

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

«УТВЕРЖДАЮ»

Заместитель Министра  
здравоохранения – Главный  
государственный санитарный  
врач Республики Беларусь



Н.П. Жукова

« 30 » августа 2016 г.

Регистрационный № 053-1215

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОЖНО-РЕЗОРБИТИВНОГО ДЕЙСТВИЯ  
ХИМИЧЕСКОЙ ПРОДУКЦИИ (ХИМИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ  
И ИХ СМЕСЕЙ) *IN VITRO*

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК: Республиканское унитарное  
предприятие «Научно-практический центр гигиены»

АВТОРЫ: к.м.н. Юркевич Е.С., к.м.н. Ильюкова И.И., Борис О.А.,  
Грынчак В.А.

Минск, 2015

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ  
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ  
Заместитель министра –  
Главный государственный  
санитарный врач  
Республики Беларусь

\_\_\_\_\_ Н.П. Жукова  
30.08.2016  
Регистрационный № 053-1215

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОЖНО-РЕЗОРБТИВНОГО ДЕЙСТВИЯ ХИМИЧЕСКОЙ  
ПРОДУКЦИИ (ХИМИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ И ИХ СМЕСЕЙ) *IN VITRO***

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК: РУП «Научно-практический центр гигиены»

АВТОРЫ: канд. мед. наук Е.С. Юркевич, канд. мед. наук И.И. Ильюкова,  
О.А. Борис, В.А. Грынчак

Минск 2015

## ГЛАВА 1. ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

1. В настоящей инструкции по применению (далее — инструкция) изложен гармонизированный с международными требованиями (OECD TG № 428 «Skin Absorption: *in vitro* Method ; (ОЭСР Руководство № 428 «Кожно-резорбтивное действие: метод *in vitro*») метод исследований по изучению кожно-резорбтивного действия вещества на удаленной коже, применяемый в комплексе медицинских услуг, направленных на медицинскую профилактику неблагоприятного действия потенциально опасной для человека продукции: чистые химические вещества, растворы и смеси химических веществ, в том числе пестициды, доклинические формы лекарственных средств медицинского и ветеринарного применения, пищевые и кормовые добавки. Метод *in vitro* используется для начального количественного определения проницаемости кожи и позволяет изучать как кожно-резорбтивное действие, так и наличие исследуемого вещества в удаленной коже. Метод *in vitro* может применяться во всех ситуациях и для всех классов химических веществ.

2. Настоящая инструкция устанавливает подходы, схему и метод испытания по оценке кожно-резорбтивного действия химических веществ и продукции на их основе на удаленной коже; используется для начального количественного определения проницаемости кожи; позволяет проводить сравнение полученных данных с результатами тестирования методом *in vivo*, и разрабатывать стратегию дальнейших исследований с применением методов *in vitro* и/или *in vivo*. Позволяет оценить и классифицировать вещество по полученным эффектам в соответствии с Согласованной на глобальном уровне системой классификации и маркировки химических веществ (далее — СГС) и минимизировать риск воздействия химического фактора на здоровье человека.

3. Метод, изложенный в настоящей инструкции, предназначен для специалистов организаций здравоохранения, проводящих государственный санитарный надзор, иных учреждений, осуществляющих реализацию мероприятий по медицинской профилактике неблагоприятного воздействия химической продукции на здоровье человека.

## ГЛАВА 2. ТЕРМИНЫ И ОПРЕДЕЛЕНИЯ

В настоящей инструкции используются следующие термины и определения:

- исследуемое вещество — материал, у которого должны быть изучены абсорбционные характеристики, желательна с радиоактивной меткой;

- непоглощенная доза (unabsorbed dose) — часть исследуемого вещества, смытая с поверхности кожи после экспозиции или присутствующая на негерметичной повязке, и количество вещества, которое испарилось с кожи во время экспозиции;

- поглощенная доза (absorbed dose) — вещество, присутствующее в биологических тканях и жидкостях организма (моче, крови, тканях и частях тела

после удаления кожи в месте нанесения), смывах с клетки, экскрементах, выдыхаемом воздухе;

- поглощаемая доза (the absorbable dose) — вещество, присутствующее на/в коже после промывания:

- смесевая химическая продукция (смесь химических веществ) — продукция преднамеренного механического смешения (соединения) двух или более химических веществ, не вступающих друг с другом в химическую реакцию;

- химическое вещество — химический элемент и (или) химическое соединение, находящиеся в естественном состоянии или полученные в результате производственного процесса, включая любую добавку, необходимую для обеспечения стабильности, и/или примеси, наличие которых обусловлено ходом производственного процесса, но исключая растворитель, который можно отделить без нарушения стабильности химического вещества или его состава;

- химическая продукция — химическое вещество или смесь химических веществ, предназначенные для дальнейшего использования в хозяйственно-бытовых и иных целях.

### ГЛАВА 3. ОБЩИЕ УСЛОВИЯ ПРОВЕДЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЙ

1. Изучение и оценку кожно-резорбтивного действия при тестировании *in vitro* проводят для тех веществ, для которых накожный путь поступления веществ является приоритетным. Метод *in vitro* оценивает диффузию химических веществ в кожу и через удаленную кожу и позволяет использовать нежизнеспособную кожу только для измерения диффузии или свежую метаболически активную кожу — для одновременного измерения диффузии и кожного метаболизма.

2. Метод предназначен для сравнительной оценки наличия вещества в коже и проницаемости препаратов через нее, а также для обеспечения модели для оценки перкутанной абсорбции у людей.

3. В исследовании может использоваться кожа многих млекопитающих, а также человека. Проницаемость кожи после отделения ее от тела поддерживается за счет основного диффузионного барьера нежизнеспособной роговой оболочки, в которой не было зарегистрировано активного прохождения вещества при диффузии через кожу.

4. При проведении исследований используют следующее оборудование, материалы, реактивы:

- весы лабораторные общего назначения 2-го класса точности (по ГОСТ 24104) с пределом взвешивания 200 г; весы аналитические электронные с пределом допускаемой погрешности  $\pm 0,0001$  г; стерилизатор сухожаровой с автоматической регулировкой температуры (100–220) °С (по ГОСТ 24437); анализатор потенциометрический с погрешностью измерений pH  $\pm 0,1$  (pH-метр) с набором электродов (по ГОСТ 19881); диффузионная ячейка, дерматом, водяная баня, холодильник бытовой (по ГОСТ 16317); стаканы химические (50–100 см<sup>3</sup>), цилиндры (по ГОСТ 1770) и колбы (по ГОСТ 25336) разной вместимости (10, 100, 1000 см<sup>3</sup>); штативы для пробирок; шпатели стеклянные; вата медицинская

гигроскопичная (по ГОСТ 5556); марля медицинская (по ГОСТ 9412); ножницы (по ГОСТ 21241);

- вода дистиллированная и бидистиллированная (по ГОСТ 6709); спирт этиловый ректификат (по ГОСТ 5962); диметилсульфоксид (х.ч.); раствор физиологический (изотонический, стерильный); масло растительное и др.

Возможно применение оборудования и материалов с аналогичными по назначению техническими и метрологическими характеристиками, а также других препаратов аналогичного назначения для проведения исследований; при их применении следует руководствоваться рекомендациями изготовителя.

5. Исследования проводят в помещениях, оснащенных приточно-вытяжной вентиляцией и водопроводной водой. Приготовление растворов, подготовка проб и проведение исследований осуществляются при следующих условиях: температура окружающего воздуха ( $20 \pm 5$ ) °С; относительная влажность воздуха не более 80% при  $T = 25$  °С; атмосферное давление 84,0–106,7 кПа (630–800 мм рт.ст.).

6. Эксперименты с лабораторными животными и изучаемыми препаратами должны производиться работниками в соответствии с требованиями охраны труда, в спецодежде, с использованием индивидуальных средств защиты кожи, органов зрения и дыхания.

#### ГЛАВА 4. ПРИНЦИП МЕТОДА

1. Исследуемое вещество, желательна с радиоактивной меткой, наносят на поверхность кожного образца, разделяющего две камеры диффузионной ячейки клетки. Вещество оставляют на коже на определенное время при установленных условиях до удаления вещества с использованием соответствующей процедуры очистки. Приемную жидкость собирают в различные периоды времени в течение эксперимента и анализируют на присутствие вещества и/или его метаболитов.

При использовании метаболически активных систем метаболиты исследуемых веществ анализируют соответствующими методами. Количественную оценку распределения исследуемого вещества и его метаболитов проводят, при необходимости, по окончании эксперимента.

2. Абсорбцию исследуемого вещества проводят в течение установленного периода времени согласно методике и измеряют путем анализа приемного раствора и обработанной кожи.

Оставшееся на коже исследуемое вещество рассматривают как абсорбированное, за исключением описанных случаев, когда абсорбцию определяют только по величине приемного раствора.

Дальнейшую оценку данных, включая полное распределение и процентное содержание исследуемого вещества, проводят на основании анализа других компонентов (вещество, смытое с кожи или оставшееся в кожных слоях).

3. Адекватность постановки опыта и достоверность тестовой системы в испытательной лаборатории оценивают по результатам тестирования

соответствующих данному методу контрольных веществ, опубликованным в литературе.

Данное требование выполняется путем тестирования контрольного (справочного) вещества (предпочтительно с липофильностью, близкой к исследуемому веществу) параллельно с исследуемым веществом или путем сравнения полученных ранее данных литературы для ряда контрольных (справочных) веществ с различной липофильностью (например, кофеин, бензойная кислота или тестостерон).

## ГЛАВА 5. ОПИСАНИЕ МЕТОДА

1. *Подготовка кожи.* В эксперименте может использоваться кожа человека или животных; при использовании кожи человека необходимо соблюдать национальные, международные и этические нормы. Предпочтительно использовать жизнеспособную кожу, нежизнеспособная кожа также может использоваться при подтверждении ее целостности.

Пригодными для применения являются как эпидермальные мембраны (разделенные обработкой энзимами, теплом или химическим способом), так и расщепленные кожные образцы (обычно 200–400 мкм толщиной), приготовленные с помощью дерматома. Как правило, используют кожу стандартной толщины, но в случаях, обоснованных специальными требованиями, может употребляться кожа с толщиной слоя  $>1$  мм.

Выбор вида животных, анатомического места и техники препарирования аргументируют. Достоверность данных для каждой экспериментальной пробы подтверждают, как минимум, в четырех воспроизведениях.

2. Целостность подготовленного образца кожи обязательно проверяют, чтобы не допустить повреждения рогового слоя. При исследовании кожного метаболизма свежесрезанная кожа должна быть использована максимально быстро (в течение 24 ч) при соблюдении условий, поддерживающих метаболическую активность.

Иные сроки хранения кожи зависят от системы энзимов, вовлеченных в метаболизм, и температур хранения. У длительно хранившихся проб кожи перед исследованием проверяют барьерную функцию.

3. Пробу исследуемого вещества (например, чистый, разбавленный или смешанный материал, содержащий исследуемое вещество, наносимое на кожу) готовят в той же форме (или в форме соответствующего суррогата), которая может воздействовать на человека или иные объекты. Любые другие формы изучаемой пробы должны быть обоснованы.

4. В эксперименте используют более одной пробы исследуемого вещества, в концентрациях, максимально соответствующих диапазону реальных воздействий на человека. Параллельно изучают экспериментальный диапазон типичных составов.

5. Исследуемое вещество наносят при помощи накожных аппликаций, имитирующих воздействие на человека, соблюдая следующие экспозиционные

дозы: 1–5 мг/см<sup>2</sup> кожи для твердых веществ, до 10 мкл/см<sup>2</sup> — для жидкостей. Количество аппликаций обосновывают ожидаемыми условиями проведения испытания, целями исследования и физическими характеристиками пробы. Например, длительные аппликации используют в случаях, когда применяют большие количества вещества на единицу поверхности.

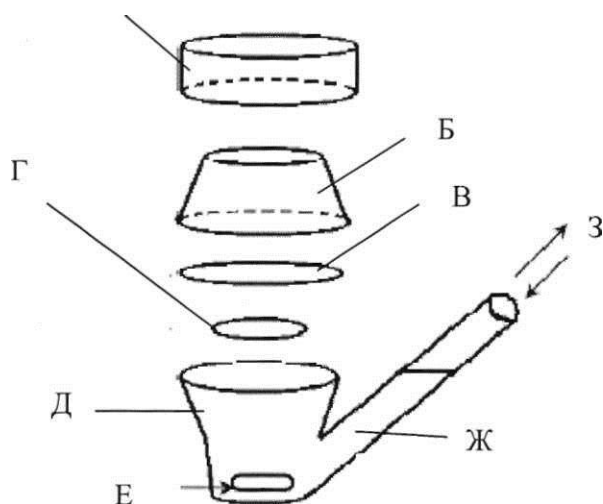
6. На пассивную диффузию веществ (соответственно и на кожно-резорбтивное действие) влияет температура. Для диффузионной камеры и кожи должна поддерживаться постоянная температура, близкая к нормальной температуре кожи — 32±1°C. Различные конструкции ячеек требуют применения различных водяных бань и нагреваемых температурных блоков для поддержания физиологической нормы для кожи и приемного раствора. Влажность должна быть в диапазоне 30–70%.

7. Диффузионная ячейка состоит из донорской и приемной камер, между которыми помещают кожи (пример типичного устройства приведен на рисунке). Ячейка должна обеспечивать герметичность вокруг кожи, легкое приготовление образцов и доброкачественное перемешивание приемного раствора в контакте с обратной стороной кожи, а также оптимальный температурный контроль ячейки и ее содержимого.

Для проведения эксперимента подходят как статические, так и проточные диффузионные ячейки. Донорские ячейки оставляют открытыми во время экспозиции определенной дозой экспериментальной пробы. Для неопределенных доз или некоторых сценариев применения для определенных доз ячейки могут быть закрыты.

8. В качестве приемного раствора, как правило, используют физиологически проводящий приемный раствор, применение иных растворов необходимо обосновать. Необходимо знать точный состав приемного раствора. Исследуемое вещество должно быть достаточно растворимо в приемном растворе таким образом, чтобы это не мешало абсорбции. Приемный раствор не должен оказывать влияния на целостность образца кожи.

В проточных системах скорость потока не должна мешать диффузии исследуемого вещества в приемный раствор. В статических системах приемный раствор должен постоянно перемешиваться и регулярно обновляться. При изучении метаболизма приемный раствор должен поддерживать жизнеспособность кожи на протяжении всего эксперимента



А — фильтр из активированного угля (для летучих исследуемых веществ);  
 Б — донорская камера ячейки; В — кожная оболочка (2,54 см<sup>2</sup>); Г — поддерживающая сетка; Д — стеклянная диффузионная ячейка; Е — магнитный вращающийся стержень;  
 Ж — приемная камера (раствор с температурой 32±1°С, поддерживаемый с помощью водяной бани); З — автоматический пробоотборник, запрограммированный для отбора проб в определенное время; пипетка/шприц для отбора проб в люминесцентные или ВЭЖХ сосуды; объем поддерживается путем добавления свежего приемного раствора.

**Рисунок — Пример типичного устройства статической диффузионной ячейки для проведения исследований перкутанной абсорбции *in vitro***

9. *Условия проведения эксперимента.* Для имитации специфического типа воздействия на человека используют короткие периоды экспозиции, в иных случаях — в течение всего эксперимента. Кожу промывают от остатков исследуемого вещества разрешенным моющим средством, промывочный раствор собирают для анализа. Процедуру удаления исследуемого вещества обосновывают, и зависит она от предполагаемых условий его использования.

Период наблюдения составляет 24 ч и, как правило, является достаточным для получения характеристик абсорбционного профиля, особенно для веществ, быстро проникающих через кожу, тем более, что целостность кожи после 24 ч может быть нарушена.

Исследуемые вещества, проникающие через кожу медленно, наблюдают более длительное время. Отбор проб приемного раствора проводят с частотой, позволяющей представить абсорбционный профиль вещества графически.

10. По окончании эксперимента все компоненты тестовой системы (донорская камера, смывы с поверхности кожи, пробы кожи, приемный раствор и приемная камера) подвергают анализу. При необходимости кожу разделяют на область, подвергшуюся воздействию, и на область под бортиком ячейки, а также на роговую оболочку, эпидермальную и дермальную фракции для проведения дополнительного анализа.



## ГЛАВА 6. ПОДГОТОВКА ОТЧЕТА

Отчет о проведении исследований включает требования, обусловленные тестовым протоколом, обоснование использованной тестовой системы; должен содержать информацию из пункта 8 гл. 5. Отчет о проведении испытания должен включать требования, предусмотренные тестовым протоколом, в т.ч. обоснование использования данной тестовой системы, и содержать следующую информацию:

- по исследуемому веществу — физическая природа, физико-химические свойства (молекулярная масса и  $\log P_{ow}$  коэффициент разделения); чистота (радиохимическая чистота); идентификационные данные (например, номер партии); растворимость в приемном растворе;

- по пробе исследуемого вещества — состав и обоснование использования; гомогенность.

- по условиям проведения эксперимента — исходная информация, источник и место расположения вырезаемого участка кожи, метод подготовки, условия хранения до использования, предварительная подготовка (очистка, обработка антибиотиком и т. д.), измерения целостности кожи, метаболический статус, обоснование использования;

- по устройству ячейки, составу приемного раствора, скорости течения приемного раствора или периоду наблюдений и процедуры — описание нанесения исследуемого вещества и количественное описание нанесенных доз; продолжительность экспозиции; описание удаления исследуемого вещества с кожи (например, промывка кожи); описание анализа кожи, способы фракционирования, используемые для демонстрации распределения кожи; процедуры промывки ячейки и оборудования; методы исследований; способы экстракции; пределы определения и аналитические методы проверки достоверности.

Все результаты эксперимента (нанесенная доза + смывы с кожи + кожа + приемный раствор + смывы с ячейки) представляют таблично, с указанием абсорбционного профиля и данных об абсорбции (степень, количество и процентное соотношение).