

Важность исторических контрольных данных в интерпретации токсикологической значимости эффектов тестируемого объекта в исследовании безопасности на животных

Хохлова Оксана Николаевна

Руководитель токсикологических исследований

Центр Биологических Испытаний

Институт биоорганической химии

им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН

г.Пушино

Результат токсикологического исследования:

Какая доза не вызывает токсикологически значимых эффектов? (No Observed Adverse Effect Level - NOAEL)

- Биологический эффект *или* случайность/артефакт?
- Эффект связан *или* не связан с тестируемым объектом?
- Эффект токсикологически значимый *или* адаптивный?

Recommended (“Best”) Practices for Determining, Communicating, and Using Adverse Effect Data from Nonclinical Studies
(*Toxicologic Pathology* 2016 Feb;44(2):147-62).

4. Необходимы рассуждения/дискуссия, причинил ли обнаруженный эффект вред подопытным животным, чтобы оценить неблагоприятные последствия, в аспектах:
- (i) патогенез эффекта — первичный или вторичный,
 - (ii) является ли эффект супрафармакологической модуляцией (усилением эффективности),
 - (iii) является ли эффект усилением адаптационных реакций или имеющихся фоновых изменений (свойственных виду, линии, возрасту).

Ист орические конт рольные данные (ИКД) –

Совокупность информации по клиническим параметрам и патологическим проявлениям от контрольных животных, использованных в исследованиях токсичности, и от интактных животных.

ИКД дают понимание о спонтанных возникновениях морфологических изменений и фоновой изменчивости параметров у одного и того же вида и линии животных, в сходных условиях в одной лаборатории.

Есть ли принятые критерии ИКД?

Критерии ИКД (Regulation (EU) 283/2013):

- Предназначены для интерпретации конечных точек исследования, которые могут отражать критические неблагоприятные эффекты;
- Должны соответствовать используемой тест-системе и быть полученными из той же лаборатории;
- Должны охватывать пятилетний период, близкий к дате исследования;
- Данные ИКД других лабораторий могут быть использованы только дополнительно

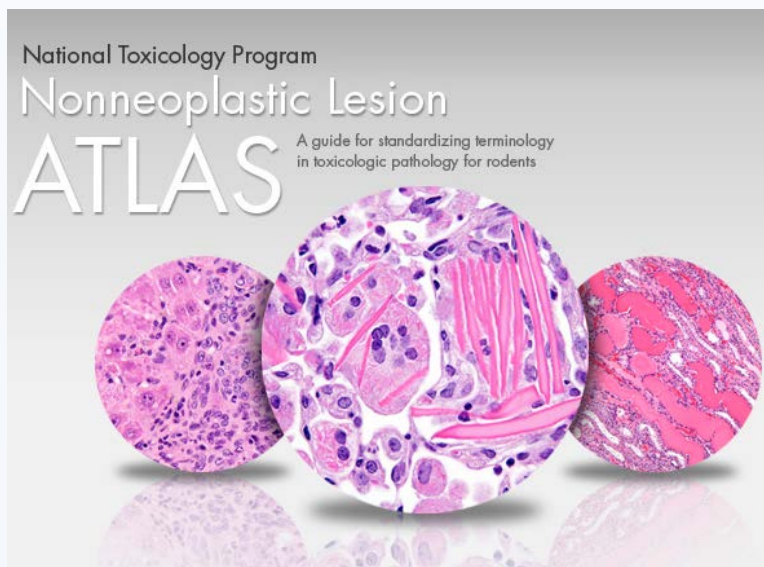
Должны содержать информацию:

- Вид, линия животных, поставщик
- Место и даты проведения исследования
- Условия содержания животных, включая тип/марку корма
- Примерный возраст и масса тела животных в начале и конце исследования, даты эвтаназии
- Способ эвтаназии
- Обнаруженные сопутствующие наблюдения (болезни, инфекции)
- Название лабораторий и исследователей, ответственных за сбор данных исследований
- Информация отдельно о каждом случае опухолей, которые могли быть объединены

NTP - Первая база опухолей у лабораторных животных для диагностики и интерпретации



<https://ntp.niehs.nih.gov/data/controls>



<https://ntp.niehs.nih.gov/atlas/nnl>

global open RENI

The standard reference for nomenclature and diagnostic criteria in toxicologic pathology.

Важность номенклатурного названия патоморфологических находок в представлении ИКД

"INHAND": International Harmonization of Nomenclature and Diagnostic criteria

OECD *Guidance Document 116 on the Conduct and Design of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies* (2014):

- ИКД помогают интерпретировать результаты. Однако результаты параллельной контрольной группы всегда имеют большую значимость в оценке увеличения частоты встречаемости опухолей.
- Значительные различия между ИКД и параллельным контролем могут быть связаны с различием в диагностической номенклатуре, линиях животных, условиях содержания, квалификацией патологов.
- ИКД могут быть использованы для сравнения в случае, если результаты параллельной контрольной группы “out of line”. Используются ИКД за 5 лет.

Включение ИКД в статистику: Elmore SA, Peddada SD. Points to consider on the statistical analysis of rodent cancer bioassay data when incorporating historical control data. Toxicol Pathol. 2009 Aug;37(5):672-6.

Использование Исторических Контрольных Данных для оценки показателей репродуктивной токсичности

OECD (2018), *Test No. 414: Prenatal Developmental Toxicity Study*, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, ГОСТ 32380-2013:

37. .. Оценка (результатов) должна включать следующую информацию:
...исторические контрольные данные для улучшения интерпретации результатов исследования, в зависимости от обстоятельств

ICH S5(R3). *Detection of Reproductive and Developmental Toxicity for Human Pharmaceuticals* (rev. 3, 2021):

VIII.A. *...Historical control/reference data can be used to assist data interpretation. Recent historical control data from the performing laboratory is preferable. Contemporary data typically from a five-year period is desirable and permits identification of genetic drift.*

VIII.A. *Fetal morphologic abnormalities should be described using industry-harmonized terminology.*

- Makris S.L. et al. (2009) Terminology of developmental abnormalities in common laboratory mammals (version 2) *Reproductive Toxicology*, 28(3), 371-434.
- DevTox.nomenclature: https://www.devtox.org/nomintro_en.php: External findings, Skeletal and cartilage findings, Visceral findings

Использование Исторических Контрольных Данных для оценки показателей репродуктивной токсичности

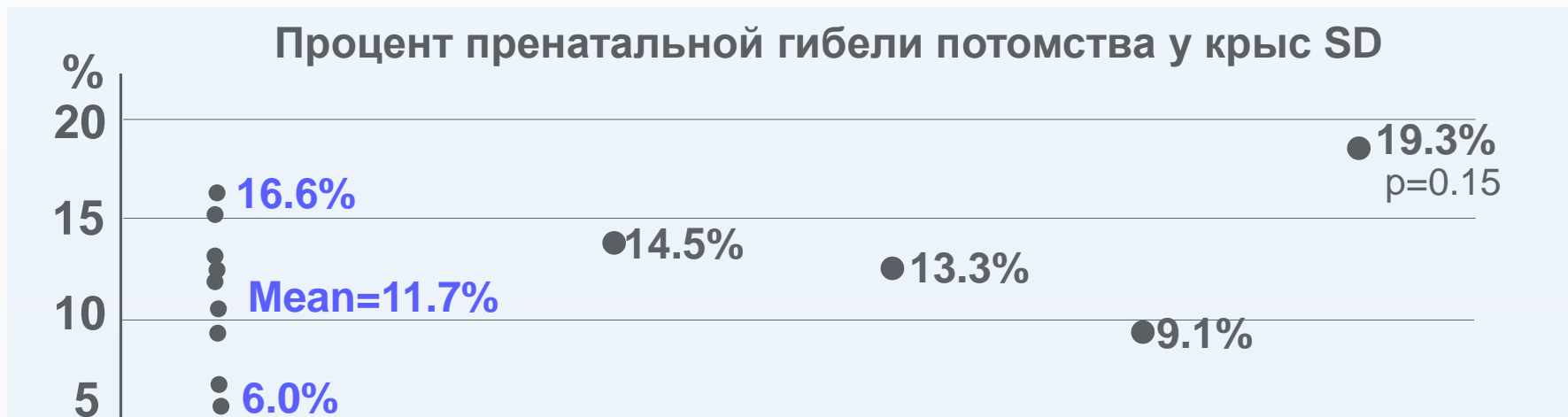
ICH S5(R3). Detection of Reproductive and Developmental Toxicity for Human Pharmaceuticals (rev. 3, 2021):

IX. PRINCIPLES OF RISK ASSESSMENT

Не все эффекты репродуктивной токсичности считаются токсикологически значимыми; оценка риска – по совокупности доказательств (weight-of-evidence)

Для редких пороков развития отсутствие дозозависимости в частоте не всегда снимает озабоченность в отношении оценки риска.

Использование Исторических Контрольных Данных для оценки показателей репродуктивной токсичности (данные ЦБИ ИБХ РАН)



ИКД
(9 иссл.)

0
мг/кг

100
мг/кг

300
мг/кг

1000
мг/кг



ЦБИ ИБХ РАН

Исторические Контрольные Данные в оценке эмбрио-фетального развития (данные ЦБИ ИБХ РАН)

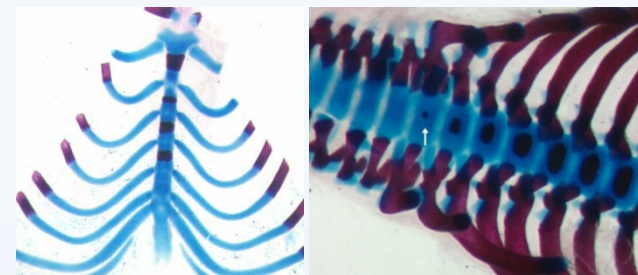
Исследование токсичности Толилтриазола на крысах SD (OECD TG414)

	ИКД (N=70)	0 мг/кг	30 мг/кг	90 мг/кг	300 мг/кг
Ранние резорбции, % от мест имплантации	3.5	4.8	4.4	4.4	8.8 ↑

Исследование токсичности 2,4,6-триметилфенола на крысах SD (OECD TG414)

Fetal Incidence, %	HCD (N=878)	0 mg/kg	25 mg/kg	100 mg/kg	400 mg/kg
External: Fetus - Small	0.2	1.8	2.6	7.4 ↑	6.4 ↑
External: Edema, Generalized	0.5	0.0	1.1	0.4	0.6
Visceral: Brain Ventricles - Dilated	0.9	4.0	7.0	9.1 ↑	10.5 ↑
Skeletal and Cartilage:					
Sternebra, 6th - Unossified	7.0	8.8	12.0	18.0 ↑	18.3 ↑
ThV, 1st – Unossified centrum	1.4	1.8	5.1	5.7	7.5 ↑

Находки при обследовании: 1) внешне, 2) органов, 3) скелета и хрящей



Исторические Контрольные Данные в оценке общетоксического действия (данные ЦБИ ИБХ РАН)

90-дневная токсичность 6-[[[4-метилфенил)сульфонил]амино]гексановой кислоты на крысах SD

Effect on Kidney	HCD	0 mg/kg	100 mg/kg	400 mg/kg	1600 mg/kg
Weight, % of bw – M	0.594 ± 0.048 (N=112) (MEAN+/-2*SD: 0.500 – 0.690)	0.608 ± 0.037	0.580 ± 0.028	0.599 ± 0.048	0.665 ± 0.035 (p < 0.01)
Weight, % of bw - F	0.604 ± 0.058 (N=54) (Mean+/-2*SD: 0.488 – 0.721)	0.589 ± 0.024	0.610 ± 0.038	0.602 ± 0.031	0.611 ± 0.019 (p < 0.05)
Accumulation, Pigment (Lipofuscinosis) - M	5.2% (0-4 findings/study)	0/10	0/10	3/10	4/10
Accumulation, Pigment (Lipofuscinosis) - F	6.0% (1-3 findings/study)	1/10	1/10	4/10	2/10

Non-Adverse

28-дневная токсичность ЕС-947-073-3 на крысах SD

Effect on Kidney	HCD	0 mg/kg	100 mg/kg	300 mg/kg	1000 mg/kg
Weight, % of bw – M	0.594 ± 0.048 (N=112) (MEAN+/-2*SD: 0.500 – 0.690)	0.612 ± 0.032	0.624 ± 0.032	0.621 ± 0.025	0.669 ± 0.037 (p < 0.001)
Renal tubular epithelium – Swelling - M	0.0 %	0/6	0/6	0/6	2/6

Adverse

Исторические Контрольные Данные в оценке токсических эффектов лекарственных препаратов (данные ЦБИ ИБХ РАН)

РУКОВОДСТВО по проведению доклинических исследований токсичности при повторном (многократном) введении действующих веществ лекарственных препаратов для медицинского применения

Приложение к Рекомендации Коллегии Евразийской экономической комиссии от 21 мая 2020 г. № 10:

V. Наблюдения. 1. Исходные и контрольные значения

28. В отношении грызунов и негрызунов необходимо располагать ретроспективными данными для изучаемых морфологических, биохимических и физиологических показателей.

Исследование расширенной острой токсичности DAZA-1 (ICH guideline M3 (R2) на крысах Wistar

Effect on Liver, F (<i>Adverse</i>)	HCD (N=35)	0 mg/kg (vehicle*)	1.4 mg/kg
ALT, U/L	50 ± 9 (min-max, 35-80)	64 ± 19	84 ± 20 (p < 0.05)
GLDH, U/L	6.3 ± 1.8 (min-max, 3.3-11.3)	14.7 ± 9.0	22.3 ± 9.0
Total bilirubin, umol/L	2.9 ± 0.8 (min-max, 1.3-4.7)	2.7 ± 0.4	3.4 ± 0.8 (p < 0.05)
Necrosis, Hepatocyte (MI-SL)	0 / 35	0 / 5	3 / 5 (p < 0.05)

* **Аспект влияния растворителя (использовался сложный растворитель)**

Аспект ИКД: Контроль качества и надежности исследования

- **Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test (OECD 474)**
- **DNA Comet Assay Test (OECD 489)**

Согласно критериям руководства ОЭСР №. 474 (ГОСТ 34660-2020), тест считается приемлемым, если:

- 1) Выбор максимальной дозы для введения обоснован; использована максимально возможная или лимитированная доза и, по крайней мере, две дополнительные дозы с соответствующим интервалом.
- 2) Проанализировано соответствующее количество клеток.
- 3) В группе положительного контроля со стандартным мутагеном, рекомендуемым руководством OECD 474 (ГОСТ 34660-2020), должно быть получено статистически значимое отличие от группы отрицательного контроля ($p < 0.05$).
- 4) **Данные группы отрицательного контроля соотносятся с данными исторического контроля лаборатории.**

Исторические контрольные данные по встречаемости микроядерных ПХЭ в костном мозге мышей ICR (данные ЦБИ ИБХ РАН)

Критерии ИКД: Важен возраст животных!

	ИКД Контроль (-)	ИКД Контроль (+) Циклофосфамид 50 мг/кг	Исследование		
			Контроль (-)	Препарат	Контроль (+) Циклофосфамид 50 мг/кг
Доля ПХЭ	0.51 ± 0.05 (n=47)	0.50 ± 0.03 (n=37)	0.53 ± 0.03 (n=5)	0.53 ± 0.03 (n=5)	0.54 ± 0.06 (n=5)
Количество ПХЭ с микроядрами на 4000 эритроцитов	8 ± 3	97 ± 34	12 ± 4	14 ± 4	126 ± 26
% ПХЭ с микроядрами	0.196 ± 0.085	2.420 ± 0.841	0.305 ± 0.093	0.335 ± 0.064	3.160 ± 0.644

Исторические контрольные данные в аспекте GLP

- Необходимость использования ИКД указана в нормативных руководствах
- ИКД предоставляются в отчете, и должны проверяться персоналом группы обеспечения качества
- СОП по историческим контрольным данным:
 - Принцип сбора, включения/не включения в массив
 - Вид/описательная статистика предоставления:
MEAN \pm SD, Min-Max, \pm 2*SD, N животных, N исследований
 - Период (5 лет? До начала исследования? До конца исследования?)
 - Критерии (см. слайд #4)
 - Формат: *В отчете специалиста? Отдельный обновляемый отчет/ы?*
Электронный формат?



Благодарю за внимание!