

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
И СОЦИАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ЭКСПЕРТИЗЫ СРЕДСТВ МЕДИЦИНСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ»

**РУКОВОДСТВО
ПО ПРОВЕДЕНИЮ
ДОКЛИНИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ
ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ**

Часть первая

Москва
2012

ГЛАВА 4

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ИЗУЧЕНИЮ РЕПРОДУКТИВНОЙ ТОКСИЧНОСТИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

Составители: член-корр. РАМН, проф. А.Д. Дурнев; к. м. н. Н.М. Смольникова; к. м. н. А.М. Скосырева; к. б. н. Е.П. Немова; к. б. н. А.С. Соломина; к. б. н. О.В. Шреде; член-корр. РАМН, проф. Т.А. Гуськова; д. м. н. О.Л. Верстакова; к. м. н. Р.Д. Сюбаев

Введение

Изучение репродуктивной токсичности фармакологических веществ является частью доклинических токсикологических исследований.

Исследования по выявлению репродуктивной токсичности включают:

- а) изучение влияния на репродуктивную (генеративную) функцию;
- б) изучение эмбрио- и фетотоксического действия, регистрируемого в антенатальном периоде развития;
- в) изучение эмбрио- и фетотоксического действия, регистрируемого в постнатальном периоде развития.

1. Общие положения

1.1. Тестирование на репродуктивную токсичность

Тестированию на репродуктивную токсичность подвергаются все новые оригинальные фармакологические вещества. Исключение может быть сделано для веществ с противоопухолевой активностью, если их применение ограничивается только онкологической практикой, и для веществ, рекомендуемых для применения по жизненным показаниям.

1.2. Изучение субстанции фармакологического вещества и/или лекарственной формы

Изучению подлежит субстанция фармакологического вещества и/или лекарственная форма. При комбинации нескольких фармакологических веществ в одной лекарственной форме (фиксированная комбинация) изучают комбинацию в целом и каждого ингредиента в отдельности, если он не был ранее разрешен для применения в медицинской практике.

1.3. Характеристика фармакологического вещества

К моменту начала тестирования необходимо располагать сведениями о физико-химических свойствах вещества, дозах (летальная, эффективная, рекомендуемая для КИ), признаках интоксикации, специфических для данного вещества, предполагаемых способах введения, профиле фармакологического действия, показаниях и схемах применения препарата в клинике. Желательно иметь данные по фармакокинетике фармакологического вещества.

1.4. Способ введения

Фармакологическое вещество вводят тем способом, который рекомендован при клиническом применении. Изучаемое вещество, предназначенное для применения внутрь, вводят лабораторным животным через зонд в желудок. По возможности следует избегать внутрибрюшинного введения.

1.5. Лабораторные животные

Исследование можно проводить как на нелинейных, так и на линейных животных. В последнем случае следует указать линию животных. Исследования проводят на здоровых и половозрелых животных. Животные должны пройти карантин не менее 10–14 дней. Разброс по исходной массе в исследуемых группах не должен превышать $\pm 10\%$. Число животных в каждой группе должно быть достаточным (не менее 10), чтобы провести статистическую обработку экспериментальных данных.

1.6. Выбор доз

При выборе доз руководствуются результатами, полученными в исследованиях по изучению острой токсичности. Наиболее целесообразно, с точки зрения последующей интерпретации результатов, проводить тестирование вещества, используя не менее 2 доз. Минимальная доза соответствует терапевтической дозе, рекомендованной для КИ, максимальная — на порядок выше рекомендованной для КИ, при которой не отмечается выраженного токсического действия на животных. В большинстве случаев в качестве максимальной дозы можно использовать высшую дозу, принятую в исследованиях по изучению хронической токсичности. Исключения составляют вещества, изменяющие характер действия при беременности. Дозы тестируемого вещества рассчитывают на единицу массы тела животного в пересчете на действующее вещество.

1.7. Контроли

При постановке эксперимента обязательно должна быть контрольная группа животных, которые содержатся в таких же условиях, как и получающие исследуемое ЛС, и получают те же вспомогательные ингредиенты, которые дополнительно используются в ходе введения.

1.8. Статистическая обработка данных

При статистической обработке данных за единицу наблюдения принимают помет, то есть результаты, полученные при исследовании одной самки. Сведения о методах статистического анализа, использованных при обработке результатов, должны быть указаны в отчете.

2. Изучение репродуктивной (генеративной) функции животных

2.1. Задачи исследований

Задачей этого этапа исследований является выявление возможного отрицательно-го действия фармакологического вещества на репродуктивную функцию. Токсическое действие фармакологических веществ может реализовываться на различных этапах репродукции: на стадии гаметогенеза (формирование мужских и женских гамет); полового поведения; созревания и качества половых клеток, их транспорта; способности к зачатию и оплодотворению и др.

2.2. Общие требования к проведению исследований

Требования к проведению исследований изложены в п.п. 1.1.–1.8. Влияние на генеративную функцию изучают в исследованиях на самках и самцах крыс.

В исследованиях на самках фармакологическое вещество вводят в течение 15 дней (3 эстральных цикла). Наиболее целесообразно проводить тестирование вещества, используя не менее 2 доз. В каждой группе должно быть не менее 20 крыс. По окончании введения препарата самок подсаживают к интактным самцам в соотношении 2:1 на 10 дней (2 эстральных цикла). Во время исследования следят за общим физическим состоянием и поведением животных. Крыс взвешивают до начала исследования, по окончании введения фармакологического вещества и перед эвтаназией на 20-й день беременности. Первым возможным днем беременности считают день подсадки самок к самцам.

Исследуют состояние репродуктивных органов самок — в яичниках подсчитывают число желтых тел, в матке — мест имплантаций, живых и мертвых плодов. На основании полученных данных определяют показатели пред- и постимплантационной гибели. Кроме того, вычисляют индекс фертильности — отношение числа беременных самок к числу подсаженных. Из каждой группы получающих ЛС самок оставляют до родов часть беременных крыс и в течение одного месяца наблюдают за развитием потомства, регистрируют общее физическое состояние и поведение, динамику массы и гибель крысят.

В исследованиях на самцах фармакологическое вещество вводят 48 дней (период сперматогенеза). Наиболее целесообразно проводить тестирование вещества, используя не менее 2 доз. В каждой группе должно быть не менее 10 крыс. По окончании введения к самцам подсаживают интактных самок в соотношении 1:2 на 10 дней (2 эстральных цикла). О состоянии репродуктивной функции самцов судят по результатам исследования репродуктивных органов самок, спаренных с самцами, получавшими препарат. Желательно предусмотреть дополнительную группу животных для выяснения возможности обратимости эффекта в случае его обнаружения.

2.3. Выбор конкретных методов исследования

Необходимо иметь в виду, что подавление репродуктивной функции при длительном введении некоторых фармакологических веществ может быть обусловлено не только нарушениями гаметогенеза, но и многими другими причинами, в том числе изменениями эндокринной функции половых желез, гипофиза, гипоталамуса и др., принимающих участие в регуляции гормонального полового гомеостаза. Поэтому, если под влиянием тестируемого вещества возникают нарушения репродуктивной функции животных, необходимо выяснить, связано это с прямым воздействием на спермато- или оогенез либо имеет опосредованный характер. Выбор конкретных методов исследования проводится экспериментатором. Ряд рекомендуемых методов приведен в приложении.

3. Изучение эмбрио- и фетотоксического действия, регистрируемого в антенатальном периоде развития

3.1. Эмбриотоксичность

Под эмбриотоксическими свойствами понимают способность вещества оказывать токсическое действие на развивающиеся эмбрионы/плоды. Эмбриотоксичность может проявляться как в повышении уровня эмбриональной смертности (эмбриолетальное действие), изменении массы тела, кранио-каудальных размеров плодов, задержке оссификации скелета (общая задержка развития), так и в виде анатомических, гистологических, цитологических, биохимических, нейрофизиологических и иных отклонений от нормы, проявляющихся до или после рождения (тератогенное действие), увеличении перинатальной смертности.

3.2. Объект исследования

Исследованию на наличие эмбриотоксических свойств должны подвергаться все новые фармакологические вещества, которые могут быть назначены женщинам репродуктивного возраста, а также не исследованные ранее компоненты, которые в качестве вспомогательных веществ включены в лекарственную форму новых или уже применяемых лекарств. Для лекарственных веществ, планируемых для клинического применения у больных с отсутствующим репродуктивным потенциалом, изучение эмбриотоксичности не является обязательным. При изучении эмбриотоксического действия должны соблюдаться положения, изложенные в пунктах 1.1–1.8.

3.3. Экспериментальные исследования

Они должны включать изучение состояния плодов к концу антенатального периода развития.

3.4. Сроки введения фармакологического вещества

Сроки должны охватывать весь период беременности, поскольку чувствительность эмбриона к токсическому действию фармакологических веществ зависит от стадии развития и при этом эмбрионы, находящиеся на одной стадии развития, могут различаться в чувствительности к действию различных по структуре веществ.

3.5. Расчет доз

С точки зрения адекватности последующей интерпретации результатов, целесообразно проводить тестирование вещества, используя не менее 2 доз. Дозы тестируемого вещества рассчитывают на единицу массы тела самки (п. 1.6).

3.6. Контроли

У всех млекопитающих часть эмбрионов погибает до или после имплантации, а у некоторых эмбрионов спонтанно возникают аномалии развития. Поэтому в лабораториях, проводящих тестирование, необходимо иметь данные по так называемому обобщенному контролю: результаты, полученные на животных, использовавшихся в качестве контрольных в предыдущих исследованиях, при сохранении стабильных условий их содержания.

3.7. Выбор вида животного

При выборе вида животного необходимо учитывать фармакокинетические параметры и видовую чувствительность изучаемого лекарственного вещества. В большинстве случаев исследования проводят на крысах. В случае необходимости получения дополнительной информации используют животных другого вида — кроликов, хомяков, мини-свиней и др.

3.8. Тестирование на крысах

3.8.1. Количественный состав групп

Каждая группа крыс в группе получающих ЛС и в контрольной должна состоять не менее чем из 10 беременных животных. Первым днем беременности считают день обнаружения сперматозоидов в вагинальном мазке. В исследованиях используют виргинных самок линейных, гибридных или рандомбредных животных.

3.8.2. Тестируемое вещество

Его вводят самкам один раз в день, в одно и то же время суток. При отсутствии сведений о выраженной индукции или ингибировании ферментов возможно введение лекарственных веществ с 1-го по 19-й день беременности в 2 дозах (п. 1.6.). Также возможна следующая схема введения препарата: с 1-го по 6-й (доимплантационный период), с 6-го по 16-й (органогенез), и с 16-го по 19-й дни беременности (фетогенез) в трех параллельных экспериментальных группах. Крысам контрольной группы в эти же сроки следует вводить растворители, используемые при приготовлении раствора или суспензии тестируемого вещества. Кроме того, в эксперимент может быть введена группа интактных беременных самок.

При необходимости валидации эксперимента в качестве позитивного контроля целесообразно использовать заведомый тератоген (салициловокислый натрий, циклофосамид и др.) в дозе, оказывающей эффект примерно на 50% эмбрионов.

3.8.3. Выявление возможного токсического действия изучаемого вещества

Во время эксперимента следует наблюдать за состоянием и поведением беременных самок, регулярно, не реже одного раза в неделю, взвешивать животных для выявления возможного токсического действия изучаемого вещества.

3.8.4. Оценка эффектов

Эффекты оцениваются после эвтаназии и вскрытия самок. Вскрытие проводят на 20-й день беременности.

3.8.5. Показатели эмбриотоксичности

Показателями эмбриотоксичности служат: пред- и постимплантационная эмбриональная гибель и аномалии развития. Предимплантационную гибель (%) определяют по разности между количеством желтых тел в яичниках и количеством мест имплантации в матке; постимплантационную гибель (%) — по разности между количеством мест имплантаций и количеством живых плодов. При оценке тератогенного действия рекомендуется сначала подсчитать количество плодов с аномалиями, регистрируемыми при внешнем осмотре, а затем разделить плоды на 2 группы и у одной части плодов исследовать состояние внутренних органов, у другой — состояние скелета. Кроме того, плоды взвешивают и определяют их краниокаудальный размер.

3.9. Тестирование на кроликах

Исследования проводят на виргинных самках. Каждая группа (в группах получающих ЛС и контроле) должна состоять не менее чем из 10 беременных крольчих.

3.9.1. Введение изучаемых веществ

Изучаемое вещество рекомендуется вводить с 6-го по 18-й дни беременности (период органогенеза), один раз в сутки, в высшей дозе (п. 2.6). Группы контрольных животных должны быть такими же, как указано в п. 4.8.2. Вопрос о том, использовать субстанцию или лекарственную форму, решается так, как указано в п. 2.2. Результаты оценивают после эвтаназии и вскрытия самок.

Вскрытие проводят на 27–28-й день беременности. Можно прибегать и к хирургическому извлечению плодов у живых крольчих.

3.9.2. Показатели эмбриотоксичности

Используются те же показатели эмбриотоксичности, что и в исследованиях на крысах (п. 3.8.5).

Примерная форма представления данных по изучению эмбриотоксического действия представлена в таблице 1.

Таблица 1

*Исследование эмбриотоксического действия (наименование препарата)
на (наименование вида животных)*

Показатели	Единица измерения
Количество беременных самок	
Количество желтых тел	О/О (в числителе — общее количество, в знаменателе — на одну самку)
Количество мест имплантации	О/О
Количество живых плодов	О/О
Количество резорбций	О/О
Количество мертвых плодов	О/О
Предимплантационная гибель	(%)
Постимплантационная гибель	(%)
Масса плодов	(г)
Краниокаудальный размер	(см)

Показатели	Единица измерения
Внешний осмотр плодов:	
количество обследованных плодов	абс.
из них с аномалиями развития:	абс., %
Состояние костной системы: количество обследованных плодов из них с аномалиями развития:	абс. абс., %
Состояние внутренних органов: количество обследованных плодов из них с аномалиями развития:	абс. абс., %

Нарушения развития, отмеченные при исследовании плодов (наименование вида животных), полученных от самок, которым вводили (наименование препарата)

Группа животных (экспозиция, доза препарата)		
Вид нарушения	Количество плодов, имевших данное нарушение	
	абс.	% к общему количеству обследованных по этой методике

4. Изучение антинатального действия фармакологических веществ, регистрируемого в постнатальном периоде развития

4.1. Цель исследований

Целью исследований, проводимых на этом этапе, является выявление нарушений эмбрионального развития, проявляющихся в постнатальном периоде жизни.

4.2. Животные

Исследование проводят на виргинных самках крыс. В получающих ЛС и в контрольной группах должно быть получено потомство не менее чем от 10 самок. Изучаемое вещество вводят самкам 1 раз в сутки с 6-го дня беременности и до родов (период органо- и фетогенеза) в дозе, близкой к максимальной (п. 1.6.). Контрольная группа самок должна получать в эти же сроки растворитель, используемый при введении препарата. Во время введения препарата необходимо регистрировать общее физическое состояние и поведение самок, динамику массы тела, продолжительность беременности, течение родов. За 3–4 дня до родов беременных самок следует рассадить по одной в клетку и обеспечить их подходящей подстилкой для устройства гнезда. В каждом помете оставляют по 6–8 новорожденных (желательно одинаковое количество самок и самцов). На 30-й день после рождения крысят отсаживают от матерей.

Исследования следует начинать не раньше чем через 24 ч и продолжать до 2-месячного возраста.

4.3. Типы исследований

Оценка включает следующие типы исследований: общие наблюдения за физическим развитием потомства; изучение скорости созревания сенсорно-двигательных рефлексов в период вскармливания самкой; изучение двигательной активности и эмоциональной реакции, способности к координации движений у потомства после окончания вскармливания; изучение обучаемости и памяти при выработке условных рефлексов с положительным и отрицательным подкреплением и сохранение полученных навыков.

Программа изучения постнатального развития определяется экспериментатором с учетом фармакологических и токсикологических свойств изучаемого лекарственного

вещества. Примерный перечень тестов указан в приложении. В некоторых случаях он может быть расширен для получения дополнительной информации (изучение влияния на морфологический состав крови, проведение биохимических, патоморфологических исследований, спаривание с последующим изучением потомства F1, F2 генераций и др.).

Необходимо иметь в виду, что введение некоторых веществ во время беременности может неблагоприятно влиять на поведение самок, приводя к нарушению лактации, угасанию материнских инстинктов и т.п. В связи с этим может возникать необходимость перекрестного вскармливания потомства.

4.4. Вещества, применяемые во время грудного вскармливания

Для некоторых фармакологических веществ, применяемых во время грудного вскармливания, желательно изучение их влияния на развитие потомства. Исследования проводят при введении вещества самкам с 1-го дня после родов до окончания вскармливания (25–30-й день). Состояние потомства оценивают с использованием тех же показателей, что и при изучении постнатального развития (п. 4.3).

4.5. Статистическая обработка полученных результатов

При статистической обработке полученных результатов в качестве независимой переменной используют среднее значение соответствующего показателя для отдельного помета. В связи с этим при формировании групп для отдельных серий исследований желательно, чтобы соблюдалось равное представительство от каждого помета. При этом необходимо предусмотреть возможность раздельного анализа результатов для самок и самцов. В отчете должны быть представлены сведения об использованных методиках статистического анализа.

5. Схема отчета о результатах изучения эмбриотоксических свойств и влияния на репродуктивную функцию фармакологического вещества

5.1. Отчет

Представляемый отчет должен включать цифровые данные в форме таблиц, содержащих основные сведения, необходимые для суждения о наличии или отсутствии у изучаемого препарата неблагоприятного действия на внутриутробное развитие и процессы репродукции. Форма некоторых таблиц представлена в приложении.

5.2. Описание аномалий развития

При описании аномалий развития следует руководствоваться общепринятой терминологией. Если трудно описать какую-либо из аномалий развития, следует представить фотографию плода с этой аномалией.

5.3. Заключительная часть отчета

В заключительной части отчета необходимо дать оценку результатам тестирования по следующим направлениям:

- оценка результатов, полученных при изучении влияния препарата на репродуктивную (генеративную) функцию;
- оценка результатов, полученных при обследовании плодов в конце антенатального периода развития;
- оценка результатов, полученных при обследовании потомства в постнатальном периоде развития.

5.4. Общее заключение

Указывают сведения о наличии или отсутствии повреждающего действия ЛС на репродуктивную функцию и внутриутробное развитие.

6. Приложение

6.1. Стандартные операционные процедуры, используемые в экспериментах по изучению репродуктивной токсичности фармакологических средств

6.1.1. Эвтаназия получавших ЛС и контрольных животных и получение эмбрионального материала

Эвтаназию самок осуществляют дислокацией шейных позвонков или декапитацией. Вскрывают брюшную полость, вырезают матку, переносят в чашку Петри с изотоническим раствором натрия хлорида. Вскрывают рога матки, подсчитывают количество живых, мертвых, резорбированных плодов, обследуют слизистую оболочку матки, отмечая места имплантации. Отделяют плоды, освобождают их из оболочек. В яйчниках подсчитывают количество желтых тел, в матке — число мест имплантаций и плодов.

6.1.2. Наружный осмотр, взвешивание плодов

Все живые плоды каждого помета обследуют под бинокулярным микроскопом типа МБС для обнаружения видимых аномалий развития. После этого плоды взвешивают, отмечают состояние каждого плода, описывают аномалии, указывают массу каждого плода и суммарную массу плодов помета.

После наружного осмотра плодов, регистрации всех аномалий и взвешивания плоды каждого помета делят на две группы. Одну группу плодов (около половины) фиксируют в жидкости Буэна и используют для изучения внутренних органов. Остальные плоды фиксируют в 96° этаноле и используют для изучения состояния скелета.

6.1.3. Исследование внутренних органов плодов по методике Вильсона в модификации отдела эмбриологии НИИЭМ АМН СССР

Исследования проводят на плодах, которые фиксировали в жидкости Буэна не менее 1 недели. Плод укрепляют на пробковом столике и при помощи безопасной бритвы разрезом параллельно нижней челюсти отделяют голову от туловища. Первый разрез головы проводят перпендикулярно нижней челюсти непосредственно за вибриссами. На этом срезе видно состояние нижней челюсти, переднего отдела твердого неба и носовой полости. Второй разрез проводится через середину глазных яблок и охватывает обонятельные луковицы. На третьем разрезе изучают состояние головного мозга: коры больших полушарий, боковых, III и IV желудочков. Срез проводят через большой поперечный диаметр черепа. Четвертый разрез проходит параллельно третьему. Исследуют мозжечок и продолговатый мозг. Пятый разрез идет через гортань, пищевод, спинной мозг, сосуды и слюнные железы. Шестым разрезом отсекается шея от туловища. Разрез проводят перед передними лапами. Видны пищевод, трахея, спинной мозг, крупные сосуды. Седьмой разрез проходит через органы грудной клетки непосредственно за передними конечностями. На разрезе видны: сердце, легкие, бронхи, пищевод, спинной мозг. Восьмой разрез проводят по середине между седьмым разрезом и пупочным кольцом. Осматривают печень, а затем осторожно удаляют ее пинцетом и исследуют состояние диафрагмы. Девятый разрез проходит ниже пупочного кольца. Видны кишечник, поджелудочная железа. Осторожно удалив петли кишечника и печень, можно наблюдать органы таза: почки, мочеточники, мочевой пузырь, прямую кишку, внутренние половые органы. Необходимо обратить внимание на почки (возможность гидронефроза), матку с придатками и тестикулы.

6.1.4. Метод висцерального исследования органов плодов по Стейплсу

После внешнего осмотра живых плодов на наличие аномалий развития, определения массы и краниокаудального размера производят декапитацию. Декапитированный плод

фиксируют, глазными ножницами разрезают переднюю брюшную стенку и грудь вдоль левого края грудины. Пинцетом удаляют вилочковую железу и исследуют топографию и состояние крупных сосудов, отходящих от сердца (правая и левая подключичные артерии, общая сонная артерия, нисходящая аорта и легочная артерия). Обращают внимание на их форму и размеры. Пинцетом фиксируют сердце за ушко правого предсердия, рассекают сердце ножницами двумя разрезами от верхушки к основанию (1 — правее, 2 — левее межжелудочковой перегородки) и исследуют состояние межжелудочковой перегородки и клапанов. Затем исследуют состояние легких (количество долей) и органов брюшной полости. После извлечения печени определяют состояние диафрагмы, а удалив петли кишечника, осматривают надпочечники, почки, мочеточники и мочевой пузырь. Почки разрезают на уровне почечных лоханок и исследуют их. Определяют абсолютную и относительную массу вилочковой железы, сердца, почек. Устанавливают пол плода и изучают топографию половых органов.

6.1.5. Окрасивание скелета ализарином (методика Доусона, модифицированная в отделе эмбриологии НИИЭМ АМН СССР)

Плоды фиксируют в 96° этаноле не менее 7 дней. Объем спирта должен превышать объем фиксируемых плодов в 10 раз. После фиксации у плодов удаляют внутренние органы и погружают в 1 % раствор КОН для просветления мягких тканей. Время пребывания плодов в этом растворе определяют эмпирически (примерно 1–2 сут). Когда становятся видны закладки костей, плоды вынимают, промывают водопроводной водой и переносят их в раствор А (150 мл глицерина, 800 мл дистиллированной воды и 10 г КОН), к которому добавляют несколько капель раствора Б (1 % раствор ализарина красного) до появления светло-фиолетового окрашивания. Через 3–5 сут окостеневшие участки скелета окрашиваются в красно-фиолетовый цвет. Для обесцвечивания мягких тканей плоды переносят в раствор А на 7–14 дней, затем их проводят через смеси глицерина, спирта и воды с целью обезвоживания (1:2:7, 2:2:6, 4:4:2, равные части спирта и глицерина, чистый глицерин с добавлением 1–2 капель формалина). В чистом глицерине плоды могут храниться. Плоды изучают под микроскопом МБС, учитывают аномалии скелета, количество точек окостенения в различных костных образованиях.

6.1.6. Методы изучения развития потомства в постнатальном периоде жизни

Общие наблюдения за физическим развитием потомства

Дни наблюдений	Регистрируемые параметры
1–2-й	Размер помета, число живых и мертвых новорожденных, число особей разного пола. Вычисляется размер помета и индекс гибели
4, 7, 14, 21-й 21-й	Гибель новорожденных, масса тела
Со 2-го	Отлипание ушной раковины (в среднем — 2-й день)
С 4-го	Появление первичного волосяного покрова (в среднем — 5-й день)
С 6-го	Прорезывание резцов (в среднем — 8-й день)
С 12-го	Открытие глаз (в среднем — 16-й день)
С 25-го	Опускание семенников (в среднем — 28-й день)
С 30-го	Открытие влагалища (в среднем — 37-й день)

*Изучение скорости созревания сенсорно-двигательных рефлексов
в период вскармливания*

Дни наблюдений	Показатели	Способ проведения исследования и регистрируемые параметры
Со 2-го	Переворачивание на плоскости*	Крысят кладут на спину на плоской поверхности, быстро отпускают и измеряют время, необходимое для возвращения в нормальное положение. Формирование рефлекса считается завершенным (в среднем — на 8-й день), если крысята возвращаются на все 4 лапы. Исследования проводят не более чем по 30 с с каждым животным до полного формирования рефлекса во всех контрольных пометах
С 5-го	Отрицательный геотаксис*	Исследования проводят 1 раз в день, по 1 мин. Крысят помещают на наклонную плоскость (25°) головой вниз. Рефлекс считается сформированным, если крысята поворачиваются на 180° (в среднем — 7-й день). Можно измерять время удержания на наклонной плоскости. Исследования проводят до полного формирования рефлекса во всех контрольных пометах
С 5-го	Удержание на «горизонтальной веревочке»	Изучают становление двигательной активности при помощи установки «Горизонтальная веревочка». Крысят помещают передними лапами на канат толщиной 2 мм. Регистрируют число крысят, удерживающихся передними лапами на канате и время удерживания (с).
С 6-го	Избегание обрыва*	Крысят кладут на стол или возвышающуюся над клеткой платформу таким образом, что передние лапы касаются края стола. Формирование рефлекса завершено (в среднем — 9-й день), если в течение 10 с крысята отползают от края площадки. Исследования проводят до полного формирования рефлекса во всех контрольных пометах
6-8-й	Маятниковый рефлекс	Определяется как изменение направления головы и туловища в горизонтальной плоскости приблизительно на 90° за счет перемещения передних лап, когда задние конечности поджаты и неподвижны. Измеряется количество поворотов за 1 мин и количество изменений направления на обратное (реверсия)
С 6-го	Открытое поле-1	Крысят помещают на площадку размерами 30 × 30 см, на которой проведены линии, образующие 36 квадратов. Регистрируют:
8-9-й		поднимание головы и передних лап
9-11-й		ползание
13-15-й		опору на задние конечности, подъем всего тела
17-20-й		двигательную активность (число пересеченных квадратов), умывания различного рода, обнюхивания, стойки, карабканье на стенки, прыжки, время отсутствия активности, возможные аномалии походки

Дни наблюдений	Показатели	Способ проведения исследования и регистрируемые параметры
С 8-го	Реакция на акустический стимул*	Крысят помещают на небольшую площадку в звукоизолированной клетке. Поворот площадки или движение животного можно регистрировать автоматически или визуально. Рефлекс считают сформированным, если животное реагирует на акустический стимул длительностью 0,3–0,5 с (в среднем формируется на 13-й день). Исследования проводят до полного формирования рефлекса во всех контрольных пометах
С 14-го	Зрачковый рефлекс*	Регистрируют сокращение зрачка или поворот головы. Исследования проводят в затемненном помещении с точечным источником света до полного формирования рефлекса во всех контрольных пометах (в среднем – 14–15-й день)
14–15-й	Избегание обрыва (вызванное визуальным стимулом)	Животное помещают на площадку, поднятую на высоту 45 см над поверхностью. Избегание падения принимается за положительное решение. Исследования проводят однократно, после открытия глаз
10-11-й	Обонятельная реакция	Животное помещают посередине рейки шириной 6 см с делениями, которую кладут на клетки. Расстояние между клетками можно менять. Определяют расстояние, на котором животное правильно выбирает направление на клетку с сибсами и матерью, в которой оно содержалось перед исследованием. Средний возраст формирования рефлекса – 10–11-й день). Можно учитывать число падений, соскальзываний, совмещая этот тест с тестом хождения по полоске
С 15-го	Мышечная сила*	Животное помещают на густую проволочную сетку, которую медленно поворачивают на 180°. Измеряют время нахождения животного под сеткой, которое должно быть не менее 15 с. Исследования проводят до достижения критерия всеми контрольными пометами

*Исследование эмоционально-двигательного поведения
и способности к координации движений*

117–20-й	Переворачивание в свободном падении	Крысят держат спиной вниз на высоте 60 см над мягкой поверхностью и быстро отпускают. Визуально регистрируют, переворачиваются ли крысята в воздухе, чтобы упасть на все 4 лапы
114–25-й	Удержание на вращающемся цилиндре*	Изучают время удержания на вращающемся цилиндре (при скорости 30 об/мин). Исследования проводят до достижения критерия – удержания в течение 3 мин на цилиндре с резиновой поверхностью и диаметром приблизительно 12 см. Сложность задачи можно варьировать, уменьшая диаметр цилиндра и его текстуру, а также скорость вращения. Исследования проводят до достижения критерия всеми контрольными животными

440-45-й	Открытое поле-2	Исследования проводят в 3-минутных тестах на протяжении 3–4 дней, либо, при большом количестве животных (более 60), один день при длительности теста не менее 3 мин. Крыс помещают в центр ярко освещенной площадки, разбитой на квадраты. Регистрируют время выхода из центра (латентный период), число посещаемых квадратов (двигательная активность), число стоек (реакция оглядывания), число обследованных отверстий (исследовательская активность), число умываний различного типа (груминг), число актов дефекации и мочеиспускания (эмоциональность)
330-45-й	Спонтантная двигательная активность	Измерение двигательной активности может быть проведено одним из альтернативных методов анализа: «белчье колесо», системы с фотоэлектрической и магнитной регистрацией и т.п.

Примечание *) — эти показатели можно изучать не в динамике, а однократно, в предполагаемый день созревания у контрольных животных.

Изучение обучаемости и памяти

Способ проведения эксперимента	Регистрируемые параметры
<i>Пассивное избегание с отрицательным (болевым) подкреплением</i>	
Методика основана на естественной для крыс реакции переходить из освещенной камеры в темную. Крыс помещают в освещенную камеру размером 40 × 20 × 20 см. В 1-й день обучения животные в темной камере получают электроболевое раздражение при силе тока 1 мА. Через 24, 48 ч исследуют время нахождения животных в освещенной камере (обычно не более 2–3 мин)	Относительное число животных, не избегающих светлой камеры. Латентный период выхода в темную камеру при первом предъявлении. Латентный период выхода в темную камеру через 24, 48 ч после обучения
<i>Активное избегание с отрицательным (болевым) подкреплением</i>	
Проводится обычно в так называемой челночной камере, состоящей из двух отсеков размером 20 × 20 × 20 см, и разделенных переходом или дверцей. В полу камеры — решетки, на которые можно подавать ток силой 0,75–1,5 мА (обычно определяют болевой порог индивидуально для каждого животного и используют ток, равный 1,5 единицам болевого порога). Обучение методом дискретных проб заключается в том, что каждое исследование начинается с сигнала (зуммер, свет). Если животное через фиксированное время (5–10 с) не переходит в безопасный отсек, подается электроболевое раздражение. Исследования проводят до достижения критерия обученности не менее чем у 80% животных контрольной группы. Критерием обученности является 18 успешных избеганий в серии из 20 исследований. Крыс обучают двустороннему избеганию. При изучении долгосрочной памяти (например 1, 7, 10 дней после достижения критерия) животных подвергают однотипным действиям с обучением исследованию. Угасание навыка исследуют каждый день, не подкрепляя сигнал болевым раздражением. Возможны модификации метода выработки этого рефлекса: одностороннее избегание, массивное обучение	Среднее количество правильных ответов в зависимости от числа предъявлений. Кривая обучаемости — относительное число животных, достигших критерия обученности при данном числе исследований. Среднее значение болевого порога. Среднее число межсигнальных реакций. Процент ошибочных ответов при исследовании памяти. Скорость угасания навыка

<i>Обучение в лабиринте с положительным (пищевым) подкреплением</i>	
<p>Используют Т-, У-образные лабиринты или многосекционные лабиринты. Животных взвешивают до начала ограничения в питании, после первого дня исследования и после достижения критерия обученности. Исследования продолжают до достижения критерия, подбираемого эмпирически при анализе кривой обученности. Исследования продолжают до достижения критерия не менее чем 80 % животных контрольной группы. При отсутствии различий в скорости обучения исследуют память обученных животных. При исследовании памяти необходимо, чтобы животные получили в процессе обучения сходное количество подкреплений</p>	<p>Среднее количество правильных ответов в зависимости от числа предъявлений. Кривая обученности. Частота (и длительность) различных актов поведения, в том числе и эмоциональная реакция на лабиринт. Число различных элементарных актов поведения до достижения критерия обученности. Потеря массы тела в процессе обучения и корреляция этого показателя со скоростью приобретения навыка</p>

6.1.7. Методы изучения репродуктивной функции

6.1.7.1. Морфологическое изучение семенников

Для морфологического изучения семенников их фиксируют в 10% формалине или жидкости Карнуа, заливают в парафин, готовят поперечные срезы толщиной 6–7 мкм, окрашивают гематоксилином и эозином. Морфологическую оценку состояния сперматогенного эпителия проводят по следующим количественным показателям:

а) индекс сперматогенеза = $\Sigma A/100$, где А — число стадий в каждом канальце, 100 — число подсчитанных канальцев. Индекс сперматогенеза подсчитывают по 4-балльной системе, фиксируют в канальце наличие сперматогоний, сперматоцитов 1-го и 2-го порядка, сперматид и сперматозоидов;

б) среднее количество нормальных сперматогоний в каждом канальце (подсчитывают 20 канальцев);

в) относительное количество канальцев с 12-й стадией мейоза (метафаза 2-го деления созревания, подсчитывают в 100 канальцах).

6.1.7.2. Функциональное состояние сперматозоидов

Имеются различные модификации получения эякулята (из эпидидимуса, после введения окситоцина, раздражение семенного бугорка и др.). Функциональное состояние сперматозоидов оценивают по следующим показателям: характер и продолжительность их движения; относительное количество патологических форм сперматозоидов; концентрация сперматозоидов. Возможно также определение относительного количества живых сперматозоидов и их резистентности — осмотической и кислотной и др. показатели.

6.1.7.3. Морфологическое изучение яичников

Для морфологического изучения яичников их фиксируют в жидкости Карнуа, заключают в парафин, готовят срезы по типу топографических, через весь орган, толщиной 6 мкм, окрашивают гематоксилином и эозином. Эвтаназию животных проводят в стадии эструс или проэструс, что необходимо для последующего подсчета структурно-функциональных элементов в яичнике.

Регистрируют:

- примордиальные фолликулы и фолликулы с одним слоем гранулезных клеток;
- фолликулы с двумя и более слоями гранулезных клеток;
- зрелые фолликулы (граафовы пузырьки);
- атретические тела и атретизирующие фолликулы;
- желтые тела;
- общее количество генеративных форм.

Указанные элементы подсчитывают по всей поверхности среза. Фолликулы примордиальные и с одним слоем гранулезных клеток учитывают в каждом 10-м срезе и результат умножают на 10, фолликулы зрелые с двумя и более слоями гранулезных клеток, атретические тела подсчитывают в каждом 5-м срезе, желтые тела фиксируют в срединном срезе. При количественной оценке микроструктуры яичника регистрируют только фолликулы, содержащие ядро и ядрышко.

Заключение

При изучении влияния фармакологического вещества на репродуктивную функцию исследователь может использовать и другие показатели, позволяющие выявить возможность его неблагоприятного действия на репродукцию. Материалы оформляются в виде научного отчета в соответствии с ГОСТ 7.32-2001 и Приказом Минздравсоцразвития России от 23 августа 2010 г. № 708н «Об утверждении правил лабораторной практики» с предоставлением в таблицах как первичных данных по каждому веществу, так и статистически обработанных результатов. К отчету необходимо приложить аналитические паспорта или нормативные документы на референтные и тестируемые вещества.

Литература

1. Гуськова Т.А. Основные проблемы безопасности лекарственных средств // Фарматека. — 2006, №5. — С.151–156.
2. Гуськова Т.А. Доклинические токсикологические исследования лекарственных средств как основа их безопасного применения в клинике // Клинические исследования лекарственных средств в России, 2004. — №3–4. — С. 8–15.
3. Гуськова Т.А., Смольникова Н.М., Скосырева А.М., Сюбаев Р.Д., Верстакова О.Л. Категории риска репродуктивной токсичности лекарственных средств // Ведомости научного центра экспертизы и государственного контроля лекарственных средств, 2001. — № 3. — С. 36–38.
4. Дыбан А.П. Раннее развитие млекопитающих. — Л.: Наука, 1988. — 228 с.
5. Дыбан А.П., Баранов В.С., Цитогенетика развития млекопитающих. — М.: Наука, 1978. — 216 с.
6. Кирющенко Л.П., Тараховский М.Л. Влияние лекарственных средств на плод. М.: 1990. — 286 с.
7. Методические указания по изучению репродуктивной токсичности фармакологических веществ. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. — М., 2005. — С. 87–100.
8. Методические указания по изучению эмбриотоксического действия фармакологических веществ и влияния их на репродуктивную функцию. — М.: Фармакологический комитет, 1986. — 25 с.
9. Принципы оценки риска для потомства в связи с воздействием химических веществ в период беременности. — Женева: ВОЗ, 1986. — 156 с.
10. Alexander P. G., Tuan R. S. Role of environmental factors in axial skeletal dysmorphogenesis. Birth Defects Research (Part C), 90: 118–132 (2010).
11. Burdan F. et al. Morphological studies in modern teratological investigations. Folia Morphol (Warsz), 64(1): 1–8 (2005).
12. Depew M.J. Analysis of skeletal ontogenesis through differential staining of bone and cartilage. Methods Mol Biol., 461: 37–45 (2008).
13. Menegola E., Broccia M. L., Giavini E. Atlas of rat fetal skeleton double stained for bone and cartilage. Teratology., 64(3): 125–133 (2001).
14. Yang Y. Skeletal morphogenesis during embryonic development. Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr., 19(3): 197–218 (2009).
15. Neubert D. Reproductive toxicology: the science today. Teratogenesis, Carcinogenesis and Mutagenesis 22: 159–174 (2002).
16. Harris M., Chapin R. E., Lockhart A. C. and Jokinen M. P. Assessment of a short-term reproductive and developmental toxicity screen. Fundam. Appl. Toxicol., 1: 186–196 (1992).
17. Amann R. P. Use of animal models for detecting specific alterations in reproduction. Fundam. Appl. Toxicol., 2: 13–16 (1982).
18. Chahoud I. et al. Classification terms in developmental toxicology: need for harmonization. Reproductive toxicology, 13 (1): 77–82 (1999).