Государственное санитарно-эпидемиологическое нормирование Российской Федерации

1.2. ГИГИЕНА, ТОКСИКОЛОГИЯ, САНИТАРИЯ

Исследование канцерогенных свойств химических веществ и биологических продуктов в хронических опытах на животных

Методические рекомендации
МР 1.2.0068—12

Издание официальное

Москва • 2012

gost.e-ecolog.ru

Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

1.2. ГИГИЕНА, ТОКСИКОЛОГИЯ, САНИТАРИЯ

Исследование канцерогенных свойств химических веществ и биологических продуктов в хронических опытах на животных

Методические рекомендации
МР 1.2.0068—12

ББК 51.2
И85

И85 **Исследование** канцерогенных свойств химических веществ и биологических продуктов в хронических опытах на животных: Методические рекомендации.—М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2012.—11 с.

ISBN 978—5—7508—1155—7

1. Разработаны Учреждением Российской Академии медицинских наук «Российский онкологический научный центр им. Н. Н. Блохина» РАМН (д.м.н., проф. Л. Н. Пылев, О. В. Смирнова, проф. А. П. Ильницкий); ФГБУ «НИИ онкологии им. Н. Н. Петрова» Минздрава России (д.м.н., проф. В. Н. Анисимов, д.м.н., проф. Г. Б. Плис, д.м.н., проф. М. А. Забежинский); ФГУ «Российский кардиологический научно-производственный комплекс» Минздрава России (д.м.н., проф. Е. В. Арзамасцев); Уральской Государственной Медицинской Академией (д.м.н., проф. Г. Я. Липатов).

2. Одобрены Комиссией по канцерогенным факторам при Федеральной службе по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека.

3. Утверждены Руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации Г. Г. Онищенко 30 августа 2012 г.

4. Введены взамен «Методических рекомендаций по исследованию канцерогенных свойств химических веществ и биологических продуктов в хронических опытах на животных», 1981 г.

ББК 51.2

ISBN 978—5—7508—1155—7

© Роспотребнадзор, 2012
© Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2012

Содержание

1. Общие положения 4
2. Принципы и критерии отбора веществ и биологических продуктов для изучения канцерогенных свойств 5
3. План эксперимента 6
4. Определение максимально переносимой дозы 7
5. Пути введения 7
6. Лабораторные животные 8
7. Продолжительность опыта 9
8. Вскрытие животных, гистологическая обработка и морфологическое исследование 9
9. Документация и обработка результатов 9
Библиографический список 11

УТВЕРЖДАЮ
Руководитель Федеральной службы
по надзору в сфере защиты прав
потребителей и благополучия человека,
Главный государственный санитарный
врач Российской Федерации

Г. Г. Онищенко
30 августа 2012 г.
Дата введения: с момента утверждения

1.2. ГИГИЕНА, ТОКСИКОЛОГИЯ, САНИТАРИЯ

Исследование канцерогенных свойств химических веществ и биологических продуктов в хронических опытах на животных

Методические рекомендации
МР 1.2.0068—12

1. Общие положения

Развитие промышленности и сельского хозяйства предполагает появление в сфере обращения веществ с неизученной биологической активностью, в том числе канцерогенностью. Контакт человека с такими веществами может иметь неблагоприятные отдаленные последствия, в частности, возникновение злокачественных опухолей различной локализации.

Своевременное выявление канцерогенных свойств вещества является основой для принятия мер по предотвращению его действия на человека и проведению соответствующих профилактических мероприятий. Основными из них являются: замена вещества на неканцерогенное, герметизация и автоматизация производства, оценка и управление рисками.

Хронические эксперименты на животных во всем мире продолжают оставаться единственным методом, позволяющим, несмотря на ряд ограничений, ответить на вопрос о канцерогенных свойствах вещества.

В соответствии с Положением о Комитете по канцерогенным веществам, правоприемником которого является Комиссия по канцерогенным факторам при Роспотребнадзоре, результаты испытаний веществ на канцерогенность следует направлять в указанную Комиссию на экспертизу.

Организации (лаборатории), проводящие исследования на канцерогенность в тестах на лабораторных животных, должны иметь помещения для содержания и работы с лабораторными животными (виварии, клиники лабораторных животных), требования к которым изложены в санитарных правилах по устройству, оборудованию и содержанию вивариев.

2. Принципы и критерии отбора веществ и биологических продуктов для изучения канцерогенных свойств

2.1. В связи с длительностью и высокой стоимостью хронических экспериментов на животных по тестированию канцерогенных свойств соединения перед началом испытаний проводится работа по отбору соединений наиболее подозрительных в наличии этого вида биологической активности и требующих испытания в первую очередь.

2.2. В этой работе следует руководствоваться следующими принципами и критериями:

2.2.1. Наличие данных о возникновении опухолей среди лиц, имевших контакт с веществом (эпидемиологических, диспансерных и др.). Описание отдельных клинических случаев заболевания также может служить основанием для отбора. При использовании данного критерия необходимо учитывать длительность латентного периода возникновения опухолей у людей и, естественно, отсутствие упомянутых данных для новых или недавно внедренных в обращение соединений.

2.2.2. Отбираются вещества и биологические продукты, имеющие (уже или в перспективе) широкое распространение среди населения и наличие вероятности появления в объектах окружающей человека среды, а также в пищевых продуктах. При этом оценивается вероятность попадания или наличие вещества в среде обитания человека, а не его концентрация.

2.2.3. Наличие химического структурного сходства с известными канцерогенными веществами или их метаболитами.

2.2.4. Обладающие цитостатическими, ростстимулирующими, иммунодепрессивными, гормоноподобными и алкилирующими свойствами. Данные показатели являются только критериями при отборе, их отсутствие или наличие не характеризуют канцерогенные потенции соединения.

2.2.5. Положительные результаты в тестах на мутагенность (*in vivo* и *in vitro*) и в тестах ДНК-повреждений.

Часто встречающаяся корреляция между мутагенными и канцерогенными свойствами вещества придает при отборе данному критерию особую значимость. В то же время по мутагенности судить о канцерогенных свойствах соединения не следует, к тому же имеются так назы-

ваемые «негенотоксичные канцерогены». При наличии у соединения мутагенных свойств даже в нескольких тестах можно предположить о его канцерогенности. Однако этого недостаточно для утверждения наличия этих свойств и принятия каких-либо законодательных и социальных мероприятий по критерию канцерогенности. Отсутствие мутагенных свойств не позволяет предполагать отсутствие канцерогенности. Аналогичная ситуация имеет место и в тестах ДНК-повреждений.

2.2.6. Вещества, получаемые биотехнологическими, генноинженерными и нанотехнологическими методами.

Упомянутые принципы и критерии отбора имеют различную значимость, все они служат как для выявления веществ, нуждающихся в изучении в первую очередь, так и для обоснования необходимости исследования соединения.

Чаще всего часть упомянутых критериев отсутствует, поскольку речь идет, как правило, о новых соединениях. В таком случае решающим является пункт 2.2.2 настоящих методических рекомендаций, а также опыт исследователя или обращение за экспертной оценкой в Комиссию по канцерогенным факторам при Роспотребнадзоре.

3. План эксперимента

3.1. Соединения сложного состава или промышленные продукты, имеющие различного рода примеси, изучаются целиком (для пестицидов – возможно действующее вещество). Необходимость исследования канцерогенных свойств составляющих обсуждается после завершения эксперимента с основным соединением в случае выявления его канцерогенных свойств.

3.2. При тестировании на канцерогенность следует стремиться к созданию условий, обеспечивающих максимальное проявление у вещества этих свойств, исходя из концепции, что таковое возможно при использовании максимально переносимой дозы (далее – МПД). В соответствии с международным определением МПД является максимальной дозой, не приводящей в субхроническом эксперименте к гибели животного или торможению массы тела более чем на 10 %.

3.3. Следует использовать минимум два вида (крысы, мыши) экспериментальных животных (не менее 50 голов каждого пола в подопытных и контрольных группах). Для оценки доза-эффектной зависимости, которая является важным дополнительным критерием наличия канцерогенной активности, необходимо использовать не менее трех (3) доз вещества, не считая контрольной группы, где доза принимается за нулевую (0). За максимальную следует брать МПД, каждая последующая доза должна отличаться от предыдущей не менее чем в 1,5—2,0 раза.

4. Определение максимально переносимой дозы

Определение МПД включает два этапа и проводится на каждом виде животных обоего пола при каждом предполагаемом методе введения вещества при тестировании.

4.1. *Острая токсичность.* Понятие острой токсичности включает вредное действие соединения, проявляющееся при однократном или кратковременном его применении. Задачей эксперимента является определение LD_{10}, LD_{16}, LD_{50}, LD_{84} вещества, используя метод пробит-анализа по Литчфилду и Уилкоксону.

4.2. *Определение МПД в субхроническом опыте.* Эксперимент проводят на 10 животных 6—8-недельного возраста обоего пола (при каждом методе введения, дозе и каждом виде). Максимальная доза находится на уровне LD_{16}, следующая – LD_{10}, а каждые последующие четыре (4) дозы в 1,5—2 раза ниже предыдущей. Соединения вводят животным в течение 6—8 недель (в режиме хронического эксперимента) и затем 2 недели наблюдают за их состоянием. Критерием токсического эффекта является гибель животных или торможение нарастания массы тела. За МПД принимается максимальная доза вещества, не приводящая к гибели животного и вызывающая торможение прироста массы тела менее чем на 10 %. При тестировании на канцерогенность МПД соединения может изменяться, но не в сторону увеличения.

5. Пути введения

5.1. Наиболее распространенным и адекватным естественному является введение испытуемого соединения животным перорально (зондом, с пищей или питьевой водой). Вещество вводят ежедневно, через зонд – 5 раз в неделю. Дозу рассчитывают в мг/кг и ppm массы тела или потребляемой пищи.

5.2. При наличии каких-либо особенностей в контакте человека с испытуемым соединением или в локализации индуцируемых им у человека опухолей путь введения может быть другим (подкожный, накожный, внутрилегочный, внутриплевральный, внутрибрюшинный, трансплацентарный и др.). Режим введения вещества при этом подбирается индивидуально для каждого метода.

5.3. Необходимо соблюдение условий, приближенных к правилам надлежащей лабораторной практики в соответствии с приказом Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации от 23.08.2010 № 708н «Об утверждении Правил лабораторной практики».

Принципы надлежащей лабораторной практики (Good Laboratory Practice (GLP): система обеспечения качества, имеющая отношение к

процессам организации, планирования, порядку проведения и контролю испытаний в области охраны здоровья человека и безопасности окружающей среды, а также оформления, архивирования и представления результатов этих испытаний.

6. Лабораторные животные

6.1. Для хранения, размещения, обработки и защиты тест-систем животных должны быть созданы надлежащие условия, обеспечивающие достоверность получаемых результатов.

6.2. Вновь полученные тест-системы животных должны быть изолированы для оценки состояния их здоровья. При возникновении заболевания или смертности данную партию животных не используют в исследовании и, при необходимости, безболезненно подвергают эвтаназии. На момент начала исследования все тест-системы должны быть полностью здоровы. Тест-системы, у которых в ходе исследования выявлены заболевания или травмы, следует изолировать и лечить, если это необходимо для обеспечения полноты исследования. Диагнозы и лечение любых заболеваний, как в ходе исследования, так и до его начала должны быть документированы.

6.3. Должна быть предусмотрена регистрация данных об источниках тест-систем, датах их поступления и состоянии на момент поступления.

6.4. Перед первоначальным введением испытуемого или стандартного объекта исследования биологические тест-системы должны пройти период акклиматизации, достаточный для адаптации к условиям исследования.

6.5. Вся информация, необходимая для надлежащей идентификации тест-системы, должна быть указана на дверях помещений или контейнерах. Отдельные тест-системы, которые должны быть переведены из их помещений или контейнеров в процессе исследования, должны иметь соответствующую маркировку.

6.6. Помещения и контейнеры для содержания тест-систем подлежат регулярной уборке и санитарной обработке. Материалы, контактирующие с тест-системой, не должны содержать загрязняющие вещества в количествах, способных повлиять на ход исследования. Подстилку для животных следует своевременно менять. Все случаи использования пестицидов должны быть документированы.

6.7. Для тестирования веществ на канцерогенность наиболее часто используют крыс и мышей. Обязательным является линейность животных и их чувствительность к канцерогенным соединениям. Можно рекомендовать крыс Вистар и мышей гибридов $F_1(CBAxC_{57}Bl_6)$.

6.8. Тестирование следует начинать на молодых (8—12-недельных) животных. Следует при их содержании соблюдать условия, приближенные к правилам надлежащей лабораторной практики.

6.9. Стандартизация корма животных является обязательным условием экспериментов по тестированию веществ на канцерогенность.

6.10. Взвешивание животных должно проводиться в начале опыта, еженедельно – в течение первых двух месяцев, два раза в месяц – в течение последующих двух, а затем – ежемесячно.

6.11. В связи с вариабельностью в частоте спонтанных опухолей, каждый эксперимент должен иметь адекватные по возрасту и количеству контрольные группы животных.

7. Продолжительность опыта

7.1. Тестируемое вещество вводится крысам в течение 24 месяцев, мышам – 18 месяцев. По истечении стандартного срока оставшиеся в живых животные могут быть подвергнуты эвтаназии сразу, через 3 месяца или оставлены на дожитие (по решению экспериментатора). Если к этому сроку выжило более 50 % животных введение вещества целесообразно продолжить до их гибели.

7.2. Используемые схемы и дозы введения канцерогенных веществ должны быть модифицированы в соответствии с видовыми особенностями используемых лабораторных животных.

8. Вскрытие животных, гистологическая обработка и морфологическое исследование

Павшие или подвергнутые эвтаназии животные опытных и контрольных групп подвергаются тщательному патолого-анатомическому исследованию. Все внутренние органы фиксируют в 10 %-м растворе нейтрального формалина, который заменяют через 7 дней. Фиксация продолжается в течение минимум 1,5 месяцев, после чего производится вырезка кусочков для гистологической обработки (промывка, проводка через спирты, заливка в парафин, резка на микротоме и окраска срезов). Окраску препаратов проводят общепринятыми методами (прежде всего гематоксилин-эозином). Морфологическое исследование должно проводиться специалистом, обладающим знаниями в области патологии и онкологии экспериментальных животных.

9. Документация и обработка результатов

9.1. Ход экспериментов подробно протоколируется в журнале, на каждое животное заводится протокол вскрытия с указанием пола, сроков эксперимента, степени посмертных изменений, данных вскрытия,

взятых на гистологическую обработку органов, гистологического номера с шифром (серия, год и др.), а также результатов морфологического изучения препаратов. В журнале приводится подробное описание изучаемого вещества, методики эксперимента, регистрируется изменение в ходе опыта массы тела каждого животного, обосновывается корректировка доз и режима введения вещества.

9.2. Корректировка доз и режима введения вещества проводится в зависимости от частоты гибели животных и торможения массы их тела. Увеличивать МПД нельзя. Осмотр животных проводят ежедневно.

9.3. По результатам исследования составляются таблицы с указанием метода введения вещества, пола животного, общего и эффективного числа животных, количества и процента опухолей (общего и у каждого пола, по отдельным их локализациям). Указываются сроки обнаружения первой опухоли и средний латентный период.

9.4. За эффективное число животных (из которого исчисляется процент опухолей) принимается количество переживших время возникновения (выявления) первой опухоли. Оно исчисляется отдельно для каждого пола и всех животных в группе, и может быть общим для всего эксперимента (отдельно для каждого вида) при отсутствии между группами выраженных различий в смертности. При наличии последних возможно в качестве эффективного числа использовать исходное количество животных или эффективное для каждой группы. Для выявления различий в выживаемости (смертности) животных составляются таблицы по опытным и контрольным группам.

9.5. Статистическая обработка результатов проводится различными общепринятыми методами: по Стьюденту-Фишеру, по χ^2, дозовому тренду и методу Пето для случайных и фатальных опухолей.

9.6. Вещество признается обладающим канцерогенными свойствами, если даже в одной из подопытных групп имеется статистически значимое превышение частоты опухолей (в том числе спонтанных) по сравнению с их количеством в контрольной (в том же самом эксперименте). Возможно в качестве дополнения использование «исторического» контроля.

9.7. Руководство лаборатории ответственно за вид представления отчетов о результатах исследований. Вид представления отчета (электронный или на бумажном носителе) и способ передачи из лаборатории должны быть согласованы с пользователями лабораторных услуг. Результаты исследования должны быть представлены четко, без ошибок в написании. Отчет о результатах исследования представляется в Комиссию по канцерогенным факторам при Роспотребнадзоре. Экспертное заключение Комиссии вместе с отчетом исполнитель направляет заказчику.

Библиографический список

1. Федеральный закон от 30.03.1999 № 52-ФЗ «О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения».

2. Федеральный закон от 10.01.2002 № 7-ФЗ «Об охране окружающей среды».

3. Федеральный закон от 26.06.2008 № 102-ФЗ «Об обеспечении единства измерений».

4. Постановление Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 31.10.2007 № 79 «Об утверждении Концепции токсикологических исследований, методологии оценки риска, методов идентификации и количественного определения наноматериалов».

5. ГОСТ Р 53434—2009 «Национальный стандарт Российской Федерации. Принципы надлежащей лабораторной практики».

6. СанПиН 1.2.2353—08 «Канцерогенные факторы и основные требования к профилактике канцерогенной опасности».

7. Приказ Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации от 23.08.2010 № 708н «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики».

8. Приказ Министерства здравоохранения СССР от 12.08.1977 № 755 «О мерах по дальнейшему совершенствованию организационных форм работы с использованием экспериментальных животных».

9. ГОСТ 7.32—2001 «Отчёт о научно-исследовательской работе. Структура и правила оформления».

Исследование канцерогенных свойств химических веществ и биологических продуктов в хронических опытах на животных

Методические рекомендации
МР 1.2.0068—12

Редактор Л. С. Кучурова
Технический редактор Е. В. Ломанова

Подписано в печать 07.12.12

Формат 60x88/16 Печ. л. 0.75
Тираж 200 экз. Заказ 79

Федеральная служба по надзору
в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
127994, Москва, Вадковский пер., д. 18, стр. 5, 7

Оригинал-макет подготовлен к печати и тиражирован
отделом издательского обеспечения
Федерального центра гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора
117105, Москва, Варшавское ш., 19а

Отделение реализации, тел./факс 952-50-89

gost.e-ecolog.ru