

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

«УТВЕРЖДАЮ»

Заместитель Министра
здравоохранения – Главный
государственный санитарный
врач Республики Беларусь



Н.П. Жукова

« 30 » *Жукова* 2016 г.

Регистрационный № 050-1215

ОПРЕДЕЛЕНИЕ РЕПРОДУКТИВНОЙ ТОКСИЧНОСТИ
ХИМИЧЕСКОЙ ПРОДУКЦИИ (ХИМИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ
И ИХ СМЕСЕЙ) НА ДВУХ ПОКОЛЕНИЯХ

инструкция по применению

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

АВТОРЫ: к.м.н. Юркевич Е.С., к.м.н. Ильскова 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 № 050-1215

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ РЕПРОДУКТИВНОЙ ТОКСИЧНОСТИ
ХИМИЧЕСКОЙ ПРОДУКЦИИ (ХИМИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ
И ИХ СМЕСЕЙ) НА ДВУХ ПОКОЛЕНИЯХ**

инструкция по применению

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

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

Минск 2015

ГЛАВА 1 ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

1. В настоящей инструкции по применению (далее — инструкция) изложен гармонизированный с международными требованиями (OECD TG № 416 «Two-Generation Reproduction Toxicity Study» / ОЭСР Руководство 416 «Исследование репродуктивной токсичности на двух поколениях») метод исследований по изучению репродуктивной токсичности на двух поколениях лабораторных животных, применяемый в комплексе медицинских услуг, направленных на медицинскую профилактику неблагоприятного действия потенциально опасной для человека продукции: чистые химические вещества, их растворы и смеси химических веществ, в т. ч. пестициды, доклинические формы лекарственных средств медицинского и ветеринарного применения, пищевые и кормовые добавки. Инструкция не распространяется на проведение испытаний по изучению токсичности готовой парфюмерно-косметической продукции.

2. Настоящая инструкция устанавливает подходы, схемы и методы испытаний, предназначенные для оценки репродуктивной токсичности, обеспечивает получение предварительной информации о токсических эффектах испытуемого вещества на эмбриональное развитие, таких как неонатальные заболевания, смертность, поведение и тератогенез, 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, проводящих государственный санитарный надзор, иных учреждений, осуществляющих 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:

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

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

ГЛАВА 3 ОБЩИЕ УСЛОВИЯ ПРОВЕДЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЙ

1. Метод по изучению влияния токсичности химических веществ на репродуктивную функцию лабораторных животных на двух поколениях обеспечивает получение информации о воздействии испытуемого вещества на целостность и состояние мужской и женской репродуктивных систем: функцию гонад, эстральный цикл, поведение во время спаривания, зачатие, беременность, роды, лактацию и отлучение от материнского питания, а также рост и развитие потомства.

2. Метод позволяет дать предварительную оценку токсического действия исследуемых веществ на эмбриональное и постэмбриональное развитие, а также на такие показатели, как неонатальные заболевания, смертность, поведение и тератогенез, и может служить руководством для последующих исследований.

3. До проведения 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 и предполагаемые пути использования вещества. Полученная информация служит подтверждением актуальности проводимых испытаний и обоснованности выбора начальной дозы.

4. Исследуемое вещество вводят с пищей, питьевой водой или через желудочный зонд в установленных дозах нескольким группам самцов и самок. Допустимы иные пути введения вещества (транскутанно, ингаляционно), но пероральный путь является предпочтительным.

5. Для выявления любого неблагоприятного воздействия на сперматогенез самцам испытуемую дозу вводят на протяжении основного периода жизни животного и, как минимум, одного полного сперматогенного цикла (около 56 дней у мышей и 70 дней у крыс).

6. С целью выявления любых неблагоприятных воздействий исследуемого вещества на эстральный цикл самкам материнского поколения (Р) испытуемую дозу вводят в период роста и в течение нескольких полных эстральных циклов.

7. Чтобы выявить неблагоприятные воздействия исследуемого вещества на поведение во время спаривания, зачатия, беременности, родов и лактации испытуемую субстанцию вводят животным обоего пола на протяжении периода спаривания, а затем только самкам в течение периода беременности и кормления.

8. Чтобы установить любые неблагоприятные эффекты исследуемого вещества на рост и развитие потомства, а также неонатальные заболевания, смертность, поведение и тератогенез после отлучения от материнского питания, вещество продолжают вводить потомству (F1) во время его роста, во взрослом

возрасте, при спаривании и рождении (F2) поколения вплоть до отлучения от материнского питания.

9. Выявление признаков токсического действия исследуемого вещества на целостность и функциональное состояние мужской и женской репродуктивной систем, а также рост и развитие потомства согласно процедуре исследований проводят у всех животных.

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

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

- весы лабораторные общего назначения 2-го класса точности (по ГОСТ 24104) с пределом взвешивания 200 г; весы аналитические электронные с пределом допускаемой погрешности $\pm 0,0001$ г; стерилизатор сухожаровой с автоматической регулировкой температуры (100–220)°С (по ГОСТ 24437); анализатор потенциометрический с погрешностью измерений $\text{pH} \pm 0,1$ (рН-метр) с набором электродов (по ГОСТ 19881); холодильник бытовой (по ГОСТ 16317); морозильная камера; баня водяная с терморегулятором, позволяющая поддерживать температуру $(55 \pm 0,5)^\circ\text{C}$ (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 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.

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

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

13. Условия проведения.

13.1. Подопытные животные.

Крысы являются предпочтительным видом для тестирования. Использование других видов животных должно быть обосновано с внесением соответствующих изменений.

Не допускается применять линии с низкой плодовитостью или известным высоким уровнем заболеваемости, или наличием пороков развития. В начале исследования изменение массы животных должно быть минимальным и не превышать 20% от среднего веса особей обоего пола.

В исследованиях должны быть использованы здоровые молодые животные. Каждая экспериментальная и контрольная группы должны содержать не менее 20 самцов и 20 самок, чтобы получить не менее 20 беременных самок, близких к родам или рожающих.

Примечание. При исследовании веществ, введение которых вызывает нежелательные эффекты (бесплодие, чрезмерную токсичность при высоких дозах и др.), достичь желаемого числа беременных животных (20) не всегда возможно, но это не делает исследование недействительным, и каждый конкретный случай следует оценивать индивидуально.

Целью является воспроизводство достаточного количества беременных самок и потомства для возможности значимой оценки потенциала вещества в отношении влияния на фертильность, беременность, материнское поведение животных поколения P, а также рост и развитие потомства линии (F1) в период от зачатия до зрелости и развитие их потомства (F2) до отнятия от материнского питания.

13.2. Температурный режим в лабораторной комнате — 22 (± 3)°C, относительная влажность — 30–70% (оптимально 50–60%), за исключением времени уборки помещения, освещение — искусственное (последовательно 12 ч — день, 12 ч — ночь).

13.3. 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.

13.4. Подготовка животных.

13.4.1. В эксперименте используют животных в возрасте от 5 до 9 недель, ранее не подвергавшихся экспериментальным процедурам. Карантинная подготовка составляет не менее пяти дней до начала исследования и включает содержание в лабораторных клетках индивидуально или небольшими группами одного пола, соответствующие микроклиматические условия и специальную диету.

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).

13.4.2. Каждому животному присваивают идентификационный номер:

- для поколения P — до начала введения исследуемого вещества;

- для поколения F1 (выбранные для спаривания животные) — при отлучении их от материнского питания.

13.5. Записи, указывающие происхождение (помет), сохраняют для всех выбранных животных потомства F1.

14. Наблюдение за общим состоянием животных проводят ежедневно с учетом ожидаемого пикового периода эффекта после приема препарата и в случае дозирования зондом.

Поведенческие изменения, признаки трудных или длительных родов, а также все признаки токсичности регистрируют.

Осмотр животных для выявления заболеваемости и смертности проводят один раз в день, включая выходные; взвешивание животных — два раза в день; еженедельно проводят дополнительный тщательный осмотр каждого животного.

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

ГЛАВА 4 ОПИСАНИЕ МЕТОДА

1. Уровень вводимых доз.

1.1. В эксперименте используют как минимум три уровня доз тестируемого вещества, распределенных по диапазону токсических воздействий.

Как правило, двух- или четырехкратные интервалы являются оптимальными для установления убывающих дозовых уровней, а добавление четвертой опытной группы животных в некоторых случаях предпочтительнее использования больших интервалов (например, более чем 10-кратных) между дозами.

1.2. Уровни исследуемых доз и режим дозирования выбирают с учетом данных о токсичности, результатах повторных исследований доз, доступной информации о метаболизме и кинетике тестируемого соединения или связанных с ним материалов.

Примечание. В тестах при введении вещества с пищей интервал доз не должен превышать 3.

Максимальный уровень дозы при отсутствии ограничений по физико-химическим свойствам или биологическим воздействиям, должен вызывать

у родителей-животных (Р) токсические эффекты, а не гибель или сильные страдания.

Примечание. В случае непредвиденной гибели животных в родительской (Р) группе при коэффициенте смертности на уровне или менее 10%, испытание считается приемлемым.

1.3. Последовательность снижения дозовых уровней выбирают с перспективой обнаружения любых дозозависимых реакций и установления уровня, при котором не наблюдаются неблагоприятные эффекты вещества (NOAEL). При необходимости исследуемое вещество растворяют / суспендируют в соответствующем растворителе с известными токсическими характеристиками; кроме того, учитывают влияние растворителя на всасывание, распределение, метаболизм, стабильность и химические свойства исследуемого вещества, которые могут изменить его токсичность и воздействовать на свойства пищи, потребление воды или питательный статус животных.

Контрольная группа получает растворитель в максимальном объеме.

Примечание. В порядке приоритетных используют водные растворы / суспензии, затем — растворы / суспензии в масле (например, в кукурузном) и только потом — возможное растворение в других растворителях.

При введении испытуемого вещества с пищей, вызывающего уменьшение потребления рациона питания или его утилизацию, необходимо использовать спаренные контрольные группы, при этом результаты исследований по контролю, направленные на оценку влияния снижения потребления пищи на репродуктивные параметры, сравнивают со спаренной контрольной группой.

2. Испытание предельной (наивысшей) дозы.

2.1. Если пероральное введение с пищей или водой тестируемого вещества с низкой токсичностью (не менее 1000 мг/кг массы тела/сут) не вызывает токсических эффектов в деятельности репродуктивной системы, то дальнейшие исследования с данным уровнем дозы считаются необязательными.

2.2. При пероральном способе введения исследуемого вещества тест с максимальной концентрацией применяют исключительно в случаях, когда предполагается воздействие высоких уровней доз на человека. Для других способов введения (ингаляционный или кожный) изучение максимальной концентрации является необходимым, с обязательным учетом физико-химических свойств исследуемого вещества (растворимость и др.).

3. Процедура введения.

3.1. Исследуемое вещество вводят животным 7 дней в неделю.

3.2. В течение всего периода эксперимента способ введения исследуемого вещества для животных экспериментальных и контрольной групп является идентичным. Объем вводимого вещества должен быть минимальным и постоянным для всех уровней доз, концентрацию регулируют путем разведений.

При введении исследуемого вещества с помощью желудочного зонда объем жидкости не должен превышать 1 мл/100 г массы тела (0,4 мл на 100 г

массы тела — для кукурузного масла), для водных растворов — 2 мл на 100 г массы тела. Исключение составляют раздражающие или коррозионно-активные вещества, которые усугубляют эффект при увеличении концентрации.

Примечание. При зондовом варианте введения детеныши, как правило, получают исследуемое вещество только косвенно, через молоко; прямое дозирование начинается для них при отлучении от материнского питания. При введении тестируемого вещества через пищу или питьевую воду детеныши будут дополнительно получать вещество напрямую в течение последней недели периода лактации, когда начинают самостоятельно есть.

3.3. При введении через пищу или питьевую воду следует исключить влияние исследуемого вещества на нормальное питание или водный баланс экспериментальных животных.

3.4. При введении исследуемого вещества через пищу, возможно, либо постоянное его введение в рацион в определенной концентрации (промилле), либо как альтернативу использовать постоянное соотношение дозы и веса тела животного, при этом должен быть указан метод расчета.

3.5. Введение тестируемого вещества через желудочный зонд проводят ежедневно в одно и то же время; корректируют вводимую дозу, как минимум, один раз в неделю, чтобы поддерживать постоянный уровень соотношения дозы и массы тела животного. При наличии информации о плацентарном распределении вещества ее учитывают при расчете дозы в зависимости от веса.

4. Процедура испытания.

4.1. Ежедневное введение тестируемого вещества самцам и самкам родительского поколения (P) начинают в возрасте от 5 до 9 недель.

4.2. Ежедневная дозировка самцам и самкам поколения F1 начинается при отлучении их от материнского питания; следует иметь в виду, что в случаях, когда испытуемое вещество вводится через пищу или питьевую воду, непосредственное его воздействие исследуемого вещества для поколения F1 может произойти уже в период лактации.

4.3. Для обоих поколений (P и F1) введение вещества должно быть продолжено в течение, по крайней мере, не менее 10 недель до начала периода спаривания. Введение вещества животным обоих полов продолжают в течение 2-х недель периода спаривания.

4.4. Самкам поколения P дозировку продолжают в течение всей беременности и до завершения периода кормления потомства F1.

Дозы для каждого животного, как правило, рассчитываются исходя из последних результатов индивидуального взвешивания, особенно при расчете дозы в течение последнего триместра беременности.

4.5. Введение вещества самцам и самкам поколений P и F1 необходимо продолжать до завершения исследования. Все животные поколений P и F1 и взрослые (самцы и самки) должны быть гуманно декапитированы, когда они больше не нужны для исследования репродуктивных эффектов. Животные потомства F1, не отобранные для спаривания, и все животные потомства F2

после отлучения от материнского питания должны быть гуманно декапитированы.

Примечание. Самцы должны быть декапитированы и осмотрены, если они больше не нужны для оценки репродуктивных эффектов.

5. Процедура спаривания должна проводиться в клетках, подходящих для этой цели. После доказательства сокоупления индивидуальное содержание оплодотворенных животных является предпочтительным, но содержание небольшими группами также приемлемо. Животные должны быть отделены друг от друга за один или два дня до родов.

6. Родительское (Р) спаривание.

6.1. В исследованиях на репродуктивную токсичность используется спаривание в соотношении 1:1 (один самец к одной самке) или 1:2 (один самец к двум самкам).

6.2. При спаривании в соотношении 1:1 самку необходимо поместить с одним самцом до наступления беременности на две недели. Каждое утро самок осматривают на наличие спермы или вагинальной пробки. Нулевым днем беременности считается день появления вагинальной пробки или спермы. В случае неудачного спаривания необходимо дополнительное спаривание с самцами или самками, доказавшими свою способность оплодотворять и оплодотворяться. Спаривания братьев и сестер следует избегать.

7. Спаривание поколения F1.

7.1. Для спаривания поколения F1 по крайней мере один самец и одна самка должны быть выбраны из каждого помета для спаривания с другими детенышами того же уровня дозы, но из другого помета для получения поколения F2. Потомство F1 не должно быть повязано, пока они не достигли полной половой зрелости.

7.2. Выбор детенышей из каждого помета должен быть случайным, когда нет значительного различия в массе тела или во внешнем виде между детенышами одного помета. В случае выраженных различий выбираются лучшие представители каждого помета.

Примечание. С практической точки зрения это лучше всего делать на основе массы тела, но выбор может быть более удобным на основе внешнего вида.

7.3. Пары без потомства должны быть исследованы для определения очевидной причины бесплодия. Это может включать в себя такие процедуры, как дополнительные возможности спаривания с другими проверенными самцами или самками, микроскопическое исследование репродуктивных органов и изучение циклов течки или сперматогенеза.

8. Второе спаривание.

8.1. В случаях изменения размера помета или сомнительного эффекта первого спаривания, связанных с введением вещества, рекомендуется взрослых особей поколений Р или F1 заменить на других для получения второго помета на производителей противоположного пола с доказанными функциями.

8.2. Если производство второго помета считается необходимым в любой генерации, животные должны быть заменены примерно через неделю после отлучения от материнского питания последнего помета.

9. Размер помета.

Животным обеспечивается возможность полноценных родов, кормления и воспитания потомства до отлучения от материнского питания. Стандартизация размеров приплода не является обязательной. При необходимости стандартизации метод должен быть подробно описан.

10. Вес тела, потребление продуктов питания и воды.

10.1. Родительские животные (Р и F1) взвешиваются (данные регистрируются) в первый день дозирования и минимум один раз в неделю после этого. Родители–самки (Р и F1) взвешиваются в период беременности, на 0; 7; 14 и 20 или 21-й дни, в период лактации в те же дни, при взвешивании помета и в день забоя животных.

10.2. Во время спаривания и в период беременности потребление продуктов питания определяется еженедельно. Потребление воды также должно быть измерено, как минимум, еженедельно, если исследуемое вещество вводится в воду.

11. Цикл течки.

Длительность цикла течки и нормальность ее протекания оцениваются у Р и F1 самок с помощью влагалищных мазков до спаривания и по возможности во время спаривания, пока доказательства спаривания не обнаруживаются. При получении клеток влагалища и шейки матки необходимо избегать нарушения слизистой оболочки, а затем индукции ложной беременности.

12. Параметры сперматогенеза.

12.1. После окончания исследования регистрируется вес яичек (семенник, testis) и придатков яичек (придатки, семенник, epididymis) всех самцов Р и F1, также необходимо зафиксировать по одному органу каждого вида для дальнейшего гистопатологического исследования.

12.2. У десяти самцов из каждой группы потомств Р и F1 яички и придатки яичек используются для подсчета гомогенизационно-устойчивых сперматид и объема спермы в хвосте придатков яичек.

12.3. Из этой же подгруппы самцов сперма из хвоста придатков яичек или из семявыносящих протоков отбирается для исследования подвижности и морфологии сперматозоидов.

Примечание. Если наблюдаются эффекты, связанные с введением вещества, или когда есть данные других исследований о возможном воздействии на сперматогенез этого вещества, то оценка спермы должна быть проведена у всех самцов в каждой доза-группе, в противном случае расчет может быть ограничен контролем и высокой дозой Р и F1 самцов.

12.4. Объем спермы в хвосте придатков яичек рассчитывается по концентрации и объему сперматозоидов в суспензии, использованной для

полной качественной оценки. Также необходимо оценить количество сперматозоидов, восстановившихся после измельчения и/или гомогенизации оставшейся ткани хвоста придатков яичек. Расчет должен быть выполнен для выбранной подгруппы самцов всех доза-групп немедленно после эвтаназии животных, если не сделаны видео или цифровые записи, или если образцы замораживают для последующего анализа. В этих случаях контрольная группа и группа с высокой дозой анализируются в первую очередь.

Примечание. В случае отсутствия эффектов, связанных с введением вещества (например, влияние на количество сперматозоидов, подвижность или морфологию) другие доза-группы можно не анализировать. В случае, когда отмечены эффекты в высоких доза-группах, то низшие доза-группы также оцениваются.

12.5. Подвижность сперматозоидов в придатке яичка (или семявыносящем протоке) оценивается в соответствии с принятой методикой или с помощью видео немедленно после эвтаназии. Сперма должна быть получена при сведении к минимуму повреждений и разбавлена для анализа подвижности с использованием приемлемых методов. Процент подвижных сперматозоидов определяется либо субъективно, либо объективно. Когда анализ подвижности выполняется компьютеризированно, то результат определения подвижности сперматозоидов зависит от определяемых пользователем пороговых значений для средней скорости и прямолинейности или линейного индекса.

Примечание. Если образцы являются видеозаписями или изображениями, записанными другим способом во время вскрытия, то последующий анализ может быть выполнен только в группах контроля и высоких доз для самцов P и F1; если наблюдаются связанные с введением вещества эффекты, то в этом случае группы с низкими дозами должны быть оценены. В отсутствие видео или цифровых изображений все животные во всех группах дозирования должны быть вскрыты и проанализированы.

12.6. Проводят морфологическую оценку образцов спермы придатка яичка (или семявыносящих протоков) путем приготовления фиксированных, влажных препаратов из спермы, содержащих как минимум, 200 сперматозоидов в образце и классифицируют их как нормальные или аномальные.

Примеры морфологических аномалий спермы могут включать в себя слияние, изолированные и уродливые головы и / или хвосты.

Примечание. Оценка должна быть выполнена в выбранных подгруппах самцов всех доза-групп либо сразу после декапитации животных, либо при наличии видео- или цифровых записей в более позднее время. Фиксированные мазки также можно исследовать в более позднее время. В этих случаях группы контроля и с высокой дозой могут быть проанализированы в первую очередь. Если не выявлены связанные с тестированием эффекты (например, влияние на морфологию сперматозоидов), то другие доза-группы можно не анализировать. При проявлении эффектов в группах, связанных с введением высоких доз, необходимо провести исследования в группах с низкими дозами.

12.7. Если любой из перечисленных выше параметров оценки спермы уже был рассмотрен в рамках системного изучения токсичности в течение как минимум 90 дней, то они не обязательно должны быть повторены в данных исследованиях. Рекомендуется, однако, сохранить образцы или цифровые записи исследования спермы поколения P с тем, чтобы при необходимости провести их оценку.

13. Потомство.

13.1. Каждый помет должен быть осмотрен как можно скорее после родов (лактация, день 0), чтобы установить количество и пол детенышей: число мертворожденных и родившихся живыми с наличием выраженных аномалий.

13.2. Детеныши, найденные мертвыми в день 0, если они не мацерированы, проверяются на предмет возможных дефектов и причин смерти и фиксируются для хранения.

13.3. Живые детеныши взвешиваются индивидуально при рождении (лактация, день 0) или на 1-й день и регулярно после этого, например, в 4; 7; 14 и 21-й дни лактации. Физические или поведенческие аномалии, наблюдаемые у матерей или в потомстве, регистрируются.

13.4. Физическое развитие потомства регистрируется, в основном, как прирост массы тела. Другие физические параметры (например, открытие ушей и глаз, прорезывание зубов, рост шерсти) дают дополнительную информацию и оцениваются с учетом данных о половом созревании (например, возраст и масса тела при вагинальном раскрытии или отделении головки пениса от крайней плоти).

13.5. У потомства F1 до и/или после отлучения от материнского питания рекомендуется проводить функциональные исследования, особенно связанные с половым созреванием (например, двигательная активность, сенсорные функции, рефлекторный онтогенез), если они не включены в отдельные тесты.

13.6. Возраст вагинального раскрытия и препуциального отделения должны быть определены для F1 детенышей, выбранных для спаривания. Анально-генитальные расстояния измеряют в 0-й день после родов у F2 детенышей, если в генерации F1 наблюдаются изменения в соотношении полов или сроках полового созревания.

13.7. Функциональные наблюдения не проводят в группах, в которых выявлены явные признаки отрицательного воздействия (например, значительное снижение веса и т.д.). Если сделаны функциональные исследования, то их не повторяют для детенышей, отобранных для спаривания.

14. Вскрытие животных.

14.1. На момент прекращения испытания (или в случае смерти в течение исследования) все животные с внешними отклонениями или клиническими признаками, а также по крайней мере один случайно выбранный детеныш/пол/помет от обоих F1 и F2 поколений должны быть исследованы макроскопически для выявления структурных аномалий или патологических изменений. Особое внимание уделяется органам репродуктивной системы.

Животные после эвтаназии и мертвые детеныши, если они не мацерированы, исследуются на наличие возможных дефектов и / или установления причины смерти и зафиксированы для дальнейшего хранения.

14.2. Матки всех первородящих самок должны быть исследованы на наличие и количество мест имплантации методом, согласующимся с гистопатологической оценкой.

14.3. На момент окончания испытания взвешиваются тела животных и следующие органы всех Р и F1 родительских животных (парные органы должны быть взвешены по отдельности):

- матка, яичники;
- яички и придатки яичек (весь и хвост);
- предстательная железа;
- семенные пузырьки с коагулирующими железами и их жидкостями (как единое целое);
- мозг, печень, почки, селезенка, гипофиз, щитовидная железа, надпочечники и известные органы-мишени.

Окончательный вес тела определяется для детенышей F1 и F2, которые выбраны для вскрытия, и следующие органы от одного случайно выбранного детеныша / пол / помет: мозг, селезенка и тимус.

14.4. Результаты вскрытия и взвешивания органов должны оцениваться в контексте с наблюдениями, сделанными в других повторных исследованиях доз, когда это возможно.

15. Гистопатологические исследования.

15.1. Гистопатологические исследования родительских животных (Р и F1).

Следующие органы и ткани родительских животных (Р и F1) или репрезентативно выбранные, должны быть зафиксированы и храниться в подходящей среде для гистопатологического исследования:

- влагалище, матка с шейкой матки и яичниками (сохраненные в соответствующем фиксаторе);
- одно яичко (сохраненное в растворе Буэна или подобном фиксаторе), один придаток яичка, семенные пузырьки, простата и coagulating gland (расположенная на передней части семенного пузырька);
- ранее определенные органы-мишени из всех Р и F1 животных, выбранных для спаривания.

15.2. Полное гистопатологическое исследование сохраненных органов и тканей, перечисленных выше, выполняется для высоких доз и контрольных групп животных поколений Р и F1, выбранных для спаривания.

15.3. Органы, в которых наблюдаются связанные с введением вещества изменения, также должны быть исследованы в группах низких и средних доз для получения дополнительных данных для определения NOAEL. Все серьезные поражения, такие как атрофия или опухоли, должны быть проверены.

Примечание. Дополнительно проводятся гистопатологические исследования репродуктивных органов животных в группах низких и средних доз, подозреваемых в снижении фертильности, например, те, которым не удалось спариться, забеременеть, произвести потомство, или родить здоровое потомство, либо для которых цикличность течки, либо количество, подвижность или морфология спермы отличаются от контроля.

15.4. Детальное гистопатологическое исследование яичка (например, с использованием фиксатора Буэна, заливка парафином и поперечная секция толщиной 4–5 мм) проводят для определения сохранности сперматид, отсутствующих слоев или типов зародышевых клеток, наличия гигантских многодетных клеток или отторжения клеток спермы в просвет. Исследование ранее зафиксированных придатков яичек проводится путем продольного сечения и включает в себя оценку головы, тела и хвоста. Придатки яичка оцениваются на лейкоцитарную инфильтрацию, изменение превалирования типов клеток, присутствие aberrантных клеток и фагоцитов в сперме. PAS и окрашивание гематоксилином может быть использованы для изучения мужских половых органов.

15.5. Постлактационный яичник должен содержать первичные растущие фолликулы, а также большое количество желтых тел лактации. В гистопатологических исследованиях определяют качественное уменьшение первичной популяции фолликулов. Количественная оценка первичных фолликулов проводится для самок F1; выборка животных, выбор отдела яичника и его размера должны быть статистически пригодны для используемой процедуры оценки. Исследования включают в себя подсчет числа первичных фолликулов, которые могут быть объединены с малыми растущими фолликулами для сравнения опытных и контрольных яичников.

16. Гистопатологические исследования детенышей.

16.1. Ткани и органы-мишени всех детенышей с внешними серьезными аномалиями или клиническими проявлениями, а также по меньшей мере одного случайно выбранного детеныша / пола / помета поколений F1 и F2, который не был выбран для спаривания, должны быть выделены и сохранены в подходящей среде для гистопатологического исследования. Полная гистопатологическая характеристика сохраненных тканей должна быть проведена с особым вниманием к органам репродуктивной системы.

ГЛАВА 7 ДАННЫЕ

1. Результаты должны быть представлены в табличной форме индивидуально для каждой тестовой группы и для каждого поколения. В них указывается:

- количество животных в начале теста;

- количество умерших животных и подвергшихся эвтаназии во время испытания;
- время любой смерти или эвтаназии;
- количество фертильных животных;
- число беременных самок;
- количество животных с признаками токсичности;
- описание наблюдаемых признаков токсичности, в т. ч. время начала, продолжительность и тяжесть;
- типы гистопатологических изменений;
- соответствующие данные о помете.

Численные результаты обрабатываются соответствующими общепринятыми статистическими методами, которые выбираются как часть описания исследования. Статистическая модель доза-эффект может быть полезна для анализа результатов.

Отчет должен содержать полные сведения о методах анализа и использованной компьютерной программе, так чтобы независимый эксперт / статистик мог повторно восстановить и оценить анализ.

2. Оценка результатов репродуктивной токсичности двух поколений.

2.1. Полученные результаты исследования репродуктивной токсичности двух поколений должны быть оценены с точки зрения наблюдаемых эффектов при вскрытии и микроскопическом исследовании.

2.2. При оценке результатов испытаний проводится выявление зависимости или отсутствие таковой между дозой исследуемого вещества и наличием или отсутствием эффекта и тяжести нарушений, в т. ч. серьезных поражений, выявленных в органах-мишенях, нарушением фертильности, клиническими аномалиями, а также нарушением репродуктивности и производства потомства, изменением массы тела, воздействием на смертность и любые другие токсические проявления.

Проведенное должным образом изучение репродуктивной токсичности должно обеспечить удовлетворительную оценку уровня отсутствия эффекта и понимание неблагоприятного воздействия на воспроизводство, роды, лактацию, постнатальное развитие, включая рост и половое развитие.

Примечание. При оценке результатов репродуктивной токсичности двух поколений принимаются во внимание физико-химические свойства исследуемого вещества и, если это возможно, данные токсикокинетики при их наличии.

ГЛАВА 8 ОТЧЕТ

1. Отчет испытаний должен включать следующую информацию.

1.1. Данные об изучаемом веществе:

- физическая природа и в случае необходимости физико-химические свойства;

- химическая идентификация;
- чистота (примеси) испытуемого вещества.

1.2. Характеристики растворимости (в случае необходимости):

- обоснование выбора растворителя, если используется не вода.

1.3. Животные:

- используемые вид/штамм;
- количество, возраст и пол животных;
- источник, лабораторные условия, питание, используемые материалы и др.;

- вес каждого животного в начале теста.

1.4. Условия испытаний:

- обоснование подбора уровня доз;
- детальная формула испытуемого вещества, подготовка рациона питания, расчетные концентрации;
- стабильность и однородность смеси;
- условия введения тестируемого вещества;
- концентрация (ppm) испытуемого вещества при переходе из пищи / питьевой воды для достижения дозы (мг/кг массы тела/день), если это возможно;

- детализация качества пищевого рациона и воды.

2. Результаты:

- потребление продуктов питания, воды и, если это возможно, расчет пищевой эффективности (увеличение массы тела на 1 грамм продуктов питания), оценка расхода материалов для животных F1 и P, за исключением периода спаривания и, по крайней мере, последнего триместра лактации;

- данные по абсорбции (при наличии);

- данные веса тел животных P и F1, выбранных для спаривания;

- данные веса помета и детенышей;

- вес тела животных после эвтаназии, а также абсолютные и относительные данные результатов взвешивания органов родительских животных;

- характер, тяжесть и продолжительность клинических проявлений (независимо от того, обратимы они или нет);

- время смерти животных во время исследования, а также животных, сохранных до окончания тестирования;

- данные о токсических реакциях по признаку пола и дозы, включая показатели спаривания, фертильности, беременности, рождения, жизнеспособности и лактации; в отчете следует указать количество особей, используемых при вычислении этих показателей;

- токсичное или иное влияние на репродукцию, потомство, постнатальный рост и т. д.;

- результаты вскрытия;

- подробное описание всех гистопатологических исследований;

- количество самок P и F1 поколений с нормальными и продолжительными циклами;

- общее количество сперматозоидов в хвосте придатка яйца, процент подвижных сперматозоидов, процент морфологически нормальных сперматозоидов и процент сперматозоидов с каждой выявленной патологией;

- время спаривания, включая количество дней до спаривания;

- длительность беременности;

- количество имплантаций, желтых тел, размер приплода;

- число родившихся живыми и погибших после имплантации;

- количество детенышей с видимыми грубыми аномалиями; также необходимо указать, если они есть, количество недоразвитых детенышей;

- данные о физических размерах детенышей и другие данные постнатального развития; оценка физических параметров должна быть обоснована;

- данные функциональных исследований детенышей и взрослых, когда это необходимо;

- статистическая обработка результатов, где это необходимо.

3. Выводы, в т. ч. NOAEL значения для матери и потомства.

Исследование репродуктивной токсичности двух поколений предоставляет информацию о последствиях многократного воздействия вещества на всех этапах репродуктивного цикла. В частности, исследование предоставляет информацию о репродуктивных параметрах, данные о развитии, росте и выживании потомства.

Результаты исследования должны быть интерпретированы в сочетании с результатами субхронического пренатального развития, токсикокинетики и других имеющихся данных. Результаты данного исследования могут часто использоваться при оценке необходимости проведения дополнительных испытаний химических веществ.

Экстраполяция результатов исследования на человека носит ограниченный характер. Наилучшим образом они могут быть использованы для получения информации об уровнях доз, не вызывающих негативные эффекты, и допустимых уровнях воздействия на человека.