

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ  
Заместитель Министра –  
Главный государственный  
санитарный врач  
Республики Беларусь



А.А.Тарасенко

« 19 » декабря 2023 г.

Регистрационный № 009 -1223

**МЕТОД ТОКСИКОЛОГИЧЕСКОЙ ОЦЕНКИ ХИМИЧЕСКИХ  
ВЕЩЕСТВ ЭСТРОГЕНОПОДОБНОГО ДЕЙСТВИЯ  
*IN VITRO / IN SILICO***

инструкция по применению

**УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК:**

республиканское унитарное предприятие «Научно-практический центр гигиены»

**АВТОРЫ:**

к.м.н. Ильюкова И.И., Анисович М.В., д.б.н., профессор Дудчик Н.В.,  
Иода В.И., к.б.н. Камлюк С.Н.

Минск, 2023

## ГЛАВА 1 НАЗНАЧЕНИЕ И ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

1. В настоящей Инструкции по применению (далее – Инструкция) изложен метод скрининговой оценки эстрогеноподобного действия химических веществ в тестах *in silico*, *in vitro*, который может быть использован в комплексе медицинских услуг по медицинской профилактике заболеваний, связанных с воздействием химических веществ на эндокринную систему организма.

2. Настоящая Инструкция предназначена для организаций (учреждений) здравоохранения, осуществляющих государственный санитарный надзор, государственных медицинских научных организаций, иных организаций здравоохранения, выполняющих токсикологические исследования и осуществляющих реализацию мероприятий по медицинской профилактике неблагоприятного воздействия химических веществ 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:

клеточная пролиферация – увеличение числа клеток в результате митотического деления клеток;

номер CAS – это численный индикатор, присваиваемый химическим веществам американской Химической реферативной службой (Chemical Abstracts Service (CAS));

отрицательный контроль – материал или вещество, которое, будучи подвергнуто исследованию по описанной методике, показывает пригодность этой методики для получения воспроизводимого, соответствующего отрицательного, неактивного или фонового ответа в тест-системе;

положительный контроль – материал или вещество, которое при исследовании по описанной методике, показывает пригодность этой методики для получения воспроизводимого, соответствующего положительного или реактивного ответа в тест-системе;

эстрогеноподобное действие – способность химического вещества действовать как естественный эстрогенный гормон (например, 17-β-эстрадиол) в организме млекопитающего;

5. Настоящая Инструкция предлагает метод скрининговой оценки эстрогеноподобного действия, включающий 2 теста: тест *in silico* на оценку связывания с эстрогеновыми рецепторами и тест на индукцию пролиферации клеток линии MCF-7.

### ГЛАВА 3 ТЕСТ *IN SILICO* НА ОЦЕНКУ СВЯЗЫВАНИЯ С ЭСТРОГЕНОВЫМИ РЕЦЕПТОРАМИ

6. Принцип теста *in silico* на оценку связывания с эстрогеновыми рецепторами заключается в автоматическом компьютерном анализе корреляции структуры химического вещества и вероятности его связывания с рецепторами эстрогена клеток. Тест может быть проведен с применением программы OECD QSAR Toolbox или любой другой аналогичной программы.

7. Тест может быть использован для прогностической оценки эстрогеноподобного действия химических веществ с известными номером CAS и/или структурной формулой.

8. Исследование представлено следующим алгоритмом работы в программе:

ввод CAS;

определение целевой конечной точки в программе: репродуктивная токсичность;

добавление следующих метаданных:

а) конечная точка: оценка связывания с эстрогеновыми рецепторами (ERBA, Estrogen receptor binding assessment);

б) выбор тестового организма (видов): рекомбинантный рецептор эстрогена человека;

создание токсикологического профиля (профилирование данных, проводится автоматически в программе);

выбор баз данных для категоризации структурно похожих химических веществ (первичная категоризация проводится по наличию органических функциональных групп, содержащихся в анализируемой молекуле химического вещества, функциональных гетероциклических фрагментов, ароматических колец, гидроксильных групп и т. д.);

применение сквозного чтения данных по шкале сродства (соотношения) связывания с рецептором эстрогена, получение прогнозируемого результата (проводится в программе автоматически);

получение результатов (оценка степени вероятности (в %) связывания с эстрогеновыми рецепторами проводится в программе автоматически).

## 9. Оценка и интерпретация результатов.

Если вероятность связывания молекулы исследуемого химического вещества ниже 70 %, делается вывод об отсутствии эстрогеноподобного действия химического вещества в QSAR-анализе.

Если вероятность связывания молекулы исследуемого химического вещества выше либо равно 70 %, делается вывод о наличии эстрогеноподобного действия химического вещества в QSAR-анализе.

## ГЛАВА 4 АНАЛИЗ ЭСТРОГЕНОПОДОБНОГО ДЕЙСТВИЯ ХИМИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ *IN VITRO*. ТЕСТ НА ИНДУКЦИЮ ПРОЛИФЕРАЦИИ КЛЕТОК ЛИНИИ MCF-7

10. Принцип теста на индукцию пролиферации клеток линии MCF-7 заключается в анализе индукции пролиферации эстрогензависимых клеток линии MCF-7 (клетки рака молочной железы человека) химическими веществами с эстрогеноподобным действием (ЭД). Кроме того, тест может быть применен для измерения степени эстрогенной активности отдельных химических веществ или смесей химических веществ. Тест является высокочувствительным и способен обнаруживать химические вещества с сильным ЭД (например, 17- $\beta$ -эстрадиол, диэтилстильбестрол) в концентрациях менее пиколярных и в химические вещества со слабым ЭД (октилфенол, эстриол) в концентрациях менее микролярных.

11. Тест на индукцию пролиферации клеток линии MCF-7 не применяется для исследования газообразных веществ.

12. Для проведения исследования используют следующее оборудование, материалы, реактивы:

питательная среда RPMI;

эмбриональная телячья сыворотка;

L-глутамин;

раствор Хэнкса;

раствор антибиотиков (AAS, Antibiotic-antimycotic solution);

раствор трипсина-ЭДТА 0,25 %;

этиловый спирт 96 %;

набор для МТТ-теста (например, CellTiter 96<sup>®</sup> Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS), Promega, США) или бромид 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия;

раствор физиологический стерильный (0,9%-ный раствор натрия хлорида для инъекций);

флаконы культуральные площадью 25 см<sup>2</sup>;  
пробирки центрифужные типа эппендорф 1,5–2,0 мл;  
пробирки центрифужные 15 мл;  
планшеты культуральные плоскодонные 96-луночные;  
ламинарный бокс II класса биобезопасности;  
СО<sub>2</sub>-инкубатор;  
центрифуга настольная для пробирок на 15 мл;  
микроскоп инвертированный;  
камера Горяева для подсчета клеток;  
дозаторы лабораторные с переменным объемом 0,1–5000 мкл по ГОСТ 28311;  
дозаторы восьмиканальные с переменным объемом 20–100 мкл;  
планшетный ридер (фотометр) со светофильтрами с длиной волны 492, 530 и 620 нм.

### 13. Культивирование клеток.

МСF-7 поддерживают при 37 °С, 5 % СО<sub>2</sub> в условиях СО<sub>2</sub>-инкубатора. Применяется среда RPMI с феноловым красным для рутинного культивирования. Аликвоту клеток выращивают в течение двух дней в среде, не содержащей фенола, содержащей 5 % инактивированной фетальной бычьей сыворотки. Далее клетки МСF-7 высевают в концентрации 400 клеток на лунку в 0,2 мл негормональной среды в 96-луночные планшеты. Клетки адаптируются в течение 3 дней в культуральной среде без гормонов перед добавлением исследуемых химических веществ.

### 14. Приготовление растворов.

Химические вещества доводятся до комнатной температуры перед растворением и разбавлением.

Для химических веществ, растворенных в 0,5%-ном этаноле, готовится испытуемый раствор в концентрации  $5 \times 10^{-4}$  М (или в пределах растворимости) в качестве самой высокой (начальной) концентрации, наносимой непосредственно на клетки.

Растворы не должны быть мутными или иметь заметный осадок. Общий объем каждого раствора должен составлять не менее 10 мл, чтобы обеспечить достаточный объем раствора для одной серии экспериментов

Для веществ, растворенных в 96%-ном этаноле, хранят аликвоту этого раствора в концентрации  $10^{-1}$  М в морозильной камере при температуре -70 °С для использования в будущих исследованиях.

Конечная концентрация этанола, наносимая на клетки, не должна превышать 0,5 %.

15. В каждый анализ должен быть включен набор контролей растворителя (с конечными концентрациями растворителя, идентичными концентрациям, используемым в реакционных смесях, содержащих тестируемое вещество). Обычно тестируемые вещества растворяют в 96%-ном этаноле, а затем разбавляют безгормональной культуральной средой.

В качестве положительного контроля используется 17-β-эстрадиол в 11 концентрациях в диапазоне  $10^{-16}$ – $10^{-9}$  М.

В качестве отрицательного контроля используется растворитель.

16. Тестируемые вещества предпочтительно готовить в абсолютном этаноле или культуральной среде. В предварительном тесте на цитотоксичность определяется концентрация растворителя, которая не оказывает отрицательного влияния на пролиферацию клеток.

17. Объем растворителя/носителя должен быть таким же, как и в реакционных смесях, содержащих испытуемые вещества, и должен оставаться постоянным в исследуемом диапазоне концентраций.

18. Предельная концентрация химического вещества составляет 1 мМ, но необходимо учитывать характеристики растворимости каждого испытуемого вещества.

19. Диапазон концентраций тестируемых веществ должен состоять как минимум из шести различных концентраций, отстоящих на один порядок друг от друга (например, 1, 10, 100 нМ; 1, 10, 100 мкМ; 1 мМ). Однако если тестируется более низкая максимальная концентрация из-за ограничений растворимости (или растворимости только в этаноле) или чрезмерной цитотоксичности, количество тестируемых концентраций можно уменьшить, чтобы учесть измененный диапазон концентраций.

20. Исторические данные пролиферации линии MCF-7 используются как часть критериев приемлемости анализа.

21. Микроскопическая оценка клеток. Перед началом любого тестирования и по окончании теста каждая лунка с клетками анализируется под фазово-контрастным микроскопом для выявления систематических ошибок посева клеток и характеристик роста контрольных и обработанных клеток. Регистрируются любые изменения в морфологии клеток, вызванные цитотоксическим действием тестируемых химикатов, а также любые изменения в скорости роста клеток, стимулированные тестируемыми химикатами. Нежелательные характеристики роста контрольных клеток могут указывать на экспериментальную ошибку.

22. Сомнительные данные должны быть подтверждены повторным тестированием вещества.

23. Для определения верхнего предела концентраций испытуемого вещества в исследование включается предварительный анализ цитотоксичности.

24. Проведение основного эксперимента.

Клетки MCF-7, культивируемые в 96-луночных планшетах, подвергаются воздействию тестируемых химических веществ в течение 7 дней. В конце 7-дневного воздействия среду удаляют, лунки один раз промывают 0,2 мл раствором Хэнкса, а затем анализируют пролиферацию клеток в МТТ-тесте.

Эксперимент следует проводить как минимум в трех повторах.

25. Оценка пролиферации клеток. В основе метода оценки пролиферации клеток с применением МТТ-набора лежит способность митохондриальных дегидрогеназ живых клеток восстанавливать желтую соль бромид 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия (МТТ) в пурпурно-синие внутриклеточные кристаллы формазана, растворимые в ДМСО. Увеличение оптической плотности в опытных пробах по сравнению с контрольными, регистрируемое на планшетном ридере (фотометре), является основанием для заключения об индукции пролиферации клеток исследуемым веществом.

В каждом эксперименте присутствуют пробы отрицательного, положительного контролей и контроля неспецифического окрашивания образца.

Контроль неспецифического окрашивания образца – модельная среда с исследуемым химическим веществом в максимальной концентрации помещается в лунки без клеточного материала.

26. Для оценки пролиферации клетки в лунках инкубируют в течение 2 часов с 20 мкл рабочего раствора МТТ (5 мг/мл физиологического раствора) в условиях CO<sub>2</sub>-инкубатора. Через 2 часа в лунках с культурой клеток модельная среда заменяется на раствор ДМСО. Планшет аккуратно встряхивается до растворения кристаллов формазана. С помощью планшетного ридера (фотометра) определяется оптическая плотность каждой лунки и фоновое поглощение (методика окрашивания и измерения проводится в соответствии с рекомендациями производителя используемого реактива).

27. Оценка эстрогеноподобного действия проводится на основании индукции пролиферации (%). Показатель отражает изменение количества клеток в опытных лунках по сравнению с лунками отрицательного контроля в присутствии исследуемого вещества и рассчитывается по формуле (1):

$$\text{Индукция пролиферации (\%)} = 100 - \left( \left( \frac{\text{ОП}_o - \text{ОП}_c}{\text{ОП}_k - \text{ОП}_c} \right) \times 100 \% \right), \quad (1)$$

где ОП<sub>о</sub> – средняя оптическая плотность опытных лунок;

ОП<sub>к</sub> – средняя оптическая плотность в лунках отрицательного контроля;

ОП<sub>с</sub> – средняя оптическая плотность модельной среды.

Стандартное отклонение для всех полученных данных не должно превышать 15 % от среднего значения.

28. Отчет об испытании включает в себя информацию об испытуемом веществе, использованном растворителе, клеточной линии, условиях испытания, результатах и выводах, является ли вещество положительным или отрицательным в данном тесте.

29. Интерпретация результатов.

Химическое вещество обладает эстрогеноподобным действием, если индукция пролиферации как минимум для одной концентрации данного химического вещества составляет более 50 %.

Химическое вещество не обладает эстрогеноподобным действием, если индукция пролиферации для всех концентраций данного химического вещества составляет менее 50 %.