

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель Министра  
здравоохранения – Главный  
государственный санитарный  
врач Республики Беларусь



Н.П. Жукова

« 30 » августа 2016 г.

Регистрационный № 057-1215

ОПРЕДЕЛЕНИЕ РЕПРОДУКТИВНОЙ/ЭМБРИОНАЛЬНОЙ  
ТОКСИЧНОСТИ ХИМИЧЕСКОЙ ПРОДУКЦИИ  
(ХИМИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ И ИХ СМЕСЕЙ)  
(СКРИНИНГОВЫЙ МЕТОД)

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.,  
Грынчак В.А.

Минск, 2015

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ  
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ  
Заместитель министра –  
Главный государственный  
санитарный врач  
Республики Беларусь

\_\_\_\_\_ Н.П. Жукова  
30.08.2016  
Регистрационный № 057-1215

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ РЕПРОДУКТИВНОЙ/ЭМБРИОНАЛЬНОЙ  
ТОКСИЧНОСТИ ХИМИЧЕСКОЙ ПРОДУКЦИИ  
(ХИМИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ И ИХ СМЕСЕЙ)  
(СКРИНИНГОВЫЙ МЕТОД)**

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, В.А. Грынчак

Минск 2015

## ГЛАВА 1 ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

1. В настоящей инструкции по применению (далее — инструкция) изложены гармонизированные с международными требованиями (OECD TG № 421 «Reproduction/Developmental Toxicity Screening Test»/ОЭСР Руководство № 421 «Оценка репродуктивной/эмбриональной токсичности скрининговым методом»; OECD TG № 422 «Combined Repeated Dose Toxicity Study with the Reproduction / Developmental Toxicity Screening Test»/ОЭСР Руководство № 422 «Совместное исследование токсичности при повторном воздействии с репродуктивной/эмбриональной токсичностью, скрининговый метод») методы исследований по изучению репродуктивной/эмбриональной токсичности скрининговым методом на лабораторных животных, применяемые 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 готовой парфюмерно-косметической продукции.

2. Настоящая инструкция устанавливает подходы, схемы и методы испытаний по оценке репродуктивной/эмбриональной токсичности скрининговым методом, обеспечивает получение первичных данных по возможным воздействиям на репродуктивность и/или эмбрион на первоначальном этапе обращения химических веществ и/или о возможных опасностях для здоровья, которые могут появиться при повторном воздействии вещества за относительно короткий промежуток времени, что 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, проводящих реализацию мероприятий по медицинской профилактике неблагоприятного воздействия химической продукции на здоровье человека.

## ГЛАВА 2 ТЕРМИНЫ И ОПРЕДЕЛЕНИЯ

В настоящей инструкции используются следующие термины и определения:

- выраженная токсичность — общий термин, описывающий явные признаки токсичности, вызванные введением исследуемого вещества. Они должны быть достаточными для оценки опасности и такими, чтобы повышение

вводимой дозы предполагало в результате тяжелые токсические проявления и возможную смерть;

- доза — количество вводимого тестируемого вещества. Доза выражается или по массе (г, мг), или массой тестируемого вещества на единицу массы тела животного (г, мг/кг), или постоянной концентрацией в пище (ppm);

- дозировка — основное понятие, включающее дозу, частоту и продолжительность введения;

- материнская токсичность — неблагоприятное воздействие на беременных самок, происходящее как непосредственно (прямое воздействие), так и опосредованно (непрямое воздействие);

- ослабление фертильности — расстройство мужских и женских репродуктивных функций или способностей;

- репродуктивная токсичность — неблагоприятное воздействие на потомство и/или ослабление мужских и женских репродуктивных функций или способностей;

- эмбриотоксичность — проявление репродуктивной токсичности, представляющее собой пред-, пере-, постнатальные структурные или функциональные расстройства потомства;

- NOAEL (No Observable Adverse Effects Level) / NOEL (No Observable Effects Level) — уровень воздействия, при котором не наблюдается вредный эффект; максимальный уровень дозы, при которой не наблюдается отрицательный вредный эффект / отсутствие эффекта (отрицательного и положительного), связанный с воздействием вещества (термин, аналогичный принятому ранее «максимальная недействующая доза» / «подпороговая доза»).

### ГЛАВА 3 ОБЩИЕ УСЛОВИЯ ПРОВЕДЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЙ

1. Предварительные скрининговые исследования репродуктивной токсичности проводят для первоначальной оценки обращающихся химических веществ. Метод ограничивается получением данных, касающихся воздействия исследуемого вещества на мужскую и женскую репродуктивную способность — функцию половых желез, поведение при спаривании, оплодотворение, развитие оплодотворенного яйца и роды.

2. Данное исследование не обеспечивает полноту данных по всем аспектам репродуктивности и эмбрионального развития и предполагает только ограниченные средства для обнаружения пред- и послеродовых проявлений.

2.1. Метод не обеспечивает полноту доказательств и не позволяет однозначно утверждать об отсутствии эффектов в связи с относительно малым количеством животных в дозируемых группах, избирательностью конечных целей и коротким периодом воздействия.

2.2. Отрицательные данные не служат доказательством абсолютной безопасности в отношении репродуктивности и эмбрионального развития.

2.3. При отсутствии данных других исследований о влиянии на репродуктивную/эмбриональную токсичность положительные результаты

применимы для первоначальной оценки опасности и способствуют принятию решений относительно необходимости и длительности дополнительного исследования.

3. Совместное исследование токсичности химических веществ при повторном воздействии и репродуктивной/эмбриональной токсичности с помощью скринингового метода, которое возможно только с учетом данных, полученных в острых опытах, дает информацию о возможной опасности для здоровья, возникающей при повторном воздействии вещества за относительно короткий промежуток времени.

3.1. Метод может использоваться для получения предварительной информации о влиянии вещества на мужскую и женскую репродуктивную способность, включая функцию половых желез, брачное поведение, зачатие, развитие эмбриона и роды, либо для оценки токсических свойств веществ на ранней стадии.

3.2. Метод позволяет первоначально оценить иммунологические эффекты и определить вещества с нейротоксическим потенциалом, которые подлежат дальнейшему углубленному исследованию.

3.3. Положительные результаты метода используют для предварительной оценки опасностей и принятия решений о дополнительном тестировании; для оценки веществ с недостатком информации; метод применяют как альтернативный другим тестам (OECD TG № 407, OECD TG № 421); как тест для определения диапазона доз при углубленном исследовании.

4. Метод предполагает пероральный способ введения тестируемого вещества. Использование другого способа введения требует обоснования.

5. До эксперимента необходимо изучить всю доступную информацию об исследуемом веществе: данные о составе и химическом строении вещества; физико-химические свойства; результаты токсикологических испытаний *in vivo* и *in vitro*; токсикологические данные о структурно родственных веществах, о воздействии повторных доз и др.

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

7. При исследовании 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 pH  $\pm 0,1$  (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 см<sup>3</sup>), цилиндры (по ГОСТ 1770) и колбы (по ГОСТ 25336) разной вместимости (10; 100; 1000 см<sup>3</sup>); 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 использовании следует руководствоваться рекомендациями изготовителя.

## 8. Принцип метода.

8.1. Вещество вводят градуированными дозами нескольким группам мужских и женских особей. Самцы получают дозу на протяжении не менее 4 недель (минимум 2 недели до и после спаривания и период спаривания), включая день перед запланированным умерщвлением. Для доказательства тестикулярной токсичности проводят гистологические исследования яичек, потому что из-за ограниченного периода дозирования мужских особей перед спариванием фертильность не является значимым показателем.

Период введения минимум в 4 недели считается достаточным для обнаружения токсического воздействия вещества на оплодотворяющую способность спермы и сперматогенез. Подробная гистопатология семенников обязательна.

8.2. Женские особи получают дозы на протяжении всего исследования: 2 недели перед спариванием (минимум два полных цикла течки), время зачатия, срок беременности и минимум 4 дня после родов, до дня перед планируемым умерщвлением включительно.

8.3. Срок исследования после адаптации зависит от поведения женских особей и составляет не менее 54 дня (минимум 14 дней перед спариванием, до 14 дней спаривание, 22 дня — беременность, 4 дня — кормление).

8.4. В течение периода введения вещества животных тщательно обследуют на предмет выявления признаков токсичности; погибшим или умерщвленным в ходе тестирования производят аутопсию. Выживших животных по окончании исследования умерщвляют и производят аутопсию.

## 9. Животные, выбор вида.

9.1. Рекомендуется использовать крыс, применение других видов требует обоснования. Животных с низкой плодовитостью или высокой степенью дефектов развития не используют.

9.2. В эксперименте участвуют здоровые половозрелые нерожавшие самки, ранее не подвергавшиеся опытным испытаниям. Подопытных животных систематизируют по роду, виду, полу, массе и/или возрасту. Группы животных (самцов, самок) формируют по массе со средне групповым отклонением не более  $\pm 20\%$ .

## 10. Условия содержания и кормления.

10.1. Температура в помещении с экспериментальными животными должна быть  $22\pm 3^{\circ}\text{C}$ . Относительная влажность должна быть как минимум 30% и не превышать 70% (если только не проводится уборка помещения), оптимальная влажность — 50–60%. Свет искусственный с последовательностью: 12 ч — свет, 12 ч — темнота. Для кормления могут использоваться традиционные лабораторные диеты с неограниченным количеством питьевой воды. На выбор пищи может влиять необходимость добавления к ней исследуемого вещества, когда введение осуществляется таким способом.

10.2. Животные могут находиться отдельно или содержаться в клетках небольшими группами одного пола; при групповом расселении следует помещать не более 5 животных в каждую клетку. Процедура спаривания должна осуществляться в подходящих для такого случая клетках. Беременных самок следует селить отдельно и обеспечить их материалами для гнездования.

11. *Подготовка.* Здоровых молодых половозрелых животных распределяют методом случайной выборки на экспериментальные группы. Клетки размещают так, чтобы свести к минимуму возможное влияние местоположения. Животных помечают индивидуальными идентификаторами и содержат в клетках как минимум 5 дней перед началом исследования для акклиматизации к лабораторным условиям.

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

13. Приготовление растворов, подготовка проб к исследованиям и проведение исследований осуществляются при следующих условиях: температура окружающего воздуха  $20\pm 5^{\circ}\text{C}$ ; относительная влажность воздуха не более 80% при  $T = 25^{\circ}\text{C}$ ; атмосферное давление 84,0–106,7 кПа (630–800 мм рт. ст.).

14. Температурный режим в лабораторной комнате —  $22(\pm 3)^{\circ}\text{C}$ , относительная влажность — 30–70% (оптимально 50–60%), за исключением времени уборки помещения, освещение — искусственное (последовательно 12 ч — день, 12 ч — ночь).

15. При кормлении используется обычная лабораторная диета с неограниченным количеством питьевой воды. На выбор диеты может повлиять необходимость обеспечить хорошее смешивание изучаемого вещества, если оно вводится с кормом. Корм должен регулярно анализироваться на загрязняющие вещества. Образцы корма должны сохраняться до завершения отчета. Выбор рациона может влиять на необходимость обеспечения подходящей примеси для введения испытуемого вещества.

## 16. Подготовка животных.

16.1. В эксперименте используют животных в возрасте от 5 до 9 недель, ранее не подвергавшихся экспериментальным процедурам. Карантинная подготовка составляет не менее 5 дней до начала исследования и включает содержание в лабораторных клетках индивидуально или небольшими группами

одного пола, соответствующие микроклиматические условия и специальную диету.

16.2. До начала опыта проводят стандартизацию экспериментальных животных: характеристика по виду, линии, источнику, полу, весу и/или возрасту; учет особей одного помета во избежание спаривания братьев и сестер; произвольный отбор для контрольных и опытных групп (выборка по массе тела).

16.3. Необходимо избегать воздействия факторов, не связанных с экспериментом: ненадлежащего обращения с беременными животными, стрессов от внешних факторов, шума и т.д. Здоровых животных произвольно распределяют на экспериментальные и контрольные группы.

17. Процедура испытания.

17.1. Количество животных на начало исследования — не менее 10 особей каждого пола, исключая случаи явного токсического воздействия, для которого возможно использование минимально допустимого числа беременных самок в группе — 8. Целью опыта является получение достаточного количества беременностей и потомства, гарантирующего значимую оценку токсического влияния вещества на фертильность, беременность, материнское поведение и поведение грудного потомства, а также на рост и развитие потомства от зачатия до 4-го дня после родов.

17.2. Подготовка доз.

Исследуемое вещество вводят перорально через зонд, если иной путь введения не считается более подходящим. Возможно введение вещества с пищей или питьевой водой.

При необходимости тестируемое вещество растворяют или смешивают. Рекомендуется использовать водные растворы/суспензии, затем по убывающей: раствор эмульсии в масле (например, кукурузное масло), другие среды, отличные от воды, с известными токсическими свойствами и устойчивостью испытуемого вещества в данной среде.

17.3. Дозирование.

В опыте используют как минимум 3 экспериментальные и 1 контрольную группы. Уровни доз основывают на данных об острой токсичности или на результатах исследования повторной дозы. Животные контрольной группы находятся в идентичных с опытом условиях. Если для введения испытуемого вещества используется среда, то контрольная группа получает ее в максимально используемом объеме.

17.4. Для токсического воздействия выбирают максимальный уровень доз, избегая при этом гибели или тяжелых страданий животных. Нисходящая последовательность уровней доз определяется с учетом любых доказанных реакций и наивысшего уровня воздействия, при котором не наблюдается вредный эффект (NOAEL), как самого низкого уровня дозы. Как правило, оптимальным является 2–4-кратный диапазон снижения уровня дозы, для больших интервалов между дозами (например, более 10) следует использовать дополнительную экспериментальную группу.



## 18. Испытание с предельной дозой.

18.1. Если при пероральном введении дозы в 1000 мг/кг массы тела в день признаков токсического действия не обнаружено и иных эффектов вредного воздействия не ожидается (по имеющимся данным для структурно и/или метаболически родственных соединений), то полное исследование с использованием трех доз не проводят.

Допускается эксперимент с более высоким уровнем предельной дозы в случае предполагаемого воздействия на человека таких уровней.

18.2. При других способах введения (ингаляционный, дермальный) использование максимально высокой концентрации в исследовании может быть продиктовано физико-химическими свойствами вещества.

18.3. Животные получают испытуемое вещество в выбранных дозах ежедневно в течение семи дней в неделю. Для принудительного введения разовой дозы применяют желудочный зонд или соответствующую полую трубку. Максимальный объем однократно вводимой жидкости зависит от массы подопытного животного и не должен превышать 1 мл/100 г, для водных растворов — 2 мл/100 г. Для веществ, вызывающих раздражение или коррозию, выраженность которых возрастает с увеличением концентрации, постоянство вводимого объема при всех уровнях доз обеспечивают за счет корректировки концентраций.

18.4. Объем вводимого с пищей или питьевой водой исследуемого вещества не должен препятствовать нормальному пищевому/водному балансу. При введении тестируемого вещества с пищей применяют или постоянную концентрацию в пище (мг/кг или ppm), или постоянный уровень дозы в зависимости от массы тела животного; другие варианты использования должны быть обоснованы. Введение испытуемых веществ через зонд проводят ежедневно в одно и то же время; вводимый уровень дозы по отношению к массе тела животного проводят корректировку еженедельно.

19. 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

### ОЦЕНКА РЕПРОДУКТИВНОЙ/ЭМБРИОНАЛЬНОЙ ТОКСИЧНОСТИ СКРИНИНГОВЫМ МЕТОДОМ

1. Скрининговое исследование используют для получения первоначальных данных о возможных воздействиях химического вещества на репродуктивность и/или эмбрион на первоначальном этапе токсикологической оценки в отношении известных химических веществ, недостаточно изученных; как предварительное исследование по поиску уровня дозы для более широких репродуктивных/эмбриональных исследований.

2. Процедура испытания стандартная (гл. 3).

3. Введение экспериментальной дозы.

3.1. Введение дозы животным обоих полов начинают как минимум за 2 недели до спаривания после 5-дневной акклиматизации. Опыт планируют так, чтобы спаривание начиналось сразу по достижении животными половой зрелости, которая может отличаться у разного вида крыс: вид *Sprague Dawley* — в 10 недель, вид *Wistar* — 12 недель. Самок с потомством умерщвляют на 4-й день после родов или сразу после. День завершённых родов считают 0 днем после родов. Небеременных самок умерщвляют на 24–26-й день после последнего дня периода спаривания. Введение доз животным обоих полов продолжают весь период спаривания; самцам продолжают вводить вещество после периода спаривания до достижения минимального 28-дневного периода дозирования, затем их умерщвляют или продолжают дозирование для возможного второго спаривания (при необходимости).

3.2. Беременным самкам дозы вводят ежедневно в течение всей беременности и минимум до 3-го дня после родов включительно или за день до умерщвления. Введение тестируемого вещества ингаляционно или дермально продолжают как минимум до 19-го дня беременности включительно (приложение 1).

4. Процедура спаривания. В исследованиях используют спаривание 1:1 (одна самка на одного самца), за исключением случаев случайной гибели самцов. Самку оставляют с одним самцом до наступления беременности или в течение 2-х недель. Каждое утро самок проверяют на наличие спермы или вагинальной пробки. Нулевым днем беременности считают день обнаружения вагинальной пробки или спермы. При неудавшемся спаривании допустимо повторное с самцами, уже осуществившими успешное спаривание.

#### 5. Наблюдения.

5.1. В течение всего периода исследования общее клиническое наблюдение должно проводиться как минимум 1 раз в день и чаще, если обнаруживаются признаки токсичности. Его предпочтительно проводить ежедневно в одно и то же время, принимая во внимание период максимума предполагаемого воздействия дозы. Соответствующие изменения поведения, признаки трудных или продолжительных родов и все другие проявления токсичности, включая летальный исход, следует фиксировать. Такие записи должны включать время начала, степень и длительность признаков токсичности.

5.2. Длительность беременности фиксируют и отсчитывают от 0 дня. Каждый приплод изучают максимально быстро после рождения, устанавливают количество и пол, число мертворожденных, родившихся живыми, малорослых (заметно меньших в сравнении с контрольными) и наличие явных аномалий.

5.3. Живых детенышей подсчитывают и устанавливают пол. Приплод взвешивают в течение 24 ч после родов (0 или 1-й день после родов) и на 4-й день после родов. При наблюдении за родительскими особями любое аномальное поведение потомства также фиксируют.

#### 6. Масса тела и потребление воды/пищи.

6.1. Самцов и самок взвешивают в первый день введения дозы, затем — еженедельно и по окончании исследования. Во время беременности самок

взвешивают в 0; 7; 14 и 20-й дни, в течение 24 ч после родов (0 или 1-й день после родов) и на 4-й день после родов. Все наблюдения фиксируют отдельно по каждому взрослому животному.

6.2. Потребление пищи определяют не реже 1 раза в неделю в течение периодов перед спариванием, беременности и кормления, измерение в период спаривания является необязательным. Потребление воды в аналогичный период измеряют в случае введения испытуемого вещества с водой.

#### 7. Патология.

7.1. После умерщвления или гибели во время опыта взрослых особей изучают макроскопически на наличие аномальных или патологических изменений, особое внимание при этом обращают на органы репродуктивной системы. Фиксируют количество мест имплантации, подсчитывают число желтых тел.

7.2. Яички и придатки всех взрослых самцов взвешивают.

7.3. Мертворожденных детенышей и умерщвленных на 4-й день после родов внимательно изучают на наличие явных внешних аномалий.

7.4. У всех взрослых животных яичники и связанные с ними половые железы, а также все органы с установленными макроскопическими поражениями сохраняют в формалине; яички, придатки яичек — в фиксаторе Буэна.

8. Производят подробное гистологическое исследование яичников, яичек и придатков яичек (с особым вниманием относятся к фазе спермогенеза и гистопатологии межтканевого тестикулярного строения клетки) животных из групп с максимальной дозой и контрольной группы; все остальные сохраненные органы — по необходимости. При наличии видимых изменений полученные результаты распространяют на животных остальных опытных групп.

## ГЛАВА 5

### СОВМЕСТНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ТОКСИЧНОСТИ ПРИ ПОВТОРНОМ ВОЗДЕЙСТВИИ С РЕПРОДУКТИВНОЙ/ ЭМБРИОНАЛЬНОЙ ТОКСИЧНОСТЬЮ (СКРИНИНГОВЫЙ МЕТОД)

1. Метод состоит из стандартного тестирования с повторяющейся дозой, применимого для веществ, для которых нельзя использовать 90-дневной тест (небольшой объем производства); или показан как предварительное тестирование перед долгосрочным исследованием (OECD TG № 407).

2. Метод предполагает более продолжительный период дозирования, чем обычное 28-дневное исследование, но следует использовать при этом меньшее число животных каждого пола на группу, чем при стандартном 28-дневном тесте совместно с тестом по определению репродуктивной и эмбриональной токсичности.

3. При меньшем, чем в отдельных опытах, количестве животных совместный тест позволяет дифференцировать прямые эффекты на репродуктивность и пренатальное развитие и вторичные, обусловленные

другими (системными) эффектами, и оценить специфические неврологические и иммунологические эффекты, для которых обязательны тщательные клинические наблюдения за животными.

4. При исследовании учитывают вид животных, линию, пол, массу и/или возраст. Возраст животного на момент начала эксперимента должен быть 8–12 недель, масса не более 20% от средней массы всех задействованных в эксперименте животных. Если исследование является предварительным перед хроническим воздействием или исследованием на нескольких поколениях, рекомендуется использовать животных одинаковых линий и полученных из одного питомника.

5. Процедура испытания стандартная (глава 3). При запланированном во время исследования усыплении число животных в группе увеличивают за счет использования группы-спутника из 10 животных (5 самцов и 5 самок) в контрольной группе и группе с максимальной дозой с целью возможности оценки обратимости эффектов, для наблюдения за эффектами минимум в течение 14 дней после завершения введений. Животных в этой группе не спаривают и, следовательно, не используют для оценки репродуктивной/эмбриональной токсичности.

6. Схема исследования.

6.1. Введение дозы животным обоих полов начинают минимум за 2 недели до спаривания после прохождения 5-дневной акклиматизации. Исследование планируют так, чтобы спаривание начинать сразу по достижении животными половой зрелости, но следует учитывать, что этот период может отличаться у разных видов крыс. Самок с потомством умерщвляют на 4-й день после родов или вскоре после этого. День родов (т. е. когда роды завершились) считается 0 днем после родов. Не беременных самок умерщвляют на 24–26-й день после последнего дня периода спаривания. Животным обоих полов введение доз продолжают весь период спаривания, затем самцам продолжают введение доз и после периода спаривания до достижения минимального периода дозирования, равного 28 дням, после чего их умерщвляют или сохраняют и продолжают дозирование для возможного второго спаривания (при необходимости).

6.2. Беременным самкам ежедневное введение доз продолжают всю беременность и минимум до 3-го дня после родов включительно, или за день до умерщвления. Если тестируемое вещество вводят ингаляционно или дермально, то введение доз продолжают минимум до 19-го дня беременности включительно.

6.3. С целью выявления замедленных реакций или снижения токсических эффектов животных в группах-спутниках осматривают повторно и не усыпляют минимум в течение 14 дней после усыпления первых самок.

7. Процедура спаривания. В исследованиях используют спаривание 1:1 (одна самка на одного самца). Исключение составляет случайная гибель самцов. Самку помещают с одним и тем же самцом до наступления беременности или в течение 2-х недель. Каждое утро самок проверяют на наличие спермы или вагинальной пробки. Нулевым днем беременности

считают день обнаружения вагинальной пробки или спермы. В случае ненаступления беременности допускается повторное спаривание с самцами, уже осуществившими успешное спаривание.

8. Общее клиническое наблюдение проводят ежедневно в одно и то же время в течение всего периода исследования, учитывая периоды максимума предполагаемого воздействия дозы. Все данные документируют. Не реже двух раз в день животных проверяют на случай гибели или терминальных состояний.

9. Детальный осмотр каждого животного проводят за 1 раз до начала дозирования, затем не реже 1 раза в неделю в одинаковых условиях и в одно и то же время суток. Все наблюдения тщательно фиксируют, используя оценочную систему баллов. Записи о состоянии животных включают, как минимум, следующие показатели: изменения на коже, шерсти, глазах, слизистых оболочках, появление секретов и экскреций и вегетативной активности (слезотечения, пилоэрекции, размер зрачков, нестандартное дыхания); изменение походки, осанки и реакции на прикосновение, наличие клонических и тонических движений, стереотипии (излишний груминг, хождение по кругу), осложненные или затянувшиеся роды или странное поведение (самовредительство, хождение задом наперед) и др.

10. Оценку сенсорной реакции (слуховой, визуальной, проприоцептивной) на различные раздражители, силы захвата, двигательной активности с использованием 10 случайно выбранных самок и самцов (по 5 животных каждого пола) проводят, как минимум, 1 раз за весь период исследования. Детали осмотра используют из доступной литературы. Срок проведения данных наблюдений: для самцов — в конце периода дозирования, незадолго до усыпления, но перед взятием крови на гематологический или биохимический анализ, для самок — желателно во время лактации, незадолго до усыпления. Во избежание гипертермии у потомства их отнимают от самок не более чем на 30–40 мин.

11. Функциональные наблюдения в конце эксперимента не проводят в случае, если данное исследование является предварительным перед субхроническим 90-дневным опытом, в который и включают функциональные наблюдения. Однако наличие данных функциональных наблюдений в этом исследовании может улучшить возможность выбора адекватных уровней доз для последующих исследований.

12. В исключительных случаях функциональные наблюдения могут быть пропущены для групп животных, проявляющих признаки токсичности, которые будут препятствовать исследованию функционального состояния животных.

13. Длительность беременности фиксируют, отсчет ведут от 0 дня беременности. Каждый приплод изучают максимально быстро после рождения, определяют количество и пол детенышей, мертворожденных, родившихся живыми, малорослых (детеныши, которые заметно меньше контрольной группы) и наличие явных аномалий.

14. Живых детенышей подсчитывают, определяют пол. Приплод взвешивают в течение 24 ч после родов (нулевой или первый день после родов)

и на 4-й день после родов. Наблюдение ведут за родительскими особями и фиксируют любое аномальное поведение потомства.

15. Масса тела, потребление пищи и воды.

15.1. Самцов и самок взвешивают в первый день введения дозы, затем не менее 1 одного раза в неделю по окончании исследования. Во время беременности самок взвешивают в 0; 7; 14 и 20-й дни, в течение 24 ч после родов (нулевой или первый день после родов) и на 4-й день после родов. Все наблюдения фиксируют индивидуально по каждому взрослому животному.

15.2. Перед спариванием, во время беременности и лактации потребление пищи определяют как минимум еженедельно, в период спаривания — необязательно. Потребление воды измеряют в случае введения исследуемого вещества с питьевой водой.

16. Гематология.

16.1. Гематологические наблюдения проводят 1 раз во время эксперимента (на 5 самцах и 5 самках из каждой группы); исследуют следующие показатели: гематокрит, концентрацию гемоглобина, число эритроцитов, общее число лейкоцитов и лейкоцитарную формулу, число тромбоцитов и время свертывания крови.

16.2. Самок для взятия крови используют в одинаковом физиологическом состоянии, сбор крови у самок желательно проводить перед началом спаривания или как часть процедуры усыпления животного, чтобы избежать вариабельности показателей в связи с началом беременности. Сбор крови у самцов проводят до или как часть процедуры усыпления животных, допускается перед началом спаривания, в наиболее подходящий период для обследования самок. Пробы крови должны хранить в надлежащих условиях.

17. Биохимия.

17.1. Определение клинических биохимических показателей, отражающих проявление токсических эффектов в тканях, внутренних органах и др., проводят в крови 5 самцов и 5 самок из каждой группы, животным не дают пищу не менее 12 ч, например, после ночи.

17.2. Исследование плазмы или сыворотки: определение калия, натрия, глюкозы, холестерина, мочевины, креатинина, белка и альбумина, как минимум, двух ферментов, отражающих гепатоцеллюлярные эффекты (аланинаминотрансфераза, аспаратаминотрансфераза, сорбитолдегидрогеназа) и желчных кислот, дополнительно — иных ферментов (печеночные и др.).

17.3. Для факультативного исследования мочу у 5 самцов из каждой группы, отобранных методом случайной выборки в последнюю неделю исследования, собирают за фиксированный промежуток времени, и определяют вид, количество, осмоляльность или удельный вес, рН, белок, глюкозу, наличие крови/клеток крови.

17.4. Дополнительно возможно изучение сывороточных маркеров общего повреждения тканей и/или других анализов (содержание кальция, фосфатов, триглицеридов, глюкозы натощак, специфичных гормонов, метгемоглобин и холинэстеразы). Выбор изучаемых показателей зависит от наблюдаемого или ожидаемого эффекта исследуемого соединения.

17.5. При отсутствии достаточной информации о фоновом состоянии животных, допустимо изучение гематологических и биохимических показателей перед началом дозирования.

18. Всех взрослых особей, задействованных в эксперименте, подвергают полному детальному вскрытию, включающему внимательный внешний осмотр тела, всех отверстий, черепной, торакальной, брюшной полостей и их содержимого; особенно внимательно — репродуктивных органов; фиксируют число мест имплантации, посчитывают число желтых тел.

19. Яички и придатки яичек всех взрослых самцов взвешивают. Обязательной консервации подлежат яичники, яички, придатки яичек, дополнительные органы репродукции, все органы с признаками макроскопического поражения, отобранные у всех животных.

20. Дополнительно у случайно выбранных 5 самок и 5 самцов из каждой группы после вскрытия выделяют печень, почки, надпочечники, тимус, селезенку, мозг и сердце, препарируют от прилегающих тканей, взвешивают максимально быстро, не допуская высыхания. Для последующих гистопатологических исследований обязательной консервации в соответствующей среде подлежат следующие органы и ткани: любые органы с выявленными поражениями, мозг (наиболее важные области, включая большие полушария, мозжечок и варолиев мост), позвоночник, желудок, тонкий и толстый кишечник (включая пейеровы бляшки), печень, почки, надпочечники, селезенка, сердце, тимус, щитовидная железа, трахея и легкие (накачивают воздухом и фиксируют), матка, мочевого пузыря, лимфатические узлы (один узел, располагающийся вблизи места введения вещества, и один, находящийся в удалении от места введения), периферические нервы (седалищные и большеберцовые), желательны расположенные ближе к мышцам, часть костного мозга (или часть аспирата костного мозга).

21. Для стандартных исследований яичек и придатков яичек используют фиксатор Буэна, другие ткани и органы хранят в формалине. Следует сохранять и другие органы и ткани, которые могут являться органами-мишенями.

22. Мертворожденных и умерщвленных на 4-й день после родов детенышей внимательно изучают на наличие явных внешних аномалий.

23. Гистопатология.

23.1. Полное гистопатологическое исследование сохраненных органов и тканей животных проводят из группы с максимальной дозой и контрольной, особое внимание уделяют сперматогенезу у самцов и гистопатологии интерстициального строения клеток яичек. В случае обнаружения изменений в опытной группе с максимальной дозой, гистопатологии подвергают органы и ткани животных остальных опытных групп.

23.2. Все полученные изменения оценивают. Для обоснования NOAEL исследуют органы животных всех опытных групп, особенно с планируемой минимальной недействующей дозой.

23.3. В группах-спутниках проводят гистопатологию тех органов и тканей, в которых наблюдались эффекты.

## ГЛАВА 6 ДАННЫЕ, ОЦЕНКА РЕЗУЛЬТАТОВ И ОТЧЕТ

### 1. Данные об испытании.

1.1. Данные для каждого животного должны быть предоставлены отдельно. В дополнение все данные должны быть сведены в табличную форму, отражающую для каждой тестовой группы количество животных на начало исследования; количество животных, умерших во время исследования или умерщвленных по гуманным соображениям и время каждой смерти или умерщвления; количество способных к деторождению животных; количество беременных самок; количество животных, демонстрирующих признаки токсичности; описание наблюдаемых признаков токсичности, включая время начала, продолжительность и тяжесть любых токсических проявлений; тип гистопатологических изменений и все соответствующие данные по приплоду. Табличная форма для отчета, одобренная в качестве наиболее подходящей для оценки воздействия на репродуктивную/эмбриональную токсичность, представлена в приложении 3.

1.2. По возможности результаты должны быть оценены с применением подходящего и приемлемого статистического метода. Статистический метод должен быть выбран до начала тестирования при планировании исследования. В связи с ограниченным объемом исследования статистический анализ в виде тестов на «значимость» имеет ограниченную ценность для многих видов эффектов, особенно репродуктивного. Некоторые наиболее популярные методы, особенно параметрические тесты для определения центральной тенденции, являются неуместными. Если используется статистический анализ, выбранный метод должен соответствовать распределению изучаемой переменной и должен быть определен до начала исследования.

### 2. Оценка результатов.

2.1. Полученные данные исследования токсичности оценивают по показателям наблюдений, аутопсии и макроскопическим данным. Оценка включает соотношение между дозой исследуемого вещества и наличием/отсутствием, количеством и тяжестью аномалий, включая макроскопические повреждения, определение органов-мишеней, бесплодность, клинические аномалии, воздействие на репродуктивность и потомство, изменения массы тела, влияние на смертность и любые другие токсические проявления.

2.2. В связи с непродолжительностью периода введения вещества самцам при оценке воздействия на их репродуктивность гистопатологию яичек и придатков яичек рассматривают вместе с данными по фертильности. Использование существующих контрольных данных по репродуктивности и развитию может быть очень полезно для интерпретации результатов исследования.

### 3. Отчет об испытании должен включать следующие данные.

3.1. Исследуемое вещество: физическое состояние и при необходимости — физико-химические свойства; идентификационные данные.



3.2. Среда (при необходимости): обоснование выбора среды (если это не вода).

3.3. Подопытные животные: вид / линия используемых животных; число, возраст и пол животных; происхождение, условия содержания, питание и т. д.; масса каждого животного в начале эксперимента.

3.4. Условия проведения исследования: обоснование выбора уровня доз; подробное описание приготовления состава тестируемого вещества/пищи, достигнутая концентрация, стабильность и однородность состава; подробное описание введения вещества; коэффициент перевода от концентрации исследуемого вещества в пищу/питьевой воде (ppm) к фактической дозе (мг/кг/день), если возможно; качество пищи и воды.

3.5. Результаты: масса/изменения массы; потребление пищи и воды, если возможно; реакция на токсичность по полу и дозе, включая фертильность, беременность и любые другие признаки токсичности; длительность беременности; токсическое или иное влияние на репродуктивность, потомство, рост после рождения и т. д.; характер, объем и длительность клинических наблюдений (можно ли их однозначно интерпретировать или нет); сенсорная и двигательная активность животных, сила захвата и т. п.; результаты гематологических тестов с соответствующими значениями физиологической нормы; результаты биохимических тестов с соответствующими значениями физиологической нормы; количество живого потомства и постимплантационная гибель плодов; количество детенышей с явно наблюдаемыми аномалиями, количество малорослых; время гибели в течение исследования или дожившие до его окончания животные; количество зародышей, желтые тела (рекомендуется), размер и масса приплода на момент отчета; масса тела детенышей на момент умерщвления и данные по массе органов родительских животных; данные некропсии; подробное описание обнаруженных гистологических изменений половых путей и других тканей самцов, если имеются; данные по абсорбции, если имеются; статистическая обработка, когда требуется (приложение 3).

#### 4. Обсуждение результатов.

##### 4.1. Заключение.

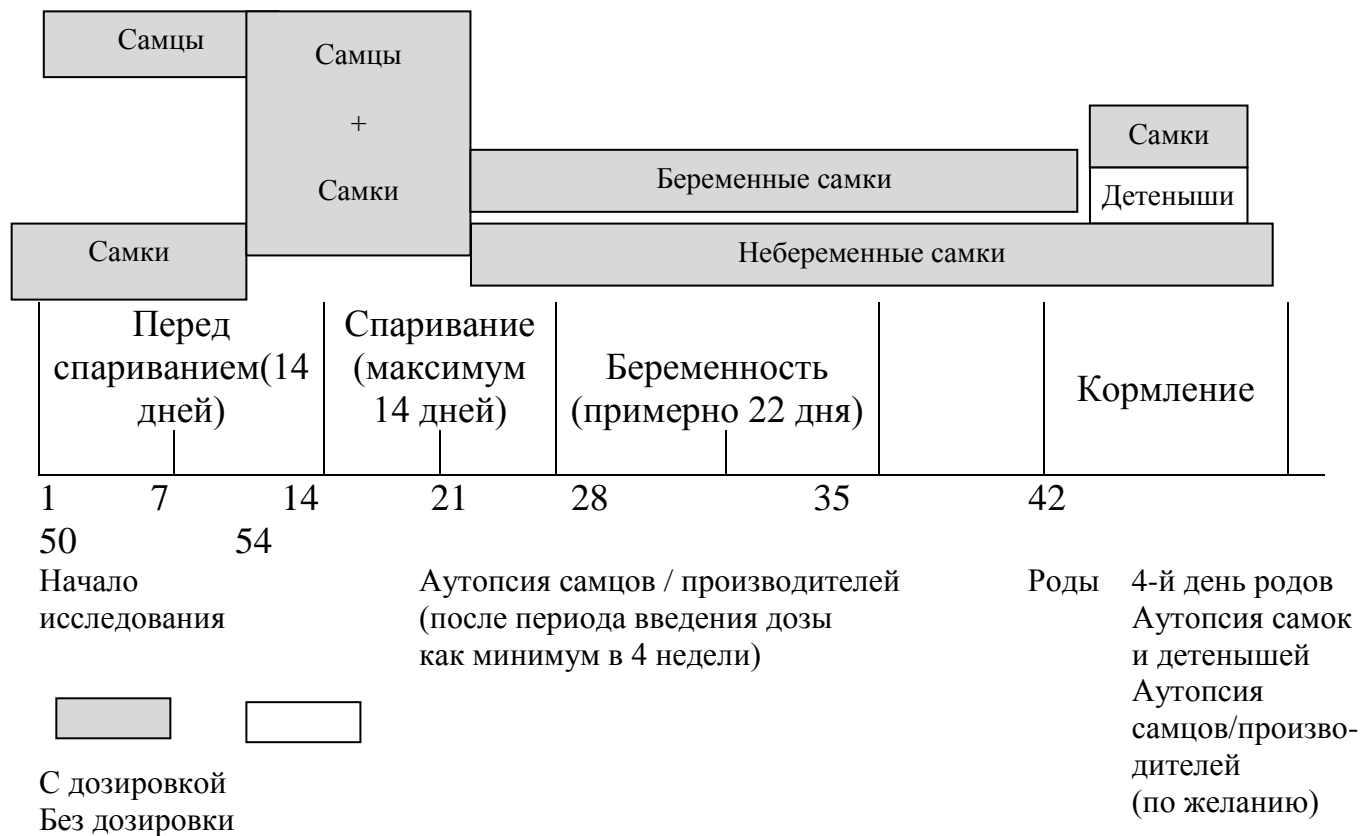
##### 4.2. Интерпретация результатов.

4.2.1. Исследование дает оценку репродуктивной/эмбриональной токсичности, связанной с введением повторяющихся доз. Оно может показать необходимость дополнительного изучения и стать руководством по разработке дальнейших исследований (Руководство № 421).

4.2.2. Исследование дает возможность оценить репродуктивную/эмбриональную токсичность вещества при его повторном введении. Так как особое внимание уделено и общетоксическому действию, и репродуктивной/эмбриональной токсичности, результаты этого исследования могут показать различия между репродуктивными/эмбриональными эффектами, появляющимися в отсутствии общей токсичности, и теми, которые проявляются только на уровнях воздействия, токсичных и для взрослых особей. Оно может показать необходимость проведения дополнительных исследований

и стать основой для разработки программы последующих исследований (Руководство № 421).

**График схемы исследования, показывающий максимальную длительность исследования, основанную на полном 14-дневном периоде спаривания**



**Пример таблицы итогового отчета  
воздействий на репродуктивность/эмбрион**

НАБЛЮДЕНИЯ	ОЦЕНКИ				
Доза (единицы)	0 (конт- роль)	...	...	...	...
Пары на начало (N)					
Самки с признаками совокупления (N)					
Самки, достигшие беременности (N)					
Дни зачатия 1-5 (N)					
Дни зачатия 6 -... <sup>(1)</sup> (N)					
Беременность ≤21 день (N)					
Беременность = 22 дня (N)					
Беременность ≥23 дня (N)					
Самки с живыми новорожденными (N)					
Самки с живыми детенышами к 4-му дню (N)					
Желтое тело/самка (в среднем)					
Эмбрионы/самка (в среднем)					
Живые детеныши/самка при рождении (в среднем)					
Живые детеныши/самка к 4-му дню (в среднем)					
Численное соотношение полов (самцы/самки) к моменту рождения (в среднем)					
Численное соотношение полов (самцы/самки) к 4-му дню (в среднем)					
Масса приплода при рождении (в среднем)					
Масса приплода к 4-му дню (в среднем)					
Масса детеныша при рождении (в среднем)					
Масса детеныша к 4-му дню (в среднем)					
<b>АНОМАЛИИ ДЕТЕНЬШЕЙ</b>					
Самки с 0					
Самки с 1					
Самки ≥2					
<b>ПОТЕРИ ПОТОМСТВА</b>					
<b>Предимплантационный (желтые тела минус зародыши)</b>					
Самки с 0					
Самки с 1					
Самки с 2					
Самки ≥ 3					
<b>Предродовой/постимплантационный (зародыши минус рожденные живыми)</b>					
Самки с 0					
Самки с 1					
Самки с 2					
Самки ≥ 3					
<b>Послеродовой (рожденные живыми минус живые к 4-му дню после родов)</b>					
Самки с 0					
Самки с 1					
Самки с 2					
Самки ≥ 3					

**Пример сводного отчета об эффектах воздействия  
на репродуктивность/развитие**

Наблюдения	Результаты				
	0 (контроль)	опыт	опыт	опыт	опыт
Доза (единицы измерения)					
Пары на начало исследования (N)					
Самки с признаками совокупления (N)					
Забеременевшие самки (N)					
Дни зачатия 1–5 (N)					
Дни зачатия 6 – <sup>n</sup> (N)					
Беременность = 21 день (N)					
Беременность = 22 дня (N)					
Беременность >23 дня (роды)					
Самки с живыми новорождёнными (N)					
Самки с живыми детенышами к 4-му дню (N)					
Желтое тело/самка (в среднем)					
Эмбрионы/самка (в среднем)					
Живые детеныши/самка при рождении (в среднем)					
Живые детеныши/самка к 4-му дню (в среднем)					
<b>ПОТЕРИ ПОТОМСТВА</b>					
Предимплантационная (желтые тела минус зародыши)					
Самки с 0					
Самки с 1					
Самки с 2					