

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

«УТВЕРЖДАЮ»

Заместитель Министра
здравоохранения – Главный
государственный санитарный
врач Республики Беларусь



Н.П. Жукова

« 30 » августа 2016 г.

Регистрационный № 048-1215

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОСТРОЙ ТОКСИЧНОСТИ
ХИМИЧЕСКОЙ ПРОДУКЦИИ (ХИМИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ И ИХ
СМЕСЕЙ) ПРИ НАКОЖНОМ ПОСТУПЛЕНИИ

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК: Республиканское унитарное
предприятие «Научно-практический центр гигиены»

АВТОРЫ: к.м.н. Юркевич Е.С., к.м.н. Ильюкова И.И., Борис О.А.,
Попель А.А.

Минск, 2015

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ
Заместитель министра –
главный государственный
санитарный врач
Республики Беларусь

_____ Н.П. Жукова
30.08.2016
Регистрационный № 048-1215

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОСТРОЙ ТОКСИЧНОСТИ
ХИМИЧЕСКОЙ ПРОДУКЦИИ (ХИМИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ И ИХ
СМЕСЕЙ) ПРИ НАКОЖНОМ ПОСТУПЛЕНИИ**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК: РУП «Научно-практический центр гигиены»

АВТОРЫ: канд. мед. наук Е.С. Юркевич, канд. мед. наук И.И. Ильюкова,
О.А. Борис, А.А. Попель

Минск 2015

ГЛАВА 1 ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

1. В настоящей инструкции по применению (далее — инструкция) изложен гармонизированный с международными требованиями (OECD TG № 402 «Acute Dermal Toxicity»/ОЭСР Руководство № 402 «Острая токсичность при кожном поступлении») метод исследования острой токсичности при кожном поступлении, применяемый в комплексе медицинских услуг, направленных на медицинскую профилактику неблагоприятного действия потенциально опасной для человека продукции — чистые химические вещества, их растворы и смеси химических веществ, в т. ч. пестициды, доклинические формы лекарственных средств медицинского и ветеринарного применения, пищевые и кормовые добавки. Инструкция не распространяется на проведение испытаний токсичности наноматериалов, готовых лекарственных средств, препаратов ветеринарного назначения, готовой парфюмерно-косметической продукции.

2. Настоящая инструкция устанавливает подходы, схемы и метод изучения острой токсичности при кожном поступлении, обеспечивает получение информации о степени раздражения исследуемого вещества при однократном воздействии, позволяет оценить химическое вещество в соответствии с Согласованной на глобальном уровне системой классификации и маркировки химических веществ (далее — СГС) и минимизировать риск воздействия химического фактора на здоровье человека.

3. Метод, изложенный в настоящей инструкции, предназначен для специалистов организаций здравоохранения, осуществляющих государственный санитарный надзор, иных учреждений, реализующих мероприятия по медицинской профилактике неблагоприятного воздействия химической продукции на здоровье человека.

ГЛАВА 2 ТЕРМИНЫ И ОПРЕДЕЛЕНИЯ

1. В настоящей инструкции используются следующие термины и определения:

- доза-ответ — связь между дозой и степенью распространенности изучаемого эффекта в экспонируемой популяции;

- доза-эффект — связь между дозой и степенью выраженности биологического эффекта у экспонируемой особи или популяции;

- дозировка — общий термин, включающий дозу, частоту и продолжительность воздействия (дозирования);

- острая дермальная токсичность — неблагоприятные эффекты, вызванные кратковременным воздействием на кожу однократной дозы тестируемого вещества;

- смесевая химическая продукция (смесь химических веществ) — продукция преднамеренного механического смешения (соединения) двух или более химических веществ, не вступающих друг с другом в химическую реакцию;

- химическое вещество — химический элемент и (или) химическое соединение, находящиеся в естественном состоянии или полученные в результате производственного процесса, включая любую добавку, необходимую для обеспечения стабильности, и/или примеси, наличие которых обусловлено ходом производственного процесса, но исключая растворитель, который можно отделить без нарушения стабильности химического вещества или его состава;

- химическая продукция — химическое вещество или смесь химических веществ, предназначенные для дальнейшего использования в хозяйственно-бытовых и иных целях;

- DL_{50}/LD_{50} (средняя смертельная доза) — статистически установленная однократная доза вещества, которая может вызвать гибель 50% животных, подвергшихся кожному воздействию; выражается в отношении единицы массы исследуемого вещества к единице массы подопытного животного (мг/кг).

ГЛАВА 3 ОБЩИЕ УСЛОВИЯ ПРОВЕДЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЙ

1. Метод определения острой кожной токсичности является обязательным для веществ, у которых кожный путь поступления является приоритетным.

2. Изучение острой токсичности является первым шагом при установлении доз для подострого и других видов испытаний, а также предоставляет информацию о кожной абсорбции и токсичном воздействии вещества при данном пути поступления, используемой для оценки опасности в соответствии с СГС.

3. До проведения эксперимента необходимо изучить всю доступную информацию об исследуемом веществе: данные о составе и химическом строении; физико-химические свойства; результаты токсикологических испытаний *in vivo* и *in vitro*; токсикологические данные по структурно родственным веществам и предполагаемые пути использования вещества. Полученная информация служит подтверждением актуальности проводимых испытаний и обоснованности выбора начальной дозы.

4. Для проведения опыта используют несколько групп подопытных животных, которых подвергают эпикутанному воздействию; каждая доза исследуемого вещества испытывается на отдельной группе животных. Наблюдение за биологическими эффектами и случаями гибели проводят сразу после нанесения и на протяжении всего эксперимента. Вскрытию подвергаются все животные — как погибшие во время опыта, так и выжившие по его завершении.

5. Животные в стадии агонии должны быть умерщвлены с соблюдением принципов медицинской биоэтики. Вещества с заведомо известными коррозионными или раздражающими свойствами не исследуются.

Условия обращения, проведения экспериментов и выведения лабораторных животных должны соответствовать гуманистическим принципам надлежащей лабораторной практики, изложенным в технических нормативных правовых актах Республики Беларусь.

6. При проведении исследований используют следующее оборудование, материалы, реактивы:

- весы лабораторные общего назначения 2-го класса точности (по ГОСТ 24104) с пределом взвешивания 200 г; весы аналитические электронные с пределом допускаемой погрешности $\pm 0,0001$ г; стерилизатор сухожаровой с автоматической регулировкой температуры (100–220)°С (по ГОСТ 24437); анализатор потенциометрический с погрешностью измерений рН $\pm 0,1$ (рН-метр) с набором электродов (по ГОСТ 19881); холодильник бытовой (по ГОСТ 16317); морозильная камера; баня водяная с терморегулятором, позволяющая поддерживать температуру (55 \pm 0,5)°С (по ГОСТ 12026) или инактиватор; стаканы химические (50–100 см³), цилиндры (по ГОСТ 1770) и колбы (по ГОСТ 25336) разной вместимости (10, 100, 1000 см³); штативы для пробирок; шпатели стеклянные; стандарт титры для приготовления образцовых буферных растворов для рН-метрии (по ГОСТ 8.135 ГСИ); бумага индикаторная универсальная (ТУ 6-091181-76); бумага фильтровальная лабораторная (по ГОСТ 12026); вата медицинская гигроскопичная (по ГОСТ 5556); марля медицинская (по ГОСТ 9412); ножницы (по ГОСТ 21241); спиртовки лабораторные стеклянные (по ГОСТ 23932Е);

- вода дистиллированная и бидистиллированная (по ГОСТ 6709); спирт этиловый ректификат (по ГОСТ 5962); диметилсульфоксид (х.ч.); раствор физиологический (изотонический, стерильный); масло растительное и др.

Возможно применение оборудования и материалов с аналогичными по назначению техническими и метрологическими характеристиками, а также других препаратов аналогичного назначения для проведения исследований; при их применении следует руководствоваться рекомендациями изготовителя.

7. Исследования проводят в помещениях, оснащенных приточно-вытяжной вентиляцией и водопроводной водой.

Приготовление растворов, подготовка проб к исследованиям и проведение исследований осуществляют при следующих условиях: температура окружающего воздуха (20 \pm 5)°С; относительная влажность воздуха не более 80% при T = 25°С; атмосферное давление 84,0–106,7 кПа (630–800 мм рт.ст.).

8. Каждое животное после нанесения дозы наблюдают не менее одного раза — в первые 30 мин, регулярно — в течение первых 12–24 ч, особенно в первые 4 ч, затем ежедневно в течение 14 дней. Результаты наблюдения регистрируют. Детальный клинический осмотр и иные необходимые манипуляции (вскрытие или замораживание животных, найденных мертвыми, умерщвленными по медицинским показаниям или вследствие агонии) проводят ежедневно.

Во время наблюдения отмечают изменения состояния кожи, шерстного покрова, глаз, слизистых оболочек, дыхательной, кровеносной, вегетативной и центральной нервной систем, соматомоторной деятельности и поведения. Особое внимание акцентируют на явлениях тремора, конвульсий, слюноотделения, диареи, летаргии, сна и комы. Время гибели фиксируется максимально точно. Массу тела каждой особи измеряют и фиксируют до начала эксперимента, после воздействия, ежедневно и на момент гибели.

9. *Патологическая анатомия.* Общей аутопсии подвергают всех подопытных животных (погибших во время испытаний, исключенных по медицинским показаниям); общие патологические изменения, результаты микроскопического анализа кожи и органов регистрируют для каждого животного отдельно.

10. Эксперименты с лабораторными животными и изучаемыми препаратами должны производиться работниками в соответствии с требованиями охраны труда, в спецодежде, с использованием индивидуальных средств защиты кожи, органов зрения и дыхания.

ГЛАВА 4 ОПИСАНИЕ МЕТОДА

1. До проведения опыта животные проходят карантинную подготовку с содержанием в лабораторных клетках в соответствующих условиях и со специальным кормлением в течение не менее 5 дней. Для исследования отбирают здоровые молодые особи методом случайного выбора и распределяют их по группам. Не позднее чем за 24 ч до начала опыта у животных удаляют (выстригают/ выбривают) шерстный покров на поверхности спины размером не менее 10% общей поверхности тела, соблюдая максимальную осторожность, чтобы не повредить кожу.

2. Для обеспечения максимального проникновения через кожу животного твердые вещества необходимо измельчить, развести водой или при необходимости другим разбавителем. При использовании разбавителя следует учитывать его возможное влияние на кожные покровы животного. Жидкие тестируемые вещества, как правило, не разбавляют.

3. Исследования проводят на взрослых особях крыс, кроликов или морских свинок. Могут быть привлечены и другие виды животных, но их использование требует обоснования.

4. Для эксперимента используют животных массой:
крысы — 200–300 г;
кролики — 2–3 кг;
морские свинки — 350–450 г.

5. Для каждого уровня доз необходимо использовать не менее 5 животных одного пола. В эксперимент не входят рожавшие и беременные самки. Испытанию подвергают животных того пола, который, по имеющейся информации, является наиболее чувствительным.

Примечание: При изучении острой токсичности в экспериментах с животными более высокого порядка, чем грызуны, целесообразно использовать меньшее количество особей. Доза вводимого вещества должна быть тщательно обоснована и не превышать умеренно токсичную. В подобных экспериментах следует избегать введения исследуемого вещества в смертельных дозах.

6. Животных следует содержать отдельно в лабораторной комнате со следующими микроклиматическими параметрами: температура — 22°C (±3) для

грызунов, 20°C (± 3) для кроликов, относительная влажность 30–70%, искусственное освещение с последовательностью 12 ч — свет, 12 ч — темнота.

7. При кормлении используется обычная лабораторная диета с неограниченным количеством питьевой воды.

8. Уровень вводимых доз.

8.1. Для получения необходимых данных для построения кривой зависимости гибели животных от полученной дозы и определения величины DL_{50}/LD_{50} (при возможности) должно быть испытано не менее трех доз, предполагающих получение диапазона токсических воздействий (минимум/максимум) и летального исхода.

8.2. Испытание предельной (наивысшей/максимальной) дозы с уровнем не ниже 2000 мг/кг массы тела должно быть проведено в подопытной группе из 5 самцов и 5 самок. В случае гибели вследствие воздействия вещества необходимо провести всестороннее изучение животного.

9. Период наблюдения должен составлять не менее 14 дней, но продолжительность периода наблюдения не должна быть строго фиксированной и может быть увеличена при наличии токсических реакций, их интенсивности и длительности периода восстановления. Особое внимание следует обратить на время появления и исчезновения признаков токсичности, гибели, особенно при наличии тенденции к замедленной смерти.

10. Процедура проведения опыта.

10.1. Животных необходимо содержать в индивидуальных клетках; вещество равномерно наносить на поверхность кожи спины, составляющую приблизительно 10% от общей поверхности тела животного. При работе с высокотоксичными веществами поверхность покрытия может быть меньше, но вещество должно быть равномерно распределено тонким слоем.

10.2. Длительность контакта исследуемого вещества с кожей животного составляет не менее 24 ч и обеспечивается марлевой повязкой, зафиксированной не вызывающей раздражения лентой. Надежная фиксация марлевой повязки, удерживающей нанесенное вещество, необходима для исключения слизывания животным. Допускается использование ограничителей движения, не позволяющих животному слизывать вещество, но полная иммобилизация не рекомендуется.

10.3. По окончании экспозиции остатки исследуемого вещества необходимо удалить с кожи животного при помощи воды или другими способами очищения.

11. Оценка токсичности на животных другого пола.

Для установления половой чувствительности к веществу после завершения опыта по изучению острой трансдермальной токсичности на животных одного пола, подбирают группу животных другого пола не менее 5 особей. В отдельных случаях может быть использовано меньшее количество животных. Если по имеющейся информации наиболее чувствительными являются животные первой группы, тестирование вещества на животных другого пола можно исключить.

ГЛАВА 5 ПОДГОТОВКА ОТЧЕТА

1. Все полученные данные на каждую подопытную группу должны быть сведены в таблицы, включающие: количество животных в начале эксперимента, время гибели каждого, количество животных с выраженными признаками токсичности, описание клинической картины интоксикации, индивидуальную массу тела (до начала опыта, через неделю и после гибели, через один день после окончания периода наблюдения, если животное выжило). Умерщвленные гуманным способом животные вследствие острой боли или сложных случаев недомогания отмечаются как случаи сложной смерти. DL_{50}/LD_{50} устанавливают одним из известных методов: Литчфилда и Вилкоксона, Блисса, Финней, Вейла, Томпсона, Миллера и Тейтнера.

2. При оценке полученных данных учитывают сведения о воздействии исследуемого вещества на животное, объем и интенсивность аномальных проявлений, включая поведенческие и клинические отклонения, значительные поражения органов, колебания массы тела, смертельный исход и другие токсические эффекты.

3. Отчет об испытании должен содержать следующие данные:

- вид, род, происхождение, условия содержания, питание животного;
- условия тестирования (метод очищения кожи и пр.);
- уровень дозы (с наполнителем (при использовании) и концентратами);
- пол животных;
- сведение в таблицу данных о реакции полов и уровень экспозиции (количество погибших, умерщвленных, с симптомами токсичности, общее количество подвергшихся воздействию);
- время гибели после воздействия, причины и критерии гуманного умерщвления животных;
- все данные наблюдений;
- величину DL_{50}/LD_{50} , установленную по окончании наблюдения для каждого пола (вычисленную установленным методом);
- 95% доверительный интервал для DL_{50}/LD_{50} (если таковой возможно предусмотреть);
- график и кривую взаимосвязи доза/летальный исход (в рамках метода определения);
- результаты вскрытия;
- все результаты гистопатологического исследования;
- результаты любых испытаний с животными другого пола;
- обсуждение результатов (в т. ч. вычисление величины DL_{50}/LD_{50}).

4. Интерпретация результатов.

4.1. Изучение острой токсичности при накожном поступлении и установление DL_{50}/LD_{50} обеспечивает оценку относительной токсичности вещества при накожном пути поступления.

4.2. Экстраполяция на человека результатов изучения острой токсичности при накожном поступлении и величин DL_{50}/LD_{50} , установленных на животных,

допустима только в ограниченной степени. Результаты изучения острой токсичности при кожном поступлении необходимо учитывать в совокупности с данными об острой токсичности при других путях воздействия.