

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

«УТВЕРЖДАЮ»

Заместитель Министра
здравоохранения – Главный
государственный санитарный
врач Республики Беларусь

 Н.П. Жукова
« 30 » августа 2016 г.
Регистрационный № 056-1215

ОПРЕДЕЛЕНИЕ РЕПРОДУКТИВНОЙ ТОКСИЧНОСТИ
ХИМИЧЕСКОЙ ПРОДУКЦИИ (ХИМИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ
И ИХ СМЕСЕЙ) НА ОДНОМ ПОКОЛЕНИИ

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., к.б.н. Войтович А.М., 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 № 056-1215

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ РЕПРОДУКТИВНОЙ ТОКСИЧНОСТИ
ХИМИЧЕСКОЙ ПРОДУКЦИИ (ХИМИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ
И ИХ СМЕСЕЙ) НА ОДНОМ ПОКОЛЕНИИ**

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, канд. биол. наук А.М. Войтович, В.А. Грынчак

Минск 2015

ГЛАВА 1 ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

1. В настоящей инструкции по применению (далее — инструкция) изложены гармонизированные с международными требованиями (OECD TG № 414 «Prenatal Developmental Toxicity Study» / (ОЭСР Руководство № 414 «Оценка токсического действия на пренатальное развитие»; OECD TG № 415 «One-Generation Reproduction Toxicity Study» / ОЭСР Руководство № 415 «Испытания по оценке репродуктивной токсичности на одном поколении»; OECD TG № 443 «Extended One-Generation Reproductive Toxicity Study»/ОЭСР Руководство № 443 «Расширенное изучение репродуктивной токсичности на одном поколении») методы исследований по изучению репродуктивной токсичности на одном поколении лабораторных животных, применяемые в комплексе медицинских услуг, направленных на медицинскую профилактику неблагоприятного действия потенциально опасной для человека продукции: чистые химические вещества, их растворы и смеси химических веществ, в т. ч. пестициды, доклинические формы лекарственных средств медицинского и ветеринарного применения, пищевые и кормовые добавки. Инструкция не распространяется на проведение испытаний токсичности готовой парфюмерно-косметической продукции.

2. Настоящая инструкция устанавливает подходы, схемы и методы испытаний, предназначенные для оценки репродуктивной токсичности на одном поколении, обеспечивает получение информации о воздействии испытуемого вещества на репродуктивную функцию самцов и самок, развитие потомства и, при необходимости, о выявлении потенциальной нейро- и иммунотоксичности вещества для потомства первого поколения, позволяет оценить химическое вещество в соответствии с Согласованной на глобальном уровне системой классификации и маркировки химических веществ (далее — СГС) и минимизировать риск воздействия химического фактора на здоровье человека.

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

ГЛАВА 2 ТЕРМИНЫ И ОПРЕДЕЛЕНИЯ

1. В настоящей инструкции используются следующие термины и определения:

Выкидыш — преждевременное удаление из матки продукта оплодотворения: эмбриона или нежизнеспособного плода.

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

Дозировка — основное понятие, включающее в себя дозу, частоту и продолжительность введения.

Изменение роста — изменение массы или размеров органов потомства.

Изменения (аномалии) — структурные изменения в развитии, в т. ч. пороки и отклонения в развитии.

Иммунотоксичность — токсическое действие изучаемого вещества на иммунный статус потомства.

Имплантация — прикрепление бластоцисты к эпителиальной оболочке матки, в т. ч. проникновение через эпителий матки и встраивание в эндометрий.

Концептус — объединенное название производных оплодотворенной яйцеклетки на любой стадии развития от оплодотворения до рождения, в т. ч. внезародышевые оболочки, а также эмбрион или плод.

Материнская токсичность — неблагоприятное воздействие на беременных самок, происходящее как непосредственно (прямое воздействие), так и опосредованно (непрямое воздействие).

Негативный эффект — изменение исходного состояния, приводящее к снижению способности организма к выживанию, воспроизводству или адаптации в окружающей среде. В терминах токсикологии развития в широком значении данное понятие включает в себя любые эффекты, препятствующие нормальному развитию концептуса как до, так и после рождения.

Нейротоксичность — токсическое действие изучаемого вещества на нервную систему потомства.

Отклонения/малые аномалии — структурные изменения, оказывающие незначительное влияние или практически не оказывающие пагубного влияния на животных, могут быть временными и происходить довольно часто в контрольной группе.

Поздняя резорбция — мертвый эмбрион или плод с внешними дегенеративными изменениями.

Плод — нерожденное потомство в постэмбриональный период.

Пороки/основные аномалии — структурные изменения, считающиеся губительными для животных (могут приводить к летальному исходу), и, как правило, редкие.

Ранняя резорбция — подтверждение имплантации без распознавания эмбриона/плода.

Резорбция — концептус, который был имплантирован в матку, впоследствии погиб и в настоящее время резорбируется или был резорбирован.

Репродуктивная токсичность — неблагоприятное воздействие на потомство и/или ослабление мужских и женских репродуктивных функций или способностей.

Токсикология развития (тератология) — изучение негативных эффектов для развивающегося организма, возникающих в результате воздействия до зачатия, в период внутриутробного развития или постнатально ко времени

полового созревания. Основные проявления токсичности на развивающийся организм включают: 1) гибель организма; 2) структурные аномалии; 3) изменение роста; 4) функциональные дефекты.

Фетотоксичность (токсичность для плода) — губительное влияние на нормальную структуру, развитие, рост и/или жизнеспособность плода.

Эмбрион — ранняя или развивающаяся стадия любого организма, в частности развивающийся продукт оплодотворения яйцеклетки после появления длинной оси и до формирования всех основных структур.

Эмбриотоксичность — губительное влияние на нормальную структуру, развитие, рост и/или жизнеспособность эмбриона.

LOAEL (Lowest observed effect level) — пороговая доза (или минимально действующая доза, порог вредного воздействия), наименьшее количество вещества, которое вызывает в организме изменения, определяемые наиболее чувствительными физиологическими и биохимическими тестами; доза, ниже которой отсутствуют внешние признаки отравления животного; наименьшая доза вещества, способная дать определенный биологический эффект (термин, аналогичный принятому ранее «минимальная действующая доза» / «пороговая доза»);

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

ГЛАВА 3 ОБЩИЕ УСЛОВИЯ ПРОВЕДЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЙ

1. Изучение репродуктивной токсичности является обязательным элементом токсикологической оценки химических веществ.

2. Метод изучения влияния токсичности химических веществ на репродуктивную функцию лабораторных животных на одном поколении обеспечивает получение информации о действии химических соединений на материнский организм, эмбриональное развитие, а также гибели, структурных аномалиях или изменениях в развитии плода.

3. Основная цель расширенного изучения репродуктивной токсичности на одном поколении — оценить специфические периоды жизни, не охватываемые другими типами изучения токсичности, и выявить эффекты, которые могут быть результатом пре- и постнатального химического воздействия.

4. 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, воздействии повторных доз (включая

скрининговые исследования репродуктивной токсичности); данные кратковременных скрининговых испытаний эндокринных дизрапторов (например, исследование утеротропного действия или по Хершбергеру, сперматогенеза, эстральных циклов и др.).

5. Расширенное изучение репродуктивной токсичности на одном поколении служит критерием оценки репродуктивной функции и включает взаимосвязь самцов и самок, самок и эмбрионов, самок и потомства поколения F₁ до и после полового созревания.

5.1. Метод позволяет изучить пре- и постнатальные эффекты химических веществ путем оценки системной токсичности для беременных и кормящих самок, молодого и взрослого потомства; репродуктивных систем взрослых самцов и самок; выявить специфические органы-мишени у потомства.

5.2. Метод дает возможность установить уровни NOAEL, LOAEL и/или провести бенчмаркинг доз для различных видов эффектов.

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

7. При 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 pH $\pm 0,1$ (рН-метр) с набором электродов (по ГОСТ 19881); холодильник бытовой (по ГОСТ 16317); морозильная камера; баня водяная с терморегулятором, позволяющая поддерживать температуру (55 \pm 0,5)°С (по ГОСТ 12026) или инактиватор; стаканы химические (50–100 см³), цилиндры (по ГОСТ 1770) и колбы (по ГОСТ 25336) различной вместимости (10; 100; 1000 см³); штативы для пробирок; шпатели стеклянные; стандарт-титры для приготовления образцовых буферных растворов для рН-метрии (по ГОСТ 8.135 ГСИ); бумага индикаторная универсальная (ТУ 6-091181-76); бумага фильтровальная лабораторная (по ГОСТ 12026); вата медицинская гигроскопичная (по ГОСТ 5556); марля медицинская (по ГОСТ 9412); ножницы (по ГОСТ 21241); спиртовки лабораторные стеклянные (по ГОСТ 23932Е);

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

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

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

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

9. 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).

10. При кормлении используется обычная лабораторная диета с неограниченным количеством питьевой воды. На выбор диеты может повлиять необходимость обеспечения хорошего смешивания 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.

11. Подготовка животных.

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

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

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

12. Уровень доз.

12.1. Необходимо использовать минимум три уровня доз и параллельную контрольную группу. Дозы выбирают с учетом возможной дальнейшей градации токсических эффектов: максимальная доза должна индуцировать определенную токсичность для развивающегося организма и/или материнской особи (клинические признаки или снижение массы тела), но не гибель или тяжелые страдания; один промежуточный уровень — к появлению минимальных наблюдаемых токсичных эффектов; минимальный — к отсутствию каких-либо признаков токсичности для развития плода или материнской особи.

Двух-четырёхкратные интервалы являются оптимальными для установления убывающей последовательности доз, добавление четвертой

тестовой группы предпочтительнее использования очень больших интервалов (более чем 10-кратных) между дозами. Целью испытания является получение NOAEL для материнской особи, но допускается данный показатель не устанавливать.

12.2. Уровни доз выбирают с учетом известных данных о токсичности, метаболизме и токсикокинетике исследуемого вещества или близких к нему веществ.

12.3. Обязательным является наличие параллельной контрольной группы, которую подвергают фиктивному воздействию или воздействию растворителем в максимальной дозе, если он используется. Опытные и контрольные группы получают одинаковый объем исследуемого вещества или растворителя и содержатся в идентичных условиях.

13. Испытание с предельной дозой.

13.1. В случае, когда пероральное введение дозы в 1000 мг/кг массы тела в день не приводит к появлению признаков токсичности, а эффектов вредного воздействия по существующим данным не ожидается (при исследовании структурно и/или метаболически родственных соединений), то полное исследование с использованием трех доз не является необходимым. Ожидаемое воздействие на организм человека может указывать на необходимость использования более высокого уровня пероральной дозы в испытании с предельной дозой.

13.2. Для других способов введения дозы (ингаляционный или дермальный) физико-химические свойства исследуемого вещества чаще указывают на максимально достижимый уровень воздействия (например, дермальное нанесение не должно вызвать серьезные местные поражения).

14. Процедуры спаривания проводят в соответствующих клетках. Индивидуальное содержание оплодотворенных животных является предпочтительным, но допускается и содержание небольшими группами.

15. Клинические наблюдения с регистрацией всех данных проводят не реже одного раза в день, включая выходные, желательно в одно и то же время с учетом пикового периода ожидаемых эффектов после введения дозы. Регистрируют состояние животных, случай гибели, агонии, изменения в поведении и все признаки очевидной токсичности.

Животных взвешивают в день 0 или не позднее дня 3; если оплодотворенные животные поставляются от стороннего производителя, в первый день воздействия, а затем каждые 3 дня в течение эксперимента и в день запланированного умерщвления.

Потребление пищи регистрируют с трехдневным интервалом, совпадающим с интервалом определения массы животных.

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

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

ГЛАВА 4

ОЦЕНКА ТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ НА ПРЕНАТАЛЬНОЕ РАЗВИТИЕ

1. Метод предназначен для изучения периода органогенеза (дни 5–15 у грызунов, дни 6–18 у кроликов) и других эффектов, начиная с момента имплантации, и при необходимости на протяжении всего периода беременности до кесарева сечения.

2. Исследуемое вещество вводят беременным самкам, начиная с момента имплантации до дня, предшествующего дню запланированного умерщвления животных, максимально близкого к сроку нормальных родов, и не приводящего к риску потери данных в результате досрочных родов.

3. За 1–2 дня до кесарева сечения женских особей умерщвляют, изучают содержимое матки и оценивают изменения мягких тканей и скелета плода.

4. Испытания проводят на стандартных лабораторных животных, наиболее часто используемых при изучении пренатальной токсичности. Наиболее предпочтительным видом грызунов является крыса, негрызунов – кролик. Использование других видов должно быть обосновано.

5. В испытании используются здоровые интактные особи, прошедшие процесс адаптации к лабораторным условиям в течение 5 дней. Животных идентифицируют по виду, источнику, полу, массе и возрасту. Для каждого уровня доз используются молодые взрослые нерожавших женских особей, которых спаривают с мужскими особями того же вида; инбридинга (спаривания особей из одного потомства) следует избегать. За день 0 беременности у грызунов принимают день обнаружения вагинальной пробки и/или спермы; у кроликов — день полового акта или искусственного оплодотворения (если используется). Оплодотворенных самок распределяют на экспериментальные и контрольные группы. Клетки устанавливают таким образом, чтобы минимизировать возможное влияние. Каждому животному присваивают идентификационный номер. Если самок оплодотворяют по партиям, животные из каждой партии должны быть произвольно распределены по группам.

6. Индивидуальное содержание оплодотворенных животных является предпочтительным, содержание небольшими группами также приемлемо.

7. Процедура испытания, количество и пол животных.

7.1. Каждая экспериментальная и контрольная группы должны содержать достаточное число женских особей для получения примерно 20 самок с имплантацией для аутопсии. Группы, состоящие из менее чем 16 животных с имплантацией, могут быть неприемлемы.

7.2. Материнская смертность, не превышающая 10%, не влияет на результаты исследования.

7.3. При использовании растворителя или других добавок для облегчения дозирования необходимо уделять внимание следующим его характеристикам: влияние на поглощение, распределение, метаболизм и удержание/выведение исследуемого вещества; влияние на химические свойства исследуемого вещества, которые могут изменить его токсические свойства; влияние на потребление воды и пищи или порядок питания животных. Растворитель не

должен обладать репродуктивной токсичностью или токсичностью для развивающегося организма.

8. Дозирование.

8.1. Исследуемое вещество вводят ежедневно после имплантации (на 5-й день после спаривания) до дня, предшествующего дню запланированного кесарева сечения. Если предварительные испытания не вызвали предимплантационной гибели, исследование продлевают на весь период беременности: от спаривания до дня, предшествующего запланированному умерщвлению.

9. Введение экспериментальной дозы.

9.1. Исследуемое вещество и/или растворитель вводят перорально посредством интубации каждый день в одно и то же время. Использование иного способа введения необходимо обосновать и аргументировать.

9.2. Для каждого животного дозу рассчитывают индивидуально на основании измеренной массы тела. С особой осторожностью с использованием существующих данных следует устанавливать дозы в течение последнего триместра беременности, чтобы избежать появления избыточной токсичности для материнской особи.

9.3. Животных, у которых в ходе эксперимента отмечено чрезвычайно сильное токсическое воздействие, гуманно умерщвляют. Дозирование опытной группы прекращают в случае проявления признаков избыточной токсичности у нескольких беременных самок.

9.4. При введении вещества через желудочный зонд дозирование животным проводят с использованием желудочной трубки или подходящей интубационной канюли в виде разовой дозы.

9.5. Максимальный разовый объем вводимой жидкости зависит от размера экспериментального животного и не должен превышать 1 мл на 100 г массы тела, для водных растворов — 2 мл на 100 г массы тела, для кукурузного масла — 0,4 мл на 100 г массы тела. Тестовый объем вводимой жидкости должен быть максимально единым для всех уровней доз, его постоянство обеспечивают путем регулирования концентрации.

10. Обследование после вскрытия.

10.1. Самок умерщвляют за один день до предполагаемых родов. Животных с признаками выкидыша или преждевременных, до запланированного времени умерщвления, родов умерщвляют и подвергают тщательному макроскопическому обследованию на наличие любых структурных аномалий или патологических изменений.

10.2. Осмотр самок во время кесарева сечения и последующего анализа плода проводят без информации о принадлежности к исследуемой группе в целях объективности.

10.3. Сразу после умерщвления или максимально быстро после гибели у животных удаляют матку и устанавливают статус беременности. Неоплодотворенные на вид матки подвергают дальнейшему исследованию для подтверждения отсутствия беременности (окрашивание сульфидом аммония для грызунов и окрашивание Салевски или альтернативный метод для

кроликов).

10.4. Беременные матки и шейки матки взвешивают, за исключением животных, обнаруженных в ходе исследования мертвыми.

10.5. У беременных животных определяют количество желтых тел.

10.6. Содержание матки осматривают на наличие погибших эмбриональных клеток или плодов и жизнеспособных плодов, определяют степень резорбции, чтобы установить относительное время гибели концептуса.

11. Осмотр плодов.

11.1. Определяют пол и массу каждого плода.

11.2. Каждый плод осматривают на наличие внешних изменений.

11.3. Плоды обследуют на наличие изменений мягких тканей и скелета (отклонения, пороки развития, аномалии) и половых путей (наличие признаков изменений в развитии). Классификация изменений плода предпочтительна, но не обязательна, в случае ее проведения для каждой категории необходимо наличие четких критериев классификации.

11.4. Для грызунов необходимо препарировать и осматривать на наличие изменений скелета около половины плодов из каждого помета. Оставшиеся плоды препарируют и осматривают на наличие изменений мягких тканей с использованием принятых или соответствующих методов последовательного сечения или общего вскрытия.

11.5. Для негрызунов (например, кроликов) осматривают каждый плод на наличие изменений мягких тканей и скелета, органы после вскрытия — на наличие изменений мягких тканей, при необходимости — изучают внутреннюю структуру сердца. Примерно у 50% плодов головы удаляют и препарируют, чтобы изучить состояние мягких тканей (глаза, головной мозг, носовые ходы и язык); метод изучения — стандартное последовательное сечение или иной равноценный. Органы поврежденных и неповрежденных плодов препарируют и осматривают на наличие изменений скелета.

ГЛАВА 5

ИСПЫТАНИЯ С ЦЕЛЬЮ ОЦЕНКИ РЕПРОДУКТИВНОЙ ТОКСИЧНОСТИ НА ОДНОМ ПОКОЛЕНИИ

1. Целью данного метода является изучение влияния химических соединений на функцию гонад, эстральный цикл, поведение во время спаривания, зачатие, лактацию и отлучение от материнского питания.

2. Испытуемое вещество вводят нескольким группам самок и самцов.

2.1. Самцам дозу вводят на протяжении развития и как минимум одного полного сперматогенного цикла (около 56 дней у мышей и 70 дней у крыс), чтобы выявить любые изменения, вызванные воздействием вещества на стадии сперматогенеза.

2.2. Самкам материнского поколения (P) дозу вводят по меньшей мере, на протяжении двух полных эстральных циклов с целью выявления любых изменений, вызванных воздействием вещества на эстральной стадии.

2.3. Животных спаривают, испытуемое вещество вводят животным обоего пола на протяжении периода спаривания и затем только самкам в течение периода беременности и кормления. Введение вещества ингаляционно должно быть научно обосновано.

3. Предпочтительным видом животных являются крысы или мыши, здоровые, ранее не бывшие в опытах, которых отбирают по внешнему виду, линии, полу, массе и/или возрасту. Линии с низкой плодовитостью не используют.

4. Процедура испытания, количество и пол животных.

4.1. Каждая экспериментальная и контрольная группа должна содержать достаточное количество животных, чтобы получить не менее 20 беременных самок, близких к родам или рожающих, и потомство для оценки влияния вещества на фертильность, беременность, материнское поведение животных поколения P, рост и развитие потомства линии F1 в период от оплодотворения яйцеклетки до отнятия от груди.

4.2. Предварительные данные об изучаемом веществе:

- твердое, жидкое, газо- или парообразное агрегатное состояние;
- химическая идентификация;
- чистота (примеси) испытуемого вещества;
- характеристики растворимости;
- точка плавления/кипения (если необходимо);
- pH (если необходимо).

5. Схема эксперимента.

5.1. Самцам поколения родителей (P) в возрасте 5–9 недель дозу вводят ежедневно, на протяжении 10 недель до периода спаривания (для мышей период дозировки — 8 недель). Самцов умерщвляют и осматривают по окончании периода спаривания или оставляют на экспериментальной диете для возможного рождения второго приплода, затем умерщвляют и осматривают.

5.2. Самки поколения родителей (P) получают испытуемое вещество ежедневно на протяжении 2 недель до спаривания, в течение 3-недельного периода спаривания, беременности и затем до периода завершения кормления потомства F1.

5.3. Для изменения режима введения доз необходимы основания, полученные из доступных данных об испытуемом веществе, например, индукции метаболизма или бионакопления.

6. Процедура спаривания.

6.1. 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 помещают с одним самцом до наступления беременности или до истечения 3 недель. Каждое утро самок осматривают на предмет наличия спермы или вагинальной пробки, появление которых считается 0 днем беременности.

6.3. При неудачном спаривании пару осматривают с целью выявления причины видимой нефертильности, включая процедуры дополнительного спаривания с самцами или самками, доказавшими свою способность

оплодотворять и оплодотворяться, микроскопического исследования репродуктивных органов, наблюдения за эстральным циклом или сперматогенезом.

7. Размер приплода.

7.1. Животным обеспечивают возможность полноценных родов и кормления потомства до момента отнятия от груди без стандартизации потомства.

7.2. При стандартизации размера помета выполняют следующую процедуру: на 4-й день после рождения размер каждого помета регулируют уничтожением лишних детенышей, сохраняя в приплоде 4 самца и 4 самки.

7.3. Если количество детенышей (самцов или самок) не позволяет сформировать их в соотношении 4 самца/4 самки, допускается частичное урегулирование (например, 5 самцов и 3 самки). Приплод численностью менее 8 детенышей не регулируют.

8. Наблюдения.

8.1. На протяжении испытания каждое животное наблюдают не реже 1 раза в день, фиксируют изменения в поведении, признаки трудных или длительных родов, признаки токсичности, гибель каждой особи индивидуально. Объем потребляемой пищи замеряют ежедневно, а после родов и в период лактации — во время взвешивания приплода. Р-самцов и самок взвешивают в первый день введения, затем еженедельно.

8.2. Срок беременности отсчитывают, начиная с 0 дня наступления беременности. Для каждого приплода сразу после родов устанавливают количество и пол детенышей, число мертворожденных (мертвых или живых), наличие аномалий. Мертвых и умерщвленных на 4-й день детенышей фиксируют и изучают на предмет выявления пороков. Живых детенышей подсчитывают, взвешивают на утро после рождения, на 4 и 7-й дни после рождения и затем еженедельно до окончания эксперимента.

8.3. Фиксируют физические и/или поведенческие аномалии, наблюдаемые у самок или потомства.

9. Вскрытие.

9.1. Животных поколения Р подвергают макроскопии после умерщвления или гибели во время эксперимента, изучают структурную патологию или изменения, особенно в органах репродуктивной системы. Погибших или агонизирующих детенышей осматривают на предмет обнаружения пороков.

10. Гистопатология.

10.1. Микроскопии подвергают яичники, матку, шейку матки, вагину, тестикулы, придатки яичников, семенной пузырек, простату, свертывающую железу, гипофиз и орган(ы)-мишень(и) всех животных потомства родителей (Р). Если перечисленные органы не были исследованы в опытах с многократными дозами, они должны быть изучены микроскопически в группах с высокой дозой и контрольной группе, а также у животных, погибших во время эксперимента.

10.2. В случае обнаружения у животных патологически измененных органов последние следует осмотреть у всех особей Р. Все ткани со

значительными патологиями и репродуктивные органы с ожидаемой бесплодностью подвергают микроскопическому исследованию.

ГЛАВА 6 РАСШИРЕННОЕ ИЗУЧЕНИЕ РЕПРОДУКТИВНОЙ ТОКСИЧНОСТИ НА ОДНОМ ПОКОЛЕНИИ

1. Целью расширенного изучения репродуктивной токсичности на одном поколении является оценка специфических периодов жизни, не охватываемых другими типами изучения токсичности, и выявление эффектов, которые могут быть результатом пре- и постнатального химического воздействия.

2. Изучение репродуктивной токсичности на одном поколении включает использование трех когорт F_1 животных:

- когорта 1: оценивает показатели репродуктивности и развития потомства; эта когорта может быть расширена включением F_2 поколения;
- когорта 2: оценивает потенциальный эффект воздействия химического вещества на развивающуюся нервную систему;
- когорта 3: оценивает потенциальный эффект воздействия химического вещества на развивающуюся иммунную систему.

3. Вопрос включения в эксперимент F_2 поколения или исключения когорты с изучением нейро-/иммунотоксичности должен быть обоснован и отражать существующие знания об исследуемом веществе.

4. Схема ведения протокола представлена в приложении 1.

5. Исследуемое вещество вводят длительно в определенных дозах нескольким группам половозрелых самцов и самок. Родительское поколение (Р) получает вещество как минимум за 2 недели до спаривания и в течение 2 недель в период спаривания. В последующем Р самцы получают вещество до прекращения материнского питания F_1 .

5.1. Продолжительность введения вещества Р самцам составляет не менее 10 недель, но при необходимости уточнения репродуктивных эффектов допускается более длительное введение.

5.2. Р самки получают вещество во время беременности и до окончания лактации и отлучения помета от материнского питания (8–10 недель воздействия). F_1 потомство после отлучения от материнского питания должны получать исследуемое вещество до полного взросления. При исследовании второго поколения потомству F_1 вводят вещество до прекращения материнского питания F_2 или до окончания исследования.

6. Выбор вида и линии животных.

6.1. Вид испытуемых животных определяют на основании имеющейся информации о веществе, но предпочтительным видом являются крысы. Использование других видов должно быть обосновано и внесено в протокол исследований. Линии с низкой плодовитостью или известной высокой частотой спонтанных дефектов развития не используют.

6.2. В исследованиях используют здоровых животных-родителей, ранее не подвергавшихся экспериментальным процедурам — самцы и нерожавшие и небеременные самки.

Из акклиматизированных в течение не менее 5 дней после привоза половозрелых животных, близких по возрасту (около 90 дней), отбирают методом случайной выборки и формируют близкие по весу контрольные и опытные группы с отклонениями от средней массы не более 20%.

7. Условия содержания стандартные. В рационе учитывают содержание фитоэстрогенов, высокие уровни в корме которых могут повлиять на некоторые показатели репродуктивности. Используют стандартизованные корма с заведомо сниженным содержанием эстрогенных веществ.

При введении веществ алиментарным путем учитывают гомогенность корма и стабильность в нем изучаемого вещества. Корм и питьевую воду регулярно анализируют на предмет загрязнения, образцы корма каждой партии хранят в соответствующих условиях (например, при -20°C) до завершения отчета на случай арбитража.

8. Содержание животных в клетках стандартное. Пометы находятся вместе с матерями до прекращения материнского питания. F_1 животных содержат небольшими группами одного пола и уровня воздействия с момента прекращения материнского питания до конца исследований. При необходимости животных могут содержать индивидуально. Уровень фитоэстрогенов, обнаруживаемый при выборочных исследованиях материала подстилки, должен быть минимальным.

9. Количество и идентификация животных.

9.1. Количество животных в экспериментальных и контрольных группах должно составлять не менее 20 беременных самок на каждую дозовую группу и быть достаточным для оценки возможного влияния вещества на фертильность, беременность, материнское поведение животных поколения P, рост и развитие потомства F_1 в период от зачатия до зрелости.

В случае недостижения запланированного количества беременных животных опыт не считают недействительным, но его результаты оценивают в каждом конкретном случае и рассматривают возможные причинно-следственные связи с изучаемым веществом.

9.2. Каждое P животное маркируют индивидуальным идентификационным номером.

9.3. Оценку эстрального цикла до начала воздействия вещества проводят для самок, которые по данным лабораторных наблюдений не имеют регулярного (4 или 5 дней) эстрального цикла. В таком случае опытные группы увеличивают до такого количества животных, чтобы гарантировать наличие не менее 20 самок в каждой группе с регулярным (4 или 5 дней) эстральным циклом к началу воздействия вещества.

9.4. Потомство F_1 во время первого осмотра новорожденных в первый постнатальный день (PND) 0 или 1 маркируют индивидуальными метками и ведут индивидуальные записи для каждого помета в течение всего исследования для всех животных F_1 и при необходимости F_2 .

10. Информация об изучаемом веществе.

10.1. Анализ имеющейся информации определяет выбор способа введения, растворителя, вида животных, доз и возможных модификаций частоты введения вещества.

10.2. Токсикокинетические данные ранее проведенных исследований также используют при планировании эксперимента, выборе уровней доз и интерпретации результатов.

Особое внимание уделяют сведениям о воздействии изучаемого вещества (или соответствующих метаболитов) на развивающийся плод или детенышей, оценку внутренней дозиметрии, возможную зависимость от дозы насыщения кинетических процессов, метаболические профили, кривые концентрация-время и т. д.

Ориентировочный набор токсикокинетических данных:

- поздние сроки беременности (например, 20-й день) — материнская кровь и кровь плода;
- середина лактации (PND 10) — материнская кровь, кровь детенышей и/или молоко;
- сразу после прекращения материнского питания (например, PND 28) — образцы крови отъемышей.

11. Выбор способа введения проводят с учетом путей поступления, характерных для воздействия вещества на человека. Если вещество вводится не с пищей, то иные способы введения (с питьевой водой, зондом, ингаляционно, через кожу) должны быть обоснованы и описаны в протоколе.

12. Выбор растворителя.

12.1. В случае необходимости изучаемое вещество растворяют или суспензируют в соответствующем растворителе; предпочтительным является водный раствор/суспензия, затем в порядке убывания — масляный раствор/суспензия (кукурузное масло и др.), растворители с известными характеристиками токсичности, стабильностью, влиянием на абсорбцию, распределение, метаболизм или задержку, химические свойства, которые могут изменить характеристики токсичности вещества, влиять на потребление пищи или воды либо на статус питания животных.

12.2. Использование потенциально токсичных растворителей (например, ацетона, ДМСО) должно исключаться.

13. Выбор доз

13.1. Исследование должно включать не менее 3-х дозовых уровней и контроль. При выборе дозовых уровней учитывают информацию о дозах в предыдущих исследованиях, данные токсикокинетики для небеременных животных, степень выделения с молоком и оценку воздействия на людей. Использование высоких дозовых уровней следует избегать, за исключением случаев ожидаемых высоких уровней воздействия на людей.

13.2. Дозовые уровни подбирают с учетом токсических эффектов, за исключением ограничений, обусловленных физико-химической природой изучаемого вещества. Максимальную дозу выбирают с целью вызвать системную токсичность, но не гибель или тяжелые страдания животных.

13.3. Диапазон дозовых уровней выбирают с целью выявить зависимость эффекта от дозы и установить NOAELs (недействующие уровни) или дозы, близкие к ним, чтобы иметь возможность для установления бенчмарк-дозы для наиболее чувствительного показателя. Во избежание большого разброса между NOAELs и LOAELs часто достаточно 2- или 4-кратного интервала между дозами. Дополнительная 4-я группа животных часто предпочтительнее использования очень большого интервала (например, более 10-кратного) между дозами.

13.4. Контрольную группу животных содержат идентично опытным группам животных. Эта группа не подвергается никакому воздействию либо воздействию имитируется, либо контрольные животные получают растворитель в максимальной дозе, если растворитель используется для введения изучаемого вещества.

14. Испытание с предельной дозой.

14.1. Исследования с использованием нескольких дозовых уровней не проводят при отсутствии токсичных эффектов при повторном введении вещества в дозе более 1000 мг/кг веса тела/день либо при наличии данных об отсутствии токсичности для близких по структуре или метаболизму соединений.

14.2. В таких случаях для расширенного изучения репродуктивной функции на одном поколении используют контрольную группу и одну дозы более 1000 мг/кг веса тела/день.

14.3. В случае выявления в этой единственной дозе репродуктивной или связанной с развитием токсичности, возможно проведение дальнейших исследований с меньшими дозами для определения NOAEL. Сокращенная схема исследований допустима при отсутствии данных на воздействие на людей.

15. Процедуры исследования.

Воздействие на потомство

15.1. Предпочтительный способ введения вещества — добавление в корм. При введении с помощью зонда детеныши получают вещество только опосредованно с молоком до прекращения материнского питания и начала прямого введения. В поступлении вещества с кормом или питьевой водой детеныши дополнительно получают изучаемое вещество, когда начинают самостоятельно питаться на последней неделе лактации. Схему исследования модифицируют, если выделение вещества с молоком незначительно и есть вероятность продолжения воздействия вещества на потомство.

График воздействия вещества и введение доз

15.2. Длительность воздействия вещества до спаривания должна быть достаточной для достижения стационарного состояния условий воздействия на Р самцов и самок и составляет, как правило, 2 недели, обеспечивающие эпидидимальный транзит созревающих сперматозоидов, выявление посттестискулярных эффектов на сперматозоиды (во время финальных стадий сперматогенеза и созревания эпидидимальной спермы) при спаривании. На

момент умерщвления исследуют тестикулярную и эпидидимальную гистопатологию и параметры спермы, Р и F₁ самцов.

15.3. При выявлении эффектов у самцов (тестикулярная токсичность, т. е. ухудшение сперматогенеза, нарушения целостности или функции сперматозоидов) и/или у самок (эстральный цикл, сексуальная восприимчивость) возможно использование других сценариев воздействия. Допустимо воздействие на Р самок начинать только после обнаружения сперматозоидов в мазке.

15.4. Изучаемое вещество вводят постоянно 7 дней в неделю до умерщвления. Для всех животных используют одинаковый способ введения. Воздействие продолжают в течение 2-х недель в период спаривания и для Р самок — в течение беременности и лактации до умерщвления после прекращения материнского питания. Самцы получают вещество до умерщвления в то время, когда животные F₁ перестают получать материнское питание. Вскрытию в первую очередь подвергают самок в один и тот же (или близкий) день лактации. Вскрытие самцов может быть отсрочено на большее число дней в зависимости от возможностей лаборатории. Исключая инициированное во время периода лактации прямое воздействие вещества на выбранных F₁ самцов и самок начинают с момента прекращения материнского питания и продолжают до вскрытия (по графику) в зависимости от назначения когорт.

15.5. Вещества, вводимые с диетой или питьевой водой, не должны нарушать нормальное питание или водный баланс и должны вводиться в постоянной концентрации/уровне доз в переводе на массу тела.

15.6. При введении вещества зондом объем одномоментно вводимой жидкости не должен превышать 1 мл/100 г веса тела/0,4 мл/100 г веса тела (масла, например, кукурузного). Варибельность вводимого объема минимизируют подбором концентраций, сохраняя в одном объеме все дозовые уровни. Исключение составляют едкие и раздражающие вещества, у которых при увеличении концентрации таковые свойства могут усугубляться.

Дозу вводимого вещества для взрослых самцов и взрослых небеременных самок рассчитывают индивидуально еженедельно, исходя из массы тела, каждые 2 дня — для беременных самок и для F₁ животных при введении вещества до прекращения материнского питания и в течение 2 недель после его прекращения. В день родов самок не запаивают зондом и не вводят вещество иным способом, при котором животных нужно брать в руки; пропуск введения изучаемого вещества в этот день предпочтительнее нарушения процесса рождения.

Спаривание

15.7. При спаривании 1:1 Р самку помещают с одним произвольно выбранным до подтверждения коитуса или до истечения 2 недель. В случае сомнений в надежности самцов (гибели) возможно повторное использование самцов, ранее участвовавших в спаривании (1:1), чтобы все самки оказались спаренными. День беременности 0 определяют по обнаруженной вагинальной пробке или сперме. Оплодотворенных животных максимально быстро

размещают отдельно. При отсутствии спаривания в течение 2 недель животных размещают раздельно без дальнейшей возможности спаривания. Спарившиеся животные должны быть четко идентифицированы в данных.

Размер помета

15.8. На 4-й день после рождения размер каждого помета регулируют путем уничтожения лишних детенышей, чтобы сохранить в приплоде 5 самцов и 5 самок. Выборочное удаление детенышей, например, на основании величины массы тела, не требуется. Если количество детенышей (самцов или самок) не позволяет сформировать помет в соотношении пять самцов/пять самок, возможно ограничение частичным соответствием (например, 6 самцов и 4 самки).

Выбор детенышей для исследований после прекращения материнского питания

15.9. После прекращения материнского питания (около 21 PND) для дальнейших исследований из детенышей всех пометов отбирают дозируемые группы и контроль, по 20 животных, которых содержат до половой зрелости (если не требуется более раннее завершение эксперимента). Отбор производят методом случайной выборки; малорослые детеныши (массой менее средней соответствующего помета более чем на 2 стандартных отклонения) не являются репрезентативными и для дальнейших исследований не используются.

На 21 PND отобранных F₁ детенышей произвольно распределяют на три когорты:

- когорта 1 (1А и 1Б) = изучение репродуктивной токсичности и токсического действия;
- когорта 2 (2А и 2Б) = изучение нейротоксичности для развивающегося организма;
- когорта 3 = изучение иммунотоксичности для развивающегося организма.

Когорта 1А: 1 детеныш-самец и 1 детеныш-самка/помет/группа (20 животных каждого пола в группе): первоочередной выбор для первичной оценки влияния на репродуктивную систему и общей токсичности.

Когорта 1Б: 1 группа детенышей-самцов и 1 группа детенышей-самок (20 животных каждого пола в группе): первоочередной выбор для последующей оценки репродуктивных характеристик путем спаривания F₁ животных и получения дополнительных гистопатологических данных в случае, если изучается вещество, предположительно влияющее на репродуктивную или эндокринную системы, или если результаты в когорте 1А вызывают сомнения.

Когорта 2А: всего 20 детенышей на группу (10 самцов и 10 самок; 1 детеныш-самец и 1 детеныш-самка/помет) предназначены для нейроповеденческих исследований с последующей оценкой нейрогистопатологии у взрослых.

Когорта 2Б: всего 20 детенышей на группу (10 самцов и 10 самок; 1 детеныш-самец и 1 детеныш-самка/помет) предназначены для оценки нейрогистопатологии после прекращения материнского питания (PND 21 или

PND 22); если количество животных недостаточно, предпочтение отдают распределению животных в когорту 2А.

Когорта 3: всего 20 детенышей на группу (10 самцов и 10 самок; 1 детеныш на помёт, если возможно); дополнительные животные из контрольной группы могут потребоваться для позитивного контроля при исследовании реакции Т-клеток зависимых антител на PND 56±3.

15.10. Если количество детенышей в помёте недостаточно для включения во все когорты, преимущество имеет когорта 1, поскольку она может быть использована для получения поколения F₂. Дополнительные животные могут потребоваться для любой когорты в особых случаях, например, если вещество предположительно является нейро-, иммунотоксикантом, или способно нарушать репродуктивную функцию. Такие детеныши могут использоваться для исследований в разные временные точки или оценки дополнительных показателей. Детеныши, не включенные в когорты, могут быть направлены на клиническую биохимию и некропсию.

Повторное спаривание Р животных

15.11. Повторное спаривание Р животных обычно не рекомендуется, т. к. в этом процессе утрачивается важная информация о числе имплантаций первого помёта (и данных о постимплантационных и перинатальных потерях, индикаторах возможного тератогенного потенциала). Если требуется подтвердить/объяснить эффект воздействия вещества на самок, рекомендуется расширить исследование за счет включения спаривания F₁ поколения животных. При этом второе спаривание Р самцов с интактными самками дает возможность уточнения сомнительных результатов или дальнейшей характеристики эффектов на фертильность, наблюдавшихся при первом спаривании.

Прижизненные наблюдения

16. Клинические наблюдения.

16.1. Общие клинические наблюдения за Р и выбранными F₁ животными проводят 1 раз в день, при введении зондом — до и после введения (для выявления возможных эффектов, связанных с пиком концентрации вещества в плазме). Изменения поведения в родах, трудные или длительные роды и все признаки токсичности фиксируют. Всех животных осматривают 2 раза в день, в выходные дни — 1 раз в день на предмет выявления тяжелой интоксикации, заболевания или гибели.

16.2. Еженедельно проводят дополнительное более детальное обследование всех Р и F₁ животных (после прекращения материнского питания), которое совмещают со взвешиванием для минимизации стресса, возникающего у животного, когда его берут на руки. Осмотры проводят с осторожностью и регистрируют данные с использованием систем, имеющихся в исследовательской лаборатории. Вариации условий исследования должны быть минимальны.

Отмечаемые признаки интоксикации должны включать, как минимум, изменения кожи, шерсти, глаз, слизистых оболочек, наличие секрета и экскреции и автономной активности (слезотечение, пилоэрекция, размер

зрачка, необычные дыхательные движения), изменения походки, позы, отношения к уходу, наличие клонических или тонических движений, стереотипия (слишком интенсивный груминг, повторяющиеся круговые движения) или странное поведение (самоповреждение, движение задом наперед).

16.3. Р животных взвешивают в день начала введения вещества и затем, как минимум, 1 раз в неделю; Р самок — в течение лактации в дни взвешивания детенышей их помета; всех животных F_1 — индивидуально в день прекращения материнского питания (PND 21) и затем еженедельно. Массу тела определяют также в день достижения половой зрелости (завершение отделения крайней плоти или раскрытие вагины) и при умерщвлении.

16.4. Потребление пищи и воды (в случае введения вещества с питьевой водой) учитывают еженедельно в день взвешивания животных. Потребление пищи каждой клеткой F_1 животных учитывают еженедельно, начиная с формирования когорт.

Эстральный цикл

16.5. Предварительная информация о влиянии изучаемого вещества на эстральный цикл, полученная в предварительных исследованиях с повторным введением вещества, используется при разработке специфических условий расширенного изучения репродуктивной токсичности.

Оценку эстральной цикличности (по вагинальной цитологии) начинают с момента начала воздействия вещества и продолжают до успешного спаривания или до истечения 2 недель периода спаривания. У отсортированных по нормальным эстральным циклам самок мазки продолжают брать и после начала воздействия вещества, но при появлении неспецифических эффектов (снижение потребления пищи и др.) возможно дополнительное время для адаптации к воздействию вещества в течение около 2 недель до начала 2-недельного периода взятия мазков, предшествующего спариванию. В этом случае период воздействия на самок увеличивается (до 4-х недель перед спариванием), в опыт следует брать более молодых животных и учитывать увеличение времени воздействия вещества на самцов перед спариванием. При взятии вагинальных/цервикальных клеток следует проявлять осторожность, чтобы не вызвать повреждения слизистой оболочки с последующей индукцией псевдобеременности.

16.6. Вагинальные мазки исследуют ежедневно у всех F_1 самок когорты 1А с момента раскрытия вагины до первого обнаружения ороговевших чешуек в мазке для определения интервала между этими двумя событиями. Эстральные циклы для всех F_1 самок в когорте 1А наблюдают в течение 2 недель, начиная примерно с PND 75. Кроме того, при необходимости спаривания поколения F_1 исследование вагинальной цитологии в когорте 1Б проводят с момента образования пар животных до подтверждения спаривания.

Спаривание и беременность

16.7. В дополнение к стандартным показателям (масса тела, потребление пищи, клинические наблюдения с регистрацией смертности/заболеваемости) фиксируют даты образования пар, оплодотворения и родов, рассчитывают

прекоитальный интервал (образование пары — оплодотворение) и длительность беременности (оплодотворение — роды). Р самок тщательно исследуют во время ожидаемых родов для выявления каких-либо признаков дистоции. Любые аномалии в гнездовом поведении или уходе за потомством регистрируют.

16.8. День наступления родов — день лактации 0 (LD 0) для материнских особей и постнатальный день 0 (PND 0) для потомства. Как вариант все сравнения могут быть основаны на посткоитальном времени для исключения искажения данных постнатального развития из-за различий в продолжительности беременности; но и время родов регистрируют, особенно если изучаемое вещество влияет на продолжительность беременности.

Параметры потомства

16.9. Каждый помёт исследуют максимально скоро после родов (PND 0 или 1) для установления числа и пола детёнышей, мертворожденных, явных аномалий: внешне видимые уродства (волчья пасть), подкожные геморрагии, аномальная окраска или текстура кожи, наличие пуповины, отсутствие молока в желудке, высохшие выделения. В первое клиническое обследование новорожденных включают качественную оценку температуры тела, степени активности и реакции на взятие в руки. Детёнышей, найденных мертвыми день PND 0 или позднее, исследуют на возможные дефекты и выясняют причину смерти. Живых детёнышей подсчитывают и взвешивают индивидуально на PND 0 или PND 1, а затем регулярно на 4; 7; 14 и 21 дни после рождения. Клинические обследования проводят при взвешивании потомства или более часто, если при рождении были обнаружены специфические изменения. Отмеченные симптомы включают, как минимум, внешние уродства, изменения кожи, шерсти, глаз, слизистых оболочек, наличие выделений и автономной активности; изменения походки, позы, отношения к взятию в руки, наличие клонических или тонических движений, стереотипия или странное поведение; все полученные данные фиксируют.

16.10. Аногенитальное расстояние (AGD) у каждого детёныша измеряют, как минимум, 1 раз в период от PND 0 до PND 4, взвешивают в день измерения AGD; полученное значение AGD стандартизируют с размерами детёнышей (например, через корень кубический из массы тела). На PND 12 или 13 контролируют наличие сосков/околососковых кружков у детёнышей-самцов.

16.11. Всех отобранных F₁ животных ежедневно исследуют на отделение слизистой оболочки препуция от основания полового члена/раскрытие вагины для самцов и самок соответственно; начинают на 1 день ранее ожидаемого появления этих показателей, чтобы выявить раннее наступление сексуальной зрелости. Отмечают любые аномалии половых органов (персистентные вагинальные нити, гипоспадия или расщепление полового члена). Сексуальную зрелость F₁ животных сравнивают с физическим развитием путем определения возраста и массы тела при отделении слизистой оболочки препуция от основания полового члена или раскрытии вагины для самцов и самок соответственно.

Последующее изучение потенциальной репродуктивной токсичности (когорты 1Б)

16.12. Когорта 1Б животных может получать изучаемое вещество до PND 90 и если необходимо использоваться для получения поколения F₂. Самцов и самок из одной дозовой группы размещают попарно (избегая спаривания потомства одних и тех же родителей) на 2 недели начиная с PND 90 или позже, но не позднее PND 120. Процедура аналогична спариванию Р животных; допускается наблюдение за потомством до PND 4, не продлевая эксперимент до прекращения материнского питания или более.

17. Оценка потенциальной нейротоксичности на развивающемся организме (когорты 2А и 2Б).

17.1. Десять самцов и десять самок когорты 2А и 10 самцов и 10 самок когорты 2Б из каждой группы, получающих изучаемое вещество (для каждой когорты: 1 самец и 1 самка на помет; все пометы представлены по крайней мере 1 детенышем; выбираются произвольно), используют для нейротоксикологических исследований. На когорте 2А животных изучают слуховой испуг, моторную активность, проводят функциональные наблюдения и нейрпатологические оценки; при этом вариации условий эксперимента должны быть минимальными и не иметь постоянной связи с воздействием вещества. На поведение животных могут влиять уровень шума, температура, освещенность, запахи, время дня и отвлекающие внимание факторы окружающей среды. Результаты нейротоксикологических оценок интерпретируют с учетом соответствующих исходных контрольных уровней. Когорту 2Б используют для оценки нейрпатологии на PND 21 или PND 22.

17.2. Изучение слухового испуга выполняют на PND 24 (± 1) с использованием когорты 2А, выбирают один день для экспериментальных и контрольных групп. Каждая сессия состоит из 50 опытов. При выполнении теста слухового испуга среднюю амплитуду ответа определяют для каждого блока из 10 опытов (5 блоков по 10 опытов) в условиях тестирования, оптимальных для привыкания внутри сессии (согласно OECD TG 426).

17.3. В соответствующее время между PND 63 и PND 75 когорту 2А животных исследуют с помощью батареи функциональных наблюдений и автоматизированного теста моторной активности (согласно OECD TG 424 и 426). Батарея функциональных наблюдений включает полное описание внешнего вида животного, поведения и функциональной целостности, которые изучают путем наблюдений за животным в домашней клетке после переноса на стандартную арену наблюдений (открытое поле), где животное свободно передвигается, и посредством манипуляционных тестов. Тестирование проводят от менее к более интерактивному. Перечень показателей приведен в приложении 2. Всех животных внимательно наблюдают опытные специалисты, желательно одни и те же, для минимизации влияния на животных используют стандартизованные процедуры. Для каждого параметра батареи используют экспериментально установленные шкалы, критерии расчета и количественные оценки результатов наблюдений. Моторную активность каждого животного изучают индивидуально, длительность сессии должна

включать время приспособления контрольных животных к режиму исследований. Моторную активность измеряют аппаратом автоматической регистрации активности, способным выявлять и ее возрастание, и снижение, и сравнивают со средним базовым уровнем. Используемые для измерений устройства должны быть протестированы по стандартным процедурам, чтобы гарантировать надежность работы приборов и различных дней исследования. Группы животных, получающих изучаемое вещество, балансируют по времени, чтобы избежать влияния на активность циркадных ритмов.

17.4. При необходимости возможно применение других/ дополнительных функциональных тестов (сенсорных, социальных, когнитивных), выполняющихся на тех же животных, что и стандартные тесты, но они не должны нарушать целостности стандартных. Дополнительные процедуры особенно полезны при наличии эмпирических наблюдений, ожидаемых эффектов или механизма действия, указывающих на специфический тип нейротоксичности.

18. Оценка потенциальной иммунотоксичности на развивающемся организме (когорты 3).

18.1. На PND 56 (± 3 дня) 10 самцов и 10 самок когорты 3 животных из каждой экспериментальной группы (1 самец и 1 самка на помет, все пометы представлены хотя бы 1 детенышем, произвольно выбранным) используют в исследовании Т-клеточно-зависимой реакции антител, т. е. первичного иммунного ответа IgM антител на Т-клеточно-зависимый антиген, например, эритроциты овцы (SRBC) или гемоцианин фиссуреллы (KLH), в соответствии с общепринятыми процедурами изучения иммунотоксичности. Реакцию оценивают подсчетом специфических бляшкообразующих клеток (PFC) в селезенке либо определением титра SRBC- или KLH-специфичных IgM антител в сыворотке методом иммуноферментного анализа ELISA на пике реакции, которая достигает пика на 4-й (PFC) или 5-й (ELISA) день после внутривенного введения. Если первичный иммунный ответ определяют путем подсчета бляшкообразующих клеток, допустимо оценивать подгруппы животных в разные дни при условии, что иммунизация и умерщвление подгрупп распределены во времени так, чтобы PFC подсчитывались на пике реакции; подгруппы содержат равное число самцов и самок из потомства всех дозовых групп, включая контроль; животные в подгруппах примерно одного постнатального возраста. Воздействие изучаемого вещества продолжают до дня, предшествующего отбору селезенки для реакции PFC или сыворотки ELISA анализа.

19. Исследования при умерщвлении животных.

19.1. Клиническая биохимия/гематология.

19.1.1. Системные эффекты контролируют у всех Р животных. Кровь, взятую при умерщвлении у 10 произвольно выбранных Р самцов и самок из каждой экспериментальной группы, используют для частичного либо полного гематологического анализа, клинической биохимии, анализа Т4 или TSH или исследований, предлагаемых профилем известных эффектов изучаемого вещества. Оценке подлежат следующие гематологические параметры:

гематокрит, концентрация гемоглобина, количество эритроцитов, общий лейкоцитоз и лейкоцитарная формула, содержание тромбоцитов и время свертывания крови. Исследования плазмы или сыворотки включать: глюкозу, общий холестерин, мочевины, креатинин, общий белок, альбумин и не менее двух ферментов — индикаторов гепатоцеллюлярных эффектов (аланинаминотрансфераза, аспартатаминотрансфераза, щелочная фосфатаза, (-глутамилтранспептидаза и сорбитолдегидрогеназа), дополнительно при необходимости — ферменты и желчные кислоты. Кроме того, кровь от всех животных может быть отобрана и храниться для анализов в более позднее время, необходимых для прояснения неоднозначных эффектов или получения иных данных. Образцы крови забираются сразу до или во время умерщвления, если второе спаривание Р животных не планируется. В случае продолжения эксперимента образцы крови отбирают за несколько дней до второго спаривания животных.

При доказанности данных после повторного введения вещества об отсутствии эффектов на показатели крови и сыворотки до умерщвления животных проводят анализ мочи по следующим показателям: внешний вид, объем, осмотическое давление и удельный вес, рН, белок, глюкоза, кровь и клетки крови, клетки некротической ткани. Мочу также могут собирать для мониторинга экскреции изучаемого вещества и/или его метаболита(ов).

19.1.2. Системные эффекты отслеживают у F_1 животных. Кровь, отобранную натошак при умерщвлении у 10 произвольно выбранных в когорте 1А самцов и самок из каждой экспериментальной группы, используют для стандартной клинической биохимии, включая оценку уровня сыворотки гормонов щитовидной железы (Т4 и TSH), гематологические параметры (общий лейкоцитоз и лейкоцитарная формула плюс количество эритроцитов) и анализ мочи.

19.1.3. Излишек детенышей на PND 4 является предметом некропсии и может использоваться для измерения концентраций в сыворотке гормона Т4 щитовидной железы. При необходимости неонатальная (PND 4) кровь пометов объединяется для биохимического анализа или определения гормонов щитовидной железы. Кровь для исследования Т4 и TSH отбирается также при некропсии на PND 22 (F_1 детеныши, не включенные в когорты).

19.2. Параметры спермы.

19.2.1. Параметры спермы измеряют у всех самцов поколения Р, если только нет данных об отсутствии эффектов на сперму в 90-дневном опыте. Исследования спермы проводят во всей когорте 1А самцов.

19.2.2. При умерщвлении регистрируют массу семенников и эпидидимисов всех Р и F_1 (когорты 1А) самцов. Как минимум один семенник и один эпидидимис сохраняют для гистопатологического изучения, а оставшиеся эпидидимисы используют для определения резервов сперматозоидов в хвосте эпидидимиса, при этом сперму из хвоста эпидидимиса забирают с использованием методов, минимизирующих повреждение, не изменяющих подвижность и морфологию сперматозоидов.

19.2.3. Подвижность сперматозоидов оценивают или непосредственно по умерщвлении или сохраняют для более поздних анализов. Процент активно двигающихся сперматозоидов определяют или субъективно, или объективно с помощью компьютерных методов. Для оценки морфологии сперматозоидов образец эпидидимальной спермы изучают в фиксированном препарате с выборкой не менее 200 сперматозоидов, которые классифицируют как нормальные или аномальные. К морфологическим аномалиям спермы относят слипание, отсутствие хвоста, деформации головок и хвостов, при этом деформация или увеличение головок сперматозоидов свидетельствует о дефектах сперматогенеза.

19.2.4. Если образцы спермы замораживают, то подвижность изучают во время некропсии, допускается производить анализ только для контрольных самцов и получавших наивысшую дозу вещества. В случае выявления эффектов, связанные с воздействием изучаемого вещества, образцы спермы исследуют во всех опытных группах.

20. Некропсия.

20.1. Всех умерщвленных или погибших во время эксперимента всех Р и F₁ животных исследуют макроскопически для выявления структурных аномалий или патологических изменений, особое внимание при этом уделяют органам репродуктивной системы. Умерщвленных из гуманных соображений (состояние агонии) и погибших детенышей подсчитывают и при отсутствии мацерации исследуют на выявление возможных дефектов и/или причины гибели; полученные данные фиксируют.

20.2. У взрослых Р и F₁ самок в день некропсии исследуют вагинальные мазки для выявления фазы эстрального цикла и корреляции с гистопатологией репродуктивных органов. Матки всех Р самок (и F₁, если необходимо) изучают на наличие и число мест имплантации способом, не нарушающим гистопатологических оценок.

Масса органов и фиксирование тканей — Р и F₁ животные

20.3. Во время умерщвления масса тела и масса органов, перечисленных ниже, всех животных Р и всех взрослых животных F₁ из соответствующих когорт (как это описано ниже) определяется как можно раньше после вскрытия, чтобы избежать высыхания. Органы консервируют при соответствующих условиях. Как правило, парные органы взвешивают совместно, если только нет специальных требований:

- матка (с трубами и шейкой), яичники;
- семенники, эпидидимисы (целиком и хвосты для образцов, используемых для подсчета сперматозоидов);
- простата (дорзолатеральная и вентральная части вместе). Выделение комплекса простаты должно проводиться с осторожностью, чтобы избежать повреждения семенных пузырьков, наполненных жидкостью. В случае связанного с воздействием вещества изменения общей массы простаты дорзолатеральный и вентральный сегменты должны быть тщательно выделены после фиксации и взвешены отдельно;

- семенные пузырьки с коагулирующими железами и их жидкости (как одна единица);

- головной мозг, печень, почки, сердце, селезенка, вилочковая железа, щитовидная железа (после фиксации), гипофиз, надпочечники и известные критические органы или ткани.

20.4. Дополнительно консервируют в соответствующих условиях образцы периферических нервов, мышц, спинного мозга, глаз со зрительными нервами, желудочно-кишечного тракта, мочевого пузыря, легких, трахеи (с прикрепленными щитовидной и паращитовидной железами), костного мозга, семявыводящих протоков (самцы), молочных желез (самцы и самки) и вагины.

20.5. В когорте животных 1А все органы взвешивают и сохраняют для гистопатологических исследований.

20.6. Для выявления индуцированных пре- и постнатальных иммунотоксических эффектов 10 самцов и 10 самок когорты 1А из каждой экспериментальной группы (1 самец и 1 самка на помет, все пометы представлены, по крайней мере, 1 детенышем, произвольно выбранным) исследуют при умерщвлении следующим образом:

- взвешивают лимфоузлы, ассоциированные и не ассоциированные с путем поступления вещества в организм (в дополнение к весу надпочечников, вилочковой железы и селезенки, уже измеренному у всех животных когорты 1А);

- анализируют субпопуляции лимфоцитов селезенки (CD4+ и CD8+ Т-лимфоцитов, В-лимфоцитов и киллеров) с использованием половины селезенки, а вторую половину сохраняют для гистопатологических исследований.

При анализе субпопуляций лимфоцитов селезенки у неиммунизированных животных (когорта 1А) определяют связь воздействия вещества с изменением в иммунологическом равновесном состоянии распределения «хелперов» (CD4+) или цитотоксичностью (CD8+) лимфоцитов вилочковой железы, или с естественными киллерами (NK) клеток (быстрая ответная реакция на опухолевые клетки и патогены).

20.7. В когорте 1Б животных взвешивают следующие органы и подвергают анализу соответствующие ткани, представленные в перечне:

- вагина (не взвешивается);
- матка с шейкой;
- яичники;
- семенники (не менее одного);
- эпидидимисы;
- семенные пузырьки и коагулирующие железы;
- простата;
- гипофиз;
- выявленные органы-мишени.

Гистопатологию в когорте 1Б изучают, если полученные результаты для когорты 1А вызывают сомнения, или вещество предположительно является репродуктивным либо эндокринным токсикантом.

20.8. Когорты 2А и 2Б: изучение нейротоксичности (PND 21 или PND 22 и взрослое потомство).

Животных когорты 2А умерщвляют после изучения поведенческих реакций, проводят определение массы головного мозга и полное нейрогистопатологическое исследование для выявления нейротоксичности. Когорту животных 2Б умерщвляют на PND 21 или PND 22, определяют массу головного мозга и микроскопически его изучают для выявления нейротоксичности. Перфузионная фиксация требуется для когорты 1А, но не обязательна для когорты 2Б (по OECD TG 426).

Взвешивание органов и сохранение тканей — F₁ отъемыши

20.9. Детенышей, не отобранных в когорты, включая самых маленьких и слабых, умерщвляют после прекращения материнского питания на PND 22, если только результаты не требуют дальнейших прижизненных исследований. Умерщвленных животных используют для некропсии, включая изучение репродуктивных органов (см. выше). У не менее 10 детенышей каждого пола и каждой экспериментальной группы (максимальная выборка пометов) взвешивают головной мозг, селезенку, вилочковую железу и сохраняют в соответствующих условиях. Кроме того, возможно консервирование для последующих микроскопических анализов (см. GD151) ткани молочных желез этих детенышей (самцов и самок) явные аномалии и органы-мишени сохраняют для возможного гистологического исследования.

21. Гистопатология Р животных.

Полное гистопатологическое исследование органов проводят для всех животных, получавших максимальную дозу вещества, и контрольных Р животных. Органы, в которых выявлены изменения, связанные с воздействием изучаемого вещества, исследуют и у животных, получавших вещество в меньших дозах, с целью установления NOAEL.

Дополнительно гистопатологическому анализу подвергают репродуктивные органы всех животных с потенциально низкой фертильностью (например, оказавшихся не способными к спариванию, оплодотворению, осеменению или рождению здорового потомства) или выявленными нарушениями эстральной цикличности, или количества, подвижности, морфологии сперматозоидов, а также все явные патологические изменения.

22. Гистопатология F₁ животных.

22.1. Когорта животных 1.

22.1.1. Полное гистопатологическое исследование органов проводят для всех животных, получавших максимальную дозу вещества, и контрольных взрослых животных когорты 1. Все пометы должны быть представлены хотя бы одним животным каждого пола. Органы и ткани, в которых выявлены изменения, связанные с воздействием изучаемого вещества, и все явные патологические признаки исследуют также у животных, получавших вещество в меньших дозах, с целью установления NOAEL. Для оценки пре- и постнатальных эффектов воздействия вещества на лимфоидные органы проводят гистопатологические исследования образцов лимфатических узлов и костного мозга, отобранных у 10 самцов и 10 самок когорты 1А, в дополнение

к уже проведенной для всех 1А животных оценке вилочковой железы, селезенки и надпочечников.

22.1.2. Репродуктивные и эндокринные ткани всех животных когорты 1Б исследуют гистопатологически в случаях, если изучаемые вещества являются потенциальными репродуктивными и эндокринными токсикантами. Когорту 1Б подвергают гистопатологическому анализу, если результаты для когорты 1А вызывают сомнение.

22.1.3. Яичники взрослых самок должны содержать примордиальные и растущие фолликулы, а также желтые тела, гистопатологическое исследование должно быть направлено на количественную оценку примордиальных, мелких растущих фолликулов и желтых тел у F₁ самок; выбор срезов яичников и размер срезов должны соответствовать используемой процедуре статистической оценки. Подсчет фолликулов может быть проведен вначале у контрольных животных и в группе животных, получавших максимальную дозу вещества, а в случае выявления неблагоприятного действия у последних — и у животных, получавших меньшие дозы. Исследования включают подсчет количества примордиальных фолликулов, которые могут быть объединены с мелкими растущими фолликулами, и сравнение яичников контрольных и опытных животных. Оценку желтых тел проводят параллельно с изучением эстральной цикличности, чтобы учитывать стадию цикла. Маточную трубу, матку и вагину изучают в плане соответствующего органо-типического развития.

22.1.4. Детальное изучение тестикулярной гистопатологии проводят у F₁ самцов для выявления вызванных воздействием изучаемого вещества эффектов на дифференцировку и развитие семенников и на сперматогенез. Если возможно, исследуют срезы гайморовой сети каналов. Головку, корпус и хвост эпидидимиса и семявыводящий проток исследуют на соответствующее органотипическое развитие в дополнение к параметрам, необходимым для Р самцов.

22.2. Когорта животных 2.

22.2.1. Нейрогистопатологические исследования выполняют для всех животных, получавших максимальную дозу вещества, и контрольных животных когорты 2А обоего пола по завершении нейрорповеденческого тестирования (после PND75, но не позднее PND 90). Гистопатологическое изучение головного мозга проводят для всех животных, получавших максимальную дозу вещества, и контрольных животных когорты 2Б обоего пола на PND21 или PND 22. Органы и ткани, в которых обнаружены изменения, связанные с действием испытуемого вещества, исследуют и у животных, получавших вещество в меньших дозах, для определения NOAEL. В когортах 2А и 2Б у животных исследуют многослойные срезы головного мозга для изучения обонятельных луковиц, коры больших полушарий, гиппокампа, базальных ядер, таламуса, гипоталамуса, среднего мозга (цекум, покрывка, ножки мозга), ствола головного мозга и мозжечка. В когорте 2А исследуют только глаза (сетчатка и зрительный нерв) и образцы

периферических нервов, мышц и спинного мозга. Все нейрогистологические процедуры должны соответствовать требованиям OECD 426.

22.2.2. Морфометрическую (количественную) оценку проводят на репрезентативных участках головного мозга (гомологичные срезы тщательно отбирают на основе надежных точек микроскопирования) и включают линейные и/или ареальные измерения конкретных областей головного мозга. Для выбора наиболее репрезентативного среза при изучении конкретного участка головного мозга делают не менее трех последовательных срезов каждой точки (уровня), репрезентативность полученных срезов оценивает нейроморфолог. Негомологичные срезы не используют.

Выборка особей для репрезентативной оценки составляет по 10 каждого пола на каждый дозовый уровень, но адекватным может быть использование меньшего числа образцов. Недостаточным для целей таких исследований считают образцы менее чем 6 животных каждого пола на дозовый уровень.

Стереологию используют для идентификации связанных с воздействием вещества эффектов (объем/количество клеток в отдельных нейроанатомических областях). Условия приготовления образцов тканей (фиксация тканей, приготовление срезов, проводка и окрашивание препаратов) должны быть репрезентативными для каждой из дозовых групп.

Если морфометрический и стереологический анализ не проводят, то ткани головного мозга животных всех дозовых уровней одновременно заливают соответствующей средой в избежание артефактов сморщивания, связанных с длительным хранением в фиксаторе.

ГЛАВА 7 ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ И ОТЧЕТ

1. *Оценка токсического действия на пренатальное развитие (Руководство № 414).*

1.1. Данные об испытании

1.1.1. Индивидуальные данные сводят в таблицу, демонстрирующую для каждой экспериментальной группы и каждого поколения количество животных в начале испытания; количество животных, обнаруженных мертвыми в ходе испытания или умерщвленных из гуманных соображений; время любой гибели или умерщвления; количество беременных особей; количество животных с признаками токсичности, описание наблюдаемых признаков токсичности, в т. ч. время появления, продолжительность и тяжесть любых токсических эффектов, тип наблюдений плода и все соответствующие данные для помета.

1.1.2. Количественные результаты оценивают общепринятыми статистическими методами с использованием помета в качестве единицы для анализа данных. Учитывают и включают в значения для групп данные животных, не доживших до запланированного умерщвления.

1.2. Оценка результатов.

1.2.1. Результаты испытаний токсичности для пренатального развития оценивают с точки зрения наблюдаемых эффектов.

1.2.2. Оценка включает следующую информацию:

- результаты испытаний для материнской особи и плода с учетом зависимости тяжести эффектов от вводимой дозы;
- критерии, используемые для классификации (изменения мягких тканей, скелета плода и пр.);
- контрольные данные предшествующих исследований;
- численность эффектов и показателей;
- статистический анализ результатов с информацией о методе анализа (для независимой экспертизы).

1.2.3. Для испытаний, демонстрирующих отсутствие токсических эффектов, необходимо предусмотреть дальнейшие исследования для оценки поглощения и биологической доступности испытуемого вещества.

2. Отчет об испытании должен включать следующие данные:

2.1. Исследуемое вещество: физическая природа и при необходимости физико-химические свойства; идентификация, в т. ч. номер CAS, если он известен и/или установлен; чистота.

2.2. Растворитель (при необходимости): обоснование выбора растворителя, за исключением воды.

2.3. Экспериментальные животные: используемый вид; количество и возраст животных; источник, условия содержания и кормления и пр.; индивидуальная масса животных в начале испытания.

2.4. Условия проведения испытания: обоснование выбора уровня доз; подробности приготовления исследуемого вещества, подготовки диеты, достигаемые концентрации, стабильность и однородность вводимого препарата; подробности введения испытуемого вещества; перевод содержания тестируемого вещества в пищу/питьевой воде (ppm) в фактическую дозу (мг/кг массы тела в день) при необходимости; условия окружающей среды; качество пищи и воды.

3. Результаты испытания.

Ответ материнской особи на вводимые дозы, включая, но не ограничиваясь:

- количество животных в начале испытания, количество выживших животных, количество беременных животных, количество выкидышей и преждевременных родов;

- день гибели во время испытания или количество животных, доживших до умерщвления;

- данные животных, которые не доживают до запланированного умерщвления, необходимо сообщать, но не использовать для статистических сравнений между группами;

- день наблюдения любого аномального клинического признака и его последующее развитие;

- масса тела, изменение массы тела и массы беременной матки, в т. ч. при необходимости изменение массы тела с поправкой на массу беременной матки;

- потребление пищи и воды, если проводились такие оценки;

- результаты аутопсии, в т. ч. масса матки;

- значения NOAEL токсичности для материнской особи и токсичности для развивающегося организма.

Показатели токсичности для развития помета с имплантатами, в т. ч.:

- количество желтых тел;
- количество имплантаций, количество и процент живых и мертвых плодов и резорбций;
- количество и процент потерь до и после имплантации.

Показатели токсичности по дозам для развития помета с живым плодом, в т. ч.:

- количество и процент живого потомства;
- соотношение полов;
- масса тела плода, предпочтительно с разбивкой по полу;
- пороки внешнего развития, развития мягких тканей и скелета и другие соответствующие изменения;
- критерии для классификации (при необходимости);
- общее количество и процент плодов и помета с любыми внешними изменениями, изменениями мягких тканей или скелета, а также виды и случаи отдельных аномалий и других соответствующих изменений.

Обсуждение результатов. Выводы

4. Интерпретация результатов

Изучение токсичности для пренатального развития позволяет получить информацию о влиянии повторного перорального воздействия вещества в период беременности. Результаты исследования рассматривают в совокупности с данными испытаний субхронической токсичности, репродуктивной токсичности, токсикокинетических и других исследований. Особое внимание уделяют как общей токсичности, так и токсичности для развивающегося организма, результаты исследования позволяют разделять эффекты для развития организма; происходящие в отсутствие общей токсичности, и эффекты, проявляющиеся только на уровнях, которые также являются токсичными для материнских особей.

5. Испытания по оценке репродуктивной токсичности на одном поколении (Руководство № 415).

5.1. Данные об испытании.

5.1.1. Данные сводят в таблицы с указанием количества животных на начало эксперимента в каждой группе, фертильных самцов, беременных самок; типов изменений и процентного соотношения животных, демонстрирующих каждый тип изменений.

5.1.2. Численные результаты обрабатывают общепринятым статистическим методом.

5.2. Отчет об испытании должен включать следующие данные:

5.2.1. Используемые виды/линии.

5.2.2. Токсические реакции с указанием пола и дозы, включая фертильность, беременность и жизнестойкость.

5.2.3. Время гибели в ходе эксперимента; если животное выжило, время запланированного умерщвления или факт умерщвления по окончании эксперимента.

5.2.4. Таблицы, демонстрирующие массу каждого потомка: среднюю массу новорожденных и индивидуальную массу новорожденных на конец испытания.

5.2.5. Токсические или другие эффекты в отношении репродуктивной функции, потомство и постнатальное развитие.

5.2.6. Даты наблюдения за каждым аномальным случаем и его последующее течение.

5.2.7. Масса тела животных линии Р.

5.2.8. Данные аутопсии.

5.2.9. Подробное описание данных микроскопического исследования.

5.2.10. Статистическая обработка результатов, если необходимо.

5.2.11. Обсуждение результатов.

5.2.12. Интерпретация результатов.

5.3. Интерпретация результатов.

Изучение репродуктивной токсичности дает информацию об эффектах повторного орального воздействия вещества. Результаты исследования рассматривают совместно с данными субхронического, тератогенного и других исследований. Экстраполяция результатов на людей действительна до определенной степени, результаты исследования могут дать полезную информацию о недействующих и допустимых уровнях воздействия на организм человека.

6. Расширенное изучение репродуктивной токсичности на одном поколении (Руководство № 443).

6.1. Полученные данные.

6.1.1. Данные представляют индивидуально для каждого животного, обобщают в табличной форме: число животных (в начале исследования, найденных погибшими в течение эксперимента или умерщвленных из гуманных соображений), время гибели или умерщвления, число фертильных, беременных и родивших живых детенышей самок, число животных с признаками интоксикации; приводят описание токсического действия, включая время, длительность и тяжесть его проявления.

6.1.2. Количественные результаты оценивают общепринятыми статистическими методами, позволяющими оценить данные с распределением, отличающимся от нормального (счетные), усеченные данные (ограниченное время наблюдения), зависимости (действие на приплод и повторные измерения) и неодинаковую дисперсию. Отчет должен включать достаточную информацию об использованных методах анализа и компьютерных программах, чтобы независимый рецензент/статистик мог оценить их или провести повторные анализы.

6.2. Оценка результатов.

6.2.1. Показатели оценивают в единицах измерения наблюдавшихся эффектов, включая данные некропсии и микроскопии. Оценка включает

выявление зависимостей или их отсутствия между дозой и наличием, частотой возникновения и выраженностью нарушений, в т. ч. явных патологических изменений, критические органы, фертильность, клинические нарушения, показатели репродуктивности и плодовитости, изменения массы тела, гибель и другие токсические эффекты, действие на развитие потомства. Особое внимание обращают на изменения, связанные с полом животных. При оценке принимают во внимание физико-химические свойства изучаемого вещества, и при возможности, токсикокинетические данные, включая плацентарный перенос выделения с молоком.

6.3. Отчет об исследовании.

6.3.1. Отчет должен включать следующую информацию, полученную в исследовании на P, F₁ и F₂ животных (если необходимо).

Изучаемое вещество: вся имеющая отношение к веществу доступная информация, токсикокинетические и токсикодинамические характеристики изучаемого вещества; идентификационные данные; чистота.

Растворитель (если применялся): обоснование выбора растворителя, отличного от воды.

Используемые животные: вид/линия, использованные в эксперименте; число, возраст и пол животных; источник, условия содержания, диета, материалы для гнезда и т.д.; индивидуальная масса животных в начале исследования; результаты вагинальных мазков для P самок перед началом воздействия вещества (если данные в это время были собраны); сведения о спаривании P поколения с указанием пар самцов и самок, участвовавших в спаривании, и тех пар, у которых спаривание оказалось успешным; исходные подсчеты детенышей для взрослого F₁ поколения животных.

Условия исследования: аргументация выбора уровней доз; детали подготовки вещества для изучения/приготовление диеты, полученные концентрации; стабильность и гомогенность вещества в растворителе или несущей среде (например, в диете, питьевой воде), в крови/молоке в условиях использования и хранения между использованиями; детали введения изучаемого вещества; пересчет концентраций изучаемого вещества в диете/питьевой воде (ppm) на дозы (мг/кг массы тела/день), если нужно; детали качества корма и воды (включая состав диеты, если известен); детальное описание процедуры рандомизации отбраковки детенышей и распределения в экспериментальные группы; условия окружающей среды; список персонала, включая профессиональное обучение.

Результаты (обобщение и индивидуальные данные в зависимости от пола и дозы); потребление пищи, потребление воды, если требуется, эффективность питания (привес массы тела на 1 г потребления пищи, исключая периоды сообитания и лактации) и поступление изучаемого вещества (для введения с кормом/питьевой водой) для P и F₁ животных; данные об абсорбции вещества (если имеются); данные о массе тела для P животных; данные о массе тела для F₁ животных, выбранных после прекращения материнского питания; время гибели во время исследования или умерщвления выживших животных в конце исследования; природа, тяжесть и длительность клинических нарушений

(обратимых или необратимых); данные гематологии, анализов мочи и клинической химии, включая TSH и T4 ; фенотипический анализ клеток селезенки (Т-, В-, НК-клетки); насыщенность клетками костного мозга; данные токсических реакций; число Р и F₁ животных с нормальной и нарушенной длительностью эстрального цикла; время спаривания (прекоитальный интервал, число дней между образованием пар и спариванием); токсическое и другое влияние на репродукцию, включая число и процент животных, которые завершили спаривание, беременность, роды и лактацию, а также самцов, оплодотворивших самок, и самок с признаками дистоции/длительных или трудных родов; длительность беременности и при наличии родов; число имплантаций, размер помета и процент детенышей — самцов; число и процент постимплантационных потерь, живо- и мертворождений; масса помета и масса детенышей (самцов, самок отдельно и вместе), число детенышей со слишком малым весом, если такие были; число детенышей с явными видимыми аномалиями; токсическое и другое влияние на потомство, постнатальное развитие, жизнеспособность и т. д.; данные о физических показателях детенышей и другие данные постнатального развития; данные о половом созревании F₁ животных; данные о функциональных наблюдениях у детенышей и взрослых, если требуются; масса тела при умерщвлении и абсолютная и относительная масса органов для Р и F₁ животных; данные некропсии; детальное описание всех гистопатологических данных; общее количество сперматозоидов в хвосте эпидидимиса, процент поступательно движущихся сперматозоидов, процент морфологически нормальных сперматозоидов, процент сперматозоидов с каждой из выявленных аномалий для Р и F₁ самцов; число и стадии созревания фолликулов в яичниках Р и F₁ самок, если требуется; подсчет желтых тел в яичниках F₁ самок; статистическая обработка результатов, если возможно;

Параметры когорты 2: детальное описание процедур, использованных для стандартизации наблюдений, в т. ч. процедур операционного определения количественных оценок данных исследования; перечень всех использованных процедур с обоснованием их использования; детали использованных поведенческих/функциональных, нейропатологических и морфометрических процедур, включая информацию и детали, касающиеся автоматических приборов; процедуры для калибровки и подтверждения эквивалентности приборов и сбалансированности экспериментальных групп в процедурах тестирования; краткое обоснование, объясняющее любой вывод, требующий профессиональной оценки; детальное описание всех поведенческих/функциональных, нейропатологических и морфометрических показателей для самцов и самок экспериментальных групп, включая как их увеличение, так и снижение по сравнению с контролем; масса головного мозга; любые диагнозы, установленные по неврологическим признакам и повреждениям, включая естественно встречающиеся болезни или состояния; фотографии примеров экспериментальных данных; фотографии с малым увеличением для оценки гомологии срезов, использованных для морфометрии; статистическая обработка результатов, включая статистические модели,

использованные при анализе данных, и результаты, независимо от того, были они достоверными или нет; связь любых других токсических эффектов с выводом о нейротоксическом потенциале изучаемого вещества в соответствии с полом и введенной дозой вещества; вклад любой токсикокинетической информации в выводы; данные, подтверждающие надежность и чувствительность методов исследования (положительные и исторические контрольные данные); связи, если наблюдались, между нейрпатологическими и функциональными эффектами; NOAEL или бенч-марк-доза для животных родителей и потомства в зависимости от пола и введенной дозы; обсуждение общей интерпретации данных, основанное на результатах, включая вывод о том, обладает или не обладает вещество нейротоксичностью, и NOAEL.

Параметры когорты 3: титры сывороточных IgM антител (сенсibilизация к SRBC или KLH) или единицы IgM PFC селезенки (сенсibilизация к SRBC); использование метода TDAR должно быть утверждено как часть оптимизационного процесса для лаборатории, впервые проводящей такое исследование, и периодически (например, ежегодно) для всех лабораторий; обсуждение общей интерпретации данных, основанное на результатах, включая вывод о том, обладает или не обладает вещество иммунотоксичностью для развивающегося организма и NOAEL; обсуждение результатов.

Выводы, включая уровни NOAEL и эффекты для животных родителей и потомства. Вся информация, не являющаяся итогом экспериментов, но имеющая значение для интерпретации результатов (например, сходство выявленных эффектов с действием известных нейротоксикантов), также должна быть охвачена.

6.4. Интерпретация результатов.

6.4.1. Расширенное изучение репродуктивной токсичности на одном поколении обеспечивает получение информации об эффектах повторного введения вещества в течение всех фаз репродуктивного цикла; предоставляет информацию о влиянии на репродуктивную систему, развитие, рост, выживаемость и функциональные показатели потомства до PND 90.

6.4.2. При интерпретации результатов принимают во внимание всю доступную информацию о веществе, включая физико-химические, токсикокинетические и токсикодинамические свойства, доступную и релевантную информацию о структурных аналогах и результаты ранее проведенных исследований токсичности изучаемого вещества (например, острой токсичности, токсичности при повторном введении, механизмов действия вещества и исследований по оценке достоверности качественных и количественных видовых различий метаболических свойств *in vivo/in vitro*). Результаты вскрытия и определения массы органов при возможности оценивают в контексте с данными наблюдений, полученными в других исследованиях с повторным введением вещества. Снижение роста потомства следует рассматривать во взаимосвязи с влиянием изучаемого вещества на состав молока.

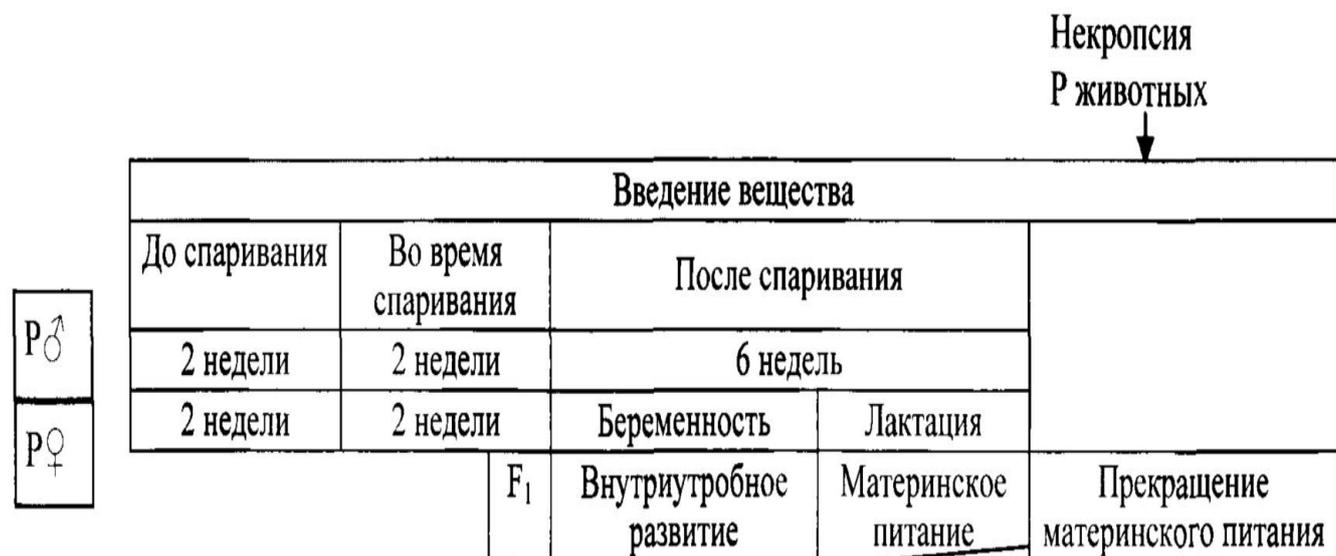
Когорта 2 (нейротоксичность в развивающемся организме)

6.4.3. Результаты исследования нейроповеденческой патологии и нейропатологии интерпретируют в контексте всех выявленных изменений с использованием подхода совокупности доказательств с экспертной оценкой. Особенности поведенческих реакций и морфологических данных, если имеются, и зависимости доза-ответ также рассматривают. Оценка нейротоксичности для развивающегося организма, в т. ч. эпидемиологические исследования населения или историй болезни и эксперименты на животных (токсикокинетические данные, информация о зависимостях структура-активность, другие испытания токсичности), входит в характеристику. Оценка результатов включает обсуждение биологической и статистической значимости, зависимости (если выявлены) между нейропатологическими и поведенческими нарушениями (OECD 426).

Когорта 3 (иммунотоксичность для развивающегося организма)

6.4.4. Подавление или активацию иммунных функций, выявленных с помощью TDAR (Т-клеточно-зависимой реакции антител), оценивают в контексте всех наблюдений. Значимость результатов TDAR может быть подтверждена другими эффектами в отношении связанных с иммунологией индикаторов (например, насыщенность клетками костного мозга, масса и гистопатология лимфоидных тканей, распределение субпопуляций лимфоцитов). Эффект, выявленный в TDAR, может быть менее значимым в случае, если другие проявления токсичности наблюдались при воздействии более низких концентраций вещества (OECD 43).

**Схема расширенного изучения репродуктивной токсичности
на одном поколении**



Родительское поколение	Когорта	Обозначение	Число животных в когорте	Половая зрелость	Примерный возраст некропии (недели)
Не менее 20 литров на группу	1А	Репродуктивность	20♂ + 20♀	Да	13
	1В	Репродуктивность	20♂ + 20♀	Да	14—20
	2А	Нейротоксичность	10♂ + 10♀	Да	9
	2В	Нейротоксичность	10♂ + 10♀	Нет	3
	3	Иммунотоксичность	10♂ + 10♀	Да	8
	Остаток	Резерв			Нет

**Измерения и наблюдения,
включенные в батарею функциональных наблюдений (когорта 2А)**

Домашняя клетка и открытое поле
Поза
Непроизвольные клонические и тонические движения
Смыкание век
Пилоэрекция
Слюнотечение
Слезотечение
Издавание звуков
Подъем на задние лапы
Аномалии походки
Возбуждение
Стереотипия
Странное поведение
Загрязнение
Аномалии дыхания
Показатели, связанные с манипуляциями
Легкость перемещения
Легкость обращения
Мышечный тонус
Реакция на приближение
Реакция на прикосновение
Слуховая реакция
Реакция на сдавливание хвоста
Реакция на выпрямление
Косолапость
Сила схватывания передней конечности
Сила схватывания задней конечности
Физиологические показатели
Температура
Масса тела
Реакция зрачка
Размер зрачка