

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ  
ИНСТИТУТ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ  
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

УДК 547.96; 577.11

№ госрегистрации 115011660024

Инв. №

УТВЕРЖДАЮ

Директор ИФАВ РАН,

Член-корреспондент РАН,



С.О.Бачурин

«25» июня 2015 г.

**«МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЕ ТОКСИЧНОСТИ ПРИ МНОГОКРАТНОМ 28-  
ДНЕВНОМ ПЕРОРАЛЬНОМ ВВЕДЕНИИ НА ГРЫЗУНАХ»**

СТП-14.621.21.0008.06-2015

Ответственный исполнитель

Заведующий лабораторией,

к.б.н.

С.Г. Ключков

«25» июня 2015 г.

Черноголовка, Московская обл. 2015

## СОДЕРЖАНИЕ

1.	Наименование методики измерений	4
2.	Назначение методики измерений и область применения	4
3.	Нормативные ссылки	4
4.	Погрешность измерений	6
5.	Условия измерений	6
6.	Требования к средствам измерений, вспомогательным устройствам, материалам, реактивам, применяемым при оценке подострой токсичности лекарственных средств, фармакологических субстанций, химических веществ в условиях 28-дневного введения через рот на грызунах	7
6.1.	Реактивы	7
6.2.	Материалы	7
6.3.	Оборудование	7
6.4.	Требования к рабочему месту и экспериментальной камере (клетке для содержания)	7
7.	Операции при подготовке к выполнению измерений - порядок выполнения оценки подострой токсичности лекарственных средств, фармакологических субстанций, химических веществ в условиях 28-дневного введения через рот на грызунах	8
7.1.	Операции по подготовке реактивов и материалов к использованию в процедуре оценки подострой токсичности лекарственных средств,	8

	фармакологических субстанций, химических веществ в условиях 28-дневного введения через рот на грызунах	
7.2.	Дизайн эксперимента по оценке подострой токсичности лекарственных средств, фармакологических субстанций, химических веществ в условиях 28-дневного введения через рот на грызунах	9
8.	Порядок выполнения измерений - оценки подострой токсичности лекарственных средств, фармакологических субстанций, химических веществ в условиях 28-дневного введения через рот на грызунах	11
8.1.	Операции по порядку проведения оценки подострой токсичности лекарственных средств, фармакологических субстанций, химических веществ в условиях 28-дневного введения через рот на грызунах	11
9.	Обработка и оформление результатов измерений	17
10.	Требования безопасности, охраны окружающей среды	17
11.	Требования к квалификации операторов	18

## **1. Наименование методики измерений**

Настоящий документ устанавливает методику оценки подострой токсичности лекарственных средств, фармакологических субстанций, химических веществ в условиях 28-дневного введения через рот на грызунах.

## **2. Назначение методики измерений и область применения**

Настоящая методика описывает процедуру оценки подострой токсичности лекарственных средств, фармакологических субстанций, химических веществ в условиях 28-дневного введения через рот на грызунах.

Метод представляет собой базовое исследование токсичности при многократном введении.

Основной областью применения данной методики является исследование в сфере экспериментальной фармакологии (оценка безопасности лекарственных средств).

## **3. Нормативные ссылки**

В настоящей методике использованы нормативные ссылки на следующие стандарты и документы:

- Руководстве по проведению доклинических исследований лекарственных средств (Миронов А.Н., Бунатян Н.Д. и др) 2012.- 994 с.;
- ГОСТ 15.101-98 «Система разработки и постановки продукции на производство. Основные положения. Порядок выполнения научно-исследовательских работ»;
- ГОСТ 7.32-2001 «Система стандартов по информации, библиотечному и издательскому делу. Отчет о научно-исследовательской работе. Структура и правила оформления»;

- Федеральный закон от 12.04.2010г. № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств»;
- Приказ Минздравсоцразвития России от 23 августа 2010 г. № 708н. «Об утверждении правил лабораторной практики»;
- Приказ Минздравсоцразвития России №750н от 26 августа 2010 г. «Об утверждении правил проведения экспертизы лекарственных средств для медицинского применения и формы заключения комиссии экспертов»;
- ГОСТ Р 53434-2009 «Принципы надлежащей лабораторной практики».
- Продукция медицинской промышленности. Технологические регламенты производства. Содержание, порядок разработки, согласования и утверждения. ОСТ 64-02-003-2002" (утв. распоряжением Минпромнауки России от 15.04.2003 N P-10);
- Государственная фармакопея Российской Федерации выпуски XI и XII.
- OECD (Paris, 1992). Chairman's Report of the Meeting of the ad hoc Working Group of Experts on Systemic Short-term and (Delayed) Neurotoxicity.
- IPCS (1986). Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals. Environmental Health Criteria Document No. 60.
- Tupper, D.E., Wallace, R.B. (1980). Utility of the Neurologic Examination in Rats. *Acta Neurobiol. Exp.*, 40, 999-1003.
- Gad, S.C. (1982). A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. *J. Toxicol Environ. Health*, 9, 691-704.
- Moser, V.C., McDaniel, K.M., Phillips, P.M. (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of Amitraz. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 108, 267-283.
- Meyer O.A., Tilson H.A., Byrd W.C., Riley M.T. (1979). A Method for the Routine Assessment of Fore- and Hindlimb Grip Strength of Rats and Mice. *Neurobehav. Toxicol.*, 1, 233-236.

– Crofton K.M., Howard J.L., Moser V.C., Gill M.W., Reiter L.W., Tilson H.A., MacPhail R.C. (1991). Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. Neurotoxicol. Teratol. 13, 599-609.

#### **4. Погрешность измерений**

Методика обеспечивает выполнение измерений с суммарной относительной погрешностью  $\pm 15,2\%$  при доверительной вероятности 0,95.

#### **5. Условия измерений**

При выполнении измерений соблюдают следующие условия:

- отсутствие посторонних шумов;
- температура окружающего воздуха (18-26)°С;
- атмосферное давление 84,0 - 106,7 кПа (630 - 800 мм рт. ст.);
- относительная влажность воздуха 30-70 %;
- воздухообмен: 10 – 15 объёмов помещений в час в СПФ зоне 20 объёмов в час;
- освещение должно быть искусственным с чередованием 12 часов света и 12 часов темноты
- напряжение в сети питания переменного тока (220  $\pm$  22) В;
- частота переменного тока 50+1 Гц

Механические воздействия, внешние электрические и магнитные поля, влияющие на работоспособность, должны быть исключены.

**6. Требования к средствам измерений, вспомогательным устройствам, материалам, реактивам, применяемым при оценке подострой токсичности лекарственных средств, фармакологических субстанций, химических веществ в условиях 28-дневного введения через рот на грызунах**

**6.1. Реактивы**

- дезинфицирующий раствор (Глютекс 0,5 %, этанол 70%).

**6.2. Материалы**

- салфетка для протирания рабочей поверхности;
- бланки для заполнения первичных данных;
- перчатки хирургические резиновые по ГОСТ 3-88.

**6.3. Оборудование**

- шприц и зонд для перорального введения.

**6.4. Требования к рабочему месту и экспериментальной камере (клетке для содержания)**

Размещение животных в клетках должно обеспечивать животному:

- удовлетворение нормальных физиологических и поведенческих потребностей: (мочеиспускание, дефекацию, поддержание температуры тела, нормального характера движения и поз, размножение (по показаниям));
- видовые социальные взаимоотношения;
- адекватную вентиляцию;

- доступ к пище и воде;
- безопасность животного;
- возможность свободного наблюдения за животным

Животные	Масса, г	Площадь пола на одно животное, см <sup>2</sup>	Высота клетки, см
Мыши	<10	38	12,7
	10-15	52	
	15-25	77	
	>25	>97	
	<100	110	
Крысы	100-200	148	17,8
	200-300	187	
	300-400	258	
	400-500	387	
	>500	>452	
Морские свинки	<350	387	17,8
	>350	>660	

**7. Операции при подготовке к выполнению измерений - порядок выполнения оценки подострой токсичности лекарственных средств, фармакологических субстанций, химических веществ в условиях 28-дневного введения через рот на грызунах**

**7.1. Операции по подготовке реактивов и материалов к использованию в процедуре оценки подострой токсичности лекарственных средств, фармакологических субстанций, химических веществ в условиях 28-дневного введения через рот на грызунах.**

Выбор животных.

Предпочтительный вид – крыса (9-недельного возраста), хотя другие виды грызунов, например, мышь, также могут быть использованы. Должны задействоваться молодые, здоровые, взрослые животные широко распространенных линий. Самки должны быть нерожавшими и небеременными. На начало эксперимента отклонения в весе животных должны быть минимальны и не должны превышать +/-20% от среднего веса животных каждого пола.

Здоровые молодые животные случайным образом распределяются по контрольным и опытным группам. Клетки должны быть расставлены таким образом, чтобы минимизировать возможные эффекты, связанные с местоположением клетки. Все животные помечаются уникальным для каждого индивидуума образом и содержатся в своих клетках не менее 5 дней до начала эксперимента, чтобы произошла акклиматизация к условиям лаборатории.

Исследуемое вещество.

Если необходимо, вещество растворяют или суспендируют в подходящей среде. Рекомендуется по возможности в первую очередь использовать водные растворы/суспензии, затем растворы/эмульсии в масле (например, кукурузном) и только затем рассматривать растворы в других средах. Для всех сред за исключением воды должны быть известны токсикологические характеристики. Должна быть определена стабильность исследуемого вещества в данной среде.

Рабочие растворы готовят в соответствии с правилами надлежащей лабораторной практики.

В случае необходимости рН растворов контролируют при помощи рН-метра.

## **7.2. Дизайн эксперимента по оценке подострой токсичности лекарственных средств, фармакологических субстанций, химических веществ в условиях 28-дневного введения через рот на грызунах.**

Тестируемое вещество вводилось самцам и самкам крыс возрастом до 9 недель перорально (зондом в желудок) ежедневно в течение 28 дней в дозах, указанных в таблице 1.

Таблица 1. Экспериментальные группы и дозы вводимой фармацевтической субстанции OSPL-502

Группа	самцы			самки		
	№	Объем	Концент-	№	Объем	Концент-

	жив.	введения (мл/кг)	рация (мг/мл)	жив.	введения (мл/кг)	рация (мг/мл)
1 контроль	11 - 20			11 - 20		
2 20 мг/кг	21 - 25	1,6	12,4	21 - 25	2,8	7,7
3 60 мг/кг	31 - 35	1,6	37,9	31 - 35	2,8	22,3
4 180 мг/кг	41 - 50	1,6	109,4	41 - 50	2,8	64,4

Контрольным животным вводилась дисперсионная среда в том же объеме. По истечении 28-дневного срока введения тестируемого вещества, а именно на 29 день исследования, животных основных групп подвергали эвтаназии. Животные сателлитных групп (20 голов) содержались еще 14 дней после отмены введения вещества для изучения неизменности или обратимости, персистенции и отсроченных проявлений токсических эффектов. Этих животных подвергали эвтаназии на 43 день исследования. Все манипуляции с животными выполнялись в соответствии с СОПами ЛФ ИФАВ. Список использованных СОПов представлен в приложении 3.

В течение всего исследования у животных регистрировали клинические признаки интоксикации, вес тела, потребление корма. Начиная с 4-й недели исследования, у животных осуществляли сбор мочи для определения спонтанного суточного диуреза. Собранную мочу подвергали анализу.

В этот же период изучали влияние тестируемого вещества на локомоторную активность, мышечную силу и ориентировочное поведение в соответствующих физиологических тестах, проводили офтальмологические исследования.

На 29 и 43 дни исследования у животных основных и сателлитных групп соответственно взяты образцы крови для анализа гематологических, биохимических и физиологических показателей.

Животные были подвергнуты CO<sub>2</sub>-эвтаназии (СОП Viv\_12), а затем вскрыты и осмотрены, органы взвешены и зафиксированы для последующего гистологического анализа.

## **8. Порядок выполнения измерений - оценки подострой токсичности лекарственных средств, фармакологических субстанций, химических веществ в условиях 28-дневного введения через рот на грызунах**

### **8.1. Операции по порядку проведения оценки подострой токсичности лекарственных средств, фармакологических субстанций, химических веществ в условиях 28-дневного введения через рот на грызунах.**

#### **Количество и пол животных**

По крайней мере 10 животных (пять самок и пять самцов) должны использоваться для каждой дозы. Если предполагается промежуточный забой животных, общее их число должно быть увеличено на количество животных, которые будут забиты до окончания эксперимента. Должно быть рассмотрено включение в эксперимент дополнительных групп по 10 животных (пять каждого пола) в контрольную группу и в группу наивысшей дозы для наблюдения за обратимостью, сохранением или же отсроченным проявлением токсических эффектов по меньшей мере в течение 14 дней после окончания периода введения.

#### **Дозировка**

В общем случае должны использоваться по крайней мере 2-3 опытных и одна контрольная группа, однако если из других данных следует, что при дозе 1000мг/кг веса тела в день эффекта не ожидается, может быть проведен limit test. Если нет подходящих данных, может быть проведен эксперимент по подбору доз, чтобы определить, какие дозы следует использовать. За

исключением введения тестируемого вещества, обращение с животными из контрольной группы должно быть идентичным таковому для опытных групп. Если используется среда для введения, контрольная группа должна получать максимальный употребляемый объем этой среды.

В выборе доз нужно принимать во внимание любые токсикологические и (токсико-) кинетические данные, имеющиеся для тестируемого вещества или сопутствующих материалов. Наивысшая доза должна выбираться так, чтобы вызывать токсические эффекты, но не смерть или тяжелые страдания. После чего должна подбираться нисходящая последовательность доз так, чтобы продемонстрировать все дозозависимые реакции и NOAEL (no-observed-adverse effects at the lowest dose level - отсутствие побочных эффектов при минимальной дозе, прим. перев.) Разница в 2-4 раза обычно оптимальна для установления нисходящей последовательности доз; часто желательно добавление четвертой экспериментальной группы при использовании больших интервалов между дозами (при разнице более, чем в 10 раз).

### **Введение доз**

Животные получают дозу тестируемого вещества ежедневно 7 дней в неделю в течение 28 дней. Введение 5 дней в неделю или в течение только 14 дней должно быть обосновано. Если тестируемое вещество дается принудительно, это должно быть сделано в виде одной дозы на животное, используя желудочный зонд или подходящий интубационный катетер (intubation cannula).

Максимальный объем жидкости, который можно вводить за один прием, зависит от размеров экспериментального животного. Объем не должен превышать 1 мл/100г веса тела, за исключением водных растворов, для которых может вводиться 2 мл/100г веса тела. Кроме раздражающих или разъедающих веществ, которые обычно приводят к раздражению (обозлению) животных при больших концентрациях, вариации в объеме вводимого материала должны быть минимизированы путем варьирования концентрацией, чтобы поддерживать одинаковый объем для всех доз.

## **Наблюдения**

Для веществ, вводимых с пищей или питьевой водой, важно убедиться, что используемое количество вещества не влияет на нормальное питание и баланс воды. Когда тестируемое вещество дается с пищей, может использоваться как постоянная концентрация в пище, так и постоянная доза по отношению к весу животного; любой альтернативный вариант должен быть строго оговорен.

Для веществ, вводимых принудительно, дозы должны даваться в сходное время каждый день и корректироваться по мере необходимости, чтобы поддерживать постоянный уровень по отношению к весу животного. Если эксперимент по многократному введению используется как предварительный перед долгосрочным исследованием, в обоих экспериментах должна использоваться сходная диета.

Период наблюдения должен составлять 28 дней. Животные из дополнительных групп, отведенные для последующего дополнительного наблюдения, должны содержаться еще как минимум 14 дней без введения вещества, чтобы выявить отсроченное проявление, или сохранение токсических эффектов, или восстановление после них.

Общее клиническое обследование должно производиться не реже одного раза в день, предпочтительно в одно и то же время, с учетом периода наступления пика нежелательных эффектов после введения дозы. Клиническое состояние животных должно быть записано. Минимум дважды в день, обычно в начале и в конце дня, все животные проверяются на предмет недомогания и смерти.

Один раз до начала введения (чтобы сравнить, как меняются показатели индивидуально у каждого животного) и, по меньшей мере, один раз в неделю после его начала, должно проводиться подробное клиническое обследование всех животных. Это обследование должно проводиться вне клетки на стандартной площадке, предпочтительно в одно и то же время. Оно должно

быть подробно записано, желательно с использованием системы баллов, четко определенной тестирующей лабораторией.

На четвертой неделе введения должна быть проведена оценка реакции на раздражители различного типа (2) (например, слуховые, зрительные, проприоцептивные) (2,4,5), оценка силы хватания (6) и оценка двигательной активности. Более детальное описание процедур, которым можно следовать, дано под соответствующими ссылками. Однако и альтернативные процедуры также могут быть применены.

Функциональное обследование, проводимое на четвертой неделе введения, может быть опущено, если эксперимент является предварительным перед последующим субхроническим (90-дневным) исследованием. В таком случае функциональное обследование должно быть обязательно включено в это исследование. С другой стороны, наличие данных функциональных обследований из эксперимента по многократному введению может помочь в выборе доз для последующего субхронического исследования.

В виде исключения, функциональное обследование может также быть опущено в группах, где выявляются признаки токсичности такой силы, что они бы значительно повлияли на проведение функционального обследования.

### **Вес тела и потребление пищи/воды**

Все животные должны взвешиваться не реже 1 раза в неделю. Измерение уровня потребления пищи проводится минимум еженедельно. Если тестируемое вещество дается с водой, потребление воды также должно замеряться минимум еженедельно.

### **Гематология**

Должны быть выполнены следующие гематологические измерения в конце периода исследования: гематокрит, концентрация гемоглобина, количество эритроцитов, общее и дифференцированное количество

лейкоцитов, количество тромбоцитов и показатель времени/способности свертывания крови.

Образцы крови должны забираться у животных из оговоренного источника непосредственно перед или как часть процесса умерщвления животных и храниться в надлежащих условиях.

### **Клиническая биохимия**

Клинические биохимические анализы с целью выявления главных токсических эффектов в тканях и, особенно, эффектов в почках и печени, должны проводиться на образцах крови, взятых у всех животных непосредственно перед или как часть процесса умерщвления (кроме случаев, когда животное найдено мертвым и/или случайно убитым). Рекомендуется лишать животное пищи в ночь перед взятием крови. В плазме и сыворотке должны определяться: концентрация натрия, калия, глюкозы, суммарного холестерина, мочевины, азот мочевины крови, содержание креатинина, суммарного белка и альбумина и не менее двух ферментов, показательных для гепатоцеллюлярных эффектов (такие как аланинаминотрансфераза, аспартатаминотрансфераза, щелочная фосфатаза, гамма-глутамилтранспептидаза и сорбитолдегидрогеназа). Измерение количества дополнительных ферментов (печеночного или иного происхождения), а также желчных кислот в определенных случаях могут дать полезную информацию.

По желанию, в течение последней недели исследования может быть проведен анализ мочи из образца, собранного за определенный промежуток времени, на внешние показатели, объем, осмотическую концентрацию или удельный вес, рН, белок, глюкозу и кровь/кровяные тельца.

### **Патология**

#### **Общее вскрытие**

Все животные, участвующие в эксперименте, подвергаются полному, подробному макроскопическому вскрытию, которое включает внимательное

обследование внешней поверхности тела, всех отверстий, полости черепа, грудной и брюшной полостей, а также их содержимого. Печень, почки, надпочечники, семенники, придатки семенников, тимус, селезенка, головной мозг и сердце всех животных (кроме случаев, когда животное найдено мертвым и/или случайно убитым) должны быть надлежащим образом освобождены от посторонних тканей, и их сырой вес должен быть измерен как можно скорее после выделения во избежание высыхания.

Следующие ткани должны быть зафиксированы в наиболее подходящем для данной ткани и для последующих патогистологических процедур фиксаторе: области всех макроскопических поражений, головной мозг (показательные районы, включая полушария, мозжечок и мост), спинной мозг, желудок, тонкий и толстый кишечник (включая Пейеровы бляшки), печень, почки, надпочечники, селезенка, сердце, тимус, щитовидная железа, трахея и легкие (зафиксированные путем наливки фиксатора и затем погружения), гонады, вспомогательные половые органы (например, матка, простата), мочевого пузыря, лимфоузлы (желательно один узел, обслуживающий область введения, и второй – удаленный от нее, чтобы выявить системные эффекты), периферический нерв (седалищный или большеберцовый), желательно, в непосредственной близости к мышце, и участок костного мозга (или свежий мазок аспирата костного мозга). Клинические и другие наблюдения могут указать на необходимость исследования дополнительных тканей. Также должны быть зафиксированы все органы, которые могут являться мишенью на основании известных свойств тестируемого вещества.

### **Патогистология**

Должен быть произведен полный патогистологический анализ зафиксированных органов и тканей от всех животных из контрольной группы и группы высокой дозы. Этот анализ должен быть распространен также на животных из других групп, если в группе высокой дозы наблюдаются отклонения, связанные с введением вещества.

Все области макроскопических поражений должны быть исследованы.

Если используется дополнительная группа животных, патогистологическое исследование должно производиться для тканей и органов, в которых были обнаружены изменения в группах, получавших препарат.

## **9. Обработка и оформление результатов измерений**

Данные должны быть представлены индивидуально для каждого животного. Кроме того, все данные должны быть сведены в таблицу, включающую для каждой экспериментальной группы: количество животных на начало эксперимента; количество животных, найденных мертвыми или забитых из гуманных соображений, а также время любой смерти или забоя; количество животных с признаками токсичности и описание наблюдаемых признаков токсичности, включая время наступления, продолжительность и выраженность всех токсических эффектов; количество животных с патологическими поражениями, типы этих поражений и процент животных с каждым типом поражений.

Если возможно, численные результаты должны быть обработаны подходящим и общепринятым статистическим методом. Статистические методы должны быть определены при планировании эксперимента.

## **10. Требования безопасности, охраны окружающей среды**

При выполнении измерений необходимо соблюдать требования техники безопасности при работе с химическими реактивами по ГОСТ 12.1.007; требования электробезопасности при работе с электроустановками по ГОСТ 12.1.019, а также требования, изложенные в технической документации к приборам.

Помещение должно соответствовать требованиям пожаробезопасности по ГОСТ 12.1.004 и иметь средства пожаротушения по ГОСТ 12.4.009. Содержание вредных веществ в воздухе не должно превышать норм установленных ГН 2.2.5.1313-03 «Предельно допустимые концентрации (ПДК) вредных веществ в воздухе рабочей зоны». Организация обучения работников безопасности труда – по ГОСТ 12.0.004.

### **11. Требования к квалификации операторов**

К выполнению измерений могут быть допущены штатные сотрудники, имеющие соответствующую профессиональную подготовку, опыт работы с животными, изучившие требования настоящего стандарта, прошедшие соответствующий инструктаж, освоившие метод в процессе тренировки.