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

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

ГОСТ 32635— 2020

МЕТОДЫ ИСПЫТАНИЯ ПО ВОЗДЕЙСТВИЮ ХИМИЧЕСКОЙ ПРОДУКЦИИ НА ОРГАНИЗМ ЧЕЛОВЕКА

Микроядерный тест на клетках млекопитающих *in vitro*

Издание официальное

Москва
Стандартинформ
2020

Предисловие

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

Сведения о стандарте

1 ПОДГОТОВЛЕН Федеральным государственным унитарным предприятием «Российский научно-технический центр информации по стандартизации, метрологии и оценке соответствия» (ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ») на основе собственного перевода на русский язык англоязычной версии документа, указанного в пункте 5

2 ВНЕСЕН Федеральным агентством по техническому регулированию и метрологии

3 ПРИНЯТ Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации (протокол от 30 июня 2020 г. № 131-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
Казахстан	KZ	Госстандарт Республики Казахстан
Киргизия	KG	Кыргызстандарт
Россия	RU	Росстандарт
Таджикистан	TJ	Таджикстандарт

4 Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 22 октября 2020 г. № 909-ст межгосударственный стандарт ГОСТ 32635—2020 введен в действие в качестве национального стандарта Российской Федерации с 1 июля 2021 г.

5 Настоящий стандарт является модифицированным по отношению к международному документу OECD Test № 487:2016 «Руководство по испытанию химических веществ. Микроядерный тест на клетках млекопитающих *in vitro*» («Guideline for testing of chemicals. *In Vitro* Mammalian Cell Micronucleus Test», MOD) путем:

- включения раздела 1, дополнительных сокращений (подраздел 2.2), которые выделены в тексте курсивом;
- изменения его структуры для приведения в соответствие с правилами, установленными в ГОСТ 1.5 (подразделы 4.2 и 4.3).

Сопоставление структуры настоящего стандарта со структурой указанного международного документа приведено в дополнительном приложении ДА.

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

6 ВЗАМЕН ГОСТ 32635—2014

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

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

© Стандартинформ, оформление, 2020

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 Термины, определения и сокращения 1
3 Основные положения и ограничения 3
4 Принципы испытания 3
5 Описание метода 3
6 Проведение испытаний 8
7 Данные и отчетность 12
Приложение А (справочное) Формулы для оценки цитотоксичности 16
Приложение ДА (справочное) Сопоставление структуры настоящего стандарта со структурой примененного в нем международного документа 18
Библиография 21

Введение

Руководства Организации экономического сотрудничества и развития (OECD) по испытаниям химических веществ периодически пересматриваются в связи с научным прогрессом, меняющимися нормативными требованиями, а также в целях защиты животных. Первоначальная версия руководства OECD Test № 487 была принята в 2010 г. В 2016 г. она была пересмотрена в контексте общего пересмотра руководств OECD по генетической токсичности и отражает накопленный опыт проведения испытаний и интерпретации данных. Настоящее руководство является частью серии руководств по генетической токсикологии. В нем представлены краткая информация об испытании генетической токсичности и обзор последних изменений[1)].

Микроядерный (MNvit) анализ *in vitro* — это метод оценки генотоксичности по выявлению микроядер (MN) в цитоплазме интерфазных клеток. Микроядра могут образовывать ацентрические фрагменты хромосом (т.е. с отсутствием центромеры) или целые хромосомы, которые не способны мигрировать к полюсам на стадии анафазы клеточного деления. Таким образом, MNvit анализ является методом *in vitro*, обеспечивающим всеобъемлющую основу для исследования потенциала повреждения хромосом *in vitro* путем определения кластогенного и анеугенного эффектов[2)] в клетках, которые подвергались делению во время или после воздействия исследуемого химического вещества (более подробная информация приведена в 4.2 настоящего стандарта). Микроядра представляют собой нарушения, которые было переданы дочерним клеткам в отличие от хромосомных аберраций, отмеченных в клетках в метафазе, которые могут не передаваться. В любом случае изменения могут быть несовместимыми с выживанием клеток.

Настоящее руководство позволяет использовать протоколы как с применением ингибитора полимеризации актина цитохалазина В (cytoB), так и без него. Добавление cytoB перед митозом приводит к образованию двуядерных клеток и, таким образом, позволяет идентифицировать и проводить анализ микроядер только в тех клетках, которые завершили один митоз[3)]. Настоящее руководство также позволяет использовать протоколы без блокатора цитокинеза при наличии доказательств, что анализируемая клеточная популяция подверглась митозу.

В дополнение к использованию анализа MNvit для определения веществ, индуцирующих микроядра, использование иммунохимического мечения кинетохор или гибридизации с центромерными/теломерными зондами [флуоресцентная гибридизация *in situ* (*FISH*)] позволяет получить дополнительную информацию по механизмам хромосомных нарушений и образованию микроядер[4)]. Процедуры мечения и гибридизации могут быть использованы в случаях, когда происходит повышение частоты образования микроядер и исследователь хочет выяснить, является это возрастание результатом кластогенных и/или анеугенных факторов.

Поскольку микроядра в интерфазных клетках могут оцениваться относительно объективно, лабораторному персоналу нужно только определять количество двуядерных клеток при использовании cytoB и частоту возникновения микроядерных клеток во всех случаях. По этой причине микропрепараты могут быть оценены относительно быстро, а анализ может быть автоматизирован. Это позволяет на практике анализировать тысячи, а не сотни клеток при обработке, что повышает эффективность анализа. Наконец, поскольку микроядра могут образовывать отставшие хромосомы, возникает возможность для выявления агентов, индуцирующих анеуплоидию, которую трудно изучать в обычном анализе на хромосомные аберрации[5)]. Однако анализ MNvit, приведенный в настоящем руководстве, не позволяет дифференцировать вещества, вызывающие изменения в количестве хромосом и/или плоидность, от веществ, индуцирующих кластогенность, без специальных методов, таких как *FISH* (см. предыдущий абзац).

Анализ MNvit является надежным и может проводиться на разных типах клеток, а также в присутствии или при отсутствии cytoB. Имеется большое количество данных, подтверждающих достоверность анализа MNvit с использованием разных типов клеток (культур клеточных линий или первичных клеточных культур)[6)]. Они включают международное исследование по валидации анализа, координируемое французским обществом генетической токсикологии [Société Française de Toxicologie Génétique (SFTG)][7)],

---

1) См. [1].
2) См. [2], [3].
3) См. [4] [5].
4) См. [6]—[17].
5) См. [18].
6) См. [19]—[36].
7) См. [19]—[23].

и доклады Международных совещаний по исследованию генотоксичности[1]. Имеющиеся данные были также повторно оценены в ретроспективном валидационном исследовании весомости доказательств Европейским центром по валидизации альтернативных методов (ECVAM) Европейской комиссии (ЕС) и Научно-консультативным комитетом ECVAM (ESAC), и метод испытания был признан научно обоснованным[2]. В анализе MNvit на клетках млекопитающих можно использовать культивированные клеточные линии или первичные клеточные культуры человека и грызунов. Поскольку на чувствительность анализа влияет фоновая частота микроядер, рекомендуется использовать типы клеток со стабильной и определенной фоновой частотой образования микроядер. Используемые клетки отбирают на основании способности хорошего роста в культуре, стабильности кариотипа (включая число хромосом) и спонтанной частоты микроядер[3]. Данные, имеющиеся в настоящее время, не позволяют давать надежные рекомендации, но предполагают, что при оценке химической опасности важно учитывать статус p53, генетическую (кариотип) стабильность, способность к восстановлению ДНК и происхождение клетки (грызуна или человека), выбранной для анализа. Таким образом, пользователям данного руководства рекомендуется учитывать влияние этих и других характеристик клеток на характеристики клеточной линии при обнаружении индукции микроядер по мере развития знаний в этой области.

---

[1] См. [5], [17].

[2] См. [37]—[39].

[3] См. [40].

Поправка к ГОСТ 32635—2020 Методы испытания по воздействию химической продукции на организм человека. Микроядерный тест на клетках млекопитающих *in vitro*

В каком месте	Напечатано	Должно быть
Предисловие. Таблица согласования	—	Узбекистан | UZ | Узстандарт

(ИУС № 2 2021 г.)

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

МЕТОДЫ ИСПЫТАНИЯ ПО ВОЗДЕЙСТВИЮ ХИМИЧЕСКОЙ ПРОДУКЦИИ НА ОРГАНИЗМ ЧЕЛОВЕКА

Микроядерный тест на клетках млекопитающих *in vitro*

Methods of testing the impact of chemical products on the human body.
Micronuclear test on mammalian cells *in vitro*

Дата введения — 2021—07—01

1 Область применения

Настоящий стандарт устанавливает требования к микроядерному анализу in vitro, применяемому для оценки генотоксичности химических веществ, путем выявления микроядер в цитоплазме интерфазных клеток, деление которых произошло во время или после воздействия исследуемого вещества.

2 Термины, определения и сокращения

2.1 В настоящем стандарте применены следующие термины с соответствующими определениями:

2.1.1 **анеуген** (aneugen): Любое вещество или процесс, воздействие которых на компоненты митотического и мейотического циклов деления клеток приводит к анеуплоидии в клетках или организмах.

2.1.2 **анеуплоидия** (aneuploidy): Любое отклонение от нормального диплоидного (или гаплоидного) числа хромосом на одну или более хромосом, но не на полный набор хромосом (полиплоидия).

2.1.3 **апоптоз** (apoptosis): Процесс запрограммированной гибели клеток, характеризующийся серией этапов, приводящих к дезинтеграции клеток в мембранно-связанные частицы, которые затем элиминируются фагоцитозом или выделением.

2.1.4 **клеточная пролиферация** (cell proliferation): Увеличение числа клеток в результате митотического деления клеток.

2.1.5 **центромера** (centromere): Участок ДНК хромосомы, где две хроматиды соединяются вместе и оба кинетохора соединяются друг с другом.

2.1.6 **концентрации** (concentrations): Конечные концентрации исследуемого химического вещества в культуральной среде.

2.1.7 **кластоген** (clastogen): Любое вещество или фактор, которые вызывают структурные хромосомные аберрации в популяции клеток или эукариотических организмов.

2.1.8 **цитокинез** (cytokinesis): Процесс деления клеток сразу после митоза, формирующий две дочерние клетки, каждая из которых содержит одно ядро.

2.1.9 **индекс пролиферации при цитокинетическом блоке;** CBPI [Cytokinesis-Block Proliferation index (CBPI)]): Доля клеток второго деления в обработанной популяции относительно необработанного контроля (см. формулы в приложении А).

2.1.10 **цитостатичность** (cytostasis): Ингибирование роста клеток (см. формулы в приложении А).

2.1.11 **цитотоксичность** (cytotoxicity): Снижение индекса пролиферации цитокинетического блока (CBPI) или индекса репликации (RI) в обработанных клетках в присутствии цитохалазина В по сравнению с отрицательным контролем (см. 5.6.3.3 и приложение А).

Примечание — Для исследований, проводимых без цитохалазина В, цитотоксичность определяют как уменьшение относительного удвоения популяции (RPD) или относительного возрастания количества клеток (RICC) в обработанных клетках по сравнению с отрицательным контролем (см. 5.6.3.4 и приложение А).

Издание официальное

2.1.12 **генотоксичность** (genotoxic): Общий термин, охватывающий все типы повреждений *ДНК* или хромосом, включающий разрывы, аддукты, перестройки, мутации, хромосомные аберрации и анеуплоидию.

Примечание — Не все типы генотоксических эффектов приводят к мутациям или стабильным хромосомным нарушениям.

2.1.13 **интерфазные клетки** (interphase cells): Клетки не в стадии митоза.

2.1.14 **кинетохор** (kinetochore): Белоксодержащая структура, формирующаяся на центромере хромосомы, с которой во время клеточного деления связаны волокна веретена деления, обеспечивающие точное расхождение дочерних хромосом к полюсам дочерних клеток.

2.1.15 **микроядра** (micronuclei): Небольшие ядра, отделенные от основных ядер клеток и являющиеся дополнительными к ним, которые образуются во время телофазы митоза или мейоза при отставании фрагментов хромосом или целых хромосом.

2.1.16 **митоз** (mitosis): Деление клеточного ядра, обычно состоящее из нескольких стадий — профазы, прометафазы, метафазы, анафазы и телофазы.

2.1.17 **митотический индекс** (mitotic index): Отношение числа клеток в метафазе к общему числу клеток в наблюдаемой клеточной популяции — показатель клеточной пролиферации в данной популяции.

2.1.18 **мутагенный** (mutagenic): Вызывающий наследуемое изменение последовательностей пар оснований *ДНК* в генах или структуре хромосом (хромосомные аберрации).

2.1.19 **нерасхождение** (non-disjunction): Нарушение расхождения парных хроматид и правильной сегрегации при образовании дочерних клеток, приводящее к аномальному числу хромосом в дочерних клетках.

2.1.20 **статус p53** (p53 status): Белок p53, участвующий в регуляции клеточного цикла, в апоптозе и репарации *ДНК*.

Примечание — Клетки с дефицитом функционального белка p53, не способные остановить клеточный цикл или устранить поврежденные клетки с использованием апоптоза или других механизмов (например, индукции репарации *ДНК*), связанных с функциями p53 в ответ на повреждение *ДНК*, теоретически должны быть более подвержены мутациям генов или хромосомным аберрациям.

2.1.21 **полиплоидия** (polyploidy): Численные нарушения хромосом в клетках или организмах, затрагивающие полный(е) набор(ы) хромосом в противоположность нарушениям по одной или нескольким хромосомам (анеуплоидия).

2.1.22 **индекс пролиферации;** PI [proliferation Index (PI)]: Метод измерения цитотоксичности, при котором не используют cytoB (см. формулы в приложении А).

2.1.23 **относительное увеличение количества клеток;** RICC [Relative Increase in Cell Count (RICC)]: Метод измерения цитотоксичности, при котором не используют cytoB (см. формулы в приложении А).

2.1.24 **относительное удвоение популяции** (RPD) [Relative Population Doubling (RPD)]: Метод измерения цитотоксичности, при котором не используют cytoB (см. формулы в приложении А).

2.1.25 **индекс репликации;** RI [Replication Index (RI)]: Доля завершенных циклов деления клеток в обработанных культурах по отношению к необработанным контролям в течение периода воздействия и восстановления (см. формулы в приложении А).

2.1.26 **фракция печени S9** (S9 liver fraction): Супернатант гомогената печени после центрифугирования 9000 g, экстракт сырой печени.

2.1.27 **смесь S9** (S9 mix): Смесь фракции печени S9 и кофакторов, необходимых для метаболической активности ферментов.

2.1.28 **контроль растворителя** (solvent control): Общий термин для определения контрольных культур, обработанных только растворителем, используемым для растворения исследуемого химического вещества.

2.1.29 **необработанный контроль** (untreated control): Культуры клеток, которые не подвергают обработке (т. е. отсутствуют исследуемое химическое вещество или растворитель), но одновременно подвергают тем же процедурам, что и культуры, обрабатываемые исследуемым химическим веществом.

2.2 В настоящем стандарте использованы следующие сокращения:

CBPI — индекс пролиферации при цитокинетическом блоке;

cytoB — цитохалазин В;

DNA — дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК);

FISH — флуоресцентная гибридизация in situ;

MN — микроядро;
MNvit — Микроядерный анализ in vitro;
PI — индекс пролиферации;
PHA — фитогемагглютинин;
RI — индекс репликации;
RICC — относительное увеличение количества клеток;
RPD — относительное удвоение популяции.

3 Основные положения и ограничения

3.1 Проведение испытаний *in vitro* обычно требует использования экзогенного источника метаболической активации, за исключением случаев, когда клетки обладают метаболической компетентностью в отношении исследуемых веществ. Система экзогенной метаболической активации не может полностью имитировать условия *in vivo*. Следует проявлять осторожность для предотвращения условий, которые могут привести к артефактным положительным результатам, не отражающим генотоксичности исследуемых химических веществ. Такие условия включают изменение значения pH[1)] или осмотической концентрации, взаимодействие со средой для культивирования клеток[2)] или избыточные уровни цитотоксичности (см. 5.6.3.6).

3.2 Для анализа индукции микроядер необходимо, чтобы митозы были как в обработанных, так и в необработанных культурах. Для подсчета микроядер наиболее информативной является стадия, при которой клетки прошли один митоз во время или после обработки исследуемым химическим веществом. Для промышленных наноматериалов необходимы специальные модификации, которые не представлены в настоящем стандарте.

3.3 Перед использованием настоящего стандарта для испытания смеси для получения данных, предназначенных для целей регулирования, следует рассмотреть вопрос о возможности обеспечения адекватных результатов. Такие соображения не нужны, когда существует нормативное требование для испытания смеси.

4 Принципы испытания

4.1 Культуры клеток человека или млекопитающих подвергаются воздействию исследуемого химического вещества как с экзогенным источником метаболической активации, так и без него, если только не используются клетки с адекватной способностью к метаболизму (см. 5.4).

4.2 Во время и после воздействия исследуемого химического вещества клетки выращивают в течение периода, достаточного для формирования хромосомных и других нарушений клеточного цикла/деления клеток, которые могут привести к образованию микроядер в интерфазных клетках. Для индукции анеуплоидии исследуемое вещество обычно должно присутствовать во время митоза. Отобранные и окрашенные интерфазные клетки анализируют на наличие микроядер. В идеале микроядра следует оценивать только в тех клетках, которые завершили митоз во время воздействия исследуемого вещества или в течение периода после воздействия, при использовании. В культурах, которые были обработаны блокатором цитокенеза, это легко достигается путем подсчета только двуядерных клеток. В отсутствие блокатора цитокинеза на основании увеличения популяции клеток важно подтвердить, что анализируемые клетки прошли клеточное деление во время или после воздействия исследуемого химического вещества. Для всех протоколов важно продемонстрировать, что пролиферация клеток прошла как в контрольных, так и в обработанных культурах, и определить степень химически индуцированной цитотоксичности или цитостатичности во всех культурах, в которых анализируют микроядра.

5 Описание метода

5.1 Клетки

5.1.1 Для испытания используют первичные культуры лимфоцитов периферической крови человека или других млекопитающих[3)] и ряд клеточных линий грызунов, таких как CHO, V79, CHL/IU и L5178Y, или клеточные линии человека, такие как TK6[4)] (см. Введение). Для анализа микроядер использовали

[1)] См. [41]—[43].
[2)] См. [44], [45].
[3)] См. [7], [20], [46]. [47].
[4)] См. [19]—[23], [26]—[29], [31], [33] —[36].

также другие клеточные линии — HT29[1], Caco-2[2], HepaRG[3], клетки HepG2[4], A549 и первичные клетки эмбриона сирийского хомячка[5], но они к настоящему времени тщательно не валидированы. Поэтому использование этих клеточных линий и типов должно быть обосновано подтвержденными результатами исследований в соответствии с критериями приемлемости, приведенными в 7.2. Было отмечено, что *cytoB* может влиять на рост клеток L5178Y, и поэтому его не рекомендуется использовать для этой линии клеток[6]. По причинам гуманного обращения с животными при использовании первичных клеток следует по возможности использовать клетки человека и отбирать образцы в соответствии с этическими принципами и нормами.

5.1.2 Лимфоциты периферической крови человека отбирают у молодых (приблизительно от 18 до 35 лет) некурящих индивидов, без известных заболеваний или недавних воздействий генотоксических агентов (например, химических веществ, ионизирующих излучений) на уровнях, которые могли бы увеличить фоновую частоту образования микроядерных клеток. Это обеспечивает низкую и стабильную фоновую частоту возникновения микроядерных клеток. Базовая частота микроядерных клеток увеличивается с возрастом, и эта тенденция более выражена у женщин, чем у мужчин[7]. При использовании объединения клеток более чем от одного донора следует указать число доноров. Необходимо продемонстрировать, что клетки до начала обработки исследуемым химическим веществом были разделены на образцы. Культуры клеток поддерживают в экспоненциальной фазе роста (клеточные линии) или стимулируют к делению (первичные культуры лимфоцитов), чтобы воздействовать на клетки в разных стадиях клеточного цикла, поскольку чувствительность клеточных стадий к исследуемым веществам может быть неизвестна. Первичные клетки, которые для деления необходимо стимулировать митогенами, как правило, во время воздействия испытуемого химического вещества (например, клетки лимфоцитов человека после 48-часовой митогенной стимуляции) больше не синхронизируют. Не рекомендуется использовать синхронизированные клетки во время обработки исследуемым химическим веществом, но это может быть приемлемым, если оправданно.

5.2 Среда и условия культивирования

Для поддержания культур используют подходящую культуральную среду и условия инкубации [культуральная посуда, увлажненная окружающая среда, содержащая 5 % CO_2 (при необходимости), температура — 37 °С]. Клеточные линии регулярно проверяют на стабильность количества модальных хромосом и отсутствие контаминации микоплазмы. Не следует использовать культуры при выявлении контаминации микоплазмы или изменении модального числа хромосом. Должна быть установлена нормальная продолжительность клеточного цикла для клеточных линий или первичных культур, используемых в испытательной лаборатории, и она должна соответствовать опубликованным характеристикам клеток.

5.3 Подготовка культур

5.3.1 Клеточные линии

Клетки отбирают из исходных (сток) культур, высевают в культуральную среду с такой плотностью, чтобы клетки в суспензиях или в монослоях продолжали расти экспоненциально до времени сбора (например, следует избегать слияния клеток, растущих в монослоях).

5.3.2 Лимфоциты

Цельную кровь, обработанную антикоагулянтом (например, гепарином), или выделенные лимфоциты культивируют (например, в течение 48 ч — для лимфоцитов человека) в присутствии митогена [например, фитогемагглютинина (*PHA*) — для лимфоцитов человека], чтобы вызывать деление клеток перед воздействием исследуемого химического вещества и *cytoB*.

5.4 Метаболическая активация

При работе с клетками с недостаточной эндогенной метаболической способностью используют систему экзогенной метаболической активации. Наиболее часто используемая система, рекомендуемая по умолчанию, если только другая система не является оправданной, включает кофакторы и пост-

[1] См. [48].
[2] См. [49].
[3] См. [50], [51].
[4] См. [52], [53].
[5] См. [54].
[6] См. [23].
[7] См. [55].

митохондриальную фракцию (S9) печени грызунов (как правило, крыс), обработанных индукторами ферментов, такими как Arochlor 1254[1], или комбинацию фенобарбитала и β-нафтофлавона[2]. Последняя комбинация не противоречит Стокгольмской конвенции по стойким органическим загрязнениям[3], и было показано, что она так же эффективна, как Aroclor 1254, в случае индукции оксидаз со смешанной функцией[2]. Обычно фракцию S9 используют в концентрациях от 1 % об. до 2 % об., но она может быть увеличена до 10 % об. в конечном объеме среды. Следует избегать использования препаратов, снижающих митотический индекс, особенно образующих комплекс с кальцием[4]. На выбор типа и концентрации используемой системы экзогенной метаболической активации или метаболического индуктора может влиять класс исследуемых веществ.

5.5 Подготовка исследуемого химического вещества

Твердые химические вещества растворяют в соответствующих растворителях и разбавляют, при необходимости, перед обработкой клеток.

Жидкие исследуемые химические вещества могут быть добавлены непосредственно в испытуемую систему и/или разбавлены перед ее обработкой. Газообразные и летучие соединения следует испытывать при соответствующих модификациях стандартного протокола, таких как обработка в герметизированных сосудах[5]. Подготовку исследуемого химического вещества проводят непосредственно перед обработкой, если отсутствуют данные о стабильности при соответствующих условиях хранения.

5.6 Условия испытаний

5.6.1 Растворители

Растворитель выбирают таким образом, чтобы оптимизировать растворимость исследуемых химических веществ, не оказывая неблагоприятного воздействия на проведение анализа, то есть на изменение роста клеток, целостность исследуемого химического вещества, реакцию с культуральными сосудами, нарушение системы метаболической активации. Рекомендуется, по возможности, в первую очередь использовать водные растворы (или культуральные среды). Хорошо изученными растворителями являются вода или диметилсульфоксид (ДМСО). Обычно органические растворители не должны превышать 1 % об. При растворении *cytoB* в ДМСО общее количество используемого органического растворителя для исследуемого химического вещества и *cytoB* не должно превышать 1 % об. В противном случае следует использовать необработанные контроли, чтобы убедиться, что процентное содержание органического растворителя не оказывает вредного воздействия. Содержание водных растворителей (физиологический раствор или вода) не должно превышать 10 % об. в конечной обработанной среде. При использовании растворителей, отличных от только хорошо зарекомендовавших себя (например, этанол или ацетон), их применение следует подтвердить данными, указывающими на их совместимость с исследуемым химическим веществом, испытуемой системой и на отсутствие генетической токсичности в используемой концентрации. При отсутствии подтверждающих данных необходимо включать необработанные контроли (см. приложение А), а также контроль растворителя, чтобы подтвердить, что выбранный растворитель не вызывает вредных или хромосомных эффектов (например, анеуплоидию или кластогенность).

5.6.2 Использование *cytoB* как блокатора цитокинеза

5.6.2.1 Одним из важнейших аспектов при проведении *MNvit* является обеспечение прохождения анализируемыми клетками митоза во время обработки или в период инкубации после обработки, при использовании. Поэтому подсчет микроядер следует ограничить клетками, которые прошли митоз во время или после обработки. Для блокирования цитокинеза наиболее широко используют *cytoB*, который подавляет сборку актина и соответственно препятствует разделению дочерних клеток после митоза, приводя к формированию двуядерных клеток[6]. При использовании *cytoB* одновременно может быть определено влияние исследуемого химического вещества на кинетику пролиферации клеток. При использовании лимфоцитов человека следует применять *cytoB* в качестве блокатора цитокинеза, потому что время клеточного цикла у доноров будет варьироваться и не все лимфоциты будут реагировать

[1] См. [56], [57].
[2] См. [58]—[60].
[3] См. [61].
[4] См. [62].
[5] См. [63]—[65].
[6] См. [6], [66], [67].

на стимуляцию *PHA* (фитогемагглютинин). Для других типов клеток использовать *cytoB* не обязательно, если можно установить, что они подверглись делению (см. 5.6.3.4). Кроме того, *cytoB* обычно не используют при оценке наличия микроядер в образцах с использованием методов проточной цитометрии.

5.6.2.2 Для обеспечения оптимальной частоты двуядерных клеток в лаборатории для каждого типа клеток должна быть установлена необходимая концентрация *cytoB* в культурах контроля растворителя и подтверждено, что она обеспечивает достаточный выход двуядерных клеток для подсчета. Оптимальная концентрация *cytoB* обычно составляет от 3 до 6 мкг/мл[1)].

5.6.3 Измерение клеточной пролиферации и цитотоксичности и выбор концентраций для обработки

5.6.3.1 При определении максимальной концентрации исследуемого вещества следует избегать концентраций, которые могут вызвать искусственный положительный ответ, сильную цитотоксичность (см. 5.6.3.6), образование осадка в культуральной среде (см. 5.6.3.7) или заметные изменения значения pH или осмотической концентрации (см. 3.1). Если добавление исследуемого химического вещества вызывает заметное изменение значения pH среды, для предотвращения искусственных положительных результатов и обеспечения соответствующих условий культивирования можно регулировать значение pH путем буферизации конечной обработанной среды.

5.6.3.2 Чтобы убедиться, что во время испытания митозу подверглось достаточное количество обработанных клеток и что воздействие проводят при соответствующих уровнях цитотоксичности (см. 5.6.3.6), проводят анализ клеточной пролиферации. Цитотоксичность определяют в основном испытании с метаболической активацией и без нее, используя соответствующие индикаторы гибели и роста клеток (см. 5.6.3.3 и 5.6.3.4). Несмотря на то, что оценка цитотоксичности в предварительном испытании может быть полезна для лучшего определения концентраций, которые будут использоваться в основном испытании, предварительный анализ не является обязательным и его выполнение не заменяет измерения цитотоксичности в основном испытании.

5.6.3.3 Обработка культур *cytoB* и определение относительных частот одноядерных, двухъядерных и многоядерных клеток в культуре обеспечивают точность количественного определения эффекта воздействия на клеточную пролиферацию и цитотоксичность или цитостатическую активность[2)] и обеспечивают микроскопическую оценку только тех клеток, деление которых происходит во время или после обработки. Количественную оценку цитотоксической и цитостатической активностей при обработке проводят путем сравнения значений индекса пролиферации при цитокинетическом блоке (*CBPI*)[3)] или индекса репликации (*RI*) не менее чем для 500 клеток на культуру (см. формулы в приложении А) в обработанных и контрольных культурах. Оценка других показателей цитотоксичности (например, целостности клеток, апоптоза, некроза, подсчета метафаз, клеточного цикла) может дать полезную информацию, но ее не следует использовать вместо *CBPI* или *RI*.

5.6.3.4 В исследованиях без *cytoB* необходимо показать, что значительная часть оцениваемых клеток подвергалась делению во время или после обработки исследуемым химическим веществом, в противном случае могут быть получены ложноотрицательные ответы. Для оценки цитотоксической и цитостатической активности воздействия рекомендуется проводить измерение относительного удвоения популяции (*RPD*) или относительного возрастания числа клеток *(RICC)*[4)] (см. формулы в приложении А). При увеличении продолжительности времени отбора проб (например, продолжительность обработки от 1,5 до 2 нормальных клеточных циклов и сбор клеток после дополнительной продолжительности от 1,5 до 2 нормальных клеточных циклов приводят к тому, что время отбора проб превышает нормальную длину клеточного цикла в 3—4 раза, как приведено в 6.1.3 и 6.1.4) *RPD* может недооценить цитотоксичность[5)]. После 1,5—2 нормальных длин клеточного цикла лучшим показателем цитотоксичности будет *RICC*. Оценка других маркеров цитотоксичности или цитостаза [например, целостность клеток, апоптоз, некроз, подсчет метафаз, индекс пролиферации (*PI*), клеточный цикл, нуклеоплазматические мостики или зародыши ядра] может дополнительно предоставить полезную информацию, но ее не следует использовать вместо *RPD* или *RICC*.

5.6.3.5 Следует оценить не менее трех концентраций исследуемого вещества (не считая растворитель и положительный контроль), отвечающих критериям приемлемости (соответствующая цитотоксичность, количество клеток и т. д.). Для каждой концентрации исследуемого вещества, независимо

---

1) См. [19].
2) См. [6].
3) См. [6], [27], [68].
4) [17], [68]—[71].
5) См. [71].

от типа клеток (клеточные линии или первичные культуры лимфоцитов), можно использовать обработанные культуры как реплицированных, так и отдельных клеток. Несмотря на то, что целесообразно использовать параллельные (дублирующие) культуры, также приемлемо использовать отдельные культуры при условии подсчета одинакового общего количества клеток для всех культур. Использование отдельных культур особенно актуально при оценке более трех концентраций исследуемого вещества (см. 6.3.3, 6.3.4). Результаты, полученные от независимых повторных культур при заданной концентрации вещества, могут быть объединены для анализа данных. Для исследуемых химических веществ, демонстрирующих небольшую или нулевую цитотоксичность, обычно приемлемы 2—3-кратные интервалы концентрации. В случае проявления цитотоксичности концентрации, выбранные для испытания, должны охватывать диапазон от концентраций, вызывающих цитотоксичность (см. 5.6.3.6), до концентраций, при которых наблюдают умеренную или незначительную цитотоксичность или ее отсутствие. Для исследуемых химических веществ, имеющих крутую зависимость концентрация — эффект, для получения данных с низкой и умеренной цитотоксичностями или для подробного изучения зависимости отклика от дозы необходимо использовать более узкий интервал между концентрациями и/или более трех концентраций (отдельные или параллельные культуры), в частности в ситуациях, когда требуется повторный анализ (см. 7.3.4).

5.6.3.6 Если максимальная концентрация основана на цитотоксичности, то наивысшая концентрация предназначена для достижения цитотоксичности (55 ± 5) % с использованием рекомендуемых параметров цитотоксичности [т.е. снижение *RICC* и *RPD* для клеточных линий без применения *cytoB* и снижение *CBPI* или *RI* при использовании *cytoB* до (45 ± 5) % относительно параллельного отрицательного контроля][1]. Следует проявлять осторожность при интерпретации положительных результатов, обнаруженных только в диапазоне высокого уровня цитотоксичности (55 ± 5) %[2].

5.6.3.7 Для малорастворимых исследуемых химических веществ, не обладающих цитотоксичностью при концентрациях ниже предела растворимости, воздействие максимальной анализируемой концентрации должно вызывать помутнение или образование осадка, видимого невооруженным взглядом или с использованием инвертированного микроскопа. Даже если цитотоксичность выше, чем самая низкая концентрация нерастворимого вещества, рекомендуется проводить испытание только при одной концентрации, вызывающей помутнение или видимый осадок, поскольку в результате образования осадка могут возникать артифициальные эффекты. При концентрации, приводящей к образованию осадка, следует позаботиться о том, чтобы осадок не влиял на проведение испытания (например, окрашивание или подсчет). Перед проведением анализа может быть полезным определение растворимости в культуральной среде.

5.6.3.8 Если не наблюдают образования осадка или ограничения цитотоксичности, максимальная исследуемая концентрация должна соответствовать 10 мМ, 2 мг/см^3 или 2 мкл/см^3, в зависимости от того, что является минимальным[3]. Когда исследуемое вещество не имеет определенного состава, например вещество неизвестного или переменного состава, сложные продукты реакции или биологические материалы (например, UVCB)[4], вредные воздействия окружающей среды и т. д., при отсутствии достаточной цитотоксичности может потребоваться более высокая максимальная концентрация (например, 5 мг/см^3) для увеличения концентрации каждого из компонентов. Эти требования могут отличаться для лекарственных препаратов для человека[5].

5.6.4 Контроли

5.6.4.1 В каждое испытание должны быть включены параллельные отрицательные контроли (см. 5.6.1), в обрабатываемую среду которых входит только растворитель, и обработанные таким же образом, что и обрабатываемые культуры.

5.6.4.2 Для подтверждения способности лаборатории выявлять кластогены и анеугены в условиях используемого протокола испытаний и эффективности системы экзогенной метаболической активации (при применении) требуется параллельный положительный контроль. Примеры веществ положительного контроля приведены в таблице 1. При обосновании можно использовать другие вещества для положительного контроля.

---

[1] См. [72].
[2] См. [71].
[3] См. [73]—[75].
[4] См. [76].
[5] См. [93].

Таблица 1 — Эталонные вещества, рекомендованные для лабораторных квалификационных испытаний и для выбора положительных контролей

Категория	Вещество	Регистрационный номер CAS
Кластогены, не требующие метаболической активации	Метилметансульфонат	66-27-3
	Митомицин С	50-07-7
	4-Нитрохинолин-N-оксид	56-57-5
	Цитозинарабинозид	147-94-4
Кластогены, требующие метаболической активации	Бензо(а)пирен	50-32-8
	Циклофосфамид	50-18-0
Анеугены	Колхицин	64-86-8
	Винбластин	143-67-9

5.6.4.3 В настоящее время неизвестны анеугены, которые требуют метаболической активации для их генотоксической активности[1]. Поскольку анализы *in vitro* по определению генотоксичности на клетках млекопитающих при непродолжительных воздействиях, проводимых одновременно с метаболической активацией и без нее с использованием одного и того же периода воздействия, достаточно стандартизированы, использование положительных контролей может быть ограничено кластогеном, требующим метаболической активации. В этом случае один ответ кластогенного положительного контроля будет показывать как активность системы метаболической активации, так и ответную реакцию анализируемой системы. При длительной обработке (без S9) необходим положительный контроль, поскольку продолжительность воздействия отличается от варианта исследования с использованием метаболической активации. Если в качестве единственного положительного контроля для непродолжительного воздействия с метаболической активацией и без нее выбирают кластоген, то для долгосрочного воздействия без метаболической активации рекомендуется выбирать анеуген. Положительные контроли как для кластогенности, так и для анеугенности также следует использовать в метаболически компетентных клетках, которые не требуют S9.

5.6.4.4 Каждое вещество положительного контроля следует использовать при одной или нескольких концентрациях, которые, как ожидается, дадут воспроизводимые и обнаруживаемые увеличения по сравнению с фоном, чтобы продемонстрировать чувствительность испытуемой системы (т.е. эффект четкий, но не позволяет исследователю сразу идентифицировать зашифрованный препарат), и ответ не должен быть вызван цитотоксичностью, превышающей пределы, указанные в настоящем стандарте.

6 Проведение испытаний

6.1 Схема обработки

6.1.1 Для максимального повышения вероятности выявления анеугена или кластогена, действующего на определенной стадии клеточного цикла, необходимо, чтобы исследуемым химическим веществом было обработано достаточное количество клеток, представляющих разные стадии клеточного цикла. Все виды обработки культуры должны начинаться и заканчиваться в период, когда клетки растут экспоненциально и продолжают рост до момента отбора проб. Таким образом, схема обработки клеточных линий и первичных клеточных культур может несколько отличаться от схемы обработки лимфоцитов, для начала клеточного цикла которых требуется митогенная стимуляция[1]. Для лимфоцитов наиболее эффективный период воздействия исследуемым химическим веществом составляет от 44 до 48 ч после стимуляции *PHA* (фитогемагглютинин), в период асинхронного деления клеток[2].

6.1.2 Было показано[3], что большинство анеугенов и кластогенов выявляются после непродолжительного периода обработки от 3 до 6 ч (в присутствии и при отсутствии S9) с последующим удалением исследуемого химического вещества и отбором проб в момент времени, эквивалентный продолжительности приблизительно от 1,5 до 2 нормальных клеточных циклов после начала обработки[4].

[1] См. [17].
[2] См. [6].
[3] См. [19].
[4] См. [7].

6.1.3 Однако для подробной оценки, необходимой для установления отрицательного результата, проводят три исследования в следующих условиях: с использованием кратковременного воздействия исследуемого вещества с метаболической активацией и без нее и длительного воздействия без метаболической активации (см. 7.2, 7.3.1 и 7.3.2):

- клетки в течение от 3 до 6 ч подвергают воздействию исследуемого химического вещества без метаболической активации и отбирают пробу после периода времени, равного приблизительно продолжительности от 1,5 до 2 нормальных клеточных циклов после начала обработки[1)];
- клетки в течение от 3 до 6 ч подвергают воздействию исследуемого химического вещества с метаболической активацией и отбирают пробу после периода времени, равного приблизительно продолжительности от 1,5 до 2 нормальных клеточных циклов после начала обработки[1)];
- клетки до момента отбора проб подвергают воздействию без метаболической активации в течение времени, равного приблизительно продолжительности от 1,5 до 2 нормальных клеточных циклов.

В случае если любое из вышеприведенных условий испытания приводит к положительному ответу, возможно, нет необходимости исследовать другие схемы обработки.

Если известно или есть основания предполагать, что исследуемое химическое вещество влияет на продолжительность клеточного цикла (например, при испытании аналогов нуклеозидов), особенно для компетентных клеток p53[2)], время до начала отбора проб или восстановления может быть продлено на продолжительность следующих от 3 до 4 клеточных циклов после начала краткосрочного и долгосрочного воздействий). Эти варианты относятся к ситуациям, когда могут возникнуть опасения относительно возможности взаимодействия между исследуемым химическим веществом и *cytoB*. При увеличении времени до отбора проб (т.е. когда общее время культивирования составляет от 3 до 4 клеточных циклов) необходимо следить за тем, чтобы клетки продолжали активно делиться. Например, для лимфоцитов экспоненциальный рост через 96 ч после стимуляции может снижаться, и однослойные культуры клеток могут сливаться.

6.1.4 Предлагаемая схема обработки клеток приведена в таблице 2. Общие схемы обработки можно модифицировать (при обосновании) в зависимости от стабильности и реакционной способности исследуемого вещества или особых характеристик роста используемых клеточных линий.

Таблица 2 — Время обработки клеток и получения результатов в *MNvit* анализе

Культура	Условия обработки	Процедура
Лимфоциты, первичные клеточные культуры и клеточные линии с введением *cytoB*	С добавлением S9, кратковременное воздействие	Длительность обработки — от 3 до 6 ч в присутствии S9; удаление S9 и среды с веществом; добавление свежей среды и *cytoB*; фиксация через промежуток времени от 1,5 до 2 нормальных клеточных циклов после начала обработки
	Без добавления S9, кратковременное воздействие	Длительность обработки — от 3 до 6 ч; удаление среды с веществом; добавление свежей среды и *cytoB*; фиксация через промежуток времени от 1,5 до 2 нормальных клеточных циклов после начала обработки
	Без добавления S9, длительное воздействие	Длительность обработки от 1,5 до 2 нормальных периодов клеточного цикла в присутствии *cytoB*; фиксация в конце периода обработки
Примечание — При обработке клеточных линии без *cytoB* схемы обработки идентичны приведенным выше, за исключением того, что *cytoB* не добавляют.		

6.1.5 В монослойных культурах в конце обработки после воздействия в течение от 3 до 6 ч могут присутствовать митотические клетки (идентифицируемые как круглые и отделяющиеся от поверхности). Поскольку эти клетки легко отделяются от поверхности, они могут быть потеряны при удалении среды, содержащей исследуемое химическое вещество. При наличии доказательств значительного увеличения числа митотических клеток по сравнению с контролем, что указывает на вероятную остановку митоза, клетки следует собирать центрифугированием и возвращать в культуру, чтобы при анализе избежать потери клеток, находящихся в митозе, которые могут содержать микроядра/хромосомные аберрации.

[1)] См. [19].
[2)] См. [35], [36], [77].

6.2 Фиксация клеток и приготовление препаратов

6.2.1 Каждую культуру собирают и обрабатывают отдельно. Приготовление препаратов может включать гипотоническую обработку, но этот шаг не является необходимым, если соответствующее распределение клеток достигнуто другим способом. Для приготовления предметных стекол можно использовать разные методы при условии получения качественных клеточных препаратов для оценки. Для обнаружения микроядер (в методе с блокировкой цитокинеза) и надежной идентификации двуядерных клеток должны быть сохранены клетки с интактной клеточной мембраной и неповрежденной цитоплазмой.

6.2.2 Можно использовать разные методы окраски препаратов, такие как Гимза или окрашивание флуоресцентными *ДНК* специфическими красителями. Использование соответствующих флуоресцентных красителей (например, акридинового оранжевого[1)] или Hoechst 33258 плюс пиронин-Y[2)]) может устранить некоторые артефакты, связанные с применением не специфичных к *ДНК* красителей. Антикинетохорные антитела, *FISH* с панцентромерными *ДНК* зондами или мечение *in situ* панцентромер специфическими праймерами в сочетании с соответствующим контрастным окрашиванием *ДНК* можно использовать для идентификации содержания (целые хромосомы будут окрашены, тогда как фрагменты ацентрических хромосом окрашены не будут) микроядер, если информация о механизме их образования представляет интерес[3)]. Можно использовать другие методы дифференцировки между кластогенами и анеугенами, если доказана и подтверждена их эффективность. Например, для определенных линий клеток выявление sub-2N ядер в гиподиплоидных случаях с использованием таких методов, как анализ изображений, лазерная сканирующая цитометрия или проточная цитометрия, также может предоставить полезную информацию[4)]. Морфологические наблюдения ядер также могут указывать на возможную анеуплоидию.

При этом метафазный анализ хромосомных аберраций (предпочтительно с тем же типом клеток и протоколом со сравнимой чувствительностью) также может быть полезным способом определения, являются ли микроядра следствием поломок хромосом (учитывая, что потеря хромосом не будет обнаружена при анализе хромосомных аберраций).

6.3 Анализ

6.3.1 Перед проведением микроскопического анализа частоты микроядер все препараты, в том числе контроля растворителя, необработанного контроля (при использовании) и положительного контроля, должны быть независимо зашифрованы. При использовании автоматизированной системы оценки, например проточной цитометрии, лазерной сканирующей цитометрии или анализа изображений, следует использовать соответствующие методы для контроля любой систематической ошибки или погрешности. Независимо от автоматизированной платформы, используемой для подсчета микроядер, *CBPI*, *RI*, *RPD* или *RICC* оценивают одновременно.

6.3.2 В культурах обработанных *cytoB* для оценки частоты микроядер должно быть проанализировано не менее 2000 двуядерных клеток для каждой концентрации и контроля[5)], равномерно распределенных между параллельными анализами (репликатами), при их использовании. При испытании отдельной культуры на дозу (см. 5.6.3.5) должно быть оценено не менее 2000 двуядерных клеток на культуру[5)]. Если для оценки при каждой концентрации доступно менее 1000 двуядерных клеток на культуру (для параллельных культур) или 2000 (для отдельной культуры) и не обнаружено значительного увеличения количества микроядер, испытание повторяют, используя большее количество клеток или менее цитотоксические концентрации, в зависимости от того, что целесообразно. Не следует учитывать двуядерные клетки неправильной формы или с двумя ядрами, сильно отличающимися по размеру. Не следует путать двуядерные клетки с ненормально разбросанными многоядерными клетками. Клетки, содержащие более двух ядер, не следует анализировать на наличие микроядер, поскольку исходная (спонтанная) частота микроядер в этих клетках может быть выше[6)]. Допускается подсчет одноядерных клеток, если доказано, что исследуемое химическое вещество влияет на активность *cytoB*. В таких случаях может быть полезен повторный анализ без *cytoB*. Оценка одноядерных клеток в дополнение к двуядерным клеткам может представить полезную информацию[7)], но не является обязательной.

---

1) См. [78].
2) См. [79].
3) См. [16], [17].
4) См. [80]—[82].
5) См. [83].
6) См. [84].
7) См. [85] [86].

6.3.3 В испытаниях с клеточными линиями без *cytoB* проводят анализ микроядер не менее чем на 2000 клеток на концентрацию исследуемого вещества и контроль[1], равномерно распределенных между параллельными испытаниями, если их используют. В испытаниях с постановкой одной культуры на концентрацию (см. 5.6.3.5) анализируют не менее 2000 клеток на культуру. Если для оценки при каждой концентрации доступно менее 1000 клеток на культуру (для параллельных культур) или 2000 (для отдельной культуры) и не обнаружено значительного увеличения количества микроядер, испытание повторяют, используя большее количество клеток или менее цитотоксические концентрации, в зависимости от того, что целесообразно.

6.3.4 При использовании *cytoB* для оценки клеточной пролиферации (см. приложение А) следует определять *CBPI* или *RI*, анализируя не менее 500 клеток на культуру. При воздействии в отсутствие *cytoB* следует получить данные, что анализируемые клетки прошли пролиферацию (см. 5.6.3.1—5.6.3.5).

6.4 Квалификация лаборатории

6.4.1 Для подтверждения достаточного опыта лаборатории перед проведением рутинных анализов она должна провести серию испытаний с эталонными веществами положительного контроля, действующими по разным механизмам (не менее одного с метаболической активацией, одного без нее и одного, действующего по анеугенному механизму, выбранных из веществ, приведенных в таблице 1, и разных отрицательных контролей (включая необработанные культуры и разные растворители/носители). Ответы этих положительных и отрицательных контролей должны соответствовать данным научной литературы. Это не предусматривается для лабораторий, имеющих опыт, т. е. имеющих историческую базу данных, как установлено в 6.5.

6.4.2 При выборе веществ положительного контроля (см. таблицу 1) следует провести испытания при кратковременном и длительном воздействиях в отсутствие метаболической активации, а также при кратковременном воздействии в присутствии метаболической активации, чтобы продемонстрировать их способность выявлять кластогенные и анеугенные вещества, определяющие эффективность системы метаболической активации и подтверждающие пригодность процедур оценки (микроскопический визуальный анализ, проточная цитометрия, лазерная сканирующая цитометрия или анализ изображений). Диапазон концентраций выбранных веществ подбирают таким образом, чтобы обеспечить воспроизводимые и обусловленные концентрацией увеличения над фоновым уровнем для того, чтобы продемонстрировать чувствительность и динамический диапазон испытуемой системы.

6.5 Исторические контрольные данные

6.5.1 Лаборатория должна установить:

- исторический диапазон положительного контроля и распределения,
- исторический диапазон отрицательного контроля (необработанный контроль, контроль растворителя) и распределения.

6.5.2 При получении первых данных для создания базы данных исторического отрицательного контроля результаты параллельных отрицательных контролей должны соответствовать опубликованным данным отрицательного контроля, если они существуют. Поскольку к контрольному распределению добавляется больше экспериментальных данных, данные параллельных отрицательных контролей в идеале должны находиться в 95 %-ном доверительном интервале контрольных пределов этого распределения[2]. Историческая база данных отрицательного контроля лаборатории изначально должна быть построена по результатам не менее чем 10 испытаний, но для составления базы данных предпочтительно наличие результатов не менее 20 экспериментов, проведенных в сопоставимых условиях. Лаборатории должны использовать методы контроля качества, такие как контрольные карты [например, контрольная карта числа несоответствий (*C-charts*) или гистограмма средних значений (*X-bar charts*)[3]], чтобы определить вариабельность данных положительного и отрицательного контролей, и показать, что процедура испытаний в лаборатории находится «под контролем»[1]. Дополнительные рекомендации о порядке создания и использования базы данных исторического контроля (то есть критерии включения (и исключения) данных в базу данных исторического контроля и критерии приемлемости для данного испытания) приведены в научной литературе[4].

---

[1] См. [83].
[2] См. [87], [88].
[3] См. [88].
[4] См. [87].

6.5.3 Любые изменения в протоколе испытания следует рассматривать с точки зрения согласованности данных с существующими базами данных исторического контроля лаборатории. Любые серьезные несоответствия должны привести к созданию новой базы данных исторического контроля.

6.5.4 Данные отрицательного контроля должны состоять из числа микроядерных клеток одной культуры или суммы параллельных культур (см. 5.6.3.5). Данные параллельного отрицательного контроля в идеале должны находиться в 95 %-ном доверительном интервале контрольных пределов базы данных исторического отрицательного контроля лаборатории[1]. Если данные параллельного отрицательного контроля выходят за пределы 95 %-ных контрольных пределов, они могут быть приемлемы для включения в базу данных исторического контрольного распределения, если эти данные не являются экстремальными выбросами и имеются доказательства того, что система испытаний находится «под контролем» (см. 6.5.2) и есть доказательства отсутствия технической ошибки или ошибки оператора.

7 Данные и отчетность

7.1 Представление результатов

7.1.1 При использовании методики цитокинетического блока для оценки индукции микроядер используют только частоты двуядерных клеток с микроядрами (независимо от числа микроядер на клетку). Подсчет количества клеток с одним, двумя и более микроядрами может дать полезную информацию, но не является обязательным.

7.1.2 Параллельно проводят оценку цитотоксичности и/или цитостатичности для всех культур — обработанных, отрицательного и положительного контролей[2]. Необходимо вычислить *CBPI* или *RI* для всех обработанных и контрольных культур как меру задержки клеточного цикла при использовании метода цитокинетического блока. При отсутствии *cytoB* следует использовать *RPD* или *RICC* (см. приложение А).

7.1.3 Данные приводят по отдельным культурам. Дополнительно все данные следует обобщить в табличной форме.

7.2 Критерии приемлемости

7.2.1 Приемлемость испытания основана на следующих критериях:

- результат параллельного отрицательного контроля считают приемлемым для добавления в базу данных исторического отрицательного контроля лаборатории при соответствии 6.5.2;
- параллельные положительные контроли (см. 6.5.2) должны вызывать ответы, совместимые с ответами, приведенными в исторической базе данных положительного контроля лаборатории, обеспечивающие статистически значимое увеличение по сравнению с одновременным отрицательным контролем;
- должны быть выполнены критерии пролиферации клеток при контроле растворителя (см. 5.6.3.2—5.6.3.4);
- все экспериментальные условия были проверены, кроме тех случаев, когда одно экспериментальное условие привело к положительным результатам (см. 6.1.1—6.1.5),
- анализируют адекватное количество клеток и концентраций (см. 5.6.3.5 и 6.3.2—6.3.4);
- критерии выбора максимальной концентрации соответствуют критериям, приведенным в 5.6.3.1—5.6.3.8.

7.3 Оценка и интерпретация результатов

7.3.1 При условии, что все критерии приемлемости выполнены, исследуемое химическое вещество считают явно положительным, если в любом из исследованных условий анализа (см. 6.1.1—6.1.4):

- хотя бы одна из испытуемых концентраций демонстрирует статистически значимое увеличение по сравнению с параллельным отрицательным контролем[3];
- увеличение зависит от дозы, по крайней мере, при одном исследуемом параметре при оценке с помощью соответствующего анализа тенденции (тренд-теста) (см. 5.6.3.5);
- любой из результатов находится за пределами распределения исторических данных отрицательного контроля [например, на основе 95 %-ных контрольных пределов по Пуассону (см. 6.5.4)].

---

1) См. [87], [88].
2) См. [16].
3) См. [89].

Когда все эти критерии соблюдены, считают, что исследуемое химическое вещество способно вызывать разрывы хромосом и/или увеличение или потерю в этой испытуемой системе. Рекомендации по выбору наиболее подходящих статистических методов приведены в научной литературе[1)].

7.3.2 При условии, что все критерии приемлемости выполнены, исследуемое химическое вещество считают явно отрицательным, если во всех исследованных условиях анализа (см. 6.1.1—6.1.4):

- ни одна из испытуемых концентраций не демонстрирует статистически значимого увеличения по сравнению с одновременным отрицательным контролем;
- нет никакого связанного с концентрацией увеличения при оценке с использованием соответствующего анализа тенденции (тренд-теста);
- все результаты находятся в пределах распределения базы данных исторического отрицательного контроля (например, на основе 95%-ных контрольных пределов по Пуассону; см. 6.5.4).

В таком случае считают, что исследуемое химическое вещество не способно вызывать разрывы хромосом и/или увеличение или потерю в этой испытуемой системе. Рекомендации по выбору наиболее подходящих статистических методов приведены в научной литературе[1)].

7.3.3 Отсутствуют требования для верификации явно положительного или явно отрицательного ответа.

7.3.4 Если ответ не является явно отрицательным или явно положительным, как указано выше, и/или если необходима помощь в установлении биологической значимости результата, данные должны быть оценены экспертным заключением и/или дальнейшими исследованиями. Может быть полезным подсчет дополнительных клеток (при необходимости) или проведение повторного анализа, возможно с использованием модифицированных условий испытаний [например, интервал концентрации, другие условия метаболической активации (то есть концентрация S9 или происхождение S9)].

7.3.5 В редких случаях (даже после проведения дальнейших исследований) совокупность данных не позволяет сделать положительное или отрицательное заключение, и поэтому результаты будут считаться сомнительными.

7.3.6 Исследуемые химические вещества, которые вызывают образование микроядер в микроядерном (*MNvit*) анализе *in vitro*, могут достигать этого, поскольку они вызывают разрыв хромосом, потерю хромосом или их комбинацию. Дальнейший анализ с использованием антикинетохорных антител, центромерных специфических зондов *in situ* или других методов может быть использован для определения того, обусловлен ли механизм индукции микроядра кластогенной и/или анеугенной активностью.

7.4 Отчет о результатах испытаний

Отчет о результатах испытаний должен содержать следующую информацию:

7.4.1 Исследуемое химическое вещество:

- источник, номер партии, срок годности (при наличии);
- стабильность исследуемого химического вещества (если известна);
- способность исследуемого химического вещества вступать в реакцию с растворителем/носителем или средой для культивирования клеток;
- растворимость и стабильность исследуемого химического вещества в растворителе (если известна);
- измерение значения pH, осмотической концентрации и осадка в культуральной среде при добавлении исследуемого химического вещества (при необходимости).

7.4.1.1 Однокомпонентное вещество:

- физические свойства, растворимость в воде и дополнительные соответствующие физико-химические свойства;
- химическая идентификация, такая как наименование по IUPAC или CAS, номер CAS, код SMILES или InChI, структурная формула, чистота, химическая идентификация примесей и соответствующие дополнительные физико-химические свойства.

7.4.1.2 Многокомпонентное вещество, UVBC и смеси:

- характеризуют (насколько это возможно) химическим наименованием (см. выше), количественным содержанием и соответствующими физико-химическими свойствами компонентов.

7.4.2 Растворитель:

- обоснование выбора растворителя;
- процентное содержание растворителя в конечной культуральной среде.

[1)] См. [90]—[92].

7.4.3 Клетки:

- тип и источник используемых клеток;
- пригодность используемого типа клеток;
- отсутствие микоплазмы в случае клеточных линий;
- для клеточных линий — информация о продолжительности клеточного цикла или об индексе пролиферации;
- при работе с лимфоцитами пол доноров крови, возраст и любая соответствующая информация о доноре, цельная кровь или отдельные лимфоциты, используемый митоген;
- нормальное (отрицательный контроль) время клеточного цикла;
- число пассажей (если использовали) — для клеточных линий;
- методы поддержания клеточных культур — для клеточных линий;
- модальное количество хромосом — для клеточных линий.

7.4.4 Условия испытаний:

- идентификация вещества, блокирующего цитокинез (например, *cytoB*), при использовании, а также его концентрация и продолжительность воздействия на клетки;
- концентрация исследуемого химического вещества, выраженная в виде конечной концентрации в культуральной среде (например, мкг или мг/см^3 или ммоль культуральной среды);
- обоснование выбора концентраций и количества культур, включая данные о цитотоксичности и ограниченной растворимости исследуемого вещества;
- состав среды, концентрация CO_2 (если использовали), уровень влажности;
- концентрация (и/или объем) растворителя и исследуемого химического вещества, добавленного в культуральную среду;
- температура и время инкубации;
- продолжительность обработки культуры исследуемым химическим веществом;
- время после обработки до фиксации;
- плотность клеток при посеве (если применимо);
- тип и состав системы метаболической активации [источник S9, способ приготовления смеси S9, концентрация или объем смеси S9 и S9 в конечной культуральной среде, контроль качества S9 (например, ферментативная активность, стерильность, метаболическая способность)];
- вещества положительного и отрицательного контролей, конечные концентрации, условия и продолжительность периодов воздействия и восстановления;
- методы приготовления препаратов и использованные методы окрашивания;
- критерии подсчета микроядерных клеток (отбор анализируемых клеток и идентификация микроядер);
- количество проанализированных клеток;
- методы измерения цитотоксичности;
- любая дополнительная информация, относящаяся к цитотоксичности и используемому методу;
- критерии для признания исследований положительными, отрицательными или сомнительными;
- использованный(е) метод(ы) статистического анализа;
- методы, например использование кинетохорных антител или панцентромерных специфических зондов для определения того, содержат ли микроядра цельные или фрагментированные хромосомы (при использовании);
- методы, используемые для определения значения pH, осмоляльности и осадка.

7.4.5 Результаты:

- определение приемлемых клеток для анализа;
- количество клеток, подвергнутых воздействию в отсутствие *cytoB*, и количество клеток после обработки до фиксации для каждой культуры в случае клеточных линий;
- использованный способ измерения цитотоксичности, например: *CBPI* или *RI* в случае блокировки цитокинеза; *RICC* или *RPD* (если методы блокировки цитокинеза не используют), другие наблюдения, при необходимости (например, слияние клеток, апоптоз, некроз, подсчет метафаз, частота двуядерных клеток);
- признаки образования осадка и время его определения;
- данные о значении pH и осмотической концентрации обрабатываемой среды (если они определены);
- распределение одно-, дву- и многоядерных клеток при использовании метода блокировки цитокинеза;

- количество клеток с микроядрами, приведенное отдельно для каждой обработанной и контрольной культуры и определенное вне зависимости от того, являются ли клетки двуядерными или одноядерными (при необходимости);

- зависимость концентрация — ответ (при возможности);

- данные параллельных отрицательных (растворитель) и положительных контролей (концентрации и растворители);

- данные исторического отрицательного (растворитель) и положительного контроля с диапазонами, средними значениями и стандартным отклонением и 95 %-ными контрольными пределами распределения, а также количество данных;

- статистический анализ, p-значение (при наличии).

7.4.6 Обсуждение результатов

7.4.7 Выводы

Приложение А
(справочное)

Формулы для оценки цитотоксичности

А.1 При использовании *cytoB*

А.1.1 При использовании *cytoB* оценка цитотоксичности основана на индексе пролиферации при цитокинетическом блоке (*CBPI*) и индексе репликации (*RI*)[1]. *CBPI* показывает среднее число ядер на клетку и может использоваться для вычисления клеточной пролиферации. *RI* показывает относительное число клеточных циклов на клетку в течение периода воздействия *cytoB* в обработанных культурах по сравнению с контрольными культурами и может использоваться для вычисления процента цитостатичности по формулам:

$$\text{Цитостатичность, \%} = 100 - 100 \cdot [(CBPI_T - 1) / (CBPI_C - 1)], \quad (A.1)$$

где $CBPI = \dfrac{\text{Число одноядерных клеток} + 2 \cdot (\text{число двуядерных клеток}) + 3 \cdot (\text{число трехъядерных клеток})}{\text{Общее количество клеток}}$;

Т — культура, обработанная исследуемым химическим веществом;

С — контрольная культура.

Таким образом, значение *CBPI* = 1 (все клетки с одним ядром) соответствует 100 %-ной цитостатичности.

$$\text{Цитостатичность, \%} = 100 - RI, \quad (A.2)$$

где $RI = \dfrac{[\text{Число двуядерных клеток} + (2 \cdot \text{число многоядерных клеток})] / (\text{общее количество клеток})_T}{[\text{Число двуядерных клеток}) + (2 \cdot \text{число многоядерных клеток})] / (\text{общее количество клеток})_C} 100\ \%$;

Т — обработанные культуры;

С — контрольные культуры.

А.1.2 Таким образом, значение *RI*, равное 53 %, означает, что по сравнению с количеством клеток, которые разделились с образованием двуядерных и многоядерных клеток в контрольной культуре, только 53 % клеток от этого числа разделились в обработанной культуре, то есть цитостатичность составляет 47 %.

А.2 При отсутствии *cytoB*

А.2.1 Если *cytoB* не используют, оценку цитотоксичности рекомендуется проводить на основе относительного увеличения числа клеток (*RICC*) или относительного удвоения популяции (*RPD*)[2], поскольку оба показателя учитывают долю популяции клеток, которые разделились. *RICC* и *RPD* вычисляют по формулам:

$$RICC = \frac{\text{Увеличение числа клеток в обработанных культурах (начало — конец)}}{\text{Увеличение числа клеток в контрольных культурах (начало — конец)}} 100\ \%; \quad (A.3)$$

$$RPD = \frac{\text{Удвоение популяции в обработанных культурах}}{\text{Удвоение популяции в контрольной культуре}} 100\ \%, \quad (A.4)$$

где удвоение популяции равно [log (число клеток после обработки / начальное число клеток)] / log 2.

А.2.2 Таким образом, значения *RICC* или *RPD*, равные 53 %, указывают на значения цитотоксичности/цитостатичности, равные 47 %.

А.2.3 С использованием индекса пролиферации (*PI*) цитотоксичность может быть определена путем подсчета числа клонов, состоящих из одной клетки (cl1), двух клеток (cl2), от трех до четырех клеток (cl4) и от пяти до восьми клеток (cl8) по формуле

$$PI = \frac{1 \cdot cl1 + 2 \cdot cl2 + 3 \cdot cl4 + 4 \cdot cl8}{cl1 + cl2 + cl4 + cl8}. \quad (A.5)$$

А.2.4 *PI* используют так же, как объективный и надежный параметр цитотоксичности для клеточных линий, культивируемых *in vitro* в отсутствие *cytoB*[3], который может рассматриваться как полезный дополнительный параметр.

В любом случае количество клеток должно быть одинаковым для обрабатываемых культур и отрицательного контроля.

---

[1] См. [17], [69].

[2] См. [69].

[3] См. [5], [36]—[38].

Больше не рекомендуется использовать в качестве параметра цитотоксичности использовавшийся ранее *RCC* (т.е. количество клеток в обработанных культурах/количество клеток в контрольных культурах), поскольку данный параметр может занижать оценку цитотоксичности.

При использовании автоматизированных систем подсчета, например проточной цитометрии, лазерной сканирующей цитометрии или анализа изображений, количество клеток в формуле (А.5) может быть заменено количеством ядер.

В культурах отрицательного контроля индекс удвоения популяции или индекс репликации должны быть совместимыми с требованием отбора образцов клеток после обработки во время, эквивалентное примерно 1,5—2 нормальным клеточным циклам.

Приложение ДА
(справочное)

Сопоставление структуры настоящего стандарта со структурой примененного в нем международного документа

Таблица ДА.1

Структура настоящего стандарта	Структура международного документа OECD Test № 487:2016
Введение (1–8)	Введение 1 2 3 4 5 6 7 8
1 Область применения (—)	
2 Термины, определения и сокращения (приложение 1)	
3 Основные положения и ограничения (9—11) 3.1 3.2 3.3	Основные положения и ограничения 9 10 11
4 Принципы испытания (12,13) 4.1 4.2	Принципы испытания 12 13
5 Описание метода (14—35) 5.1 Клетки 5.1.1 5.1.2 5.2 Среда и условия культивирования 5.3 Подготовка культур 5.3.1 Клеточные линии 5.3.2 Лимфоциты 5.4 Метаболическая активация 5.5 Подготовка исследуемого химического вещества 5.6 Условия испытаний 5.6.1 Растворители 5.6.2 Использование *cytoB* как блокатора цитокинеза 5.6.2.1 5.6.2.2 5.6.3 Измерение клеточной пролиферации и цитотоксичности и выбор концентраций для обработки 5.6.3.1 5.6.3.2 5.6.3.3 5.6.3.4 5.6.3.5 5.6.3.6 5.6.3.7 5.6.3.8	Описание метода Клетки 14 15 Среда и условия культивирования 16 Подготовка культур 17 18 Метаболическая активация 19 Подготовка исследуемого химического вещества 20 Условия испытаний Растворители 31 Использование *cytoB* как блокатора цитокинеза 22 23 Измерение клеточной пролиферации и цитотоксичности и выбор концентраций для обработки 24 25 26 27 28 29 30 31

Продолжение таблицы ДА.1

Структура настоящего стандарта	Структура международного документа OECD Test № 487:2016
5.6.4 Контроли 5.6.4.1 5.6.4.2 5.6.4.3 5.6.4.4	Контроли 32 33 34 35
6 Проведение испытаний 6.1 Схема обработки 6.1.1 6.1.2 6.1.3 6.1.4 6.1.5 6.2 Фиксация клеток и приготовление препаратов 6.2.1 6.2.2 6.3 Анализ 6.3.1 6.3.2 6.3.3 6.3.4 6.4 Квалификация лаборатории 6.4.1 6.4.2 6.5 Исторические контрольные данные 6.5.1 6.5.2 6.5.3 6.5.4	Проведение испытаний Схема обработки 36 37 38 39 40 Фиксация клеток и приготовление препаратов 41 42 Анализ 43 44 45 46 Квалификация лаборатории 47 48 Исторические контрольные данные 49 50 51 52
7 Данные и отчетность (53—63) 7.1 Представление результатов 7.1.1 7.1.2 7.1.3 7.2 Критерии приемлемости 7.3 Оценка и интерпретация результатов 7.3.1 7.3.2 7.3.3 7.3.4 7.3.5 7.3.6 7.4 Отчет о результатах испытаний 7.4.1 Исследуемое химическое вещество 7.4.1.1 Однокомпонентное вещество 7.4.1.2 Многокомпонентное вещество, UVBC и смеси 7.4.2 Растворитель 7.4.3 Клетки 7.4.4 Условия испытаний 7.4.5 Результаты	Данные и отчетность Представление результатов 53 54 55 Критерии приемлемости 56 Оценка и интерпретация результатов 57 58 59 60 61 62 Отчет о результатах испытаний 63
*	Библиография
**	Приложение 1 Термины и определения
Приложение А Формулы для оценки цитотоксичности	Приложение 2 Формулы для оценки цитотоксичности

Окончание таблицы ДА.1

Структура настоящего стандарта	Структура международного документа OECD Test № 487:2016
Приложение ДА Сопоставление структуры настоящего стандарта со структурой примененного в нем международного документа	
Библиография	

* Библиография размещена в конце настоящего стандарта.

** Приложение 1 размещено в разделе 2 настоящего стандарта.

Примечание — После заголовков разделов настоящего стандарта приведены в скобках номера аналогичных им разделов международного документа.

Библиография

[1] OECD (2016), Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014—2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, No. 234, OECD, Paris

[2] Kirsch-Volders, M. (1997), Towards a validation of the micronucleus test, Mutation Research, Vol. 392/1-2, pp. 1—4

[3] Parry, J.M., A. Sors (1993), The detection and assessment of the aneugenic potential of environmental chemicals: the European Community aneuploidy project, Mutation Research, Vol. 287/1, pp. 3—15

[4] Fenech, M., A.A. Morley (1985), Solutions to the kinetic problem in the micronucleus assay, Cytobios, Vol. 43/172-173, pp. 233—246

[5] Kirsch-Volders, M. et al. (2000), Report from the *In Vitro* Micronucleus Assay Working Group, Environmental and Molecular Mutagenesis, Vol. 35/3, pp. 167—172

[6] Fenech, M. (2007), Cytokinesis-block micronucleus cytome assay, Nature Protocols, Vol. 2/5, pp. 1084—1104

[7] Fenech, M., A.A. Morley (1986), Cytokinesis-block micronucleus method in human lymphocytes: effect of *in-vivo* ageing and low dose X-irradiation, Mutation Research, Vol. 161/2, pp. 193—198

[8] Eastmond, D.A., J.D. Tucker (1989), Identification of aneuploidy-inducing agents using cytokinesis-blocked human lymphocytes and an antikinetochore antibody, Environmental and Molecular Mutagenesis, Vol. 13/1, pp. 34—43

[9] Eastmond, D.A., D. Pinkel (1990), Detection of aneuploidy and aneuploidy-inducing agents in human lymphocytes using fluorescence *in-situ* hybridisation with chromosome-specific DNA probes, Mutation Research, Vol. 234/5, pp. 9—20

[10] Miller, B.M. et al. (1991), Classification of micronuclei in murine erythrocytes: immunofluorescent staining using CREST antibodies compared to *in situ* hybridization with biotinylated gamma satellite DNA, Mutagenesis, Vol. 6/4, pp. 297—302

[11] Farooqi, Z., F. Darroudi, A. T. Natarajan (1993), The use of fluorescence *in-situ* hybridisation for the detection of aneugens in cytokinesis-blocked mouse splenocytes, Mutagenesis, Vol. 8/4, pp. 329—334

[12] Migliore, L. et al. (1993), Cytogenetic damage induced in human lymphocytes by four vanadium compounds and micronucleus analysis by fluorescence *in situ* hybridization with a centromeric probe, Mutation Research, Vol. 319/3, pp. 205—213

[13] Norppa, H., L. Renzi, C. Lindholm (1993), Detection of whole chromosomes in micronuclei of cytokinesis-blocked human lymphocytes by antikinetochore staining and *in situ* hybridization, Mutagenesis, Vol. 8/6, pp. 519—525

[14] Eastmond, D.A, D.S. Rupa, L.S. Hasegawa (1994), Detection of hyperdiploidy and chromosome breakage in interphase human lymphocytes following exposure to the benzene metabolite hydroquinone using multicolor fluorescence *in situ* hybridization with DNA probes, Mutation Research, Vol. 322/1, pp. 9—20

[15] Marshall, R.R. et al. (1996), Fluorescence *in situ* hybridisation (FISH) with chromosomespecific centromeric probes: a sensitive method to detect aneuploidy, Mutation Research, Vol. 372/2, pp. 233—245

[16] Zijno, P. et al. (1996), Analysis of chromosome segregation by means of fluorescence *in situ* hybridization: application to cytokinesis-blocked human lymphocytes, Mutation Research, Vol. 372/2, 211—219

[17] Kirsch-Volders et al. (2003), Report from the *in vitro* micronucleus assay working group, Mutation Research, Vol. 540/2, pp. 153—163

[18] OECD (1997), Test No. 473: *In Vitro* Mammalian Chromosome Aberration Test, OECD Guidelines for Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris. http://dx.doi.org/10.1787/9789264071261-en

[19] Lorge, E. et al. (2006), SFTG International collaborative Study on *in vitro* micronucleus test. I. General conditions and overall conclusions of the study, Mutation Research, Vol. 607/1, pp. 13—36

[20] Clare, G. et al. (2006), SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test. II. Using human lymphocytes, Mutation Research, Vol. 607/1, pp. 37—60

[21] Aardema, M.J. et al. (2006), SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test, III. Using CHO cells, Mutation Research, Vol. 607/1, pp. 61—87

[22] Wakata, A. et al. (2006), SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test, IV. Using CHO/IU cells, Mutation Research, Vol. 607/1, pp. 88—124

[23] Oliver, J. et al. (2006), SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test, V. Using L5178Y cells, Mutation Research, Vol. 607/1, pp. 125—152

[24] Albertini, S. et al. (1997), Detailed data on *in vitro* MNT and *in vitro* CA: industrial experience, Mutation Research, Vol. 392/1-2, pp. 187—208

[25] Miller, B. et al. (1997), Comparative evaluation of the *in vitro* micronucleus test and the *in vitro* chromosome aberration test: industrial experience, Mutation Research, Vol. 392/1-2, pp. 45—59

[26] Miller, B. et al. (1998), Evaluation of the *in vitro* micronucleus test as an alternative to the *in vitro* chromosomal aberration assay: position of the GUM Working Group on the *in vitro* micronucleus test. Gesellschaft fur Umwelt-Mutations-forschung, Mutation Research, Vol. 410, pp. 81—116

[27] Kalweit, S. et al. (1999), Chemically induced micronucleus formation in V79 cells — comparison of three different test approaches, Mutation Research, Vol. 439/2, pp. 183—190

[28] Kersten, B. et al. (1999), The application of the micronucleus test in Chinese hamster V79 cells to detect drug-induced photogenotoxicity, Mutation Research, Vol. 445/1, pp. 55—71

[29] von der Hude, W. et al. (2000), *In vitro* micronucleus assay with Chinese hamster V79 cells — results of a collaborative study with *in situ* exposure to 26 chemical substances, Mutation Research, Vol. 468/2, pp. 137—163

[30] Garriott, M.L., J.B. Phelps, W.P. Hoffman (2002), A protocol for the *in vitro* micronucleus test, I. Contributions to the development of a protocol suitable for regulatory submissions from an examination of 16 chemicals with different mechanisms of action and different levels of activity, Mutation Research, Vol. 517/1-2 , pp. 123—134

[31] Matsushima, T. et al. (1999), Validation study of the *in vitro* micronucleus test in a Chinese hamster lung cell line (CHL/IU), Mutagenesis, Vol. 14/6, pp. 569—580

[32] Elhajouji, A., E. Lorge (2006), Special Issue: SFTG International collaborative study on *in vitro* micronucleus test, Mutation Research, Vol. 607/1, pp. 1—152

[33] Kirkland, D. (2010), Evaluation of different cytotoxic and cytostatic measures for the *in vitro* micronucleus test (MNVit): Introduction to the collaborative trial, Mutation Research, Vol. 702/2, pp. 139—147

[34] Hashimoto K. et al. (2011), Comparison of four different treatment conditions of extended exposure in the *in vitro* micronucleus assay using TK6 lymphoblastoid cells, Regulatory Toxicology and Pharmacology, Vol. 59/1, pp. 28—36

[35] Honma, M., M. Hayashi (2011), Comparison of *in vitro* micronucleus and gene mutation assay results for p53-competent versus p53-deficient human lymphoblastoid cells, Environmental and Molecular Mutagenesis, Vol. 52/5, pp. 373—384

[36] Zhang, L.S. et al. (1995), A comparative study of TK6 human lymphoblastoid and L5178Y mouse lymphoma cell lines in the *in vitro* micronucleus test, Mutation Research Letters, Vol. 347/3-4, pp. 105—115

[37] ECVAM (2006), Statement by the European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM) Scientific Advisory Committee (ESAC) on the scientific validity of the *in vitro* micronucleus test as an alternative to the in vitro chromosome aberration assay for genotoxicity testing, ESAC 25th meeting, 16-17 November 2006, Available at: http://ecvam.jrc.it/index.htm

[38] ESAC (2006), ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC) Peer Review, Retrospective Validation of the *In Vitro* Micronucleus Test, Summary and Conclusions of the Peer Review Panel, Available at: http://ecvam.jrc.it/index.htm.

[39] Corvi, R. et al. (2008), ECVAM Retrospective Validation of *in vitro* Micronucleus Test (MNT), Mutagenesis, Vol. 23/4, pp. 271—283

[40] ILSI paper (draft), Lorge, E., M.M. Moore, J. Clements, M. O'Donovan, M. Honma, A. Kohara, J. van Benthem, S. Galloway, M.J. Armstrong, A. Sutter, V. Thybaud, B. Gollapudi, M. Aardema, J. Young-Tannir. Standardized Cell Sources and Recommendations for Good Cell Culture Practices in Genotoxicity Testing. Mutation Research

[41] Scott, D. et al. (1991), International Commission for Protection Against Environmental Mutagens and Carcinogens, Genotoxicity under extreme culture conditions. A report from ICPEMC Task Group 9, Mutation Research, Vol. 257/2, pp. 147—205

[42] Morita, T. et al. (1992), Clastogenicity of low pH to various cultured mammalian cells, Mutation Research, Vol. 268/2, pp. 297—305

[43] Brusick, D. (1986), Genotoxic effects in cultured mammalian cells produced by low pH treatment conditions and increased ion concentrations, Environmental Mutagenesis, Vol. 8/6, pp. 789—886

[44] Long, L.H. et al. (2007), Different cytotoxic and clastogenic effects of epigallocatechin gallate in various cell-culture media due to variable rates of its oxidation in the culture medium, Mutation Research, Vol. 634/1-2, pp. 177—183

[45] Nesslany, F. et al. (2008), Characterization of the Genotoxicity of Nitrilotriacetic Acid, Environmental and Molecular Mutation., Vol. 49, pp. 439—452

[46] Fenech, M., A.A. Morley (1985), Measurement of micronuclei in lymphocytes, Mutation Research, Vol. 147/1-2, pp. 29—36

[47] Fenech, M. (1997), The advantages and disadvantages of cytokinesis-blood micronucleus method, Mutation Research, Vol. 392, pp. 11—18

[48] Payne, C.M. et al. (2010), Hydrophobic bile acid-induced micronuclei formation, mitotic perturbations, and decreases in spindle checkpoint proteins: relevance to genomic instability in colon carcinogenesis, Nutrition and Cancer, Vol. 62/6, pp. 825—840

[49] Bazin, E. et al. (2010), Genotoxicity of a Freshwater Cyanotoxin,Cylindrospermopsin, in Two Human Cell Lines: Caco-2 and HepaRG, Environmental and Molecular Mutagenesis, Vol. 51/3, pp. 251—259

[50] Le Hegarat, L. et al. (2010), Assessment of the genotoxic potential of indirect chemical mutagens in HepaRG cellsby the comet and the cytokinesis-block micronucleus assays, Mutagenesis, Vol. 25/6, pp. 555—560

[51] Josse, R. et al. (2012), An adaptation of the human HepaRG cells to the in vitro micronucleus assay, Mutagenesis, Vol. 27/3, pp. 295—304

[52] Ehrlich, V. et al. (2002), Fumonisin B1 is genotoxic in human derived hepatoma (HepG2) cells, Mutagenesis, Vol. 17/3, pp. 257—260

[53] Knasmüller, S. et al. (2004), Use of human-derived liver cell lines for the detection of environmental and dietary genotoxicants; current state of knowledge, Toxicology, Vol. 198/1-3, pp. 315—328

[54] Gibson, D.P. et al. (1997), Induction of micronuclei in Syrian hamster embryo cells: comparison to results in the SHE cell transformation assay for National Toxicology Program test chemicals, Mutation Research, Vol. 392/1-2, pp. 61—70

[55] Bonassi, S. et al. (2001), HUman MicroNucleus Project: international database comparison for results with the cytokinesis-block micronucleus assay in human lymphocytes, I. Effect of laboratory protocol, scoring criteria and host factors on the frequency of micronuclei, Environmental and Molecular Mutagenesis, Vol. 37/1, pp. 31—45

[56] Maron, D.M., B.N. Ames (1983), Revised methods for the Salmonella mutagenicity test, Mutation Research, Vol. 113/3-4, pp. 173—215

[57] Ong, T.-m. et al. (1980), Differential effects of cytochrome P450-inducers on promutagen activation capabilities and enzymatic activities of S-9 from rat liver, Journal of Environmental Pathology and Toxicology, Vol. 4/1, pp. 55—65

[58] Elliott, B.M. et al. (1992), Alternatives to Aroclor 1254-induced S9 in *in-vitro* genotoxicity assays, Mutagenesis, Vol. 7, pp. 175—177

[59] Matsushima, T. et al. (1976), «A safe substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems», in *In Vitro* Metabolic Activation in Mutagenesis Testing, de Serres, F.J. et al. (eds), Elsevier, North-Holland, pp. 85—88

[60] Johnson, T.E., D. R. Umbenhauer, S.M. Galloway (1996), Human liver S-9 metabolic activation: proficiency in cytogenetic assays and comparison with phenobarbital/betanaphthoflavone or Aroclor 1254 induced rat S-9, Environmental and Molecular Mutagenesis, Vol. 28, pp. 51—59

[61] UNEP (2001), Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants, United Nations Environment Programme (UNEP). Available at: [http://www.pops.int/]

[62] Tucker, J.D., M.L. Christensen (1987), Effects of anticoagulants upon sister-chromatid exchanges, cell-cycle kinetics, and mitotic index in human peripheral lymphocytes, Mutation Research, Vol.190/3, pp. 225—228

[63] Krahn, D.F., F.C. Barsky, K.T. McCooey (1982), «CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids», in Genotoxic Effects of 91—103

[64] Zamora, P.O. et al. (1983), Evaluation of an exposure system using cells grown on collagen gels for detecting highly volatile mutagens in the CHO/HGPRT mutation assay, Environmental Mutagenesis, Vol. 5/6, pp. 795—801

[65] Asakura, M. et al. (2008), An improved system for exposure of cultured mammalian cells to gaseous compounds in the chromosomal aberration assay, Mutation Research, Vol. 652/2, pp. 122—130

[66] Fenech, M. (1993), The cytokinesis-block micronucleus technique: a detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations, Mutation Research, Vol. 285/1, pp. 35—44

[67] Phelps, J.B., M.L. Garriott, W.P. Hoffman (2002), A protocol for the *in vitro* micronucleus test. II. Contributions to the validation of a protocol suitable for regulatory submissions from an examination of 10 chemicals with different mechanisms of action and different levels of activity, Mutation Research, Vol. 521/1-2, pp. 103—112

[68] Kirsch-Volders, M. et al. (2004), Corrigendum to «Report from the *in vitro* micronucleus assay working group», Mutation Research, 564, 97—100

[69] Lorge, E. et al. (2008), Comparison of different methods for an accurate assessment of cytotoxicity in the *in vitro* micronucleus test. I. Theoretical aspects, Mutation Research, Vol. 655/1-2, pp. 1—3

[70] Surralles, J. et al. (1995), Induction of micronuclei by five pyrethroid insecticides in wholeblood and isolated human lymphocyte cultures, Mutation Research, Vol. 341/3, pp. 169—184

[71] Honma, M. (2011), Cytotoxicity measurement in *in vitro* chromosome aberration test and micronucleus test, Mutation Research, Vol. 724, pp. 86, 87

[72] Pfuhler, S. et al. (2011), *In vitro* genotoxicity test approaches with better predictivity: Summary of an IWGT workshop, Mutation Research, Vol. 723/2, pp. 101—107

[73] OECD (2014), Document supporting the WNT decision to implement revised criteria for the selection of the top concentration in the *in vitro* mammalian cell assays on genotoxicity (Test Guidelines 473, 476 and 487) ENV/JM/TG(2014)17. Available upon request

[74] Morita T., M. Honma, K. Morikawa (2012), Effect of reducing the top concentration used in the *in vitro* chromosomal aberration test in CHL cells on the evaluation of industrial chemical genotoxicity, Mutation Research, Vol. 741, pp. 32—56

[75] Brookmire L., J.J. Chen, D.D. Levy (2013), Evaluation of the Highest Concentrations Used in the *In Vitro* Chromosome Aberrations Assay, Environmental and Molecular Mutagenesis, Vol. 54/1, pp. 36—43

[76] EPA, Office of Chemical Safety and Pollution Prevention (2011), Chemical Substances of Unknown or Variable Composition, Complex Reaction Products and Biological Materials: UVCB Substances, http://www.epa.gov/opptintr/newchems/pubs/uvcb.txt.

[77] Sobol, Z. et al. (2012), Development and validation of an *in vitro* micronucleus assay platform in TK6 cells, Mutation Research, Vol.746/1, pp. 29—34

[78] Hayashi, M., T. Sofuni, M. Jr. Ishidate (1983), An Application of Acridine Orange Fluorescent Staining to the Micronucleus Test, Mutation Research, Vol. 120/4, pp. 241—247

[79] MacGregor, J. T., C.M. Wehr, R.G. Langlois (1983), A Simple Fluorescent Staining Procedure for Micronuclei and RNA in Erythrocytes Using Hoechst 33258 and Pyronin Y, Mutation Research, Vol. 120/4, pp. 269—275

[80] Bryce, S.M. et al. (2011), Miniaturized flow cytometry-based CHO-K1 micronucleus assay discriminates aneugenic and clastogenic modes of action, Environmental and Molecular Mutagenesis, Vol. 52/4, pp. 280—286

[81] Nicolette, J. et al. (2011), *In vitro* micronucleus screening of pharmaceutical candidates by flow cytometry in Chinese hamster V79 cells, Environmental and Molecular Mutagenesis, Vol. 52/5, pp. 355—360

[82] Shi, J., R. Bezabhie, A. Szkudlinska (2010), Further evaluation of a flow cytometric *in vitro* micronucleus assay in CHO-K1 cells: a reliable platform that detects micronuclei and discriminates apoptotic bodies, Mutagenesis, Vol. 25/1, pp. 33—40

[83] OECD (2014), «Statistical analysis supporting the revision of the genotoxicity Test Guidelines», OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on testing and assessment, No.198, OECD Publishing, Paris

[84] Fenech, M. et al. (2003), HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures, Mutation Research, Vol. 534/1-2, pp. 65—75

[85] Elhajouji, A., M. Cunha, M. Kirsch-Volders (1998), Spindle poisons can induce polyploidy by mitotic slippage and micronucleate mononucleates in the cytokinesis-block assay, Mutagenesis, Vol. 13/2, pp. 193—198

[86] Kirsch-Volders, M. et al. (2011), The in vitro MN assay in 2011: origin and fate, biological significance, protocols, high throughput methodologies and toxicological relevance, Archives of Toxicology, Vol. 85/8, pp. 873—899

[87] Hayashi, M. et al. (2010), Compilation and use of genetic toxicity historical control Data, Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, Vol.723/2, pp. 87—90

[88] Ryan, T. P. (2000), Statistical Methods for Quality Improvement, 2nd ed., John Wiley and Sons, New York

[89] Hoffman, W.P., M.L. Garriott, C. Lee (2003), «*In vitro* micronucleus test», in Encyclopedia of Biopharmaceutical Statistics, 2nd ed., Chow, S. (ed.), Marcel Dekker, Inc. New York, pp. 463—467

[90] Fleiss, J. L., B. Levin, M.C. Paik (2003), Statistical Methods for Rates and Proportions, 3rd ed., John Wiley & Sons, New York

[91] Galloway, S.M. et al. (1987), Chromosome aberration and sister chromatid exchanges in Chinese hamster ovary cells: Evaluation of 108 chemicals, Environmental and Molecular Mutagenesis, Vol. 10/suppl. 10, pp. 1—175

[92] Richardson, C. et al. (1989), «Analysis of Data from *In Vitro* Cytogenetic Assays», in Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data, Kirkland, D.J. (ed), Cambridge University Press, Cambridge, pp. 141—154

[93] International Conference on Harmonisation (ICH) Guidance S2 (R1) on Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended For Human Use

УДК 615.038/615.012/615.014/615.2:006.354 МКС 75.080 MOD
11.020
11.120.01

Ключевые слова: методы испытания по воздействию химической продукции на организм человека, микроядерный тест на клетках млекопитающих *in vitro*

БЗ 12—2020

Редактор *Л.И. Нахимова*
Технический редактор *В.Н. Прусакова*
Корректор *Л.С. Лысенко*
Компьютерная верстка *Е.О. Асташина*

Сдано в набор 23.10.2020. Подписано в печать 17.11.2020. Формат 60×84 1/8. Гарнитура Ариал.
Усл. печ. л. 3,72. Уч.-изд. л. 3,37.
Подготовлено на основе электронной версии, предоставленной разработчиком стандарта

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

Поправка к ГОСТ 32635—2020 Методы испытания по воздействию химической продукции на организм человека. Микроядерный тест на клетках млекопитающих *in vitro*

В каком месте	Напечатано	Должно быть
Предисловие. Таблица согласования	—	Узбекистан | UZ | Узстандарт

(ИУС № 2 2021 г.)