

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

«УТВЕРЖДАЮ»

Заместитель Министра
здравоохранения – Главный
государственный санитарный
врач Республики Беларусь



Н.П. Жукова

« 20 » *августа* 2016 г.
Регистрационный № 054-1215

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОЖНО-РЕЗОРБТИВНОГО ДЕЙСТВИЯ
ХИМИЧЕСКОЙ ПРОДУКЦИИ (ХИМИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ
И ИХ СМЕСЕЙ) *IN VIVO*

инструкция по применению

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

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

Минск, 2015

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ
Заместитель министра –
Главный государственный
санитарный врач
Республики Беларусь

_____ Н.П. Жукова
30.08.2016
Регистрационный № 054-1215

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОЖНО-РЕЗОРБТИВНОГО ДЕЙСТВИЯ ХИМИЧЕСКОЙ
ПРОДУКЦИИ (ХИМИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ И ИХ СМЕСЕЙ) *IN VIVO***

инструкция по применению

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

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

Минск 2015

ГЛАВА 1 ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

1. В настоящей инструкции по применению (далее — инструкция) изложен гармонизированный с международными требованиями (OECD TG № 427 «Skin Absorbption: *in vivo* Method»; ОЭСР Руководство № 427 «Кожно-резорбтивное действие: метод *in vivo*») метод исследования по изучению кожно-резорбтивного действия вещества, 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 испытания по изучению кожно-резорбтивного действия для веществ, разъедающих кожу (обладающих коррозионным действием).

2. Настоящая инструкция устанавливает подходы, схему и метод испытания по оценке кожно-резорбтивного действия химических веществ и продукции на их основе, обеспечивает получение полной информации о кожно-резорбтивном действии исследуемого вещества и степени транскутанного проникновения в организм, позволяет оценить и классифицировать 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:
- исследуемое вещество — материал, у которого должны быть изучены абсорбционные характеристики, желательно с использованием радиоактивной метки;

- непоглощенная доза (Unabsorbed dose) — часть исследуемого вещества, смытая с поверхности кожи после экспозиции или присутствующая на негерметичной повязке, и количество вещества, которое испарилось с кожи во время экспозиции;

- поглощенная доза (Absorbed dose) — вещество, присутствующее в биологических тканях и жидкостях организма (моче, крови, тканях и частях тела после удаления кожи в месте нанесения), смывах с клетки, экскрементах, выдыхаемом воздухе;

- поглощаемая доза (The absorbable dose) — вещество, присутствующее на/или в коже после промывания;
- продолжительность экспозиции — временной интервал между нанесением и удалением исследуемой пробы путем промывания кожи;
- 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.

ГЛАВА 3 ОБЩИЕ УСЛОВИЯ ПРОВЕДЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЙ

1. Метод *in vivo* используется в тех случаях, когда широко применяемые и достаточно информативные методы *in vitro* не позволяют получить необходимые сведения.

2. Преимуществом тестирования *in vivo* является использование физиологически и метаболически неповрежденной системы (кожи) того вида животных, который используется в большинстве токсикологических исследований, и при этом может быть модифицирован для других видов животных. Недостатки тестирования *in vivo* включают: использование живых животных, применение меченого радиоактивным изотопом материала для получения достоверных результатов, сложности в определении ранней фазы абсорбции, разницу в проницаемости кожи у людей и крыс, которая имеет большую проницаемость, чем кожа людей, что может привести к недостоверности результатов исследования. Наибольшее сходство с кожей людей имеет кожа морских свинок, свиней и обезьян.

3. У веществ, разъедающих кожу (обладающих коррозионным действием), кожно-резорбтивное действие не изучают.

4. До эксперимента *in vivo* по определению раздражающего/разъедающего действия на кожу изучают всю доступную информацию об исследуемом веществе: результаты исследований на человеке и/или лабораторных животных; сведения о раздражающем воздействии одного или более структурных аналогов или их смесей, кислотных и щелочных свойствах; проверенные и верифицированные результаты исследований *in vitro* или *ex vivo*.

5. Условия обращения, проведения экспериментов и выведения лабораторных животных должны соответствовать гуманистическим принципам

надлежащей лабораторной практики, изложенным в технических нормативных правовых актах Республики Беларусь.

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

- весы лабораторные общего назначения 2-го класса точности (по ГОСТ 24104) с пределом взвешивания 200 г; весы аналитические электронные с пределом допускаемой погрешности $\pm 0,0001$ г; стерилизатор сухожаровой с автоматической регулировкой температуры (100–220)°С (по ГОСТ 24437); анализатор потенциометрический с погрешностью измерений рН $\pm 0,1$ (рН-метр) с набором электродов (по ГОСТ 19881); холодильник бытовой (по ГОСТ 16317); 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; вата медицинская гигроскопичная (по ГОСТ 5556); марля медицинская (по ГОСТ 9412); ножницы (по ГОСТ 21241);

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

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

7. Исследования проводят в помещениях, оснащенных приточно-вытяжной вентиляцией и водопроводной водой. Приготовление растворов, подготовка проб и проведение исследований осуществляют при следующих условиях: температура окружающего воздуха (20±5)°С; относительная влажность воздуха не более 80% при T = 25°С; атмосферное давление 84,0–106,7 кПа (630–800 мм рт.ст.).

8. *Условия содержания и кормления.* Температура в экспериментальном помещении, где содержатся подопытные животные, должна составлять (22±3)°С для крыс; Относительная влажность помещения 50–60%, ее минимальный уровень не должен быть меньше 30%, максимальный — 70%, за исключением случаев, когда производится уборка. Освещение искусственное, сменяется в следующей последовательности: 12 ч светло, 12 ч темно. Животные должны содержаться в отдельных клетках. Для кормления может использоваться стандартный корм, питьевая вода — в неограниченном количестве.

9. *Подготовка животных.* Животных выбирают случайно, оставляют в клетках минимум на 5 дней до начала нанесения тестируемого вещества, что позволит им адаптироваться к лабораторным условиям. По завершении периода адаптации (за 24 ч до экспозиции) необходимо аккуратно, избегая повреждений, выбрать участок кожи у каждого животного в районе лопаток, затем обезжирить его ацетоном. Площадь аппликации должна быть достаточной для получения достоверной информации об абсорбции вещества, как минимум, площадью 10 см² для крыс массой 200–250 г. После нанесения вещества животных содержат в метаболических клетках.

10. Эксперименты с лабораторными животными и изучаемыми препаратами должны производиться работниками в соответствии с требованиями охраны

труда, в спецодежде, с использованием индивидуальных средств защиты кожи, органов зрения и дыхания.

ГЛАВА 4 ОПИСАНИЕ МЕТОДА

1. Тестируемое вещество, предпочтительно радиоактивно меченное, наносят на выбритый участок кожи животного в одной или более адекватной дозе в форме, применяемой при его использовании. Вещество оставляют на коже на фиксированное время под соответствующим покрытием (негерметичным, полугерметичным, герметичным), чтобы исключить слизывание вещества животными. По окончании экспозиции покрытие убирают, участок кожи очищают с помощью соответствующего средства (вода, мыло). Покрытие и материалы, используемые при очистке, необходимо сохранить для анализов, а экспонированный участок кожи покрыть новым защитным материалом.

2. До начала, в процессе и после эксперимента животных содержат в отдельных метаболических клетках. Экскременты и выдыхаемый воздух собирают для последующего анализа. Сбор выдыхаемого воздуха может быть прекращен, когда будут получены убедительные данные, что в нем не содержится или содержится в незначительном количестве летучий радиоактивный метаболит.

3. Каждую дозу вещества исследуют на нескольких группах животных. Одну группу выводят из опыта по окончании экспозиции, остальные — через определенные промежутки времени. В конце периода наблюдения проводят забой всех выживших животных, исследованиям подвергают кровь и другие биологические жидкости. Выделяют участок кожи, на который наносили вещество, для определения количества не выведенного вещества изучают все органы и ткани животного. Пробы анализируют соответствующими методами и рассчитывают степень кожной абсорбции.

4. Наиболее предпочтительным видом животных являются крысы, но возможно использование других видов животных (без шерсти, с близкой к человеческой степени абсорбции). В эксперименте используют молодых половозрелых самцов белых крыс с массой тела 200–250 г, на начало исследования различия в весе отдельных животных не должны превышать 20% от среднего веса группы.

5. *Количество и пол животных:* для исследования каждой дозы вещества и для каждого этапа умерщвления используют группу животных как минимум из четырех особей. Каждая группа животных должна быть умерщвлена в различные интервалы времени, например, в конце экспозиции (обычно через 6 или 24 ч после нанесения) и в более отдаленные периоды (через 48 и 72 ч). Если есть данные о половой чувствительности при кожной резорбции, используют наиболее чувствительный пол; при отсутствии таких данных — животных обоего пола.

6. *Подготовка к тесту.* До проведения эксперимента должны быть изучены характеристики кожной абсорбции исследуемого вещества; желательно, чтобы вещество имело радиоактивную метку. Тестируемая форма вещества (например, в чистом виде, не разбавленное или продукция, содержащая

тестируемое вещество) должна быть идентична реальному аналогу, с которым может контактировать человек или иной живой организм. Любое отклонение от формы следует обосновать. При необходимости исследуемое вещество растворяют или суспензируют в подходящем растворителе. Для всех растворителей, кроме воды, должны быть известны характеристики абсорбции и потенциального взаимодействия с исследуемым веществом.

7. *Нанесение вещества на кожу.* На поверхности кожи выбирают место нанесения вещества, на которое равномерно наносят определенное количество вещества, соответствующее реальным условиям контакта человека с веществом (1–5 мг/см² для твердых веществ и до 10 мл/см² для жидкостей). Любые другие количества должны быть обоснованы с учетом предполагаемых условий применения вещества, цели исследования или физических характеристик пробы.

Участок кожи с нанесенным веществом должен быть защищен от слизывания, например, пористым материалом (проницаемым нейлоновым, марлевым покрытием).

При повторных аппликациях вещества на место нанесения накладывают герметичное покрытие. В случае испарения полунлетучего вещества уровень его воздействия (проникновения) снижается до недопустимой степени, поэтому необходимо улавливать испаряющееся вещество угольными фильтрами, покрывающими устройство для нанесения (приложение).

Используемые приборы не должны повреждать кожу, поглощать или реагировать с исследуемой пробой.

После нанесения вещества все животные должны быть возвращены в метаболические клетки для сбора экскрементов.

8. Продолжительность экспозиции должна соответствовать ожидаемому периоду воздействия на человека (например, 6 или 24 ч). После периода воздействия животных содержат в индивидуальных метаболических клетках до умерщвления. За животными на протяжении всего исследования устанавливают регулярное, через определенные промежутки времени, наблюдение с целью выявления и регистрации признаков интоксикации или аномальных реакций. По окончании периода экспозиции осматривают обработанную кожу и учитывают видимые признаки раздражения.

Метаболические клетки должны обеспечивать отдельный сбор мочи и фекалий, сбор диоксида углерода ¹⁴C и летучих углеродных смесей, которые необходимо анализировать, если их количество превышает 5%. Мочу, фекалии и другие жидкости собирают отдельно от каждой группы при каждом взятии проб. При наличии данных о том, что летучие радиоактивные метаболиты образуются в небольших количествах или не присутствуют вообще, могут использоваться открытые клетки.

Выделения собирают во время воздействия вещества, до 24 ч после первого контакта с кожей и далее ежедневно до конца эксперимента. Обычно достаточно трехразового сбора экскрементов, но в некоторых случаях их количество может быть увеличено.

По окончании периода экспозиции с животных удаляют защитные устройства и сохраняют для дальнейшего анализа. Кожу животных промывают

как минимум 3 раза с использованием моющего средства, не раздражающего кожу, при помощи мягкого тампона, избегая попадания вещества на другие участки тела. Затем кожу высушивают, смывные воды, используемые приспособления (щетки, приборы, тампоны и пр.) сохраняют для анализа. На животных, которые будут возвращены в метаболические клетки и затем сформированы в группы, накладывают свежие повязки.

9. *Процедура завершения опыта.* Каждая опытная группа животных должна быть умерщвлена в установленное время, кровь собрана для анализа. Обработанные и необработанные участки кожи должны быть отобраны для отдельного анализа.

Обработанный участок кожи может быть разделен на роговой слой и эпидермис для более точного анализа о распределении по времени исследуемого вещества в роговом слое. Для облегчения фракционирования кожи (после последней промывки и умерщвления животного) снимают каждый защитный слой.

Обработанный участок кожи вместе с окружающим его необработанным участком должен быть выделен и прикреплен на плоскую поверхность. Затем аккуратно (с легким надавливанием) прикрепляют отрезок клейкой ленты (скотч) на поверхность кожи и отделяют его вместе с частью рогового слоя. Последовательно накладывают полоски скотча до тех пор, пока лента не перестанет к поверхности кожи. Это означает, что весь роговой слой отделен. Для каждого животного следует хранить все куски скотча в одном контейнере с добавлением дигестанта, растворяющего роговой слой.

Все потенциальные целевые ткани и органы-мишени могут быть отобраны для выполнения отдельных измерений до того, как остатки тел животных будут использованы для определения абсорбированной дозы. Мертвых животных сохраняют для дальнейшего анализа. Мочу, собранную во время забоя, смешивают с ранее собранной.

После забоя животных и сбора и удаления экскрементов клетки тщательно промывают соответствующим растворителем. Прочее потенциально загрязненное оборудование исследуют подобным образом.

ГЛАВА 5 АНАЛИЗ

1. Во всех исследованиях необходимо достичь адекватного извлечения (в среднем $100 \pm 10\%$ радиоактивности). Результаты, выходящие за пределы данного диапазона, следует обосновать. Уровень экспозиционной дозы в каждом образце должен быть проанализирован с использованием соответствующей обоснованной процедуры.

2. Статистический анализ должен включать определение степени дисперсии для каждого нанесения.

ГЛАВА 6 ПОДГОТОВКА ОТЧЕТА

1. Для каждого животного должны быть проведены следующие измерения при каждом взятии проб тестируемого вещества и/или метаболитов:

- количество вещества, адсорбированное на защитных устройствах;
- количество вещества, полученное с кожи;
- количество вещества на коже или внутри нее, которое не удалось смыть;
- количество вещества в образце крови;
- содержание вещества в выделениях и/или выдыхаемом воздухе (при необходимости);
- количество вещества, оставшегося в тканях или органах, оставленных для отдельного анализа.

В дополнение к индивидуальным данным должны быть представлены средние значения по всей группе, сгруппированные по признаку взятия проб.

Количество вещества и/или метаболитов в испражнениях, использованном воздухе, крови и тканях тела дает возможность определить общее количество вещества, абсорбированного на каждом этапе. Также можно рассчитать количество вещества, абсорбированного на каждый см² кожи, подверженный его воздействию.

2. Отчет должен включать требования, описанные в протоколе, включая обоснование выбранной системы исследования, и содержать:

- описание исследуемого вещества: идентификационные данные (номер CAS (если имеется), источник, чистота (радиохимическая чистота), известные примеси, номер партии); физическое состояние, физико-химические свойства (pH, летучесть, растворимость, стабильность, молекулярный вес и $\log P_{ow}$);

- подготовку исследования: рецептура и обоснование применения; детали подготовки, нанесенное количество, достигнутая концентрация, использованный растворитель, стабильность и однородность (гомогенность) раствора;

- выбор экспериментальных животных: вид/линия; количество, возраст и пол; источник получения животных, условия содержания, диета и т. д.; вес каждого животного в начале тестирования;

- условия проведения испытания: детали по введению вещества (место нанесения, методы анализа, окклюзивное/неокклюзивное покрытие, объем аппликации, методы экстракции и определения); подробные данные о качестве воды и корма;

- полученные результаты: признаки токсичности; данные об абсорбции в форме таблиц (соотношение, количество или процент); общее восстановление после исследования; интерпретация результатов, включая сравнение с любой доступной информацией о кожно-резорбтивном действии вещества.

**Пример дизайна типичного устройства, используемого для изоляции
и защиты места нанесения вещества при изучении
кожно-резорбтивного действия методом *in vivo***

