодном растворителе. Рекомендуется, если это возможно, использовать водные растворы/суспензии (первый выбор), затем определяется возможность использования масляных растворов/суспензий (например, кукурузное масло) и затем возможность приготовления раствора с использованием других растворителей. Стабильность вещества в растворителе должна быть подтверждена.

4.3 Дозирование

4.3.1 В план исследования должны быть включены не менее 3 доз и соответствующая контрольная группа. При отсутствии ограничения по физико-химическим параметрам или биологическим эффектам исследуемого вещества выбранная наивысшая доза должна вызывать токсическое действие, но не быть летальной или вызывать тяжелые страдания. В случае неожиданной гибели животных допустимым считают исследования с уровнем смертности первого поколения P не более 10 %. Последующие меньшие дозы определяются с целью продемонстрировать любые эффекты, связанные с дозой, и уровень «отсутствия токсических эффектов» (NOAEL) или дозы, близкие к пределу обнаружения, которые позволяют определить «нетоксичную» дозу. Обычно оптимальным считается 2—4-кратный интервал между используемыми более низкими дозами, и дополнительно для 4-й испытуемой группы рекомендуется использовать очень большой интервал (более, чем десятикратное уменьшение) между дозами. Для исследований, в которых вещество смешивают с кормом, интервал между дозами не должен превышать трехкратную дозу. Уровень доз следует выбирать с учетом имеющихся токсикологических данных, в частности, результатов исследований с многократным введением вещества. Любая имеющаяся информация о метаболизме и кинетике исследуемого вещества или родственных веществ должна быть учтена. Дополнительно такая информация будет также полезна для демонстрации адекватности выбранного режима дозирования.

4.3.2 Контрольная группа должна состоять из животных, не получающих исследуемое вещество или получающих только растворитель, если растворитель используется для введения исследуемого вещества. За исключением отсутствия введения исследуемого вещества, животные контрольной группы должны подвергаться всем тем же процедурам, что и животные опытных групп. При использовании растворителя контрольная группа должна получать растворитель в максимальном используемом объеме. Если исследуемое вещество вводится вместе с кормом и вызывает снижение потребления корма или его использования, то может потребоваться использование парной контрольной группы. Альтернативно, данные из контролируемых исследований, проведенных с целью исследования влияния снижения потребления пищи на репродуктивные параметры, могут быть использованы вместо соответствующей по потреблению пищи парной контрольной группы.

4.3.3 Должны быть учтены ниже приведенные параметры растворителя и других добавок: эффект на абсорбцию, распределение, метаболизм или задержку исследуемого вещества; влияние на химические параметры исследуемого вещества, приводящее к изменению его токсикологических характеристик; и влияние на потребление воды или пищи или статус «откормленности» животных.

4.4 Предельный тест

Если при введении внутрь в одной суточной дозе не менее 1000 мг на 1 кг массы тела с кормом или с водой, эквивалентного процента, при применении процедур, описанных в настоящем стандарте, не наблюдается токсического эффекта, или токсический эффект при этой дозе не ожидается, исходя из данных о структурно и/или метаболически родственных веществах, тогда полное исследование с использованием нескольких доз может быть нецелесообразно. Предельный тест применяется, за исключением случаев, когда действие у человека показывает необходимость использования более высокой дозы при введении внутрь. При использовании других путей введения, таких как ингаляционный или местное применение, часто максимальная достижимая концентрация зависит от физико-химических характеристик исследуемого вещества, таких как растворимость.

4.5 Введение доз

4.5.1 Животные должны получать исследуемое вещество в течение 7 дней в неделю. Предпочтительным является введение внутрь (корм, питьевая вода или желудочный зонд). Если используется другой путь введения, то это должно быть обосновано, и могут потребоваться соответствующие изменения. Все животные должны получать вещество одинаковым методом в течение приемлемой продолжительности эксперимента. При введении исследуемого вещества через желудочный зонд должна использоваться соответствующая канюля. Объем одномоментно вводимой жидкости не должен превышать 1 мл/100 г массы тела животного (0,4 мл/100 г массы тела — максимальный объем для кукурузного масла), за исключением водных растворов, при которых может вводиться 2 мл/100 г массы тела. За исключением раздражающих или коррозивных веществ, у которых, как правило, наблюдаются выраженные токсические эффекты при повышенных концентрациях, вариабельность вводимого объема должна быть минимальной путем корректировки концентраций, чтобы обеспечить постоянный объем для всех уровней доз. При использовании желудочного зонда щенки обычно получают исследуемую субстанцию опосредованно через молоко до момента прямого введения после прекращения грудного вскармливания. При введении вещества с кормом или водой щенки, как правило, будут получать дополнительно испытуемое вещество, когда они начнут кормиться самостоятельно в течение последней недели периода лактации.

4.5.2 При введении веществ с кормом или питьевой водой важно обеспечить отсутствие влияния количества исследуемого вещества на нормальное питание или водный баланс у животных. При введении вещества с кормом используется или постоянная концентрация вещества в корме (ppm), или постоянный уровень дозы в отношении с массой тела животных; использование других подходов должно быть указано. При введении исследуемого веществ через желудочный зонд вводимая доза должна вводиться в одинаковое время каждый день и корректироваться еженедельно для поддержания постоянного уровня дозы в отношении массы тела животного. При расчете дозы, вводимой через зонд, по отношению к массе тела животного, необходимо учитывать информацию о плацентарном распределении.

4.6 Экспериментальные графики

4.6.1 Суточное введение исследуемого вещества самкам и самцам первого поколения лабораторных животных P начинается в возрасте от 5 до 9 недель. Суточное введение самкам и самцам поколения F1 начинается по прекращению грудного вскармливания; следует помнить, что в случае введения вещества с пищей или питьевой водой прямое воздействие на щенков поколения F1 уже происходит на протяжении периода лактации. Для животных обоих полов (поколения P и F1) введение исследуемого вещества должно проводиться на протяжении не менее 10 недель до начала периода спаривания. Затем введение продолжается и у самцов, и у самок на протяжении двухнедельного периода спаривания. После этого, если самцы больше не требуются для оценки действия исследуемого вещества на репродуктивную систему, они подвергаются эвтаназии гуманным способом и подвергаются патологическому исследованию. Самкам поколения F вещество продолжают вводить на протяжении периода беременности и до окончания грудного вскармливания потомства поколения F1. Следует рассмотреть необходимости внесения изменения в график дозирования на основе имеющейся информации об исследуемом веществе, включая имеющиеся токсикологические данные, данные о метаболизме или биоаккумуляции вещества. Доза, вводимая каждому животному, как правило, основана на самом последнем определении массы тела животного. Однако корректировка дозы в течение последнего триместра беременности должна проводиться с осторожностью.

4.6.2 Наблюдение за животными поколений P и F1 должно продолжаться вплоть до эвтаназии. Все животные этих поколений должны быть умерщвлены гуманным способом после прекращения периода наблюдения за влиянием исследуемого вещества на репродуктивную функцию. Животные поколения F1, не отобранные для спаривания, и все животные поколения F2 должны быть умерщвлены гуманным способом после окончания периода грудного вскармливания.

5 Процедуры спаривания

5.1 Спаривание животных поколения P

Для каждого спаривания пару самки и самца из одинаковой схемы дозирования (спаривание 1:1) помещают в одну клетку до достижения копуляции или содержат в течение 2 недель. Каждый день самок осматривают на наличие следов спермы или разрывов вагины. День беременности 0 определяют как день обнаружения разрывов вагины или следов спермы. Если спаривание прошло

неудачно, может быть предпринята процедура повторного спаривания самок с выбранными самцами-производителями из той же группы. Спарившиеся пары должны быть четко идентифицированы в документации. Спаривания животных из одного помета следует избегать.

5.2 Спаривание животных поколения F1

5.2.1 Из животных поколения F1 выбирают минимум одного самца и одну самку из каждого помета на момент прекращения грудного вскармливания для спаривания с другими щенками из другого помета, но той же опытной группы, для получения потомства поколения F2. Выбор щенков из каждого помета должен осуществляться случайным образом при отсутствии значительных различий по массе тела или внешнему виду щенков в помете. При наличии таких различий следует отобрать наиболее репрезентативных особей из каждого помета. На практике наилучшим критерием отбора является масса тела, но допускается также проводить отбор по внешнему виду. Поколение F1 не следует спаривать до достижения полного полового созревания.

5.2.2 Пары без потомства следует оценить для определения истинных причин бесплодия. Оценку проводят с помощью таких процедур, как дополнительные возможности для спаривания с другими доказанными самцами-производителями или плодовитыми самками, микроскопией репродуктивных органов, изучением овариальных циклов или сперматогенеза.

5.3 Второе спаривание

В определенных случаях, например при связанном с действием исследуемого вещества нарушении размера помета или наблюдении непонятного эффекта при первом спаривании, рекомендуется провести второе спаривание животных поколения P или F1 для получения второго помета. Для второго спаривания рекомендуется использовать самок или самцов, у которых не было помета с доказанными производителями противоположного пола. Если получение второго помета признано необходимым в любом из поколений, то животных следует спаривать приблизительно через неделю после прекращения грудного вскармливания последнего помета.

5.4 Размер помета

Допускается сохранить у животных весь помет и уход за детенышами до окончания грудного вскармливания. Стандартизация размера помета не является необходимой. При проведении стандартизации используемый метод должен быть подробно описан.

6 Наблюдения

6.1 Клинические наблюдения

Общеклиническое наблюдение за животными проводится каждый день, и в случае использования желудочного зонда при выборе времени проведения процедуры должен учитываться ожидаемый пиковый период эффекта после введения исследуемого вещества. Следует регистрировать изменения поведенческих реакций, признаки тяжелых или затяжных родов и все проявления токсических эффектов. Дополнительно более детальный осмотр каждого животного должен проводиться не реже 1 раза в неделю и может быть совмещен с процедурой взвешивания. Дважды в день и один раз в день в выходные дни, если приемлемо, все животные должны быть проверены на наличие заболеваний или гибели.

6.2 Масса тела и потребление пищи/воды животными

Животные, приносящие потомство (поколения P и F1), должны взвешиваться в первый день начала введения исследуемого вещества и еженедельно в течение всего исследования. Самок этих поколений животных следует взвешивать минимум в дни беременности 0, 7, 14 и 20 или 21, а также в течение периода лактации одновременно со взвешиванием щенков помета и в день эвтаназии. Данные наблюдения следует регистрировать индивидуально для каждого взрослого животного. В период созревания и беременности потребление пищи оценивают еженедельно. Потребление воды измеряется как минимум еженедельно, если исследуемое вещество вводится вместе с водой.

6.3 Овариальный цикл

Длительность и нормальность овариального цикла оценивается у самок поколения Р и F1 по вагинальной смазке до начала спаривания, и, если предусмотрено планом, в течение спаривания, до получения доказательств совокупления. При получении образцов клеток вагины/шейки матки следует принимать меры по предупреждению повреждения слизистой и, как следствие, индукции псевдобеременности [2].

6.4 Характеристики спермы

6.4.1 У всех самцов поколений Р и F1 после эвтаназии должны быть зарегистрированы масса яичек и эпидидимиса, и один из органов должен в дальнейшем подвергнуться гистопатологическому исследованию (6.7.1, 7.1.1, 7.1.3). Из подгруппы количеством не менее 10 мужских особей из каждой опытной группы самцов поколений Р и F1 оставшиеся яички и эпидидимисы должны быть использованы для подсчета устойчивых к гомогенизации сперматидов и резервов спермы отростков эпидидимиса (*cauda epididymides*) соответственно. У этого количества самцов должна быть отобрана сперма из *cauda epididymides* или семявыводящего канала для оценки подвижности спермы и морфологического исследования. Если обнаружены токсические эффекты исследуемого вещества или имеются данные других исследований о его возможном влиянии на сперматогенез, то оценка спермы должна быть проведена у всех самцов во всех опытных группах; в других случаях количественные оценки могут быть проведены только у самцов поколений Р и F1 контрольной группы и групп, получающих самую высокую дозу.

6.4.2 Общее количество устойчивых к гомогенизации сперматидов яичек и спермы *cauda epididymides* должно быть посчитано [3], [4]. Резервуары спермы могут быть определены по концентрации и объему спермы в суспензии, использованной для качественных оценок, и количеству сперматозоидов, полученных при последующем измельчении и/или гомогенизации оставшейся ткани *cauda* (хвоста). Количественный подсчет следует проводить на отобранной подгруппе животных из всех опытных групп непосредственно после эвтаназии животных, если не проводится видео- или цифровая запись или если образцы не подвергаются заморозке для последующего анализа. В этих случаях первыми могут быть изучены образцы от животных из контрольной группы и группы, получавшей наивысшую дозу исследуемого вещества. Если связанные с веществом эффекты на сперму не обнаружены (например, влияние на количество сперматозоидов, их подвижность или морфологию), то исследование образцов тканей животных других групп проводить не обязательно. Если эффекты выявлены у животных, получавших наивысшую дозу, то животные с более низкими дозами также должны быть изучены.

6.4.3 Подвижность сперматозоидов эпидидимиса (или из спермовыводящего канала) следует оценивать или фиксировать на видео непосредственно после эвтаназии. Процедура получения сперматозоидов должна обеспечивать их минимальное повреждение, разведение для анализа подвижности получают с помощью приемлемых методов [5]. Процент прогрессивно подвижных сперматозоидов следует определять субъективно или объективно. При проведении анализа движения компьютеризированными методами [6] — [11] определение прогрессивной подвижности основано на определяемой оператором норме для средней скорости пробега и индекса линейности или прямого движения. Если образцы снимают на видео [1] или регистрируют изображение другими методами в момент вскрытия, далее может быть проведен анализ тканей самцов поколений Р и F1 только контрольной группы и группы с наивысшей дозой, если токсическое фертильное действие исследуемого вещества не обнаружено; в противном случае, также должны быть исследованы образцы из других групп. При отсутствии видеозаписи или цифрового изображения все образцы из всех опытных групп должны быть исследованы при вскрытии.

6.4.4 Должно быть проведено морфологическое исследование образцов спермы эпидидимиса. Сперматозоиды (не менее 200 на образец) должны быть исследованы как фиксированные мокрые препараты [13] и оценены как нормальные или с наличием отклонений. Образцы с отклонениями могут включать слияние клеток, изолированные головки, неправильную форму головки и/или хвостов. Исследование следует проводить на отобранной подгруппе животных из всех опытных групп непосредственно после эвтаназии животных, если не проводится видео- или цифровая запись, которая может быть проанализирована впоследствии. Мазки после их фиксации также могут быть изучены позднее. В этих случаях первыми могут быть изучены образцы от животных из контрольной группы и группы, получавшей наивысшую дозу исследуемого вещества. Если связанные с веществом эффекты на сперму не обнаружены (например, влияние на морфологию), то исследование образцов тканей животных других групп проводить не обязательно. Если эффекты выявлены у животных, получавших наивысшую дозу, то животные с более низкими дозами также должны быть изучены.

6.4.5 Если любой из вышеописанных параметров уже был изучен в рамках исследования системного токсического действия продолжительностью не менее 90 дней, то повторение этих исследований в данном эксперименте не требуется. Однако рекомендуется провести видео или цифровую регистрацию изображения образцов спермы животных поколений Р для обеспечения возможности последующей оценки, если необходимо.

6.5 Потомки

6.5.1 Каждый помет должен быть исследован как можно быстрее после родов (день лактации 0) для установления количества и пола щенков в помете, мертворожденных и живорожденных и наличия врожденных аномалий. Щенки, обнаруженные мертвыми в нулевой день периода лактации, при отсутствии признаков разложения, по возможности должны быть осмотрены на наличие возможных дефектов развития и причин смерти и законсервированы. Живые щенки должны быть пересчитаны и индивидуально взвешены при рождении (день лактации 0) или на следующий день (день 1), а также регулярно в определенные дни, например в дни 4, 7, 14 и 21 периода лактации. Физические отклонения или изменения поведения, наблюдаемые у самок и щенков, должны регистрироваться.

6.5.2 Физическое развитие щенков должно оцениваться, как правило, по увеличению массы тела. Другие физические параметры (например, открытие ушей и глаз, прорезывание зубов, рост шерсти) могут представлять дополнительную информацию, но эти данные, как правило, оцениваются в отношении данных о половом созревании (возраст и масса тела при открытии вагины или отделение головки пениса от крайней плоти) [14]. Функциональные параметры (моторная функция, сенсорная функция, развитие рефлексов) рекомендуется оценивать у щенков поколения F1 до и/или после прекращения грудного вскармливания, особенно функции, связанные с половым созреванием, если такие анализы не включены в отдельные токсикологические исследования. Возраст открытия вагины и отделения крайней плоти должны быть установлены для животных поколения F1, выбранных для спаривания. Длина аногенитального расстояния должна быть измерена у новорожденных поколения F2 в день родов, если они были вызваны нарушением отношения полов в поколении F1 или длительностью полового созревания.

6.5.3 Определение функциональных характеристик животных можно не проводить, если в группе наблюдаются выраженные токсические эффекты (например, значительное отставание от увеличения массы тела и др.). Функциональное обследование не проводится на щенках, выбранных для спаривания.

6.6 Общее патологическое обследование

6.6.1 На момент эвтаназии или гибели в ходе исследования все взрослые животные (поколения Р и F1), все щенки с внешними дефектами развития или клиническими проявлениями, а также не менее одного случайно выбранного животного — щенок/пол/помет из обоих поколений F1 и F2, должны быть подвергнуты общему патологическому макроскопическому исследованию на наличие структурных нарушений или патологических изменений. Особое внимание следует обращать на органы репродуктивной системы. Щенки, подвергнутые эвтаназии и погибшие, при отсутствии мацерации, должны быть исследованы на наличие возможных дефектов и/или причин смерти и законсервированы.

6.6.2 Должны быть исследованы матки всех впервые рожающих самок с использованием процедуры, предупреждающей негативное влияние на последующее гистологическое исследование, на наличие и количество мест имплантации.

6.7 Взвешивание органов

6.7.1 На момент эвтаназии должна быть определена масса тела и масса ниже приведенных органов всех родительских животных поколений Р и F1 (парные органы взвешиваются индивидуально):

- матка, яичники;
- яички, эпидидимис (тело и хвост);
- простата;
- семенные пузырьки с прилегающими железами и их жидкость (как один орган);
- головной мозг, печень, почки, селезенка, гипофиз, щитовидная железа, надпочечники и известные органы-мишени.

6.7.2 Масса тела на момент смерти определяется у щенков поколений F1 и F2, отобранных для патологического исследования. Также у одного случайно выбранного животного — щенок/пол/помет (6.6.1) определяется масса следующих органов: головной мозг, селезенка и тимус.

6.7.3 Данные общего патологического исследования и взвешивания массы органов должны оцениваться вместе с наблюдениями других исследований с многократным введением исследуемого вещества, если это приемлемо.

7 Гистопатологическое исследование

7.1 Животные-производители

7.1.1 У животных, давших потомство (поколения P и F1), из указанных далее органов и тканей или их репрезентативных образцов должны быть законсервированы и храниться в соответствующей среде для последующего гистопатологического исследования:

- вагина, матка с шейкой матки и яичники (консервируют в пригодном консервирующем растворе);
- одно яичко (консервируют в фиксанале Боуина или аналогичном), один эпидидимис, семенные пузырьки, простата и прилегающие железы;
- предварительно определенные как органы-мишени животных поколений P и F1, выбранных для спаривания.

7.1.2 Полное гистологическое исследование законсервированных органов и тканей, перечисленных в 7.1.1, следует проводить для животных, получавших высокие дозы исследуемого вещества, и контрольной группы поколений P и F1, выбранных для спаривания. Оценка яичников животных поколения P не является необходимой. Для получения дополнительных данных о четком определении NOAEL следует провести гистологическое исследование органов, в которых обнаружены изменения, связанные с исследуемым веществом, от животных, получавших низкие и средние дозы исследуемого вещества. Дополнительно гистопатологическому исследованию должны быть подвергнуты органы репродуктивной системы животных из групп с низкими и средними дозами исследуемого вещества, у которых было заподозрено снижение фертильности, то есть животных, которые не сумели спариться, зачать или стать производителем, или получить жизнеспособное потомство, или животных, у которых были обнаружены нарушения овариального цикла, количества сперматозоидов, их подвижности или морфологии. Должны быть исследованы все физические повреждения органов, такие как атрофия или развитие опухолей.

7.1.3 Для определения признаков фертильной токсичности, таких как неразвитые сперматиды, отсутствие типов или слоев зародышевых клеток, присутствие многоядерных гигантских клеток или присутствие сперматогенных клеток в полости, должно быть проведено тщательное гистологическое исследование (с использованием консерванта Боуина, приготовлением парафиновых препаратов и поперечных срезов толщиной 4—5 мкм) [15]. Изучение неповрежденного эпидидимиса должно включать головку, тело и хвост, а также оценку продольной секции. Орган следует изучить на наличие инфильтрации лейкоцитами, изменений превалирующего типа клеток, наличие клеток аберрантного типа и фагоцитоза сперматозоидов. Для исследования мужских половых органов можно использовать метод PAS и окрашивание гематоксилином.

7.1.4 Яичники после периода лактации должны содержать примордиальные и растущие фолликулы, а также большое желтое тело (связанное с лактацией). При гистологическом исследовании следует оценить качественное уменьшение популяции примордиальных фолликулов. Количественный подсчет примордиальных фолликулов должен быть проведен для самок поколения F1; количество животных, выбор секции яичника и выбор количества секций должны быть статистически обоснованы с учетом используемой процедуры оценки. Исследование должно включать подсчет количества примордиальных фолликулов, которое может быть скомбинировано с небольшими растущими фолликулами с целью сравнения яичников животных контрольной и опытных групп [16] — [20].

7.2 Щенки по окончании периода грудного вскармливания

Для целей гистологического исследования консервируют и хранят в подходящей среде целые дефектные ткани и органы-мишени всех щенков, у которых были обнаружены внешние дефекты или клинические симптомы, а также от не менее одного животного, выбранного случайным образом, — щенок/пол/помет из всех групп поколений F1 и F2, не отобранных для спаривания (см. 6.6.1). Должно быть проведено полное гистопатологическое исследование законсервированных тканей с особым упором на органы репродуктивной системы.

8 Данные и отчетность

8.1 Данные

8.1.1 Данные следует указывать индивидуально и суммировать в табличной форме. Для каждой опытной группы и каждого поколения указывается количество животных в начале исследования, количество погибших животных и животных, подвергшихся эвтаназии для прекращения страданий; время смерти каждого животного, количество фертильных животных, количество беременных самок, количество животных с симптомами токсических эффектов, описание наблюдавшихся симптомов токсических эффектов, включая время обнаружения, продолжительность и тяжесть симптомов, типы гистопатологических изменений и все соответствующие данные по помету.

8.1.2 Численные результаты следует оценивать с помощью соответствующего общепринятого статистического метода; статистические методы следует рассматривать как часть плана исследования. Дозозависимые статистические модели могут использоваться для анализа данных. Отчет должен содержать достаточную информацию о методе анализа и использованных компьютерных программах, чтобы независимый эксперт/статистик смог провести повторную оценку и реконструировать анализ.

8.2 Оценка результатов

8.2.1 Результаты исследования репродуктивной токсичности на двух поколениях должны оцениваться по наблюдаемым эффектам, включая результаты макроскопического и микроскопического анализов. Оценка должна включать: зависимость или отсутствие уровня дозы исследуемого вещества, а также наличие или отсутствие частоты и тяжести отклонений, включая дефекты развития, идентифицированные органы-мишени, нарушения фертильности, клинические симптомы токсичности, нарушения поведенческих реакций у половозрелых животных и помета, изменения массы тела, влияния на смертность и любые токсические эффекты. При оценке полученных результатов следует учитывать физико-химические характеристики исследуемого вещества и, если имеются, токсикокинетические данные.

8.2.2 Проведенное надлежащим образом исследование репродуктивной токсичности должно обеспечить адекватную оценку уровня «без эффекта» и понимания нежелательных эффектов исследуемого вещества на репродукцию, роды, лактацию, постнатальное развитие, включая рост и половое созревание.

8.3 Отчет об исследовании

Отчет об исследовании должен включать в себя следующую информацию:

Исследуемое вещество:

- физическое описание и, если требуется, физико-химические характеристики;
- идентификационные данные;
- чистота.

Растворитель (если применимо):

- обоснование выбора растворителя, если используется не вода.

Лабораторные животные:

- использованные в исследовании виды/линии;
- количество, возраст и пол животных;
- источник происхождения, условия содержания, корм, материал для гнезда и др.;
- индивидуальные массы тела животных на начало исследования.

Условия исследования (экспериментальные условия):

- обоснование выбора уровней доз;
- описание подготовки исследуемого вещества для введения/приготовления корма, получаемые концентрации;
- стабильность и однородность вводимой смеси;
- детали процедуры введения исследуемого вещества;
- отклонение от концентрации вещества в корме/питьевой воде (в ppm) к достигаемой дозе (мг/кг массы тела/день), если применимо;
- описание качества корма и воды.

Результаты:

- потребление корма и воды, если доступно, эффективность корма (прибавление массы тела на грамм потребляемой пищи) и потребление исследуемого вещества для животных поколений Р и F1, за исключением периода совместного обитания, и на последнем триместре лактации;
- данные по абсорбции (если имеются);
- данные по массе тела животных поколений Р и F1, выбранных для спаривания;
- масса тела новорожденных и щенков;
- масса тела при эвтаназии и абсолютные и относительные данные о массе тела для животных-производителей;
- природа, тяжесть и длительность клинических симптомов (являются обратимыми или нет);
- время гибели животных в течение исследования или животных, доживших до эвтаназии;
- данные о выявленном токсическом эффекте по полу и дозе; включая индексы спаривания, фертильности, беременности, родов, жизнеспособности потомства и лактации; отчет должен содержать числа, использованные для расчета индексов;
- описание токсических или других эффектов на репродукцию, потомство, постнатальный рост и др.;
- данные вскрытия;
- подробное описание всех гистопатологических данных;
- количество самок поколений Р и F1 с нормальным овариальным циклом и его продолжительность;
- общее количество сперматозоидов в *cauda epididymides*, количество прогрессивно подвижной спермы, процент морфологически нормальных сперматозоидов, процент сперматозоидов с обнаруженными дефектами;
- время до спаривания, включая количество дней до начала спаривания;
- продолжительность беременности;
- количество мест имплантации, желтых тел, размера помета;
- количество живорожденных и пост-имплантационные потери;
- количество щенков с внешними дефектами развития, количество обнаруженных мелких особей, если определялось, должно быть указано;
- данные о физических параметрах (дефектах) у щенков и другие данные о постанатальном развитии; определяемые физические параметры должны быть обоснованы;
- данные о функциональных параметрах, оцениваемых у щенков и взрослых особей, если применимо;
- статистическая обработка результатов, если применимо.

Обсуждение результатов.

Заключение, включая NOAEL значения для животных-производителей и потомства.

8.4 Интерпретация полученных результатов

Исследование репродуктивной токсичности на двух поколениях обеспечивает получение информации об эффектах исследуемого вещества при многократном введении в течении всех фаз репродуктивного цикла. В частности, при исследовании получают информацию о репродуктивных параметрах и о развитии, росте и выживании потомства. Результаты исследования следует оценивать вместе с данными исследования субхронической токсичности, пренатальном развитии, токсикокинетическими исследованиями и других проведенных исследований. Часто результаты данного исследования могут использоваться для определения необходимости дальнейших исследований вещества. Экстраполяция результатов данного исследования на возможные эффекты у человека валидна до определенного предела. Наиболее приемлемым является использование данных по уровню «отсутствия эффекта» и допустимого уровня воздействия у человека [21] — [24].

Библиография

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

[2] Sadleir, R.M.F.S. (1979). Cycles and Seasons, In: Reproduction in Mammals: I. Germ Cells and Fertilization, C.R. Auston and R.V. Short (eds.), Cambridge, New York

[3] Gray, L.E. et al., (1989). A Dose-Response Analysis of Methoxychlor-Induced Alterations of Reproductive Development and Function in the Rat. Fundamental and Applied Toxicology 12:92—108

[4] Robb, G.W. et al., (1978). Daily Sperm Production and Epididymal Sperm Reserves of Pubertal and Adult Rats. Journal of Reproduction and Fertility 54:103—107

[5] Klinefelter, G.R. et al., (1991). The Method of Sperm Collection Significantly Influences Sperm Motion Parameters Following Ethane Dimethanesulfonate Administration in the Rat. Reproductive Toxicology 5:39—44

[6] Seed, J. et al. (1996). Methods for Assessing Sperm Motility, Morphology, and Counts in the Rat, Rabbit, and Dog: a Consensus Report. Reproductive Toxicology 10:237— 244

[7] Chapin, R.E. et al., (1992). Methods for Assessing Rat Sperm Motility. Reproductive Toxicology 6:267—273

[8] Klinefelter, G.R. et al., (1992). Direct Effects of Ethane Dimethanesulphonate on Epididymal Function in Adult Rats: an In Vitro Demonstration. Journal of Andrology 13:409—421

[9] Slott, V.L. et al., (1991). Rat Sperm Motility Analysis: Methodologic Considerations. Reproductive Toxicology 5:449—458

[10] Slott, V.L. and Perreault, S.D., (1993). Computer-Assisted Sperm Analysis of Rodent Epididymal Sperm Motility Using the Hamilton-Thorn Motility Analyzer. In: Methods in Toxicology, Part A., Academic, Orlando, Florida. pp. 319—333

[11] Toth, G.P. et al., (1989). The Automated Analysis of Rat Sperm Motility Following Subchronic Epichlorhydrin Administration: Methodologic and Statistical Considerations. Journal of Andrology 10:401—415

[12] Working, P.K. and M. Hurtt, (1987). Computerized Videomicrographic Analysis of Rat Sperm Motility. Journal of Andrology 8:330—337

[13] Linder, R.E. et al., (1992). Endpoints of Spermatoxicity in the Rat After Short Duration Exposures to Fourteen Reproductive Toxicants. Reproductive Toxicology 6:491—505

[14] Korenbrot, C.C. et al., (1977). Preputial Separation as an External Sign of Pubertal Development in the Male Rat. Biological Reproduction 17:298303

[15] Russell, L.D. et al., (1990). Histological and Histopathological Evaluation of the Testis, Cache River Press, Clearwater, Florida

[16] Heindel, J.J. and R.E. Chapin, (eds.) (1993). Part B. Female Reproductive Systems, Methods in Toxicology, Academic, Orlando, Florida

[17] Heindel, J.J. et al., (1989) Histological Assessment of Ovarian Follicle Number in Mice As a Screen of Ovarian Toxicity. In: Growth Factors and the Ovary, A.N. Hirshfield (ed.), Plenum, New York, pp. 421—426

[18] Manson, J.M. and Y.J. Kang, (1989). Test Methods for Assessing Female Reproductive and Developmental Toxicology. In: Principles and Methods of Toxicology, A.W. Hayes (ed.), Raven, New York

[19] Smith, B.J. et al., (1991). Comparison of Random and Serial Sections in Assessment of Ovarian Toxicity. Reproductive Toxicology 5:379—383

[20] Heindel, J.J. (1999). Oocyte Quantitation and Ovarian Histology. In: An Evaluation and Interpretation of Reproductive Endpoints for Human Health Risk Assessment, G. Daston, And C.A. Kimmel, (eds.), ILSI Press, Washington, DC

[21] Thomas, J. A. (1991). Toxic Responses of the Reproductive System. In: Casarett and Doull's Toxicology, M.O. Amdur, J. Doull, and C.D. Klaassen (eds.), Pergamon, New York

[22] Zenick, H. and E.D. Clegg, (1989). Assessment of Male Reproductive Toxicity: A Risk Assessment Approach. In: Principles and Methods of Toxicology, A.W. Hayes (ed.), Raven Press, New York

[23] Palmer, A.K. (1981). In: Developmental Toxicology, Kimmel, C.A. and J. Buelke-Sam (eds.), Raven Press, New York

[24] Palmer, A.K. (1978). In Handbook of Teratology, Vol. 4, J.G. Wilson and F.C. Fraser (eds.), Plenum Press, New York

УДК 615.038/615.012/615.014/615.2:006.354

ОКС 07.080
11.020
11.120.01

Ключевые слова: воздействие химической продукции, доклинические исследования, лекарственные средства, клинические исследования, государственная регистрация, безопасность, изучение репродуктивной токсичности, два поколения лабораторных животных

Редактор *И.А. Косорукова*
Корректор *М.И. Першина*
Компьютерная вёрстка *А.С. Самарина*

Подписано в печать 08.02.2016. Формат 60x84 1/8.
Усл. печ. л. 1,86. Тираж 34 экз. Зак. 4089.

Подготовлено на основе электронной версии, предоставленной разработчиком стандарта

ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ»
123995 Москва, Гранатный пер., 4.
gost.e-ecolog.ru gost.e-ecolog.ru

gost.e-ecolog.ru