ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО

ПО ТЕХНИЧЕСКОМУ РЕГУЛИРОВАНИЮ И МЕТРОЛОГИИ

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ГОСТ Р 56697— 2015

МЕТОДЫ ИСПЫТАНИЯ ПО ВОЗДЕЙСТВИЮ ХИМИЧЕСКОЙ ПРОДУКЦИИ НА ОРГАНИЗМ ЧЕЛОВЕКА

Изучение токсичности у негрызунов при пероральном многократном введении в течение 90 дней

(OECD Test № 409:1998 Repeated dose 90-day oral toxicity study in non-rodents, 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. № 1758-ст

4 Настоящий стандарт идентичен международному документу ОЭСР Тест № 409:1998 «Изучение токсичности у негрызунов при пероральном многократном введении в течение 90 дней» (OECD Test № 409:1998 «Repeated Dose 90-day Oral Toxicity Study in Non-Rodents», IDT).

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

Руководства Организации экономического сотрудничества и развития (ОЭСР) по испытаниям химических веществ периодически пересматриваются в свете научного прогресса. Первоначально руководство 409 было утверждено в 1981 г. В пересмотренной версии изменения сделаны с целью получения дополнительной информации о животных моделях, используемых в исследовании.

Пересмотренная версия Руководства 409 в значительной степени основывается на итогах Консультативного совещания экспертов OECD по испытаниям подострой и острой токсичности, проходившего в Риме в период со 2 по 3 ноября 1995 г. [1].

Исследование подострой оральной токсичности с использованием повторяющихся доз может проводиться после того, как будет получена первичная информация по токсичности в результате проведения 28-дневного исследования острой токсичности или токсичности при многократном введении. 90-дневные исследования обеспечивают получение информации о возможных рисках для здоровья, таких как вытекающие из повторяющегося воздействия в период быстрого роста и полового созревания. Исследование будет обеспечивать получение информации по основным токсическим эффектам, обозначив органы-мишени и возможность накопления, и может показать уровень экспозиции, при котором не наблюдается побочных эффектов и который может быть использован в выборе доз для хронических исследований и для установления критериев безопасности воздействия на организм человека.

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

МЕТОДЫ ИСПЫТАНИЯ ПО ВОЗДЕЙСТВИЮ ХИМИЧЕСКОЙ ПРОДУКЦИИ НА ОРГАНИЗМ ЧЕЛОВЕКА

Изучение токсичности у негрызунов при пероральном многократном введении в течение 90 дней

Methods of testing the chemicals of human hazard.
Repeated dose 90-day oral toxicity study in non-rodents

Дата введения — 2016—07—01

1 Область применения

Настоящий стандарт устанавливает метод анализа и оценки характеристик токсичности химического вещества.

Настоящий стандарт применяют для идентификации побочных эффектов химического воздействия у негрызунов.

Настоящий стандарт применим только в следующих случаях:

- наблюдаемые эффекты в других исследованиях указывают на необходимость их уточнения на других видах негрызунов;
- токсикокинетические исследования указывают, что использование специфичных видов негрызунов — наиболее подходящий выбор лабораторных животных;
- другие специфические причины, обосновывающие использование негрызунов.

2 Термины и определения

В настоящем стандарте применены следующие термины с соответствующими определениями:

2.1 **доза** (dose): Количество введенного исследуемого вещества. Доза выражается как масса (г, мг) или как масса исследуемого вещества на единицу опытного животного (например, мг/кг), или как постоянная диетарная концентрация (ppm).

2.2 **дозировка** (dosage): Общий термин, включающий в себя дозу, ее частоту и продолжительность дозирования.

2.3 **NOAEL** (no-observed-adverse-effect level): Аббревиатура для уровня, на котором не наблюдается вредного воздействия (no-observed-adverse-effect level) и самый высокий уровень дозы, на котором не наблюдается никаких побочных явлений, связанных с проводимой терапией.

3 Сущность метода

Исследуемое вещество вводят ежедневно перорально отдельными дозами нескольким группам экспериментальных животных — по одной одинаковой дозе на каждую группу в течение 90 дней. На протяжении всей продолжительности приема за животными внимательно наблюдают для обнаружения признаков токсичности. Проводят вскрытие умерших или умерщвленных во время исследования животных. В конце исследования всех выживших животных умерщвляют и проводят вскрытие.

4 Описание метода/подготовительных работ к проведению исследования

4.1 Выбор вида лабораторных животных

Широко используемые виды негрызунов — это собаки, которые должны быть определенной породы; наиболее часто используют породу Бигль. Можно использовать также другие виды животных, например свиней, карликовых свиней. Приматы не рекомендуются, если их использование не обосновано. Следует использовать молодых, здоровых животных, и при использовании собак дозировку

Издание официальное

следует начинать предпочтительно в возрасте 4—6 мес, но не позднее 9 мес. При проведении предварительного исследования хронической токсичности перед долгосрочным исследованием следует использовать одни и те же виды/породы животных в обоих исследованиях.

4.2 Условия содержания и кормления

Для питания можно применять обычные лабораторные диеты с неограниченным употреблением питьевой воды. Выбор диеты может быть связан с необходимостью подмешивания испытуемого вещества. Условия содержания в клетке должны быть подходящими для используемых видов. Предпочтительно искусственное освещение с последовательностью: 12 ч света, 12 ч темноты. Условия содержания и питания должны отвечать установленным требованиям для выбранных видов, как это предусмотрено официальным законодательством и руководствами [2]—[4].

4.3 Подготовка лабораторных животных

Используют здоровых молодых животных, которые акклиматизировались к лабораторным условиям и не подвергались исследованию в предыдущих экспериментах. Продолжительность акклиматизации зависит от выбранных видов и источника их происхождения. Рекомендуются не менее 5 дней для собак и свиней и не менее двух недель — для других видов, полученных из внешних источников. Экспериментальные животные должны быть охарактеризованы по виду, породе (линии), источнику происхождения, полу, весу и/или возрасту. Животные должны быть случайно разделены по контрольным и экспериментальным группам. Клетки должны быть расположены таким образом, чтобы возможное влияние размещения клеток было минимальным. Каждому животному должен быть присвоен идентификационный номер.

4.4 Подготовка доз

Исследуемое вещество можно вводить в пищевой рацион или в питьевую воду через желудочный зонд или в капсулах. Метод перорального введения зависит от цели исследования, а также от физико-химических свойств исследуемого вещества.

При необходимости исследуемое вещество растворяют или суспендируют в подходящей среде. По возможности рекомендуется в первую очередь рассматривать для использования водный раствор/суспензию, затем рассматривать раствор/эмульсию в масле (например, в кукурузном масле), а затем в зависимости от возможностей — растворы в других средах. Должна быть определена стабильность исследуемого вещества в условиях введения.

5 Процедура

5.1 Количество и пол животных

Следует использовать не менее 8 животных (4 самки и 4 самца) для каждой дозы исследуемого вещества. Если планируется промежуточное умерщвление, количество животных должно быть увеличено на то количество, которое планируют умертвить до окончания исследования. Число животных на момент завершения исследования должно быть адекватным для полноценной оценки токсического действия. На основании имеющихся сведений об исследуемом веществе или его близком аналоге может быть принято решение о включении дополнительной группы из 8 животных (по 4 каждого пола) в виде контроля или в виде дополнительной группы, получающей наивысшую дозу для наблюдения после дозирования с целью выявления обратимости или персистирования токсических эффектов. Продолжительность указанного периода наблюдения после дозирования должна быть установлена в соответствии с наблюдаемыми эффектами.

5.2 Дозирование

Не менее чем три уровня дозы и одновременный контроль следует использовать, кроме тех случаев, когда проводят предельный тест (см. 5.3). Уровни доз могут основываться на результатах более раннего многократного введения или на исследованиях по предварительному подбору диапазона доз для многократного введения. При этом должны быть приняты во внимание любые существующие данные по токсикокинетике для исследуемого вещества или сходных соединений. Если нет ограничений по физико-химическим свойствам или биологическим эффектам исследуемого вещества, самые высокие уровни доз должны быть выбраны с целью вызывать токсические эффекты, но

не смерть или тяжелые страдания. Должна быть выбрана убывающая последовательность уровней доз с целью демонстрации любых дозозависимых эффектов и уровня, при котором не наблюдается вредного эффекта (no-observed-adverse-effect level, NOAEL) в качестве самого низкого уровня дозировки. 2—4-кратные интервалы зачастую являются оптимальными для установления убывающей последовательности уровней доз, и добавление четвертой экспериментальной группы часто предпочтительно для использования очень широких интервалов (например, больше чем 6—10-кратных) между дозировками.

Контрольная группа должна быть группой, не подвергшейся воздействию, или контрольной группой, получающей носитель/растворитель, если носитель/растворитель используют при введении исследуемого вещества. За исключением воздействия исследуемого вещества, с животными в контрольной группе необходимо обращаться так же, как и с животными в экспериментальных группах. Если используют носитель вещества, контрольная группа должна получать носитель в максимально высоком объеме, используемом в исследовании. Если исследуемое вещество вводится в рацион и вызывает снижение потребления с пищей, то получающая одинаковый рацион контрольная группа может быть полезна для выявления эффектов, связанных со снижением потребления пищи, обусловленным вкусовыми или токсикологическими изменениями.

Должны быть обоснованы следующие возможные эффекты растворителя/среды: влияние на всасывание, распределение, метаболизм или удержание исследуемого вещества, воздействие на химические свойства исследуемого вещества, которое может изменить его токсикологические характеристики; воздействие на потребление пищи или воды или статус питания.

5.3 Предельный тест

Если испытание при одном уровне дозы, эквивалентном не менее 1000 мг/кг массы тела в день, используя процедуры, описанные для данного исследования, не приводит к возникновению побочных эффектов, и если основываясь на данных о структурно родственных соединениях не следует ожидать токсичность, то полное исследование с использованием трех уровней доз можно не проводить. Предельный тест не проводят, если для людей планируется применение более высоких доз.

5.4 Введение доз

Животным дают определенные дозы исследуемого вещества ежедневно семь дней в неделю в течение 90 дней. Любой другой режим дозирования, например 5 дней в неделю, нуждается в обосновании. Когда испытуемое вещество вводят через желудочный зонд, это должно быть сделано за одно введение с помощью желудочного зонда или подходящей интубационной канюли (катетер, трубка). Максимальный объем жидкости, который может быть введен единовременно, зависит от размера экспериментального животного. Обычно объем должен быть как можно более низким. За исключением раздражающих или разъедающих (коррозионных) веществ, которые обычно приводят к усилению эффекта с ростом концентрации, различия в объеме должны быть минимизированы, чтобы обеспечить постоянный объем на всех уровнях доз.

Для веществ, введенных через пищу или питьевую воду, важно, чтобы количество исследуемого вещества не влияло на нормальное питание или водный баланс. Когда испытуемое вещество вводят через пищу, используют либо постоянную диетарную концентрацию (ppm), либо постоянный уровень дозы в расчете на массу тела животного; любой другой альтернативный вариант использования должен быть обоснован. Для вещества, вводимого через желудочный зонд или в виде капсул, дозу следует давать в одно и то же время каждый день и корректировать с изменением массы тела животного, при необходимости. Когда 90-дневное исследование используют как предварительное перед долгосрочным исследованием хронической токсичности, в обоих исследованиях используют одинаковую диету.

6 Наблюдения

Период наблюдений должен быть не мене 90 дней. Животные в сателлитной (спутниковой) группе, которая предназначена для последующих наблюдений, должны содержаться в течение соответствующего периода без применения исследуемого препарата, персистирования токсических эффектов или восстановления после них.

Общие клинические наблюдения проводят один раз в день, желательно в одно и то же время, принимая во внимание период пика ожидаемых эффектов после введения дозы. Клиническое состояние животных должно быть зафиксировано в документации. Не менее чем два раза в день, обычно в

начале и в конце дня, все животные должны быть проверены на наличие признаков заболевания и смерти.

Один раз перед первым дозированием (для того, чтобы были возможны внутригрупповые сравнения) и далее один раз в неделю у всех животных должны быть проведены детальные клинические наблюдения. Эти наблюдения должны быть проведены вне клетки на стандартной площадке и предпочтительно в одно и то же время. Все меры должны быть предприняты для минимизации вариабильности в проведении измерений у животных. Признаки токсичности должны быть тщательно зафиксированы, включая время наступления признака, степень и продолжительность. Наблюдения должны включать в себя, но не ограничиваться только следующим: изменением кожных покровов, шерсти, глаз, слизистых оболочек, выделением секреций и экскреций и автономной деятельностью, слезоотделением, пилоэрекцией, размером зрачка, необычным характером дыхания. Изменение в походке, положении тела и реакции на обращение, а также наличие клонических или тонических движений, стереотипные движения (например, повышенный уход за шерстью, повторяющееся кружение) или любое странное поведение также должны быть зафиксированы.

Офтальмологический осмотр с использованием офтальмоскопа или иного подходящего оборудования должен быть проведен перед введением исследуемого вещества и по окончании исследования, желательно у всех животных, или минимум у животных, получивших наивысшую дозу, и в контрольных группах. Если установлены офтальмологические изменения, связанные с проводимой терапией, все животные должны быть проверены.

6.1 Масса тела животных и потребление ими пищи и воды

Всех животных необходимо взвешивать один раз в неделю. Измерения потребления пищи следует проводить еженедельно. Если исследуемое вещество вводят с питьевой водой, потребление воды также должно быть измерено еженедельно. Потребление воды также измеряют при введении исследуемого вещества с пищей или через зонд, во время которых питьевая активность может изменяться.

6.2 Гематология и клиническая биохимия

Образцы крови берут из определенного места и хранят в соответствующих условиях, если хранение необходимо. В конце периода исследования образцы собирают непосредственно перед или во время процедуры умерщвления животных.

Гематология, включая гематокрит, концентрация гемоглобина, число эритроцитов, общее количество лейкоцитов, лейкоцитарная формула, количество тромбоцитов и мера потенциала свертываемости (например, время свертывания, протромбиновое время или тромбопластиновое время) должны быть исследованы в начале исследования, затем либо ежемесячно, либо в середине и в конце исследования.

Исследования клинической биохимии, предназначенные для исследования основных токсических эффектов в тканях, особенно в почках и печени, должны быть выполнены на образцах крови, полученных от всех животных в начале исследования, затем либо ежемесячно, либо в середине и в конце исследования. Должен быть исследован водно-солевой баланс, углеводный обмен, функции почек и печени. На выбор специальных исследований будут влиять сведения о механизме действия исследуемого вещества. Перед забором крови животные не должны принимать пищу в течение соответствующего для каждого вида периода. Предлагаемые тесты включают в себя измерения кальция, фосфора, хлора, натрия, калия, глюкозы натощак, аланин-аминотрансферазы, аспартат аминотрансферазы, орнитиндекарбоксилазы, гамма глутамилтранспептидазы, азота мочевины, альбумина, креатинина крови, общего билирубина и общего белка сыворотки.

Общий анализ мочи должен быть проведен в начале исследования, затем в середине и в конце исследования, с использованием системы сбора мочи в течение определенного времени. Общий анализ мочи включает в себя объем, осмолярность или удельный вес, pH, белок, глюкозу и кровь/клеточные элементы крови. Дополнительные параметры могут быть применены при необходимости для исследования расширения наблюдаемых эффектов.

Дополнительно должны быть рассмотрены исследования по изучению маркеров общего повреждения тканей. Другие исследования, которые могут быть необходимы для адекватной токсикологической оценки, включают в себя анализы липидов, гормонов, кислотно-щелочного баланса, метгемоглобина и ингибирование холинэстеразы. Дополнительная клиническая биохимия может быть применена при необходимости расширить исследования наблюдаемых эффектов. Дополнительные исследования следует проводить для химических веществ определенных классов отдельно в каждом конкретном случае.

Таким образом, необходим гибкий подход в зависимости от видов животных и/или ожидаемых эффектов у каждого соединения.

6.3 Патоморфологические исследования

6.3.1 Аутопсия

Все животные в исследовании должны быть подвержены полной, детализированной аутопсии, которая включает внимательную проверку внешних покровов тела, всех отверстий, а также черепной, грудной и брюшной полостей и их содержимого. Печень с желчным пузырем, почки, надпочечники, яички, придатки яичка, яичники, матка, щитовидная железа (с паращитовидными железами), тимус, селезенки, мозг и сердце всех животных (кроме умирающих животных и/или животных, которые вскоре будут умерщвлены) должны быть очищены от любых прилипших тканей должным образом и как можно скорее после вскрытия, во избежание высыхания, должна быть взвешены.

Следующие органы должны быть сохранены в наиболее подходящей среде как для их долговременного хранения, так и их последующего гистологического исследования: органы с серьезными поражениями, мозг (представительные участки, включая головной мозг, медуллярное вещество/варолиев мозг), спинной мозг (с трех уровней: шейного, средне-грудного и поясничного отделов), гипофиз, глаза, щитовидная железа, паращитовидная железа, тимус, пищевод, слюнные железы, желудок, тонкая кишка и толстая кишка (включая бляшки Пейера), печень, желчный пузырь, поджелудочная железа, почки, надпочечники, селезенка, сердце, трахеи и легкие, аорты, половые железы, матка, добавочные половые железы, женские молочные железы, предстательная железа, мочевой пузырь, лимфатические узлы (предпочтительно один лимфатический узел, охватывающий путь введения, а другой — удаленный от пути введения), периферические нервы (седалищный или большеберцовый) предпочтительно в непосредственной близости от мышц, часть костного мозга (и/или свежий аспират костного мозга) и кожа. Клинические и другие результаты могут означать, что существует необходимость изучения дополнительных тканей. Должны быть сохранены любые другие органы, которые могут быть органами-мишенями исходя из известных свойств исследуемого вещества.

6.4 Гистопатологические исследования

Полное гистопатологическое исследование сохраненных органов и тканей должно быть проведено у всех животных в контрольной группе и группе применения наивысшей дозы. Изучение должно быть расширено на животных всех других групп, если в группе применения высокой дозы наблюдаются изменения, связанные с введением исследуемого вещества. Все серьезные изменения должны быть всесторонне изучены.

Когда используют сателлитную группу, гистопатологические исследования должны быть проведены на тканях и органах, идентифицированных как органы-мишени в экспериментальных группах.

7 Данные и отчетность

7.1 Данные

В отчетах должны быть приведены индивидуальные данные. Дополнительно все данные должны быть суммарно представлены в табличной форме с указанием для каждой испытуемой группы числа животных в начале исследования, числа животных, погибших во время исследования, и числа животных, умерщвленных из гуманных соображений, а также время смерти или умерщвления каждого животного, число наблюдавшихся симптомов токсических эффектов, описание наблюдавшихся симптомов токсических эффектов, включая время обнаружения, продолжительность и тяжесть любых токсических эффектов, число животных, у которых проявились поражения, тип поражений и процентное соотношение животных, у которых проявился каждый тип поражения.

Когда это целесообразно, численные результаты следует оценивать с помощью соответствующего, общепринятого статистического метода. Статистические методы и данные, которые нужно проанализировать, следует рассматривать как часть плана исследования.

7.2 Отчет об исследовании

Исследуемое вещество:
- физические свойства, чистота и физико-химические свойства;
- идентификационные данные.

Растворитель (при применении):

- обоснование выбора растворителя, если не используют воду.

Лабораторные животные:

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

Условия исследования:

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

Результаты:

- масса тела/изменения массы тела;
- потребление корма и воды, если применимо;
- данные о выявленном токсическом эффекте в зависимости от пола и уровня дозы, включая симптомы интоксикации;
- природа, тяжесть и длительность клинических симптомов (являются обратимыми или нет);
- офтальмологическое обследование;
- гематологические исследования с соответствующими значениями в начале исследования;
- клинические исследования биохимии с соответствующими значениями в начале исследования;
- конечная масса тела, масса органов и весовые соотношения орган/масса тела;
- данные вскрытия;
- подробное описание всех гистопатологических исследований;
- данные поглощения при наличии;
- статистическая обработка результатов, в случае необходимости.

Обсуждение результатов.

Заключения.

Библиография

[1] OECD (Rome, 1995). Report of the Consultation Meeting on Sub-chronic and Chronic Toxicity/Carcinogenicity Testing

[2] EEC Council Directive 86/609/EEC on the approximation of laws, regulations and administrative provisions of the Member States regarding the protection of animals used for experimental and other scientific purposes. Official Journal, 29, L358, 18th December 1986

[3] National Research Council, 1985. Guide for the care and use of laboratory animals. NIH Publication No. 86-23. Washington D.C., US. Dept. of Health and Human Services

[4] GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, December, 1989). Publication on the Planning and Structure of Animal Facilities for Institutes Performing Animal Experiments. ISBN 3-906255-06-9

УДК 615.038:615.012/.014:615.2:006.354

ОКС 07.080
11.020
11.120.01

Ключевые слова: воздействие химической продукции, метод испытания, токсичность, негрызуны, пероральное многократное введение, 90-дневный тест

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

Подписано в печать 08.02.2016. Формат 60x84 1/8.
Усл. печ. л. 1,40. Тираж 34 экз. Зак. 4090.

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