

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 ОПРЕДЕЛЕНИЯ КЛАССА ОСТРОЙ ТОКСИЧНОСТИ ПРИ
ПЕРОРАЛЬНОМ ВВЕДЕНИИ»**

СТП-14.621.21.0008.07-2015

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 определении класса острой токсичности при пероральном введении	8
6.1.	Реактивы	8
6.2.	Материалы	8
6.3.	Оборудование	8
6.4.	Требования к рабочему месту и экспериментальной камере (клетке для содержания)	8
7.	Операции при подготовке к выполнению измерений - порядок выполнения определения класса острой токсичности при пероральном введении	9
7.1.	Операции по подготовке реактивов и материалов к использованию в процедуре определение класса острой токсичности при пероральном введении	9
7.2.	Дизайн эксперимента по определению класса острой токсичности при пероральном введении	11
8.	Порядок выполнения измерений - определение класса острой токсичности при пероральном	13

	введении	
8.1.	Операции по порядку проведения определения класса острой токсичности при пероральном введении	13
9.	Обработка и оформление результатов измерений	15
10.	Требования безопасности, охраны окружающей среды	15
11.	Требования к квалификации операторов	16
12.	Валидация метода определение класса острой токсичности при пероральном введении	17

1. Наименование методики измерений

Настоящий документ устанавливает методику определения класса острой токсичности при пероральном введении.

2. Назначение методики измерений и область применения

Настоящая методика описывает процедуру определения класса острой токсичности при пероральном введении.

Метод представляет собой исследование острой токсичности при однократном 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.
- Roll R., Höfer-Bosse Th. And Kayser D. (1986). New Perspectives in Acute Toxicity Testing of Chemicals. Toxicol. Lett., Suppl. 31, 86.
- Roll R., Riebschläger M., Mischke U. and Kayser D. (1989). Neue Wege zur Bestimmung der akuten Toxizität von Chemikalien. Bundesgesundheitsblatt 32, 336-341.
- Diener W., Sichha L., Mischke U., Kayser D. and Schlede E. (1994). The Biometric Evaluation of the Acute-Toxic-Class Method (Oral). Arch. Toxicol. 68, 559-610.
- Diener W., Mischke U., Kayser D. and Schlede E. (1995). The Biometric Evaluation of the OECD Modified Version of the Acute-Toxic-Class Method (Oral). Arch. Toxicol. 69, 729-734.
- Diener W., and Schlede E. (1999) Acute Toxicity Class Methods: Alternatives to LD/LC50 Tests. ALTEX 16, 129-134.
- Schlede E., Mischke U., Roll R. and Kayser D. (1992). A National Validation Study of the Acute-Toxic-Class Method – An Alternative to the LD50 Test. Arch. Toxicol. 66, 455-470.

- Schlede E., Mischke U., Diener W. and Kayser D. (1994). The International Validation Study of the Acute-Toxic-Class Method (Oral). Arch. Toxicol. 69, 659-670.
- OECD (2000) Guidance Document on Acute Oral Toxicity. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No 24.
- OECD (2000) Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No 19.
- OECD (1998) Harmonized Integrated Hazard Classification System For Human Health And Environmental Effects Of Chemical Substances as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals in November 1998, Part 2, p. 11 [<http://webnet1.oecd.org/oecd/pages/home/displaygeneral/0,3380,EN-documents-521-14-no-24-no-0,FF.html>].
- Lipnick R L, Cotruvo, J A, Hill R N, Bruce R D, Stitzel K A, Walker A P, Chu I; Goddard M, Segal L, Springer J A and Myers R C (1995) Comparison of the Up-and Down, Conventional LD50 and Fixed Dose Acute Toxicity Procedures. Fd. Chem. Toxicol 33, 223-231.
- Chan P.K. and A.W. Hayes. (1994). Chap. 16. Acute Toxicity and Eye Irritancy. Principles and Methods of Toxicology. Third Edition. A.W. Hayes, Editor. Raven Press, Ltd., New York, USA

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 ± 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 определении класса острой токсичности при пероральном введении

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 внутрижелудочного 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 ²	Высота клетки, см
Мыши	<10	38	12,7
	10-15	52	
	15-25	77	
	>25	>97	
Крысы	<100	110	17,8
	100-200	148	
	200-300	187	
	300-400	258	
	400-500	387	
	>500	>452	

7. Операции при подготовке к выполнению измерений - порядок выполнения определения класса острой токсичности при пероральном введении

7.1. Операции по подготовке реактивов и материалов к использованию в процедуре определение класса острой токсичности при пероральном введении.

Выбор животных

Предпочтительный вид грызунов – крыса, хотя и другие виды также могут быть использованы. Обыкновенно используют самок. Это обусловлено тем, что по литературным данным, касающимся традиционного способа определения LD₅₀, чаще всего разница между животными разного пола незначительна, но если она есть, самки, в основном, оказываются немного более чувствительны.

Однако если данные по токсикологическим и токсикокинетическим свойствам структурно-родственных веществ указывают на то, что самцы могут быть более чувствительны, именно этот пол нужно использовать. Если тест проводится на самцах, необходимо дать адекватное обоснование.

Должны задействоваться молодые, здоровые, взрослые животные широко распространенных линий. Самки должны быть нерожавшими и

небеременными. На момент введения препарата животное должно находиться в возрасте 8-12 недель, а его вес должен уместаться в интервал +/-20% от среднего первоначального веса всех животных, уже получивших дозу препарата.

Подготовка животных

Животных отбирают случайным образом, помечают уникальным для каждого индивидуума образом и содержат в своих клетках не менее 5 дней перед началом введения, 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 pH растворов контролируют при помощи pH-метра.

Подготовка доз

В общем случае тестируемое вещество необходимо вводить в одинаковом объеме среды для всего диапазона доз, варьируя концентрацию вещества.

Нельзя превышать максимально допустимый объем введения. Максимальный объем жидкости, который можно вводить за один раз, зависит от размера животного. Для грызунов он не должен в норме превышать 1мл/100г веса тела; однако в случае водных растворов можно рассматривать и 2мл/100г.

В отношении приготовления доз рекомендуется использовать водный раствор/суспензию/эмульсию везде, где это возможно, после чего в порядке убывания предпочтительности идет раствор/суспензия/эмульсия в масле (например, кукурузном), а затем только растворы в других субстанциях.

Для растворителей, отличных от воды, должны быть известны токсикологические характеристики. Дозы должны приготавливаться непосредственно перед введением, если только не известна стабильность препарата в продолжение периода его использования и не показано, что она приемлема.

7.2. Дизайн эксперимента по определению класса острой токсичности при пероральном введении.

Исследование острой токсичности изучаемого препарата базировалось на основополагающих документах OECD 401 «Acute Oral Toxicity», 1987, OECD 423. «Acute Toxic Class Method», 2001, позволяющие классифицировать лекарственное средство и оценить его опасность согласно классификации GHS (OECD (1998)). Острые опыты были поставлены на самках крыс, поскольку самки, по литературным источникам при пероральном введении, являются более чувствительными (FDA 2003).

Выбранные методы позволяют определить конкретную величину LD₅₀ только в том случае, если хотя бы две дозы вызвали смертность выше 0%, но ниже 100%. Именно для этого, мы из литературных источников ((FDA 2003) выбрали такой уровень доз, где бы из трех выбранных, две вызвали гибель 0 и 100%, что позволило нам определить LD₅₀. Изучаемый препарат акатинол мемантин 10 мг Компании МЕРЦ ФАРМА ГмбХ и КоКГаА (Германия) вводили животным двукратно в эквивалентном объеме 1,75-2,15 мл с интервалом 1,5-2 ч внутрижелудочно, в виде 32,1-35,2% водной суспензии. Каждая группа состояла из 5-6 животных. Длительность периода наблюдения за животными после введения препаратов составила 2

недели, в течение которых регистрировался учет погибших и выживших животных. Для установления основных токсикометрических параметров острой токсичности использовался метод пробит-анализа по Литчфилду и Уилкоксону (Беленький Л.М.,1963). Процедура тестирования представлена в табл.1.

Таблица 1. Процедура тестирования острой токсичности препарата акатинол мемантин 10 мг, компании МЕРЦ ФАРМА ГмбХ и КоКГаА (Германия)

Акатинол Мемантин/Крысы						
Номер группы	Препарат	Кол-во животных	Номера животных	Доза мг/кг	Объем введения (мл/крысу)	Кратность превышения максим. тер.дозы
		самки	самки			
2	Акатинол Мемантин	6	25-30	300	3-5	300
3	Акатинол Мемантин	6	19-24	360	3-5	360
4	Акатинол Мемантин	6	31-35	420	3-5	420

Перед введением, животных лишали пищи, но не воды, на ночь. По прошествии периода голодания животных взвешивали и на основании данных массы тела высчитывали дозу, затем вводили им тестируемый препарат.

После введения препарата велось постоянное наблюдение за животными с регистрацией времени наступления первых клинических признаков интоксикации (СОП Viv_28). В независимости от динамики проявления и развития клинических признаков через 15 мин, 30 мин и 60 мин и 120 мин после введения препаратов у всех животных проводили подробный клинический осмотр с регистрацией клинических признаков интоксикации и степени их выраженности (слабая степень, средняя, сильная) (СОП Viv_28). При наступлении гибели животного регистрировали время наступления смерти.

8. Порядок выполнения измерений - определение класса острой токсичности при пероральном введении

8.1. Операции по порядку проведения определения класса острой токсичности при пероральном введении.

Введение доз

Тестируемое вещество вводят в единственной дозе внутрижелудочно, используя желудочный зонд или подходящий интубационный катетер. В нестандартных случаях, когда вещество не может быть введено в один прием, дозу можно разделить на меньшие части и вводить в течение периода, не превышающего 24 часа.

Животных следует лишать пищи перед введением (к примеру, крыс лишают пищи, но не воды, на ночь; мышей лишают пищи, но не воды, в течение 3-4 часов). По прошествии периода голодания животных взвешивают и вводят тестируемое вещество.

Определяют вес тела натошак для каждого животного и на основании этих данных высчитывают дозу. После введения вещества период лишения пищи может быть продлен еще на 3-4 часа для крыс и на 1-2 часа для мышей. Если доза вводится по частям на протяжении определенного интервала времени, может быть необходимо обеспечить животных пищей и водой в зависимости от продолжительности этого интервала.

Лимит-тест на одной дозе 2000 мг/кг веса тела может быть проведен на шести животных (по трое животных на шаг). В исключительных случаях может быть проведен лимит-тест на одной дозе 5000 мг/кг с использованием троих животных. Если по вине препарата произойдет гибель, может понадобиться дальнейшее тестирование на ближайшей меньшей дозе.

Наблюдения

За каждым животным наблюдают отдельно, по меньшей мере, один раз в течение первых 30 минут после введения дозы, затем периодически в течение

24 часов (уделяя особое внимание первым 4 часам), и далее ежедневно, в общей сложности на протяжении 14 дней.

Продолжительность наблюдений не должна быть жестко фиксирована. Она должна определяться токсическими реакциями, временем их наступления и продолжительностью восстановительного периода и, таким образом, может быть по необходимости увеличена. Временные точки наступления и исчезновения признаков токсичности важны, особенно если имеется тенденция к их отсрочке. Все наблюдения документируются систематически, для каждого животного ведутся индивидуальные записи.

Необходимо дополнительное наблюдение в случае, если у животного продолжают проявляться признаки токсичности. Необходимо следить за состоянием кожи и меха, глаз и слизистых оболочек, а так же дыхательной, кровеносной, вегетативной и центральной нервной систем, соматомоторной активностью и особенностями поведения.

Особое внимание следует обратить на тремор, конвульсии, слюноотделение, диарею, летаргию, сон и кому. Нужно учитывать принципы и критерии, собранные в Руководстве по определению критических состояний в целях гуманности (Humane Endpoints Guidance Document).

Животные в состоянии агонии и испытывающие сильную боль или продолжительный выраженный стресс должны быть гуманно умерщвлены. Если животное убито по гуманным соображениям или найдено мертвым, время смерти должно быть зафиксировано как можно более точно.

Вес тела

Вес каждого животного должен быть определен непосредственно перед введением вещества и как минимум еженедельно после этого. Изменения веса должны быть вычислены и записаны. В конце эксперимента выжившие животные взвешиваются и подвергаются гуманному умерщвлению.

Патология

Все животные (включая тех, которые умерли или были выведены из эксперимента по соображениям гуманности) должны подвергаться общему

вскрытию. Все макроскопические патологические изменения должны быть записаны для каждого животного. Можно также провести микроскопическое исследование органов, в которых были обнаружены патологические изменения при вскрытии, для животных, проживших 24 часа и более после получения дозы, поскольку это может дать полезную информацию.

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: общее количество использованных животных, количество животных с признаками токсичности, количество животных, найденных мертвыми или эвтаназированных из гуманных соображений, время смерти каждого животного, описание и временные параметры признаков токсичности, а также их обратимость, и результаты вскрытия.

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.

12. Валидация метода определения класса острой токсичности при пероральном введении

Препарат вводился животным двукратно (с интервалом 1,5-2 ч.) в объеме 2,7-3,2 мл. Концентрация суспензии препарата акатинол мемантин 10 мг компании МЕРЦ ФАРМА ГмбХ и КоКГаА определялась из расчета содержания активной субстанции на массу таблетированной лекарственной формы.

У половины животных, которым вводили акатинол мемантин 10 мг, компании МЕРЦ ФАРМА ГмбХ и КоКГаА в дозе 300 мг/кг, уже через 15 минут наблюдался тремор, снижение двигательной активности животных и реакции подошвенного рефлекса. Через 30 минут кроме признаков, наблюдавшихся ранее, отмечается круговое движение практически всех крыс в группе, а также появление тремора еще у одной крысы. У одного животного наблюдались клонические судороги. У всех крыс была торчащая шерсть, птоз. Через 60 минут сохранялось тоже состояние животных. Спустя 120 минут происходило снижение тремора у животных в группе до одной крысы. Через 24 часа образовывались коричневые корочки вокруг глазниц.

При введении Акатинол Мемантина в дозе 360 мг/кг наблюдается схожая клиническая картина, как и после введения в дозе 300 мг/кг с той лишь разницей, что тремор начинался у животных только через час после введения и продолжался в течение 120 минут. Через 24 часа появлялось аномальное дыхание у одной крысы. Отмечалось прикрытие век, повышение саливации, у двух крыс коричневые выделения около носа/рта, торчащая шерсть.

С повышением дозы до 420 мг/кг через 15 минут только у одной крысы отмечается снижение активности и тремор. Через 30 минут уже у всех животных в группе наблюдается снижение реакции на выемку из клетки, мышечного тонуса, реактивности, подошвенного рефлекса, ответа на прикосновение. У пяти животных наблюдался тремор. Через час появлялся

тремор у последнего животного в группе который не проходил и через 120 минут.

Через 24 часа к имеющимся признакам добавились выделения коричневого цвета вокруг носовых ходов и у всех животных была торчащая шерсть и затрудненное дыхание. Гибель животных регистрировалась в течение 4 –х дней после введения препарата. Динамика гибели животных при внутрижелудочном введении Акатинол Мемантина представлена в табл.8

Табл. 8. Временная характеристика проявления летальных эффектов у животных, получавших препарат акатинол мемантин 10 мг, компании МЕРЦ ФАРМА ГмбХ и КоКГаА (Германия)

Гр/доза мг/кг		Наблюдаемый эффект (гибель) в динамике														
		Дни	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	14	% эфф.
300	2/6	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	33,3
360	5/6	4	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	83,3
420	5/6	2	1	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	83,3

Расчетные данные по определению основных параметров острой токсичности представлены в таблице 10.

Табл. 10. Расчетные данные по определению основных параметров острой токсичности препарата акатинол мемантин 10 мг/кг, компании МЕРЦ ФАРМА ГмбХ и КоКГаА (Германия)

Доза мг/кг	Наблюдаемый эффект	Наблюдаемы й эффект в %	«Ожидаемый» % эффекта	Разность между «ожидаемым» и наблюдаемым % эффекта	Слагаемые для χ^2
300	2/6	33,3	39	5,7	0,014
360	5/6	83,3	70	-13,3	0,085
420	5/6	83,3	96	12,7	0,38

$$\chi^2 = 1,437 ; S = 1,22 ; fLD_{50} = 1,17$$

$$LD_{50} = 320 \text{ мг/кг}; LD_{16} = 260 \text{ мг/кг}; LD_{84} = 395 \text{ мг/кг}$$

LD₅₀=320(188,2÷374,4) мг/кг при P=0,05

По результатам выполненных исследований можно сделать заключение о том, что препарат акатинол мемантин 10 мг, компании МЕРЦ ФАРМА ГмбХ и КоКГаА (Германия) по своим параметрам острой токсичности, согласно гармонизированной системе классификации опасности и маркировки химической продукции (GHS) следует отнести к 4 категории острой токсичности – умеренно опасным, а отечественному ГОСТу 12.1.007-76 «Классификация и общие требования безопасности» оба препарата так же относятся к препаратам умеренно опасным – 3-му класса опасности (табл.11).

Табл. 11. Классификация токсичности веществ по величине LD₅₀ (крысы, внутрижелудочно, мг/кг)

№	Наименование документа	Класс/категория токсичности				
		1	2	3	4	5
1	ГОСТ 12.1.007-76	≤15	15-150	151-5000	≥5000	
6	HGS	≤5	5-50	51-300	301-2000	≥ 2000