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

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

ГОСТ 32641— 2014

МЕТОДЫ ИСПЫТАНИЯ ПО ВОЗДЕЙСТВИЮ ХИМИЧЕСКОЙ ПРОДУКЦИИ НА ОРГАНИЗМ ЧЕЛОВЕКА

Определение токсичности при повторном/многократном пероральном поступлении вещества на грызунах. 28-дневный тест

(OECD, Test №407:2008, IDT)

Издание официальное

Москва
Стандартинформ
2015

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

Цели, основные принципы и основной порядок проведения работ по межгосударственной стандартизации установлены в ГОСТ 1.0–92 «Межгосударственная система стандартизации. Основные положения» и ГОСТ 1.2–2009 «Межгосударственная система стандартизации. Стандарты межгосударственные, правила, рекомендации по межгосударственной стандартизации. Правила разработки, принятия, обновления и отмены»

Сведения о стандарте

1 ПОДГОТОВЛЕН Федеральным бюджетным учреждением здравоохранения «Российский регистр потенциально опасных химических и биологических веществ» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ФБУЗ «Российский регистр потенциально опасных химических и биологических веществ» Роспотребнадзора); Федеральным государственным унитарным предприятием «Всероссийский научно-исследовательский центр стандартизации, информации и сертификации сырья, материалов и веществ» (ФГУП «ВНИЦСМВ»); Техническим комитетом по стандартизации № 339 «Безопасность сырья, материалов и веществ»

2 ВНЕСЕН Федеральным агентством по техническому регулированию и метрологии

3 ПРИНЯТ Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации (протокол от 28 марта 2014 г. № 65-П)

За принятие проголосовали:

Краткое наименование страны по МК (ИСО 3166) 004 – 97	Код страны по МК (ИСО 3166) 004 – 97	Сокращенное наименование национального органа по стандартизации
Азербайджан	AZ	Азстандарт
Армения	AM	Минэкономики Республики Армения
Беларусь	BY	Госстандарт Республики Беларусь
Казахстан	KZ	Госстандарт Республики Казахстан
Киргизия	KG	Кыргызстандарт
Молдова	MD	Молдова-Стандарт
Россия	RU	Росстандарт
Таджикистан	TJ	Таджикстандарт
Туркменистан	TM	Туркменстандартлары
Узбекистан	UZ	Узстандарт
Украина	UA	Минэкономразвития Украины

4 Настоящий стандарт идентичен международному документу OECD Test № 407: 2008 Repeated Dose 28-Day Oral Toxicity Study in Rodents (ОЭСР Тест № 407: 2008 Повторное исследование пероральной токсичности на грызунах: 28 - дневное).

Перевод с английского языка (en).

Степень соответствия – идентичная (IDT)

5 Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 24 сентября 2014 г. № 1215-ст межгосударственный стандарт ГОСТ 32641—2014 введен в действие в качестве национального стандарта Российской Федерации с 1 июня 2015 г.

6 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

Информация об изменениях к настоящему стандарту публикуется в ежегодном информационном указателе «Национальные стандарты», а текст изменений и поправок – в ежемесячном информационном указателе «Национальные стандарты». В случае пересмотра (замены) или отмены настоящего стандарта соответствующее уведомление будет опубликовано в ежемесячном информационном указателе «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

© Стандартинформ, 2015

В Российской Федерации настоящий стандарт не может быть полностью или частично воспроизведен, тиражирован и распространен в качестве официального издания без разрешения Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии

Введение

Первая редакция руководства 407 по тестированию химических веществ была утверждена в 1981 г. Данное руководство периодически пересматривается в свете последних достижений науки. Новая редакция руководства была принята в 1995 г. с целью получения дополнительной информации от животных, используемых в исследовании, в частности, в области нейротоксичности и иммунотоксичности.

В 1998 г. Организация экономического сотрудничества и развития (ОЭСР) поставила приоритетную задачу по пересмотру существующих и разработке новых руководств по тестированию с целью исследования и тестирования потенциальных эндокринных деструкторов [9]. Одним из элементов поставленной задачи было дополнение действующего руководства ОЭСР по определению токсичности при повторном 28-дневном пероральном поступлении вещества на грызунах, необходимыми для обнаружения эндокринной активности тестируемых веществ. Для этого была проведена обширная международная программа проверки обоснованности и целесообразности дополнительных параметров, характеристик этих параметров для химических веществ с (анти)эстрогенной, (анти)андрогенной и (анти)тиреоидной активностью, внутрилабораторной и межлабораторной воспроизводимости и влияние новых параметров на параметры, предусмотренные предыдущей редакцией руководства 407. Большой объем данных, полученных в результате такой программы, был компилирован и подробно проанализирован в исчерпывающем отчете [10]. Настоящая редакция руководства 407 включает в себя опыт и выводы, полученные во время проведения международной программы тестирования и позволяет рассматривать некоторые зависимые от эндокринной системы воздействия в контексте с другими токсикологическими эффектами.

М Е Ж Г О С У Д А Р С Т В Е Н Н Ы Й С Т А Н Д А Р Т

МЕТОДЫ ИСПЫТАНИЯ ПО ВОЗДЕЙСТВИЮ ХИМИЧЕСКОЙ ПРОДУКЦИИ НА ОРГАНИЗМ ЧЕЛОВЕКА

Определение токсичности при повторном/многократном пероральном поступлении вещества на грызунах. 28-дневный тест

OECD guidelines for the testing of chemicals.
Repeated dose 28-day oral toxicity study in rodents

Дата введения – 2015–06–01

1 Область применения

При оценке и исследовании токсических характеристик химического вещества, определение пероральной токсичности при многократном применении возможно после получения исходной информации о токсичности, установленной в ходе тестирования острой токсичности. Настоящий стандарт предназначен для изучения токсического воздействия на весьма широкий диапазон мишеней. Исследование предоставляет информацию о возможной опасности для здоровья, вероятной при повторяющемся воздействии в течение относительно короткого периода времени, включая воздействие на нервную, иммунную и эндокринную системы. Именно с точки зрения этих органов-мишеней следует идентифицировать химические вещества, обладающие потенциальным нейротоксическим действием, которое может потребовать дальнейших глубоких исследований в этом направлении, а также исследование химических веществ, которые могут наносить ущерб функции щитовидной железы. Исследование также может предоставить данные о химических веществах, которые поражают мужские и/или женские репродуктивные органы у молодых половозрелых животных и могут указывать на другие иммунные эффекты.

Результаты исследований, проводимых в соответствии с настоящим стандартом, применяются для выявления опасности для здоровья и оценки рисков. Полученные в результате параметры воздействия на эндокринную систему следует рассматривать в контексте [12]. Метод включает в себя базовое исследование токсичности при многократном введении химических веществ, для которых проведение 90-дневного исследования не оправдано (например, объем производства которых не превышает определенных пределов) или в качестве предварительного испытания перед долгосрочным исследованием. Продолжительность воздействия должна составлять 28 дней.

Международная программа исследований, проводившаяся для обоснования параметров вероятного выявления воздействия тестируемого вещества на эндокринную систему, показала, что качество данных, получаемых при исследованиях в соответствии с настоящим стандартом, в значительной степени зависит от опыта лаборатории, проводящей испытание. Это, в частности, относится к гистопатологическим исследованиям периодических изменений в женских репродуктивных органах и к определению массы малых гормонозависимых органов, которые сложно препарировать. Было разработано специальное руководство по гистопатологии [20]. Оно составлено в помощь патологам в проведении исследований и помогает повысить чувствительность анализа. Было выявлено, что на эндокринную токсичность могут указывать различные параметры, и эти параметры включены в настоящий стандарт. Параметры, по которым имевшиеся данные были недостаточными для подтверждения их пригодности, или которые, в ходе проверки, продемонстрировали недостаточные доказательства их способности выявлять эндокринные деструкторы, предлагаются в качестве дополнительных объектов исследования (см. раздел 6).

Основываясь на данных, полученных в процессе валидации, следует отметить, что чувствительности анализа недостаточно для выявления всех веществ с (анти)андрогенным или (анти)эстрогенным действием [10]. Настоящий стандарт не применяется при исследованиях на жизненном этапе, наиболее чувствительном к эндокринным нарушениям. Тем не менее, в ходе процесса валидации, настоящий стандарт позволяет выявить вещества, которые оказывают слабое и сильное воздействия на функцию щитовидной железы и эндокринные активные вещества; вещества, которые оказывают сильное и умеренное действие через эстрогенные или эндрогенные рецепторы, однако, в большинстве случаев, не удалось выявить эндокринные активные вещества, слабо воздействующие на эстрогенные или эндрогенные рецепторы. Таким образом, это исследование не может считаться скриннинговым исследованием эндокринной активности.

Издание официальное

Соответственно, отсутствие влияния эффектов, связанных с этими видами воздействия не может являться доказательством отсутствия влияния на эндокринную систему. Что касается влияния на эндокринные медиаторы, то, учитывая вышесказанное, определение свойств вещества не должно основываться только на результатах настоящего исследования, должна учитываться вся совокупность представленных доказательств, включая все имеющиеся данные о химическом веществе для определения его потенциальной эндокринной активности. По этой причине принятие регулярного решения по эндокринной активности (общая характеристика вещества) должно быть общим подходом, который не предусматривает применение только настоящего стандарта.

Общеизвестно, что все процедуры на животных, проводятся в соответствии с национальными стандартами о защите животных; нижеизложенные описания процесса ухода и исследования являются минимальными нормативными стандартами, и будут заменены местными нормами, если они более строгие. Дальнейшее руководство гуманного исследования на животных дается в [15].

2 Термины и определения

В настоящем стандарте применены следующие термины с соответствующими определениями:

2.1 **андрогенная активность** (Androgenicity): Способность химического вещества действовать как естественный андрогенный гормон (например, тестостерон) в организме млекопитающего.

2.2 **антиандрогенная активность** (Antiandrogenicity): Способность химического вещества подавлять действие естественного андрогенного гормона (например, тестостерона) в организме млекопитающего.

2.3 **антитироидная активность** (Antithyroid activity): Способность химического вещества подавлять действие естественного тироидного гормона (например, трийодтиронин – T_3) в организме млекопитающего.

2.4 **антиэстрогенная активность** (Antioestrogenicity): Способность химического вещества подавлять действие естественного эстрогенного гормона (например, эстрадиола 17) в организме млекопитающего.

2.5 **валидация** (Validation): Научный процесс, предназначенный для характеристики операционных требований и ограничений метода испытания и демонстрации его надежности и соответствия конкретной цели.

2.6 **доза** (Dose): Количество вводимого тестируемого вещества. Доза выражается как масса (г, мг), или как масса тестируемого вещества на единицу массы подопытного животного в сутки (например, мг/кг/сутки), или как постоянная концентрация вещества в пище.

2.7 **дозировка** (Dosage): Общий термин, включающий в себя дозу, частоту и продолжительность ее ввода.

2.8 **очевидная токсичность** (Evident toxicity): Общий термин, который описывает явные признаки токсичности после введения тестируемого вещества. Они должны быть достаточными для оценки опасности и такими, чтобы увеличение вводимой дозы вещества могло привести к развитию признаков серьезного отравления и возможной смерти.

2.9 **тироидная активность** (Thyroid activity): Способность химического вещества действовать как естественный тироидный гормон (например, T_3) в организме млекопитающего.

2.10 **эстрогенная активность** (Oestrogenicity): Способность химического вещества действовать как естественный эстрогенный гормон (например, эстрадиол 17β) в организме млекопитающего.

2.11 **NOAEL:** Уровень отсутствия наблюдаемого вредного воздействия после введения вещества, является максимальной дозой, не вызывающей обнаруживаемого вредного воздействия на здоровье.

3 Принцип тестирования

Тестируемое вещество вводится перорально ежедневно, дозированно, нескольким группам подопытных животных, при этом каждой группе вводится одинаковая доза вещества в течение 28 дней. На протяжении периода приема вещества животные находятся под тщательным наблюдением с целью выявления признаков токсического воздействия. Животные, умершие или умерщвленные по соображениям гуманности в ходе тестирования, подлежат аутопсии; после завершения тестирования выжившие животные также умерщвляются и подвергаются аутопсии. 28-дневное исследование предоставляет информацию о воздействии многократного перорального введения вещества и может указывать на необходимость проведения дальнейшего, более долгосрочного исследования. Оно

может также предоставить информацию, касающуюся подбора концентрации вещества для более долгосрочного исследования. Данные, полученные в результате применения настоящего стандарта, должны позволить характеризовать токсичность тестируемого вещества с указанием зависимости ответной реакции от дозы и определить уровень отсутствия наблюдаемого вредного воздействия (NOAEL).

4 Описание метода

4.1 Животные

4.1.1 Выбор видов животных

Предпочтительным видом подопытных животных являются крысы, хотя возможно использование прочих видов грызунов. Если параметры, определяемые настоящим стандартом, тестируются на других видах грызунов, необходимо предоставить подробное обоснование такого выбора. С биологической точки зрения вероятно, что другие виды животных будут реагировать на ядовитые вещества аналогично крысам, однако применение более мелких видов может привести к увеличению вариабельности из-за технической сложности препарирования более мелких органов. При проведении международной программы валидации для выявления эндокринных деструкторов в качестве подопытных животных применяли только крыс. В тестировании следует применять обычные лабораторные породы молодых здоровых половозрелых животных. Самки должны быть нерожавшими и небеременными. Введение доз вещества должно начинаться сразу же после отлучения от матери, но в любом случае, до того, как животным исполнится девять недель. В начале исследования отклонение массы подопытных животных должно быть минимальным и не превышать ± 20 % средней массы особей обоего пола. В случае, если исследование проводится в качестве предварительного к долгосрочным исследованиям хронической токсичности, в обоих исследованиях должны использовать животных одной породы и одного и того же происхождения.

4.1.2 Условия содержания и кормления

Все процедуры должны соответствовать национальным стандартам обращения с лабораторными животными. Температура в помещении с подопытными животными должна составлять (22±3) °С. Несмотря на то, что относительная влажность воздуха не должна быть ниже 30 % и, желательно, не превышать 70 %, за исключением периода уборки помещения, целевое значение относительной влажности составляет от 50 % до 60 %. Освещение в помещении должно быть искусственное, с чередованием 12 ч света, 12 ч темноты. В кормлении можно применять обычный лабораторный рацион с неограниченной подачей воды для питья. Выбор рациона может быть обусловлен необходимостью обеспечить соответствующую смесь тестируемого вещества при его введении в соответствии с настоящим методом. Животные должны содержаться в клетках небольшими группами особей одного пола; отдельное содержание животных возможно, если оно научно обосновано. При групповом содержании в одной клетке не должно быть более пяти животных.

Пища должна регулярно проверяться на содержание загрязняющих веществ. Образец пищи должен сохраняться до момента подготовки финального отчета.

4.1.3 Подготовка животных

Здоровые молодые половозрелые животные распределяются в контрольную и экспериментальную группы в произвольном порядке. Клетки с животными располагаются таким образом, чтобы свести к минимуму потенциальное воздействие размещения клеток. Каждому животному присваивается уникальный идентификационный номер. Все животные до начала исследования проходят акклиматизацию к лабораторным условиям на протяжении не менее пяти дней.

4.2 Подготовка доз вещества

Тестируемое вещество вводят через желудочный зонд, с пищей или с питьевой водой. Способ перорального введения зависит от цели исследования и физических/химических/токсико-кинетических свойств тестируемого вещества.

В необходимых случаях тестируемое вещество растворяют или суспензируют в подходящем растворителе. Рекомендуется, при наличии возможности, в первую очередь применять водный раствор/суспензию, затем масляный раствор/эмульсию (например, на основе кукурузного масла) и потом возможные растворы в прочих растворителях. Для любых растворителей, кроме воды, должны быть известны их токсические характеристики. Необходимо определить стабильность тестируемого вещества в условиях введения препарата.

4.3 Основное испытание

4.3.1 Число и пол животных

Для приема каждой дозы вещества применяют не менее 20 животных (10 самок и 10 самцов). Если запланировано промежуточное умерщвление, число подопытных животных должно быть

увеличено на число животных, которых предусматривают умертвить до завершения исследования. Основываясь на предварительных знаниях о химическом веществе или его ближайшем аналоге, следует предусмотреть включение дополнительной сопутствующей группы из десяти животных (по пять особей каждого пола) в контрольную группу и группу, получающую максимальную дозу с целью наблюдения после периода введения вещества за обратимостью, устойчивостью или замедленным проявлением токсического действия в течение не менее 14 дней после введения вещества.

4.3.2 Дозирование

Обычно применяют не менее трех тестируемых групп и одну контрольную группу, но если, основываясь на оценке прочих данных, никакого воздействия не ожидается при дозе 1000 мг/кг массы животного/сутки, возможно проведение испытания предельной дозы. При отсутствии достаточных данных возможно проведение исследования по поиску/подбору/определению диапазона доз (применяя животных одной породы и одного и того же происхождения) для того, чтобы определить необходимые дозы. Кроме введения тестируемого вещества, с животными контрольной группы следует обращаться так же, как и с тестируемыми группами. В случае применения растворителя, контрольная группа должна получать его в максимальном объеме.

Уровни доз должны подбирать с учетом всех имеющихся данных о токсических и токсико-кинетических свойствах тестируемого вещества или его производных. Максимальная доза должна выбираться с целью вызвать токсическое воздействие, а не смерть или жестокие страдания животного. Поэтому убывающая последовательность уровней дозы должна подбираться с целью продемонстрировать реакцию на вводимую дозу и уровень отсутствия наблюдаемого вредного воздействия (NOAEL) при минимальной дозе. Часто двух – четырехкратный интервал является оптимальным для установления убывания уровней дозы, а добавление четвертой тестируемой группы бывает предпочтительным при применении очень больших интервалов (например, превышающий показатель 10) между дозировками.

При наблюдении общих признаков токсичности (например, снижение массы тела, поражение печени, сердца, легких или почек и т. д.) или прочих изменений, которые могут не являться ответной реакцией на токсическое воздействие (например, снижение потребления пищи, увеличение печени и т. д.), обнаруженное вредное воздействие на чувствительные иммунные, неврологические или эндокринные органы системы должны интерпретироваться с особой тщательностью.

4.3.3 Испытание предельной дозы

Если испытание одной дозы, составляющей не менее чем 1000 мг/кг массы животного/сутки, при введении вещества с пищей или питьевой водой, в эквивалентной доле в пище или питьевой воде (исходя из значения массы тела), с применением процедур, описанных в настоящем исследовании, не приводит к наблюдаемому неблагоприятному воздействию, и если токсичность не предполагается, исходя из данных о структурно-родственных веществах, проведение полного исследования с применением трех уровней дозы может быть необязательным. Испытание предельной дозы проводится, за исключением тех случаев, когда воздействие на человеческий организм указывает на необходимость применения более высоких доз вещества.

4.3.4 Введение доз вещества

Животным вводятся дозы тестируемого вещества ежедневно, семь дней в неделю, в течение 28 дней.

При введении тестируемого вещества с принудительным питанием вещество следует вводить животным в однократной дозе, применяя желудочный зонд или подходящий интубационный катетер. Максимальный объем жидкости, который может быть введен за один раз, зависит от размера подопытного животного. Этот объем не должен превышать 1 мл/100 г массы тела, за исключением случаев с водными растворами, когда можно применять объем из расчета 2мл/100г массы тела. Кроме вызывающих раздражение или разъедающих веществ, которые в обычных условиях проявляют усугубляющее действие при повышенных концентрациях, вариабельность объема тестируемого вещества следует сводить к минимуму путем коррекции концентрации вещества, обеспечивая постоянный объем для всех уровней доз.

Для веществ, вводимых с пищей или питьевой водой, важно обеспечить, чтобы применяемое количество тестируемого вещества не нарушало обычного питания или водного баланса. При введении тестируемого вещества с пищей можно применять постоянную концентрацию пищи (мг/л) или постоянную дозу в пересчете на массу тела животного; при применении альтернативного варианта должно быть приведено его подробное описание. Для вещества, вводимого через желудочный зонд, дозу следует вводить ежедневно в одно и то же время, корректируя ее, по мере необходимости, для поддержания постоянного уровня дозы в пересчете на массу тела животного. В случае, когда исследования многократного применения вещества являются предварительными перед долгосрочным исследованием, в обоих исследованиях должны применять аналогичный пищевой рацион.

4.4 Результаты наблюдений

Период наблюдений должен составлять 28 дней. Животные в сопутствующей группе, предназначенные для последующего наблюдения, должны содержаться в течение периода не менее 14 дней без введения тестируемого вещества с целью выявления замедленного проявления или устойчивости токсического действия или восстановления от токсического воздействия.

Общие клинические наблюдения должны проводить один раз в день, желательно в одно и то же время, с учетом пикового периода предполагаемого действия после введения дозы вещества. Состояние здоровья животных должно фиксироваться документально. Не реже двух раз в сутки, как правило, утром и вечером, всех животных проверяют на признаки клинических проявлений заболевания и летальность.

Один раз до первого воздействия (для внутригрупповых сравнений), и хотя бы один раз неделю спустя, должны проводить подробные клинические наблюдения всех животных. Такие наблюдения следует проводить вне жилой клетки, желательно в стандартной обстановке, и в одно и то же время. Результаты наблюдений должны быть тщательно задокументированы, желательно с применением системы бальной оценки, четко определенной лабораторией, проводящей тестирование. Следует принять меры, обеспечивающие минимальные отклонения в условиях наблюдений, а также проведение наблюдений специалистами, которые не знают о введенном веществе. Отмечаемые признаки должны включать в себя, но не ограничиваться, изменениями кожи, меха, глаз, слизистых оболочек, наличием выделений или экскреции и автономной деятельности (например, слезотечение, пилоаррекция, изменение размера зрачков, необычная дыхательная деятельность). Изменения походки, положения тела и реакции на обращение, а также наличие клонических или тонических движений, стереотипного (например, избыточная чистка шерсти, повторяющееся движение по кругу) или необычного поведения (например, нанесение себе увечий, хождение пятясь задом) также должны документироваться [3].

На четвертой неделе введения вещества должна проводиться оценка сенсорной реактивности на различные раздражители [3] (например, слуховые, визуальные и проприоцептивные раздражители) [4], [5], [6], оценка силы схвата [7] и двигательной активности [8]. Дальнейшее описание применяемой методики приведено в соответствующем списке литературы. Тем не менее, возможно применение альтернативной методики.

Функциональные наблюдения, проводимые на четвертой неделе исследований, могут быть пропущены в случае, если исследование является предварительным перед последующим (90-дневным) субхроническим исследованием. В этом случае функциональные наблюдения должны проводить в ходе изучения отдаленных результатов. С другой стороны, наличие данных функциональных наблюдений в ходе исследования многократного применения могут упростить подбор уровней мощности доз для целей последующего субхронического исследования.

В порядке исключения, функциональные наблюдения могут быть также пропущены для групп, в которых иным образом проявились признаки токсичности в такой степени, в которой они могли бы существенно воспрепятствовать проведению функциональных тестов.

При аутопсии можно определить (по выбору) эстральный цикл всех самок, взяв влагалищный мазок. Эти наблюдения предоставляют информацию о периоде эстрального цикла в момент умерщвления подопытного животного и облегчают гистологический анализ тканей, чувствительных к эстрогену (см. руководство по гистопатологии [20]).

4.4.1 Масса тела и потребление пищи/воды

Все животные подлежат взвешиванию не реже одного раза в неделю. Измерения потребляемой пищи должны проводить, по крайней мере, еженедельно. Если тестируемое вещество вводится с питьевой водой, измерения потребления воды должны также проводить не реже одного раза в неделю.

4.4.2 Гематология

Следующие гематологические исследования должны проводить в конце периода испытаний: определение гематокрита, концентрации гемоглобина, числа эритроцитов, ретикулоцитов, общего числа лейкоцитов и лейкоцитарной формулы, подсчет числа тромбоцитов и определение времени свертываемости/способности свертывания крови. Прочие анализы, которые проводят в случае, если тестируемое вещество или предполагаемые метаболиты имеют или предположительно могут иметь окислительные свойства, включают в себя определение концентрации метгемоглобина и телец Гейнца.

Забор образцов крови проводят в месте проведения исследования и хранят, в случае необходимости, при соответствующих условиях. В конце периода испытаний забор образцов проводят непосредственно перед или в ходе процедуры умерщвления животных.

4.4.3 Клиническая биохимия

Клинические биохимические исследования для выявления обширного токсического воздействия на ткани и, особенно, воздействия на почки и печень, проводят на образцах крови, полученных от каждого животного, непосредственно перед или в ходе процедуры умерщвления (за исключением животных, обнаруженных в состоянии агонии и/или промежуточно умерщвленных). При анализе плазмы или сыворотки крови необходимо определять содержание натрия, калия, глюкозы, общее содержание холестерина, мочевины, азота в составе мочевины крови, креатинина, общего белка и уровня альбумина и более двух ферментов, указывающих на гепатоцеллюлярные эффекты (таких, как аланин-аминотрансфераза, аспартат-аминотрансфераза, щелочная фосфатаза, гамма-глутамилтранспептидаза и глютаминатдегидрогеназа) и желчных кислот. Анализ может также включать в себя определение дополнительных ферментов (гепатического или прочего происхождения) и билирубина, что может дать полезную информацию при определенных обстоятельствах.

Дополнительно в течение последней недели исследований может быть проведен общий анализ мочи, собранной за фиксированный промежуток времени, для определения следующих характеристик: внешний вид, объем, осмоляльность или удельная масса, уровень кислотности, простой белок, глюкоза и кровь/эритроциты.

Кроме того, следует учитывать возможность проведения исследований для выявления в плазме или сыворотке крови маркеров общего повреждения тканей. Другие исследования, которые следует проводить, если известные свойства тестируемого вещества могут, или предполагается, что могут, воздействовать на связанные особенности обмена веществ, включают в себя анализ на кальций, фосфор, триглицериды, специфические гормоны и холинэстеразу. Эти анализы должны проводить для веществ определенных классов или в зависимости от конкретного случая.

Несмотря на то, что в ходе международного анализа эндокринной системы, не было отмечено явного преимущества в определении тироидных гормонов (T_3, тироксин – T_4) и тиреостимулирующего гормона, полезно сохранять образцы плазмы или сыворотки крови для измерения концентрации T_3, T_4 и тиреостимулирующего гормона (по выбору) с целью выявления воздействия на гипофизарно-щитовидный ствол. Для хранения эти образцы могут быть заморожены при температуре минус 20 °С. Следующие факторы могут оказывать влияние на анализ вариабельности и абсолютной концентрации гормонов:

-время умерщвления, из-за циркадных изменений концентрации гормонов;

-способ умерщвления, для избежания повышенного стресса у животных, который может влиять на концентрацию гормонов;

-наборы для анализа для определения концентрации гормонов, которые могут отличаться от стандартных наборов.

Окончательное определение химических веществ, влияющих на щитовидную железу, более надежно при проведении гистопатологического исследования, чем при проведении анализа на уровне гормонов.

Забор образцов плазмы, специально предназначенных для анализа гормонов, должен проводиться в соответствующее время суток. Особое внимание рекомендуется уделять анализу T_3, T_4 и тиреостимулирующего гормона на основании изменений гистопатологии щитовидной железы. Цифровые значения, полученные при анализе концентраций гормонов, зависят от выпускаемых промышленностью различных наборов реактивов. Соответственно, не представляется возможным определить критерии эффективности, основываясь на данных за прошлые периоды. Наоборот, исследовательские лаборатории должны стремиться к тому, чтобы контрольные коэффициенты вариаций не превышали следующих значений: 25 для T_3 и T_4, и 35 для тиреостимулирующего гормона. Все концентрации указываются в нг/мл.

Если исходных данных за прошлые периоды недостаточно, следует рассмотреть необходимость проведения анализа переменных гематологического исследования или клинической биохимии до начала введения препарата, или, желательно, на животных, не входящих в тестируемые группы.

4.5 Патология

4.5.1 Общая аутопсия

Все животные, участвовавшие в исследовании, подлежат аутопсии, которая включает тщательное исследование внешней поверхности тела, всех отверстий, внутричерепной, грудной и брюшной полостей и их содержимого. Печень, почки, надпочечники, яички, эпидидимис, предстательная железа плюс семенные железы со свертывающей железой целиком, вилочковая железа, селезенка, мозг и сердце всех животных (за исключением животных, обнаруженных в состоянии агонии и/или промежуточно умерщвленных до окончания исследования) должны быть надлежащим образом отделены от всех прилегающих тканей, в зависимости от конкретного случая, и взвешены во влажном состоянии – сразу после вскрытия, чтобы избежать высыхания. Особой

тщательности требует отделение совокупных органов предстательной железы с тем, чтобы избежать прокола наполненных жидкостью семенных желез. В качестве альтернативного варианта семенные железы и предстательная железа могут быть отделены от тканей и взвешены после фиксации.

Кроме того, две ткани следует дополнительно взвесить сразу после вскрытия во избежание высыхания: парные яичники (масса во влажном состоянии) и матку, включая шейку матки (руководство по удалению и препарированию тканей матки для взвешивания приведено в [19]).

Масса щитовидной железы (дополнительно) может быть определена после фиксации. Отделять ткани также следует очень осторожно и только после фиксации, во избежание их повреждения. Повреждение тканей может скомпрометировать гистопатологическое исследование.

Следующие ткани должны сохраняться в наиболее оптимальной фиксирующей среде как для анализа тканевых культур, так и для предполагаемого последующего гистопатологического исследования (см. 4.5.2): все макроскопические поражения, мозг (типовые области, включая головной мозг, мозжечок и варолиев мост), спинной мозг, глаз, желудок, тонкая и толстая кишка (включая пейеровы бляшки), печень, почки, надпочечники, селезенка, сердце, вилочковая железа, щитовидная железа, трахея и легкие (сохраненные путем наполнения фиксатором и последующим погружением), гонады (семенники и яичники), добавочные половые органы (матка и шейка матки, эпидидимис, предстательная железа плюс семенные железы со свертывающей железой), влагалище, мочевой пузырь, лимфатические узлы (помимо ближайшего дренирующего лимфатического узла следует взять еще один лимфатический узел в соответствии с имеющимся у лаборатории опытом [16]), периферический нерв (седалищный или большеберцовый), желательно в непосредственной близости от мышцы, скелетная мышца и кость с костным мозгом (срезом или, в качестве альтернативы, свежим прикрепленным пунктатом костного мозга). Рекомендуется, чтобы семенные железы фиксировались погружением в жидкость Буэна или модифицированный фиксатор Дэвидсона [17], [18]. Белочная оболочка должна быть аккуратно и неглубоко проколота иголкой с обоих полюсов органа для того, чтобы обеспечить быстрое проникание фиксатора. Клинические и прочие данные могут обусловить необходимость исследования дополнительных тканей. Кроме того, все органы, которые считаются вероятными поражаемыми исходя из известных свойств тестируемого вещества, также должны быть сохранены.

Следующие ткани могут указывать на наличие эндокринного воздействия: гонады (яичники и семенники), добавочные половые органы (матка и шейка матки, эпидидимис, семенные железы со свертывающей железой, задняя латеральная и вентральная предстательная железа), влагалище, гипофиз, мужские молочные железы, щитовидная железа и надпочечники. Изменения мужской молочной железы не были зафиксированы документально в достаточном объеме, однако, этот параметр может быть очень чувствителен к веществам с эстрогенным действием. Исследования органов/тканей, не перечисленных в настоящем пункте, являются необязательными (см. раздел 6).

Руководство по гистопатологии [20] дает дополнительную подробную информацию о вскрытии, фиксировании, изготовлении срезов и гистопатологии тканей желёз внутренней секреции.

В ходе международной программы исследований были получены некоторые подтверждения того, что слабовыраженное эндокринное воздействие химических веществ с низкой потенциальной возможностью влияния на гомеостаз половых гормонов может быть выявлено через рассинхронизацию эстрального цикла в различных тканях, и в гораздо меньшей степени – по явным гистопатологическим изменениям в женских половых органах. Несмотря на отсутствие определенных доказательств такого воздействия, рекомендуется учитывать возможную асинхронию эстрального цикла при интерпретации результатов гистопатологии яичников (фолликулярных, оболочковых и зернистых клеток), матки, шейки матки и влагалища. При проведении оценки стадии цикла, определяемые с помощью вагинального мазка, также могут применять для сравнения.

4.5.2 Гистопатология

На сохраненных органах и тканях всех животных в контрольной группе и группе, получавшей высокую дозу, должно проводиться полное гистопатологическое исследование. Эти исследования должны распространяться на животных всех прочих групп дозировки вещества, если связанные с проведением исследования изменения наблюдаются в группе, получающей высокую дозу.

Исследованию подлежат все макроскопические повреждения.

Если применяют сопутствующую группу животных, гистопатологическое исследование должно проводиться на тканях и органах, воздействие на которые было выявлено в опытных группах.

5 Данные исследований и отчет

5.1 Данные исследований

Необходимо представлять индивидуальные данные. Кроме того, все данные должны быть представлены в табличной форме с указанием числа животных в каждой экспериментальной группе

на дату начала исследований, числа животных, найденных мертвыми во время проведения исследования или умерщвленных по причине гуманности, и времени смерти или умерщвления, количества проявления признаков токсичности, описания наблюдавшихся признаков токсичности, включая время начала проявления, продолжительность и серьезность всех признаков токсичности, числа животных, у которых проявились поражения, тип поражения, и процентное соотношение животных, у которых проявились поражения каждого типа.

Где применимо, числовые значения должны оцениваться в соответствии с подходящими и общепринятыми статистическими методами. Статистические методы и данные для анализа должны быть определены на стадии планирования исследования.

В целях контроля качества предлагается собирать контрольные данные за прошлые периоды и рассчитывать коэффициенты вариаций цифровых данных, особенно для параметров, связанных с выявлением эндокринных деструкторов. Эти данные могут быть применены для сравнения при оценке фактических исследований.

5.2 Отчет по результатам исследования

Отчет по результатам исследования должен включать в себя следующую информацию:

Исследуемое вещество:

-физическая природа, чистота и физико-химические свойства;

-идентификационные данные.

Растворитель (в соответствующем случае):

-обоснование выбора растворителя, кроме воды.

Подопытные животные:

-применяемый биологический вид и порода;

-число, возраст и пол животных;

-источник, условия содержания, кормления и т. д.;

-индивидуальная масса тела животных в начале исследования;

-обоснование применения животных других видов, кроме крыс.

Условия проведения исследований:

-обоснование выбора уровня доз вещества;

-подробный состав тестируемого вещества/режим приема вещества, полученная концентрация, устойчивость и однородность вещества;

-подробная информация о введении тестируемого вещества;

-пересчет концентрации тестируемого вещества, вводимого с пищей/питьевой водой (мг/л), в фактическую дозу (мг/кг массы тела/сутки), если применимо;

-подробная информация о качестве пищи и воды.

Результаты:

-масса тела, изменения массы тела;

-потребление пищи и потребление воды, в соответствующих случаях;

-данные о токсическом действии в разбивке по полу и уровню дозы, включая проявления влияния токсичности;

-характер, серьезность и продолжительность клинических проявлений (обратимых или необратимых);

-сенсорная активность, сила схвата и оценка двигательной деятельности;

-гематологические исследования с соответствующими исходными показателями;

-клинические биохимические исследования с соответствующими исходными показателями;

-масса тела при умерщвлении и данные о массе органов;

-результаты аутопсии;

-подробное описание результатов гистопатологических исследований;

-данные поглощения (если есть);

- статистическая обработка результатов (при необходимости).

Обсуждение результатов.

Выводы.

6 Объекты исследования, рекомендованные для выявления эндокринных деструкторов (ЭД)

Таблица 1

Обязательные органы и системы	Необязательные органы и системы
Вес	
Семенники Эпидидимис Надпочечники Предстательная железа плюс семенные железы со свертывающей железой	Яичники Матка, включая шейку матки Щитовидная железа
Гистопатология	
Гонады: семенники и яичники надпочечники Дополнительные половые органы: эпидидимис, предстательная железа + семенные железы со свертывающей железой матка, включая шейку матки Надпочечник Щитовидная железа Влагалище	Вагинальные мазки Мужские молочные железы Гипофиз
Определение концентрации гормонов	
	Уровень циркулирующих в крови T_3, T_4 Уровень циркулирующего в крови тиреостимулирующего гормона

Библиография

[1] Руководящий документ OECD Test № 407 «Repeated Dose 28-Day Oral Toxicity Study in Rodents»

[2] OECD (Paris, 1992). Chairman's Report of the Meeting of the ad hoc Working Group of Experts on Systemic Short-term and (Delayed) Neurotoxicity

[3] IPCS (1986). Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals. Environmental Health Criteria Document No. 60

[4] Tupper, D.E., Wallace, R.B. (1980). Utility of the Neurologic Examination in Rats. Acta Neurobiol. Exp., 40, 999-1003

[5] Gad, S.C. (1982). A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. J. Toxicol Environ. Health, 9, 691-704

[6] Moser, V.C., McDaniel, K.M., Phillips, P.M. (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of Amitraz. Toxicol. Appl. Pharmacol., 108, 267-283

[7] Meyer O.A., Tilson H.A., Byrd W.C., Riley M.T. (1979). A Method for the Routine Assessment of Fore- and Hindlimb Grip Strength of Rats and Mice. Neurobehav. Toxicol., 1, 233-236

[8] Crofton K.M., Howard J.L., Moser V.C., Gill M.W., Reiter L.W., Tilson H.A., MacPhail R.C. (1991). Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. Neurotoxicol. Teratol. 13, 599-609

[9] OECD (1998). Report of the First Meeting of the OECD Endocrine Disrupter Testing and Assessment (EDTA) Task Force, 10th-11th March 1998, ENV/MC/CHEM/RA(98)5

[10] OECD. (2006). Report of the Validation of the Updated Test Guideline 407: Repeat Dose 28-day Oral Toxicity Study in Laboratory Rats. Series on Testing and Assessment No 59, ENV/JM/MONO(2006)26

[11] OECD. (2002). Detailed Review Paper on the Appraisal of Test Methods for Sex Hormone Disrupting Chemicals. Series on Testing and Assessment No 21, ENV/JM/MONO(2002)8

[12] OECD (2002).Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals

[13] OECD (2006). Final Summary report of the meeting of the Validation Management Group for mammalian testing. ENV/JM/TG/EDTA/M(2006)2

[14] OECD (2006). Draft Summary record of the meeting of the Task Force on Endocrine Disrupters Testing and Assessment. ENV/JM/TG/EDTA/M(2006)3

[15] OECD (2000) Guidance document on the recognition, assessment and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation. Series on Testing and Assessment No 19. ENV/JM/MONO(2000)7

[16] P. Haley, R. Perry, D. Ennulat, S. Frame, C. Johnson, J.-M. Lapointe, A. Nyska, P.W. Snyder, D. Walker, and G. Walter (2005). STP Position Paper: Best Practice Guideline for the Routine Pathology Evaluation of the Immune System. Toxicol Pathol 2005 33: 404-407

[17] Hess RA, Moore BJ. (1993) Histological Methods for the Evaluation of the Testis. In: Methods in Reproductive Toxicology, Chapin RE and Heindel JJ (eds). Academic Press: San Diego, CA, pp. 52-85

[18] Latendresse JR, Warbrittion AR, Jonassen H, Creasy DM.(2002) Fixation of testes and eyes using a modified Davidson's fluid: comparison with Bouin's fluid and conventional Davidson's fluid. Toxicol. Pathol. 30, 524-533

[19] OECD. (2007). OECD Guideline for Testing of Chemicals N°440: Uterotrophic Bioassay in Rodents: A short-term screening test for oestrogenic properties

[20] OECD. (2008). Guidance Document on histopathology. Endocrine disruption: Guidelines for histological evaluation (draft). Series on Testing and Assessment

УДК 661:615.099:006.354 МКС 13.020.01 IDT

Ключевые слова: химическая продукция, воздействие на организм человека, метод испытаний, повторное исследование, пероральная токсичность, грызуны

Подписано в печать 12.01.2015. Формат 60x84 1/8.

Усл. печ. л. 1,86. Тираж 33 экз. Зак. 156.

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