	ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России ЛАБОРАТОРИЯ ТОКСИКОЛОГИИ НАУЧНОГО ЦЕНТРА ИННОВАЦИОННЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ С ОПЫТНО-ПРОМЫШЛЕННЫМ ПРОИЗВОДСТВОМ		
СОП №:	Номер версии:	Число страниц:	
III/1П-002-2022/3	3	34	
	Дата начала действия версии СОП:	Дата окончания действия версии СОП:	
	21.06.2022	21.06.2024	
Наименование СОП:	**Оценка острой токсичности при внутрижелудочном поступлении методом фиксированной дозы (ГОСТ 32296-2013, ОЭСР Тест № 420)**		
Составлено/ Пересмотрено:	_____ подпись	15.06.2020/ 07.06.2022 дата	В.В. Багметова
Проверено: Руководитель СОК	_____ подпись	08.06.2022 дата	В.Н. Перфилова
Утверждено: Руководитель лаборатории	_____ подпись	09.06.2022 дата	Л.И. Бугаева
Форма обучения:	чтение ✓	практические занятия	

1. НАЗНАЧЕНИЕ СОП

1.1. ЦЕЛЬ: описать процедуру изучения острой токсичности при внутрижелудочном поступлении методом фиксированной дозы по ГОСТ 32296-2013 (ОЭСР Тест № 420).

1.2. ПРЕДНАЗНАЧЕНИЕ:

СОП предназначена сотрудникам, выполняющим экспериментальное исследование острой токсичности фармакологических веществ.

2. НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ

1. Национальный стандарт РФ ГОСТ Р 33044-2014 «Принципы надлежащей лабораторной практики» (Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 20 ноября 2014 г. № 1700-ст

межгосударственный стандарт ГОСТ 33044—2014 введен в действие в качестве национального стандарта Российской Федерации с 1 августа 2015 г. Настоящий стандарт идентичен международному документу OECD Guide 1:1998 OECD Principles of good laboratory practice).

2. Межгосударственный стандарт ГОСТ 32296-2013 «Методы испытаний по воздействию химической продукции на организм человека. Основные требования к проведению испытаний по оценке острой токсичности при внутрижелудочном поступлении методом фиксированной дозы» (Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 22 ноября 2013 г. № 795-ст межгосударственный стандарт ГОСТ 32296—2013 введен в действие в качестве национального стандарта Российской Федерации с 1 августа 2014 г. Настоящий стандарт идентичен международному документу OECD Test № 420 «Acute Oral Toxicity - Fixed Dose Procedure»). – М.: Стандартинформ, 2014. – 15 с.
3. Национальный стандарт Российской Федерации ГОСТ Р 56700-2015 «Лекарственные средства для медицинского применения. Доклинические фармакологические исследования безопасности» (Утвержден и введен в действие Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 11 ноября 2015 г. № 1761-ст. Настоящий стандарт идентичен международному документу ICH S7A:2001 «Доклинические фармакологические исследования безопасности лекарственных средств для медицинского применения» (ICH S7A:2001 «Safety Pharmacology studies for human pharmaceuticals»). - М.: Стандартинформ, 2016. – 11 с.
4. Национальный стандарт Российской Федерации ГОСТ Р 56701-2015 Лекарственные средства для медицинского применения. Руководство по планированию доклинических исследований безопасности с целью последующего проведения клинических исследований и регистрации лекарственных средств (Утвержден и введен в действие Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 11 ноября 2015 г. № 1762-ст. Настоящий стандарт идентичен международному документу ICH M3(R2):2009 «Руководство по планированию доклинических исследований безопасности с целью последующего проведения клинических исследований и регистрации лекарственных средств»). - М.: Стандартинформ, 2016. – 27 с.

3. ОТВЕТСТВЕННОСТЬ

Все сотрудники, которым предназначена СОП, должны следовать описанным в ней правилам и знать методику оценки острой токсичности фармакологических веществ при внутрижелудочном поступлении методом фиксированной дозы.

Сотрудники, принимающие участие в проведении токсикологических исследований фармакологических веществ, обязаны соблюдать конфиденциальность в отношении любых данных, полученных в ходе исследования, в соответствии с законодательством Российской Федерации. Организация, проводящая исследования токсических свойств фармакологических веществ, должна обеспечить конфиденциальность результатов исследований в рамках принятых ею обязательств и в соответствии с законодательством Российской Федерации.

4. ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

Метод обеспечивает получение информации об острой токсичности вещества при проглатывании и позволяет оценить и классифицировать его в соответствии с СГС. Проведению испытания должен предшествовать анализ информации об исследуемом веществе. Такая информация включает сведения о составе и химическом строении вещества; его физико-химических свойствах; результатах токсикологических испытаний *in vivo* и *in vitro*, а также токсикологические данные по структурно родственным веществам и предполагаемые пути использования вещества. Эта информация нужна для подтверждения того, что испытание является необходимым для защиты здоровья человека и способствует выбору подходящей начальной дозы.

5. ТЕРМИНЫ И ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Доза (Dose): количество вводимого тестируемого вещества. Доза выражается как отношение массы тестируемого вещества к единице массы подопытного животного (например, мг/кг).

Предельная доза (Limit dose): доза, являющаяся самой большой при тестировании (2000 или 5000 мг/кг).

СГС (GHS): Согласованная на глобальном уровне система классификации опасности и маркировки химической продукции. Совместная деятельность ОЭСР (Организация экономического сотрудничества и развития), Комитета экспертов ООН по перевозке опасных грузов (физикохимические свойства) и МОТ (информирование об использовании опасных материалов), координируемая Межорганизационной программой по рациональному регулированию химических веществ (МПРРХВ).

DL50/LD50 (средняя смертельная доза, перорально): одиночная статистически полученная доза вещества, которая предположительно в 50% случаев может вызвать смерть животного. При введении перорально, DL50/LD50 выражается в отношении единицы массы испытываемого вещества к единице массы подопытного животного мг/кг.

6. СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

СОП - стандартная операционная процедура;
GLP - Good Laboratory Practice;
СОК – служба обеспечения качества;
ЛС – лекарственное средство.

7. ПРИМЕНЯЕМОЕ ОБОРУДОВАНИЕ / ИНСТРУМЕНТЫ / РЕАКТИВЫ

- журналы для заполнения первичных данных;
- салфетки для протирания рабочей поверхности;
- зонд для перорального введения;
- стерильные одноразовые пластиковые шприцы разных объемов;
- металлические иглы разных размеров;
- перманентный маркер;
- электронные весы;
- секундомер;
- вода очищенная;
- стеллажи для содержания животных;
- клетки для содержания животных;
- плексигласовые индивидуальные камеры для мышей и крыс;
- средства индивидуальной защиты (шапка, маска, перчатки, халат).

8. ПРОЦЕДУРА ВЫПОЛНЕНИЯ

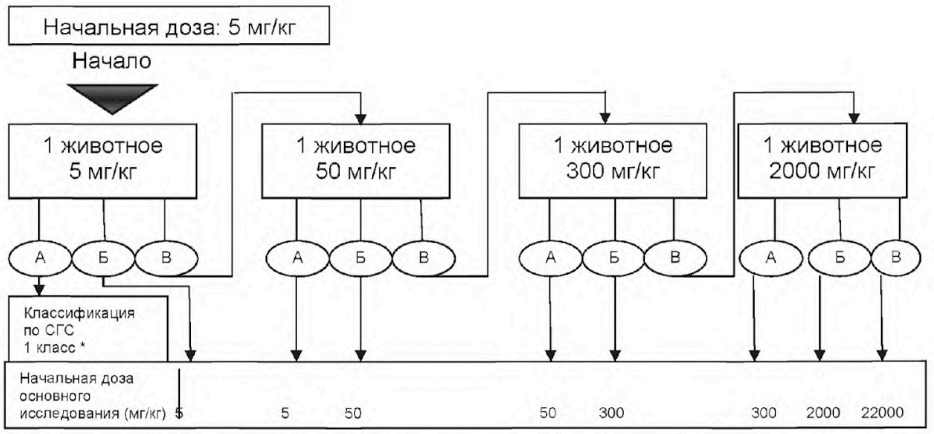
8.1. Принцип тестового метода. Группе животных одного пола, используя пошаговую процедуру, дают фиксированные дозы 5, 50, 300 и 2000 мг/кг (в особых случаях можно рассматривать дополнительную фиксированную дозу 5000 мг/кг). Начальная доза подбирается на основе прицельного исследования, так как доза предполагает воспроизведение некоторых признаков токсичности, не причиняя сильных токсических действий или летального исхода. Затем группам животных могут вводиться более высокие либо низкие дозы, это зависит от наличия или отсутствия признаков токсичности, или летального исхода. Процедура продолжается до тех пор, пока доза не приведет к выраженной токсичности или пока не будет зафиксирован один случай смерти, а также до тех пор, пока не будет наблюдаться отсутствие реакции при введении наибольшей дозы или пока не наступит смерть при наименьшей дозе.

8.2. Предварительное исследование. Целью предварительного исследования является подбор подходящей начальной дозы для основного исследования. Изучаемый препарат вводится одному животному последовательно в соответствии с блок-схемами 1-4. Предварительное исследование завершается, когда может быть принято решение относительно начальной дозы для основного испытания (или если при минимальной установленной дозе отмечается смерть).

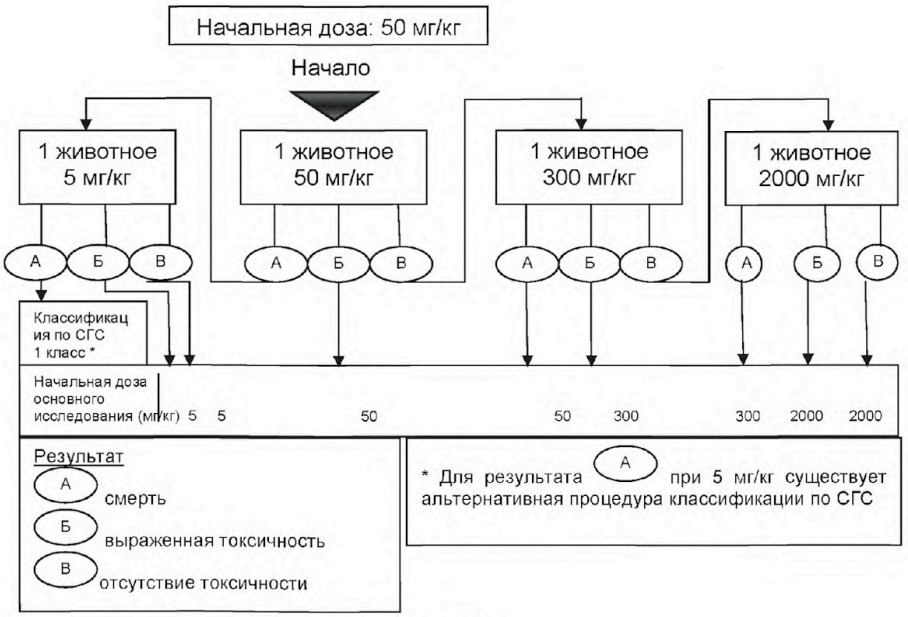
Начальная доза для предварительного исследования подбирается из установленных уровней доз (5, 50, 300 и 2000 мг/кг) как доза, которая может оказаться токсичной на основе исследований данного препарата или структурно родственных веществ в опытах *in vivo* или *in vitro*. При отсутствии такой информации начальная доза составляет 300 мг/кг. Между введением каждой дозы должно проходить, как минимум, 24 ч. Все животные должны наблюдаться в течение, как минимум, 14 дней.

В исключительных случаях, и только когда это оправдано определенными условиями, может быть рассмотрено исследование дополнительного установленного уровня дозы в 5000 мг/кг. Из соображений гуманного отношения к животным, исследования, относящиеся к Классу 5 СГС (от 2000 до 5000 мг/кг) нецелесообразны и могут проводиться, только если результаты подобных исследований имеют значение для здоровья животных или человека.

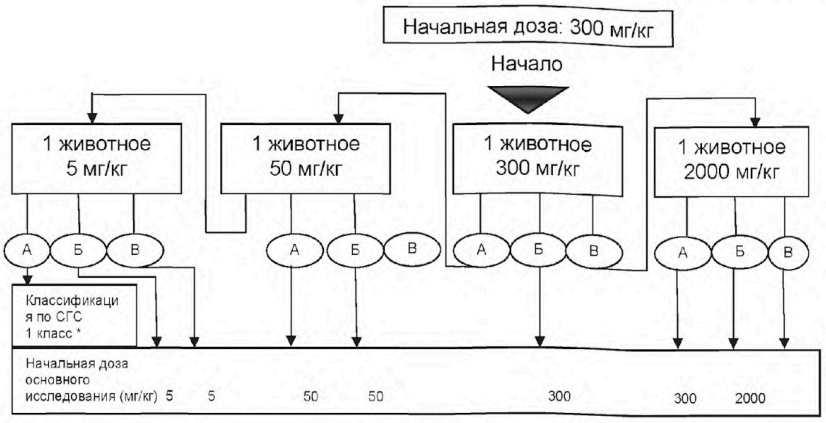
В случаях, когда животное при самом низком установленном уровне дозы (5 мг/кг) в предварительном исследовании умирает, необходимо закончить исследование и присвоить веществу класс 1 согласно классификации СГС. Однако если требуется дальнейшее подтверждение классификации вещества, необязательное дополнительное исследование может быть проведено следующим образом: второе животное тестируется с использованием дозы 5 мг/кг. Если второе животное умирает, то Класс 1 СГС подтверждается, и исследование немедленно завершается. Если второе животное выживает, то проводится дополнительное исследование на трех животных с использованием дозы 5 мг/кг. Поскольку в данном случае существует высокий риск смертности, дозировку проводят последовательным способом из соображений бережного отношения к животным. Временной интервал между дозированием каждого животного должен быть достаточным, чтобы установить, что предыдущее животное, вероятно, выживет. Если происходит вторая смерть, то последовательность дозирования должна быть немедленно завершена, и в дальнейшем тестирование на животных не проводится. Поскольку возникновение второй смерти (независимо от числа животных, протестированных ко времени завершения эксперимента) совпадает с результатом А (два или более смертельных случая), следует придерживаться правила классификации при установленной дозе 5 мг/кг (класс 1, если есть два или более смертельных случая или класс 2 - не более одного смертельного исхода).



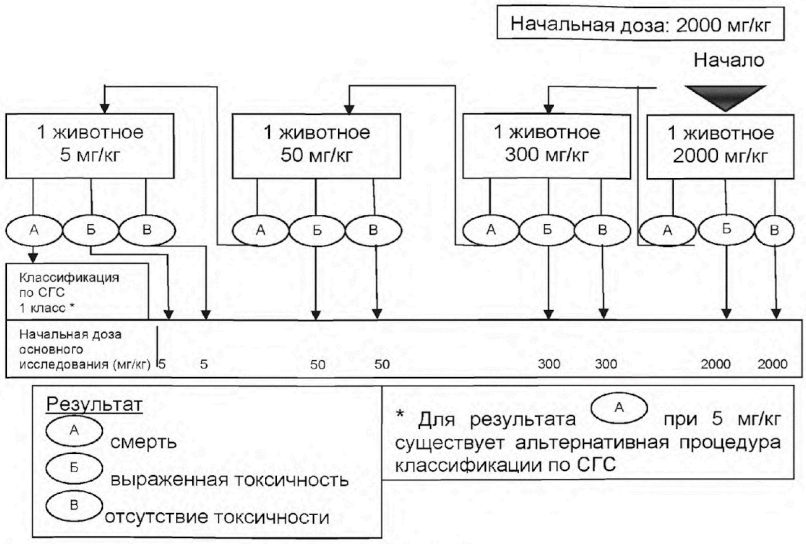
Блок-схема 1. Схема введения фармакологического вещества при предварительном исследовании, начальная доза 5 мг/кг.



Блок-схема 2. Схема введения фармакологического вещества при предварительном исследовании, начальная доза 50 мг/кг.



Блок-схема 3. Схема введения фармакологического вещества при предварительном исследовании, начальная доза 300 мг/кг.



Блок-схема 4. Схема введения фармакологического вещества при предварительном исследовании, начальная доза 2000 мг/кг.

8.3. Основное исследование. Шаги, которые необходимо предпринять после исследования с начальным уровнем дозы, показаны в блок-схемах 5-7. Необходимо проведение одного из трех действий:

-прекратить испытание и определить соответствующий класс опасности;

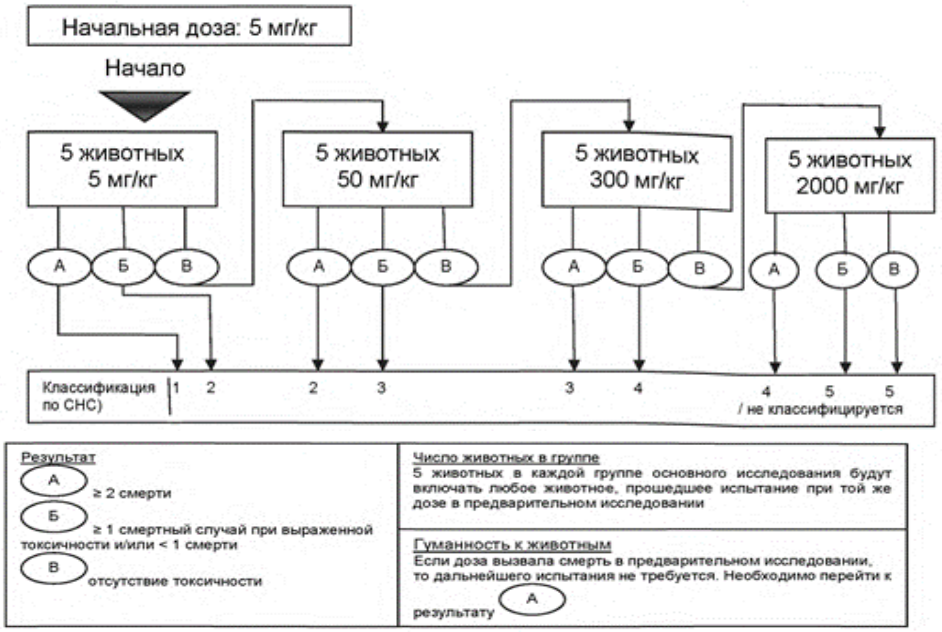
-провести испытание с более высоким уровнем дозы;

-провести испытание с меньшим фиксированным уровнем дозы.

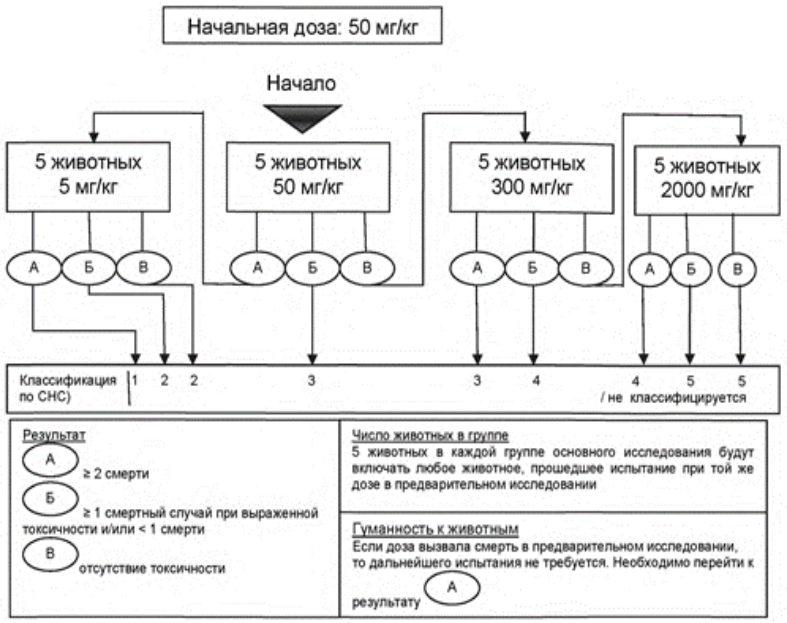
Однако в целях защиты животных, уровень дозы, который явился причиной смерти животного в предварительном исследовании, повторно в основном исследовании не рассматривается. Исследования показали, что наиболее вероятным результатом испытания с начальным уровнем дозы будет возможность классификации вещества и отсутствие необходимости проводить дальнейшие исследования.

В общей сложности пять животных одного пола следует использовать при проведении эксперимента с каждым уровнем доз. Из пяти животных в группе отбирается одно животное из предварительного исследования с выбранным уровнем дозы и четыре дополнительных животных (за исключением, нестандартных случаев, когда рассматриваемый уровень дозы в основном испытании не был включен в предварительное исследование).

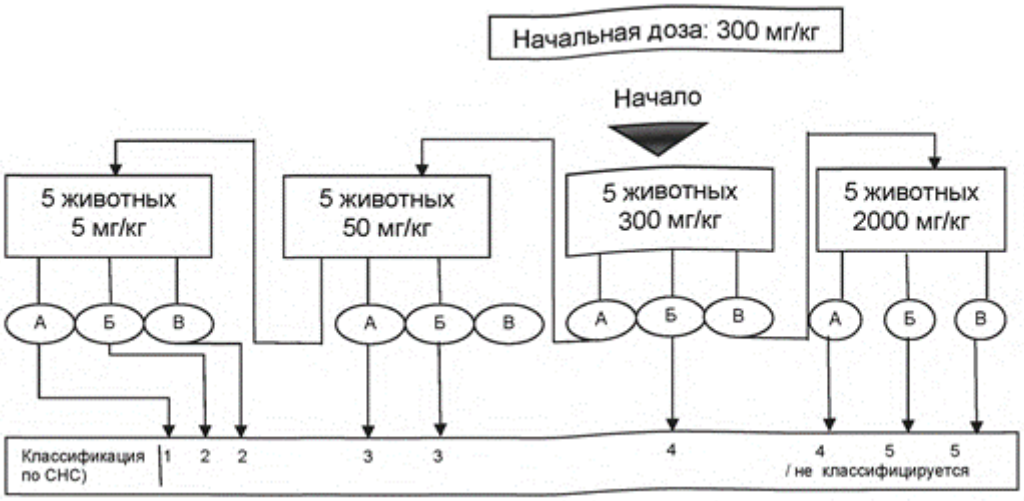
Временной интервал между приемом доз каждого уровня определяется началом, продолжительностью и тяжестью токсических признаков. Исследование животных со следующей дозой должно быть отложено до тех пор, пока не выживет одно из животных, принявших предыдущую дозу. Между принятием доз каждого уровня рекомендуется делать перерыв в три или четыре дня, если необходимо, для возможности наблюдения замедленной токсичности. Временной интервал может быть установлен как адекватный, например, в случае неубедительного ответа (реакции).



Блок-схема 5. Схема введения фармакологического вещества, начальная доза 5 мг/кг, при основном исследовании по оценке острой токсичности при внутрижелудочном поступлении методом фиксированной дозы (ГОСТ 32296-2013).

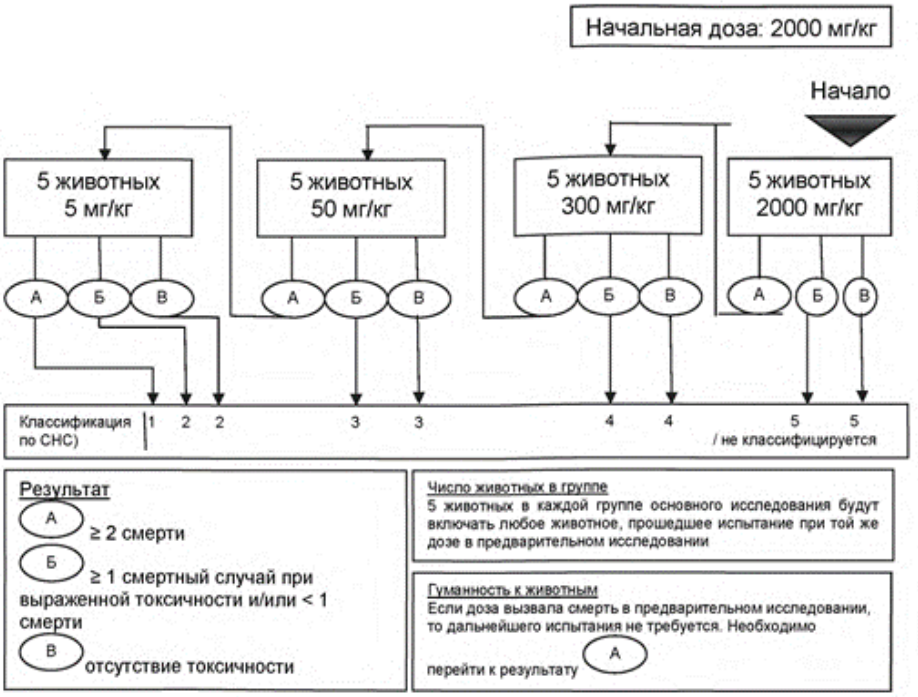


Блок-схема 6. Схема введения фармакологического вещества, начальная доза 50 мг/кг, при основном исследовании по оценке острой токсичности при внутрижелудочном поступлении методом фиксированной дозы (ГОСТ 32296-2013).



Блок-схема 7. Схема введения фармакологического вещества, начальная доза 300 мг/кг, при основном исследовании по оценке острой токсичности при внутрижелудочном поступлении методом фиксированной дозы (ГОСТ 32296-2013).

8.4. Испытание предельной дозы. Пороговое испытание предельной дозы проводится в случаях, когда исследователь обладает информацией о том, что вещество, вероятно, не является токсичным, например, обладает токсичностью только в дозах, превышающих предельные уровни. Информация о токсичности исследуемого вещества может быть получена из данных об исследовании родственных по физико-химическим свойствам веществ, смесей или продуктов, с учетом того, что имеет значение наличие и процентное содержание компонентов. В тех случаях, когда информация о токсичности вещества отсутствует или недостаточна, или, когда исследуемое вещество, вероятно, является токсичным, необходимо проводить основное исследование. Используя обычную процедуру, начальное изучение препарата в дозе 2000 мг/кг (в особых случаях 5000 мг/кг) вещества в предварительном испытании с последующим тестированием других четырех животных является исследованием предельной дозы (блок-схема 8).



Блок-схема 8. Схема испытания предельной дозы 2000 мг/кг.

8.5. Критерии для классификации исследуемых тест-объектов с ожидаемыми величинами DL50/LD50, превышающими 2000 мг/кг, без необходимости проведения испытания.

Критерии для определения Класса опасности 5 призваны идентифицировать исследуемые вещества, относящиеся к относительно низкому классу острой токсической опасности, но при определенных условиях представляющие опасность для более уязвимых популяций. Для этих веществ уровень DL50/LD50 предположительно находится в диапазоне концентраций 2000-5000 мг/кг при пероральном или дермальном воздействии и эквивалентных концентраций для других путей воздействия. Исследуемые вещества могут быть отнесены к данному Классу опасности, определяемому концентрациями: 2000 мг/кг < DL50/LD50 < 5000 мг/кг (Класс 5 в СГС) в следующих случаях:

а) если отнесены к этому классу согласно любой схеме испытания на основании смертельных исходов;

б) если получены надежные доказательства, указывающие на отнесение DL50/LD50 к Классу 5; или если другие исследования на животных или случаи токсического воздействия на человека и оказывают влияние на здоровье человека;

в) посредством экстраполяции, оценки и измерения данных, если нет показаний к отнесению к классу более высокой опасности; и

-доступна надежная информация, указывающая на значительную токсичность для человека; или

-любой смертельный исход, зарегистрированный во время испытания веществ, входящих в классы опасности до класса 4, и вводимых перорально; или

-если экспертная оценка подтверждает наличие клинических признаков токсичности при тестировании с концентрациями, превышающими указанные в Классе 4, кроме случаев диареи, пилоэрекции или вялости; или

-в случаях, когда экспертная оценка подтвердит надежность информации, указывающей на потенциальную значимость выраженного воздействия из других исследований на животных.

8.5.1. Испытания при дозах свыше 2000 мг/кг. В исключительных случаях, и только когда это оправдано определенными указаниями, может быть рассмотрено исследование дополнительного установленного уровня дозы в 5000 мг/кг. Из соображений защиты животных, исследования, относящиеся к Классу 5 СГС (от 2000 до 5000 мг/кг) нецелесообразны и могут проводиться, только если результаты подобных исследований имеют значение для здоровья животных или человека.

8.5.2. Предварительное исследование. Правила проведения последовательной процедуры также включают уровень доз 5000 мг/кг. Таким образом, при использовании в предварительном исследовании в качестве начальной дозы 5000 мг/кг в случае результата А (смерть) необходимо провести исследование второго животного с дозой 2000 мг/кг; результатов Б и В (явная токсичность или отсутствие токсичности) позволят выбрать для основной части исследования начальную дозу 5000 мг/кг. Аналогично, если в качестве начальной дозы не используется доза 5000 мг/кг, в случае результатов Б и В при 2000 мг/кг исследуется уровень дозы 5000 мг/кг; последующий результат А при 5000 мг/кг будет определять начальную дозу 2000 мг/кг основной части исследования и результаты Б и В - начальную дозу для основного исследования 5000 мг/кг.

8.5.3. Основное исследование. В правила проведения последовательной процедуры также включают уровень доз 5000 мг/кг. Таким образом, при использовании в основном исследовании в качестве начальной дозы 5000 мг/кг в случае результата А (> 2 смертей) необходимо провести исследование второй группы с дозой 2000 мг/кг; результата Б (явная токсичность или > 1 смерти) или В (отсутствие токсичности) вещество не будет классифицировано по системе СГС. Аналогично, если используется начальная доза, отличная от 5000 мг/кг, испытание продолжается с дозой 5000 мг/кг в случае результата Б при 2000 мг/кг; последовательный результат А при 5000 мг/кг приведет к отнесению вещества к классу 5 по СГС, а результаты Б и В не позволят классифицировать вещество.

8.6. Наблюдение за тест-системами. Животные наблюдаются индивидуально после введения дозы не меньше, чем один раз в первые 30 минут, регулярно в течение первых 24 ч, причем особое внимание уделяется первым четырем часам, и затем ежедневно в течение 14 дней, кроме случаев, когда они должны быть отстранены от исследования и умерщвлены гуманным способом по медицинским показаниям или найдены мертвыми. Длительность наблюдения зависит от токсических реакций, начала и длительности периода восстановления. Важно зафиксировать время появления и исчезновения симптомов токсичности, особенно если есть тенденция к замедленному возникновению токсических симптомов. Наблюдения, включающие отдельные отчеты о каждом животном, систематически регистрируются.

Дополнительное наблюдение может потребоваться, если признаки токсичности у животных не исчезают. В ходе наблюдений фиксируются изменения в коже и шерсти, в глазах и слизистых, в респираторной, кровеносной, вегетативной и центральной нервной системах, нарушения в соматомоторике и поведении. Внимание должно фокусироваться на явлениях тремора, конвульсий, слюноотделения, диареи, летаргии, сна и комы. Агонизирующие животные или животные, испытывающие непереносимую боль или находящиеся в безнадежном физическом состоянии, должны быть умерщвлены гуманным способом. Если животные умерщвлены из соображений гуманности или найдены мертвыми, время смерти должно быть зафиксировано максимально точно.

9. СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Березовская И.В., Митрохин Н.М // Экспресс-методы определения острой токсичности // Бюллетень ВНЦ БАВ. - М., 1990. - С. 45–67.
2. Березовская И.В., Иванова В.М. Актуальные проблемы безопасности дженериков //Бюллетень ВНЦ БАВ. - Старая Купавна, 2002. - С. 37–52.
3. Березовская И.В. Классификация химических веществ по параметрам острой токсичности при парентеральных способах введения // Хим.- фарм. журн. - 2003. - Т. 37. - № 3. - С. 32–34.
4. Голиков С.Н., Саноцкий И.В., Тиунов Л.А. Общие механизмы токсикологического действия. - Л.: Медицина, 1986. - С. 279.
5. Гуськова Т.А. Токсикология лекарственных средств. - Москва, 2008. - 196 с.
6. Куценко С.А. // Основы токсикологии. - СПб.: Фолиант, 2004. - 720 с.
7. Липперт Г. Международная система единиц в медицине. - М.: Медицина, 1980. -С. 208.
8. Методы определения токсичности и опасности химических веществ (токсикометрия) / Под ред. проф. И.В. Саноцкого. - М.: Медицина, 1970. - С. 343.
9. Общая токсикология / Под ред. Б.А. Курляндского и В.А. Филова. - М.: Медицина, 2002. - С. 606.
10. Проблема нормы в токсикологии / Под ред. проф. И.М. Трахтенберга. - М.: Медицина, 1991. - С. 204.
11. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Под ред. Миронова А.Н. Часть первая. - М.: Гриф и К, 2012. - 944 с.
12. Согласованная на глобальном уровне система классификации опасности и маркировки химической продукции (СГС) ST/SG/AC.10/30/Rev.4 / Четвертое пересмотренное издание. – Организация Объединенных наций, Нью-Йорк и Женева, 2011. – 684 с.
13. OЭСР Test № 420 «Acute Oral Toxicity - Fixed Dose Procedure».
14. British Toxicology Society Working Party on Toxicity (1984). Special report: a new approach to the classification of substances and preparations on the basis of their acute toxicity. Human Toxicol., 3, 85-92.
15. Van den Heuvel, M.J., Dayan, A.D. and Shillaker, R.O. (1987). Evaluation of the BTS approach to the testing of substances and preparations for their acute toxicity. Human Toxicol., 6, 279-291.
16. Van den Heuvel, M.J., Clark, D.G., Fielder, R.J., Koundakjian, P.P., Oliver, G.J.A., Pelling, D., Tomlinson, N.J. and Walker, A.P. (1990). The international validation of a fixed-dose procedure as an alternative to the classical LD50 test. Fd. Chem. Toxicol. 28, 469-482.
17. Whitehead, A. and Curnow, R.N. (1992). Statistical evaluation of the fixed-dose procedure. Fd. Chem. Toxicol., 30, 313-324.
18. Stallard, N. and Whitehead, A. (1995). Reducing numbers in the fixed-dose procedure. Human Exptl. Toxicol. 14, 315-323.
19. Stallard, N., Whitehead, A. and Ridgeway, P. (2000). Statistical evaluation of modifications to the fixed dose procedure (manuscript in preparation).
20. OECD (2000). Guidance Document on Acute Oral Toxicity. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No.24.
21. 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 Assesment No 19.

22. OECD (1998). Harmonised Integrated Hazard Classification 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://webnet 1, oecd.org/oecd/pages/home/displaygeneral/0,3380, EN-documents-521-14-no-24-no-0, FF.html].
23. 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.
24. Chan P.K and A.W. Hayes (1994) Chapter 16 Acute Toxicity and Eye Irritation In: Principles and Methods of Toxicology. 3rd Edition. A.W. Hayes, Editor. Raven Press, Ltd. New York, USA.

10. ПРИЛОЖЕНИЯ

ПРИЛОЖЕНИЕ А

Лаборатория токсикологии

НЦИЛС ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России

СОГЛАСОВАНО
Руководитель СОК
_____
В.Н.Перфилова

«___» _____20___г.

УТВЕРЖДЕНО
Руководитель ИЦ
_____
Л.И. Бугаева

«___» _____20___г.

М.П.

Журнал регистрации выживших и погибших тест-систем при изучении острой токсичности фармакологических веществ

Место хранения: 400087, г. г. Волгоград, ул. Новороссийская, д. 39,
Комната хранения:

Начат	
Окончен	

Список сотрудников, допущенных к заполнению журнала по регистрации выживших и погибших тест-систем при изучении острой токсичности фармакологических веществ

№ п/п	Ф.И.О.	Должность	Подпись
1.			
2.			
3.			
4.			
5.			
6.			
7.			
8.			
9.			
10.			

Карта регистрации гибели и эвтаназии тест-систем

Код исследования _____

Группа _____ Вещество_____ Доза _____
Дата проведения эвтаназии _____
Способ эвтаназии _____
Вид ТС_____ Пол ТС _____
Исполнители: _____

№ животного	Гибель	Эвтаназия	Время летального исхода	Сутки эксперимента

Кол-во животных в группе на начало исследования	
Кол-во животных в группе по окончании исследования	
Кол-во умерших животных	
Кол-во животных, подвергшихся эвтаназии	

Подписи исполнителей:
_____ / **Ф. И. О.**_____/
подпись расшифровка подписи
Руководитель исследования:
_____ / **Ф. И. О.**_____/

ПРИЛОЖЕНИЕ Б

Лаборатория токсикологии

НЦИЛС ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России

СОГЛАСОВАНО
Руководитель СОК
_____
В.Н.Перфилова

«___» _____20___г.

УТВЕРЖДЕНО
Руководитель ИЦ
_____
Л.И. Бугаева

«___» _____20___г.
М.П.

Журнал регистрации признаков отравления тест – систем при изучении острой токсичности фармакологических веществ

Место хранения: 400087, г. г. Волгоград, ул. Новороссийская, д. 39,
Комната хранения:

Начат	
Окончен	

Список сотрудников, допущенных к заполнению журнала регистрации признаков отравления тест –систем при изучении острой токсичности фармакологических веществ

№ п/п	Ф.И.О.	Должность	Подпись
1.			
2.			
3.			
4.			
5.			
6.			
7.			
8.			
9.			
10.			

Карта регистрации признаков отравления тест-систем

Код исследования _____

Дата: _____ Вид ТС: _____ Пол: _____ №ТС_____ Масса_____ Вещество: _____Доза: _____

Путь введения: _____ t введения_____ Группа_____ Исполнители: _____

Показатели	Время от момента введения вещества													
общее состояние														
шерстный и кожный покров														
видимые слизистые														
поведение (особенности)														
двигательная активность														
координация движений														
тонус скелетной мускулатуры														
реакция на раздражители (тактильные, болевые,звуковые)														
характер дыхания														
частота дыхания														
тремор														
судороги														
птоз														
корнеальные рефлексы														
рефлекс переворачивания														
особенности дефекаций														
особенности уринаций														

Показатели оцениваются в баллах от 0 до 8: 4 балла – норма; 0-3 балла – снижение; 5-8 баллов – повышение показателя.

Подписи исполнителей:

_____ / **Ф. И. О.**_____/

подпись расшифровка подписи

Руководитель исследования:

_____ / **Ф. И. О.**_____/

ПРИЛОЖЕНИЕ В

Лаборатория токсикологии

НЦИЛС ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России

СОГЛАСОВАНО
Руководитель СОК
_____
В.Н.Перфилова

«___» _____20___г.

УТВЕРЖДЕНО
Руководитель ИЦ
_____
Л.И. Бугаева

«___» _____20___г.

М.П.

Журнал регистрации массы тела тест-систем при изучении острой токсичности фармакологических веществ

Место хранения: 400087, г. г. Волгоград, ул. Новороссийская, д. 39,
Комната хранения:

Начат	
Окончен	

Список сотрудников, допущенных к заполнению журнала регистрации массы тела тест-систем при изучении острой токсичности фармакологических веществ

№ п/п	Ф.И.О.	Должность	Подпись
1.			
2.			
3.			
4.			
5.			
6.			
7.			
8.			
9.			
10.			

Карта регистрации динамики массы тела тест-систем

Код исследования _____

Время проведения эксперимента_____
Группа _____ Вещество_____ Доза _____
Вид ТС_____ Пол ТС _____
Исполнители: _____

№ животного	Масса тела, г			
	Исходные данные	1сутки	7 дней	14 дней

Подписи исполнителей:

_____ / **Ф. И. О.**_____/
подпись расшифровка подписи

Руководитель исследования:

_____ / **Ф. И. О.**_____/

ПРИЛОЖЕНИЕ Г

Лаборатория токсикологии

НЦИЛС ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России

СОГЛАСОВАНО
Руководитель СОК
_____
В.Н.Перфилова

«___» _____20___г.

УТВЕРЖДЕНО
Руководитель ИЦ
_____
Л.И. Бугаева

«___» _____20___г.

М.П.

Журнал формирования групп при изучении острой токсичности фармакологических веществ

Место хранения: 400087, г. г. Волгоград, ул. Новороссийская, д. 39,
Комната хранения:

Начат	
Окончен	

Список сотрудников, допущенных к заполнению журнала формирования групп при изучении острой токсичности фармакологических веществ

№ п/п	Ф.И.О.	Должность	Подпись
1.			
2.			
3.			
4.			
5.			
6.			
7.			
8.			
9.			
10.			

Карта регистрации формирования групп тест-систем при изучении острой токсичности

Код исследования _____

Дата_____ Время проведения эксперимента_____
Группа _____ Вещество_____ Доза _____
Вид ТС_____ Пол ТС _____
Исполнители: _____

№ п/п	Масса тела	Присвоенный номер

Подписи исполнителей:

_____ / **Ф. И. О.**_____/
подпись расшифровка подписи

Руководитель исследования:

_____ / **Ф. И. О.**_____/

Лист регистрации изменений от 07.06.2022 в СОП № III/1П-002-2022/3 версия 3

№ изм.	№ страницы	№ пункта	Внесенные изменения
1	1	Титул. лист	*В заглавной части титульного листа удалено:* «Дата утверждения» и строка «Составление, утверждение и пересмотр СОП». *В заглавной части титульного листа* «Дата пересмотра» *заменено* на «Дата окончания действия версии СОП»; «Составлено» *заменено* на «Составлено/пересмотрено». *Из колонтитула СОП удалено:* «Дата начала действия». В отдельных случаях слово «животное» заменено на «тест-систему»; слово «вещество, препарат и т.п.» заменено на «тест-объект».
2	1	1	*Удалено:* … **И ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ** **ЦЕЛЬ:** Цель данной СОП… 2… Сотрудники, работающие с этой методикой, должны руководствоваться данной СОП и грамотно вести соответствующую документацию. *Добавлено:* **…СОП** 1.1. ЦЕЛЬ: … 1.2. …
3	1-2	2	*Изменен порядковый номер п. с 3 на 2.* *Удалено:* 1. Федеральный закон «Об обращении лекарственных средств» от 12 апреля 2010 г. № 61-ФЗ, статьи 4, 11 (в ред. от 02.08.2019 N 297-ФЗ). 3. Приказ Минздрава России от 01.04.2016 N 199н "Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики". 4. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Под ред. Миронова А.Н. Часть первая. — М.: Гриф и К, 2012. — 944 с.
4	2	3	*Изменен порядковый номер п. с 4 на 3.*
5	2-3	4	*Изменен порядковый номер п. с 6 на 4.*
6	3	5	*Удалено:* **5. ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ.** Целью изучения острой токсичности является определение переносимых, токсических и летальных доз фармакологического вещества и причин наступления гибели животных с анализом клинической картины интоксикации. Метод исследования острой токсичности основан на введении животным серий фиксированных доз. Данный подход позволяет избежать использование смерти животных как конечной точки эксперимента и основывается на наблюдении явных признаков токсичности в одной из серий

			введенных фиксированных доз. Испытания in vivo и модельные эксперименты совместно демонстрируют, что процедура является воспроизводимой, требует меньшее число животных и причиняет животным меньше страданий, чем традиционные методы, а также позволяет ранжировать вещества таким же образом, как и другие методы исследования острой токсичности. Принцип метода заключается в том, что в основной части исследования используются только средние токсичные дозы, введение которых, как ожидается, не может привести к летальному исходу. Исследуемые вещества не должны также применяться в дозировках, которые являются причиной возникновения выраженных болевых ощущений и недомоганий, оказывая разъедающее или сильно раздражающее действие. Агонизирующие животные или животные, испытывающие непереносимую боль или находящиеся в безнадежном физическом состоянии, должны быть умерщвлены гуманным способом и учтены при подведении результатов исследования также, как и животные, погибшие во время исследования.
7	3	5	*Изменен порядковый номер п. с 7 на 5.* *Удалено:* *Термины и определения в редакции ФЗ № 61 от 12.04.2010 г.:* **Лекарственные средства** - вещества или их комбинации, вступающие в контакт с организмом человека или животного, проникающие в органы, ткани организма человека или животного, применяемые для профилактики, диагностики (за исключением веществ или их комбинаций, не контактирующих с организмом человека или животного), лечения заболевания, реабилитации, для сохранения, предотвращения или прерывания беременности и полученные из крови, плазмы крови, из органов, тканей организма человека или животного, растений, минералов методами синтеза или с применением биологических технологий. К лекарственным средствам относятся фармацевтические субстанции и лекарственные препараты. **Лекарственные препараты** - лекарственные средства в виде лекарственных форм, применяемые для профилактики, диагностики, лечения заболевания, реабилитации, для сохранения, предотвращения или прерывания беременности. **Фармацевтическая субстанция** - лекарственное средство в виде одного или нескольких обладающих фармакологической активностью действующих веществ вне зависимости от природы происхождения, которое предназначено для производства, изготовления лекарственных препаратов и определяет их эффективность. **Лекарственная форма** - состояние лекарственного препарата, соответствующее способам его введения и

			применения и обеспечивающее достижение необходимого лечебного эффекта. **Вспомогательные вещества** - вещества неорганического или органического происхождения, используемые в процессе производства, изготовления лекарственных препаратов для придания им необходимых физико-химических свойств. **Дозировка** - содержание одного или нескольких действующих веществ в количественном выражении на единицу дозы, или единицу объема, или единицу массы в соответствии с лекарственной формой либо для некоторых видов лекарственных форм количество высвобождаемого из лекарственной формы действующего вещества за единицу времени. **Безопасность лекарственного средства** - характеристика лекарственного средства, основанная на сравнительном анализе его эффективности и риска причинения вреда здоровью. **Доклиническое исследование лекарственного средства** - биологические, микробиологические, иммунологические, токсикологические, фармакологические, физические, химические и другие исследования лекарственного средства путем применения научных методов оценок в целях получения доказательств безопасности, качества и эффективности лекарственного средства. *Термины и определения в редакции «Руководства по проведению доклинических исследований лекарственных средств» (под ред. Миронова А.Н., ч. 1, 2012):* **Фармакологическое вещество** – вещество или смесь веществ с установленной фармакологической активностью. **Действующее вещество (субстанция)** – вещество растительного, животного, микробного, синтетического или полусинтетического происхождения, обладающее фармакологической активностью и предназначенное для производства и изготовления лекарственных препаратов. **Контрольное вещество** – любое вещество (или смесь), отличное от тестируемого вещества, корма и воды, введенное в тест-систему с целью сравнения с тестируемым веществом. **Токсичность** – свойство вещества при попадании в определенных количествах в организм человека, животных или растений вызывать их отравление или гибель. **Острая токсичность -** токсикометрическая характеристика фармакологического вещества или лекарственного препарата (ЛП), выражающая его способность вызывать гибель животных при однократном введении или при введении через короткие (не более 6 ч) интервалы времени в течение суток. **$ЛД_{50}$** (полулетальная доза, доза половинной выживаемости, среднесмертельная доза, LD_{50}) - средняя доза вещества,

			вызывающая гибель половины (50%) животных испытуемой группы. *Следующие термины и определения приведены в редакции ГОСТ 32296-2013 и ГОСТ 32644-2014:*
8	3	6	*Добавлено:* **6. СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** **СОП -** стандартная операционная процедура; **GLP -** Good Laboratory Practice; **СОК –** служба обеспечения качества; **ЛС –** лекарственное средство.
9	3-4	7	*Изменен порядковый номер п. с 8 на 7.* *Удалено:* – Компьютер; –Протокол исследования; – бланки для заполнения первичных данных; – перчатки хирургические резиновые по ГОСТ 3–88; – вазелиновое масло; – ректальный термометр; – Аквадистиллятор ДЭ-4-2 (Россия, г. Саранск); – облучатель бактерицидный передвижной «Генерис» (Россия, г.Челябинск); – … ВСТ-600/10 (Россия, Санкт-Петербург), – … 1,0; 2,0; 3,0; 5,0 и 10,0 мл (SFM HospitalProducts GmbH, GERMANY), – … (ООО «Открытая Наука», Москва, Россия *Добавлено:* **…/РЕАКТИВЫ** - журналы для заполнения первичных данных; - … разных …; - металлические иглы разных размеров; - перманентный маркер; - секундомер; - вода очищенная;
10	4-10	8	*Изменен порядковый номер п. с 9 на 8.* *Удалено:* **8.2. Выбор тест-систем.** Наиболее предпочтительным видом грызунов является крыса, вместе с тем могут использоваться и другие виды грызунов. В основном используются женские особи, так как они являются более чувствительными к воздействию токсикантов. Однако если токсикологические и токсикокинетические данные для структурно родственных веществ показывают, что мужские особи являются более чувствительными, следует использовать животных данного пола. Проведение испытания с использованием мужских особей должно быть научно обосновано. В эксперименте должны быть использованы здоровые молодые половозрелые особи обычно используемых

			лабораторных линий. Женские особи не должны быть беременными или рожавшими. Каждое животное на момент начала эксперимента должно быть в возрасте от 8 до 12 недель, а его масса должна составлять ±10-20% от средней массы ранее исследуемых животных. **8.3. Условия содержания и кормления тест-систем.** Температура в лабораторной комнате должна составлять (22±2) С. Относительная влажность должна быть как минимум 30% и не превышать 70%. Освещение должно быть искусственным в последовательности 12 часов - свет, 12 часов - темнота. При кормлении может быть использована обычная лабораторная диета с неограниченным количеством питьевой воды. Животных можно содержать группами в клетках в зависимости от дозы, однако количество животных в клетке не должно препятствовать наблюдению за каждым из них. **8.4. Подготовка тест-систем.** Животные должны быть отделены методом сплошной выборки, помечены и содержаться в клетках не менее пяти дней до начала введения тестируемого вещества, что позволит им привыкнуть к лабораторным условиям. **8.5. Предварительная пищевая депривация.** Перед введением дозы животных необходимо ограничить в пище (т.е. крыс не кормить с вечера перед введением дозы, но поить; мышей не кормить три-четыре часа перед введением дозы, но поить). После голодания необходимо взвесить животных, затем ввести испытываемое вещество. После введения препарата крыс не кормить три - четыре часа, мышей - один - два часа. Если доза вводится порционно, в зависимости от периода введения дозы животным может потребоваться корм или питье. **8.6. Тест-объекты.** Исследовательская лаборатория должна изучить всю имеющуюся информацию по тестируемому веществу до начала исследования. Такая информация будет включать отличительные особенности и химическую структуру вещества; его физико-химические свойства; результаты любых in vitro и in vivo исследований токсичности вещества; токсикологические данные по структурно родственным веществам; и предполагаемое использование вещества. Эта информация является необходимой, чтобы убедить все заинтересованные стороны относительно того, что исследование имеет важное значение для защиты здоровья человека, а также она поможет в выборе наиболее подходящей начальной дозы. Сведения о структуре, физико-химических свойствах, растворимости, условиях хранения, фармакологической активности с представлением данных экспериментальных исследований, предполагаемых дозах и путях введения в

			клинике, а также другие значимые для проведения эксперимента сведения о свойствах субстанции фармакологического вещества или его лекарственной формы, предоставляются разработчиком. В том числе в виде предварительной нормативной документации (проект ФС, аналитический паспорт вещества и пр.) на фармакологическое вещество. Для лекарственных форм предоставляются проект ФСП, сертификат соответствия и характеристика вспомогательных веществ, использованных при ее получении (растворители, наполнители, стабилизаторы и др.). **8.7. Подготовка доз тест-объектов.** Как правило, изучаемое вещество вводится фиксированными объемами в диапазоне испытуемых доз путем изменения концентрации доз. Если изучаемые продукты в жидком состоянии, то целесообразно их использование для тестирования без разбавления, это может быть важно для последующей оценки риска использования вещества. Максимальный разовый объем жидкости зависит от размера подопытного животного. Вводимый грызунам объем не должен превышать 1 мл/100 г массы тела: между тем, в случаях с водными растворами объем дозы может составить 2 мл/100 г массы тела. В любом случае, максимальный объем вводимой дозы не должен быть превышен. Рекомендуется использовать водные растворы/суспензии/эмульсии химических веществ, для продуктов, нерастворимых в воде и в других растворителях, отдавая предпочтение растворам/суспензиям/эмульсиям на масляной основе (растительные масла). В случае использования разбавителя (растворителя), не являющегося водой, его токсикологические характеристики должны быть известны. Дозы должны быть приготовлены незадолго до введения с учетом стабильности изучаемого препарата в период исследования. **8.8. Введение доз тест-объектов.** Испытываемое вещество вводится разовой дозой через зонд: желудочную трубку или интубационную канюлю. Если в исключительных случаях введение разовой дозы невозможно, доза может быть введена частями в период, не превышающий 24 ч. **8.15. Масса тела.** Масса тела животного должна быть установлена незадолго до введения тестируемого вещества, и контролироваться не менее чем раз в неделю после испытания. Изменения в массе тела должны быть вычислены и зафиксированы. Выжившие по окончании испытания животные должны быть взвешены и умерщвлены гуманным способом. **8.16. Патологическая анатомия.** Все животные в исследовании. Всех подопытных животных (включая погибших во время испытаний, а также исключенных по

			медицинским показателям) необходимо подвергнуть общей аутопсии. Для каждого животного должны быть зарегистрированы все общие патологические изменения. Рекомендуется учесть также результаты микроскопического анализа органов у животных, проживших 24 и больше часов после первого приема тестируемого вещества. Такие результаты могут содержать полезную информацию. **8.17. Данные исследования.** На каждого животного должны быть собраны данные. Кроме того, все данные должны быть оформлены в виде таблиц на каждую подопытную группу, содержащих сведения о количестве животных, демонстрирующих признаки токсичности, количестве животных, погибших во время испытания или умерщвленных из соображений гуманности, время смерти каждого животного, описание и временной график токсического действия и восстановления, результаты вскрытия. **8.18. Отчет по результатам исследования.** Отчет об испытании должен содержать следующую информацию: **Исследуемый тест-объект:** - физическая природа, чистота, и при необходимости, физико-химические свойства (в том числе изомеризация); - идентифицирующие данные, в том числе CAS - номер; **Растворитель (если используется):** - обоснование выбора растворителя в случае, если это не вода; **Подопытные тест-системы:** - вид/род используемых животных; - микробиологический статус животных, если таковой известен; - число, возраст и пол животных (в том числе, при необходимости, обоснование применения самцов вместо самок); - происхождение, условия содержания, питание и так далее; **Условия испытания:** - технология приготовления испытываемого вещества (включая физические параметры используемых компонентов); - подробности о введении тестируемого вещества, включая дозировку, объем и время приема; -подробности о качестве корма и воды (включая способ/источник корма и воды); -обоснование выбора начальной дозы. **Результаты:** -сведение в таблицу реакций каждого подопытного животного на вещество на уровень введенной дозы (т.е. тех животных, которые реагируют на токсичность, в т.ч. летальный исход, изменение основных свойств,

			интенсивность и продолжительность эффекта токсикологической значимости), -сведение в таблицу веса тела и изменений в весе тела, -индивидуальная масса тела животного в день введения вещества, спустя неделю после введения вещества, на момент гибели или умерщвления, -дата и время гибели, если она произошла раньше запланированного умерщвления, -временной график появления признаков токсичности, сведения об обратимости признаков токсичности для каждого животного, -результаты вскрытия и результаты гистопатологического исследования для каждого животного, если таковые имеются. **Обсуждение и интерпретация результатов;** **Выводы.**
11	11-12	9	*Изменен порядковый номер п. с 10 на 9.* *Добавлено:* 11. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Под ред. Миронова А.Н. Часть первая. - М.: Гриф и К, 2012. - 944 с.
12	13-24	10	*Добавлен п. 10 ПРИЛОЖЕНИЯ* *Удалено:* **ПРИЛОЖЕНИЕ А** **Регистрационная карта к протоколу исследования № _____** **Протокол регистрации гибели животных при изучении острой токсичности** **Название исследования _____** **Дата введения вещества_____ Время регистрации_____** **Группа _____ Вещество_____ Доза _____** **Способ эвтаназии _____** **Вид животных_____ Пол животных _____** **Исполнители: _____** **ТАБЛИЦА** **Подписи исполнителей_____** **ПРИЛОЖЕНИЕ Б Регистрационная карта к протоколу исследования № _____ Протокол изучения острой токсичности** Дата: _____ Животное: вид_____ пол _____масса_____Вещество_____доза_____t введения_____ **ТАБЛИЦА** **Подписи исполнителей_____** **ПРИЛОЖЕНИЕ В** **Регистрационная карта к протоколу исследования № _____** **Протокол регистрации динамики массы тела животных при изучении острой токсичности** **Название исследования _____** **Дата_____ Время проведения эксперимента_____** **Группа _____ Вещество_____ Доза _____** **Вид животных_____ Пол животных _____** **Исполнители: _____**

			ТАБЛИЦА **Подписи исполнителей**_____ *Добавлено:* **ПРИЛОЖЕНИЕ А** Журнал регистрации выживших и погибших тест-систем при изучении острой токсичности фармакологических веществ **Карта регистрации гибели и эвтаназии тест-систем** **Код исследования** _____ Группа _____ Вещество_____ Доза _____ Дата проведения эвтаназии _____ Способ эвтаназии _____ Вид ТС_____ Пол ТС _____ Исполнители: _____ **ТАБЛИЦА** **Подписи исполнителей:** _____ / **Ф. И. О.**_____/ подпись расшифровка подписи **Руководитель исследования:** _____ / **Ф. И. О.**_____/ **ПРИЛОЖЕНИЕ Б** Журнал регистрации признаков отравления тест – систем при изучении острой токсичности фармакологических веществ **Карта регистрации признаков отравления тест-систем** **Код исследования** _____ Дата: _____ Вид ТС: _____ Пол: _____ №ТС_____ Масса_____ Вещество: _____Доза: _____ Путь введения: _____ t введения_____ Группа_____ Исполнители: _____ **ТАБЛИЦА** **Подписи исполнителей:** _____ / **Ф. И. О.**_____/ подпись расшифровка подписи **Руководитель исследования:** _____ / **Ф. И. О.**_____/ **ПРИЛОЖЕНИЕ В** Журнал регистрации массы тела тест-систем при изучении острой токсичности фармакологических веществ **Карта регистрации динамики массы тела тест-систем** **Код исследования** _____ Время проведения эксперимента_____ Группа _____ Вещество_____ Доза _____ Вид ТС_____ Пол ТС _____ Исполнители: _____ **ТАБЛИЦА** **Подписи исполнителей:** _____ / **Ф. И. О.**_____/ подпись расшифровка подписи **Руководитель исследования:**

			_____ / **Ф. И. О.**_____/ **ПРИЛОЖЕНИЕ Г** Журнал формирования групп при изучении острой токсичности фармакологических веществ **Карта регистрации формирования групп тест-систем при изучении острой токсичности** **Код исследования** _____ Дата_____ Время проведения эксперимента_____ Группа _____ Вещество_____ Доза _____ Вид ТС_____ Пол ТС _____ Исполнители: _____ **ТАБЛИЦА** **Подписи исполнителей:** _____ / **Ф. И. О.**_____/ подпись расшифровка подписи **Руководитель исследования:** _____ / **Ф. И. О.**_____/
13	Каждая страница	колонтитул	*Удалено:* Начало действия:

Руководитель лаборатории:

«____» _____ _____ г. _____ /_____/

дата подпись