

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ
СТАНДАРТ

ГОСТ
32636—
2014

МЕТОДЫ ИСПЫТАНИЯ ПО ВОЗДЕЙСТВИЮ ХИМИЧЕСКОЙ ПРОДУКЦИИ НА ОРГАНИЗМ ЧЕЛОВЕКА

Субхроническая ингаляционная токсичность:
90-дневное исследование

Издание официальное



Москва
Стандартинформ
2019

Предисловие

Цели, основные принципы и общие правила проведения работ по межгосударственной стандартизации установлены ГОСТ 1.0 «Межгосударственная система стандартизации. Основные положения» и ГОСТ 1.2 «Межгосударственная система стандартизации. Стандарты межгосударственные, правила и рекомендации по межгосударственной стандартизации. Правила разработки, принятия, обновления и отмены»

Сведения о стандарте

1 ПОДГОТОВЛЕН Федеральным государственным унитарным предприятием «Всероссийский научно-исследовательский центр стандартизации, информации и сертификации сырья, материалов и веществ» (ФГУП «ВНИЦСМВ»), Техническим комитетом по стандартизации ТК 339 «Безопасность сырья, материалов и веществ» на основе собственного перевода на русский язык англоязычной версии документа, указанного в пункте 5

2 ВНЕСЕН Федеральным агентством по техническому регулированию и метрологии

3 ПРИНЯТ Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации (протокол от 30 мая 2014 г. № 67-П)

За принятие проголосовали:

Краткое наименование страны по МК (ИСО 3166) 004—97	Код страны по МК (ИСО 3166) 004—97	Сокращенное наименование национального органа по стандартизации
Азербайджан	AZ	Азстандарт
Армения	AM	Минэкономики Республики Армения
Беларусь	BY	Госстандарт Республики Беларусь
Казахстан	KZ	Госстандарт Республики Казахстан
Киргизия	KG	Кыргызстандарт
Молдова	MD	Молдова-Стандарт
Россия	RU	Росстандарт
Таджикистан	TJ	Таджикстандарт
Туркмения	TM	Главгосслужба «Туркменстандартлары»
Узбекистан	UZ	Узстандарт
Украина	UA	Минэкономразвития Украины

4 Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 3 октября 2014 г. № 1269-ст межгосударственный стандарт ГОСТ 32636—2014 введен в действие в качестве национального стандарта Российской Федерации с 1 июня 2015 г.

5 Настоящий стандарт идентичен международному документу OECD, Test No. 413:2009 «Субхроническая ингаляционная токсичность: 90-дневное исследование» («Subchronic Inhalation Toxicity: 90-Day Study», IDT).

Наименование настоящего стандарта изменено относительно наименования указанного международного документа для приведения в соответствие с ГОСТ 1.5 (подраздел 3.6)

6 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

7 ПЕРЕИЗДАНИЕ. Май 2019 г.

Информация о введении в действие (прекращении действия) настоящего стандарта и изменений к нему на территории указанных выше государств публикуется в указателях национальных стандартов, издаваемых в этих государствах, а также в сети Интернет на сайтах соответствующих национальных органов по стандартизации.

В случае пересмотра, изменения или отмены настоящего стандарта соответствующая информация будет опубликована на официальном интернет-сайте Межгосударственного совета по стандартизации, метрологии и сертификации в каталоге «Межгосударственные стандарты»

Стандартинформ, оформление, 2015, 2019



В Российской Федерации настоящий стандарт не может быть полностью или частично воспроизведен, тиражирован и распространен в качестве официального издания без разрешения Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии

Содержание

1 Область применения	1
2 Описание метода	2
2.1 Животные	2
2.1.1 Выбор видов	2
2.1.2 Подготовка	2
2.1.3 Условия содержания и кормления	2
2.2 Ингаляционные камеры	2
2.3 Исследование токсичности	2
2.3.1 Предельные концентрации	2
2.3.2 Исследование по определению диапазона доз	3
2.3.3 Основное исследование	3
2.3.4 Промежуточные умерщвления	4
2.3.5 Вспомогательное (реверсивное) исследование	4
2.3.6 Контрольные животные	4
2.4 Условия проведения исследования	4
2.4.1 Введение концентраций	4
2.4.2 Гранулометрический состав	4
2.4.3 Приготовление исследуемого вещества в среде	5
2.5 Контроль условий экспозиции	5
2.5.1 Воздушные потоки в камере	5
2.5.2 Температура и относительная влажность в камере	5
2.5.3 Исследуемое вещество: номинальная концентрация	5
2.5.4 Исследуемое вещество: фактическая концентрация	5
2.5.5 Исследуемое вещество: гранулометрический состав	6
3 Наблюдения	6
3.1 Массы тела	7
3.2 Потребление пищи и воды	7
4 Клиническая патология	7
4.1 Офтальмологический осмотр	8
5 Макроскопическая патология и масса органов	8
6 Гистопатология	9
7 Данные исследований и отчет	10
7.1 Данные исследований	10
7.2 Отчет об исследовании	10
Библиография	12

Введение

Данное пересмотренное Руководство по испытанию 413 (ТГ 413) было разработано для того, чтобы полностью охарактеризовать токсичность исследуемого препарата при ингаляционном поступлении в течение субхронического воздействия продолжительностью 90 дней, а также обеспечить надежными данными для количественных оценок риска вдыхания.

До проведения исследования в целях повышения качества исследования и минимизации используемых животных испытательной лаборатории должна быть рассмотрена вся доступная информация об исследуемом препарате. Информация, которая поможет в выборе подходящих концентраций испытания, может включать идентичность, химическую структуру и физико-химические свойства исследуемого препарата; результаты любых *in vitro* или *in vivo* испытаний токсичности; предполагаемое(ые) использование(я) и вероятное воздействие на человека; доступные данные (Q)SAR и токсикологические данные структурно родственных веществ; а также данные, полученные из других исследований повторного воздействия. Если в ходе исследования ожидается или наблюдается нейротоксичность, руководитель исследования может выбрать включение подходящих оценок, таких как функциональная наблюдательная батарея (ФНБ) и измерение двигательной активности. Хотя определение времени воздействия по отношению к конкретным исследованиям может быть критическим, выполнение этих дополнительных мероприятий не должно нарушать основной план исследования.

Растворы агрессивных или раздражающих исследуемых препаратов могут быть испытаны при концентрациях, которые дадут желаемую степень токсичности (см. GD 39 [3]). При воздействии этих препаратов на животных целевые концентрации должны быть достаточно низкими, чтобы не вызвать заметной боли и дистресса, но достаточными, чтобы продлить кривую «концентрация — ответ» до уровней, которые достигают регуляторной и научной цели испытания. Эти концентрации должны быть выбраны в индивидуальном порядке, предпочтительно на основе адекватно разработанного исследования по определению диапазона доз, которое дает информацию относительно критической конечной точки, любого порога раздражения и времени наступления. Основание для выбора концентрации должно быть предоставлено.

Умиравшие животные или животные, явно испытывающие боль или показывающие признаки тяжелого и продолжительного дистресса, должны быть гуманно умерщвлены. Умиравших животных учитывают таким же образом, что и животных, которые умирают во время испытания. Критерии для принятия решения об умерщвлении умирающих или тяжело страдающих животных и рекомендации по распознаванию прогнозируемой или приближающейся смерти рассматриваются в руководящем документе ОЗСР о гуманных конечных точках [4].

**МЕТОДЫ ИСПЫТАНИЯ ПО ВОЗДЕЙСТВИЮ ХИМИЧЕСКОЙ ПРОДУКЦИИ
НА ОРГАНИЗМ ЧЕЛОВЕКА****Субхроническая ингаляционная токсичность:
90-дневное исследование**

Methods of testing the chemicals of human hazard.
Subchronic inhalation toxicity: 90-Day study

Дата введения — 2015—06—01

1 Область применения

Данное пересмотренное Руководство по испытанию 413 (ТГ 413) было разработано для того, чтобы полностью охарактеризовать токсичность исследуемого препарата при ингаляционном поступлении в течение субхронического воздействия продолжительностью 90 дней, а также обеспечить надежными данными для количественных оценок риска вдыхания. Группы из 10 самцов и 10 самок грызунов подвергаются 6 ч в день в течение 90 дней (13 нед) воздействию: а) исследуемого препарата при трех или более уровнях концентрации, б) отфильтрованного воздуха (негативный контроль) и/или в) растворителя (контроль растворителя). Животные, как правило, подвергаются воздействию 5 дней в неделю, но также допустимо воздействие в течение 7 дней в неделю. Самцов и самок испытывают постоянно, если известно, что один пол более подвержен воздействию данного исследуемого препарата, то особи могут подвергаться воздействию при различных уровнях концентрации. Это руководство позволяет руководителю исследования включать вспомогательные (реверсивные) группы промежуточных умерщвлений, бронхоальвеолярного лаважа (БАЛ), неврологических испытаний, а также дополнительных оценок клинической патологии и гистопатологических оценок для того, чтобы лучше охарактеризовать токсичность исследуемого препарата.

Руководство ОЭСР периодически пересматривают с учетом достижений научно-технического прогресса, соображений защиты животных и изменения нормативных требований. Исходное Руководство 413 (ТГ 413) по испытанию субхронического вдыхания было принято в 1981 году [2]. ТГ 413 было пересмотрено с учетом состояния науки и для соблюдения действующих и ожидаемых нормативных требований.

Исследования субхронической ингаляционной токсичности в основном используют для получения регуляторных концентраций для оценки риска работника в условиях специальности. Также они используются для оценки жилья человека, транспортного и экологического рисков. Это руководство дает характеристику вредным эффектам, которые проявляются после повторного ежедневного ингаляционного воздействия исследуемого препарата в течение 90 дней (приблизительно 10 % продолжительности жизни крыс). Данные, полученные из исследований субхронической ингаляционной токсичности, могут быть использованы для количественных оценок риска и для выбора концентраций для хронических исследований. Данное Руководство по испытанию специальным образом не предназначено для тестирования наноматериалов. Определения, используемые в рамках данного Руководства по испытанию, можно найти в Руководстве 39 [3].

2 Описание метода

2.1 Животные

2.1.1 Выбор видов

Следует использовать здоровых молодых половозрелых грызунов наиболее часто используемых лабораторных линий. Предпочтительно использовать крыс. Могут быть использованы другие виды, но их применение требует обоснования.

2.1.2 Подготовка

Самки должны быть нерожавшими и небеременными. На день отбора для эксперимента животные должны быть в возрасте от 7 до 9 нед. Диапазон колебания массы тела животных для каждого пола не должен превышать $\pm 20\%$ от средней массы тела всех животных, задействованных в исследовании, отдельно каждого пола. Животные отбираются в случайном порядке и маркируются, что позволит идентифицировать каждое из них, и содержатся в клетках в течение 5 дней до начала испытания для адаптации к лабораторным условиям.

2.1.3 Условия содержания и кормления

Животных следует помечать индивидуальными идентификаторами, если возможно, подкожными маячками-ответчиками, чтобы облегчить процесс наблюдения и избежать путаницы. Температура в помещении с экспериментальными животными должна составлять $(22 \pm 3)^\circ\text{C}$. Относительная влажность должна варьироваться между 30% и 70% , но это может быть недостижимо, если вода используется в качестве растворителя. Перед и после воздействия животных, как правило, следует содержать в клетках группами одного пола и одной концентрации, но количество животных на клетку не должно затруднять наблюдения за каждым животным в клетке и должно минимизировать вероятность потерь от каннибализма и борьбы. Если животные подвергаются воздействию только через нос, им может потребоваться привыкнуть к ограничивающей трубке. Ограничивающие трубки не должны вызывать у животных физический или температурный стресс или приводить к потере подвижности. Средства механического удерживания могут повлиять на физиологические объекты исследования, как, например, температура тела (гипертермия) и/или минутный объем легочной вентиляции. Если данные показывают, что подобные изменения не являются значимыми, то адаптация к ограничивающим трубкам не является необходимой. Животных, подвергающихся воздействию аэрозолем через все тело, следует содержать индивидуально на протяжении периода экспозиции, чтобы уберечь их от проникновения тестируемого аэрозоля через шерстку партнеров по клетке. Могут использоваться традиционные и проверенные лабораторные диеты, за исключением периода экспозиции испытываемого препарата, во время которого для животного необходимо обеспечить неограниченное количество питьевой воды. Освещение должно быть искусственным в режиме 12 ч при свете/12 ч в темноте.

2.2 Ингаляционные камеры

Природа исследуемого препарата и предмет исследования должны быть учтены при выборе ингаляционной камеры. Предпочтительной моделью воздействия является воздействие через нос (данный термин включает воздействие «только через голову», «только через нос», «только через мордочку»). Экспозиция «только через нос», как правило, предпочтительна при исследованиях жидких или твердых аэрозолей, а также для паров, которые могут конденсироваться и образовывать аэрозоль. Специальные цели исследования могут быть достовернее достигнуты при модели воздействия «через все тело», но применение такой модели должно быть обосновано в отчете об исследовании. Чтобы обеспечить атмосферную стабильность при использовании камеры для воздействия «через все тело», общий «объем» испытываемых животных не должен превышать 5% от объема камеры. Методика воздействий «только через нос» и «через все тело», а также их положительные и отрицательные особенности отражены в GD 39 [3].

2.3 Исследование токсичности

2.3.1 Предельные концентрации

В отличие от исследований острой токсичности, в исследованиях субхронической ингаляционной токсичности определенного предела концентраций не существует. Максимально тестируемая концентрация должна учитывать: 1) максимально достижимую концентрацию, 2) при воздействии на человека уровень, при котором разворачивается наиболее неблагоприятный сценарий, 3) необходимость поддерживать соответствующий объем кислорода и/или 4) соображения о защите животных. В отсутствие данных о предельных концентрациях можно использовать предельные концентрации для острой токсичности

Согласованной на глобальном уровне системы классификации и маркировки химических веществ ООН (то есть вплоть до максимальной концентрации 5 мг/л для аэрозолей, 20 мг/л для паров и 20,000 ppm для газов); см. GD 39 [3]. Если при тестировании газов или высоколетучих исследуемых препаратов (например, жаропонижающих средств) возникла необходимость превысить эти предельные концентрации, следует привести обоснование. Предельная концентрация должна вызывать явную интоксикацию, не приводя к чрезмерному стрессу у животных и не влияя на продолжительность их жизни [4].

2.3.2 Исследование по определению диапазона доз

Прежде чем приступить к основному исследованию, может возникнуть необходимость в определении диапазона концентраций для исследования. Определение диапазона концентраций для исследования является более полным, нежели визуальное изучение, потому что оно не ограничено отбором концентраций. Информация, полученная в результате определения диапазона концентраций для исследования, может помочь провести основное исследование более успешно. Определение диапазона концентраций для исследования может, например, дать информацию об аналитических методах, об измерении частиц, об обнаружении механизмов интоксикации, данные клинической патологии и гистопатологии, расчеты, какими могут быть концентрации NOAEL (уровень отсутствия наблюдаемого вредного воздействия после введения вещества, является максимальной дозой, не вызывающей обнаруживаемого вредного воздействия на здоровье) и MTC (минимальная токсическая концентрация) в основном исследовании. Руководитель исследования по определению диапазона концентраций может использовать для установления порога раздражения дыхательных путей (например, с помощью гистопатологии дыхательных путей, тестирование легочной функциональной пробы или бронхоальвеолярный лаваж) наивысшую концентрацию, которая не вызывает стресса у животных и изменения параметров, которые наиболее полно характеризуют токсичность исследуемого вещества.

Определение диапазона концентраций может состоять из одного или более уровней концентрации. Не более трех самцов и трех самок следует подвергать воздействию каждого уровня концентрации. Определение диапазона концентраций должно длиться не менее 5 дней, но, как правило, не более 14 дней. Обоснование выбора концентрации для основного исследования необходимо отразить в отчете по основному исследованию. Цель основного исследования — установление зависимости «концентрация — ответ», базирующийся на основе наиболее чувствительных показателей. Низкий уровень концентрации в идеале не должен вызывать наблюдаемого токсического эффекта, тогда как высокий уровень концентрации должен вызывать явную токсичность, не приводя к чрезмерному стрессу у животных и не влияя на продолжительность их жизни [4].

При выборе уровня концентрации для определения диапазона концентраций вся имеющаяся информация, включая данные о зависимости активности препарата от структуры вещества и данные по сходным химикатам, должна быть учтена (см. Область применения). Определение диапазона концентраций может подтверждать/проверять то, какие показатели являются наиболее чувствительными, например ингибирование холинэстеразы для органофосфатов, образование метгемоглобина путем эритроцитотоксических агентов, тиреоидные гормоны (T3, T4) для тиреоидных, белок, LDH или нейтрофилы в бронхоальвеолярном лаваже для безвредных плохо растворимых частиц или аэрозолей с легочно-раздражающим действием.

2.3.3 Основное исследование

Основное исследование субхронической токсичности, как правило, включает три уровня концентрации, а также одновременно негативный контроль (воздух) и/или контроль растворителя при необходимости. Следует использовать все имеющиеся данные, чтобы способствовать выбору соответствующих уровней воздействия, включая результаты системных исследований токсичности, метаболизм и кинетику (особое внимание следует уделить тому, чтобы избежать высоких уровней концентрации, которые насыщают кинетические процессы). Каждая экспериментальная группа включает грызунов из 10 самцов и 10 самок, которые подвергаются воздействию исследуемого препарата в течение 6 ч в день 5 дней в неделю на основе периода в 13 нед (общая продолжительность исследования не меньше 90 дней). Животные могут подвергаться воздействию также 7 дней в неделю (например, при тестировании вдыхаемых фармацевтических продуктов). Если известно, что один пол более чувствителен к воздействию тестируемого вещества, животные разных полов могут подвергаться воздействию различных уровней концентраций с целью оптимизировать зависимость «концентрация — ответ». Если воздействию «только через нос» подвергаются другие виды грызунов, помимо крыс, то можно отрегулировать максимальную продолжительность воздействия с целью минимизировать дистресс, характерный для данного вида. В случае, если продолжительность экспозиции составляет менее 6 ч/день или при необходимости используется долгосрочное (например, 22 ч/день) исследование с воздействием «через все тело», следует приве-

сти обоснование (см. GD 39 [3]). Во время экспозиции рекомендуется голодание животных, если только экспозиция не превышает 6 ч. Во время воздействия «через все тело» животным можно давать воду.

Выбранные целевые концентрации должны идентифицировать органы-мишени и показывать четкую зависимость «концентрация — ответ»:

- Высокий уровень концентрации должен вызывать токсический эффект, но не приводить к затяжным признакам интоксикации или летальности, что может препятствовать правильной оценке.
- Средний(е) уровень(ни) концентрации должны быть между низким и высоким уровнями концентрации для градации токсических эффектов.
- Низкий уровень концентрации должен вызывать слабые эффекты или вообще не вызывать признаков интоксикации.

2.3.4 Промежуточные умерщвления

Если запланированы промежуточные умерщвления, количество животных при каждом воздействии должно быть увеличено на количество, которое должно быть умерщвлено до завершения исследования. Для применения промежуточных умерщвлений должно быть предоставлено обоснование, а также они должны быть правильно учтены в статистических анализах.

2.3.5 Вспомогательное (реверсивное) исследование

Вспомогательное (реверсивное) исследование может использоваться для наблюдения за обратимостью, стойкостью или отдаленными проявлениями интоксикации после эксперимента в течение соответствующего времени, но не более 14 дней. Вспомогательные (реверсивные) группы состоят из 10 самцов и 10 самок, подвергаемых воздействию одновременно с экспериментальными животными в основном исследовании. Группы вспомогательного (реверсивного) исследования должны подвергаться воздействию исследуемого препарата с максимальным уровнем концентрации, и при необходимости следует проводить одновременный контроль воздуха и/или среды.

2.3.6 Контрольные животные

Животные в параллельной негативной (воздушной) группе должны содержаться в условиях, идентичных тем, в которых содержатся животные в экспериментальной группе, за исключением того, что они подвергаются воздействию отфильтрованного воздуха, а не исследуемого вещества. Если вода или другая субстанция используется в процессе генерации исследуемой атмосферы, в исследование следует включить группу по контролю среды вместо группы по негативному (воздушному) контролю. По возможности в качестве среды следует использовать воду. Если в качестве среды используется вода, контрольных животных следует подвергать воздействию воздуха при таком же уровне относительной влажности, что и в исследуемых группах. Выбор подходящей среды должен опираться на соответствующим образом полученные предиспытательные или ретроспективные данные. Если токсичность среды не общеизвестна, руководитель исследования может решить применить и негативный (воздушный) контроль, и контроль среды, но это крайне нежелательно. Если ретроспективные данные показывают, что среда нетоксична, то в негативных (воздушных) контрольных группах нет необходимости и следует применять только контроль среды. Если предварительное исследование тестируемого вещества, введенного в среду, не выявляет токсичности, то из этого следует, что среда в тестируемой концентрации нетоксична и необходимо выполнение контроля среды.

2.4 Условия проведения исследования

2.4.1 Введение концентраций

Животные подвергаются воздействию исследуемого вещества в виде газа, паров, аэрозоля или их смеси. Исследуемое физическое состояние зависит от физико-химических свойств тестируемого препарата, выбранной концентрации и/или физической формы, которые наиболее вероятно присутствуют во время использования исследуемого препарата. Зернистый материал может быть подвергнут механическим процессам, чтобы добиться требуемого гранулометрического состава. Дальнейшие правила содержатся в GD 39 [3].

2.4.2 Гранулометрический состав

Размеры частиц должны быть определены для всех аэрозолей и для паров, которые могут конденсироваться в форму аэрозоля. Чтобы обеспечить воздействие на все важные области дыхательных путей, рекомендуется использование аэрозоля с массовым средним аэродинамическим диаметром (MMAD) в диапазоне от 1 до 3 мкм с геометрическим стандартным отклонением (σ_g) в диапазоне от 1,5 до 3,0 [4]. Следует приложить должные усилия, чтобы соблюсти указанное требование; в случае, если это невозможно, необходимо предоставить экспертную оценку. Например, металлические частицы в воздухе могут быть меньшего размера, чем стандартные, а также заряженные частицы и волокна могут превышать размер стандартных.

2.4.3 Приготовление исследуемого вещества в среде

В идеале тестируемый препарат следует испытывать без использования среды. Среда необходима для создания соответствующей концентрации исследуемого вещества и размера частиц, при этом предпочтение отдается воде. Если исследуемый препарат растворен в среде, его стабильность должна быть установлена.

2.5 Контроль условий экспозиции

2.5.1 Воздушные потоки в камере

Поток воздуха, проходящий через камеру воздействия, должен тщательно контролироваться, непрерывно измеряться и регистрироваться, по крайней мере ежечасно в течение каждого воздействия. Мониторинг в реальном времени концентрации среды испытания (или временной стабильности) представляет собой полное измерение всех динамических параметров и предоставляет косвенные средства контроля всех соответствующих динамических параметров ингаляции. Если концентрация измеряется в режиме реального времени, частота измерения воздушных потоков может быть сведена к одному единичному измерению воздействия в день. Особое внимание следует уделить, чтобы избежать возвратного дыхания в камерах только через нос. Концентрация кислорода должна быть не менее 19 %, а концентрация углекислого газа не должна превышать 1 %. Если есть основания полагать, что данная норма не может быть соблюдена, концентрации кислорода и углекислого газа должны быть измерены. Если измерения в первый день воздействия показывают, что концентрация этих газов на надлежащем уровне, никакие дополнительные измерения не требуются.

2.5.2 Температура и относительная влажность в камере

Температура в камере должна составлять $(22 \pm 3) ^\circ\text{C}$. Относительную влажность в дыхательной зоне животных при воздействиях и «через нос», и «через все тело» следует проверять постоянно и фиксировать каждый час в течение всего времени экспозиции, если это возможно. Относительная влажность должна предпочтительно составлять 30 % — 70 %, но в определенных случаях (например, при тестировании препарата на водной основе) данный уровень может быть неприменим или не измерим вследствие взаимовлияния исследуемого препарата и метода исследования.

2.5.3 Исследуемое вещество: номинальная концентрация

По возможности следует наблюдать и фиксировать номинальную концентрацию при экспозиции в клетке. Номинальная концентрация — это масса сгенерированного испытываемого вещества, разбавленная общим объемом воздуха, проходящего через ингаляционную систему камеры. Номинальная концентрация не используется при описании экспозиции на животных, но сравнение номинальной и фактической концентраций позволит судить об эффективности генератора в испытательной системе и позволит вовремя выявить проблемы в нем.

2.5.4 Исследуемое вещество: фактическая концентрация

Фактическая концентрация — это концентрация исследуемого препарата в зоне дыхания животных в ингаляционной камере. Фактические концентрации могут быть получены специальными методами (например, методом непосредственного выбора, адсорбционным методом или методом химической реактивности и последующим анализом) или неспециальными методами, например гравиметрический капельный анализ. Использование гравиметрического анализа допустимо только для однокомпонентных порошкообразных веществ в аэрозольной упаковке или для жидких аэрозолей с низкой летучестью и должно быть подкреплено предварительно полученными соответствующими специальными характеристиками исследуемого препарата. Концентрацию аэрозоля с многокомпонентного порошка можно также определить с помощью метода гравиметрического анализа. В этом случае потребуются данные анализа, подтверждающие, что состав аэрозоля-вещества схож с составом исходного материала. Если подобная информация не имеется, может потребоваться повторный анализ исследуемого вещества (в идеале, в воздушном состоянии) в определенных временные интервалы в течение всего исследования. Для аэрозолей, которые могут испаряться или сублимироваться, следует указать, что все фазы среды были исследованы выбранным методом.

Необходимо по возможности использовать один и тот же препарат для тестирования; исследуемый образец должен храниться в условиях, которые позволят сохранить его степень чистоты, однородность и стабильность. Перед началом исследования необходимо располагать описанием препарата, включая его степень чистоты и, если это технически возможно, его обозначение и количество выявленных в нем примесей и загрязняющих веществ. Такие сведения можно наглядно показать с помощью следующих, но не ограничиваясь ими, данных: время удержания и относительная величина пика, молекулярная масса, полученная методом масс-спектропии или газохроматографии, или другие

подсчеты. Хотя определение тестовых образцов не входит в обязанности испытательной лаборатории, возможно, целесообразно подтвердить спонсорские характеристики, по крайней мере в ограниченном виде (например, цвет, физическая природа и т. д.).

Воздействующую атмосферу следует поддерживать в неизменном состоянии, насколько это возможно. Прибор для контроля в реальном времени, такой как фотометрический счетчик для аэрозольных частиц для аэрозолей или общий гидрокарбонный анализатор для паров, может использоваться для показателя стабильности условий экспозиции. Фактическую концентрацию в камере следует измерять не менее трех раз в каждый день экспозиции на каждом уровне экспозиции. Если это невозможно вследствие ограниченных воздушных потоков или низкой концентрации, за все время периода экспозиции допускается отбор одной пробы. В идеале этот образец следует брать в течение всего периода экспозиции. Образцы концентрации для каждой камеры не должны отклоняться от средней концентрации более чем на $\pm 10\%$ для газов и паров или $\pm 20\%$ для жидких и твердых аэрозолей. Время для достижения равновесного состояния и перехода к распаду (t_{95}) нужно измерить и зафиксировать. Период воздействия охватывает время генерации исследуемого вещества. При этом учитывается время, необходимое для достижения равновесного состояния в камере (t_{95}) и перехода к распаду. Инструкция по расчету t_{95} содержится в GD 39 [3].

Для сложных смесей из газов/паров и аэрозолей каждая фаза может демонстрировать разное поведение в ингаляционной камере. По этой причине для каждой фазы (газ/пар или аэрозоль) следует выбрать по меньшей мере одну индикаторную субстанцию (аналит), как правило, основную активную в лекарственной форме исследуемого препарата. Когда тестируемый препарат является смесью (например, по составу), аналитическая концентрация должна быть описана для общего состава и не только для активного ингредиента или компонента (вещества, определяемого при анализе). Дополнительная информация о фактической концентрации содержится в GD 39 [3].

2.5.5 Исследуемое вещество: гранулометрический состав

Гранулометрический состав аэрозолей следует определять не реже чем раз в неделю для каждого уровня концентрации путем использования каскадного импактора или альтернативного прибора, например аэродинамического спектрометра (APS). Если удастся показать равнозначность результатов, полученных каскадным импактором и альтернативным прибором, то допускается использование альтернативного прибора в исследовании.

Второе устройство, такое как гравиметрический фильтр или импиджер/образователь газовых пузырьков, следует использовать параллельно основному инструменту для подтверждения эффективности его работы. Массовая концентрация, полученная гранулометрическим анализом, должна находиться в разумных пределах массовой концентрации, полученной в результате анализа работы фильтров (см. GD 39 [3]). Если удастся показать равнозначность результатов для всех концентраций, тестируемых на раннем этапе исследования, проведения дальнейших подтверждающих измерений можно избежать. Из соображений заботы о животных измерения следует проводить таким образом, чтобы минимизировать получение необоснованных данных, что может привести к повторному исследованию.

Определение размеров частиц следует выполнить для паров, если есть любая вероятность, что конденсация паров ведет к образованию аэрозоля или если частицы обнаружены в атмосфере паров с потенциалом смешанных фаз.

3 Наблюдения

Клинические наблюдения за животными следует проводить до, во время и после периода экспозиции. Более частые наблюдения могут потребоваться в зависимости от реакции животных во время экспозиции. Если наблюдения за животными затруднены из-за использования сдерживающих трубок, плохого освещения в камерах для воздействия через все тело или непрозрачной атмосферы, животных следует тщательно осматривать после экспозиции. Наблюдения накануне экспозиции могут зафиксировать реверсивность или обострение токсических эффектов.

Все наблюдения фиксируются отдельно по каждому животному. Когда животных умерщвляют из гуманных соображений или находят мертвыми, время смерти следует зафиксировать как можно точнее.

Наблюдения в клетке должны фиксировать изменения на коже и шерсти, глазах и слизистых оболочках, а также в дыхательной и кровеносной системах, изменения в нервной системе, а также соматомоторной активности и в поведении. По возможности следует отмечать различия между локальными и оставшимися системными эффектами. Внимание следует направить на наблюдения за тремором, конвульсиями, слюнотечением, диареей, апатией, сном и комой. Измерение ректальной температуры

позволит удостовериться в рефлекторном брадикардии или гипо/гипертермии, связанной с воздействием вещества или обездвиженностью. Дополнительные наблюдения, например за кинетикой, биомониторингом, легочными функциями, ретенцией слабо растворимых материалов, которые накапливаются в легочных тканях, за поведенческими изменениями, могут быть включены в протокол исследования.

3.1 Массы тела

Индивидуальные массы животного должны быть записаны незадолго до первого воздействия (0 день), в дальнейшем дважды еженедельно (например, по пятницам и понедельникам, чтобы продемонстрировать восстановление в течение выходных при отсутствии воздействия или в временном интервале, позволяющем оценить систематическую токсичность) и в момент смерти или эвтаназии. При отсутствии эффекта в течение первых 4 нед. для оставшейся части исследования массу тела можно измерять еженедельно. Вспомогательных (реверсивных) животных (при использовании) следует продолжать взвешивать еженедельно в течение периода восстановления. При завершении исследования все животные должны быть взвешены незадолго до умерщвления, чтобы обеспечить объективные рассчитанные соотношения органа к массе тела.

3.2 Потребление пищи и воды

Объем потребляемой пищи следует измерять еженедельно. Также объем потребляемой воды может быть измерен.

4 Клиническая патология

Определение клинических патологий должно быть выполнено для всех животных, включая животных в контрольных и вспомогательных (реверсивных) группах, когда они умерщвлены. Временной интервал между окончанием воздействия и сбором крови должен быть зафиксирован, особенно когда восстановление органов-мишеней происходит быстро. Взятие проб после окончания экспозиции указано для тех параметров с коротким периодом полураспада плазмы (например, COHb, CHE, MetHb).

В Таблице 1 приведены параметры клинической патологии, исследование которых, как правило, требуется во всех токсических испытаниях. Анализ мочи в общепринятой практике не является обязательным, но он может быть выполнен, если это может быть полезным в целях предполагаемой или наблюдаемой токсичности. Руководитель исследования может выбрать для оценки дополнительные параметры, чтобы более полно охарактеризовать токсичность исследуемого вещества (например, холинэстераза, липиды, гормоны, кислотно-щелочной баланс, метгемоглобин или тельца Хайнца, креатинкиназа, миелоидно/эритроидное соотношение, тропонины, газы в артериальной крови, лактатдегидрогеназа, сорбитдегидрогеназа, глутамат дегидрогеназа и гамма глутамил транспептидаза).

Таблица 1 — Параметры в стандартной клинической патологии

Параметр	Исследование
Гематология	
Подсчет эритроцитов	Подсчет общего количества лейкоцитов
Концентрация гемоглобина	Подсчет дифференцированных лейкоцитов
Средний эритроцитарный гемоглобин	Подсчет тромбоцитов
Среднее гематокритное число	Потенциал свертывания (выбрать одно):
Концентрация среднего эритроцитарного гемоглобина	Протромбинированное время
Ретикулоциты	Время неполного тромбопластина
Клиническая биохимия	
Глюкоза*	Аланинаминотрансфераза
Общий холестерин	Аспартат-аминотрансфераза
Триглицериды	Щелочная фосфатаза
Азот мочевины крови	Калий
Общий билирубин	Натрий
Креатинин	Кальций
Общий белок	Фосфор
Альбумин	Хлорид
Глобулин	

Окончание таблицы 1

Параметр	Исследование
Анализ мочи (факультативно)	
Внешний вид (цвет и мутность)	Общий белок
Масса	Глюкоза
Удельный вес или осмотическое давление	Кровь/клетки крови
pH	
* Так как период длительного голодания может привести к изменению в измерениях глюкозы у экспериментальных животных по сравнению с животными контрольной группы, руководитель исследования должен определить, целесообразно ли подвергать животных голоду. Если используется голодание, его длительность должна быть надлежащей для используемых видов; для крыс это может быть 16 ч (ночное голодание). Исследование глюкозного голодания может быть выполнено после ночного голодания на протяжении последней экспозиционной недели или после ночного голодания перед вскрытием (в последнем случае вместе с другими клиническими патологическими параметрами).	

Если есть признаки, что нижний дыхательный тракт (например, альвеолы) является первичным очагом депонирования и сохранения, то бронхоальвеолярный лаваж (BAL) может быть предпочтительным методом выбора параметров количественного анализа, гипотетически основанных на «доза — эффект» и сфокусированных на альвеолите, пульмональном воспалении и фосфолипидах. Это позволяет соответствующим образом исследовать альвеолярные повреждения, вызванные изменением дозы и периода воздействия препарата. Это допускает изменения доз и выдержек для надлежащего измерения альвеолярных повреждений. Флюид BAL может быть проанализирован на предмет общего и дифференцированного подсчета лейкоцитов, общего белка и лактатдегидрогеназы. Другие параметры, которые могут быть учтены, указывают на лизосомные повреждения, фосфолипиды, фиброзы и раздражение или аллергическое воспаление, которые могут включать определения провоспалительного цитокина/хемокина. Измерения BAL, как правило, дополняют данные гистопатологических исследований, но не заменяют их. Руководство по проведению легочного лаважа можно найти в GD 39 [3].

4.1 Офтальмологический осмотр

Для всех животных до введения исследуемого вещества и для всех групп, подвергшихся высокой концентрации и контрольной при завершении испытания, должны проводиться офтальмологические исследования глазного дна, рефракционной среды, радужки, конъюнктивы, используя офтальмоскоп или аналогичное устройство. При обнаружении изменений в глазах все животные других групп должны быть обследованы, включая вспомогательную (реверсивную) группу.

5 Макроскопическая патология и масса органов

Все экспериментальные животные, включая тех, которые погибли во время исследования или были изъяты из исследования по соображениям заботы о животных, должны быть подвергнуты полному обескровливанию (если выполнимо) и полному вскрытию. Для каждого животного следует зафиксировать время между окончанием последней экспозиции и его умерщвлением. Если невозможно провести вскрытие сразу после обнаружения погибшего животного, его следует охладить (не заморозить) при температуре достаточно низкой, чтобы минимизировать распад тканей. Вскрытие следует провести как можно скорее, как правило, в течение одного-двух дней. Все значимые патологические изменения необходимо зафиксировать по каждому животному, обращая особое внимание на изменения в дыхательных путях.

В таблице 2 приведены органы и ткани, которые следует сохранить в соответствующей питательной среде во время полного вскрытия для гистопатологического исследования. Сохранение (упомянутых) органов и тканей и любых других органов осуществляется по решению руководителя исследования. Органы, названия которых выделены жирным шрифтом, следует иссечь и взвесить во влажном состоянии как можно скорее после вскрытия, чтобы избежать высыхания. Щитовидную железу и эпидидимисы следует взвешивать только по необходимости, так как иссечение артефактов может затруднить гистопатологическое исследование. Ткани и органы следует зафиксировать в 10%-ном растворе формалина или другого соответствующего фиксатора как можно скорее после вскрытия, но не менее чем за 24—48 ч до иссечения, в зависимости от используемого фиксатора.

Таблица 2 — Органы и ткани, консервируемые в ходе макроскопической аутопсии

Надпочечники Аорта Костный мозг (и/или свежий пунктат) Мозг (включая раздели головного мозга, мозжечок и костный мозг/мост) Слепая кишка Толстая кишка Двенадцатиперстная кишка [Придатки яичка] [Глаза (сетчатка, зрительный нерв) и веки] Бедро и коленная чашечка Желчный пузырь (при наличии) [Гардеровы железы] Сердце Подвздошная кишка Тонкая кишка Почки [Слезные железы (дополнительный глазной)] Гортань (3 уровня, включая основу надгортанника) Печень Легкое (все доли одного уровня, включая главные бронхи) Лимфатические узлы из области корня легкого, специально для плохо растворимой частицы испытуемого материала. Для более подробных наблюдений и/или исследований с иммунологическим фокусом могут быть рассмотрены дополнительные лимфатические узлы, например из медиастинальных, цервикальных/подчелюстных и/или слуховых областей Лимфатические узлы (периферические от входных ворот) Молочная железа (женская) Мышца (бедро) Носоглоточные ткани [не менее 4 уровней; 1 уровень для включения носоглоточного канала и назально-ассоциированной лимфоидной ткани (НАЛТ)]	Пищевод [Обонятельная луковица] Яичники Поджелудочная железа Паращитовидные железы Периферический нерв (седалищный или большеберцовый, предпочтительно близкий к мышце) Гипофиз Предстательная железа Прямая кишка Слюнные железы Семенные пузырьки Кожа Спинной мозг (цервикальный, середино-торакальный и поясничный) Селезенка Грудина Желудок Зубы Яички Зобная железа Щитовидная железа [Язык] Трахея (не менее 2 уровней, включая 1 продольную секцию, проходящую через киль, и 1 поперечную секцию) [Мочеточник] [Мочеиспускательный канал] Мочевой пузырь Матка Органы-мишени Все макроскопические повреждения и массы
--	---

Легкие следует извлечь без повреждений, взвесить и зафиксировать соответствующим фиксатором под давлением в 20—30 см воды, чтобы обеспечить сохранность легочной структуры [5]. Срезы легочных тканей должны быть собраны для всех долей на одном уровне, включая главные бронхи, но если был выполнен легочный лаваж, доля, в которой не был произведен лаваж, должна быть рассечена на три уровня (несерийные срезы).

Следует исследовать не менее четырех уровней носоглоточных тканей, одна из которых должна включать носоглоточный канал, [6], [7], [8], [9], [10], для адекватного обследования сквамозной кости, промежуточного (нересничного дыхательного), дыхательного (ресничного дыхательного) и обонятельного эпителия, а также дренажной лимфатической ткани (НАЛТ; [10], [11]). Следует исследовать три уровня гортани, один из этих уровней должен включать основание надгортанника [13]. Следует исследовать не менее двух уровней трахеи, включая продольное сечение через киль бифуркации главного бронха и одного поперечного среза.

6 Гистопатология

Гистопатологическая оценка всех органов и тканей, перечисленных в таблице 2, должна быть выполнена для контрольной группы и группы высокой концентрации и для всех животных, которые умирают или умерщвляются во время исследования. Особое внимание следует обратить на дыхательный путь, органы-мишени и макроскопические поражения. Органы и ткани, которые имеют поражения в группе с высокой концентрацией, должны быть обследованы во всех группах. Руководитель исследования может предпочесть выполнение гистопатологических оценок для дополнительных групп, чтобы продемонстрировать четкий отклик концентрации. Когда используется вспомогательная (реверсивная) группа, должна быть выполнена гистопатологическая оценка для всех тканей и органов, идентифицированных по эффектам в обработанных группах. Если в группе сильного воздействия происходят избыточные ранние смерти или

другие проблемы, которые компрометируют значимость данных, следующая более низкая концентрация должна быть обследована гистопатологически. Следует попытаться соотнести макроскопические наблюдения с микроскопическими результатами.

7 Данные исследований и отчет

7.1 Данные исследований

Необходимо обеспечить информацию о массе тела, потреблении пищи, клинической патологии, общей патологии, массе органов и гистопатологии для каждого животного. Данные клинических наблюдений следует подытожить в таблице, отражающей количество животных в каждой подопытной группе, количество животных со специфическими признаками интоксикации, количество животных, найденных мертвыми в ходе исследования или умерщвленных по гуманным причинам, время смерти каждого животного, описание и динамику появления признаков токсичности и их обратимость, а также данные вскрытия. Все результаты, количественные и побочные, следует оценивать при помощи соответствующего метода статистического анализа. Все общепринятые статистические методы могут быть использованы, и статистические методы следует выбрать во время планирования исследования.

7.2 Отчет об исследовании

Отчет об испытании должен включать следующую информацию:

Экспериментальные животные и условия их содержания

- Описание условий в клетке, в том числе: количество (или изменение в количестве) животных в клетке, подстилающий материал, температура окружающей среды и относительная влажность, фотопериод, а также идентификация диеты.

- Используемые виды/штаммы и обоснование для использования видов, отличных от крыс. Могут быть представлены источник и исторические данные, если они относятся к животным, подвергшимся воздействию при аналогичных условиях воздействия, содержания и диеты.

- Количество, возраст и пол животных.

- Метод рандомизации.

- Описание каких-либо предварительных испытаний кондиционирования, включая диету, карантин и лечение заболеваний.

Исследуемое вещество

- Физическая природа, чистота и при необходимости физико-химические свойства (в том числе изомеризация).

- Идентификация данных и регистрационный номер химической реферативной службы (CAS), если он известен.

Среда

- Обоснование использования растворителя и обоснование выбора растворителя (если это не вода).

- Исторические и сопутствующие данные, свидетельствующие о том, что растворитель не влияет на результаты исследования.

Ингаляционная камера

- Подробное описание ингаляционной камеры, включая объем и диаграмму.

- Источник и описание оборудования, используемого для воздействия на животных, а также оборудование среды.

- Оборудование для измерения температуры, влажности, размера частиц, а также фактической концентрации.

- Источник воздуха и система, используемая для кондиционирования.

- Методы, используемые для калибровки оборудования, чтобы обеспечить однородную среду испытания.

- Перепад давления (положительный или отрицательный).

- Каналы воздействия на камеру (только «через нос»); расположение животных в камере («на все тело»).

- Стабильность среды испытания.

- Расположение датчиков температуры и влажности и отбора проб среды испытания в камере.

- Обработка подаваемого/извлеченного воздуха.

- Расходы воздушного потока, расход воздушного потока/канал воздействия (только «через нос») или нагрузка животного/камера («на все тело»).

- Время до равновесия в ингаляционной камере (t_{95}).

- Количество изменений объема в час.
- Измерительные устройства (если применимы).

Данные по воздействию

- Обоснование выбора целевой концентрации в основном исследовании.
- Номинальные концентрации (общая масса исследуемого препарата, образуемого в ингаляционной камере, деленная на объем воздуха, проходящий через камеру).
- Фактическая концентрация исследуемого препарата, отобранного из зоны дыхания животных; для исследуемых смесей, которые производят гетерогенные физические формы (газы, пары, аэрозоли), каждая из которых может быть проанализирована отдельно.
- Все концентрации в воздухе должны быть представлены в единицах массы (мг/л , мг/м^3 и т. д.), а не в единицах объема (ppm , ppb и т. д.).
- Распределение частиц по размерам, массовый средний аэродинамический диаметр (МСАД), а также геометрическое стандартное отклонение (Σg), включая методы их расчета. Индивидуальные анализы размера частиц должны быть представлены.

Условия испытаний

- Подробная информация о приготовлении исследуемого препарата, включая информацию о любых процедурах, используемых для уменьшения размера частиц твердых материалов или для приготовления раствора исследуемого препарата.
- Описание (предпочтительно, включая диаграмму) оборудования, используемого для создания среды испытания и для воздействия на животных в среде испытания.
- Подробная информация об оборудовании, используемом для контроля температуры в камере, влажности и потока воздуха в камере (например, развитие калибровочной кривой).
- Подробная информация об оборудовании, используемом для сбора образцов для определения концентрации в камере и распределения частиц по размерам.
- Подробная информация об используемом химико-аналитическом методе и валидации метода (включая эффективность восстановления исследуемого препарата из среды отбора).
- Метод рандомизации при назначении животных к экспериментальной и контрольной группам.
- Подробная информация о качестве продуктов питания и воды (в том числе тип диеты/источник, источник воды).
- Обоснование выбора концентраций испытания.

Результаты

- Сведение в таблицу данных о температуре в камере, уровне влажности и воздушном потоке.
- Сведение в таблицу данных о номинальной и фактической концентрации в камере.
- Сведение в таблицу данных о размере частиц, включая собранные сведения об аналитических образцах, распределение размеров частиц, подсчеты ММАД и Σg .
- Сведение в таблицу данных о реакции и уровне концентрации для каждого животного (то есть признаки токсического отравления у животного, включая агонию, природу, степень тяжести, время появления и продолжительность эффектов).
- Сведение в таблицу данных о массе тела каждого животного.
- Сведение в таблицу данных о потреблении пищи.
- Сведение в таблицу данных клинической патологии.
- Данные вскрытия и гистопатологические данные для каждого животного, если имеются.

Обсуждение и интерпретация результатов

- Особое внимание необходимо уделить описанию методов, используемых для удовлетворения требованиям настоящего Руководства, например предельно допустимые концентрации или размер частиц.
- Пригодность частиц для вдыхания, принимая во внимание общие данные, должна быть адресной, особенно если требования к размерам частиц не выполнены.
- Последовательность методов, используемых для определения номинальной и фактической концентрации, а также зависимость фактической концентрации от номинальной должна быть включена в общую оценку исследования.
- Вероятная причина смерти и доминирующий механизм действий (оказывающий системное действие или локальное влияние на организм) должны быть адресными.
- Если была необходимость в гуманном умерщвлении животного, испытывающего боль или проявляющего признаки страдания и дистресса, то нужно привести объяснения в соответствии с документом ОЗСР [4].
- Выявление органов-мишеней.
- Определение NOAEL и LOAEL.

Библиография

- [1] OECD, Test No. 413. Subchronic Inhalation Toxicity: 90-Day Study
- [2] OECD (1981). Subchronic Inhalation Toxicity Testing, Original Test Guideline No 413, Environment Directorate, OECD, Paris
- [3] OECD (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing, Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 39, ENV/JM/MONO(2009)28, OECD, Paris
- [4] 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, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris
- [5] Whalan, J.E. and Redden, J.C. (1994). Interim Policy for Particle Size and Limit Concentration Issues in Inhalation Toxicity Studies. Office of Pesticide Programs, United States Environmental Protection Agency
- [6] Dungworth D.L., Tyler W.S. and Plopper C.E. (1985). Morphological Methods for Gross and Microscopic Pathology (Chapter 9) in Toxicology of Inhaled Material, Witschi H.P. and Brain J.D. (eds), Springer Verlag Heidelberg, pp. 229—258
- [7] Young J.T. (1981). Histopathological examination of the rat nasal cavity. *Fundam. Appl. Toxicol.* 1, 309—312
- [8] Harkema J.R. (1990). Comparative pathology of the nasal mucosa in laboratory animals exposed to inhaled irritants. *Environ. Health Perspect.* 85, 231—238
- [9] Woutersen R.A., Garderen-Hoetmer A. van, Slootweg P.J. and Feron V.J. (1994) Upper respiratory tract carcinogenesis in experimental animals and in humans. In: Waalkes MP and Ward JM (eds) Carcinogenesis. Target Organ Toxicology Series, Raven Press, New York, 215—263
- [10] Mery S., Gross E.A., Joyner D.R., Godo M. and Morgan K.T. (1994). Nasal diagrams: A tool for recording the distribution of nasal lesions in rats and mice. *Toxicol. Pathol.* 22, 353—372
- [11] Kuper C.F., Koornstra P.J., Hameleers D.M.H., Biewenga J., Spit B.J., Duijvestijn A.M., Breda Vriesman van P.J.C. and Sminia T. (1992). The role of nasopharyngeal lymphoid tissue. *Immunol. Today* 13, 219—224
- [12] Kuper C.F., Arts J.H.E. and Feron V.J. (2003). Toxicity to nasal-associated lymphoid tissue. *Toxicol. Lett.* 140—141, 281—285
- [13] Lewis D.J. (1981). Mitotic Indices of Rat Laryngeal Epithelia. *Journal of Anatomy* 132(3), 419—428

УДК 661:615.099

МКС 13.020.01

Ключевые слова: химическая продукция, воздействие на организм человека, метод испытаний, субхроническая ингаляционная токсичность, 90 дней

Редактор *Н.Е. Рагузина*
Технический редактор *И.Е. Черепкова*
Корректор *Е.Р. Ароян*
Компьютерная верстка *Ю.В. Половой*

Сдано в набор 14.05.2019. Подписано в печать 15.07.2019. Формат 60 × 84^{1/8}. Гарнитура Ариал.
Усл. печ. л. 2,33. Уч.-изд. л. 1,86.

Подготовлено на основе электронной версии, предоставленной разработчиком стандарта

ИД «Юриспруденция», 115419, Москва, ул. Орджоникидзе, 11.
www.jurisizdat.ru y-book@mail.ru

Создано в единичном исполнении во ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ»
для комплектования Федерального информационного фонда стандартов,
117418 Москва, Нахимовский пр-т, д. 31, к. 2.
www.gostinfo.ru info@gostinfo.ru