МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СОВЕТ ПО СТАНДАРТИЗАЦИИ, МЕТРОЛОГИИ И СЕРТИФИКАЦИИ
(МГС)
INTERSTATE COUNCIL FOR STANDARDIZATION, METROLOGY AND CERTIFICATION
(ISC)

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

ГОСТ ISO 10993-10— 2023

Изделия медицинские

ОЦЕНКА БИОЛОГИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ МЕДИЦИНСКИХ ИЗДЕЛИЙ

Часть 10

Исследования сенсибилизирующего действия

(ISO 10993-10:2021, Biological evaluation of medical devices — Part 10: Tests for skin sensitization, IDT)

Издание официальное

Москва
Российский институт стандартизации
2023

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 Автономной некоммерческой организацией «Институт медико-биологических исследований и технологий» (АНО «ИМБИИТ») на основе собственного перевода на русский язык англоязычной версии стандарта, указанного в пункте 5

2 ВНЕСЕН Федеральным агентством по техническому регулированию и метрологии

3 ПРИНЯТ Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации (протокол от 25 сентября 2023 г. № 165-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
Армения	AM	ЗАО «Национальный орган по стандартизации и метрологии» Республики Армения
Беларусь	BY	Госстандарт Республики Беларусь
Киргизия	KG	Кыргызстандарт
Россия	RU	Росстандарт
Узбекистан	UZ	Узстандарт

4 Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 10 октября 2023 г. № 1090-ст межгосударственный стандарт ГОСТ ISO 10993-10—2023 введен в действие в качестве национального стандарта Российской Федерации с 1 июня 2024 г.

5 Настоящий стандарт идентичен международному стандарту ISO 10993-10:2021 «Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 10. Исследования кожной сенсибилизации» (Biological evaluation of medical devices — Part 10: Tests for skin sensitization, IDT).

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

При применении настоящего стандарта рекомендуется использовать вместо ссылочных международных стандартов соответствующие им межгосударственные стандарты, сведения о которых приведены в дополнительном приложении ДА

6 ВЗАМЕН ГОСТ ISO 10993-10—2011

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»

© ISO, 2021
© Оформление. ФГБУ «Институт стандартизации», 2023



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 Нормативные ссылки 1
3 Термины и определения 2
4 Общие принципы (поэтапный подход) 3
5 Предварительная оценка 3
6 Методы исследования кожной сенсибилизации 4
7 Ключевые факторы в интерпретации результатов исследований 15
Приложение А (обязательное) Подготовка образцов для исследования кожной сенсибилизации 17
Приложение В (справочное) Метод приготовления экстрактов из полимерных исследуемых образцов 18
Приложение С (справочное) Методы сенсибилизации кожи без использования животных 20
Приложение D (справочное) Справочная информация о методах кожной сенсибилизации 33
Приложение ДА (справочное) Сведения о соответствии ссылочных международных стандартов межгосударственным стандартам 35
Библиография 36

Введение

ISO (Международная организация по стандартизации) является федерацией национальных органов по стандартизации (органов — членов ISO). Работу по подготовке международных стандартов проводят под руководством технических комитетов ISO. Каждая организация-член, заинтересованная в области деятельности, для которой создан технический комитет, имеет право быть представленной в данном комитете. Международные правительственные и неправительственные организации также принимают участие в работе ISO. ISO тесно сотрудничает с Международной электротехнической комиссией (IEC) по вопросам стандартизации электротехнической продукции.

Процедуры, примененные при разработке настоящего стандарта, а также процедуры, предназначенные для его дальнейшей поддержки, приведены в Директиве ISO/IEC, часть 1. Следует отметить необходимость различных критериев утверждения для различных видов документов ISO. Настоящий стандарт подготовлен в соответствии с редакционными правилами Директив ISO/IEC, часть 2 (www.iso.org/directives).

Следует учитывать, что элементы настоящего стандарта могут быть предметом патентных прав. ISO не несет ответственности за идентификацию таких прав, частично или полностью. Сведения о патентных правах, идентифицированных при разработке настоящего стандарта, указаны во введении и/или в перечне полученных ISO деклараций о патентном праве (см. www.iso.org/patents).

Любая информация о торговой марке продукции, указанной в настоящем стандарте, является информацией, приведенной для удобства пользования.

Разъяснения добровольного характера стандартов, значений конкретных терминов ISO и понятий, связанных с оценкой соответствия, а также информации о соблюдении ISO принципов ВТО по техническим барьерам в торговле (ТВТ), приведены по URL: www.iso.org/iso/foreword.html.

Международный стандарт подготовлен Техническим комитетом ISO/TC 194 «Биологическая и клиническая оценка медицинских изделий» в сотрудничестве с Техническим комитетом Европейского комитета по стандартизации (CEN) — Комитетом CEN/TC 206, «Биологическая и клиническая оценка медицинских изделий» в соответствии с Соглашением о техническом сотрудничестве между ISO и CEN (Венское соглашение).

Это пятое издание отменяет и заменяет четвертое издание (ISO 10993-10:2010), которое технически пересмотрено.

Основные изменения по сравнению с предыдущим изданием заключаются в следующем:

- данный стандарт содержит только описание исследования сенсибилизации кожи;
- приложение С о методах сенсибилизации кожи, не связанных с животным (ранее приложение D), дополнено;
- исследование на раздражение приведено в ISO 10993-23.

Перечень всех частей стандартов серии ISO 10993 приведен на официальном сайте ISO.

Отзывы и вопросы по настоящему стандарту должны быть направлены в национальные органы по стандартизации пользователя. Полный список данных органов приводится по адресу: www.iso.org/members.html.

Настоящий стандарт оценивает возможный вред при контакте с химическими веществами, выделяемыми из медицинских изделий (МИ), которые могут привести к кожной сенсибилизации.

Некоторые материалы, включенные в МИ, исследованы, и их потенциал к кожной сенсибилизации зафиксирован. В частности, существуют данные по сенсибилизирующим свойствам стоматологических материалов (см. ссылку [51]). Другие материалы и их химические компоненты не исследованы и могут вызывать нежелательный эффект при контакте с человеком. Таким образом, производитель обязан оценить каждое изделие на предмет потенциальных негативных эффектов перед его реализацией.

Традиционно исследования на мелких животных проводят перед исследованием на человеке, чтобы помочь предсказать ответ человеческого организма (справочная информация приведена в приложении D). С 2015 г. одобрено несколько методов *in chemico* и *in vitro*, а также выпущено руководство Организации экономического сотрудничества и развития (ОЭСР) по оценке потенциала химических веществ к кожной сенсибилизации [75], [79], [104]. Обзор доступных альтернативных методом исследования кожной сенсибилизации приведен в приложении С. Каждый из этих методов, разработанный для конкретного ключевого события, возможно, не будет достаточным для выводов о наличии или отсутствии потенциала химических веществ к кожной сенсибилизации и должен рассматриваться в контексте комплексных подходов, таких как комплексные подходы к исследованиям и оценке (IATA), сочетая их с другой дополнительной информацией. Необходимо обратить внимание на то, что исследования

кожной сенсибилизации *in vitro* и *in chemico* в приложении С одобрены только для чистых химических веществ, но не для МИ. Для подтверждения применимости МИ для анализа их потенциала к кожной сенсибилизации следует проводить надлежащие оценку и валидацию.

Предварительное использование методов *in vitro* рекомендовано как скрининг перед исследованиями на животных. Для сокращения числа используемых животных настоящий стандарт представляет поэтапный подход с обзором и анализом результатов исследования на каждой стадии. Предполагается, что для представления в регулирующие органы исследования кожной сенсибилизации должны быть проведены с соблюдением надлежащей лабораторной практики (GLP) или согласно ISO/IEC 17025 с учетом применения в конкретной стране и соответствовать нормам обращения с животными. Рекомендуется использовать метод статистического анализа данных по мере уместности его применения.

Настоящий стандарт включает важные инструменты для разработки безопасных продуктов и предназначен для применения специалистами, имеющими должную подготовку и опыт, способными интерпретировать надлежащим образом требования настоящего стандарта и результаты оценки каждого МИ, принимая во внимание все факторы, относительно рассматриваемого изделия и его целевого использования, обладающими современными знаниями по МИ и осуществляющими обзор научной литературы и анализ предыдущего клинического опыта.

Настоящий стандарт основан на материалах многих стандартов и руководств, включая Руководство ОЭСР, Американскую фармакопею и Европейскую фармакопею, и является основным документом для выбора и проведения исследований, позволяющих оценить реакции кожной сенсибилизации, относящиеся к безопасности медицинских материалов и изделий.

Поправка к ГОСТ ISO 10993-10—2023 Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 10. Исследования сенсибилизирующего действия

В каком месте	Напечатано	Должно быть		
Предисловие. Таблица согласования	—	Таджикистан	TJ	Таджикстандарт

(ИУС № 4 2024 г.)

М Е Ж Г О С У Д А Р С Т В Е Н Н Ы Й С Т А Н Д А Р Т

Изделия медицинские

ОЦЕНКА БИОЛОГИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ МЕДИЦИНСКИХ ИЗДЕЛИЙ

Часть 10

Исследования сенсибилизирующего действия

Medical devices.
Biological evaluation of medical devices.
Part 10. Sensitization tests

Дата введения — 2024—06—01

1 Область применения

Настоящий стандарт распространяется на медицинские изделия (МИ) и материалы, применяемые для их изготовления, и устанавливает требования к проведению исследований сенсибилизирующего действия на кожу.

Настоящий стандарт устанавливает требования:

- к проведению исследований методами *in vivo*;
- обработке и интерпретации полученных результатов.

Примечание — В приложении А приведены инструкции по подготовке образцов для проведения вышеуказанных исследований.

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы нормативные ссылки на следующие стандарты [для датированных ссылок применяют только указанное издание ссылочного стандарта, для недатированных — последнее издание (включая все изменения)]:

ISO 10993-1, Biological evaluation of medical devices — Part 1: Evaluation and testing within a risk management process (Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 1. Оценка и исследования в процессе менеджмента рисков)

ISO 10993-2, Biological evaluation of medical devices — Part 2: Animal welfare requirements (Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 2. Требования к обращению с животными)

ISO 10993-12, Biological evaluation of medical devices — Part 12: Sample preparation and reference materials (Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 12. Приготовление проб и контрольные образцы)

ISO 10993-18, Biological evaluation of medical devices — Part 18: Chemical characterization of materials (Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 18. Исследование химических свойств материалов)

Издание официальное

3 Термины и определения

В настоящем стандарте применены следующие термины с соответствующими определениями.

ISO и IEC поддерживают терминологическую базу данных, используемую в целях стандартизации по следующим адресам:

- электропедия IEC: доступна по адресу: http://www.electropedia.org/;
- платформа онлайн-просмотра ISO: доступна по адресу: http://www.iso.org/obp.

3.1 **аллерген** (sensitizer): Химическое вещество или материал, которое(ый) способно(ен) вызывать специфическую реакцию гиперчувствительности при повторном контакте с этим веществом или материалом.

3.2 **аллергический контактный дерматит** (allergic contact dermatitis): Клинический диагноз, основывающийся на наблюдаемой иммунологически опосредованной кожной реакции на химическое вещество.

3.3 **контрольный экстрагент** (blank): Экстрагент (3.17), не содержащий исследуемый образец (3.15) и подвергающийся такому же воздействию в идентичной емкости в таких же условиях, как и экстрагент с исследуемой пробой во время экстракции.

Примечание — Контрольный экстрагент предназначен для оценки возможных побочных эффектов, связанных с сосудом для экстракции, с экстрагирующей жидкостью и процессом экстракции.

3.4 **провокация** (challenge): Процесс, следующий за фазой индукции (3.8), в котором исследуется иммунологический эффект последующего воздействия на организм индуцирующего материала.

3.5 **выявление** (elicitation): Иммунологическая реакция на воздействие аллергена ранее сенсибилизированного индивидуума.

3.6 **эритема** (erythema): Покраснение кожи или слизистой оболочки.

3.7 **экстракт** (extract): Жидкость, полученная в результате экстракции исследуемого образца или контроля.

[ISO 10993-12:2021, 3.6]

3.8 **индукция** (induction): Процесс, ведущий к появлению *de novo* повышенной иммунологической активности организма после первоначального воздействия конкретного материала.

3.9 **раздражитель** (irritant): Агент, вызывающий раздражение (3.10).

3.10 **раздражение** (irritation): Локализованная неспецифическая воспалительная ответная реакция на однократное, повторное или непрерывное воздействие вещества/материала.

Примечание — Раздражение кожи является обратимой реакцией и, в основном, характеризуется такими симптомами, как местная эритема (3.6) (покраснение), отек, зуд, отслаивание, растрескивание и отшелушивание кожи.

3.11 **отрицательный контроль** (negative control): Материал и/или вещество с достаточно изученными характеристиками, которые при применении в конкретном методе исследования подтверждают воспроизводимость этого метода и соответствие отрицательного, нереактивного или минимального биологического ответов в тест-системе установленным требованиям.

Примечание — На практике в качестве отрицательного контроля используют контрольный экстрагент (3.3), экстрагент (3.17)/растворители и стандартные образцы.

[ISO 10993-12:2021, 3.10, изменено — Примечание 1 к определению заменено]

3.12 **отек (эдема)** (oedema): Увеличение объема ткани вследствие абнормальной инфильтрации жидкости.

3.13 **положительный контроль** (positive control): Материал и/или вещество с достаточно изученными характеристиками, которые при применении в конкретном методе подтверждают воспроизводимость этого метода и соответствие положительного или реактивного биологического ответа в тест-системе установленным требованиям.

3.14 **кожная сенсибилизация** (skin sensitization): Реакция гиперчувствительности замедленного типа, опосредованная Т-клетками, индуцированная низкомолекулярными химическими веществами (аллергенами), состоящая из двух фаз: индукции и выявления (элиситации).

Примечание — У человека ответная кожная реакция может проявляться как зуд, эритема (3.6), отек (эдема) (3.12), папулы, везикулы, волдыри или их комбинация. У животных реакции могут отличаться и можно увидеть только эритему и эдему.

3.15 **исследуемый образец** (test material): Материал, изделие, его часть или компонент, которые отбирают для биологического или химического исследования.

3.16 **исследуемая проба** (test sample): Материал, изделие, его часть, компонент, экстракт (3.7) или его часть, которые подвергают биологическим либо химическим исследованию или оценке.

3.17 **экстрагент** (vehicle): Жидкость, используемая для смачивания, разбавления, суспензирования, экстрагирования (3.7) или растворения исследуемого вещества/образца.

4 Общие принципы (поэтапный подход)

Доступные методы для исследования сенсибилизации разработаны специально для выявления кожной сенсибилизации. Другие типы неблагоприятных эффектов, как правило, не определяются этими исследованиями.

Настоящий стандарт требует поэтапного подхода, учитывая, что каждый этап может быть подтверждением того, что дальнейшее исследование сенсибилизации кожи не требуется:

a) обзор литературы и информации о поставщиках, содержащий оценку химических и физических свойств, а также информацию о потенциально возможном кожном сенсибилизирующем действии любого компонента МИ либо сходных по структуре химических реагентов или веществ (см. ISO 10993-1); проведение оценки риска на основе существующей информации для определения приемлемости риска кожной сенсибилизации или необходимости дальнейшего исследования;

b) дополнительная характеристика и оценка риска материала изделия по необходимости, включая химическую характеристику и анализ исследуемого образца в соответствии с общими принципами ISO 10993-18;

c) предпочтительность исследований *in vitro* и *in vivo* в соответствии с ISO 10993-2 и замена животных по мере появления новых научно подтвержденных и обоснованных, практически доступных методов *in vitro*.

Примечание — В настоящее время для обнаружения способности химических веществ вызывать кожную сенсибилизацию существует ряд одобренных и признанных на международном уровне методов *in vitro*; эти методы *in vitro* пока не одобрены для МИ. Тем не менее ведется работа по одобрению некоторых из этих методов для исследования МИ;

d) проведение исследований *in vivo* на животных только в тех случаях, когда исследуемые образцы не могут быть охарактеризованы и оценка риска не может быть осуществлена с использованием информации, полученной с помощью средств, описанных в перечислениях a), b) и c).

5 Предварительная оценка

5.1 Общие положения

Необходимо подчеркнуть, что результатом предварительного анализа может быть заключение о нецелесообразности проведения исследований на сенсибилизирующее действие.

Применимы требования, установленные в разделе 5 ISO 10993-1:2018, а также нижеприведенные.

Нестерильные образцы исследуют *in vivo* только способом аппликации, так как вероятность микробной контаминации исследуемого образца может затруднить интерпретацию результата. В тех случаях, когда стерильность исследуемого образца не может быть гарантирована, но образец тем не менее считают не контаминированным, может быть использовано интрадермальное введение.

5.2 Виды материалов

5.2.1 Первоначальная оценка

Необходимо учитывать, что в процессе изготовления и сборки МИ в качестве технологических веществ могут быть использованы дополнительные химические компоненты, например смазочные материалы или антиадгезивные добавки. Кроме того, в химических компонентах исходного материала и технологических веществ, в конечной продукции могут присутствовать остаточные количества адгезивов, растворителей и стерилизующих агентов, а также продуктов реакции, образующихся в процессе стерилизации. Степень риска при использовании данных компонентов можно определить посредством

показателей выщелачивания или деградации готовых изделий. Должны быть идентифицированы те химические компоненты, которые могут вызвать кожную сенсибилизацию.

5.2.2 Керамики, металлы и сплавы

Данные материалы, как правило, менее сложны относительно входящих в их состав химических веществ по сравнению с полимерами и материалами из биотканей.

5.2.3 Полимеры

Как правило, данные материалы имеют более сложный химический состав по сравнению с описанием, приведенным в 5.2.2. Может присутствовать целый ряд реакционно активных продуктов/примесей/добавок/остаточного катализатора; степень или масштаб полимеризации может варьироваться.

5.2.4 Материалы из биологических тканей

Данные материалы сложны по своему составу. Биологические материалы часто содержат остаточные количества технологических веществ (например, сшивающие и антимикробные агенты). Образцы одного биологического материала могут отличаться друг от друга.

Методы, приведенные в настоящем стандарте, разработаны не для исследования биотканей, поэтому их результаты могут быть неадекватными. Например, методы, представленные в настоящем стандарте, не учитывают межвидовой сенсибилизации.

5.3 Информация о химическом составе

5.3.1 Общие положения

Должен быть полностью определен качественный и количественный химический состав материала. Если количественные данные не получены, то обоснование этого должно быть документировано.

5.3.2 Существующие источники данных

Качественная и количественная информация о составе по возможности должна быть получена от поставщика или изготовителя исходного материала.

Для полимеров часто требуется доступ к информации, защищенной правами на интеллектуальную собственность; для этого необходимо положение о передаче и использовании такой конфиденциальной информации.

Качественная информация о добавках, используемых в процессе обработки (например, антиадгезивные добавки), также должна быть получена от компетентных представителей производственной цепочки, включая переработчиков и производителей компонентов.

При отсутствии сведений о составе МИ рекомендуется проведение обзора литературы для установления вероятной природы исходного материала и любых добавок, чтобы помочь в выборе наиболее подходящих методов анализа для исследуемого материала.

Химический состав готовых изделий определяют в соответствии с ISO 10993-18.

Примечание — Состав керамики, металлов и сплавов должен быть указан в соответствии с международными стандартами ISO или ASTM (Американского общества по испытанию материалов) и/или может быть определен пользователем. Однако необходимо получить полные и детальные данные о качественном и количественном составах исходного материала от его поставщика или изготовителя, а также сведения от производителей компонентов о дополнительных веществах, используемых в процессе обработки. При доступности базовые файлы регуляторов также могут быть использованы. Материалы из мастер-файла (досье), хранящиеся в контролирующих органах, являются еще одним источником данных, где они доступны.

6 Методы исследования кожной сенсибилизации

6.1 Выбор методов исследований

Разработаны альтернативные подходы к методам *in vitro* и химическим методам для чистых химических веществ с использованием комбинации различных проб для идентификации кожных аллергенов. Некоторые из этих методов включены в руководства по исследованиям ОЭСР (TG 442C [75], TG 442D [79] и TG 442E [104]) или в программу руководства по исследованиям ОЭСР [121] (см. приложение С).

Пробы, описанные в данных руководствах к исследованиям, охватывают три ключевых момента недавно определенного процесса с неблагоприятным исходом (АОР) для сенсибилизации кожи, включая момент молекулярной инициации (связывание белков), индукцию воспаления и активацию дендритных клеток. Эти методы исследования, разработанные для конкретного ключевого момента,

по отдельности могут не являться достаточными для выводов о наличии или отсутствии потенциала химических веществ к сенсибилизации кожи и должны быть рассмотрены в контексте интегрированных подходов, таких как IATA, сочетая их с другой дополнительной информацией.

В соответствии с ISO 10993-2 такие интегрированные подходы следует учитывать при оценке способности к кожной сенсибилизации неразбавленных химических веществ. Являются ли такие подходы также применимыми к МИ или к экстрактам из МИ, пока неизвестно. Обзор существующих альтернативных исследований сенсибилизации кожи для неразбавленных химических веществ, представлен в приложении С.

На данный момент доступны три метода для определения сенсибилизирующего действия химических веществ на кожу животных. Они включают два метода на морских свинках и один метод на мышах. Проводят исследования методом максимизации на морских свинках (GPMT) и методом закрытых накожных аппликаций [проба Бюлера (Buehler)], из которых наиболее чувствителен метод максимизации [9]. Метод закрытых накожных аппликаций подходит для продуктов местного применения.

Местная проба на лимфатическом узле мыши (LLNA) является принятым на международном уровне методом, включенным в руководства к исследованию ОЭСР в 2010 г. [33] для испытаний отдельных химических веществ. LLNA является единственным альтернативным методом испытаний на морских свинках и стал предпочтительным методом для исследований химических веществ *in vivo* (см. [19] и [32]). В некоторых случаях может быть необходимо проведение исследований на морских свинках для оценки сенсибилизирующего действия отдельных исследуемых образцов.

Это относится к тем металлам (см. [44]), которые могут показать ложноположительные результаты, а также к тем веществам с высокой молекулярной массой, которые не проникают через кожу, или к веществам, не растворимым в рекомендуемых экстрагентах.

Примечание — Все три метода на животных разработаны для определения сенсибилизирующего действия химических веществ на кожу, таких как контактный дерматит, гиперчувствительность замедленного (IV) типа.

С учетом требований ISO 10993-2 относительно бережного отношения к животным предпочтительно использовать метод LLNA при проведении пробы *in vivo*. Кроме того, LLNA по сравнению с другими пробами дает объективные количественные данные.

6.2 Анализ локальных лимфатических узлов на мышах

6.2.1 Принцип

После местной обработки исследуемой пробой тыльной поверхности ушей измеряют степень пролиферации лимфоцитов в лимфатических узлах, дренирующих места нанесения (уши). Увеличение клеточной пролиферации в три раза или более по сравнению с контролем является пороговым критерием для определения исследуемого образца как аллергена.

При исследовании химических веществ необходимо выполнять пробы LLNA с использованием метода «доза—ответ». Для готовых продуктов/МИ может быть достаточным испытать только неразведенный экстракт.

Примечание — Ссылки с [15]—[44] содержат репрезентативные публикации по тесту LLNA. Лабораториям, проводящим пробу, рекомендуется ознакомиться с соответствующими доступными статьями.

6.2.2 Приготовление пробы

Исследуемый образец должен быть жидкостью, суспензией, гелем или пастой, чтобы его можно было нанести на ухо мыши. По возможности должна быть исследована серия доз (разведений). В противном случае следует использовать наивысшую концентрацию, приготовленную как химический раствор, суспензия или экстракт. При обнаружении сильной ответной реакции с экстрактом методом LLNA может потребоваться последующее исследование с различными дозами (разведениями) для того, чтобы оценить способность экстракта вызывать кожную сенсибилизацию. Системная токсичность и чрезмерное местное кожное раздражение могут сделать результаты исследования недействительными; таким образом, следует избегать таких реакций. В определенных случаях может стать необходимым предварительное исследование.

Наиболее часто используемым растворителем для соединений/химических веществ является смесь ацетона с оливковым маслом (АОО) в соотношении 4:1. Жидкие образцы, являющиеся гидрофильными и/или неплотно прилегающими к коже уха, должны быть модифицированы для стойкого контакта к месту испытания. Это достигается добавлением таких загущающих веществ, как карбоксилметилцеллюлоза, или гидроксиэтилцеллюлоза (с плотностью 0,5 %), или поверхностно-активное веще-

ство (сурфактант) Pluronic® L92[1)] с объемной долей в 1 %. Для водорастворимых химических веществ более предпочтительны диметилсульфоксид (DMSO) или диметилформамид (DMF), чем сурфактант Pluronic® L92 [34]. Как альтернативу можно использовать другие экстрагенты [33]. Эффект от введения добавок в экстрагирующую среду и/или изменения состава экстрагента должны быть обоснованы и отражены документально. Для этого следует провести эксперименты с применением веществ от слабого до умеренного сенсибилизирующего действия, также часто используемых как положительные контроли. Кроме того, может быть выполнено введение положительного контроля в исследуемый образец с целью демонстрации того, что тест LLNA все еще способен обнаружить присутствие потенциальных кожных сенсибилизаторов в приготовленном экстракте. Методы экстракции описаны в ISO 10993-12.

Для каждого ежедневного нанесения необходимо приготовить отдельный экстракт.

Примечание — Возможный метод экстракции для полимеров приведен в приложении В.

6.2.3 Животные и условия содержания

Следует использовать здоровых небеременных самок мышей линий CBA/Ca, CBA/J или BALB/c, если не утверждена другая линия [33], [41] и [42]. Другие линии мышей также являются приемлемыми (DBA/2, B6C3F1) [35]. Мыши должны быть в возрасте от 7 до 12 нед; мыши в каждом исследовании должны быть одного возраста (в диапазоне 1 нед).

Содержание и выбор животных должны быть в соответствии с ISO 10993-2. Мыши, акклиматизированные в лаборатории, должны быть индивидуально идентифицированы. Для некоторых исследуемых образцов может потребоваться отдельное размещение. Это должно быть обосновано и отражено документально.

Животные должны быть индивидуально идентифицированы методами, исключающими перфорацию ушей или меток на них.

При групповом размещении необходимо принять во внимание перекрестную контаминацию и употребление нежелательных продуктов.

6.2.4 Процедура исследования

Для химических веществ тест LLNA, как правило, проводят по методу «доза—ответ». Для твердых МИ исследуемые образцы должны быть экстрактами. В этих случаях исследуется единственная доза. Как правило, экстракт можно исследовать неразбавленным. Тем не менее, когда экстракт содержит высокотоксичные компоненты, это может привести к отрицательному результату теста LLNA. Таким образом, при исследовании цитотоксических экстрактов (см. ISO 10993-5) рекомендуется проводить тест LLNA методом «доза—ответ» и с разбавлением экстракта. Дополнительно, при обнаружении внушительного ответа на пробу LLNA возможно проведение последующего ответа на дозу для оценки возможного сенсибилизирующего действия экстракта.

Для обеспечения воспроизводимости и чувствительности исследовательская лаборатория должна включать испытания вещества положительного контроля сенсибилизации кожи для валидации тест-системы и демонстрации положительного ответа. Известные контактные аллергены от слабого до умеренного сенсибилизирующего действия (например, меркаптобензотиазол, гексил коричный альдегид или бензокаин) могут быть использованы в качестве положительного контроля. Приведенные примеры могут не подходить к каждому экстрагенту при приготовлении образца (например, экстрагенту на водной основе). В таких случаях можно выбрать другой положительный контроль. ASTM F2148 указывает на то, что при таких обстоятельствах в качестве положительных контролей следует применять формалин и 2,4-динитрохлорбензол (DNCB). Это должно быть обосновано и отражено документально.

Рекомендуется одновременное включение группы положительного контроля, но возможна ситуация, когда достаточно проведение периодического испытания (т. е. при интервалах ≤ 6 мес) исследуемого вещества с положительным контролем. Это относится к лабораториям, которые выполняют тест LLNA регулярно (не менее чем один раз в месяц) и имеют архивную базу данных положительного контроля, демонстрирующую способность лаборатории получать воспроизводимые и точные значения с положительным контролем. Адекватное владение методами LLNA может быть продемонстрировано путем получения последовательных положительных результатов с положительным контролем по крайней мере в 10 независимых исследованиях, проведенных в течение разумного приемлемого периода времени (т. е. менее одного года).

[1)] Pluronic® L92 является примером коммерчески доступного подходящего продукта. Данная информация приводится для удобства пользователей настоящего стандарта и не является рекламой ISO означенного продукта.

Индивидуальные массы тела должны быть зарегистрированы в начале и в конце исследования. Для выявления потенциальной токсичности исследуемого образца в течение исследования необходимо проводить и регистрировать клиническое наблюдение.

Использование положительного контроля только один раз каждые 6 мес может иметь последствия для результатов, полученных в предыдущий шестимесячный период, если этот положительный контроль показывает отрицательный результат. В [33] отмечается, что периодическое исследование вещества положительного контроля (т. е. при интервалах ≤ 6 мес) должно быть выполнено в лабораториях, регулярно проводящих LLNA (не менее одного раза в месяц) и имеющих опыт и документально подтвержденные навыки получения воспроизводимых результатов с положительными контролями. Следует учитывать, что решение проводить положительный контроль только периодически, а не одновременно с испытаниями может вызвать трудности с адекватностью и приемлемостью отрицательных результатов исследования, полученных без одновременного положительного контроля в течение интервала между каждым периодическим исследованием положительного контроля. Например, если при периодическом исследовании положительного контроля получен ложноотрицательный результат, все отрицательные результаты исследуемого вещества, полученные в интервале между последним приемлемым периодическим исследованием положительного контроля и неприемлемым периодическим исследованием положительного контроля, могут быть под вопросом. Для демонстрации того, что предыдущие отрицательные результаты исследуемого вещества приемлемы, от лаборатории может потребоваться повторить проведение всех отрицательных исследований, что вызовет дополнительные расходы и привлечение большего количества животных.

6.2.5 Опытная группа

При проведении LLNA для оценки должны быть доступны данные по меньшей мере пяти мышей на группу. Реакции лимфатических узлов определяют либо индивидуальными измерениями, либо измерением объединенных образцов лимфатических узлов. Для статистического анализа предпочтительнее выполнение индивидуальных измерений.

Когда для оценки доступна только одна доза, например экстракт, для измерения индивидуальных реакций следует использовать минимум пять мышей для каждой группы.

Группы распределяются:

- на группу контроля каждого используемого экстрагента (см. приложение А);
- если применимо, группа положительного контроля для каждого используемого экстрагента;
- опытную группу для каждого экстракта.

При исследовании отдельного химического вещества или соединения LLNA следует проводить методом «доза—ответ». Для других типов испытаний и образцов, таких как экстракты, оценка зависимости дозы от воздействия может оказаться не выполнимой. Использование только одной опытной группы должно быть обосновано и отражено документально.

Примечание — Когда собрано достаточно данных для доказательства постоянства дозового ответа положительного контроля, одна доза может быть включена для демонстрации чувствительности пробы [32].

Соответствующий образец следует наносить на тыльную сторону обоих ушей выбранных мышей в дозе 25 мкл/сут три дня подряд. Каждый день необходимо наблюдать состояние поверхности ушей на предмет признаков раздражения, которые могут помешать интерпретации результатов (см. [23], [27], [29]).

6.2.6 Определение клеточной пролиферации и приготовление образцов тканей

Пролиферирующие клетки в дренирующих ушных лимфатических узлах могут быть помечены либо радиоактивной, либо флуоресцентной меткой. Как правило, используемыми радиометками являются ^{3}H-метилтимидин и ^{125}I-йододеоксиуридин, а для флуоресценции можно использовать флуородеоксиуридин.

Через (72 ± 2) ч после последней обработки места нанесения измеряют массу тела каждой мыши и вводят внутривенно метку для анализа пролиферации клеток. Вводят фосфатно-буферный соляный раствор (PBS) 0,25 мл, содержащий 20 мкКи (740 KBq) единиц радиоактивности ^{3}H-метилтимидина всем исследуемым и контрольным мышам через хвостовую вену. Для ^{125}I-йододеоксиуридина вводят 0,25 мл PBS, содержащего 2 мкКи (74 KBq), а для флуородеоксиуридина — 0,25 мл PBS, содержащего 10^{-5} моль/л в хвостовую вену [33].

Доступны и должны быть рассмотрены другие альтернативные процедуры, не требующие радиометок [например, определение аденозинтрифосфатом (ATP) (метод DA) (OECD TG 442A [122]), определение бромодеоксиуридидом BrdU (метод ELISA или FCM) (OECD TG 442B [123]].

Примечание — Для дополнительной информации см. [33], [36], [42], [43] и [49].

Мышей усыпляют через (5 ± 0,75) ч после введения меченого раствора согласно ISO 10993-2. Удаляют ушной дренирующий лимфатический узел. Избегают перекрестной контаминации образцов ткани. Могут быть объединены лимфатические узлы каждой группы или пары лимфатических узлов каждого отдельного животного. Предпочтительно получать данные от каждого индивидуального животного, так как это учитывает их вариабельность между каждым животным в группе. Одноклеточные препараты готовят осторожным продавливанием лимфатических узлов через сетку 200 мкм из нержавеющей стали или нейлона над контейнером. Промывают сито охлажденным PBS в контейнер для удаления клеток из сетчатого фильтра. Таким образом контейнер содержит препарат клеток. Препараты клеток дважды промывают центрифугированием и ресуспендированием в PBS. Клетки осаждают 5 %-ной трихлоруксусной кислотой (TCA) при температуре (4 ± 2) °C на (18 ± 1) ч. После центрифугирования осадок ресуспендируют в 1 мл TCA и переносят в сцинтилляционные флаконы, содержащие 10 мл сцинтилляционной жидкости для ^{3}H-подсчета, или на гамма-счетчик для ^{125}I-подсчета (см. [21], [35] и [36]).

Примечание — В качестве альтернативы мечение клеток и анализ пролиферации клеток могут проводить *ex vivo* (см. [37] и [38]).

6.2.7 Результаты и их интерпретация

Измеряют уровень радиоактивности в клетках лимфатических узлов в единицах количества в минуту на мышь (cpm/мышь) с последующим преобразованием количество в минуту (cpm) в распад в минуту (dpm). Вычисляют среднее и стандартное отклонение dpm для по меньшей мере трех показателей для каждого животного или для каждой группы мышей. Из каждого полученного результата следует вычесть значение фоновой величины.

При использовании метода индивидуальной пробы также вычисляют среднее и стандартное отклонения dpm для каждой группы из пяти мышей. Определяют индекс стимуляции (SI) путем деления полученного среднего значения dpm исследования на значения dpm для внутреннего контроля используемого экстрактанта. Значение SI, равное трем или более (≥ 3,0), считают положительным для определения исследуемого образца как сенсибилизатора (см. ссылку [16]).

Для положительных контрольных образцов значения SI должны более или равны 3,0.

Для достоверного исследования положительный контроль следует проводить либо одновременно, либо в течение предшествующих 6 мес [33].

6.2.8 Отчет об исследовании

Отчет об исследовании должен включать:

a) описание исследуемого материала/ов или изделия;

b) предназначенное использование/применение исследуемого материала или изделия;

c) примененный международный стандарт (включая год его публикации);

d) подробное описание метода, использованного при подготовке исследуемой пробы или исследуемого образца или изделия;

e) описание экспериментальных животных;

f) способ нанесения пробы на уши;

g) описание метода определения клеточной пролиферации;

h) любые отклонения от процедуры;

i) записи наблюдений, включая клинические и массу тела;

j) оценку результатов, включая положительный контроль;

k) дату исследования.

6.3 Исследование на морских свинках для выявления кожной сенсибилизации

6.3.1 Принцип

В настоящее время используют две пробы на морских свинках для определения сенсибилизирующей активности химических веществ и МИ — проба Бюлера (Buehler) и GPMT. Обе пробы состоят из индукционных и провокационных фаз, охватывая тем самым все стадии гиперчувствительности.

6.3.2 Выбор концентраций исследуемой пробы

Данные методы для исследования потенциального сенсибилизирующего действия простых химических веществ рекомендованы только для одного значения концентрации на каждое исследование.

Примечание — Возможный метод экстракции для полимеров приведен в приложении B.

6.3.3 Фаза индукции

Скорость сенсибилизации в большой степени зависит от индукционной дозы, которая в пробах на морских свинках должна по возможности вызывать раздражение от слабого до умеренного. Если порог раздражения кожи не достигнут, то выбирают более высокую концентрацию, которая при этом не должна сказываться на здоровье животного. Индукционную дозу в пробах на морских свинках, как правило, выбирают на основе предварительных экспериментов, как описано в индивидуальных пробах на морских свинках (см. 6.5.4.2). Неразбавленные экстракты на основе стандартных растворителей не нуждаются в предварительных исследованиях.

6.3.4 Фаза провокации

Концентрацию провокационной пробы в исследованиях на морских свинках также определяют в ходе предварительных экспериментов на животных, ранее не подвергавшихся воздействию исследуемого материала. Следует использовать наивысшую нераздражающую дозу, определенную предварительными оценками. Рекомендуется применять более чем одну концентрацию для провокационной пробы для того, чтобы упростить оценку результатов.

6.4 Важные факторы, влияющие на результат исследования

Биохимические и физические характеристики исследуемой пробы могут повлиять на выбор исследования, так как метод максимального воздействия требует внутрикожного введения. Если исследуемую пробу не допускается вводить внутрикожно, то необходимо использовать альтернативный метод (т. е. местное нанесение). Экстракты следует подготавливать в асептических условиях. Нестерильные пробы должны быть исследованы только местным нанесением, так как вероятность микробной контаминации исследуемой пробы может затруднить интерпретацию результатов. В тех случаях, когда стерильность исследуемой пробы не может быть гарантирована, но пробу считают неконтаминированной, может быть обосновано внутрикожное введение.

Выбор экстрагента влияет на биодоступность исследуемого образца. Хотя не существует оптимального экстрагента для всех материалов, следует выбирать экстрагент, который оптимизирует экстракцию за счет растворимости и проникновения. Концентрация исследуемой пробы должна быть максимально возможной, но не оказывать влияния на интерпретацию результатов. Большинство исследователей предпочитает исследуемую пробу в виде раствора, потому что дисперсии склонны к образованию осадка, что затрудняет точное дозирование. Примерами экстрагента для внутрикожной инъекции служат солевой раствор, пропиленгликоль и растительное масло.

Расхождение в результатах, полученных разными лабораториями, возможно по нескольким причинам. Следующие факторы являются существенными в процедуре испытаний:

- условия окружающей среды;
- место воздействия на животном;
- метод удаления волос (стрижка/бритье или химическая депиляция);
- тип конструкции подушечки;
- количество исследуемого образца;
- уровень окклюзии;
- время экспозиции и осмотр животных.

Реактивность животных также изменяется в зависимости от генетических факторов и условий содержания.

Сравнение количества подопытных животных с положительной реакцией на провокацию с животными соответствующих контрольных групп является ключевым для указания на положительный результат исследования, при этом степень реакции помогает интерпретировать результаты. Пограничные реакции на провокацию более всего разрешаются повторным исследованием. Гистопатологические исследования, как показано, не помогают в оценке результатов.

Чтобы гарантировать воспроизводимость и чувствительность, испытательная лаборатория должна также исследовать вещества положительного контроля для валидации тест-системы и демонстрации положительного ответа. Предпочтительно, чтобы положительные контроли являлись контактными аллергенами в диапазоне от слабого до умеренного (например, меркаптобензотиазол, гексилкоричный альдегид и бензокаин). Тем не менее при демонстрации стабильности в течение продолжительного периода 6 мес или более необязательно включать положительный контроль в каждую пробу, а можно проводить его с регулярными интервалами, не превышающими 6 мес. В исследованиях на морских свинках в группе положительного контроля, как правило, используют десять животных. Возможно использова-

ние меньшего количества животных, если исследование с веществом положительного контроля проводится чаще чем один раз в каждые 6 мес. Следует использовать по меньшей мере пять подопытных животных с положительным веществом и пять контрольных животных [1].

Примечание — Для получения положительного ответа можно использовать растворы аллергенов, от умеренных до сильных [например, формальдегид и динитрохлорбензол (DNCB)]. Тем не менее это не гарантирует, что анализ может идентифицировать ответные реакции на слабые аллергены в экстрактах из МИ.

6.5 Метод максимизации на морских свинках

6.5.1 Принцип

Проводят оценку потенциальной способности исследуемого образца вызывать кожную сенсибилизацию на морских свинках, используя метод максимального сенсибилизирующего воздействия на морских свинках, применяемый для однокомпонентных химических веществ.

6.5.2 Приготовление исследуемой пробы

Исследуемую пробу готовят в соответствии с приложением А. Концентрация исследуемой пробы должна быть максимально возможной, но не влиять на интерпретацию результатов (см. 6.5.4.2).

Примечание — Возможный метод экстракции для полимеров приведен в приложении В.

6.5.3 Животные и условия их содержания

Следует использовать здоровых молодых половозрелых морских свинок-альбиносов одной аутбредной линии, любого пола, массой 300—500 г до начала исследования. Если используют самок, то они должны быть не рожавшими и не беременными.

Акклиматизацию и содержание животных осуществляют в соответствии с ISO 10993-2. Предварительные исследования, по необходимости, должны быть выполнены на одной группе животных для определения оптимальных концентраций для исследования (см. 6.5.4.2).

Для исследования порошкообразных или жидких материалов не менее 10 животных должны быть обработаны исследуемой пробой и не менее пяти животных должны быть в контрольной группе. При необходимости для предварительных исследований используют дополнительное количество животных.

При исследовании экстрактов также используют не менее 10 животных для каждого экстракта, и не менее пяти морских свинок в группе для контрольного раствора. При необходимости предварительных исследований используют дополнительное количество животных.

Если исследование на 10 опытных и пяти контрольных животных дает полностью отрицательные результаты, то маловероятно, что дальнейшее исследование на еще 10 опытных и пяти контрольных животных приведет к положительным результатам. Однако при развитии каких-либо сомнительных реакций необходимо провести повторную провокацию (см. 6.5.6). Если сомнительные реакции остаются, то проводят новое исследование по меньшей мере на 20 опытных и 10 контрольных животных.

6.5.4 Процедура исследования

6.5.4.1 Подготовка

До начала исследования шерсть на участках нанесения исследуемой пробы на кожу тщательно выстригают.

6.5.4.2 Предварительные исследования

Предварительные исследования предназначены для того, чтобы определить концентрацию пробы, которая будет использована в основном исследовании (см. 6.5.4.3).

Неразведенные экстракты при использовании стандартных растворителей (например, физиологический раствор или растительное масло) не требуют предварительного исследования.

Для местного нанесения пропитывают подходящую фильтровальную бумагу, или впитывающую марлевую подушечку (от 4 до 8 $см^2$), или камеру с исследуемым образцом и накладывают подушечку на выстриженный участок кожи под окклюзионной повязкой, закрепленной бинтом или попонкой и обернутой вокруг туловища животного.

При обертывании животного для фиксации окклюзионной повязки необходимо убедиться в том, что она не препятствует нормальному дыханию животного. Предпочтительно адаптивное обертывание, которое должен делать специально обученный персонал.

Местно наносят различные разведения исследуемой пробы на бока по меньшей мере двух животных. Через 24 ч удаляют окклюзионные повязки и подушечки, оценивают состояние участков нанесения на наличие эритемы и отека, используя шкалу оценки Магнуссона и Клигмана, приведенную в табли-

це 1. Также возможно исследование растворения объекта внутрикожной инъекцией при использовании нетрадиционных растворителей.

Возможно разбавление пробы для внутрикожной инъекции с использованием нестандартных растворителей.

Для местной фазы индукции в основном исследовании выбирают наиболее высокую концентрацию, которая вызывает эритему от слабой до умеренной и не оказывает общего отрицательного воздействия на животных в соответствии с ISO 10993-2. Необходимо помнить, что для экстрактов из МИ может быть не получен порог раздражения. В таких случаях необходимо использовать наивысшую возможную концентрацию, например неразведенный экстракт. Для конечных продуктов/МИ достаточно исследовать только неразведенный экстракт.

Для провокационной фазы в основном тесте выбирают наивысшую концентрацию, которая не вызывает эритемы (см. таблицу 1).

Таблица 1 — Шкала Магнуссона—Клигмана

Реакция на аппликацию подушечки	Шкала оценки, баллы
Отсутствие видимых изменений	0
Дискретная или фрагментарная эритема	1
Умеренная и сплошная эритема	2
Интенсивная эритема и/или отек	3

Должно быть рассмотрено предварительное введение полного адъюванта Фрейнда (FCA) всем животным.

6.5.4.3 Основное исследование

6.5.4.3.1 Внутрикожная индукционная фаза

Каждому животному в выстриженные внутрилопаточные участки кожи (A, B и C) в соответствии с рисунком 1 проводят парные внутрикожные инъекции в объеме 0,1 мл каждого из нижеперечисленного:

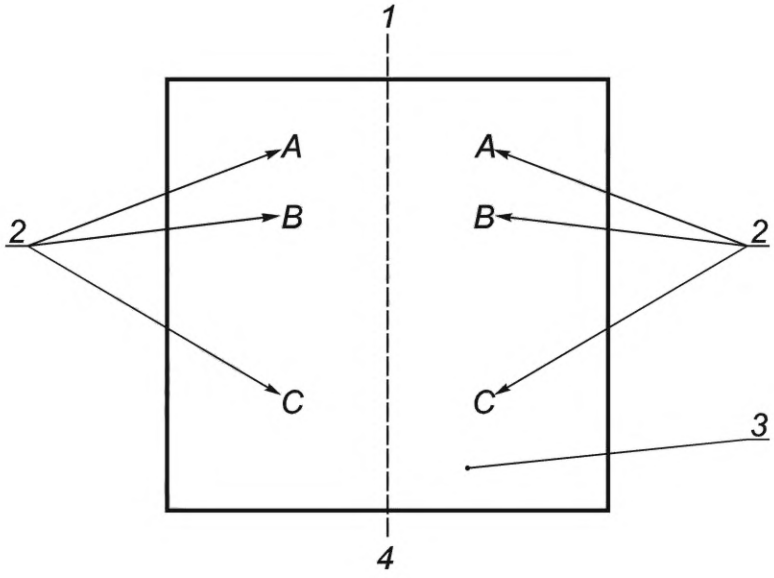
- участок A: смесь стабильной эмульсии полного адъюванта Фрейнда с выбранным растворителем в соотношении *V/V* = 50/50. Применяют физиологический раствор (BP, USP или эквивалентный) или экстрагирующую жидкость/растворитель;
- участок B: исследуемый образец (неразведенный экстракт); контрольным животным вводят только экстрагент/растворитель;
- участок C: исследуемая проба в концентрации, выбранной для участка B, эмульгированная со стабильной эмульсией полного адъюванта Фрейнда и экстрагирующей жидкостью/растворителя (раствор, примененный на участке A) в соотношении *V/V* = 50/50; контрольным животным вводят эмульсию экстрагирующей жидкости/растворителя с адъювантом (контроль экстрагента).

6.5.4.3.2 Местная индукционная фаза

Через (7 ± 1) сут после внутрикожной индукционной фазы начинают накожные аппликации исследуемой пробы на внутрилопаточную область каждого животного, используя подушечку площадью примерно 8 $см^2$ (фильтровальная бумага или марля), чтобы покрыть участки внутрикожной инъекции (см. рисунок 1). При этом используют концентрацию, выбранную в процессе предварительного исследования при местном нанесении (если проводили, см. 6.5.4.3.1). Если максимальная концентрация, которая может быть достигнута в 6.5.4.3.1, не вызывает раздражения, то предварительно обрабатывают область аппликации 10 %-ным раствором натрия додецилсульфата (SDS), втерев его в кожу за (24 ± 2) ч до аппликации. Какие-либо остатки SDS должны быть удалены до нанесения подушечек для местной индукционной фазы, так как оставшийся SDS может повлиять на абсорбцию экстракта. Фиксируют подушечки окклюзионной повязкой. Удаляют повязку и подушечки через (48 ± 2) ч.

Предпочтительны свежеприготовленные экстракты. Если экстракты хранят более чем (24 ± 2) ч, то их стабильность должна быть проверена.

Процедуру с контрольными животными повторяют в том же режиме, используя только контрольную экстрагирующую жидкость.



1 — голова; *2* — 0,1 мл внутрикожных инъекций (см. 6.5.4.3.1); *3* — выстриженная внутрилопаточная область; *4* — хвост; *A, B, C* — участки инъекции

Рисунок 1 — Расположение участков внутрикожной инъекции

6.5.4.3.3 Провокационная фаза

Для исследования провокационной фазы необходимо следовать процедуре, описанной ниже:

a) всех подопытных и контрольных животных провоцируют через (14 ± 1) сут после завершения местной индукционной фазы;

b) для неразбавленных исследуемых экстрактов с использованием стандартных растворителей (например, физиологический раствор или растительное масло):

1) как подопытных, так и контрольных животных обрабатывают исследуемыми и контрольными экстрактами или

2) контрольных животных обрабатывают неразбавленной экстрагирующей жидкостью, а опытных животных — неразбавленным исследуемым экстрактом.

Для провокационной фазы рекомендуется применение наивысшей нераздражающей концентрации исследуемой пробы. Для исследования с экстрактами из МИ предварительное исследование для определения наивысшей нераздражающей концентрации экстрактов, как правило, не проводят. Неразбавленные экстракты с использованием стандартных растворителей, как правило, не подвергают предварительному исследованию.

Применение варианта по перечислению b), 1) позволяет определить, появляется ли какая-либо кожная реакция у опытных животных из-за раздражения, а не из-за сенсибилизации. Согласно варианту по перечислению b), 1) на опытных и контрольных животных воздействуют исследуемым и контрольным экстрактами. Если наблюдаются какие-либо кожные реакции на исследуемые экстракты у контрольных животных, то реакция может быть вызвана раздражением, а не сенсибилизацией, так как контрольные животные прежде не подвергались воздействию исследуемых экстрактов.

Согласно варианту по перечислению b), 2) на контрольных животных не воздействуют испытуемым экстрактом, а на опытных животных контрольным экстрактом. В случае кожных реакций, наблюдаемых у опытных животных, с которыми не проводили предварительное исследование, для определения наивысшей концентрации экстрактов, не вызывающей раздражение, может понадобиться дополнительное исследование для исключения ложноположительного результата;

c) при использовании нестандартных растворителей на всех опытных и контрольных животных должно быть оказано воздействие исследуемыми контрольными экстрактами;

d) экстракты следует наносить местно на выбритые участки кожи, которые не были обработаны на стадии индукции, такие как верхняя часть бока каждого животного, с использованием соответствующих накладок или камер, пропитанных исследуемой пробой при концентрации, выбранной в 6.5.4.3.1 для участка *B* (см. рисунок 1). Если концентрация, выбранная в 6.5.4.3.1 для участка *B*, не является наивысшей нераздражающей концентрацией, то необходимо использовать наивысшую нераздражающую

концентрацию, определенную при предварительном исследовании (см. 6.5.4.2). Объем экстракта, используемый для пропитывания подушечек/камер, должен быть указан и обоснован;

e) подушечки/камеры должны быть зафиксированы окклюзионной повязкой;

f) повязку и подушечку удаляют через (24 ± 2) ч.

6.5.5 Наблюдение за животными

Осматривают поверхность тех участков, которые проводили провокационную пробу опытных и контрольных животных, через (24 ± 2), (48 ± 2) ч после снятия повязки. Для визуализации реакций кожи рекомендуется использовать естественное или искусственное освещение с полным спектром. Описывают и оценивают степень кожной реакции, включая эритему и отек, в соответствии со шкалой Магнуссона—Клигмана, приведенной в таблице 1, для каждого участка и в каждый интервал времени наблюдения. Настоятельно рекомендуется, чтобы описание было сделано без информации о виде обработки для исключения предвзятости в оценке результатов.

Стрижку и бритье следует проводить перед каждым шагом в процедуре исследования (см. 6.5.4.1). Тем не менее повторное бритье может быть необязательным после провокационной или повторной провокационной пробы, если животное брили за сутки до этого.

6.5.6 Оценка результатов

Если оценка в баллах по шкале Магнуссона—Клигмана, полученная в опытной группе, равна 1 или выше, то наличие сенсибилизации подтверждают в том случае, если у контрольных животных этот показатель менее 1 балла. Если оценка в баллах у контрольных животных равна 1 или выше, то реакция кожи опытных животных, которая превышает наиболее сильную реакцию, наблюдаемую в контроле, является результатом сенсибилизации. Если реакция сомнительная, то рекомендуется дополнительная провокационная проба для подтверждения результатов первой провокационной пробы. Результат исследования может быть представлен в качестве положительных результатов провокационной пробы в опытной и контрольной группах.

Иногда в опытной группе у большего, чем в контроле, количества животных выявляется ответная реакция, однако интенсивность реакции не выше, чем у контрольных животных. В этом случае проводят дополнительную провокационную пробу для получения более четкого ответа организма. При необходимости дополнительную провокационную пробу проводят в срок от 1 до 2 нед после первой провокации. При этом применяют описанный выше метод, используя другой бок животного.

6.5.7 Отчет об исследовании

Отчет должен включать следующую информацию:

a) описание исследуемого(ых) образца(ов) или изделия;

b) предназначенное использование/применение исследуемой пробы или образца;

c) примененный международный стандарт (включая год его публикации);

d) подробное описание метода, использованного при подготовке испытуемой пробы или исследуемого образца или изделия;

e) описание экспериментальных животных;

f) способ нанесения на опытные участки кожи;

g) любые отклонения от процедуры;

h) маркировку опытных участков кожи и их описание;

i) данные наблюдений;

j) оценку результатов;

k) дату исследования.

6.6 Метод закрытого участка [проба Бюлера (Buehler)]

6.6.1 Принцип

Оценивают потенциальную способность исследуемого материала вызывать кожную сенсибилизацию на морских свинках.

6.6.2 Приготовление исследуемой пробы

Исследуемая проба должна быть приготовлена, как изложено в приложении А. Концентрация исследуемой пробы должна быть по возможности наивысшей, но без влияния на интерпретацию результатов (см. 6.6.4.2). Если позволяют форма и размер, то устройства для местного применения (например, электроды) могут быть использованы без приготовления пробы.

6.6.3 Животные и условия содержание

Следует использовать здоровых молодых половозрелых морских свинок-альбиносов любого пола одной аутбредной линии массой 300—500 г до начала исследования. Если используют самок, то они должны быть не рожавшими и не беременными.

Акклиматизацию и содержание животных осуществляют в соответствии с ISO 10993-2. Предварительные исследования должны быть выполнены на одной группе животных, чтобы определить оптимальные концентрации исследуемой пробы (см. 6.5.4.2).

Для исследования порошкообразных или жидких материалов используют не менее 10 животных на каждый исследуемый образец и не менее пяти животных составляют контрольную группу. Дополнительное число животных используют для проведения предварительных исследований.

При исследовании экстрактов также используют не менее 10 животных для каждого экстракта и не менее пяти морских свинок составляют контрольную группу для каждого растворителя. Дополнительное число животных используют для предварительных исследований.

Если исследование на 10 экспериментальных и пяти контрольных животных полностью отрицательное, то маловероятно, что дальнейшее исследование на 10 экспериментальных и пяти контрольных животных даст положительные результаты. Однако, если проявятся какие-нибудь неоднозначные реакции, должна быть выполнена повторная провокация (см. 6.5.6). Если сомнительные реакции остаются, то проводят новое исследование не менее чем на 20 опытных и 10 контрольных животных.

6.6.4 Процедура исследования

6.6.4.1 Подготовка

Тщательно выстригают или сбривают шерсть на всех участках нанесения перед всеми этапами тестирования.

6.6.4.2 Предварительные исследования

Предварительные исследования проводят для того, чтобы определить концентрацию исследуемой пробы, которая будет использована в основном исследовании в соответствии с 6.6.4.3.

МИ, предназначенные для местного использования, и неразведенные экстракты, полученные при использовании обычных растворителей, не требуют предварительного исследования.

Для местного нанесения пропитывают исследуемой пробой или экстрактом фильтровальную бумагу или гигроскопичную марлевую подушечку соответствующих размеров, прикладывают ее к выстриженному участку и фиксируют окклюзионной повязкой на (6 ± 0,5) ч. Чтобы обеспечить плотное прилегание исследуемой пробы к коже, животное рекомендуется фиксировать. Если используют обертывание, то его адекватность должна быть оценена в каждом эксперименте. Описывают и оценивают степень кожной реакции, включая эритему и отек, в соответствии с таблицей 1 (по классификации Магнуссона—Клигмана) для каждого участка через (24 ± 2) и (48 ± 2) ч после удаления повязки.

Местно наносят четыре концентрации исследуемой пробы на боковую поверхность тела по меньшей мере двух животных, используя соответствующие аппликации, и фиксируют окклюзионной повязкой на (6 ± 0,5) ч. Описывают и оценивают степень кожной реакции, включая эритему и отек, в соответствии с таблицей 1 (по классификации Магнуссона—Клигмана) для каждого участка через (24 ± 2) и (48 ± 2) ч после удаления повязки.

Выбирают:

a) для индукционной фазы в основном исследовании наивысшую концентрацию, которая вызывает незначительную эритему, но не оказывает общего отрицательного влияния на организм животного;

b) для провокационной фазы в основном исследовании наивысшую концентрацию, которая не вызывает эритемы.

6.6.4.3 Основное исследование

6.6.4.3.1 Индукционная фаза

Локально наносят исследуемый образец на выстриженную область левой верхней части спины каждого животного, используя соответствующие аппликации, пропитанные в исследуемой пробе, при концентрации раствора, выбранной по перечислению a) 6.6.4.2. Удаляют фиксирующие приспособления и повязку через (6 ± 0,5) ч. Повторяют эту процедуру последовательно три дня в неделю в течение 3 нед. Контрольным животным проводят все процедуры в том же режиме, используя при этом только контроль экстрагирующей жидкости.

6.6.4.3.2 Провокационная фаза

Провокационную пробу проводят через (14 ± 1) сут после последней индукционной аппликации на опытных и контрольных животных. Провокационную пробу проводят способом однократной местной аппликации на выстриженный опытный участок кожи каждого животного, используя соответствующую

исследуемую пробу в концентрации, выбранной по перечислению b) 6.6.4.2. Удаляют фиксирующие приспособления и повязку через (6 ± 0,5) ч.

6.6.5 Наблюдение за животными

При необходимости, через (24 ± 2) ч после первой или второй провокационной пробы проводят либо:

a) удаление шерсти у всех животных на опытных участках и окружающей их коже с помощью коммерчески доступного депилятора в соответствии с прилагаемой к нему инструкцией или

b) выбривание шерсти у всех животных на опытных участках и окружающей их коже.

Тщательно промывают депилированный участок теплой водой и вытирают животных полотенцем перед их возвращением в клетки.

Через (24 ± 2) ч после удаления провокационных накладок и не менее чем через 2 ч после описанной выше процедуры удаления шерсти оценивают состояние опытных участков кожи в соответствии с таблицей 1. Осмотр повторяют через (48 ± 2) ч после провокационного воздействия. Для визуализации реакций кожи рекомендуется использовать естественное или искусственное освещение с полным спектром. Чтобы исключить предвзятость в оценке результатов, рекомендуется исключить информацию о проведенных процедурах.

6.6.6 Оценка результатов

Должна быть применена шкала оценок Магнуссона—Клигмана, приведенная в таблице 1.

Если оценка в баллах, полученная в опытной группе, равна 1 или выше, то о наличии сенсибилизации говорят в том случае, если у контрольных животных этот показатель менее 1 балла. Если оценка в баллах у контрольных животных равна 1 или выше, то реакция кожи опытных животных, которая превышает наиболее сильную реакцию, наблюдаемую в контроле, является результатом сенсибилизации. Для подтверждения результатов первой провокационной пробы рекомендуют дополнительную провокационную пробу. Результат испытания может быть представлен в качестве частоты положительных результатов провокационной пробы в опытной и контрольной группах.

Иногда в опытной группе у большего, чем в контроле, количества животных выявляется ответная реакция, однако интенсивность реакции не выше, чем у контрольных животных. В этом случае проводят дополнительную провокационную пробу для получения более четкого ответа организма. При необходимости дополнительную провокационную пробу проводят в срок от 1 до 2 нед после первой провокации. При этом применяют описанный выше метод, используя другой бок животного.

Рекомендуется использовать новую отрицательную контрольную группу.

6.6.7 Отчет об исследовании

В отчет об исследовании включают следующую информацию:

a) описание исследуемого(ых) образца(ов) или изделия;

b) примененный международный стандарт (включая год его публикации);

c) предназначенное использование/применение исследуемого(ых) образца(ов) или изделия;

d) подробное описание метода, использованного при подготовке исследуемой пробы или образца;

e) описание экспериментальных животных;

f) способ нанесения на опытные участки кожи;

g) любые отклонения от процедуры;

h) маркировку опытных участков кожи и их описание;

i) данные наблюдений;

j) оценку результатов, включая статистические методы;

k) дату исследования.

7 Ключевые факторы в интерпретации результатов испытаний

Методы, включенные в настоящий стандарт, являются значимым инструментом при разработке безопасной продукции и должны быть выполнены в соответствии с надлежащими мерами контроля качества (например, ISO/IEC 17025 или GLP) при условии, что их выполняет и интерпретирует обученный персонал. Необходимо предоставить доказательства того, что люди, планирующие, проводящие и оценивающие результаты исследований, имеют соответствующую квалификацию путем подготовки и опыта к таким заданиям.

Обнаруженное любым из методов сенсибилизирующее действие не является причиной невозможности применения данного материала или изделия, так как объем образца при проведении исследований может существенно превышать объем, используемый в реальных условиях. Установленный

любым утвержденным методом отрицательный эффект свидетельствует о необходимости дальнейшего анализа, что позволит оценить риск при воздействии на человека.

Прогнозирующие результаты исследований, полученные при процедурах, описанных в настоящем стандарте, не могут быть использованы сами по себе и должны быть интерпретированы вместе с другой информацией для оценки риска реакции гиперчувствительности или других форм иммунотоксичности. Отрицательный результат не всегда исключает возможность того, что продукция может вызывать аллергическую реакцию кожи. Для обоснования результата его необходимо проверить, используя другие источники информации, такие как:

- претензии со стороны изготовителя и покупателя;
- опыт работы с изделиями, содержащими сходные составляющие;
- результаты диагностических проб в дерматологических клиниках;
- ретроспективные эпидемиологические данные.

Приложение А
(обязательное)

Подготовка образцов для исследования кожной сенсибилизации

А.1 Общие положения

При проведении исследований кожной сенсибилизации и интерпретации результатов учитывают характер, степень, продолжительность, частоту и условия воздействия МИ на человека. Одним из существенных условий проведения исследований является подготовка исследуемого образца.

А.2 Образцы для прямого контакта

А.2.1 Твердые исследуемые образцы

Твердые образцы подходящей внешней формы (лист, пленка и т. д.) исследуют, не подвергая изменениям, используя образцы размерами 2,5 × 2,5 см и толщиной, которая близка к толщине образца при его клиническом применении, но не более 0,5 см. Образцы отрицательного контроля готовят аналогичным образом. Отрицательный контроль должен быть близок по внешним параметрам к исследуемому образцу и не должен быть раздражителем. Если не удается подобрать более подходящий контроль, можно использовать впитывающую марлю как заменитель.

Твердый образец может быть измельчен (исключая возможное загрязнение) или в достаточной степени смочен водой или подходящим растворителем, не обладающим раздражающим действием, что обеспечивает более тесный контакт материала с тканями. Керамические материалы измельчают, однако следует помнить, что физико-химические свойства керамики могут измениться при ее переходе в порошкообразное состояние из-за возможного сильного воздействия на биологическую деятельность.

Порошки (например, суперабсорбенты) исследуют при непосредственном нанесении или после приготовления из них пасты с использованием подходящего растворителя, при этом параллельно с увлажненным, растворенным или суспендированным исследуемым материалом используют контроль с таким же экстрагентом.

Примечание — Площадь поверхности и/или размер частиц — существенные факторы в биологических клеточных реакциях, таких как фагоцитоз, который имеет большое значение в воспалительном и иммунном ответах.

А.2.2 Жидкие исследуемые образцы

Жидкости исследуют неразбавленными путем прямого нанесения или, если это нецелесообразно, разбавленными соответствующим растворителем. Контроль с использованием того же растворителя следует оценивать параллельно с разбавленной испытательной жидкостью.

А.3 Экстракты из исследуемых образцов

Твердые материалы исследуют, подвергая исследованию экстракты из них. Если исследуют экстракты, то они должны быть подготовлены в соответствии с ISO 10993-12, с использованием полярных, неполярных и (или) других подходящих жидкостей, если это необходимо. Выбор метода экстракции должен быть обоснован.

Параллельно с экстрактом из исследуемого образца используют контроль экстрагента.

Примечание — Для полимерных материалов возможный метод экстракции приведен в приложении В.

А.4 Экстрагенты

Если исследуемую пробу подвергают экстракции, разбавлению, суспендированию или смачиванию, следует использовать соответствующий растворитель, не обладающий раздражающим или сенсибилизирующим действием. Список соответствующих растворителей приведен в ISO 10993-12.

А.5 Стерильные исследуемые образцы

Если конечный продукт поставляют в стерильном состоянии, то перед изучением исследуемый материал подвергают стерилизации таким же методом. Существуют определенные трудности при исследовании образцов, стерилизованных окисью этилена, поскольку окись этилена и продукты ее деструкции могут оказывать биологическое действие в исследованиях, рекомендованных настоящим стандартом. При обнаружении реакции раздражения необходимо рассмотреть исследования этого ответа на изделие до и после стерилизации окисью этилена, позволяющие дифференцировать, вызвана ли обнаруженная реакция действием изучаемого материала или она обусловлена остаточным количеством окиси этилена.

Приложение В
(справочное)

Метод приготовления экстрактов из полимерных исследуемых образцов

В.1 Общие положения

В настоящем приложении приведено руководство по приготовлению экстрактов из полимерных исследуемых образцов для использования в методе максимизации на морских свинках (GPMT). Приготовление экстракта первоначально описано в [3], а дополнительная информация предоставлена в D.2 ISO 10993-12:2021.

В.2 Метод приготовления

В.2.1 Предварительная экстракция

Процедуру предварительной экстракции проводят на исследуемом образце для определения наиболее подходящего процесса экстракции для использования в GPMT.

Метанол и ацетон являются рекомендуемыми растворителями для экстракции. Исследуемый образец режут на маленькие кусочки (если возможно) и помещают в две отдельные емкости. От 10- до 20-кратного объема каждого растворителя (т. е. от 10 до 20 мл растворителя на каждый грамм исследуемого образца) добавляют в каждую емкость, емкости встряхивают при комнатной температуре для экстракции. Растворитель меняют три раза после каждой экстракции встряхиванием, например: после (4 ± 1) ч, (8 ± 1) ч или (24 ± 2) ч в течение периода от 24 до 72 ч, используя тот же объем свежего растворителя. Экстракт собирают после каждого периода экстракции в одну емкость. Растворитель удаляют выпариванием для получения осадка.

Наиболее подходящий растворитель для исследования определяют на основании массы полученного осадка. Необходимо определить процентный выход осадка. Растворитель, дающий наибольшее количество осадка, выбирают как растворитель экстракции для исследования кожной сенсибилизации.

Определяют растворимость осадка добавлением оливкового масла, ацетона, метанола или диметилсульфоксида (DMSO). Жидкость, растворяющую большую часть осадка, используют как экстрагент в методе максимизации на морских свинках (GPMT).

Примечание — Если исследуемый образец растворяется или разлагается в ацетоне или метаноле или если невозможно получить адекватное количество осадка, то в качестве растворителя экстракции можно применить *n*-гексан или 1:1 смесь циклогексана и пропанол-2.

В.2.2 Финальная экстракция

В.2.2.1 Общие положения

Существует два метода приготовления исследуемого раствора из экстракта в органическом растворителе.

Метод 1 применим, когда количество осадка, полученного экстракцией растворителем из исследуемого образца, и масса исследуемого образца относительно велики, что позволило получить достаточные количества осадка. Дополнительно метод 1 особо рекомендуется для оценки риска МИ, используемых повторно [14].

Метод 2 применим, когда количество осадка, полученного экстракцией растворителем из исследуемого образца, или масса исследуемого образца относительно малы. Примерами последнего являются контактные линзы или внутриглазные линзы.

Для методов 1 и 2, параллельно с экстракцией веществ из исследуемого образца, объем растворителя, равный общему объему, использованному во время экстракции исследуемого образца, подвергается той же процедуре концентрации, что и исследуемые экстракты. Этот контроль используется как отрицательный контроль для каждой фазы исследования.

В.2.2.2 Приготовление исследуемой пробы по методу 1

Для экстракции по методу 1 исследуемую пробу помещают в 10—20-кратный объем соответствующего экстрагента (выбранного во время предварительной экстракции) и перемешивают встряхиванием при комнатной температуре. Экстракцию проводят трижды, заменяя экстрагент и помещая его в отдельную емкость. Например, заменяют через (4 ± 1) ч, (8 ± 1) ч и (24 ± 2) ч и продолжают взбалтывать при комнатной температуре в течение периода от 24 до 72 ч в зависимости от выщелачивания и стабильности веществ, экстрагируемых из исследуемого материала.

Осадок получают выпариванием собранного растворителя. Применяют ротационный испаритель при наиболее низкой температуре, при которой возможно контролируемое выпаривание под сниженным давлением.

Осадок растворяют в соответствующем растворителе (оливковое масло/ацетон/этанол/ДМСО), выбранном при исследовании растворимости во время предварительной экстракции. Приготавливают 10 %-ный (в/в) исследуемого раствора для внутрикожной фазы индукции и 20 %-ный (в/в) для внутрикожной фазы индукции и для местной фазы индукции методом GPMT. Для провокационной фазы GPMT 10 %-ный (в/в) раствор приготовляют в растворителе. 10 %-ный раствор далее разбавляют растворителем для получения 1 %-, 0,1 %-, 0,01 %- и 0,001 %-ных исследуемых растворов.

B.2.2.3 Приготовление исследуемой пробы по методу 2

Для экстракции по методу 2 исследуемый образец помещают в 10—20-кратный объем соответствующего растворителя (выбранного во время предварительной экстракции) и встряхивают при комнатной температуре в течение (24 ± 2) ч. Растворитель собирают в одной емкости. Процедуру экстракции повторяют три раза в течение периода от 24 до 72 ч, каждый раз используя тот же объем свежего растворителя. Экстракты собирают в одной емкости и растворитель выпаривают.

Для внутрикожной индукционной фазы полученные экстракты выпаривают до тех пор, пока остаточное количество миллилитров экстракта не равняется, или слегка ниже половины первоначального количества граммов примененного образца (т. е. если экстрагированы 10 г исследуемого образца, то комбинированный экстракт растворителя выпаривают примерно до 5 мл), или полностью для получения осадка. После получения осадка его растворяют в соответствующем растворителе (выбранном во время предварительной экстракции) до 5 мл. Этот раствор считают 200 %-ным исследуемым раствором.

Дополнительно готовят 100 %-ный исследуемый раствор путем разбавления 200 %-ного исследуемого раствора растворителем.

Для местной индукционной фазы применяют 100 %-ный исследуемый раствор. Для внутрикожной и местной индукционной фазы растворитель в 200 %-ных и 100 %-ных исследуемых растворах заменяют оливковым маслом, комбинируя исследуемый раствор с равным объемом оливкового масла и выпаривая растворитель под потоком газообразного азота.

Для провокационной фазы применяют 100 %-, 50 %-, 25 %-, 12,5 %- и 6,25 %-ный исследуемые растворы. 100 %-ный исследуемый раствор разбавляют растворителем для получения 50 %-, 25 %-, 12,5 %- и 6,25 %-ного исследуемых растворов. Растворитель в исследуемых растворах не заменяют оливковым маслом для провокационной фазы.

B.3 Метод максимизации на морских свинках

B.3.1 Общие положения

Метод GPMT выполняют, как описано в 6.5, за исключением провокационной фазы, которая описана ниже. Провокационная фаза с использованием метода экстракции растворителем должна быть выполнена без окклюзионной повязки.

B.3.2 Провокационная фаза

Через 2 нед после нанесения закрытой аппликации все подопытные и контрольные животные провоцируются исследуемым образцом.

При экстракции по методу 1 0,1 мл аликвоты 10 %-ного (в/в), 1 %-ного и 0,1 %-ного исследуемых растворов наносят местно на правый бок каждого подопытного животного и животного отрицательного контроля. Дополнительно 0,1 мл аликвот 0,01 %-ного и 0,001 %-ного исследуемых растворов и растворителя положительного контроля наносят местно на левый бок каждого опытного животного и животного отрицательного контроля.

При экстракции по методу 2 0,1 мл аликвоты 100 %-ного, 50 %-ного и 25 %-ного исследуемых растворов наносят местно на правый бок каждого опытного животного и животного отрицательного контроля. Дополнительно 0,1 мл аликвоты 12,5 %-ного и 6,25 %-ного исследуемых растворов и растворителя негативного контроля наносят местно на левый бок каждого опытного животного и животного отрицательного контроля.

При экстракции по методу 1 и методу 2 животных положительного контроля обрабатывают 0,1 мл аликвоты 0,1 % DNCB (динитрохлорбензол, ДНХБ) в этаноле на правом боку и этаноле на левом боку.

Примечание — Аналогичным образом можно поступить с применением окклюзионной повязки.

Приложение С
(справочное)

Методы сенсибилизации кожи без использования животных

С.1 Введение

С.1.1 История альтернативных методов исследования кожной сенсибилизации

Попытки сократить или заменить применение животных в исследованиях токсичности привели к развитию новых методов, не связанных с животными. Так как изначально методы были приняты для тестирования химических веществ, интерес к этим новым методам для оценки безопасности лекарств и МИ вырос в последние годы. Для сенсибилизации кожи часто применяют методы исследования *in vivo* на животных и людях, так как они позволяют наблюдение неблагоприятного результата (например, аллергического контактного дерматита) на живом объекте. Тем не менее по мере развития понимания молекулярных и клеточных механизмов процесса кожной сенсибилизации разработаны методы для оценки потенциала химических веществ или материалов к кожной сенсибилизации, не связанные с животными [57]. Эти методы могут быть разделены на три категории:

- химические методы (*in chemico assays)*: исследование или процедура, связанные с присущей реактивностью материала, включающие скорее физико-химические измерения, а не биологическое тестирование;
- методы моделирования (*in silico assays*): исследование или процедура, проводимые методами компьютерного моделирования [например, такие как компьютерная модель молекулы или клетки, которая точно имитирует ее поведение, или оценка количественного соотношения структура—активность (QSAR)];
- методы *in vitro*: исследование или процедура, проводимые вне живого организма и при контролируемых условиях (например, культуры клеток в планшете).

На данный момент ни один из валидированных методов в этих категориях не способен полностью воспроизвести точную и сложную сеть механизмов молекулярного, клеточного и органного уровней, которые действуют в живых организмах.

Как следствие, каждый метод при индивидуальном рассмотрении не способен полностью воспроизвести события, приводящие к неблагоприятному результату. Скорее, прогноз потенциала к сенсибилизации кожи химическим веществом в человеке основан на механистичных подходах, сочетающих несколько анализов в стратегиях исследований [66], [70].

С.1.2 Процесс с неблагоприятным исходом (AOP), ведущим к кожной сенсибилизации

В руководстве OECD описана последовательная цепь связанных событий на молекулярном, клеточном, тканевом и органном уровнях, ведущих к кожной сенсибилизации [5].

Эта серия событий структурирована таким образом, чтобы разработать и создать подробную и стандартную картину пути, ведущего к неблагоприятному исходу, наблюдаемому во всем организме (животном или человеке).

Данную серию событий называют процессом с неблагоприятным исходом (AOP).

Процесс с неблагоприятным исходом (AOP) линейно связывает существующие знания по одной или нескольким сериям случайно связанных ключевых событий (KE) между двумя точками — молекулярное инициирующее событие (MIE) и неблагоприятный исход (AO) [56]. Процесс с неблагоприятным исходом (AOP) является центральным элементом токсикологической базы знаний, созданной для поддержки оценки химического риска, основанной на механистических рассуждениях.

Процесс с неблагоприятным исходом (AOP) для сенсибилизации кожи начинается после воздействия и абсорбции сенсибилизирующего агента. После того как агент проникает в роговой слой кожи, происходит серия событий на молекулярном, клеточном и органном уровнях, приводящая к неблагоприятной конечной точке аллергического контактного дерматита или контактной гиперчувствительности. Четырьмя ключевыми моментами для сенсибилизации кожи в AOP являются следующие:

- ключевое событие 1 — ковалентное связывание с белками кожи: молекулярное инициирующее событие после проникновения в роговой слой является необратимым формированием комплекса гаптен-белок. В живом организме это событие связано с выработкой специфичного ответа Т-клетки памяти;
- ключевое событие 2 — ответ кератиноцитов: этот ключевой момент включает активацию биохимических путей в кератиноцитах и воспалительные медиаторные ответы, а также изменения в экспрессии гена, связанные с путями клеточных сигналов, такими как элемент ответа антиоксидант/электрофил (ARE);
- ключевое событие 3 — активация дендритных клеток: подробные биохимические события после формирования комплекса гаптен-белок пока полностью не ясны. Тем не менее известно, что задействованные пути связаны с воспалением, такие как сигнальный путь протеинкиназы, активированной митогеном, и путь ответа оксидативного стресса, которые особенно фиксируются в кератиноцитах и дендритных клетках. Эффекты на клеточном и тканевом уровнях также полностью не известны, но включают эпидермальные ответы, в которые входят:

1) иммунное распознавание химических аллергенов кератиноцитами, специализированными эпидермальными дендритными клетками (т. е. клетками Лангерганса) и дермальными дендритными клетками;

2) ответы в форме экспрессии специфичных маркеров клеточной поверхности, таких как адгезивные молекулы, хемокины и цитокины, такие как IL-1β или IL-12p70, как правило, воспринимаются как свидетельство созревания дендритной клетки;

- ключевое событие 4 — пролиферация Т-клетки: на органном уровне (лимфатические узлы и кожа) ответами являются:

1) миграция дендритных клеток в лимфатический узел, где антиген представлен молекулами основного комплекса гистосовместимости (MHC) к нативным Т-лимфоцитам (Т-клеткам), и

2) дифференциация и пролиферации Т-клеток на аллергенспецифические активные Т-клетки и Т-клетки памяти.

Финальным физиологическим ответом является приобретение чувствительности; ключевым ответом организма — кожное воспаление после получения провокации веществом на фазе элиситации. Этот ответ связан со стимуляцией специфичной Т-клетки памяти, производимой на фазе индукции. Общий эффект у млекопитающих — аллергический контактный дерматит у людей или его эквивалент, контактная гиперчувствительность у грызунов [65].

С.1.3 Интегрированные подходы к исследованию и оценке

IATA являются практическими, научно-обоснованными подходами к характеристике химической опасности, которые полагаются на интегрированный анализ существующей информации в сочетании с получением новой информации посредством стратегии испытаний. Для прогноза потенциала химических веществ к кожной сенсибилизации у человека альтернативные методы, не связанные с животными, применяют в комплексе или в сочетании с имеющейся соответствующей информацией для полной характеристики биологической конечной точки. Конечная точка сенсибилизации может быть определена путем применения интегрированного подхода, когда вся существующая и надежная информация о химическом веществе или материале объединяется с данными биохимических (*in chemico*), моделируемых (*in silico*) и/или клеточных (*in vitro*) методов для адекватного прогнозирования токсичности материала или химического вещества. Иногда интегрированный подход может потребовать выработки дополнительных данных с использованием подходов, не связанных с животными, для получения полной приемлемости для прогнозирования конкретной конечной точки токсичности.

Примерами наборов для кожной сенсибилизации *in vitro* являются KeratinoSens™, LuSens, U-SENS™, набор для активации линии клеток человека (h-CLAT) и набор IL-8 Luc. Набор прямой реактивности пептидов (DPRA) — это пример для кожной сенсибилизации *in chemico*. Примерами моделируемых методов сенсибилизации *in silico* являются QSAR Toolbox и платформа моделирование TImes MEtabolism, используемая для прогнозирования сенсибилизации кожи (TIMES SS) [56], [67]. Некоторые из этих методов могут комбинироваться в IATA для оценки потенциала к сенсибилизации кожи химических веществ или материалов.

Для стандартизации оценки при помощи IATA при принятии нормативных решений OECD разработала руководство принципов и шаблонов для сообщения установленных подходов (DA) и индивидуальных источников информации [57], [67]. DA состоит из процедуры интерпретации закрепленных данных (DIP), применяемой к данным, выработанным с определенным набором источников информации для выведения результата, который может быть использован самостоятельно или вместе с другими источниками информации в IATA для удовлетворения конкретных нормативных нужд.

Для приобретения нормативной приемлемости IATA для потенциала к сенсибилизации кожи интегрированные подходы включают DA, в то время как для каждого DA четко описаны соответствующая информация и конкретные применяемые методы, не связанные с животными, а также предоставляется процедура для интерпретации данных этих обозначенных методов. Таким образом, DA являются стратегиями, основанными на правилах, которые могут исключить необходимость экспертной оценки, как только конкретный подход описан, валидирован, стандартизован и принят [61].

В руководстве OECD 256:2017, приложение I [124] (см. таблицу С.1) приведено описание 12 наглядных предметных исследований DA для сенсибилизации кожи. Некоторые из них в настоящее время рассматриваются в OECD для руководства по исследованиям «Установленные подходы для сенсибилизации кожи».

Таблица С.1 — Предметные исследования руководства ОЭСР 256:2017, приложение I [124]

Предметное исследование		Цель
I	Интегрированный подход стратегии исследования к идентификации опасности для кожи «2 из 3», основанный на цепи неблагоприятного результата (BASF)	Идентификация опасности
II	Последовательная стратегия исследования (STS) для идентификации опасности сенсибилизаторов кожи (RIVM)	Идентификация опасности
III	Конвейерный подход без тестирования для сенсибилизации кожи (Г. Патлевич)	Идентификация опасности

Окончание таблицы С.1

Предметное исследование		Цель
IV	Вертикальная мета-модель для идентификации опасности сенсибилизации кожи (L'Oréal)	Идентификация опасности
V	Стратегия интегрированного решения для опасности сенсибилизации кожи (ICCVAM)	Идентификация опасности
VI	Согласованное классификационное древо для прогноза опасности кожной сенсибилизации (EC JRC)	Идентификация опасности
VII	Прогноз потенциала сенсибилизатора, основанный на ключевом моменте 1 + 2: комбинация данных реактивности кинетических пептидов и данных KeratinoSens® (Givaudan)	Прогноз потенциала
VIII	Модель искусственной нейросети для прогнозирования LLNA EC3 (Shiseido)	Прогноз потенциала
IX	Байесовская сеть DIP (BN-ITS-3) для идентификации опасности и мощности сенсибилизаторов кожи (P&G)	Прогноз потенциала
X	STS для классификации сенсибилизирующей мощности, основанной на данных *in chemico* и *in vitro* (Kao Corporation)	Прогноз потенциала
XI	Интегрированная стратегия исследования (ITS) для классификации сенсибилизирующей мощности, основанная на данных *in silico*, *in chemico* и *in vitro* (Kao Corporation)	Прогноз потенциала
XII	DIP для оценки риска кожной аллергии (SARA) (Unilever)	Прогноз потенциала

С.2 Анализ в условиях *in vitro* для исследования кожной сенсибилизации

С.2.1 Общие положения

В С.2 приведены обобщения проб сенсибилизации кожи *in vitro*, включенные в недавние обзоры и международные исследования оценки [58], [59], [65], [68].

С.2.2 Методы испытания

С.2.2.1 DPRA

DPRA — это биохимический метод, который количественно определяет реакционную способность исследуемого химического вещества путем его истощения синтетическими пептидами, содержащими цистеин или лизин. Вычисляют значения истощения, %, и в прогностической модели классифицировано химическое вещество как сенсибилизатор или несенсибилизатор кожи (см. таблицу С.2).

Таблица С.2 — DPRA

Ключевое событие 1. Молекулярное инициирующее событие связывания ковалентного белка	
Руководство ОЭСР	Техническое руководство OECD 442C [75]
Рабочие показатели (ответ да/нет)	Точность 80 %, чувствительность 80 %, специфичность 77 %
Экспериментальная система	Концентрацию цистеина или лизина, остающегося в синтетическом пептиде, определяют после инкубации при температуре от 22,5 °С до 30 °С на 24 ч с исследуемым химическим веществом. Для помощи в обнаружении синтетические пептиды содержат фенилаланин. Концентрации пептидов измеряют высокоэффективной жидкостной хроматографией (ВЭЖХ/HPLC) с градиентной элюцией и УФ-детектированием при длине волны 220 нм
Принцип исследования	Определяют процентные показатели убывания пептидов цистеина и лизина и используют в модели прогнозирования, которая классифицирует исследуемое химическое вещество в один из четырех классов реактивности, которые разделены на сенсибилизаторов и несенсибилизаторов кожи

Окончание таблицы С.2

Ключевое событие 1. Молекулярное инициирующее событие связывания ковалентного белка	
Считывание данных	Относительные концентрации пептидов измеряют HPLC с обнаружением при длине волны в 220 нм
Время воздействия	24 ч
Применимость	Метод неприменим к тестированию металлических соединений, так как они могут вступать в реакцию с белками посредством других механизмов, кроме ковалентного связывания. Исследуемое химическое вещество должно быть полностью растворено в надлежащем растворителе при концентрации в 100 ммоль. Исследование смесей возможно, если их состав известен
Применение к МИ	Отсутствие данных. DPRA работает с ацетонитрилом, водой, изопропанолом и ацетоном. Тем не менее метод, возможно, не будет работать с неполярными растворителями МИ, такими как кунжутное, хлопковое или оливковое масло. Так как проба использует излишек химического вещества против пептидов в пробе, маловероятно, что проба подходит для обнаружения сенсибилизаторов кожи в экстрактах МИ
Примечание — См. ссылки [74]–[76].	

С.2.2.2 KeratinoSens™[1)]

Набор KeratinoSens™ использует иммортализованную линию адгезивных клеток кератиноцитов человека, содержащую репортерный ген люциферазы, контролируемый антиоксидант-ответственным элементом (ARE) гена человека AKR1C2, который повышающе регулируется сенсибилизаторами кожи (см. таблицу С.3).

Таблица С.3 — KeratinoSens™

Ключевое событие 2. Активация эпидермальных кератиноцитов	
Руководство ОЭСР	Техническое руководство OECD 442D [79]
Рабочие показатели (ответ да/нет)	Точность 77 %, чувствительность 78 %, специфичность 79 %
Экспериментальная система	Трансгенная клеточная линия KeratinoSens™: иммортализованная линия адгезивных клеток, полученная из кератиноцитов человека, стабильно накапливающих репортерный ген люциферазы, контролируемый ARE гена человека AKR1C2
Принцип исследования	Клеточная линия KeratinoSens™ содержит ген люциферазы под транскрипционным контролем конститутивного активатора, объединенного с элементом ARE. Сигнал люциферазы указывает на активацию эндогенных Nrf2-зависимых генов путем электрофильных сенсибилизаторов кожи. Индукцию гена люциферазы определяют количественно измерением люминисценции, производимой субстратами люциферазы, генерирующими свет. Исследуемые химические вещества признают сенсибилизаторами кожи, если они вызывают статистически значимое повышение в активности люциферазы (т. е. 50 %-ное увеличение) ниже концентрации, которая не вызывает значительного сокращения в активности клеток
Считывание данных	Количественное измерение (обнаружением люминесценции) индукции гена люциферазы
Время воздействия	48 ч
Применимость	Проба KeratinoSens™ применима к исследуемым химическим веществам, включающим различные органические функциональные группы, механизмы реакции, мощности сенсибилизации кожи и физико-химические свойства. Дополнительно проба применима к растворимым химическим веществам или тем, которые формируют стабильные дисперсии (например, суспензии или коллоиды) в среде воздействия.

[1)] KeratinoSens является торговой маркой продукта, поставляемого Givaudan Schweiz AG, CH-8310 Кемптталь. Данная информация приведена для удобства пользователей настоящего стандарта и не является рекламой ISO означенного продукта. Можно использовать эквивалентные продукты, если показано, что они приводят к тем же результатам.

Окончание таблицы С.3

Ключевое событие 2. Активация эпидермальных кератиноцитов	
Применение к МИ	Данные отсутствуют. KeratinoSens™ работает с DMSO и водными растворами, но возможно не будет работать с неполярными жидкостями для МИ, такими как кунжутное, хлопковое или оливковое масло, потому что их значения log P превышают 15,0
Примечание — См. ссылки [77]—[80].	

С.2.2.3 LuSens

Набор LuSens использует иммортализованную линию клеток кератиноцитов человека, накапливающую репортерный ген люциферазы под контролем антиоксидант-ответственным элементом (ARE) гена хинона оксидоредуктазы крысы 1 (NQO1), который усилен сенсибилизаторами кожи (см. таблицу С.4).

Таблица С.4 — LuSens

Ключевое событие 2. Активация эпидермальных кератиноцитов	
Руководство ОЭСР	Техническое руководство OECD 442D
Рабочие показатели (ответ да/нет)	Точность 74 %, чувствительность 74 %, специфичность 74 %
Экспериментальная система	Трансгенная клеточная линия LuSens: иммортализованная линия адгерентных клеток, полученная из кератиноцитов человека, стабильно накапливающая репортерный ген люциферазы под контролем ARE гена крысы NQO1
Принцип исследования	Трансгенная клеточная линия LuSens содержит репортерный ген люциферазы под транскрипционным контролем активатора, объединенного с элементом ARE. Сигнал люциферазы указывает на активацию электрофилами эндогенных Nrf2-зависимых генов. Индукция гена люциферазы измеряют количественно по люминесценции, производимой субстратами люциферазы, генерирующими свет, как индикатор активности в клетках фактора транскрипции Nrf2 после воздействия электрофильных сенсибилизаторов кожи
Считывание данных	Количественное измерение (обнаружением люминесценции) индукции гена люциферазы
Время воздействия	48 ч
Применимость	Проба LuSens применима к исследуемым химическим веществам, включающим различные органические функциональные группы, механизмы реакции, мощности сенсибилизации кожи и физико-химические свойства. Дополнительно проба применима к растворимым химическим веществам или тем, которые формируют стабильные дисперсии (например, суспензии или коллоиды) в среде воздействия
Применение к МИ	Данные отсутствуют. LuSens работает с DMSO и водными растворителями, но возможно не будет задействовать с неполярными растворителями МИ, такими как кунжутное, хлопковое или оливковое масло, потому что их значения log P превышают 15,0
Примечание — См. ссылки [81]—[84].	

С.2.2.4 SENS-IS

Набор SENS-IS является моделью *in vitro*, разработанной для химических веществ и смесей, которая измеряет KE2 путем оценки профилей экспрессии гена в моделях кожи человека [Episkin® RhE или SkinEthic™ RHE[1)]]. SENS-IS позволяет классифицировать сенсибилизаторы кожи по категориям мощности [84]. Проба SENS-IS валидирована в исследовании от индустрии [86], [87] и в настоящее время оценивается EURL-ECVAM (см. таблицу С.5).

[1)] Episkin® RhE и SkinEthic™ RHE (EPISKIN) являются примерами коммерчески доступных подходящих продуктов. Данная информация приведена для удобства пользователей настоящего стандарта и не является рекламой ISO означенного продукта.

Таблица С.5 — SENS-IS

Ключевое событие 2. Активация эпидермальных кератиноцитов	
Руководство ОЭСР	Проект 4.107. Новое техническое руководство — токсигеномный анализ на 3D реконструированном эпидермисе для измерения мощности сенсибилизации кожи — проба SENS-IS
Рабочие показатели (ответ да/нет)	Точность 96,6 %, чувствительность 97,7 %, специфичность 95,2 % [86], [87]
Экспериментальная система	Модели реконструированного человеческого эпидермиса (RhE) Episkin® RhE или SkinEthic™ RHE (EPISKIN)
Принцип исследования	Измеряют экспрессию гена двух групп генов: одна группа (группа REDOX) включает набор из 17 генов, имеющих в своем активаторе антиоксидантный реагирующий элемент и отслеживающих защитные окислительно-восстановительные сигналы, индуцированные взаимодействием сенсибилизаторов кожи, связывающих с аминокислотами цистеина комплекса Keap1-NRF2 [89]. Вторая группа (группа SENS-IS) включает набор из 21 гена, задействованных в воспалении, сигналах опасности и миграции клеток для реакции на сложный каскад событий, ведущих к активации дендритных клеток химическим веществом, сенсибилизирующим кожу
Считывание данных	Количественный анализ экспрессии 64 генов, измеряемый количественной полимеразной цепной реакцией с обратной транскрипцией (qRT-PCR)
Время воздействия	15 мин воздействия; ткани RHE затем промываются и постинкубируются 6 ч.
Применимость	Проба SENS-IS использует 3D ткани RHE для четкого учета шага проникновения сквозь кожу продуктов с разной растворимостью или физическим состоянием. SENS-IS может производить количественный анализ не только химических веществ, но и натуральных продуктов, смесей и готовых изделий [90], [91]
Применение к МИ	Проба SENS-IS работает с полярными (соляной) и неполярными (кунжутное масло) носителями экстракции и может быть использована для тестирования экстрактов МИ. В исследовании, подтверждающем концепцию оценки чувствительности кожи к экстрактам МИ, были проанализированы пять известных сенсибилизаторов кожи, имеющихся в составе медицинского силикона, и отрицательный контроль. Все исследуемые объекты экстрагированы в полярном (физиологический раствор) и неполярном (кунжутное масло) растворителях и правильно идентифицированы как сенсибилизаторы или несенсибилизаторы кожи [88]
Примечание — См. ссылки [85] — [91].	

С.2.2.5 Набор IL-18 RHE

Оценка сенсибилизации кожи путем измерения базального высвобождения IL-18 после нанесения химического вещества на поверхность раздела воздух—жидкость RHE приведена в таблице С.6.

Таблица С.6 — Проба IL-18 RhE

Ключевое событие 2. Активация эпидермальных кератиноцитов	
Руководство ОЭСР	На настоящий момент не существует
Рабочие показатели (ответ да/нет)	На ограниченном наборе (<10) соединений для различных исследованных моделей. Андрес и др. [92] рассчитали рабочие показатели на наборе из 19 химических веществ. В статье обсуждаются пять моделей прогнозирования, дающие разные рабочие показатели
Экспериментальная система	Модели восстановленного человеческого эпидермиса SkinEthic™ RHE (EPISKIN), VUmc-EE, EpiCS®[a] (CellSystems), и EpiDerm™ (MatTek Corp.)[b] [92], [93], [94], [95]
Принцип исследования	После химического воздействия эпидермисы подвергались пробе жизнеспособности клеток и поддерживающие среды получены для исследования IL-18 ELISA
Считывание данных	Количественное исчисление IL-18 с использованием ELISA в среде культуры RHE; параллельно, жизнеспособность клеток измеряют тестом MTT

Окончание таблицы С.6

Ключевое событие 2. Активация эпидермальных кератиноцитов	
Время воздействия	24 ч
Применимость	Проба применима для исследования растворимых контактных аллергенов и катионных металлов на предмет потенциала к сенсибилизации кожи [94]
Применение к МИ	Данные отсутствуют. Так данная проба использует ткани RHE, она, возможно, будет работать с полярными и неполярными экстрактами из МИ
[a] VUmc-EE, EpiCS® (CellSystems) является примером коммерчески доступного подходящего продукта. Данная информация приводится для удобства пользователей настоящего стандарта и не является рекламой ISO означенного продукта. [b] Epiderm™ EPI-200 (MatTek Corp) является примером коммерчески доступного подходящего продукта. Данная информация приводится для удобства пользователей настоящего стандарта и не является рекламой ISO означенного продукта.	

С.2.2.6 EpiSensA[1)]

Проба эпидермальной сенсибилизации EpiSensA использует модели ткани RhE. Проба основана на индукции маркерных генов, связанных с ответом кератиноцитов на воспаление и цитозащиту в индукции кожной сенсибилизации (см. таблицу С.7).

Таблица С.7 — EpiSensA

Ключевое событие 2. Активация эпидермальных кератиноцитов	
Руководство ОЭСР	На настоящий момент не существует
Рабочие показатели (ответ да/нет)	Точность 90 %, чувствительность 94 %, специфичность 78 % [96]
Экспериментальная система	Модели восстановленного человеческого эпидермиса LabCyte EPI-MODEL 24 (Japanese Tissue Engineering Co., Ltd.)[a] и Epiderm™ EPI-200 (MatTek Corp.)
Принцип исследования	Эта проба основана на индукции множественных маркерных генов (ATF3, IL-8, DNAJB4 и GCLM), связанных с двумя ответами кератиноцитов (воспалительный или цитопротекторный) в индукции сенсибилизации кожи. Механистическая значимость маркерных генов подтверждена фокусированием на ключевых молекулах, регулирующих ответы кератиноцитов *in vitro* (P2X7 для воспалительных и Nrf2 для цитопротективных ответов). Повышающая регуляция ATF3 IL-8, или DNAJB4 и GCLM, индуцированная 2,4-динитрохлорбензолом в кератиноцитах человека значительно подавляется P2X7 специфичным антагонистом KN-62 или Nrf2 siRNA соответственно, который поддерживает механистическую релевантность маркерных генов
Считывание данных	Количественный анализ экспрессии четырех маркерных генов, измеряемый количественной полимеразной цепной реакцией с обратной транскрипцией (RT-PCR)
Время воздействия	6 ч
Применимость	EpiSensA может быть тестом сенсибилизации кожи на механической основе, применимом к широкому кругу химических веществ, включая липофильные химические вещества и пре-/про-гаптены [97]
Применение к МИ	Данные отсутствуют. Так данная проба использует ткани RhE, она, возможно, будет работать с полярными и неполярными экстрактами из МИ
[a] LabCyte EPI-MODEL 24 (Japanese Tissue Engineering Co., Ltd.) является примером коммерчески доступного подходящего продукта. Данная информация приведена для удобства пользователей настоящего стандарта и не является рекламой ISO означенного продукта.	

[1)] EpiSensA является примером коммерчески доступного подходящего продукта. Данная информация приведена для удобства пользователей настоящего стандарта и не является рекламой ISO означенного продукта.

С.2.2.7 SenCeeTox®[1)]

Проба SenCeeTox® измеряет экспрессию 11 генов, связанных с сенсибилизацией кожи в кератиноцитах 3D тканей RHE. Повышенная экспрессия генов, а также реактивность и цитотоксичность определяют потенциал сенсибилизации кожи (см. таблицу С.8).

Таблица С.8 — SenCeeTox®

Ключевое событие 2. Активация эпидермальных кератиноцитов	
Руководство ОЭСР	На настоящий момент не существует
Рабочие показатели (ответ да/нет)	Точность 84 %, чувствительность 81 %, специфичность 92 % [99]
Экспериментальная система	Пробы реконструированного человеческого эпидермиса EpiDerm™ EPI-200 (MatTek Corp.) и Skin-Ethic™ RhE (EPISKIN)
Принцип исследования	Экспрессию восьми Nrf2/ARE, одного AhR/XRE и двух генов, контролируемых Nrf1/MRE, измеряют количественной полимеразной цепной реакцией с обратной транскрипцией (qRTPCR). Индуцирование сложения при каждой концентрации воздействия сочетается с данными реактивности и цитотоксичности для определения потенциала к сенсибилизации
Считывание данных	Количественный анализ экспрессии 11 генов измеряют qRT-PCR. Также определяют химическую реактивность и цитотоксичный потенциал. Результаты этих индивидуальных проб анализируются при помощи алгоритма, который включает все данные каждой пробы для прогноза потенциала к кожной сенсибилизации
Время воздействия	24 ч
Применимость	Проба SenCeeTox® может использоваться для оценки химических и металлических сенсибилизаторов кожи различной мощности [98]
Применение к МИ	Проба SenCeeTox® работает с полярным (солевым) и неполярным (кунжутное масло) экстрагентом и применима для испытания экстрактов МИ. В ссылках [98] и [100] сообщалось, что проба SenCeeTox® способна точно определять растворы отдельных химических и металлических сенсибилизаторов кожи, связанных с МИ, экстрагированных из силикона медицинского назначения, используя полярные и неполярные растворители, такие как физраствор и кунжутное масло

С.2.2.8 h-CLAT

Набор h-CLAT определяет количественно изменения в экспрессии маркеров клеточной поверхности, связанных с процессом активации моноцитов и дендритных клеток после воздействия сенсибилизаторов кожи. Уровни экспрессии маркеров поверхности используют для идентификации сенсибилизаторов и несенсибилизаторов кожи (см. таблицу С.9).

Таблица С.9 — h-CLAT

Ключевое событие 3. Активация эпидермальных дендритных клеток	
Руководство ОЭСР	Техническое руководство OECD 442E
Рабочие показатели (ответ да/нет)	Точность 85 %, чувствительность 93 %, специфичность 66 %
Экспериментальная система	Клеточная линия hCLAT: моноцитная клеточная линия лейкемии человека THP-1

[1)] SenCeeTox® является примером коммерчески доступного подходящего продукта. Данная информация приведена для удобства пользователей настоящего стандарта и не является рекламой ISO означенного продукта.

Окончание таблицы С.9

Ключевое событие 3. Активация эпидермальных дендритных клеток	
Принцип исследования	Проба h-CLAT измеряет изменения в экспрессии маркеров клеточной поверхности CD86 и CD54 на клетках THP-1 после воздействия исследуемого химического вещества в течение 24 ч. Эти молекулы поверхности являются типичными маркерами моноцитной активации THP-1 и могут имитировать активацию дендритных клеток, имеющую большее значение в праймировании Т-клеток. Изменения в экспрессии маркеров поверхности измеряют проточной цитофлуометрией. Определяют относительную флуоресценцию маркеров поверхности по сравнению с контрольными экстрагентами и используют для дифференциации между сенсибилизаторами и несенсибилизаторами кожи [104]
Считывание данных	Уровни экспрессии клеточных маркеров поверхности CD86 и CD54 измеряют проточной цитометрией после окраски клеток антителами, маркированными флуорохромом
Время воздействия	24 ч
Применимость	Набор h-CLAT применима к исследуемым химическим веществам, которые растворимы в подходящем растворителе или формируют стабильные дисперсии в подходящем носителе. Исследуемые химические вещества со значениями Log P выше 3,5 имели тенденцию выдавать ложноположительные результаты [104], [105]
Применение к МИ	Данные отсутствуют. h-CLAT работает с физиологическим раствором и растворителями DMSO, но, возможно, не будет задействовать неполярные жидкости для МИ, такими как кунжутное, хлопковое или оливковое масла, потому что их значения log P превышают 15,0

С.2.2.9 U-SENS™[1)]

Метод исследования активации клеточной линии U937 (U-SENS™) является пробой *in vitro*, которая количественно определяет экспрессию маркера клеточной поверхности CD86 проточной цитометрией на клеточной линии гистиоцитарной лимфомы человека, клетки U937 (см. таблицу С.10).

Таблица С.10 — U-SENS™

U-SENS™ — Ключевое событие 3. Активация эпидермальных дендритных клеток	
Руководство ОЭСР	Техническое руководство OECD 442E
Рабочие показатели (ответ да/нет)	Точность 86 %, чувствительность 91 %, специфичность 65 %
Руководство ОЭСР	Техническое руководство OECD 442E
Рабочие показатели (ответ да/нет)	Точность 86 %, чувствительность 91 %, специфичность 65 %
Экспериментальная система	Клеточная линия U-SENS™: U937, клеточная линия гистиоцитарной лимфомы человека
Принцип исследования	CD86 считают ко-стимулирующей молекулой, которая может имитировать моноцитную активацию, занимающую ключевое место в праймировании Т-клеток. Изменения экспрессии маркера клеточной поверхности CD86 измеряют методом проточной цитометрии после окрашивания клеток, как правило, антителами, маркированными флуоресцеинизотиоцианатом (FITC). Одновременно проводят измерение цитотоксичности (например, используя PI) для оценки, происходит ли повышающая регуляция экспрессии маркера клеточной поверхности CD86 при субцитотоксичных концентрациях. Вычисляют индекс стимуляции (SI) маркера клеточной поверхности CD86 по сравнению с растворителем/контролем носителя и используют в прогностической модели для поддержки различия между сенсибилизаторами и несенсибилизаторами кожи [104]

[1)] U-SENS является торговой маркой продукта, поставляемого L'Oréal, 41 улица Март, Клиши, 92110. Данная информация приведена для удобства пользователей настоящего стандарта и не является рекламой ISO означенного продукта. Можно использовать эквивалентные продукты, если показано, что они приводят к тем же результатам.

Окончание таблицы С.10

U-SENS™ — Ключевое событие 3. Активация эпидермальных дендритных клеток	
Считывание данных	Изменения экспрессии маркера клеточной поверхности CD86 измеряют методом проточной цитометрии после окрашивания клеток, как правило, антителами, маркированными флуоресцеинизотиоцианатом (FITC)
Время воздействия	(45 ± 3) ч
Применимость	Проба применима к исследуемым химическим веществам, которые растворимы или формируют стабильные дисперсии (т. е. коллоид или суспензию, в которых исследуемое химическое вещество не осаждается либо не отделяется от растворителя/носителя на разные фазы) в подходящем растворителе/носителе [104]
Применение к МИ	Данные отсутствуют. U-SENS работает с физиологическим раствором и растворителями DMSO, но вряд ли будет работать с неполярными растворителями МИ, такими как кунжутное, хлопковое или оливковое масла, потому что их значения log P превышают 15,0

С.2.2.10 Набор IL-8 Luc

Набор репортерного гена интерлейкин-8 (проба IL-8 Luc) использует репортерную клетку IL-8, полученную из THP-1 (клетки THP-G8), которая позволяет количественно измерить индукцию гена люциферазы путем обнаружения люминесценции из зарекомендовавших себя субстратов люциферазы, продуцирующих свет, в качестве индикатора активности IL-8 и GAPDH в клетках после воздействия химических веществ, сенсибилизирующих кожу (см. таблицу С.11).

Таблица С.11 — Проба IL-8 Luc

Ключевое событие 3. Активация эпидермальных дендритных клеток	
Руководство ОЭСР	Техническое руководство OECD 442E
Рабочие показатели (ответ да/нет)	Точность 86 %, чувствительность 96 %, специфичность 41 %
Экспериментальная система	Клеточная линия IL8 Luc: репортерная клеточная линия IL-8, полученная из THP-1 (THP-G8)
Принцип исследования	Проба IL-8 Luc использует репортерную клеточную линию IL-8, полученную из THP-1, THP-G8, которая накапливает стабильный люциферазный оранжевый (SLO) и стабильный люциферазный красный (SLR) гены люциферазы под контролем активаторов IL-8 и глицеральдегид 3-фосфат дегидрогеназы (GAPDH) соответственно (1). Это позволяет количественно измерить индукцию гена люциферазы путем обнаружения люминесценции из зарекомендовавших себя субстратов люциферазы, производящих свет, в качестве индикатора активности IL-8 и GAPDH в клетках после воздействия химических веществ, сенсибилизирующих кожу [104]
Считывание данных	Изменения в экспрессии IL-8, цитокина, связанного с активацией дендритных клеток
Время воздействия	16 ч

Окончание таблицы С.11

Ключевое событие 3. Активация эпидермальных дендритных клеток	
Применимость	Хотя проба IL-8 Luc использует X-VIVO™ 15 в качестве растворителя, она точно определяет химические вещества с коэффициентом растворения октанола/воды log Kow >3,5 и с растворимостью в воде около 100 μg/мл. Тем не менее отрицательные результаты для исследуемых химических веществ, которые не растворяются при 20 мг/мл, могут произвести ложноотрицательные результаты из-за их неспособности раствориться в XVIVO™15. Следовательно, отрицательные результаты для этих химических веществ не следует рассматривать. В процессе валидации обнаружен высокий ложноотрицательный уровень для ангидридов. Более того, из-за ограниченной метаболической способности клеточной линии (8) и условий эксперимента, про-гаптены (вещества, требующие метаболической активации) и пре-гаптены (вещества, активируемые окислением воздухом) могут произвести отрицательные результаты в пробе. Проба IL-8 Luc может классифицировать химические вещества как сенсибилизаторы и несенсибилизаторы кожи, тем не менее на данный момент она не предоставляет оценки мощности [105]
Применение к МИ	Данные отсутствуют. Культуральную среду X-VIVO™ 15, DMSO или воду используют в качестве экстрагента для исследуемых химических веществ. Неизвестно, будет ли проба работать с неполярными жидкостями для МИ, такими как кунжутное, хлопковое или оливковое масла

С.2.2.11 Быстрое обнаружение геномного аллергена™[1)]

Быстрое обнаружение геномного аллергена™ (GARD™) является пробой на клеточной основе, которая использует естественное распознавание инородных веществ дендритными клетками, измеряемое многопараметрным считыванием геномных биомаркеров. После клеточной стимуляции химические вещества классифицируют как сенсибилизаторы или несенсибилизаторы кожи, основываясь на индуцированных транскрипционных профилях (см. таблицу С.12). Проба GARD была валидирована в исследовании от индустрии [118] и на данный момент оценивается EURL-ECVAM, а также получила положительное научное мнение ESAC по коже GARD™.

Таблица С.12 — GARD™

Ключевое событие 3. Активация дендритных клеток	
Руководство ОЭСР	Проект 4.106. Новое техническое руководство — тест кожи GARD™: метод *in vitro* для идентификации сенсибилизаторов кожи, основывающийся на геномной интерпретации влияния химических веществ на человеческие дендритные клеткоподобные клетки (ключевое событие 3 AOP) [121]
Рабочие показатели (ответ да/нет)	Точность 94 %, чувствительность 93 %, специфичность 96 % [118]. Примечание — Проба кожи GARD™ может сочетаться с измерением мощности GARD™ для получения класса согласно европейским правилам классификации, маркировки и упаковки (CLP) (например, слабый или сильный сенсибилизатор кожи)
Экспериментальная система	Клеточная линия GARD™skin: SenzaCells™ (SenzaGen) человеческого миелоидного происхождения с характеристиками, сходными с дендритными клетками
Принцип исследования	GARD™skin измеряет экспрессию 200 генов, индуцированных в SenzaCells™ в ответ на химическое воздействие. 200 генов, относящиеся к прогностически значимым asGARD (GPS), включают биомаркеры активации и созревания дендритных клеток (KE3), несколько путей сигнализирующих об опасности и рецепторов распознавания структур (KE2), а также антиген-представляющие молекулы и пути клеточной пролиферации (KE4) [116], [117]

[1)] GARD является торговой маркой продукта, поставляемого SenzaGen AB, Medicon Village (406), 22381 Лунд, Швеция. Данная информация приведена для удобства пользователей настоящего стандарта и не является рекламой ISO означенного продукта. Можно использовать эквивалентные продукты, если показано, что они приводят к тем же результатам.

Окончание таблицы С.12

Ключевое событие 3. Активация дендритных клеток	
Считывание данных	GPS включает механистично релевантные гены, задействованные в процессе сенсибилизации кожи, таком как повышающая регуляция состимулирующих молекул и индукция клеточного и окислительного стресса [115]. Экспрессию гена 200 генов в GPS измеряют с использованием аналитической системы Nanostring®[a]. Полученную экспрессию гена анализируют путем распознавания взаимосвязей, используя алгоритм машинного обучения, основанный на закрепленном наборе эталонных образцов [114]. Каждый образец классифицируют как сенсибилизатор или несенсибилизатор кожи, не прибегая к субъективной оценке
Время воздействия	24 ч
Применимость	Проба GARD™skin широко применима в обширном химическом пространстве, охватывающем множество органических функциональных групп и конечных использований, включая пре-/про-гаптены и вещества с низкой водной растворимостью [113], [116]
Применение к медицинским изделиям	Пробы GARD™ работают с полярным (солевым) и неполярным (кунжутное и оливковое масла) экстрагентами и применимы для исследования экстрактов из МИ. В исследовании с целью подтверждения сенсибилизирующего действия экстрактов из МИ проанализированы четыре известных сенсибилизатора кожи, содержащиеся в силиконе медицинского назначения и полиуретане, и отрицательный контроль. Исследуемые объекты экстрагированы в полярном (физиологическом) и неполярном (масло) экстрагентах и четко определены как сенсибилизаторы или несенсибилизаторы кожи [119]
[a] Nanostring® является примером коммерчески доступного подходящего продукта. Данная информация приведена для удобства пользователей настоящего стандарта и не является рекламой ISO или IEC означенного продукта.	

С.3 Обсуждение

С.3.1 Наборы для идентификации, одобренные OECD

Руководствами по исследования OECD 442 [75], [79], [104] одобрено шесть наборов для идентификации *in vitro* химических кожных аллергенов, которые относятся к ключевым событиям 1, 2 и 3 и могут быть применены для обнаружения химических аллергенов в экстрактах из МИ — это DPRA, KeratinoSens™, LuSens, h-CLAT, U-SENS™ и IL-8 Luc. Тем не менее, так как DPRA использует избыток химического вещества для обнаружения реактивности пептида, данный набор возможно не будет способен определять низкие уровни сенсибилизаторов в разбавленных экстрактах МИ. Данные наборы валидированы с использованием чистых исследуемых веществ, а не химических смесей. Из-за ограниченной метаболической способности клеточных линий, используемых в некоторых пробах *in vitro*, про-гаптены (т. е. вещества, требующие ферментной активации, например посредством ферментов Р450) могут также предоставлять ложноотрицательные результаты [82], [104]. Наконец, эти методы исследования, разработанные для конкретного ключевого события, поодиночке могут не являться достаточными для выводов о наличии или отсутствии потенциала химических веществ к кожной сенсибилизации и должны рассматриваться в контексте интегрированных подходов, таких как IATA, сочетая их с другой дополнительной информацией.

Учитывая специфичность исследований биосовместимости МИ, используемых для оценки готовых изделий или материалов в существующем виде или после экстрагирования в полярных и неполярных жидкостях, применимость наборов OECD должна быть подтверждена. У многих из них могут быть ограничения с неполярными экстрагентами для МИ, такими как кунжутное, хлопковое или оливковое масла. Помимо проблемы несовместимости веществ и растворителей некоторые наборы, валидированные OECD, возможно, не будут способны обнаружить потенциальные кожные сенсибилизаторы в экстрактах МИ, потому что они часто присутствуют в чрезвычайно низких концентрациях.

С.3.2 Геномные наборы

Геномными наборами, относящимися к ключевым событиям 2 и 3, являются SenCeeTox®, SENS-IS, EpiSensA и GARD™и приведены в С.2.2. Первые три работают с тканями RHE, а четвертый основан на патентованной клеточной линии. Они все незначительно отличаются, но их общая черта — использование маркерных генов для идентификации кожных сенсибилизаторов. Также все наборы, кроме EpiSensA, результативно завершили пилотные проекты с использованием полярных и неполярных экстрактов из полимерных МИ с добавлением кожного сенсибилизатора. Точность на ограниченном наборе образцов для пилотных проектов была сопоставима или пре-

вышала точность наборов, валидированных OECD. Два из этих наборов, SENS-IS и GARD™, в настоящее время рассматривают в рамках раздела 4 Программы Организации экономического сотрудничества и развития (OECD) секцией «Руководство по исследованию» [121] (проекты, связанные с руководствами исследований по влиянию на здоровье).

Эти наборы могут быть использованы для оценки потенциала МИ к кожной сенсибилизации с учетом их точности, способности работать с полярными и неполярными жидкостями и потенциалом быть самостоятельными методами для исследования сенсибилизации кожи МИ. Однако их способность к обнаружению катионных металлических сенсибилизаторов должна быть подтверждена.

С.3.3 Другие наборы

Набор IL-18 RHE относится к ключевому событию 2. Данный набор измеряет выделение IL-18 и жизнеспособность клеток. Эти исследования для набора IL-18 RHE имеют ограничения. Так как набор использует ткани RHE, он возможно может работать с полярными и неполярными экстрактами из МИ. Тем не менее, если данный набор не валидирован OECD или включен в какое-либо крупное сравнительное исследование кожной сенсибилизации *in vitro*, его применение в исследовании МИ должно быть подтверждено.

С.3.4 Общие соображения для валидации методов испытания МИ в условиях *in vitro*

В руководстве исследований OECD для определения потенциала химических веществ к кожной сенсибилизации включены шесть валидированных наборов *in chemico* и *in vitro* (DPRA, Keratinosens, LuSens, h-Clat, U-Sens, IL-8 Luc), а также два набора (GARD™, SENS-IS) [75], [79], [104] добавлены в Программу OECD по Руководству исследований [121]. Включение любого из этих наборов кожной сенсибилизации *in vitro* для исследований МИ должно поддерживаться данными валидации, подтверждающими эквивалентность/превосходство метода *in vitro* по сравнению с текущими методами *in vivo*, используемыми для оценки потенциала МИ/экстрактов МИ к кожной сенсибилизации.

Такой процесс валидации должен позволить сравнить рабочие показатели между пробами-кандидатами и исследовать как при самостоятельном использовании, так и в качестве части стратегии тестирования.

На этапе валидации при планировании исследований необходимо учитывать следующее:

- решение относительно использования референтных материалов сенсибилизации кожи или экстракты несенсибилизирующих материалов, к которым сенсибилизаторы будут добавлены в указанных концентрациях:
- идентификацию репрезентативных классов химических веществ, сенсибилизирующих кожу, которые могут присутствовать в МИ;
- выбор списка референтных химических веществ для построения вариационной базы данных, содержащей физико-химические характеристики, исторические данные методов на животных и человеке, а также данные *in vitro* и *in chemico* валидированных проб OECD;
- идентификацию материалов отрицательного и положительного контроля для использования при валидации;
- определение значений минимальной надежности (в пределах между воспроизводимостью) и точности (чувствительность, специфичность) по сравнению с методами на человеке и/или животных для валидации пробы *in vitro*;
- идентификацию тех химических или физических свойств материалов МИ, которые могут привести к помехам тестирования, ложноотрицательным или ложноположительным результатам;
- определение сферы применимости рассматриваемых проб *in vitro*, таких как: материалы, подходящие для экстракции, или материалы, не подходящие для экстракции (например, жидкостей, гелей, паст, газов, паров, аэрозолей, конденсатов, наноматериалов).

С.4 Выводы

Примерно 20 % химических веществ в мировой коммерции являются сенсибилизаторами [72]. Тем не менее только около 1 % экстрактов МИ показывают положительные результаты в тестах сенсибилизации кожи на животных [94]. Эти факты, а также наличие современных проб сенсибилизации кожи *in vitro* убедили экспертов в том, что коренной сдвиг в сторону признания проб *in vitro* для тестирования МИ неизбежен [73]. Тем не менее, чтобы это произошло, необходимы тщательно спланированные исследования оценки/валидации наиболее многообещающих наборов для кожной сенсибилизации *in vitro* или комбинации наборов.

Приложение D
(справочное)

Справочная информация о методах кожной сенсибилизации

Сенсибилизация у человека наступает после однократного или многократного накожного воздействия, инициируется и запускается компонентами иммунной системы. Сначала гаптен (химическое вещество) должен проникнуть сквозь кожу. Затем он вступает в реакцию с белками кожи для формирования иммуногенных комплексов. Клетки Лангерганса на эпидермальной/дермальной границе вырабатывают антиген на специфические лимфоциты, которые затем активируются для инициации иммунных ответов. Небольшой процент этих лимфоцитов является клетками долгосрочной памяти, которые служат основными активаторами в провокационной фазе. Таким образом, последующие повторные воздействия могут привести к негативным реакциям, которые сопровождаются выбросом лимфокинов активированными лимфоцитами и другими воспалительными клетками, привлеченными в область поражения.

В 1895 г. Ядассон, используя метод аппликаций, обнаружил у клинического пациента контактную аллергию на ртуть. Этот новаторский подход предоставил научную базу для последующих исследований, направленных на диагноз и прогноз контактной аллергии у человека и животных. Развитие перспективных/прогнозирующих исследований для оценки сенсибилизирующего потенциала химикатов последовало за новаторской работой Лэндстайнера и Чейза [11], которые обосновали использование морских свинок для изучения сенсибилизации кожи.

В 1969 г. Магнуссон—Клигман [12] опробовали множество вариантов исследований на морских свинках и предложили процедуру максимизации на морских свинках (GPMT), основанную на внутрикожных инъекциях (с полным адъювантом Фрейнда [FCA] или без него) и на последующих местных аппликациях исследуемого материала на тот же участок. Данный метод исследования требует предварительной обработки исследуемого участка, если исследуемый материал не является раздражителем. Как правило, он достоверно обнаруживает слабые сенсибилизаторы, так как понятие «слабый» включает нулевую вероятность положительных реакций. Этот чувствительный метод широко используется. Применение полного адъюванта Фрейнда повышает чувствительность метода исследования и в некоторых случаях может переоценить сенсибилизирующий потенциал испытуемого соединения.

В 1965 г. Бюлер (Buehler) [7] предложил использование закрытых аппликаций для обеспечения окклюзии как метод оптимизации воздействия и приближения к условиям процедур, используемых на человеке (Human Repeat Insult Patch Test, HRIPT). Высказывалось предположение, что методика окклюзионной аппликации является чувствительной и точно прогнозирует средние и сильные сенсибилизаторы, таким образом предотвращая вероятность негативных реакций у человеческих моделей при повторной накожной пробе (Human Repeat Insult Patch Test, HRIPT). Представленные данные показали преимущества окклюзии по сравнению с внутрикожными инъекциями и местным применением открытого типа. Стимуляция иммунной системы адъювантами не использовалась. Данный метод признан достаточно чувствительной процедурой для определения наиболее слабых сенсибилизаторов и доказан как достаточно гибкий для использования в процедуре оценки риска. Тем не менее исследование закрытой аппликацией [исследование Бюлера (Buehler)] менее чувствительно по сравнению с методом GPMT [9].

Эти два исследования, метод закрытой аппликации в Соединенных Штатах Америки и метод максимизации в Европе, наиболее часто использовались для оценки безопасности. Результаты сенсибилизирующих проб на морских свинках зависят от многих факторов, связанных с животными и с техническими аспектами, что объясняет различия в результатах исследований разных лабораторий, например: линия животных, их пол, возраст, окружающие условия исследования, исследуемый участок на животном, метод удаления шерсти (стрижка/бритье или химическая депиляция), тип конфигурации аппликации, количество исследуемого материала, качество окклюзии, время воздействия и считывание тканевого ответа. Использованы и изучены многочисленные исследования, и у каждого из них появились сторонники. В настоящий момент существует несколько методик, признанных приемлемыми в нормативных целях при условии, что методика отражена документально надлежащим образом и обоснована исследователем. Во всех случаях процедуры следует проводить в соответствии с первоисточником. Список других исследований приведен ниже.

В монографии [8] приведена актуальная информация по исследованию кожной сенсибилизации:

1) метод с использованием полного адъюванта Фрейнда;
2) метод с использованием разделенного адъюванта;
3) метод открытых накожных аппликаций;
4) метод оптимизации Мауера;
5) тест на подушечках стопы морских свинок;
6) кумулятивный метод с увеличением степени контакта;
7) скарификационный метод (с адъювантом и аппликациями);
8) метод исследования на ушах мыши.

Местная проба на лимфатическом узле мыши (LLNA) предпочтительнее, чем GPMT и исследование закрытой аппликацией Бюлера для идентификации опасности химических веществ. LLNA принята OECD в 2010 г. как самостоятельная альтернатива существующим исследованиям на морских свинках и как метод улучшения обра-

щения с животными [33]. Проба LLNA апробирована для определения сенсибилизирующего действия химических веществ [39], [40].

Научной базой для исследования является измерение введенного 3H-метил-тимидина в лимфоциты дренирующих лимфатических узлов мыши под местным воздействием испытуемой пробы как показатель сенсибилизации. Это исследование не включает провокационную фазу. Конечная точка — индекс стимуляции (ИС), означающий соотношение введенного тимидина в лимфатические узлы животных, получивших дозу воздействия, с количеством тимидина, введенного в лимфатические узлы контрольной группы. Исследование является положительным, когда индекс стимуляции превышает 3 (SI>3). Внутри- и межлабораторная оценки LLNA показали воспроизводимое соотношение «доза—ответ» внутри и между лабораториями [16], [17], [21], [25], [26], [28] и [32]. Тем не менее сообщалось о трудностях в различии между раздражающими и аллергенными веществами при использовании LLNA [18], [25] и [28]. Таким образом, LLNA может давать ложноположительные результаты с раздражителями и завышать аллергенность веществ, имеющих и раздражающие, и аллергенные свойства [16]. Однако у LLNA есть преимущества по сравнению с пробами на морских свинках из-за более короткой продолжительности исследования, более объективной конечной точки, меньшего объема требуемого испытуемого вещества, а также это исследование не включает инъекции полного адъюванта Фрейнда. Возможны усовершенствования методики исследования путем использования анализа маркеров активации клеток и цитометрии потока [23], [24]. Не установлено, могут ли они быть внедрены на практике в стандартные протоколы LLNA для обычной токсикологии. С другой стороны, LLNA ограничивает выбор испытуемых экстрактов; в большинстве исследований использовалась смесь ацетона и оливкового масла. Недавнее исследование демонстрирует вариабельность результатов с применением разных испытуемых экстрактов [27]. Кроме того, при использовании LLNA невозможно изучать провокационную фазу или конфигурации перекрестной реактивности, так как животных умерщвляют после индукции до забора лимфатических узлов.

Проба подколенного лимфатического узла (PLNA), использующая подкожное введение в подушечку стопы [19], [22], [31], является альтернативой пробе на лимфатическом узле. В данной пробе кроме прямого измерения активации лимфатического узла возможно применение антигенов-репортеров для дальнейшего прояснения иммуномодуляции, вызванной исследуемым химическим веществом [15].

Процесс оценки риска не должен полагаться на единственную модель или особенный подход; его проведение должно быть продумано для предоставления максимальной гарантии безопасности потребителю. Как правило, это требует проведения исследований на животных моделях или методами без использования животных, а также на человеческих экспериментальных моделях (добровольцах). Требуется определенная гибкость при выборе моделей и методов при наличии документированного и/или валидированного обоснования.

Отрицательный ответ, полученный на морских свинках, при надлежащем проведении может быть окончательным, если исследуемая концентрация более безопасна по сравнению с условиями клинического применения. Тем не менее необходимо избегать оценки исследуемых образцов исключительно на основании вероятности и/или тяжести без должного рассмотрения использования конечного изделия.

Риск, т. е. вероятность и тяжесть аллергической реакции на изделие, определяется, в основном, следующими четырьмя факторами: сенсибилизирующий потенциал химического аллергена, его количество в изделии, биодоступность и условия воздействия. Относительный сенсибилизирующий потенциал химических веществ может быть определен минимальной индукционной концентрацией, необходимой для стимуляции данного уровня сенсибилизации: чем меньше эта концентрация, тем выше потенциал аллергена [6], [30]. Продемонстрировано, что значительное число случаев аллергического контактного дерматита обнаруживалось у потребителей, когда остаточный уровень аллергена в изделии превышал его минимальную индукционную концентрацию, полученную путем GPMT [14].

Однако прогнозирующее исследование смесей и изделий гораздо менее обоснованно и может проводиться после исследования ингредиентов изделия. Соответственно план исследования и интерпретация результатов могут быть неопределенными, но несколько примеров подтверждают и отражают эту возможность. В исследованиях на животных с экстрактами ацетона из свитера, вызвавшего контактный дерматит у людей, выявлены аллергены (хлорофенилгидразоны фосгена) [11]. В другом случае в результате исследования на животных с экстрактами ацетона/хлороформа из резиновых сапог, вызвавших контактный дерматит у человека, выявлены каузативные аллергены меркаптобензотиазол и дибензотиазилдисульфид [10]. Четко продемонстрирована необходимость использования надлежащего органического растворителя. Экстракты, подготовленные с органическим растворителем, вызвали гиперчувствительность на морских свинках, в то время как экстракты с солевым раствором не вызвали такой реакции.

В Японии согласно руководству по основным биологическим исследованиям медицинских материалов и изделий (1995 г.) [4] рекомендована процедура приготовления пробы с органическим растворителем, с последующим выпариванием до получения осадка, а также процедура оценки риска путем сравнения процента выхода осадка из материала с минимальным процентным раствором осадка (смесью), которая индуцирует кожную сенсибилизацию на животных.

Методы исследования кожной сенсибилизации *in vitro* для рутинного использования пока не доступны, но, учитывая введение новых правил в Европе, запрещающих испытания на животных для исследования косметических средств, высока вероятность появления новых стратегий для идентификации кожных аллергенов (см. приложение С).

Приложение ДА
(справочное)

Сведения о соответствии ссылочных международных стандартов межгосударственным стандартам

Таблица ДА.1

Обозначение ссылочного международного стандарта	Степень соответствия	Обозначение и наименование соответствующего межгосударственного стандарта
ISO 10993-1	IDT	ГОСТ ISO 10993-1—2021 «Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 1. Оценка и исследования в процессе менеджмента риска»
ISO 10993-2	—	*, 1)
ISO 10993-12	IDT	ГОСТ ISO 10993-12—2023 «Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 12. Отбор и подготовка образцов для проведения исследований»
ISO 10993-18	IDT	ГОСТ ISO 10993-18—2022 «Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 18. Исследование химических свойств материалов в рамках процесса менеджмента риска»

* Соответствующий межгосударственный стандарт отсутствует. До его принятия рекомендуется использовать перевод на русский язык данного международного стандарта.

Примечание — В настоящей таблице использовано следующее условное обозначение степени соответствия стандартов:

- IDT — идентичные стандарты.

1) В Российской Федерации действует ГОСТ Р ИСО 10993-2—2009 «Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 2. Требования к обращению с животными».

Библиография

Общие ссылки для исследований кожной сенсибилизации

[1] Organization for Economic Cooperation and Development (OECD), Guidelines for the testing of chemicals No. 406, Skin sensitization, OECD Publications, 1992

[2] de Silva O., Basketter D.A., Barratt M.D. et al. *Alternative methods for skin sensitization testing*, The Report and Recommendations of ECVAM Workshop 19, ATLA, 24, pp. 683—705, 1996

[3] MHLW Notification by Director, MDED, Yakuseikishin—hatsu 0106 No.1, Jan. 6, 2020. Amendment of Basic Principles of Biological Safety Evaluation Required for Application for Approval to Market Medical Devices

[4] *Japanese Guidelines of Basic Biological Tests of Medical Materials and Devices*, 1995

Библиография для исследований кожной сенсибилизации

[5] Organization for Economic Cooperation and Development (OECD), The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins, OECD Series on Testing and Assessment, n° 168, Éditions OCDE, Paris, 2014, https://doi.org/10.1787/9789264221444—en

[6] Andersen K.E., Vølund A. Frankild S. The guinea pig maximization test with a multiple dose design, Acta Derm. Venereol., 75, pp. 463—469, 1995

[7] Buehler E.V. Delayed contact hypersensitivity in the guinea pig, Arch. Dermatol., 91, pp. 171—175, 1965

[8] European Chemical Industry Ecology and Toxicology Centre *Skin sensitization testing for the purpose of hazard identification and risk assessment*, Monograph 29, Brussels, Belgium, 2000

[9] Frankild S., Vølund A., Wahlberg J.E. et al. Comparison of the sensitivities of the Buehler test and the guinea pig maximization test for predictive testing of contact allergy, Acta Derm. Venereol., 80, pp. 256—262, 2000

[10] Kaniwa M.A., Momma J., Ikarashi Y. et al. A method for identifying causative chemicals of allergic contact dermatitis using a combination of chemical analysis and patch testing in patients and animal groups: application to a case of rubber boot dermatitis, Contact Dermatitis, 27, pp. 166—173, 1992

[11] Kojima S., Momma J., Kaniwa M.A. Phosgene (chlorophenyl) hydrazones, strong sensitizers found in yellow sweaters bleached with sodium hypochlorite, defined as causative allergens for contact dermatitis by an experimental screening method in animals, Contact Dermatitis, 23, pp. 129—141, 1990 [published erratum appears in Contact Dermatitis, 23, p. 383]

[12] Landsteiner K., Chase M.W. Studies on the sensitization of animals with simple chemical compounds, J. Exp. Med., 69, p. 767, 1939

[13] Magnusson B., Kligman A.M. The identification of contact allergens by animal assay. The guinea pig maximization test, J. Invest. Dermatol., 52, pp. 268—276, 1969

[14] Nakamura A., Momma J., Sekignchi H. et al. A new protocol and criteria for quantitative determination of sensitization potencies of chemicals by guinea pig maximization test, Contact Dermatitis, 31, pp. 72—85, 1994

Библиография для LLNA

[15] Albers R., Broeders A., Van Der Pijl A. et al. The use of reporter antigens in the popliteal lymph node assay to assess immonomodulation by chemicals, Toxicol. Appl. Pharmacol., 143, pp. 102—109, 1997

[16] Basketter D.A., Lea L.J., Cooper K. et al. Threshold for classification as a skin sensitizer in the local lymph node assay: a statistical evaluation, Food. Chem. Toxicol., 37, pp. 1167—1174, 1999

[17] Basketter D.A., Roberts D.W., Cronin M. et al. The value of the local lymph node assay in quantitative structure—activity investigations, Contact Dermatitis, 27, pp. 137—142, 1992

[18] Basketter D.A., Scholes E.W., Kimber I. The performance of the local lymph node assay with chemicals identified as contact allergens in the human maximization test, Food. Chem. Toxicol.,32, pp. 543—547, 1994

[19] De Bakker J.M., Kammüller M.E., Muller E.S.M. et al. Kinetics and morphology of chemically induced popliteal lymph node reactions compared with antigen—mitogen—, and graft—versus—hostreaction—induced—responses, Virchows Archiv. B Cell Pathol., 58, pp. 279—287, 1990

[20] Dean J., Twerdok L.E., Andersen K.E. et al. *The murine local lymph node assay: A test method for assessing the allergic contact dermatitis potential of chemicals/compounds*, NIH publication No. 99—494, Research Triangle Park, 1999, available at https://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/ docs/immunotox docs/llna/llnarep.pdf

[21] Dearman R.J., Basketter D.A., Kimber I. Local lymph node assay: use in hazard and risk assessment, J. Appl. toxicol., 19, pp. 299—306, 1999

[22] Descotes J., Patriarca C., Vial T. et al. The popliteal lymph node assay in 1996, Toxicol., 119, pp. 45—49, 1997

[23] Gerberick G.F., Gruse L.W., Ryan C.A. Local lymph node assay: differentiating allergic and irritant responses using flow cytometry, Methods, 19, pp. 48—55, 1999(a)

[24] Gerberick G.F., Gruse L.W., Miller C.M. et al. Selective modulation of B—cell activation markers CD86 and I—AK on murine draining lymph node cells following allergen or irritant treatment, Toxicol. Appl. Pharmacol, 159, pp. 142—151, 1999(b)

[25] Ikarashi Y., Tsuchiya T., Nakamura A. A sensitive mouse lymph node assay with two application phases for detection of contact allergens, Arch. Toxicol., 67, pp. 629—636, 1993

[26] Kimber I., Hilton J., Dearman R.J. et al. An international evaluation of the murine local lymph node assay and comparison of modified procedures, Toxicol., 103, pp. 63—73, 1995

[27] Lea L.J., Warbrick E.V., Dearman R.J. et al. The impact of vehicle on assessment of relative skin sensitization potency or 1,4—dihydroquinone in the local lymph node assay, Am. J. Contact Dermatitis, 10, pp. 213—218, 1999

[28] Loveless S.E., Ladics G.S., Gerberick G.F. et al. Further evaluation of the local lymph node assay in the final phase of an international collaborative trial, Toxicol., 108, pp. 141—52, 1996

[29] Montelius J., Wahlkvist H., Boman A. et al. Experience with the murine local lymph node assay: inability to discriminate between allergens and irritants, Acta Derm. Venereol., 74, pp. 22—27, 1994

[30] Roberts D.W. Structure—activity relationships of skin sensitization potential of diacrylates and dimethacrylates, Contact Dermatitis, 17, pp. 281—289, 1987

[31] Vial T., Carleer J., Legrain B. et al. The popliteal lymph node assay: results of a preliminary interlaboratory validation study, Toxicol., 122, pp. 213—218, 1997

[32] Warbrick E.V., Dearman R.J., Lea L.J. et al. Local lymph node assay responses to paraphenylenediamine: intra— and inter—laboratory evaluations, J. Appl. Toxicol., 19, pp. 225—260, 1999

[33] Organization for Economic Cooperation and Development (OECD), Guideline for the testing of chemicals No. 429, Skin sensitisation: Local lymph node assay, OECD Publications, 2010

[34] Ryan C.A., Cruse L.W., Skinner R.A. et al. Examination of a vehicle for use with water soluble materials in the murine local lymph node assay, Food Chem Toxicol., 40, pp. 1719—1725, 2002

[35] Woolhiser M.R., Munson A.E., Meade B.J. Comparison of mouse strains using the local lymph node assay, Toxicology 146, pp. 221—227, 2000

[36] Takeyoshi M., Noda S., Yamasaki K. et al. Advantage of using CBA/N strain mice in a nonradioisotopic modification of the local lymph node assay, J. Appl. Toxicol., 26, pp. 5—9, 2006

[37] Van Och F.M.M., Slob W., De Jong W.H. et al. A quantitative method for assessing the sensitizing potency of low molecular weight chemicals using a local lymph node assay: employment of a regression method that includes determination of the uncertainty margins, Toxicology, 146, pp. 49—59, 2000

[38] De Jong W.H., Van Och F.M.M., Den Hartog Jager C.F. et al. Ranking of allergenic potency of rubber chemicals in a modified local lymph node assay, Toxicol. Sc., 66, pp. 226—232, 2002

[39] Dean J.H., Twerdok L.E., Tice R.R. et al. ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay. II Conclusions and recommendations of an independent scientific peer review panel, Regul. Toxicol. Pharmacol., 34, pp. 258—273, 2001

[40] Hanek K.E., Tice R.R., Carson B.L. et al. ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay. III Data analysis completed by the National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods, Regul. Toxicol. Pharmacol., 34, pp. 274—286, 2001

[41] ASTM F2148—13, *Standard Practice for Evaluation of Delayed Contact Hypersensitivity Using the Murine Local Lymph Node Assay (LLNA)*

[42] Organization for Economic Cooperation and Development (OECD), Test No. 442B: Skin Sensitization: Local Lymph Node Assay: BrdU—ELISA or —FCM, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, Éditions OCDE, Paris, 2018, https://doi.org/10.1787/9789264090996—en

[43] Lee J.K., Park J.H., Park S.H. et al. A nonradioisotopic endpoint for measurement of lymph node cell proliferation in a murine allergic contact dermatitis model, using bromodeoxyuridine immunohistochemistry, J. Pharmacol. Toxicol. Methods, 48, pp. 53—61, 2002

[44] ICCVAM, 2010. ICCVAM Test Method Evaluation Report on Using the LLNA for Testing Pesticide Formulations, Metals, Substances in Aqueous Solutions, and Other Products. NIH Publication No. 10—7512. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences.

Библиография для исследования кожной сенсибилизации *in vitro*

[45] Basketter D., Maxwell G. In vitro approaches to the identification and characterization of skin sensitizers, Cutaneous and Ocular Toxicol., 26, pp. 359—373, 2007

[46] Ashikaga T., Yoshida Y., Hirota M et al. Development of an in vitro skin sensitization test using human cell lines: The human Cell Line Activation Test (h—CLAT) I. Optimization of the h—CLAT protocol, Toxicology in vitro, 20, pp. 767—773, 2006

[47] Sakaguchi H., Ashikaga T., Miyazawa M. et al. Development of an in vitro skin sensitization test using human cell lines: the human Cell Line Activation Test (h—CLAT) II. An inter—laboratory study of the h—CLAT, Toxicology in vitro, 20, pp. 774—784, 2006

[48] Ashikaga T., Sakaguchi H., Okamoto K. et al. Assessment of the human Cell Line Activation Test (h—CLAT) for Skin Sensitization; Results of the First Japanese Inter—laboratory Study, Alternatives to Animal Testing and Experimentation, 13, pp. 27—35, 2008

[49] EURL CVAM, European Union Reference Laboratory for alternatives to animal testing, https://ec.europa.eu/jrc/en/eurl/ecvam

[50] Gibbs S., Kosten I., Veldhuizen R., Spiekstra S., Corsini E., Roggen E., Rustemeyer T., Feilzer A.J., Kleverlaan C.J. Assessment of metal sensitizer potency with the reconstructed human epidermis IL—18 assay. Toxicology. 393, pp. 62—72, 2018

[51] HAUGEN E. and HENSTEN—PETTERSEN A. The sensitizing potential of periodontal dressings. J.Dent. Res., 57, pp. 950—953, 1978

[52] Johansson H., Gradin R., Forreryd A., Agemark M., Zeller K., Johansson A., Larne O., van Vlier E., Borrebaeck C., Lindstedt M. Evaluation of the GARD assay in a blind Cosmetics Europe study. ALTEX, 34, pp. 515—523, 2017

[53] Roberts D.W. Is a combination of assays really needed for non—animal prediction of skin sensitization potential? Performance of the GARD™ (Genomic Allergen Rapid Detection) assay in comparison with OECD guideline assays alone and in combination. Regul Toxicol Pharmacol, 98, pp. 155—160, 2018

[54] Cottrez F., Boitel E., Ourlin J.C., Peiffer J.L., Fabre I., Henaoui I.S., Mari B., Vallauri A., Paquet A., Barbry P., Auriault C., Aeby P., Groux H., SENS—IS, a 3D reconstituted epidermis based model for quantifying chemical sensitization potency: Reproducibility and predictivity results from an inter—laboratory study. Toxicol In Vitro, 32, pp. 248—260, 2016

[55] Kimber I., Dearman R.J., Betts C.J., Gerberick G.F., Ryan C.A., Kern P.S., Patlewicz G.Y., Basketter D.A. The local lymph node assay and skin sensitization: a cut—down screen to reduce animal requirements? Contact Dermatitis, 54, pp. 181—185, 2006

Библиография для исследования сенсибилизации *in vitro* (общие ссылки)

[56] Ankley G. T., Bennett R. S., Erickson R. J., Hoff D. J., Hornung M. W., Johnson R. D., Mount D. R., Nichols J. W., Russom C. L., Schmieder P. K., Serrrano J. A., Tietge J. E., Villeneuve D. L. (2010). Adverse outcome pathways: A conceptual framework to support ecotoxicology research and risk assessment. Environmental Toxicology and Chemistry 29:730—741

[57] Casati S. (2017) Contact hypersensitivity: Integrated approaches to testing and assessment. Current Opinion in Toxicology 5:1—5

[58] Ezendam J., Braakhuis H. M., Vandebriel R. J. (2016) State of the art in non—animal approaches for skin sensitization testing: from individual test methods towards testing strategies. Arch Toxicol. 90(12):2861—2883

[59] Hoffmann S., Kleinstreuer N., Alépée N., Allen D., Api A. M., Ashikaga T., Clouet E., Cluzel M., Desprez B., Gellatly N., Goebel C., Kern P. S., Klaric M., Kühnl J., Lalko J. F., Martinozzi—Teissier S., Mewes K., Miyazawa M., Parakhia R., van Vliet E., Zang Q., Petersohn D. (2018) Non—animal methods to predict skin sensitization (I): the Cosmetics Europe database. Crit Rev Toxicol. 48(5):344—358

[60] Kimber I., Travis M. A., Martin S. F., Dearman R. J. Immunoregulation of skin sensitization and regulatory T cells. 2012. Contact Dermatitis 67(4):179—83

[61] Kleinstreuer N. C., Hoffmann S., Alépée N., Allen D., Ashikaga T., Casey W., Clouet E., Cluzel M., Desprez B., Gellatly N., Göbel C., Kern P. S., Klaric M., Kühnl J., Martinozzi—Teissier S., Mewes K., Miyazawa M., Strickland J., van Vliet E., Zang Q., Petersohn D. (2018) Non—animal methods to predict skin sensitization (II): an assessment of defined approaches. Crit Rev Toxicol. 48(5):359—374

[62] Martin S. F., Esser P. R., Weber F. C., Jakob T., Freudenberg M. A., Schmidt M., Goebeler M. (2011) Mechanisms of chemical—induced innate immunity in allergic contact dermatitis. Allergy 66(9):1152—63

[63] OECD, 2017. Revised Guidance Document on Developing and Assessing Adverse Outcome Pathways. Series on Testing & Assessment No. 184. ENV/JM/MONO (2013)6. Organization for Economic Co—operation and Development. Paris. 32 pp. Available at: http://search.oecd.org/officialdocuments/displaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono(2013)6&doclanguage=en

[64] Organization for Economic Cooperation and Development (OECD), Guidance Document on the Reporting of Defined Approaches to be Used Within Integrated Approaches to Testing and Assessment, OECD Series on Testing and Assessment, n° 255, Éditions OCDE, Paris, 2017, Available at: https://doi.org/10.1787/9789264274822—en

[65] Reisinger K., Hoffmann S., Alépée N., Ashikaga T., Barroso J., Elcombe C., Gellatly N., Galbiati V., Gibbs S., Groux H., Hibatallah J., Keller D., Kern P., Klaric M., Kolle S., Kuehnl J., Lambrechts N., Lindstedt M., Millet M., Martinozzi—Teissier S., Natsch A., Petersohn D., Pike I., Sakaguchi H., Schepky A., Tailhardat M., Templier M., van Vliet E., Maxwell G. (2015) Systematic evaluation of non—animal test methods for skin sensitisation safety assessment. Toxicol In Vitro 29(1):259—70

[66] Strickland J., Zang Q., Kleinstreuer N., Paris M., Lehmann D. M., Choksi N., Matheson J., Jacobs A., Lowit A., Allen D., Casey W. (2016) Integrated decision strategies for skin sensitization hazard. J Appl Toxicol. 36(9):1150—62

[67] Urbisch D., Honarvar N., Kolle S. N., Mehling A., Ramirez T., Teubner W., Landsiedel R. (2016) Peptide reactivity associated with skin sensitization: The QSAR Toolbox and TIMES compared to the DPRA. Toxicol In Vitro 34:194—203

[68] Urbisch D., Mehling A., Guth K., Ramirez T., Honarvar N., Kolle S., Landsiedel R., Jaworska J., Kern P. S., Gerberick F., Natsch A., Emter R., Ashikaga T., Miyazawa M., Sakaguchi H. (2015) Assessing skin sensitization hazard in mice and men using non—animal test methods. Regul Toxicol Pharmacol. 71(2):337—51

[69] Van der Veen J. W., Pronk T. E., Van Loveren H., Ezendam J. (2013) Applicability of a keratinocyte gene signature to predict skin sensitizing potential. Toxicol In Vitro 27(1):314—322

[70] Van der Veen J. W., Rorije E., Emter R., Natsch A., van Loveren H., Ezendam J. (2014) Evaluating the performance of integrated approaches for hazard identification of skin sensitizing chemicals. Regul Toxicol Pharmacol. 69(3):371—9

[71] Van der Veen J. W., Vandebriel R., Van Loveren H., Ezendam J. (2011) Keratinocytes, innate immunity and allergic contact dermatitis — opportunities for the development of in vitro assays to predict the sensitizing potential of chemicals. DOI: 10.5772/28337. In: Ro YS, (ed) Contact dermatitis. DOI: 10.5772/1167. ISBN: 978—953—307—577—8

[72] Safford R.J. (2008) The dermal sensitisation threshold— a TTC approach for allergic contact dermatitis. Regul. Toxicol. Pharmacol. 51:195—200

[73] Myers D.K., Goldberg A.M., Poth A., Wolf M.F., Carraway J., McKim J., Coleman K.P., Hutchinson R., Brown R., Krug H.F., Bahinski A., Hartung T. (2017) From In Vivo to In Vitro: The Medical Device Testing Paradigm Shift. ALTEX 34(4):479—500

Библиография для исследования сенсибилизации *in vitro* (DPRA)

[74] Gerberick G.F., Vassallo J.D., Bailey R.E., Chaney J.G., Morrall S.W., Lepoittevin J.P. (2004) Development of a peptide reactivity assay for screening contact allergens. Toxicol Sci. 81(2):332—43

[75] Organization for Economic Cooperation and Development (OECD), Test No. 442C: In Chemico Skin Sensitisation: Assays addressing the Adverse Outcome Pathway key event on covalent binding to proteins, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, Éditions OCDE, Paris, 2019, Available at: https://doi.org/10.1787/9789264229709—en

[76] Urbisch D., Mehling A., Guth K., Ramirez T., Honarvar N., Kolle S., Landsiedel R., Jaworska J., Kern P.S., Gerberick F., Natsch A., Emter R., Ashikaga T., Miyazawa M., Sakaguchi H. (2015) Assessing skin sensitization hazard in mice and men using non—animal test methods. Regul Toxicol Pharmacol. 71(2):337—351

Библиография для исследования сенсибилизации *in vitro* (KeratinoSens™)

[77] EURL ECVAM, 2014. Recommendation on the KeratinoSens™ assay for skin sensitization testing, 42 pp. Available at: https://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_labs/eurl—ecvam/eurl—ecvam—recommendations/recommendation—keratinosens—skin—sensitisation

[78] Fabian E., Vogel D., Blatz V., Ramirez T., Kolle S., Eltze T., van Ravenzwaay B., Oesch F., Landsiedel R. (2013) Xenobiotic metabolizin enzyme activities in cells used for testing skin sensitization in vitro. Arch Toxicol 87(9):1683—1969

[79] OECD, 2018. Test No. 442D: In Vitro Skin Sensitisation: ARE—Nrf2 Luciferase Test Method. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4. OECD Publishing, Paris. https://doi.org/10.1787/9789264229822—en

[80] Thorne N., Inglese J., Auld D.S. (2010) Illuminating Insights into Firefly Luciferase and Other Bioluminescent Reporters Used in Chemical Biology. Chemistry and Biology 17(6):646—657

Библиография для исследования сенсибилизации *in vitro* (LuSens)

[81] EURL ECVAM, 2018. The LuSens test method Validation Study Report. Доступно по адресу: https://tsar.jrc.ec.europa.eu/test—method/tm2011—10

[82] OECD, 2018. Test No. 442D: In Vitro Skin Sensitisation: ARE—Nrf2 Luciferase Test Method. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4. OECD Publishing, Paris. https://doi.org/10.1787/9789264229822—en

[83] Ramirez T., Mehling A., Kolle S.N., Wruck C.J., Teubner W., Eltze T., Aumann A., Urbisch D., van Ravenzwaay B., Landsiedel R. (2014) LuSens: a keratinocyte based ARE reporter gene assay for use in integrated testing strategies for skin sensitization hazard identification. Toxicol. In Vitro 28, 1482—1497

[84] Ramirez T., Stein N., Aumann A., Remus T., Edwards A., Norman K.G., Ryan C., Bader J.E., Fehr M., Burleson F., Foertsch L., Wang X., Gerberick F., Beilstein P., Hoffmann S., Mehling A., van Ravenzwaay B., Landsiedel R. (2016) Intra— and inter—laboratory reproducibility and accuracy of the LuSens assay: A reporter gene—cell line to detect keratinocyte activation by skin sensitizers. Toxicol. In Vitro 32, 278—286

Библиография для исследования сенсибилизации *in vitro* (SENS—IS)

[85] Cottrez F., Boitel E., Auriault C., Aeby P., Groux H. (2015) Genes specifically modulated in sensitized skins allow the detection of sensitizers in a reconstructed human skin model. Development of the SENS—IS assay. Toxicol In Vitro 29 (4):787—802

[86] Cottrez F., Boitel E., Pellevoisin C., Alonso A., Seyler S., Groux H. (2016a). Evaluation of the SkinEthic RHE model in the SENS—IS assay for prediction of skin sensitization of chemicals. Society of Toxicology Annual Meeting, New Orleans, Louisiana, USA

[87] Cottrez F., Boitel E., Ourlin J.C., Peiffer J.L., Fabre I., Henaoui I.S., Mari B., Vallauri A., Paquet A., Barbry P., Auriault C., Aeby P., Groux H. (2016b) SENS—IS, a 3D reconstituted epidermis based model for quantifying chemical sensitization potency: Reproducibility and predictivity results from an inter—laboratory study. Toxicol In Vitro 32:248—60

[88] Cottrez F., Pellevoisin C., Coleman K., Groux H. (2018) In vitro assessment of medical device extracts potential to produce skin sensitization. Toxicology Letters Volume 295, Supplement 1, 10 October, Page S179, https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2018.06.827

[89] Uruno A., Motohashi H. (2011) The Keap1—Nrf2 system as an in vivo sensor for electrophiles. Nitric Oxide 25(2):153—60

[90] Cottrez F., Boitel E., Berrada—Gomez M.P., Dalhuchyts H., Bidan C., Rattier S., Ferret P.J., Groux H. (2020). In Vitro Measurement of Skin Sensitization Hazard of Mixtures and Finished Products: Results Obtained With the SENS—IS Assays. Toxicol In Vitro 62:104644

[91] Bergal M., Puginier M., Gerbeix C., Groux H., Roso A., Cottrez F., Milius A. (2020) In vitro testing strategy for assessing the skin sensitizing potential of «difficult to test» cosmetic ingredients. Toxicol In Vitro 65:104781

Библиография для исследования сенсибилизации *in vitro* (Набор IL—18 RHE)

[92] Andres E., Barry M., Hundt A., Dini C., Corsini E., Gibbs S., Roggen E. L., Ferret P. J. (2017) Preliminary performance data of the RHE/IL—18 assay performed on SkinEthic™ RHE for the identification of contact sensitizers. Int J Cosmet Sci. 39(2):121—132

[93] Galbiati V., Papale A., Marinovich M., Gibbs S., Roggen E.L., Corsini E. (2017). Development of an in vitro method to estimate the sensitization induction level of contact allergens. Toxicology Letters 271:1—11

[94] Gibbs S., Kosten I., Veldhuizen R., Spiekstra S., Corsini E., Roggen E., Rustemeyer T., Feilzer A. J., Kleverlaan C. J. (2018) Assessment of metal sensitizer potency with the reconstructed human epidermis IL—18 assay. Toxicology 393:62—72

[95] Gibbs S., Corsini E., Spiekstra S.W., Galbiati V., Fuchs H.W., Degeorge G., Troese M.J., Hayden P.M., Deng W., Roggen E. (2013) An epidermal equivalent assay for identification and ranking potency of contact sensitizers. Toxicology and Applied Pharmacology 272(2):529—41

Библиография для исследования сенсибилизации *in vitro* (EpiSensA)

[96] Saito K., Nukada Y., Takenouchi O., Miyazawa M., Sakaguchi H., Nishiyama N. (2013) Development of a new in vitro skin sensitization assay (Epidermal Sensitization Assay; EpiSensA) using reconstructed human epidermis. Toxicol In Vitro 27(8):2213—24

[97] Saito K., Takenouchi O., Nukada Y., Miyazawa M., Sakaguchi H. (2017) An in vitro skin sensitization assay termed EpiSensA for broad sets of chemicals including lipophilic chemicals and pre/pro—haptens. Toxicol In Vitro 40:11—25

Библиография для исследования сенсибилизации *in vitro* (SenCeeTox®)

[98] Coleman K.P., McNamara L.R., Grailer T.P., Willoughby J.A.Sr, Keller D.J., Patel P., Thomas S., Dilworth C. (2015) Evaluation of an In Vitro Human Dermal Sensitization Test for Use with Medical Device Extracts. Applied In Vitro Toxicology 1(2): 118—130

[99] McKim J.M.Jr, Keller D.J.III, Gorski J.R. (2010) A new in vitro method for identifying chemical sensitizers combining peptide binding with ARE/EpRE—mediated gene expression in human skin cells. Cutaneous and Ocular Toxicology 29(3):171—192

[100] McKim J.M.Jr., Keller D.J.III, Gorski J.R. (2012). An in vitro method for detecting chemical sensitization using human reconstructed skin models and its applicability to cosmetic, pharmaceutical, and medical device safety testing. Cutaneous and Ocular Toxicology 31(4):292—305

Библиография для исследования сенсибилизации *in vitro* (h—CLAT)

[101] Ashikaga T., Yoshida Y., Hirota M., Yoneyama K., Itagaki H., Sakaguchi H., Miyazawa M., Ito Y., Suzuki H., Toyoda H. (2006) Development of an in vitro skin sensitization test using human cell lines: The human Cell Line Activation Test (h—CLAT) I. Optimization of the h—CLAT protocol. Toxicol. In Vitro 20:767—773

[102] EC EURL ECVAM, 2015. Re—analysis of the within and between laboratory reproducibility of the human Cell Line Activation Test (h—CLAT). Доступно по адресу: https://eurl—ecvam.jrc.ec.europa.eu/eurl—ecvam—recommendations/eurl—ecvam—recommendation—on—the human—cell—line—activation—test—h—clat—for—skin—sensitisation—testing

[103] Fabian E., Vogel D., Blatz V., Ramirez T., Kolle S., Eltze T., van Ravenzwaay B., Oesch F., Landsiedel R. (2013) Xenobiotic metabolizing enzyme activities in cells used for testing skin sensitization in vitro. Arch Toxicol 87:1683—1969

[104] OECD, 2018. Test No. 442E: In Vitro Skin Sensitisation: In Vitro Skin Sensitisation assays addressing the Key Event on activation of dendritic cells on the Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, https://doi.org/10.1787/9789264264359—en

[105] Takenouchi O., Miyazawa M., Saito K., Ashikaga T., Sakaguchi H. (2013) Predictive performance of the human Cell Line Activation Test (h—CLAT) for lipophilic with high octanolwater partition coefficients. J. Toxicol. Sci. 38:599—609

Библиография для исследования сенсибилизации *in vitro* (U—SENS™)

[106] Alépée N., Piroird C., Aujoulat M., Dreyfuss S., Hoffmann S., Hohenstein A., Meloni M., Nardelli L., Gerbeix C., Cotovio J. (2015) Prospective multicentre study of the U—SENS test method for skin sensitization testing. Toxicol In Vitro 30:373—382

[107] EURL ECVAM, 2017. The U—SENS™ test method Validation Study Report. Доступно по адресу: https://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_labs/eurl—ecvam/eurl—ecvam—recommendations

[108] OECD, 2018. Test No. 442E: In Vitro Skin Sensitisation: In Vitro Skin Sensitisation assays addressing the Key Event on activation of dendritic cells on the Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, https://doi.org/10.1787/9789264264359—en

[109] Piroird C., Ovigne J.M., Rousset F., Martinozzi—Teissier S., Gomes C., Cotovio J., Alépée N. (2015) The Myeloid U937 Skin Sensitization Test (U—SENS) addresses the activation of dendritic cell event in the adverse outcome pathway for skin sensitization. Toxicol. In Vitro 29:901—916

Библиография для исследования сенсибилизации *in vitro* (Набор IL—8 Luc)

[110] Kimura Y., Fujimura C., Ito Y., Takahashi T., Nakajima Y., Ohmiya Y., Aiba S. (2015) Optimization of the IL—8 Luc assay as an in vitro test for skin sensitization, Toxicol In Vitro 29:1816—30

[111] OECD, 2018. Test No. 442E: In Vitro Skin Sensitisation: In Vitro Skin Sensitisation assays addressing the Key Event on activation of dendritic cells on the Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, https://doi.org/10.1787/9789264264359-en

[112] OECD, 2017. Report of the Peer Review Panel for the IL—8 Luciferase (IL—8 Luc) Assay for in vitro skin sensitisation. Series on Testing and Assessment No. 258, ENV/JM/MONO(2017)20. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series—testing—assessment—publications—number.htm

Библиография для исследования сенсибилизации *in vitro* (GARD™)

[113] Forreryd A., Johansson H., Albrekt A. S., Lindstedt M. (2014) Evaluation of high throughput gene expression platforms using a genomic biomarker signature for prediction of skin sensitization. BMC Genomics 15:379

[114] Forreryd A., Zeller K.S., Lindberg T., Johansson H., Lindstedt M. (2016) From genomewide arrays to tailor—made biomarker readout — Progress towards routine analysis of skin sensitizing chemicals with GARD. Toxicol In Vitro 37:178—188

[115] Johansson H., Albrekt A.S., Borrebaeck C.A., Lindstedt M. (2013) The GARD assay for assessment of chemical skin sensitizers. Toxicol In Vitro 27(3):1163—9

[116] Johansson H., Lindstedt M., Albrekt A.S., Borrebaeck C.A. (2011) A genomic biomarker signature can predict skin sensitizers using a cell—based in vitro alternative to animal tests. BMC Genomics. 12:399

[117] Roberts D. W. (2018) Is a combination of assays really needed for non—animal prediction of skin sensitization potential? Performance of the GARD™ (Genomic Allergen Rapid Detection) assay in comparison with OECD guideline assays alone and in combination. Reg. Toxocol. Pharmacol. 98:155—160

[118] Johansson H., Gradin R., Johansson A., Adriaens E., Edwards A., Zuckerstätter V., Jerre A., Burleson F., Gehrke H., Roggen E. (2019) Validation of the GARD™skin Assay for Assessment of Chemical Skin Sensitizers: Ring Trial Results of Predictive Performance and Reproducibility. Toxicological Sciences, 170 (2): 374—381

[119] Jenvert R. M., Johansson A., Larne O., Aaltonen E., Jerre A., Gradin R., Johansson H. (2019) In vitro skin sensitization testing of Medical Devices using GARD®. Toxicology Letters, volume 31, Supplement 1, 10 October, 155

[120] ISO 10993—5, *Biological evaluation of medical devices — Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity*

[121] OECD, 2020. OECD Test Guidelines Programme, Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: http://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/oecd—guidelines—testing—chemicals—related—documents.htm

[122] OCDE. 2010, Test No. 442A: Skin Sensitization: Local Lymph Node Assay: DA, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, Éditions OCDE, Paris, https://doi.org/10 .1787/9789264090972—en

[123] OCDE. 2018, Test No. 442B: Skin Sensitization: Local Lymph Node Assay: BrdU—ELISA or—FCM, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, Éditions OCDE, Paris, https://doi.org/10.1787/9789264090996—en

[124] OCDE. 2017, Guidance Document on the Reporting of Defined Approaches and Individual Information Sources to be Used within Integrated Approaches to Testing and Assessment (IATA) for Skin Sensitisation, OECD Series on Testing and Assessment, n° 256, Éditions OCDE, Paris, https://doi.org/10.1787/9789264279285—en

[125] ISO/IEC 17025, *General requirements for the competence of testing and calibration laboratories*

УДК 615.46:002:006.354 МКС 11.100.20 IDT

Ключевые слова: медицинское изделие, аллерген, эритема, индукция, сенсибилизация

Редактор *Л.С. Зимилова*
Технический редактор *И.Е. Черепкова*
Корректор *С.И. Фирсова*
Компьютерная верстка *М.В. Малеевой*

Сдано в набор 11.10.2023. Подписано в печать 23.10.2023. Формат 60×84⅛. Гарнитура Ариал.
Усл. печ. л. 5,58. Уч.-изд. л. 5,02.

Подготовлено на основе электронной версии, предоставленной разработчиком стандарта

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

Поправка к ГОСТ ISO 10993-10—2023 Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 10. Исследования сенсибилизирующего действия

В каком месте	Напечатано	Должно быть		
Предисловие. Таблица согласования	—	Таджикистан	TJ	Таджикстандарт

(ИУС № 4 2024 г.)

IDTISO 10993-10-2023