

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

«УТВЕРЖДАЮ»

Заместитель Министра
здравоохранения – Главный
государственный санитарный
врач Республики Беларусь



Н.П. Жукова
«2016 г.»
Регистрационный № 047-1215

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОСТРОЙ ТОКСИЧНОСТИ
ХИМИЧЕСКОЙ ПРОДУКЦИИ (ХИМИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ И ИХ
СМЕСЕЙ) ПРИ ИНГАЛЯЦИОННОМ 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 № 047-1215

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОСТРОЙ ТОКСИЧНОСТИ
ХИМИЧЕСКОЙ ПРОДУКЦИИ (ХИМИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ И ИХ
СМЕСЕЙ) ПРИ ИНГАЛЯЦИОННОМ 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) изложены гармонизированные с международными требованиями (OECD TG № 403 «Acute Inhalation Toxicity»/ОЭСР Руководство № 403 «Острая токсичность при ингаляционном поступлении», OECD TG № 436 «Acute Inhalation Toxicity — Acute Toxic Class Method»/ОЭСР Руководство № 436 «Оценка острой токсичности при ингаляционном поступлении с определением класса острой токсичности») методы определения острой токсичности химических веществ и их смесей, 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 наноматериалов, готовых лекарственных средств, препаратов ветеринарного назначения, готовой парфюмерно-косметической продукции.

2. Настоящая инструкция устанавливает подходы, схемы и методы проведения исследований по изучению острой токсичности при ингаляционном поступлении в организм, обеспечивает получение информации об острой токсичности и классе опасности вещества при вдыхании, 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. Методы, изложенные в настоящей инструкции, предназначены для специалистов организаций здравоохранения, осуществляющих государственный санитарный надзор, иных учреждений, занимающихся реализацией мероприятий по медицинской профилактике неблагоприятного воздействия химической продукции на здоровье человека.

ГЛАВА 2 ТЕРМИНЫ И ОПРЕДЕЛЕНИЯ

В настоящей инструкции используются следующие термины и определения:

- агония — состояние умирания или невозможности выжить даже при лечении;

- аэрозоль — относительно стабильная во времени суспензия, газообразная среда, в которой рассредоточены мелкие твердые или жидкие аэрозольные частицы, диаметром от 0,001 до 100 мкм;

- газ — состояние вещества, отличное от жидкого и твердого сравнительно низкой плотностью и вязкостью, высокой степенью расширения и сжатия с изменениями давления и температуры, повышенной способностью к диффузии и спонтанной тенденцией к равномерному распределению в любой емкости;

- гуманная конечная точка — наиболее ранний показатель в испытаниях на животных, указывающий на сильную боль, дистресс, страдания или приближающуюся гибель;

- дымка (или туман) — жидкие аэрозоли, образованные путем конденсации пересыщенных паров или физической деформации жидкости: пульверизация, распыление или образование пузырьков; густая дымка, затрудняющая видимость, называется туманом;

- испытание на предельное содержание — ингаляционное исследование, выполненное с использованием единственной группы животных, которые были подвергнуты испытанию предельной концентрацией;

- концентрация — масса тестируемого препарата на единицу объема воздуха (мг/л, мг/м³) или единица объема тестируемого препарата на единицу объема воздуха (промилле, частей на млрд);

- острая ингаляционная токсичность — вредный эффект, вызванный воздействием тестируемого препарата после непрерывной ингаляционной экспозиции от не менее 4 до не более 24 ч;

- отборочное исследование — предварительное изучение вещества с использованием минимального количества животных, имеющее целью выбор концентраций для основного эксперимента;

- пар — фаза газообразного состояния исследуемого вещества, включая смеси, находящиеся в жидком или твердом состоянии при комнатной температуре и давлении (эффект Кельвина);

- предельная возможная концентрация (предельная концентрация) — максимальная концентрация, рекомендуемая для исследований ингаляционной токсичности, которая зависит от физического состояния испытуемого препарата, и составляющая согласно Классификационной схеме СГС 20000 промилле — для газов, 20 мг/л — для паров и 5 мг/л — для аэрозолей;

- пыль — сухие твердые частицы диаметром более 0,5 мкм, рассредоточенные в газообразной среде в результате механического разрушения сыпучего материала или порошка, однокомпонентного вещества или смеси;

- скорая гибель — агония и смерть, которые ожидаются до наступления следующего запланированного наблюдения; признаки, указывающие на такое состояние у грызунов, могут включать конвульсии, горизонтальное положение, опрокинутое положение и тремор;

- средний аэродинамический диаметр массы (MMAD) — среднемассовое распределение масс относительно аэродинамического диаметра, используемое наряду с геометрическим стандартным отклонением, для описания гранулометрического состава аэрозоля, основанного на массе и размере частиц аэрозольного облака, который рекомендуется для исследований острой ингаляционной токсичности, в размере 1–4 мкм;

- СГС (Согласованная на глобальном уровне Система классификации и маркировки химических веществ) — система классификации химических веществ в зависимости от вида и уровня опасности для здоровья человека и окружающей среды, включающая согласованные элементы системы информирования, такие как пиктограммы, сигнальные слова, заявления об

опасности, предупредительные заявления и паспорта безопасности, с целью передать информацию об опасности и защитить человека и окружающую среду;

- 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;

- CL_{50}/LC_{50} (средняя смертельная концентрация) — обусловленная временем статистически выверенная оценка концентрации исследуемого вещества, которая предположительно может являться причиной смерти 50% животных, подвергшихся определенному воздействию препарата во время экспозиции или в течение определенного промежутка времени после экспозиции; значение CL_{50}/LC_{50} выражается как масса исследуемого препарата на единицу объема воздуха (мг/л, мг/м³) или как единица объема исследуемого препарата на единицу объема воздуха (промилле, частей на млрд); продолжительность выдержки всегда должна быть установлена (например, 4-часовая CL_{50}/LC_{50}).

ГЛАВА 3 ОБЩИЕ УСЛОВИЯ ПРОВЕДЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЙ

1. До испытаний необходимо выполнить анализ существующей информации по исследуемому веществу, включающий сведения о составе и химическом строении, физико-химических свойствах, химической структуре, результатах токсикологических испытаний *in vivo* и *in vitro*, токсикологических данных по структурно родственным веществам и предполагаемую область применения вещества. Полученная информация подтверждает необходимость проведения исследований и способствует выбору адекватной начальной концентрации.

2. Исследуемые вещества не должны применяться в концентрациях, являющихся причиной возникновения выраженных болевых ощущений и недомоганий за счет разъедающего или сильно раздражающего действия. Используемые концентрации должны находиться в диапазоне между достаточно низкими, не вызывающими боли и нарушений, и достаточно высокими, позволяющими расширить кривую «концентрация-ответ» до заданных уровней. Агонизирующих и испытывающих непереносимую боль животных умерщвляют гуманным способом, при подведении итогов исследования их учитывают как погибших во время испытаний.

3. *Животные. Выбор вида.* Для исследований используют грызунов, предпочтительно не беременных и не рожавших самок белых крыс, которые являются наиболее чувствительными к воздействию токсикантов; использование других видов грызунов и/или самцов белых крыс должно быть подтверждено токсикологическими и токсикокинетическими данными для структурно родственных веществ.

4. В эксперименте используют здоровых молодых половозрелых особей от 8 до 12 недель, массой 160–200 г, составляющей $\pm 20\%$ от средней массы ранее исследуемых животных.

5. *Условия содержания и кормления.* 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). При кормлении используется обычная лабораторная диета с неограниченным количеством питьевой воды.

6. *Подготовка животных.* Животных разделяют на группы методом случайной выборки, помечают и содержат в клетках не менее 5 дней до начала введения тестируемого вещества с целью их привыкания к лабораторным условиям.

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

7. В исследованиях 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 $^\circ\text{C}$ (по ГОСТ 24437); ингаляционные камеры (с объемом камеры, занимаемым телами тестируемых животных, не превышающим 5% объема камеры); анализатор потенциометрический с погрешностью измерений $\text{pH} \pm 0,1$ (pH-метр) с набором электродов (по ГОСТ 19881); холодильник бытовой (по ГОСТ 16317); морозильная камера; баня водяная с терморегулятором, позволяющая поддерживать температуру $55 \pm 0,5^\circ\text{C}$ (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 pH-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); оборудование;

- 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.

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

9. Содержание животных в камере должно осуществляться при следующих условиях: температура воздуха в камере — $22\pm 3^{\circ}\text{C}$; относительная влажность воздуха в зоне дыхания животных — 30–70%, но в некоторых случаях (препарат на водной основе) параметр может быть неприменим или неизмеряем, например, при взаимовлиянии исследуемого препарата и метода исследования.

10. До начала опыта животных ограничивают в пище (нельзя кормить с вечера перед введением дозы, но поить; мышей не кормить 3–4 ч перед введением дозы, но поить); взвешивают, затем вводят исследуемое вещество. После эксперимента крыс нельзя кормить 3–4 ч, мышей — 1–2 ч.

11. При выборе ингаляционной камеры учитывают природу исследуемого препарата и нормативные требования. Изучаемое вещество вводят интраназально, т. е. путем воздействия через голову, нос и мордочку. Экспозиция только через нос предпочтительна для изучения аэрозолей жидких и твердых и для паров, которые могут конденсироваться в форме аэрозолей. Для решения отдельных задач исследования возможно воздействие через все тело. Использование иной модели экспозиции должно быть обусловлено целями исследования и обосновано в отчете.

12. Гранулометрический состав

12.1. Для всех аэрозолей и паров, которые могут конденсироваться и превращаться в аэрозоль, необходимо определять размер частиц. Чтобы обеспечить воздействие на всю область дыхательных путей, рекомендовано использовать аэрозоли с массовым средним аэродинамическим диаметром (MMAD) от 1 до 4 мкм, с геометрическим стандартным отклонением (σ_g) от 1,5 до 3,0. Причины невыполнения данных требований (например, наличие в воздухе металлических частиц с размером меньше стандартного или заряженных частиц, волокон и гигроскопичных материалов, которые увеличиваются в размерах во влажной среде респираторного тракта) должны иметь экспертную оценку.

12.2. Для создания в атмосфере необходимой концентрации и размера частиц используют растворитель, предпочтительно воду. Зернистый материал для получения требуемого гранулометрического состава подвергают механическому воздействию, избегая изменения состава, разложения и загрязнения. При предполагаемом изменении состава тестируемого препарата в результате механических процессов (чрезмерно высокая температура в процессе сильного дробления вследствие трения) следует провести его анализ.

13. Параллельное исследование проводят без контрольных животных. При применении растворителя, отличного от воды, контрольную группу используют только в случае отсутствия справочных данных о токсичности растворителя при ингаляционном воздействии. Полученный отрицательный эффект токсичности

препарата, содержащего растворитель, свидетельствует о нетоксичности растворителя, и дальнейших его испытаний не требуется.

14. *Воздушные потоки*, проходящие через камеру, необходимо контролировать, наблюдать и фиксировать не реже одного раза в 1 ч на протяжении периода экспозиции. Концентрация исследуемого вещества в газовой среде (устойчивость) — это интегральное вычисление всех динамических параметров воздуха, обеспеченное косвенными способами контроля. При интраназальном поступлении следует не допускать возвратных воздушных потоков; концентрация кислорода должна составлять не менее 19%, углекислого газа — не менее 1%.

15. Исследуемый препарат.

15.1. *Номинальную концентрацию* — массу сгенерированного изучаемого вещества, разбавленную общим объемом воздуха, проходящего через систему клетки в затравочной камере, периодически контролируют и фиксируют. Сравнение номинальной и фактической концентраций позволяет судить об эффективности генератора в испытательной системе и своевременно выявлять и устранять нарушения.

15.2. *Фактическая концентрация* — это концентрация исследуемого препарата в зоне дыхания животных в ингаляционной камере, измеренная специальными методами (непосредственного выбора, адсорбционным, химической реактивности) и последующим анализом, или неспециальными методами (гравиметрический капельный анализ).

15.2.1. Гравиметрический анализ применяют на основании предварительно полученных соответствующих данных и только для однокомпонентных порошкообразных веществ в аэрозольной упаковке или для жидких аэрозолей с невысокой летучестью.

Для многокомпонентных порошков определение концентрации аэрозоля гравиметрическим методом анализа возможно только при наличии данных, подтверждающих сходство состава аэрозольного препарата с составом исходного материала.

При отсутствии подобной информации проводят повторный анализ воздушной пробы в определенные временные интервалы опыта. Использование данного метода для аэрозольных испаряющихся или сублимирующихся агентов должно быть обязательно отмечено. В отчете указывают цели, номинальную и фактическую концентрацию, но в статистическом анализе для подсчета значения летальной концентрации используется только фактическая концентрация.

15.2.3. Для исследований используют только один препарат, который хранится в условиях, позволяющих сохранить его чистоту, однородность и стабильность. Перед началом опыта изучают препарат, степень его чистоты и количество выявленных примесей (если технически возможно). Также учитывают данные о времени удержания и относительной площади пика, молекулярной массе, полученной методом масс-спектропии или газовой хроматографии и т. п. Целесообразно подтвердить некоторые поддерживающие характеристики — цвет, физическую природу и т. д.

15.2.4. Во время опыта концентрация вещества должна быть максимально постоянной, отбор проб воздуха проводят регулярно, не реже двух раз за 4 ч. Отбор одной пробы допустим при ограниченных воздушных потоках или низкой концентрации вещества. При значительных колебаниях концентраций в отобранных пробах количество отобранных образцов удваивают. Допустимые отклонения концентраций для каждой камеры не должны превышать от средней концентрации: $\pm 10\%$ для газов и паров или $\pm 20\%$ для жидких и твердых аэрозолей. Время для достижения динамического равновесия и перехода к распаду (t_{95}) замеряют и фиксируют. Период воздействия вещества включает время генерации и учитывает время, необходимое для достижения равновесного состояния в камере (t_{95}) и перехода к распаду.

15.2.5. Для сложных смесей из газов/паров и аэрозолей, проявляющих в ингаляционной камере нестабильность концентраций, в качестве индикаторной субстанции (аналита) выбирают активную, одну для всех этапов — газ/пар или аэрозоль. Если тестируемый препарат является по своему составу смесью, то в качестве аналитической, определяемой при анализе, используют концентрацию неактивного ингредиента или основного компонента, а общую — для всего состава.

15.2.6. Гранулометрический состав аэрозолей определяют при помощи каскадного импактора (пробоотборника частиц) или альтернативным инструментом (аэродинамическим спектрометром APS) не реже двух раз/4 ч ингаляции. Для подтверждения эффективности работы основного прибора, применяемого для определения гранулометрического состава исследуемого вещества, используют гравиметрический фильтр или импинджер (прибор для измерения запыленности и загазованности). Массовая концентрация, полученная ситовым анализом, должна находиться в пределах массовой концентрации, полученной при анализе работы фильтров.

Применение в исследовании альтернативного инструмента возможно только в случае демонстрации равноценных результатов, полученных каскадным импактором и альтернативным инструментом.

Размеры частиц следует определять для паров, при вероятности образования аэрозоля при их конденсации или обнаружении частиц с потенциалом смешанных фаз.

16. Наблюдение за животными осуществляют систематически. Во время экспозиции всех животных подвергают клиническому осмотру, после экспозиции – не реже двух раз и чаще в день экспозиции, при наличии реакции и в последующие 14 дней — не реже одного раза в день. Продолжительность наблюдения зависит от природы и времени появления клинических признаков и периода восстановления. Обязательным является индивидуальный для каждого животного учет и фиксация времени появления и исчезновения признаков интоксикации, особенно при тенденции к запаздыванию. Животных в состоянии агонии и с признаками сильного поражения умерщвляют гуманным способом. Время смерти умерщвленного животного или найденного мертвым фиксируют максимально точно.

При наблюдении за животными фиксируют изменения кожи и шерсти, глаз и слизистых оболочек, респираторной, кровеносной, вегетативной и центральной нервной систем, соматомоторную активность и поведение; различие между локальными и системными эффектами; фокусируют внимание на явлениях тремора, конвульсий, слюноотделения, диареи, летаргии, сна и комы; измеряют ректальную температуру, чтобы удостовериться в рефлекторном брадикардии или гипо/гипертермии, связанной с лечением или обездвиженностью.

17. Индивидуальную массу тела каждого животного фиксируют один раз во время акклиматизационного периода, в день экспозиции, перед экспозицией (день 0), в 1; 3, и 7-й дни и затем еженедельно, а также в день гибели или умерщвления, если они наступают после 1-го дня. Внимательному наблюдению подвергают животных, непрерывно теряющих >20% массы тела в сравнении данными на начало исследования. Выживших животных взвешивают и умерщвляют в соответствии с принципами биоэтики по истечении постэкспозиционного периода.

18. Всех подопытных животных, включая погибших во время исследования или умерщвленных по гуманным соображениям, подвергают общей аутопсии. Вскрытие проводят максимально быстро, как правило, в течение 1–2 дней. При несоблюдении сроков вскрытия погибших животных охлаждают (не замораживают) при температуре, не допускающей аутолиза. Все патологические изменения фиксируют индивидуально для каждого животного, обращая особое внимание на любые изменения в респираторном тракте. Дополнительно измеряют массу легкого, проводят микроскопический анализ дыхательных путей и респираторного тракта, осматривают органы с симптомами выраженных патологических изменений у выживших 24 или более часов животных.

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 МЕТОД ОЦЕНКИ ОСТРОЙ ТОКСИЧНОСТИ ПРИ ИНГАЛЯЦИОННОМ ПОСТУПЛЕНИИ

1. Метод по оценке острой токсичности (OECD TG № 403) позволяет изучить соотношения «концентрация-ответ» в диапазоне от нелетального к летальному исходу, чтобы вывести среднюю летальную (CL_{50}/LC_{50}), нелетальную пороговую концентрацию (CL_{01}/LC_{01}), а также определить возможную гендерную чувствительность.

2. Принцип метода заключается в использовании минимального количества животных и возможности осуществления испытаний по двум способам проведения опыта: первый — традиционный протокол с тестом на предельную концентрацию или серий концентраций поэтапно по 4 ч; второй метод — протокол концентрация×время ($C \times t$), т. е. тест на предельно допустимую

концентрацию или серии концентраций при различной продолжительности времени.

3. Условия экспозиции.

3.1. Воздействие только через нос на крысах может длиться до 6 ч. Для мышей период экспозиции не должен превышать 4 ч. Более длительный период воздействия необходимо обосновать. Животных, подвергшихся полному (на все тело) воздействию препарата, содержат индивидуально во избежание проглатывания/слизывания препарата. Во время экспозиции животных не кормят, но воду не ограничивают.

3.2. В зависимости от физического состояния исследуемого вещества: физико-химических свойств, выбранной концентрации и/или физической формы, наиболее приближенной к реальным условиям использования, воздействие исследуемого препарата на животных может быть в виде газа, паров, аэрозоля или их смеси. Гигроскопичное и химически реактивное вещество тестируют в условиях минимальной влажности в отсутствие паров воды и избегают возникновения взрывоопасных концентраций.

4. Процедура испытания (традиционный протокол, протокол концентрация×время ($C \times t$)).

Метод содержит два вида исследования: традиционный протокол и Протокол $C \times t$; каждый метод включает визуальное наблюдение, основное исследование и/или тест на предельное содержание. При наличии данных о половой чувствительности испытания проводят с более восприимчивым полом. Для грызунов, за исключением крыс, при интраназальном воздействии максимальный период экспозиции выбирают с целью снижения видоспецифических различий. Для минимизации количества животных, вовлеченных в эксперимент, до начала опыта изучают все имеющиеся данные о веществе.

4.1. Общие положения Традиционного протокола.

При проведении исследования согласно традиционному протоколу группы экспериментальных животных подвергают воздействию препарата определенный период времени (обычно 4 ч) в камерах, предназначенных только для вдыхания всем телом. Испытывают предельную концентрацию или воздействуют поэтапно тремя концентрациями (основное исследование). Основному исследованию предшествует предварительное испытание, за исключением случаев, когда информация о тестируемом веществе имеется.

4.1.1. *Предварительное исследование* проводят для оценки эффективности исследуемого препарата, для определения различий в гендерной восприимчивости, с целью выбора уровня концентрации для основного исследования или для теста на предельную концентрацию.

При выборе уровня концентрации для предварительного исследования используют всю имеющуюся информацию, включая данные QSAR и аналогов. Каждую выбранную концентрацию испытывают на трех самцах и трех самках (по 3 животных/пол) для установления различий в гендерной восприимчивости. Предварительное исследование может быть ограничено наблюдением за одним уровнем концентрации с меньшим числом животных, но в случае необходимости

возможно использование и большего количества концентраций. Предварительное исследование не проводят при наличии соразмерных, ранее выполненных исследований.

4.1.2. *Предельную концентрацию* определяют в соответствии с нормативными требованиями. Для системы СГС, например, предельная (максимально разрешенная) концентрация для газов, паров и аэрозолей составляет 20 000 промилле, 20 и 5 мг/л соответственно.

При испытании аэрозолей важным является получение размеров частиц, пригодных для вдыхания (ММАД — 1–4 мкм), при предельной концентрации 2 мг/л. Для большинства исследуемых препаратов такие эксперименты возможны, за исключением некоторых паров и аэрозолей, для которых достижение предельных концентраций технически затруднено.

Тестирование аэрозоля при предельной концентрации, превышающей 2 мг/л, СГС не рекомендует из-за принципов гуманного отношения к животным, но допускает в исключительных случаях: если величина частиц пригодна для вдыхания; если имеется исключительно веская причина, связанная со здоровьем человека, и это должно быть отражено в отчете.

Исследование потенциально взрывоопасных продуктов проводят с мерами предосторожности, чтобы избежать условий, благоприятных для взрыва. Пробный тест перед испытанием предельной концентрации проводят с целью избежать ненужного использования животных и удостовериться, что в камере созданы все необходимые условия.

Результаты испытания с предельной концентрацией, приведшие к гибели или агонии, могут заменить предварительное исследование при испытаниях других концентраций. При невозможности из-за физических или химических свойств исследуемого препарата достичь уровня предельной концентрации исследуют максимально достижимую концентрацию. В случае гибели более 50% животных при испытании максимально достижимой концентрации дальнейшее исследование не проводят, а пояснения фиксируют в отчете. Если максимально достижимая концентрация паров не вызывает токсического эффекта, необходимо сгенерировать исследуемый препарат в виде жидкого аэрозоля.

4.1.3. *Основное исследование* выполняют на 5 самцах и 5 самках (или при наличии данных 5 животных другого наиболее восприимчивого пола) на каждый уровень концентрации. Исследуемый уровень концентрации должен обеспечивать получение достоверных статистических результатов. Временной интервал между тестами в подопытных группах определяется появлением, длительностью и тяжестью токсических признаков. Экспозицию последующего уровня концентрации проводят только по факту выживания прошедших предыдущее испытание животных.

4.2. Общие положения протокола концентрация×время (C×t)

При оценке ингаляционной токсичности пошаговое исследование концентрация×время (C×t) является альтернативой традиционному протоколу. Животных подвергают многократному воздействию нескольких уровней концентрации исследуемого вещества. Для испытаний используют только камеры с воздействием через нос (камеры для воздействия через все тело не используют).

Результатом исследований в соответствии с традиционным протоколом и протоколом $C \times t$ являются значения CL_{50}/LC_{50} , но испытания по протоколу $C \times t$ предпочтительней для получения значений CL_{01}/LC_{01} и CL_{10}/LC_{10} .

4.2.1. Для испытания в основном исследовании 4–5 концентраций вещества необходимо использовать двух животных (по одному каждого пола или два наиболее восприимчивого пола) для каждого интервала $C \times t$, чтобы не снизить систематическую ошибку оценки и изменчивость, увеличить коэффициент результативности и улучшить охват доверительного интервала. Однако для 5-й экспозиции допустимо учитывать данные, полученные из опыта от одного животного каждого пола или от двух наиболее восприимчивого пола.

4.2.2. *Предварительное исследование* предшествует основному исследованию или испытанию предельной концентрации и применяется для оценки эффективности испытываемого вещества, определения гендерных различий в чувствительности и выбора уровня концентрации для основного исследования. Уровень концентрации для предварительного исследования определяют на основании имеющейся информации о веществе и близких по структуре веществах.

Концентрацию каждого выбранного уровня ингалируют в течение 240 мин трем самцам и трем самкам. Вместо предварительного исследования допустимо использование результатов ранее выполненного.

4.2.3. В качестве *начальной концентрации* по протоколу $C \times t$ может приниматься предельная концентрация или полученная в результате предварительных исследований. Опытная группа состоит из 1 животного одного пола, которое подвергается воздействию начальной концентрации в течение различной продолжительности времени (например, 15; 30; 60; 120 или 240 мин), общее количество экспериментальных животных — 10 (п. 4.3).

Предельную концентрацию определяют в соответствии с нормативными требованиями. Для системы СГС, например, предельная (максимально разрешенная) концентрация для газов, паров и аэрозолей составляет 20000 промилле, 20 и 5 мг/л соответственно. Требования и процедура испытаний предельной концентрации идентичны описанным в п. 4.1.2.

4.2.4. В качестве начальной концентрации для *основного исследования* по протоколу $C \times t$ принимают предельную концентрацию или полученную в результате предварительных исследований. При наличии летальности в предварительных исследованиях точку концентрации и период воздействия определяют на уровне минимальной экспозиции (время \times концентрация), вызвавшей гибель в предварительных испытаниях.

4.2.5. Для большинства исследуемых препаратов, чтобы определить отношение $C \times t$ и летальность, достаточным является получение результатов в четырех тестах: с предельно допустимой концентрацией и тремя дополнительными экспозициями с меньшими временными интервалами, но иногда целесообразно изучение пятой экспозиции.

5. Поэтапное исследование концентрация \times время ($C \times t$) по протоколу $C \times t$

5.1. Поэтапное исследование взаимосвязи концентрация \times время ($C \times t$) является альтернативой исследованиям по традиционному протоколу по оценке

ингаляционной токсичности (приложение 16). Поэтапное исследование проводят при необходимости длительных испытаний на животных с множественными временными интервалами, чтобы получить ответные реакции при чрезвычайных обстоятельствах (emergency response planning).

5.2. Испытание начинают с пятикратного воздействия (15; 30; 60; 120 и 240 мин) исследуемого вещества на одно животное в течение одного сеанса. При этом рекомендованные СГС предельные концентрации, составляющие 20000 промилле для газов, 20 мг/л для паров и 5 мг/л для аэрозолей, могут быть превышены только при нормативном/научном обосновании необходимости проведения испытаний на более высоком уровне.

5.3. При отсутствии или недостаточности информации об исследуемом препарате проводят предварительное исследование на 3 животных одного пола, на которых воздействуют выбранными целевыми концентрациями в течение 240 мин.

5.4. В случае гибели менее 50% экспериментальных животных, получавших предельную концентрацию, дополнительных исследований не проводят. Ингаляционное воздействие концентрациями, превышающими предельные в 2 и более раза, проводят исключительно в научных целях для изучения соотношения концентрация/время/ответ.

5.5. Если при испытании предельной концентрации получены токсические эффекты, то проводят дополнительное испытание (основное исследование) с более низкой и/или высокой концентрацией исследуемого вещества при идентичной продолжительности и меньшей разнесенности.

5.6. При проведении основного исследования и опыта с предельной концентрацией каждый выбранный уровень концентрации и каждый временной интервал изучают на одном животном одного пола. В некоторых случаях используют по 2 крысы обоих полов на концентрацию/момент времени (или 4 животных восприимчивого пола на концентрацию/момент времени), что может снизить систематическую ошибку оценки и изменчивость, увеличить коэффициент результативности и улучшить охват доверительного интервала относительно протокола.

5.7. Каждую экспозиционную сессию (изучение одной концентрации) выполняют в течение одного дня. Следующую экспозицию проводят, убедившись, что ранее подвергнутые воздействию животные выжили, и после коррекции при необходимости целевой концентрации и продолжительности воздействия. Каждую сессию начинают с группы, которая подвергнется наиболее продолжительному воздействию (например, 240 мин), и затем — по убыванию. В случае гибели животных через 90 мин после 240-минутной экспозиции или при возникновении клинических признаков сильного отравления (резкое изменение ритма дыхания, затрудненное дыхание) последующих экспозиций по 120 мин не проводят и выбирают более короткую продолжительность воздействия (90; 65; 45; 33 и 25 мин) заданной концентрацией.

5.8. Концентрацию в камере контролируют многократно, чтобы установить средневзвешенную по времени концентрацию для продолжительности

каждого воздействия. Для статистического анализа предпочтительней использовать время гибели каждого животного.

ГЛАВА 5

МЕТОД ОЦЕНКИ ОСТРОЙ ТОКСИЧНОСТИ С ОПРЕДЕЛЕНИЕМ КЛАССА ОСТРОЙ ТОКСИЧНОСТИ

1. Данный метод (OECD TG № 436) позволяет получить информацию об острой токсичности вещества при вдыхании и классифицировать вещество в соответствии с СГС по показателям острой ингаляционной токсичности.

2. Принцип метода заключается в использовании поэтапной процедуры введения серии фиксированных целевых концентраций при 4-часовом периоде воздействия и получении информации об острой токсичности исследуемого препарата для последующей классификации испытуемого вещества.

3. Условия экспозиции

3.1. Продолжительность ингаляции фиксирована и равна 4 ч, включая время уравнивания. Для увеличения длительности экспозиции необходимо обоснование. Животных, подвергшихся полному (на все тело) воздействию препарата, содержат индивидуально во избежание проглатывания/слизывания препарата. Во время экспозиции животных не кормят, но воду не ограничивают.

3.2. В зависимости от физического состояния исследуемого вещества: физико-химических свойств, выбранной концентрации и/или физической формы, наиболее приближенной к реальным условиям использования, воздействие исследуемого препарата на животных может быть в виде газа, паров, аэрозоля или их смеси. Гигроскопичное и химически реактивное вещество тестируют в условиях минимальной влажности в отсутствие паров воды и избегают возникновения взрывоопасных концентраций.

4. Процедура испытания

4.1. Основное исследование

4.1.1. На каждом этапе используются по три животных каждого пола или шесть животных наиболее чувствительного пола. Уровень начальной концентрации должен соответствовать одному из четырех выбранных значений и с максимальной вероятностью вызывать проявления токсичности у части подвергшихся воздействию животных. Схемы испытания для газов и паров (приложения 1, 6) описывают процедуру испытания с граничными значениями для категорий согласно СГС паров (определенных как категории 1–4), газов (100; 500; 2500; 20000 промилле) (приложения 2–5), паров (0,5; 2; 10; 20 мл/л/4 ч) (приложения 7–10), а также пыли и туманов (0,05; 0,5; 1; 5 мг/л/4 ч) (приложение 11–15). К категории 5 относят концентрации выше соответствующего предела. Для каждой начальной концентрации применима соответствующая схема испытания. В зависимости от количества погибших либо подвергшихся эвтаназии животных испытание проводят в указанном на схеме стрелками порядке вплоть до возможности категоризации.

4.1.2. В основной части исследования на каждый уровень концентрации (минимум три) используют по 5 особей мужского и женского пола (или 5 особей

наиболее чувствительного пола, если известен). Выбранные концентрации должны обеспечивать достоверность статистического анализа. Временной интервал между введениями различным группам определяют появлением, длительностью и тяжестью токсических признаков. Экспозицию последующего уровня концентрации проводят только по факту выживания прошедших предыдущее испытание животных, что позволяет при необходимости скорректировать целевую концентрацию.

4.2. *Испытание на предельное содержание*

4.2.1. Испытание проводят с практически нетоксичными веществами, которые проявляют токсическое действие только при уровне концентрации, превышающем нормативные уровни. Информацию о токсичности испытуемого вещества получают из данных об аналогичных составах, смесях или продуктах, учитывая характер и процентное содержание токсикологически значимых компонентов. При недостатке или отсутствии информации о токсичности или подозрении на токсичность проводят основное испытание.

4.2.2. При проведении испытаний используют по 3 животных каждого пола или 6 животных наиболее чувствительного пола, на которых воздействуют концентрациями, равными 20000 промилле для газов, 20 мг/л для паров и 5 мг/л для пыли/туманов соответственно, что является испытанием на предельное содержание.

При исследовании аэрозолей основной задачей является достижение респирабельного размера частиц (MMAD 1–4 мкм). Это возможно для большинства веществ в концентрации 2 мг/л. Исследование аэрозолей в концентрациях более 2 мг/л проводят только при респирабельном размере частиц.

Испытание концентраций, превышающих предельные, СГС не рекомендует из-за принципов гуманного отношения к животным, но допускает при наличии веских оснований, таких как прямое отношение к защите здоровья человека, с обязательным указанием данных оснований в протоколе исследования.

Исследование потенциально взрывоопасных продуктов проводят с мерами предосторожности, чтобы избежать условий, благоприятных для взрыва. Пробный тест перед испытанием предельной концентрации проводят с целью избежать ненужного использования животных и удостовериться, что в камере созданы все необходимые условия.

ГЛАВА 6 ПОДГОТОВКА ОТЧЕТА

1. Данные об испытании должны содержать сведения о массе тела и результатах вскрытия по каждому животному индивидуально; результаты клинического осмотра сводят в таблицу, отражающую количество животных в каждой подопытной группе, количество животных со специфическими признаками интоксикации, количество животных, найденных мертвыми или умерщвленных по гуманным причинам, время смерти каждого животного,

описание и динамика появления признаков токсичности и их обратимость, а также результаты вскрытия.

2. Отчет об испытании должен включать следующие данные:

2.1. Подопытные животные и их содержание:

- описание условий содержания в клетке, включая: количество (или изменения в количестве) животных в клетке, материал подстилки, температура окружающей среды и относительная влажность, световой период и обозначение диеты;

- используемые виды/линии и обоснование для использования других видов, кроме крыс;

- количество, возраст и пол животных;

- метод рандомизации;

- подробности о качестве пищи и воды (включая тип/источник диеты, источник воды);

- описание условий содержания перед началом испытания, включая диету, карантин и лечение от болезни.

2.2. Исследуемый препарат:

- физическая природа, наличие примесей и, если значимо, физико-химические свойства (включая изомеризацию);

- идентификационные данные и регистрационный номер в Реферативной службе по химии (CAS), если таковой имеется.

2.3. Растворитель:

- обоснования для использования растворителя и обоснование для выбора растворителя (если это иное, чем вода);

- справочные или совпадающие данные, подтверждающие, что растворитель не влияет на результаты исследования.

2.4. Ингаляционная камера:

- описание ингаляционной камеры, включая размеры и объем;

- описание и поставщик оборудования, используемого для экспозиции животных, а также генерация атмосферы;

- оборудование для измерения температуры, относительной влажности, размера частиц и фактической концентрации;

- источник поступления воздуха и обработка поступившего/извлеченного воздуха, система кондиционирования;

- методы, используемые для проверки оборудования с целью обеспечить гомогенность в тестируемой атмосфере;

- перепады давления (положительные или отрицательные);

- отверстия для экспозиции в камере (только через нос); размещение животных в системе (воздействие через все тело);

- временная гомогенность/стабильность тестируемой атмосферы;

- место размещения датчиков, определяющих температуру и относительную влажность, отбор образцов тестируемой атмосферы в клетке;

- скорость потоков воздуха, скорость потока воздуха/отверстия для экспозиции (только через нос) или нагрузка животных/клетку (для воздействия через все тело);

- время, рекомендуемое для достижения равновесия в ингаляционной камере (t_{95});

- количество изменений объема в 1 ч;

- приборы, снимающие показания (если применены).

2.5. Данные экспозиции:

- обоснование для выбора целевой концентрации в основном исследовании;

- номинальные концентрации (общая масса исследуемого препарата, сгенерированного в ингаляционной камере, разделенная на объем воздуха, проходящего через камеру);

- фактическая концентрация тестируемого препарата, собранная из зоны дыхания животных; для исследуемых смесей, которые продуцируют гетерогенные физические формы (газы, пары, аэрозоли); каждая форма может быть проанализирована отдельно;

- все воздушные концентрации должны быть указаны в отчете в единицах массы (например: мг/л, мг/м³ и т. д.); в скобках допускается указание их в единицах объема (например, промилле, часть на млрд и т. д.);

- гранулометрический состав, средний аэродинамический диаметр (MMAD) и геометрическое стандартное отклонение (σ), включая методы их вычисления. Индивидуальный гранулометрический анализ должен быть изложен в отчете.

2.6. Условия проведения испытания:

- подробные сведения о приготовлении тестируемого препарата, включая данные о мероприятиях по уменьшению размера частиц для твердых материалов или по приготовлению растворов исследуемого препарата. Если есть вероятность, что механические процессы изменят состав исследуемого вещества, необходимо включить результаты анализа для подтверждения состава тестируемого вещества;

- описание оборудования (предпочтительно с диаграммой), используемого для генерации исследуемой атмосферы и экспозиции животных в этой атмосфере;

- подробные сведения об оборудовании, используемом для наблюдения за температурой в камере, относительной влажностью, воздушными потоками;

- подробные сведения об оборудовании, используемом для забора образцов с целью вычисления концентрации в камере и гранулометрического состава;

- подробные сведения об используемом химико-аналитическом методе и проверке достоверности метода (включая эффективность восстановления тестируемого препарата из питательной среды, в которую были помещены образцы;

- метод случайной выборки животных для включения в испытательную и контрольную группы;

- обоснование для выбора исследуемой концентрации.

2.7. Результаты:

- сведение в таблицу данных о температуре в камере, уровне влажности и воздушном потоке;

- сведение в таблицу данных о номинальной и фактической концентрации;

- сведение в таблицу данных о размере частиц, включая собранные сведения об аналитических образцах, распределение размеров частиц, подсчеты MMAD и σ ;

- сведение в таблицу данных о реакции и уровне концентрации для каждого животного (т. е. признаки токсического отравления у животного, включая агонию, природу, тяжесть, время появления и продолжительность эффектов);

- индивидуальная масса тела животных, полученная в дни проведения эксперимента; дата и время смерти, если предшествовали умерщвлению, динамика появления признаков токсичности и были ли они обратимы для каждого животного;

- данные вскрытия и гистопатологические данные для каждого животного, если имеются;

- классификация категории согласно GHS и граничное значение LC₅₀.

2.8. Обсуждение и интерпретация результатов:

- особое внимание необходимо уделить описанию методов, используемых в целях удовлетворения требованиям Руководства по проведению испытаний, например, к предельно допустимой концентрации или размерам частиц;

- пригодность частиц для вдыхания, принимая во внимание общие данные, должна быть адресной, особенно если требования к размерам частиц не соблюдены;

- если на основании критериев по определению гуманной конечной точки была необходимость в гуманном умерщвлении животного, испытывающего боль или проявляющего признаки страдания, нужно привести объяснения;

- последовательность методов, используемых для определения номинальной и фактической концентрации, а также зависимость фактической концентрации от номинальной должна быть включена в общую оценку исследования;

- вероятная причина смерти и доминирующий образ действий (оказывающий общее или локальное влияние на организм) должны быть адресными.

**Процедура испытания для концентраций газов
(частей на миллион (ppm)/4 ч)**

Общие указания

Процедура проведения испытания для каждой начальной концентрации газов приведена в соответствующей схеме (приложения 4–7).

Приложение 1a: начальная концентрация 100 ppm

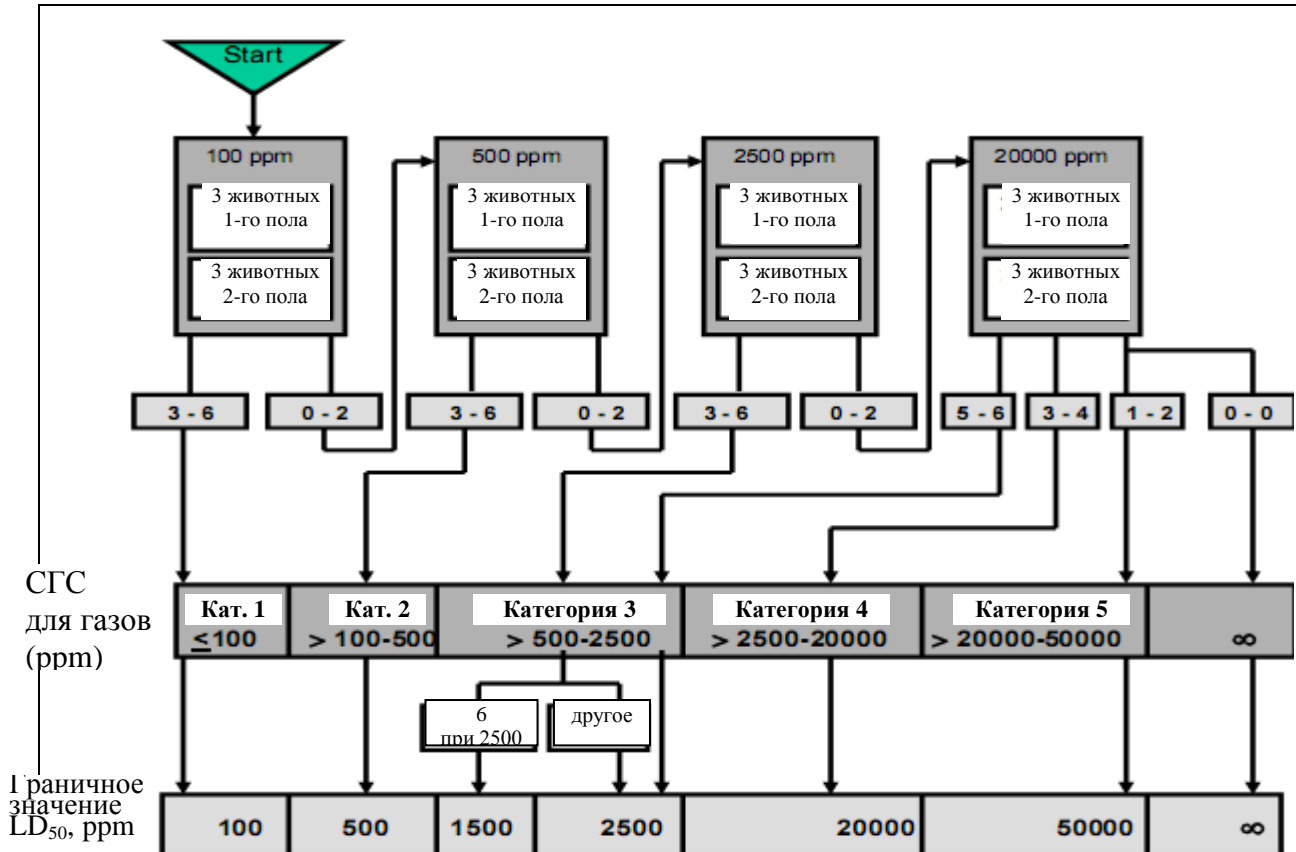
Приложение 1b: начальная концентрация 500 ppm

Приложение 1c: начальная концентрация 2500 ppm

Приложение 1d: начальная концентрация 20000 ppm

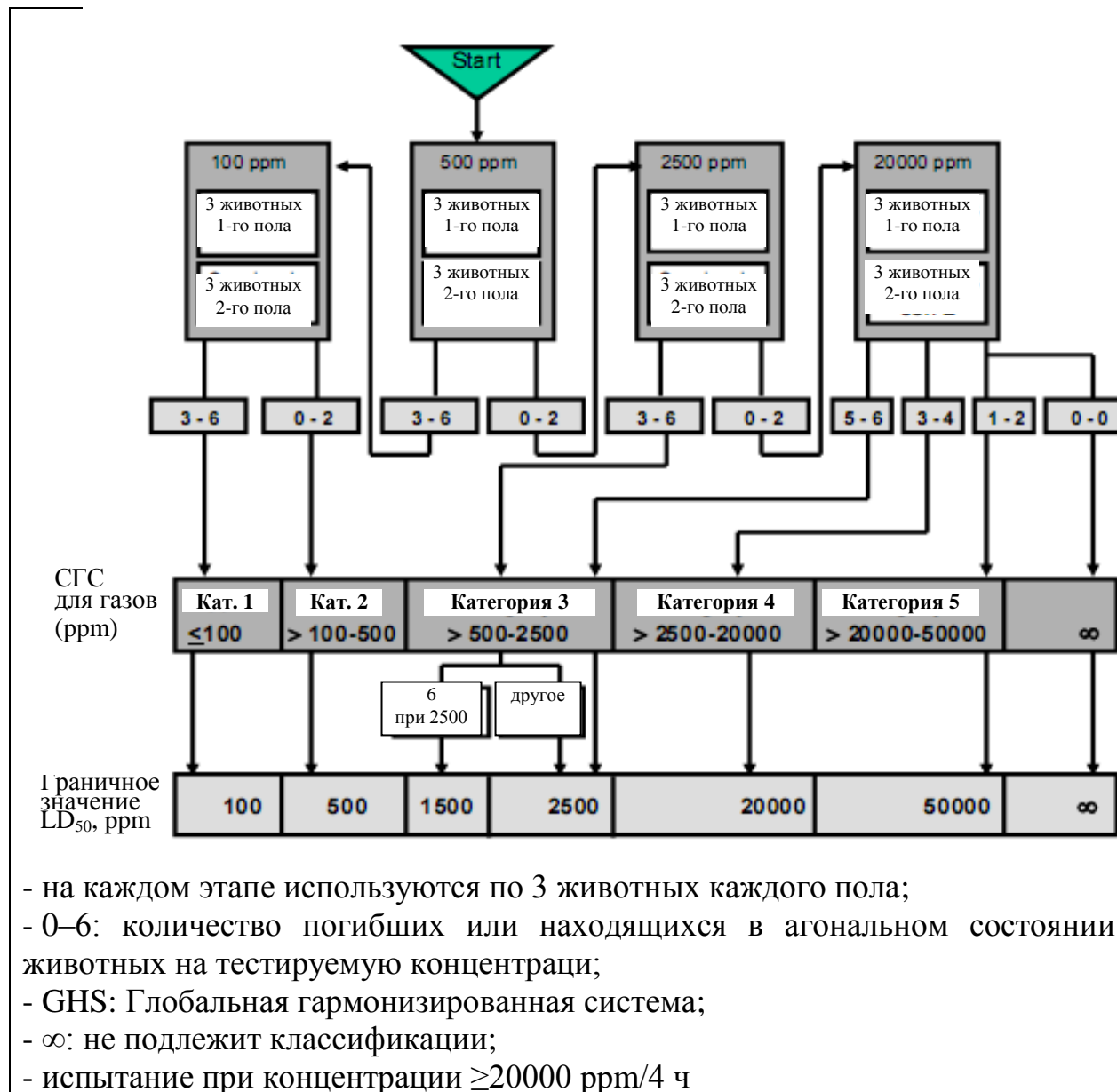
В зависимости от количества гуманно умерщвленных или погибших животных испытание проводится в порядке, указанном стрелками

Острая ингаляционная токсичность.
Процедура испытания с начальной концентрацией газов 100 ppm/4 ч

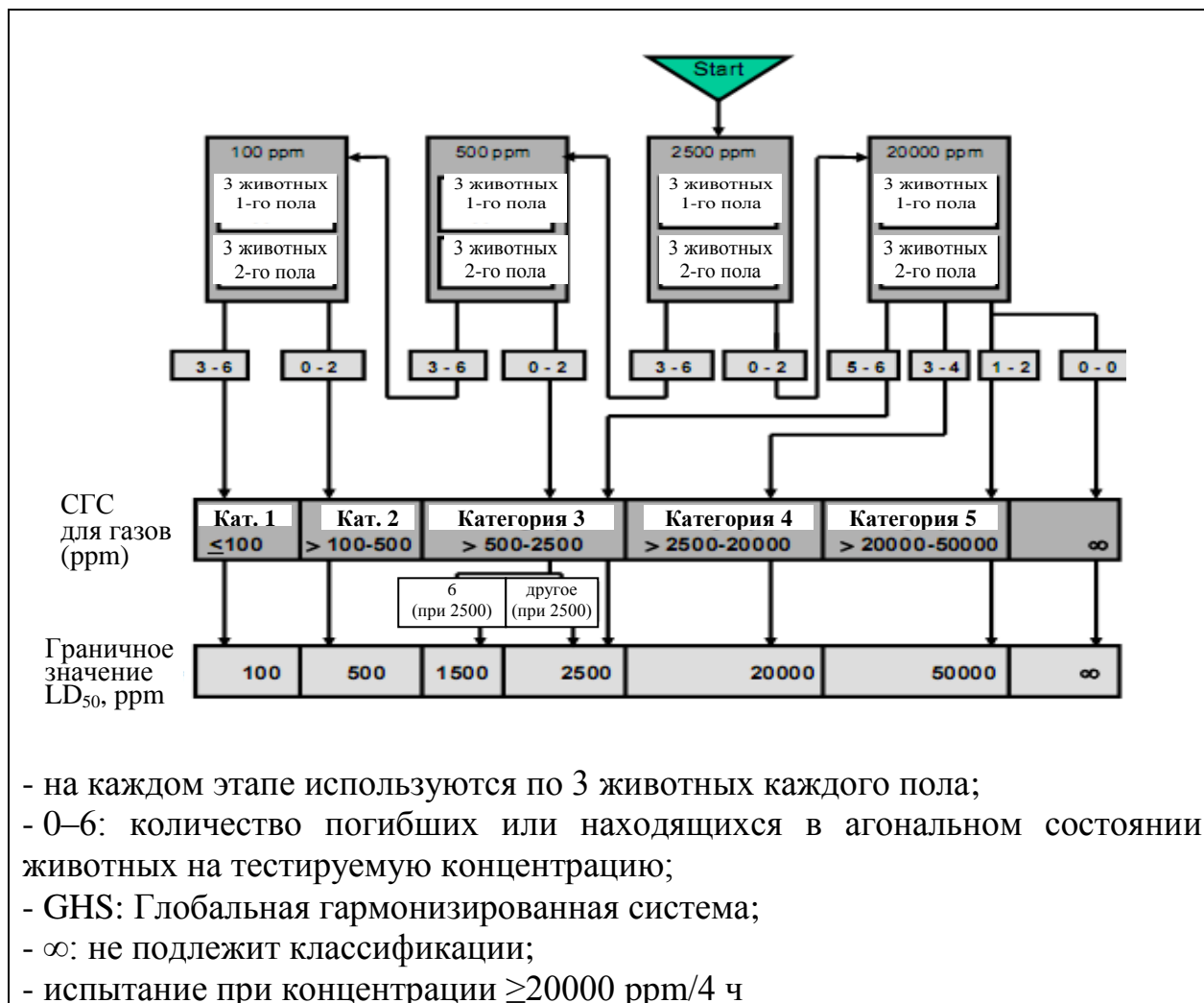


- 0–6: количество погибших или находящихся в агональном состоянии животных на тестируемую концентрацию;
- GHS: Глобальная гармонизированная система;
- ∞: не подлежит классификации;
- испытание при концентрации ≥20000 ppm/4 ч

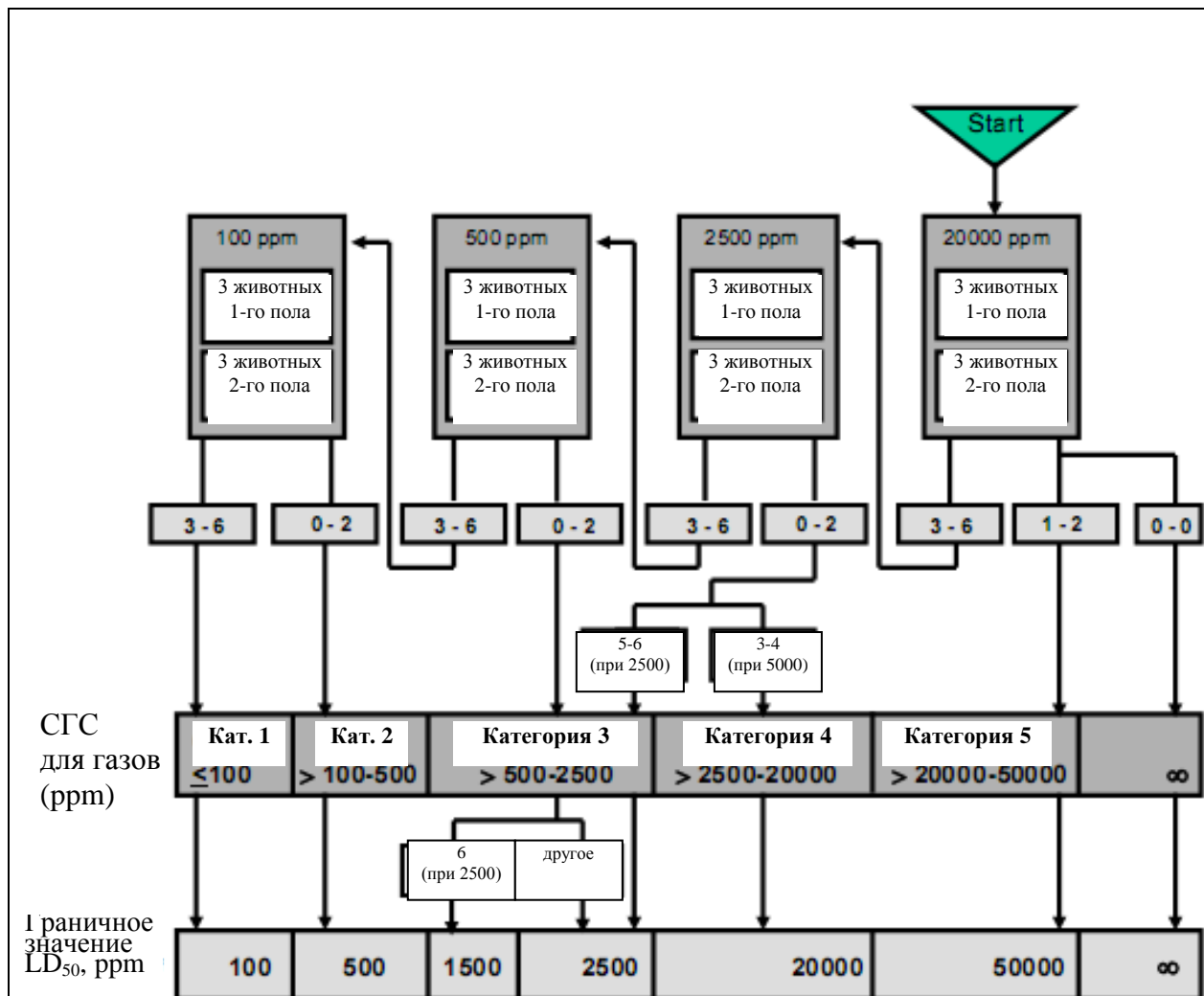
Острая ингаляционная токсичность.
Процедура испытания с начальной концентрацией газов 500 ppm/4 ч



Острая ингаляционная токсичность.
Процедура испытания с начальной концентрацией газов 2500 ppm/4 ч



Острая ингаляционная токсичность.
Процедура испытания с начальной концентрацией газов 20000 ppm/4 ч



- на каждом этапе используются по 3 животных каждого пола;
- 0–6: количество погибших или находящихся в агональном состоянии животных на тестируемую концентрацию;
- GHS: Глобальная гармонизированная система;
- ∞: не подлежит классификации;
- испытание при концентрации ≥20000 ppm/4 ч

**Процедура испытания для концентраций паров
(мг/л/4 ч)**

Общие указания

Процедура проведения испытания для каждой начальной концентрации паров приведена в соответствующей схеме (приложения 7–10)

Приложение 2a: начальная концентрация 0,5 мг/л

Приложение 2b: начальная концентрация 2,0 мг/л

Приложение 2c: начальная концентрация 10 мг/л

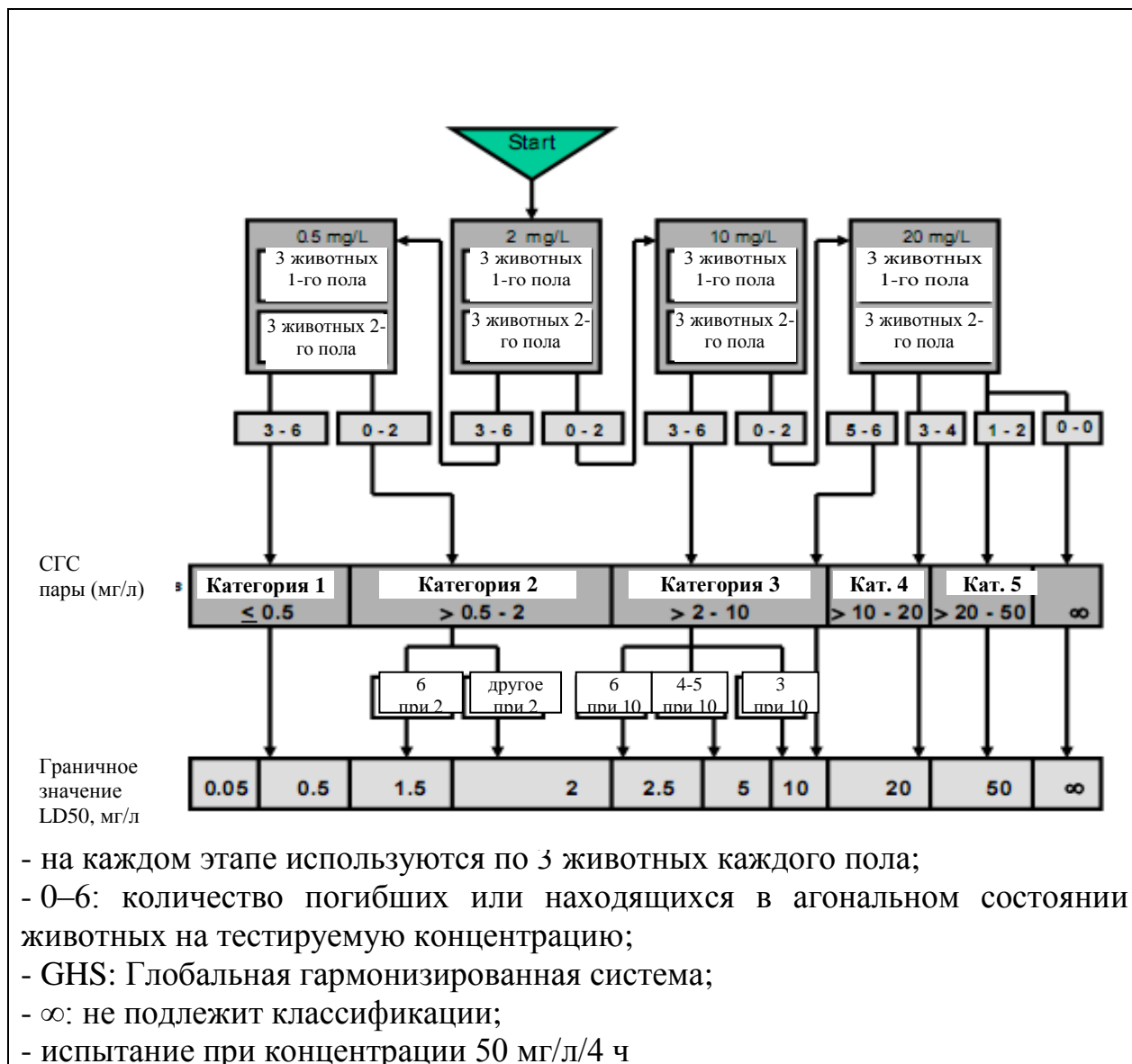
Приложение 2d: начальная концентрация 20 мг/л

В зависимости от количества гуманно умерщвленных или погибших животных испытание проводится в порядке, указанном стрелками

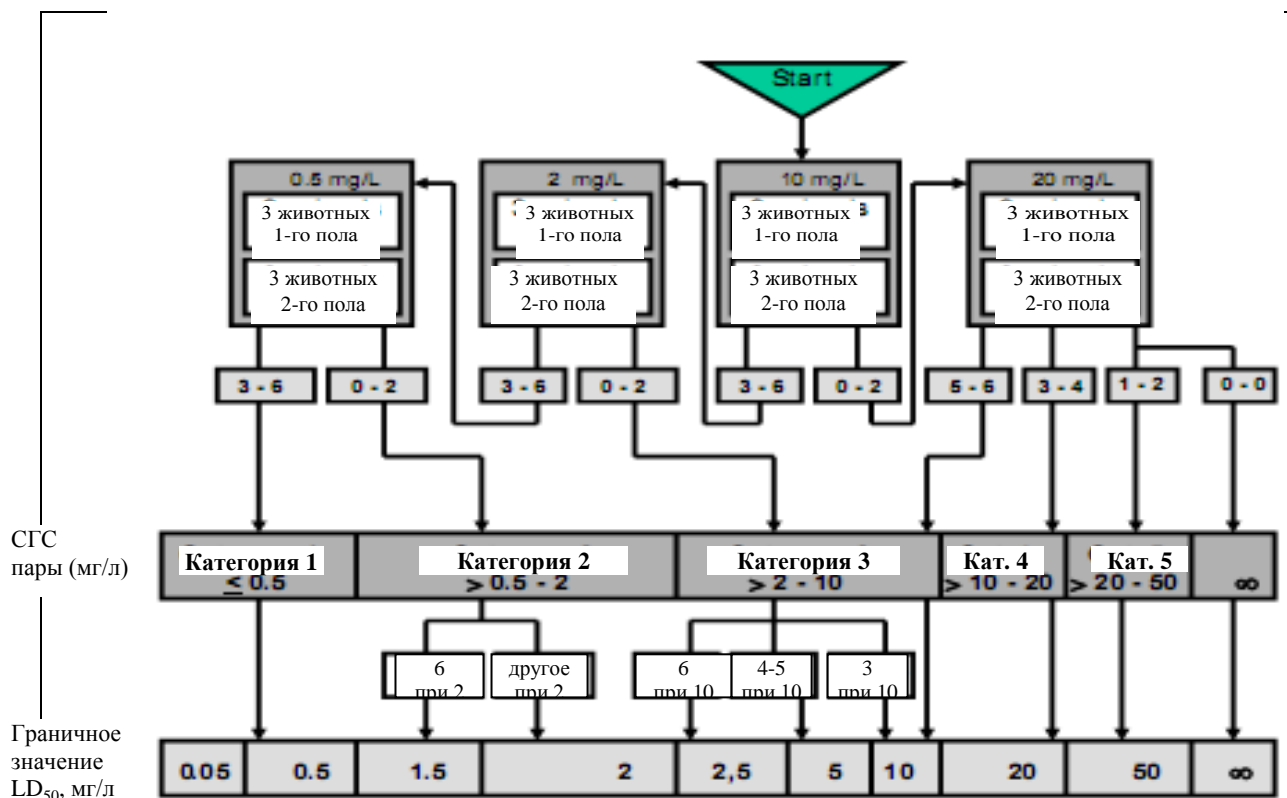
Острая ингаляционная токсичность.
Процедура испытания с начальной концентрацией паров 0,5 мг/л/4 ч



**Острая ингаляционная токсичность.
Процедура испытания с начальной концентрацией паров 2 мг/л/4 ч**

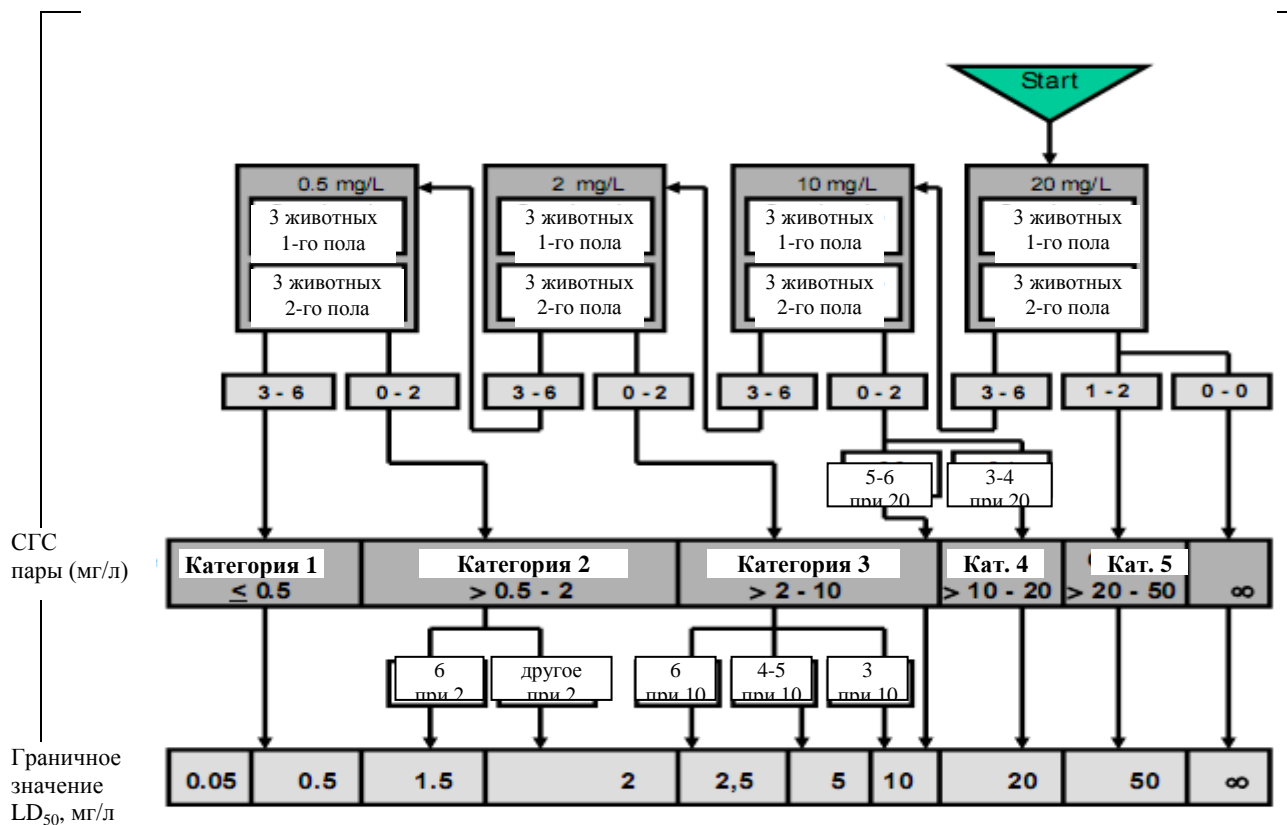


Острая ингаляционная токсичность.
Процедура испытания с начальной концентрацией паров 10 мг/л/4 ч



- на каждом этапе используются по 3 животных каждого пола;
- 0–6: количество погибших или находящихся в агональном состоянии животных на тестируемую концентрацию;
- GHS: Глобальная гармонизированная система;
- ∞: не подлежит классификации;
- испытание при концентрации 50 мг/л/4 ч

**Острая ингаляционная токсичность.
Процедура испытания с начальной концентрацией паров 20 мг/л/4**



- на каждом этапе используются по 3 животных каждого пола;
- 0–6: количество погибших или находящихся в агональном состоянии животных на тестируемую концентрацию;
- GHS: Глобальная гармонизированная система;
- ∞: не подлежит классификации;
- испытание при концентрации 50 мг/л/4 ч

**Процедура испытания для концентраций пыли и аэрозоли
(мг/л/4 ч)**

Общие указания

Процедура проведения испытания для каждой начальной концентрации пыли и аэрозоли приведена в соответствующей схеме (приложения 12–15).

Приложение 3a: начальная концентрация 0,05 мг/л

Приложение 3b: начальная концентрация 0,5 мг/л

Приложение 3c: начальная концентрация 1 мг/л

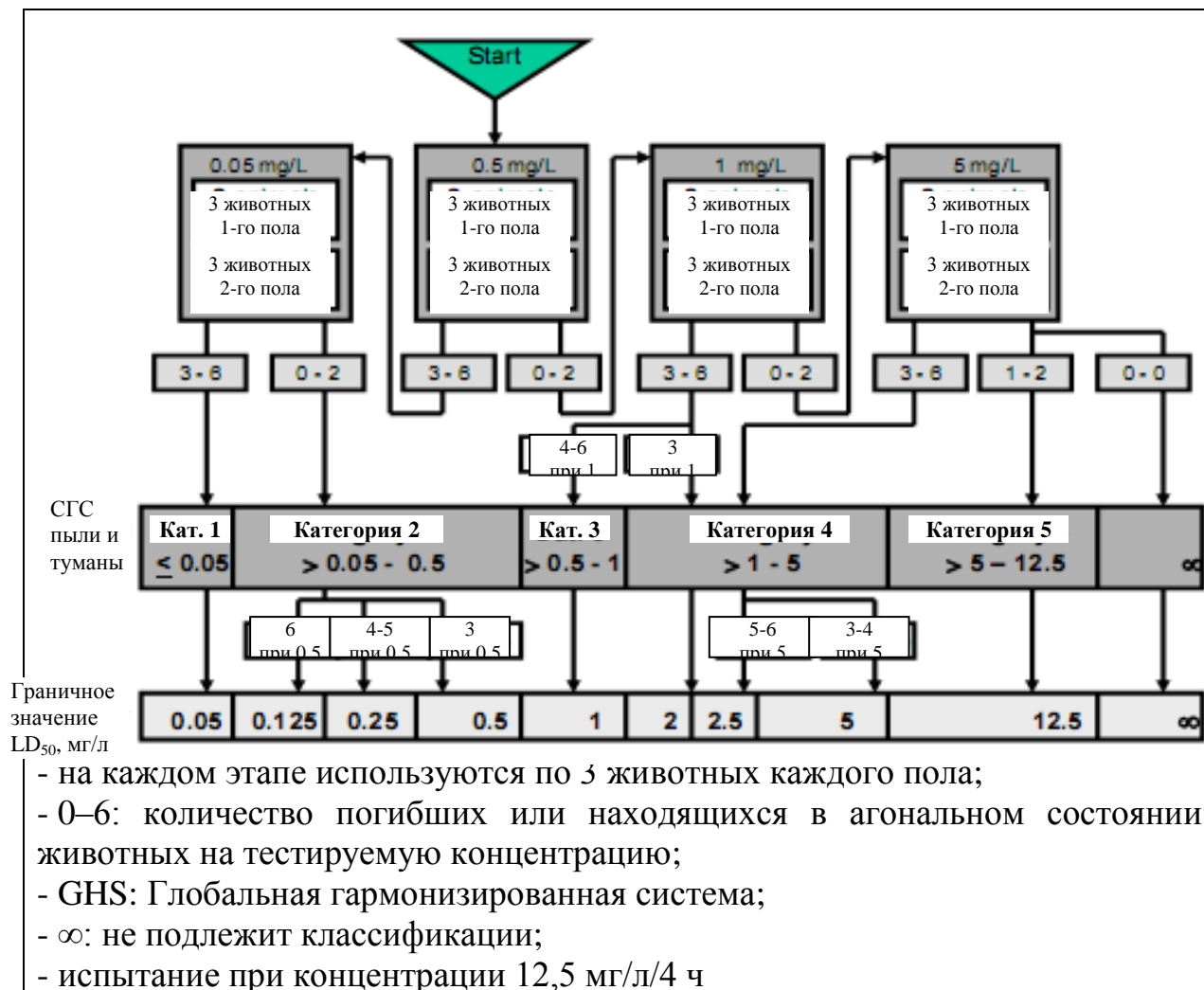
Приложение 3d: начальная концентрация 5 мг/л

В зависимости от количества гуманно умерщвленных или погибших животных испытание проводится в порядке, указанном стрелками

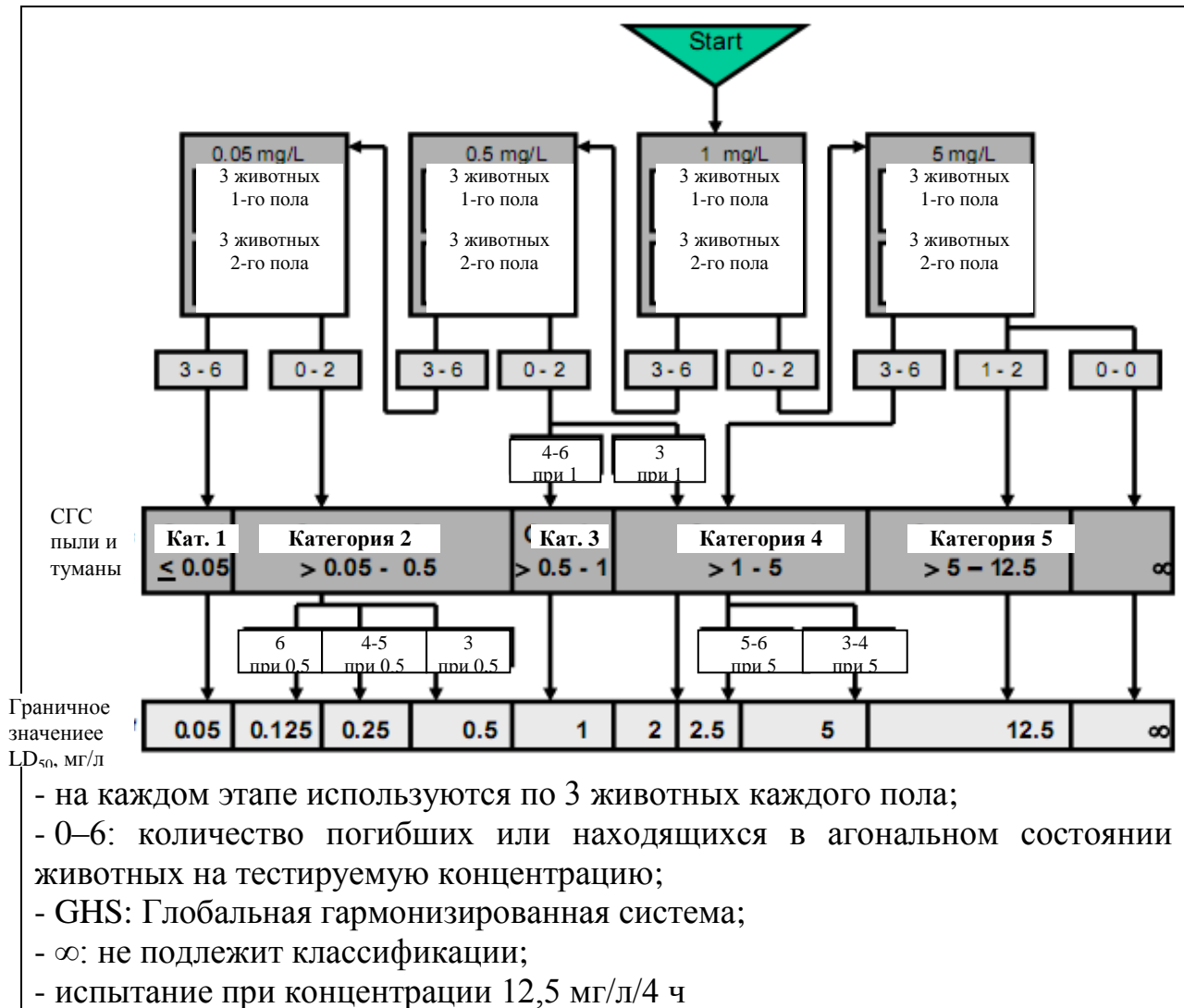
**Острая ингаляционная токсичность.
Процедура испытания с начальной концентрацией
пыли и аэрозолей 0,05 мг/л/4 ч**



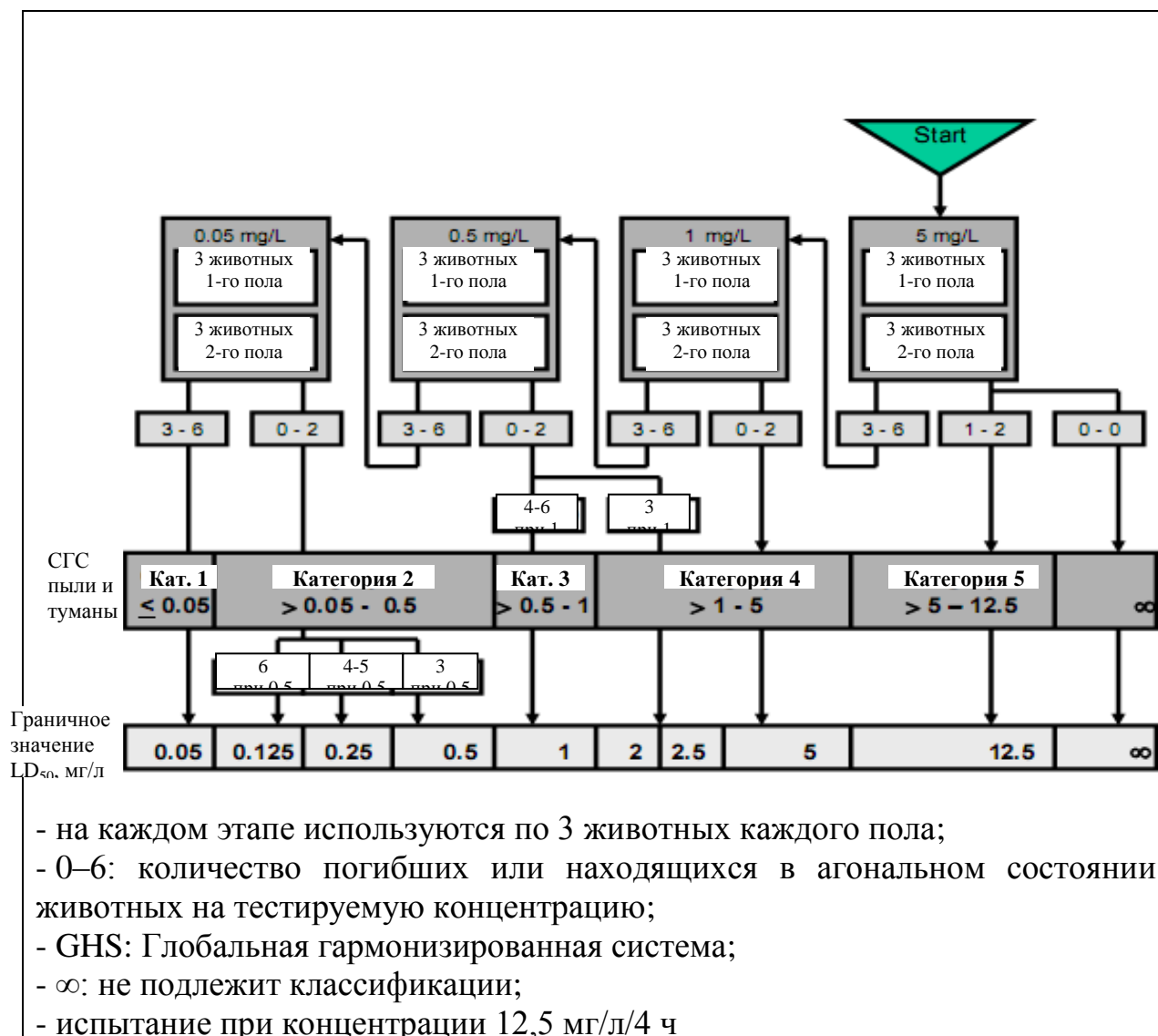
**Острая ингаляционная токсичность.
Процедура испытания с начальной концентрацией
пыли и аэрозолей 0,5 мг/л/4 ч**



**Острая ингаляционная токсичность.
Процедура испытания с начальной концентрацией
пыли и аэрозолей 1 мг/л/4 ч**



**Острая ингаляционная токсичность.
Процедура испытания с начальной концентрацией
пыли и аэрозолей 5 мг/л/4 ч**



Пример поэтапной процедуры

<p>Экспозиционная сессия I — Тест с предельной концентрацией</p> <ul style="list-style-type: none">• 1 животное/пол на концентрацию/момент времени; всего 10 животных• Целевая концентрация = Тест на предельную концентрацию• Воздействие на пять групп животных целевой концентрацией на протяжении 15; 30; 60; 120 или 240 мин
<p>Экспозиционная сессия II — Основное исследование</p> <ul style="list-style-type: none">• 1 животное/пол на концентрацию/момент времени; всего 10 животных• Воздействие на пять групп животных более низкой концентрацией (1/2 предельной концентрации) с чуть большей продолжительностью (множитель $\sqrt{2}$ разнесения)
<p>Экспозиционная сессия III – Основное исследование</p> <ul style="list-style-type: none">• 1 животное/пол на концентрацию/момент времени; всего 10 животных• воздействие на пять групп животных более низкой концентрацией (1/4 предельной концентрации) с чуть большей продолжительностью (множитель $\sqrt{2}$ разнесения)
<p>Экспозиционная сессия IV – Основное исследование</p> <ul style="list-style-type: none">• 1 животное/пол на концентрацию/момент времени; всего 10 животных• воздействие на пять групп животных более низкой концентрацией (1/8 предельной концентрации) с чуть большей продолжительностью (множитель $\sqrt{2}$ разнесения) или
<p>Экспозиционная сессия IV – Основное исследование</p> <ul style="list-style-type: none">• 1 животное/пол на концентрацию/момент времени; всего 10 животных• воздействие на пять групп животных более высокой концентрацией (2 предельной концентрации) с чуть меньшей продолжительностью (множитель $\sqrt{2}$ разнесения)
<p>В случае недостаточных совпадений можно осуществить дополнительную экспозицию (экспозиционная сессия V). Результаты первых четырех экспозиций должны быть изучены для выявления недостающих данных в зависимости «концентрация-время». Концентрация и продолжительность экспозиции в экспозиционной сессии V должны быть выбраны с учетом того, чтобы покрыть недостающие промежутки в данных</p>
<p>Все экспозиционные сессии (включая первую или тест с предельной концентрацией) будут использованы для расчета соотношения «концентрация-время-отклик» методом статистического анализа. По возможности для каждого интервала $C \times t$ нужно использовать средневзвешенную по времени концентрацию и продолжительность воздействия до момента смерти (если смерть наступила во время воздействия)</p>
<p><i>Примечание:</i></p> <p>1. При отсутствии информации о гендерной восприимчивости следует</p>

использовать крыс обоих полов (по 1 животному/пол на концентрацию). Последующие испытания каждого уровня концентрации проводят на 10 животных наиболее чувствительного пола (или по 2 животных обоих полов на концентрацию/момент времени); при этом наличие половой чувствительности устанавливают заранее во время экспозиционной сессии

В некоторых случаях может быть принято решение использовать по 2 крысы обоих полов на концентрацию/момент времени (или 4 животных восприимчивого пола на концентрацию/момент времени)

2. Согласно классификационной схеме СГС предельная (максимально разрешенная) концентрация для газов, паров и аэрозолей составляет 20 000 промилле, 20 и 5 мг/л соответственно. В случае предполагаемой токсичности в качестве начальной необходимо выбрать более низкую концентрацию. В нормативных и научных интересах допустимо использование более высокой концентрации

3. Воздействие на животных следующим уровнем испытываемой концентрации следует начинать после получения обоснованной уверенности в том, что на предыдущей концентрации животные выжили, при этом появляется возможность скорректировать целевую концентрацию и продолжительность воздействия для следующих экспозиционных сессий

4. Для определения последующего соотношения концентрации и продолжительности воздействия следует руководствоваться минимальной дозой (время×концентрация), приведшей к летальности во время теста с предельной концентрацией (первая экспозиция)

Затем концентрацию уменьшают вдвое (до 1/2 предельной концентрации) и изменяют время экспозиции, используя геометрическое деление периода воздействия на коэффициент 1,4 ($\sqrt{2}$) того промежутка времени первой экспозиции, когда наблюдался уровень минимальной летальной концентрации (время x концентрация).

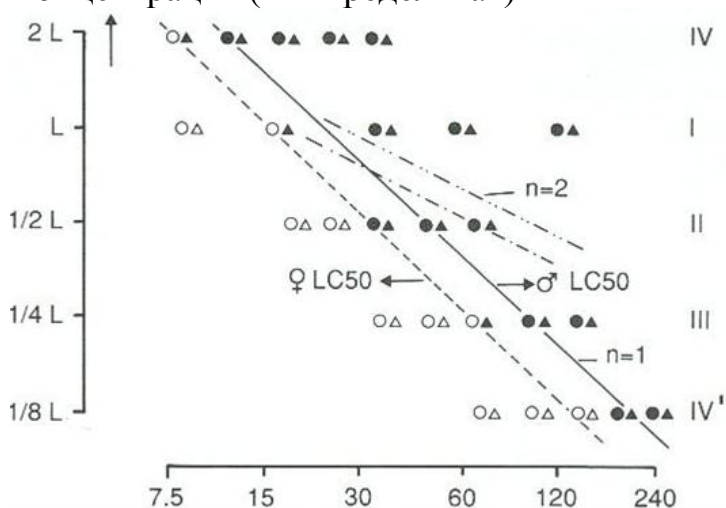
В данном примере летальность во время Экспозиционной сессии была обнаружена на 15 мин; продолжительность во время сессии II по этой причине была ориентирована на 30 мин и составила 15; 21; 30; 42 и 60 мин.

После первых двух экспозиций рекомендуется схематично отображать полученные данные указанным выше образом и проверить, может ли соотношение концентрации и времени иметь угол 45° ($n=1$) или соотношение концентрация-время-отклик меньше (например, $n=2$) либо больше (например, $n = 0,8$).

В последующих случаях рекомендуется адаптировать соотношение концентрации и времени воздействия

5. В определенных случаях может возникнуть необходимость увеличить концентрацию (до 2-х предельных) и изменить временной диапазон, используя геометрическое деление периода воздействия на коэффициент 1,4 ($\sqrt{2}$) того промежутка времени, когда во время первой экспозиции наблюдался уровень минимальной летальной концентрации. Минимальная продолжительность воздействия должна превышать 5 мин; максимальная продолжительность не может превышать 8 ч

Возможная иллюстрация отношения концентрация-время-смертность у крыс
 Концентрация (L = предельная)



Время воздействия (мин)

Примечания:

Незакрашенный символ — выжившие животные; закрашенный символ — павшие животные

Треугольники — самки; окружности — самцы

Жирные линии — величины CL_{50}/LC_{50} (диапазон-7,5–240 мин) для самцов при $n = 1$

Штриховые линии — величины CL_{50}/LC_{50} (диапазон-7,5–240 мин) для самок при $n=1$

Пунктирные линии — линия гипотетических величин CL_{50}/LC_{50} для самцов и самок, если $n = 2$

Математическая обработка результатов для Протокола $C \times t$

Процедура $C \times t$ с 4 или 5-ю концентрациями воздействия и 5-ю длительностями выдает 20 или 25 информационных точек соответственно. С этими информационными точками отношение $C \times t$ может быть вычислено с применением статистического анализа:

$$\text{(единица вероятности) Probit (P)} = b_0 + b_1 \ln C + b_2 \ln t \quad \text{Уравнение 1}$$

где C = концентрация;

t = длительность воздействия, или

$$\text{(Реакция) Response} = f(C^n t) \quad \text{Уравнение 2}$$

где $n = b_1 / b_2$.

Применяя уравнение 1, величину CL_{50}/LC_{50} можно рассчитать для заданного периода времени (например, 4 ч, 1 ч, 30 мин или для любого временного периода в диапазоне испытываемых временных периодов), используя $P = 5$ (50% ответных реакций).

Следует отметить, что правило Хабера применимо только при $n = 1$. Величина CL_{01}/LC_{01} может быть рассчитана, используя $P = 2,67$.