

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ
Заместитель Министра –
Главный государственный
санитарный врач
Республики Беларусь



А.А.Тарасенко

« 29 » 01 2022 г.

Регистрационный № 008-1121

**МЕТОДИКА ОЦЕНКИ СТЕПЕНИ ВЫРАЖЕННОСТИ
ГЕНО- И ЦИТОТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ВЕЩЕСТВ
ДЛЯ ОБОСНОВАНИЯ КОЭФФИЦИЕНТА ЗАПАСА
ПРИ ГИГИЕНИЧЕСКОМ НОРМИРОВАНИИ МУТАГЕНОВ
В ВОЗДУХЕ РАБОЧЕЙ ЗОНЫ**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК:

Республиканское унитарное предприятие «Научно-практический центр гигиены»

АВТОРЫ:

к.м.н. Богданов Р.В., к.б.н. Колеснева Е.В., Крыж Т.И., Анисович М.В.

Минск, 2021

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ
Заместитель министра —
Главный государственный
санитарный врач
Республики Беларусь

_____ А. А. Тарасенко
28.01.2022
Регистрационный № 008-1121

**МЕТОДИКА ОЦЕНКИ СТЕПЕНИ ВЫРАЖЕННОСТИ
ГЕНО- И ЦИТОТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ВЕЩЕСТВ
ДЛЯ ОБОСНОВАНИЯ КОЭФФИЦИЕНТА ЗАПАСА
ПРИ ГИГИЕНИЧЕСКОМ НОРМИРОВАНИИ МУТАГЕНОВ
В ВОЗДУХЕ РАБОЧЕЙ ЗОНЫ**

инструкция по применению

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

АВТОРЫ: канд. мед. наук Р. В. Богданов, канд. биол. наук Е. В. Колеснева,
Т. И. Крыж, М. В. Анисович

Минск 2021

ГЛАВА 1

НАЗНАЧЕНИЕ И ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

1. Настоящая инструкция по применению (далее — инструкция) устанавливает методику оценки степени выраженности гено- и цитотоксического действия веществ для обоснования коэффициента запаса при гигиеническом нормировании мутагенов в воздухе рабочей зоны с целью выявления мутагенных эффектов и минимизации риска воздействия химического фактора на здоровье человека. Методика направлена на выявление маркеров цитотоксических и цитогенетических нарушений, вызванных химическими веществами, и последующего обоснования коэффициента запаса для потенциальных мутагенов при гигиеническом нормировании вредных веществ в воздухе рабочей зоны.

2. Настоящая инструкция предназначена для организаций (учреждений) здравоохранения, осуществляющих государственный санитарный надзор, иных учреждений, выполняющих токсикологические исследования и осуществляющих реализацию мероприятий по медицинской профилактике неблагоприятного воздействия химической продукции на здоровье человека.

3. Настоящая инструкция вступает в силу с даты ее утверждения.

ГЛАВА 2

ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

4. Для целей настоящей инструкции используются следующие термины и их определения:

абerrации хроматидного типа — структурные хромосомные нарушения, выявляемые как разрыв одной хроматиды или разрыв и соединение между хроматидами;

абerrации хромосомного типа — структурные хромосомные нарушения, выявляемые как разрыв или разрыв и соединение между обеими хроматидами в идентичной точке;

вредные вещества — вещества, которые при контакте с организмом человека в случае нарушения требований безопасности могут вызвать профессиональные заболевания или отклонения в состоянии здоровья, обнаруживаемые современными методами как в процессе воздействия вредного вещества, так и в отдаленные сроки жизни настоящего и последующего поколений;

коэффициент запаса — расчетная величина, показывающая, во сколько раз предельно допустимая концентрация вредного вещества ниже порога хронического действия;

микроядро — небольшое ядро, отделенное от основного ядра клетки, образующееся в телофазе митоза (мейоза) при отставании фрагментов хромосомы или целых хромосом;

митотический индекс — отношение числа клеток в метафазе к общему числу клеток в наблюдаемой клеточной популяции; показатель степени пролиферации в данной клеточной популяции;

нормохромный эритроцит — зрелый эритроцит, в котором отсутствуют рибосомы, и который отличается от незрелого, полихроматофильного эритроцита при селективном окрашивании на рибосомы;

полиплоидия — кратное гаплоидному (n) изменение числа хромосом, отличное от диплоидного числа (т. е. $3n$, $4n$ и т. д.);

полихроматофильный эритроцит — незрелый эритроцит на промежуточной стадии развития, который еще содержит рибосомы и поэтому может быть отличен от зрелого, нормохромного эритроцита при селективном окрашивании на рибосомы;

порог хронического действия — наименьшая концентрация или доза вещества, вызывающая при хроническом воздействии изменения биологических показателей на уровне целостного организма, выходящие за пределы приспособительных физиологических реакций;

предельно допустимая концентрация (ПДК) в воздухе рабочей зоны — качественное и (или) максимальное количественное значение концентрации микроорганизма-продуцента, микробного препарата и его компонентов, вредного вещества в воздухе рабочей зоны, которое при ежедневной (кроме выходных дней) работе продолжительностью 8 ч и не более 40 ч в неделю в течение всего рабочего стажа не должно вызывать заболеваний или отклонений в состоянии здоровья, обнаруживаемых современными методами исследований, в процессе работы или в отдаленные сроки жизни настоящего и последующего поколений;

пробел (гэп) — небольшое ахроматическое нарушение одной хроматиды размером меньше ширины одной хроматиды и с минимальным смещением хроматид;

структурные aberrации — изменение структуры хромосом, выявляемое при микроскопическом анализе митоза на стадии метафазы, наблюдаемое как делеции, фрагменты, внутривхромосомные и межхромосомные обмены;

центромера (кинетохор) — участок(и) хромосомы, с которым нити веретена деления связаны во время клеточного деления, что позволяет дочерним (гомологичным) хромосомам двигаться к полюсам дочерних клеток;

численные aberrации — отклонение числа хромосом от нормального набора хромосом вида животного, использованного в эксперименте;

эндоредупликация — процесс, при котором после периода S (периода репликации ДНК) ядро не входит в митоз и происходит следующий S период.

5. Содержание лабораторных животных и оборудование должны соответствовать действующим нормативно-методическим документам к постановке лабораторных исследований для обоснования гигиенических нормативов вредных веществ в воздухе рабочей зоны.

6. Условия обращения, проведения экспериментов и выведения лабораторных животных (эвтаназия) из экспериментов должны соответствовать гуманистическим принципам надлежащей лабораторной практики, изложенным в технических нормативных правовых актах Республики Беларусь.

7. Гигиеническое нормирование химических веществ основывается на принципах пороговости действия вредных веществ на целостный организм и учитывает комплексный подход к установлению порогов вредного действия с

изучением как интегральных показателей, так и специфического действия химических веществ, в том числе гено- и цитотоксического действия.

8. Для изучения гено- и цитотоксического действия веществ при гигиеническом нормировании мутагенов в воздухе рабочей зоны настоящая методика предлагает:

микроядерный тест на эритроцитах млекопитающих;

метод «ДНК-комет» в клетках млекопитающих *in vivo*;

метод оценки хромосомных aberrаций в клетках млекопитающих *in vitro*;

метод оценки хромосомных aberrаций в клетках костного мозга млекопитающих.

Обоснование ПДК вредных веществ в воздухе рабочей зоны проводится в соответствии с этапами, представленными в приложении 1.

9. Экспериментальное изучение токсичности и определение параметров токсикометрии вредных веществ осуществляется общепринятыми методами.

10. Расчет коэффициента запаса производится на основании установленных параметров токсикометрии (порог острого действия, порог хронического действия, зона хронического действия, коэффициент видовой чувствительности) и оценки гено- и цитотоксического действия химического вещества.

ГЛАВА 3

ОБЩИЕ УСЛОВИЯ ПРОВЕДЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЙ ПО ВЫЯВЛЕНИЮ ГЕНО- И ЦИТОТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ

11. На предварительном этапе проводят анализ информации по исследуемому веществу, включающий сведения о составе и химическом строении, физико-химических свойствах, результатах токсикологических испытаний *in vivo* и *in vitro*. Полученная информация служит подтверждением необходимости проведения исследований и способствует выбору адекватной начальной дозы.

12. Твердые вещества растворяют или суспендируют в соответствующем растворителе и при необходимости разводят перед использованием. Жидкие вещества вводят непосредственно или разводят перед использованием. Растворы исследуемых веществ хранятся при соответствующих условиях.

13. Растворитель не должен оказывать токсическое действие при использованных дозах (концентрациях) и вступать в реакцию с исследуемым веществом (предпочтительно использовать водные растворы).

14. Приготовление растворов, подготовку проб и проведение исследований осуществляют при следующих условиях: температура окружающего воздуха 20 ± 5 °С; относительная влажность воздуха не более 80 % при температуре 25 °С; атмосферное давление 630–800 мм рт. ст.

ГЛАВА 4

МИКРОЯДЕРНЫЙ ТЕСТ НА ЭРИТРОЦИТАХ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

15. Микроядерный тест на млекопитающих *in vivo* используют для выявления индукции исследуемым веществом нарушений хромосом или

митотического аппарата эритробластов при анализе эритроцитов в костном мозге или в периферической крови животных.

16. При оценке мутагенной активности микроядерный тест на млекопитающих *in vivo* позволяет учесть такие факторы как метаболизм, фармакокинетику вещества, процессы репарации ДНК. Тест *in vivo* также используют при дальнейшей оценке мутагенного эффекта, выявленного в тест-системах *in vitro*.

17. Принцип метода заключается в анализе частоты незрелых (полихроматофильных) эритроцитов с микроядрами у экспериментальных животных, повышение которой является показателем индуцированных нарушений хромосом.

18. Объектом исследования является костный мозг грызунов. Анализ полихроматофильных эритроцитов с микроядрами в периферической крови также используется у других видов животных, селезенка которых не способна элиминировать эритроциты с микроядрами или для которых показана чувствительность в выявлении веществ, вызывающих структурные или численные нарушения хромосом.

19. Микроядра различают по ряду критериев:

идентификация присутствия или отсутствия кинетохора или ДНК центромер в микроядре;

частота полихроматофильных эритроцитов;

доля зрелых (нормохромных) эритроцитов с микроядрами в периферической крови от проанализированного числа зрелых эритроцитов (если эксперимент длится 4 и более недель).

20. Необходимо использовать генетически однородных животных, отклонение по массе тела и возрасту которых на момент эксперимента не должно превышать $\pm 10\%$. Контрольные и экспериментальные группы формируют методом случайного отбора, каждое животное маркируют.

21. В каждом опыте должны быть соответствующие положительные и отрицательные контроли. Контрольные и экспериментальные группы животных должны находиться в одинаковых условиях.

Химические вещества положительного контроля при выбранных уровнях экспозиции должны индуцировать значимое повышение количества микроядер над контролем. Примеры веществ положительного контроля приведены в приложении 2.

Воздействие на животных группы отрицательного контроля и экспериментальных групп проводится до установления данных variability и частоты клеток с микроядрами, соответствующих историческому контролю. Исследования на контрольной группе без воздействия проводят до установления отсутствия вредного или мутагенного эффектов.

22. В каждой экспериментальной и контрольной группе должно быть не менее 5 животных каждого пола. Если имеются данные на том же виде животных и при той же схеме введения, которые показывают на отсутствие существенных различий в токсичности между полами достаточно проведение опыта на животных одного пола.

23. Исследуемое вещество вводят внутривенно или внутривентально (другой способ должен быть обоснован).

24. Эксперимент может быть проведен 2 способами:

Способ 1. Однократное воздействие на животных. Пробы отбирают не менее 2 раз, не ранее 24 ч, но, не превышая 48 ч после введения, с соответствующим интервалом между пробами. Пробы периферической крови отбирают не менее 2 раз, не ранее 36 ч, но, не превышая 72 ч после введения, с соответствующим интервалом между пробами. При выявлении положительного ответа при одном интервале времени забора пробы, дополнительные интервалы времени для забора проб не требуются.

Способ 2. Двукратное и более ежедневное введение (два и более введения с интервалом 24 ч). Пробу отбирают между 18–24 ч после последнего введения для костного мозга и между 36 и 48 ч после последнего введения для периферической крови. Другие интервалы времени отбора проб могут быть использованы как дополнительные.

25. Полную схему исследований с использованием трех доз можно не проводить в случае отсутствия токсического эффекта при действии дозы 2000 мг/кг в 1 сут и отсутствия генотоксичности по результатам анализа структурно-связанных веществ.

26. Приготовление препаратов. Клетки костного мозга выделяют из бедренной или большой берцовой кости сразу после эвтаназии животных, готовят препараты и окрашивают, используя стандартные методы (окрашивание по Романовскому – Гимзе, акридиновым оранжевым и т. д.). Периферическую кровь берут из хвостовой вены или других кровеносных сосудов. Клетки крови окрашивают суправитально или делают мазок и окрашивают.

27. При микроскопическом анализе долю незрелых эритроцитов от общего (незрелые + зрелые) числа эритроцитов определяют для каждого животного при подсчете по крайней мере 200 эритроцитов для костного мозга и 1000 для периферической крови. Для учета незрелых эритроцитов с микроядрами анализируют минимум 2000 незрелых эритроцитов на каждое животное. При анализе доля незрелых эритроцитов от общего числа эритроцитов должна быть не менее 20 % от значений контрольного уровня. Для учета микроядер (при заправке животных в течение 4 и более недель) анализируют не менее 2000 зрелых эритроцитов на каждое животное.

28. Для каждого животного подсчитывают число незрелых эритроцитов, число незрелых эритроцитов с микроядрами, число незрелых эритроцитов от общего числа эритроцитов, долю незрелых эритроцитов от общего числа эритроцитов и процент эритроцитов с микроядрами. При заправке в течение 4 и более недель также учитывают данные по зрелым эритроцитам. Результаты представляют в табличной форме (приложение 3).

29. Оценка и интерпретация результатов. Критериями определения положительного результата являются: зависимое от дозы повышение числа клеток с микроядрами или значимое повышение числа клеток с микроядрами в одной дозовой группе при одном временном варианте эксперимента. Вещество, которое не соответствует вышеприведенным критериям, считается не мутагенным

в данном тесте. Положительные результаты в микроядерном тесте показывают, что вещество индуцирует образование микроядер, которые являются следствием хромосомных нарушений или повреждений митотического аппарата эритробластов. Отрицательные результаты указывают, что при данных условиях эксперимента вещество не индуцирует образование микроядер в незрелых эритроцитах у исследованного вида.

ГЛАВА 5

МЕТОД «ДНК-КОМЕТ» В КЛЕТКАХ МЛЕКОПИТАЮЩИХ *IN VIVO*

30. Метод ДНК-комет (*comet assay*) или метод щелочного гелеэлектрофореза отдельных клеток используют для оценки способности химических веществ индуцировать ДНК-повреждения в органах и тканях лабораторных животных. В щелочной версии метод позволяет интегрально оценивать первичные ДНК-повреждения, включающие одно- и двунитевые разрывы ДНК.

31. Принцип метода основан на регистрации в электрическом поле ДНК и/или фрагментов ДНК клеток, заключенных в агарозный гель. Исследуемые клетки вносят в агарозный гель и наносят на подготовленные гель-слайды. После полимеризации геля клетки лизируют и подвергают щелочной денатурации ($\text{pH} > 13$), в результате которой ДНК переходит в однонитевую форму. В процессе электрофореза ДНК мигрирует к аноду, формируя электрофоретический след, напоминающий хвост кометы, параметры которого зависят от количества разрывов в исследуемой ДНК. После завершения щелочного электрофореза микропрепараты нейтрализуют/фиксируют, окрашивают и микроскопируют под флуоресцентным микроскопом. Измерения могут быть выполнены визуально, непосредственно под микроскопом либо с использованием сохраненных цифровых изображений (компьютерный анализ).

32. Методика приготовления микропрепаратов, лизис и условия проведения электрофореза подробно описаны в рекомендациях OECD Guideline N 489 «*In vivo* mammalian alkaline comet test assay» и в МР 4.2.0014-10 «Оценка генотоксических свойств методом ДНК-комет *in vitro*».

33. Исследования проводят на мелких лабораторных грызунах — половозрелых мышах или крысах. Необходимо использовать генетически однородных животных, отклонение по массе тела и возрасту которых на момент эксперимента не должно превышать $\pm 10\%$. Каждая контрольная и получающая исследуемое вещество группа должна содержать не менее 5 особей (эксперименты проводят на животных одного пола).

34. Исследуемые вещества растворяют в деионизированной воде или физиологическом растворе. Водонерастворимые вещества вводят с Твин-80 или используют в качестве растворителя 1 % раствор этилового спирта или диметилсульфоксид (ДМСО). Для перорального введения водонерастворимых веществ предпочтительно использовать 1 % водную суспензию крахмала или растительное масло (оливковое).

35. Вещество исследуют в дозах, соответствующих $1/10 \text{ DL}_{50}$ и $1/100 \text{ DL}_{50}$, но не выше $1/2 \text{ DL}_{50}$. В случае если токсичность исследуемого вещества низкая и

дозу DL_{50} невозможно определить по техническим причинам, в качестве максимальной дозы используется 2000 мг/кг.

36. Исследуемое вещество вводят внутрижелудочно или внутрибрюшинно (другой способ должен быть обоснован). Максимальный одновременный объем вводимого раствора или соответствующего растворителя зависит от массы тела животного и определяется из расчета не более 20 мл/кг.

37. Эксперименты проводят при однократном введении исследуемого вещества с эвтаназией животных через 3–6 ч и 18–24 ч после введения. Более короткая экспозиция (менее 3 ч) допускается для нестабильных, быстро абсорбируемых и метаболизируемых веществ, более длительная экспозиция (более 24 ч) — для веществ, требующих большего времени для биотрансформации. При получении положительного результата при одном из сроков экспозиции эксперименты далее не проводят.

38. Для оценки генотоксического действия веществ, обладающих кумулятивным эффектом, используют многократное введение вещества в течение 7–14 дней. Животных подвергают эвтаназии через 3 ч после последнего введения.

39. Оценку проводят минимум в трех органах/тканях (в костном мозге, в клетках крови, в толстой кишке, в головном мозге, в печени, в мочевом пузыре) с обязательным включением печени

40. Окрашивание и микроскопический анализ. Для окраски микропрепаратов используют флуоресцентные красители (например, этидиум бромид, пропидиум йодид, SYBR Green I или акридиновый оранжевый).

41. Оценка результатов. Для каждого микропрепарата анализируют не менее 100 ДНК-комет. Статистический анализ результатов проводят по каждому органу путем сравнения показателей повреждения ДНК в опытной и контрольной группах (% ДНК в хвосте, момент хвоста, длина хвоста, индекс ДНК-комет). Критерием положительного результата является статистически значимое, зависимое от дозы увеличение показателя повреждения ДНК при одном из сроков введения. Положительный результат указывает, что исследуемое вещество проявляет *in vivo* ДНК-повреждающее действие в данном органе-мишени.

ГЛАВА 6

МЕТОД ОЦЕНКИ ХРОСОМНЫХ АБЕРРАЦИЙ В КЛЕТКАХ МЛЕКОПИТАЮЩИХ *IN VITRO*

42. Метод оценки хромосомных aberrаций в клетках млекопитающих *in vitro* используют для выявления веществ, которые индуцируют структурные aberrации хромосом в культивируемых клетках млекопитающих. Тест используют для скрининга потенциальных мутагенов и канцерогенов для млекопитающих.

43. Метод оценки хромосомных aberrаций *in vitro* проводят на перевиваемых клеточных линиях, клеточных штаммах или первичных культурах клеток. Используемые клетки отбирают на основе способности к росту в культуре, стабильности кариотипа, числа и разнообразия хромосом и спонтанного уровня хромосомных aberrаций.

В экспериментах используют:

различные клеточные линии (клетки яичников китайского хомячка СНО, клетки легких китайского хомячка V79, ТК6);

первичные культуры, включая лимфоциты периферической крови человека и млекопитающих.

44. Принцип метода. Экспозицию клеточных культур с изучаемым веществом проводят в вариантах с метаболической активацией и без нее. После экспозиции с изучаемым веществом в культуры клеток вносят вещество, блокирующее клеточный цикл на стадии метафазы (например, колцемид или колхицин). Далее клетки фиксируют, красят и анализируют под микроскопом для обнаружения хромосомных аббераций.

Индикаторами цитотоксичности являются: целостность клеток и их рост, степень слияния, количество жизнеспособных клеток, митотический индекс.

45. Для культивирования используют соответствующие культуральные среды и условия инкубации (посуда для культивирования, концентрация CO_2 , температура и влажность). Клеточные линии, на которых проводят исследования, следует постоянно проверять на стабильность модального числа хромосом и отсутствие контаминации микоплазмой (для клеток должна быть известна нормальная продолжительность клеточного цикла).

46. Клеточные культуры засевают в культуральной среде до плотности, при которой клетки не будут мешать друг другу до времени фиксации и инкубируют при 37°C .

47. При метаболической активации клетки инкубируют с изучаемым веществом. Используют кофакторы и постмитохондриальную фракцию (S9), приготовленную из печени грызунов, обработанных индуктором ферментов Aroclor 1254, или комбинацией фенобарбитала и β -нафтофлавона. Постмитохондриальную фракцию добавляют в объеме 1–10 % от объема культуральной среды. Критериями определения максимальной концентрации изучаемого вещества являются: цитотоксичность, растворимость в культуральной среде, изменение pH и осмотическая концентрация.

48. Растворитель не должен вступать в химическую реакцию с исследуемым веществом, не должен снижать выживаемость клеток и активность смеси S9. Используют водный растворитель (физиологический раствор или питательную среду). При тестировании веществ, водные растворы которых нестабильны, следует использовать безводный органический растворитель.

49. Исследуют не менее 3 доз (концентраций) вещества. Если вещество обладает цитотоксическим действием, его следует изучать в таких дозах (концентрациях), которые находятся в диапазоне от максимального уровня токсичности до ее отсутствия. На момент фиксации максимальная концентрация должна показать значительное (более 50 %) сокращение степени слияния, количества клеток или митотического индекса.

Для веществ с относительно низкой цитотоксичностью выбирают наиболее низкую максимальную дозу или концентрацию в культуре клеток (5 мкл/мл, 5 мг/мл или 0,01 M).

50. Для относительно нерастворимых веществ, которые не токсичны в концентрациях ниже предела растворимости, максимальную концентрацию берут выше предела растворимости в конечной культуральной среде в конце периода обработки. Когда токсичность проявляется только в более высокой, чем самая низкая нерастворимая концентрация, исследуют более одной концентрации с видимой преципитацией.

51. Контроль. Соответствующие положительные и отрицательные контроли в вариантах с метаболической активацией и без нее должны быть в каждом эксперименте. В варианте с метаболической активацией вещество положительного контроля должно проявлять мутагенный эффект после метаболической активации.

В качестве положительного контроля применяют вещество в концентрации, при которой имеется воспроизводимое и значимое повышение эффекта над контролем. Примеры веществ положительного контроля приведены в приложении 2.

В группах отрицательного контроля, обработку клеток проводят в том же режиме, как и в экспериментальных группах для каждого времени фиксации. Исследования на контрольной группе без воздействия проводятся до установления отсутствия вредного или мутагенного эффектов растворителя.

52. Пролиферирующие клетки обрабатывают исследуемым веществом в вариантах с метаболической активацией и без нее. Обработку лимфоцитов проводят через 48 ч после стимуляции митогеном.

53. Для каждой концентрации ставят две культуры, в т. ч. для отрицательного и положительного контролей. Когда данные показывают минимальные вариации результатов между двумя культурами, возможно использование в эксперименте только одной культуры с каждой концентрацией.

54. Газообразные или летучие вещества исследуют соответствующими методами, например, в запечатанных культуральных сосудах.

55. Клетки экспонируют с исследуемым веществом в условиях с метаболической активацией и без нее в течение 3–6 ч и фиксируют через промежуток времени эквивалентный приблизительно 1,5-кратной продолжительности клеточного цикла после начала воздействия веществом. Если получен отрицательный результат в вариантах с метаболической активацией и без нее, следует провести опыт с метаболической активацией, увеличив длительность воздействия до 1,5-кратной продолжительности клеточного цикла.

56. Каждую культуру клеток фиксируют отдельно для приготовления препаратов метафазных хромосом, колцемид или колхицин вводят за 1–3 ч до фиксации в культуру клеток. Клетки подвергают гипотонической обработке, фиксируют и окрашивают.

57. Анализируемые метафазы должны содержать число центромер в пределах ± 2 от модального числа для исследуемого типа клеток. Анализируют минимум 200 разбросанных метафаз в каждом опыте. При значительном числе аберраций количество наблюдений может быть снижено. Необходимо учитывать полиплоидии и эндоредупликации при их наличии.

58. Оценка результатов. Оценивают процент клеток со структурными aberrациями хромосом. Учитывают число и частоту разных типов структурных aberrаций хромосом в экспериментальных и контрольных культурах. Пробелы регистрируют отдельно и не включают в общую частоту aberrаций.

59. Критериями определения положительного результата являются: зависимое от концентрации статистически значимое повышение числа клеток с aberrациями хромосом;

воспроизводимое повышение числа клеток с aberrациями хромосом.

Повышение частоты полиплоидных клеток показывает, что вещество ингибирует процесс митоза и индуцирует численные хромосомные аномалии. Повышение числа клеток с эндоредупликацией хромосом указывает, что вещество ингибирует прогрессию клеточного цикла. Положительные результаты в тесте на хромосомные aberrации *in vitro* показывают, что вещество индуцирует структурные хромосомные aberrации в культивируемых соматических клетках млекопитающих.

Вещество, результаты исследования которого не соответствуют вышеприведенным критериям, считаются не мутагенами в данной тест-системе. Отрицательные результаты указывают, что при данных условиях эксперимента вещество не индуцирует хромосомные aberrации.

ГЛАВА 7

МЕТОД ОЦЕНКИ ХРОМОСОМНЫХ АБЕРРАЦИЙ В КЛЕТКАХ КОСТНОГО МОЗГА МЛЕКОПИТАЮЩИХ

60. Метод оценки хромосомных aberrаций в клетках костного мозга млекопитающих *in vivo* используют для анализа структурных aberrаций хромосом, индуцированных исследованным веществом. Данный метод подходит для оценки мутагенов, так как позволяет учесть такие факторы как метаболизм, фармакокинетика и процессы репарации ДНК. Тест *in vivo* используют при дальнейшей оценке мутагенного эффекта, выявленного в тест-системах *in vitro*.

Если известно, что вещество или активный метаболит не достигают ткани-мишени, этот тест не подходит для оценки мутагенности. Тканью-мишенью является костный мозг.

61. Рекомендуется использовать крыс, мышей и хомяков. Необходимо использовать генетически однородных животных, отклонение по массе тела и возрасту которых на момент эксперимента не должно превышать $\pm 10\%$.

62. Методом случайного отбора формируют контрольные и экспериментальные группы животных. В каждой экспериментальной и контрольной группе должно быть как минимум 5 животных каждого пола.

63. Исследуемое вещество вводят внутрижелудочно или внутрибрюшинно (другой способ должен быть обоснован). Перед эвтаназией животным вводят вещество, блокирующее митоз на стадии метафазы (колхицин или колцемид). Готовят препараты клеток костного мозга, окрашивают и анализируют хромосомные aberrации в метафазах.

64. Контроль. Соответствующие положительные и отрицательные контроли должны быть в каждом опыте для каждого пола.

Вещества положительного контроля при выбранных дозах (концентрациях) воздействия должны индуцировать значимое повышение количества хромосомных aberrаций над контролем. Дозу (концентрацию) положительного контроля следует подбирать так, чтобы был четкий эффект. Примеры веществ положительного контроля приведены в приложении 2.

Воздействие на животных группы отрицательного контроля (контроль с растворителем) и экспериментальных групп проводится до установления данных вариабельности и частоты клеток с aberrациями хромосом, соответствующих историческому контролю.

65. Рекомендуется использовать однократное введение вещества. При необходимости введения большого объема вещества, исследуемое вещество может быть введено в дробных дозах.

66. Эвтаназию части животных проводят через интервал равный 1,5-кратной продолжительности нормального клеточного цикла, длительность которого в норме составляет 12–18 ч. Другую часть животных выводят из эксперимента через 24 ч после первой эвтаназии.

Перед эвтаназией животным вводят внутривенно колцемид или колхицин. Животных выводят из эксперимента через определенный интервал времени: крыс и мышей через 3–5 ч, хомячков — 4–5 ч. Клетки отбирают из костного мозга, готовят препараты и анализируют хромосомные aberrации.

67. Для первой части животных тестируют 3 дозы, при этом диапазон доз должен быть выбран в пределах от максимальной до отсутствия токсичности. Максимальная доза определяется как доза, вызывающая такие признаки токсичности, которые при повышении уровня доз при том же режиме воздействия указывают на возможность летального эффекта. Максимальная доза может также быть определена как доза, вызывающая ряд признаков токсичности в костном мозге (снижение митотического индекса более чем на 50 %).

68. Полную схему исследований с использованием 3 доз можно не проводить в случае отсутствия токсического эффекта при действии дозы 2000 мг/кг в сутки и отсутствия генотоксичности по результатам анализа структурно-связанных веществ.

Для опытов с длительным введением максимальная доза составляет 2000 мг/кг массы тела в сутки при длительности введения до 14 дней и 1000 мг/кг в сутки при длительности введения более 14 дней.

69. Исследуемое вещество вводят внутривенно или внутривентально (другой способ должен быть обоснован).

70. Сразу после эвтаназии животных выделяют костный мозг, проводят гипотоническую обработку клеток и фиксацию. Клетки наносят на стекла и окрашивают.

71. Оценивают митотический индекс как показатель цитотоксичности, анализируя минимум по 1000 клеток на каждое экспериментальное животное, включая положительный и отрицательный контроль.

Для анализа aberrаций хромосом анализируют минимум по 100 метафаз на каждое животное. Число клеток может быть уменьшено, если наблюдают высокое число aberrаций. Анализируемые метафазы должны содержать число центромер

в пределах $2n \pm 2$. Учитывают число проанализированных клеток, число aberrаций на клетку и процент клеток со структурными aberrациями хромосом.

Пробелы регистрируют отдельно и не включают в общую частоту aberrаций. Если нет данных по различию показателей между животными разного пола, результаты можно объединить.

72. Критериями положительного результата являются: зависимое от дозы повышение числа клеток с aberrациями хромосом или четкое повышение числа клеток с aberrациями хромосом в одной группе при одном временном варианте эксперимента.

Возрастание полиплоидии указывает, что исследуемое вещество индуцирует изменение числа хромосом, возрастание эндоредупликации указывает, что исследуемое вещество может нарушать клеточный цикл.

Вещество, результаты исследования которого не соответствуют приведенным выше критериям, считается не мутагенным в данном тесте. Положительные результаты в тесте на хромосомные aberrации *in vivo*, показывают, что вещество индуцирует aberrации хромосом в клетках костного мозга исследуемого вида животных. Отрицательные результаты указывают, что при данных условиях эксперимента вещество не индуцирует хромосомные aberrации в клетках костного мозга исследованного вида животных.

ГЛАВА 8 ОБОСНОВАНИЕ КОЭФФИЦИЕНТА ЗАПАСА ПРИ ГИГИЕНИЧЕСКОМ НОРМИРОВАНИИ МУТАГЕНОВ В ВОЗДУХЕ РАБОЧЕЙ ЗОНЫ

73. Коэффициент запаса рассчитывается на основании параметров токсикометрии по результатам острых, субхронических и хронических экспериментов (приложение 1). При обосновании коэффициента запаса учитывают следующие параметры токсикометрии: порог острого действия (Lim_{ac}) и порог хронического действия (Lim_{chr}), зона хронического действия (Z_{ch}), коэффициент видовой чувствительности (КВР) и цитотоксическое действие (ЦД) (таблица 1).

Таблица 1. — Расчет коэффициента запаса при обосновании ПДК химических веществ в воздухе рабочей зоны

Номер п/п	Параметры токсикометрии	Значения показателей токсикометрии, условный балл			
		<10	10-100	101-1000	>1000
1	Lim_{ac} мг/м ³	<10	10-100	101-1000	>1000
	Баллы	8	6	4	2
2	Lim_{chr} мг/м ³	≤ 1	1,1-10	11-100	>100
	Баллы	8	6	4	2
3	Z_{ch}	>10	10-5	4,9-2,5	<2,5
	Баллы	8	6	4	2
4	КВИО	>10000	9999-1000	999-100	<100
	Баллы	8	6	4	2
5	КВР	>9	9-3	<3	
	Баллы	8	6	4	
6	ЦД	наличие		отсутствие	
	Баллы	10		0	

Для расчета коэффициента запаса следует в каждом из шести разделов таблицы 1 найти графу, относящуюся к данным опыта, и соответствующий балл.

Полученные условные баллы суммируют и в соответствии с полученным значением устанавливают коэффициент запаса согласно таблицы 2.

Таблица 2. — Величина коэффициента запаса в зависимости от суммы баллов для обоснования ПДК химических веществ в воздухе рабочей зоны

Сумма баллов	12	14	16	18	20	22	24	26	28	30	32	>34
Коэффициент запаса	4	5	6	7	8	9	10	12	14	16	18	20

74. При обосновании ПДК порог хронического действия устанавливается экспериментальным путем. Полученная величина порога хронического действия не может быть принята в качестве ПДК, поскольку данная концентрация может оказывать общетоксическое или специфическое действие, выходящее за пределы приспособительных реакций со стороны целостного организма, и требует снижения на рассчитанный коэффициент запаса.

Приложение 1
к инструкции по применению
«Методика оценки степени выраженности
гено- и цитотоксического действия веществ
для обоснования коэффициента запаса
при гигиеническом нормировании
мутагенов в воздухе рабочей зоны»
(Справочное)

Этапы гигиенической регламентации химических веществ
в воздухе рабочей зоны

Этап	Наименование исследований
1. Первичная токсикологическая оценка	<p>Литературный поиск, номер CAS (при наличии). Принятие решения об объеме исследований. Острые опыты на животных (установление параметров острой токсичности на двух видах лабораторных животных с учетом половой и видовой чувствительности). Определение способности оказывать местное раздражающее действие на кожу и слизистые оболочки глаз. Изучение кожно-резорбтивного действия. Выявление возможных кумулятивных свойств и получение сведений о преимущественно поражаемых органах и системах организма подопытных животных при повторном внутрижелудочном поступлении вещества. Определение сенсibiliзирующей способности. Изучение мутагенного действия</p>
2. Полная токсикологическая оценка	<p>Установление порогов хронического общетоксического и специфического действия в хроническом эксперименте, оценка отдаленных последствий. Расчет коэффициента запаса. Обоснование ПДК. Разработка метода контроля вещества в воздухе рабочей зоны</p>
3. Корректировка гигиенического норматива	<p>Изучение условий труда и состояния здоровья работающих после внедрения вещества в производство</p>

Приложение 2
к инструкции по применению
«Методика оценки степени выраженности
гено- и цитотоксического действия веществ
для обоснования коэффициента запаса
при гигиеническом нормировании
мутагенов в воздухе рабочей зоны»
(Справочное)

Примеры веществ положительного контроля

Вещество	Номер CAS
Триэтиленмеламин	51-18-3
Этилметансульфонат	62-50-0
Этилнитрозомочевина	759-73-9
Митомицин С	50-07-7
Циклофосфамид (моногидрат)	6055-19-2

Примечание: в качестве положительного контроля могут быть использованы другие вещества. Рекомендуется в качестве положительного контроля использовать вещество по химическому классу сходное с известным положительным контролем.

Приложение 3
к инструкции по применению
«Методика оценки степени выраженности
гено- и цитотоксического действия веществ
для обоснования коэффициента запаса
при гигиеническом нормировании
мутагенов в воздухе рабочей зоны»
(Справочное)

Пример представления результатов микроядерного теста
на эритроцитах млекопитающих

Номер животного	Число ПХЭ ¹	Число НХЭ ²	Доля ПХЭ от общего числа эритроцитов (%)	Число ПХЭ с микроядрами (на 2000 ПХЭ)	Процент ПХЭ с микроядрами (%)
Отрицательный контроль					
1					
2					
...					
Среднее по группе (M±m)					
Опытная группа					
1					
2					
...					
Среднее по группе (M±m)					
Положительный контроль					
1					
2					
...					
Среднее по группе (M±m)					
¹⁾ — ПХЭ — полихроматофильные эритроциты; ²⁾ — НХЭ — нормохромные эритроциты.					