

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ  
Заместитель Министра –  
Главный государственный  
санитарный врач  
Республики Беларусь



А.А.Тарасенко  
« 06 » 2022 г.  
Регистрационный № 042-0622

**МЕТОД ТЕСТИРОВАНИЯ *IN VITRO* РАЗДРАЖАЮЩЕГО  
ДЕЙСТВИЯ ПАРФЮМЕРНО-КОСМЕТИЧЕСКОЙ ПРОДУКЦИИ**

инструкция по применению

**УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК:**

республиканское унитарное предприятие «Научно-практический центр гигиены»

**АВТОРЫ:**

к.м.н. Ильюкова И.И., Анисович М.В., Протасевич У.С., Васильева М.М.,  
Гомолко Т.Н., Иода В.И., к.б.н. Камлюк С.Н.

Минск, 2022

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ  
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ  
Заместитель министра –  
Главный государственный  
санитарный врач  
Республики Беларусь

\_\_\_\_\_ А. А. Тарасенко  
10.06.2022  
Регистрационный № 042-0622

**МЕТОД ТЕСТИРОВАНИЯ *IN VITRO* РАЗДРАЖАЮЩЕГО  
ДЕЙСТВИЯ ПАРФЮМЕРНО-КОСМЕТИЧЕСКОЙ ПРОДУКЦИИ**

инструкция по применению

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

АВТОРЫ: канд. мед. наук И. И. Ильюкова, М. В. Анисович,  
У. С. Протасевич, М. М. Васильева, Т. Н. Гомолко, В. И. Иода, канд. биол.  
наук С. Н. Камлюк

Минск 2022

## ГЛАВА 1

### НАЗНАЧЕНИЕ И ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

1. Настоящая Инструкция по применению (далее – Инструкция) устанавливает метод тестирования *in vitro* раздражающего действия парфюмерно-косметической продукции с целью подтверждения ее безопасности для здоровья человека.

Инструкция распространяется на исследование кожно-раздражающих свойств парфюмерно-косметической продукции (далее – ПКП), за исключением продукции, имеющей  $pH \leq 2,5$  или  $\geq 11,5$ .

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

жизнеспособность клетки, % – параметр для измерения суммарной активности клеточной популяции, например, способности клеточных митохондриальных дегидрогеназ восстанавливать витальный краситель МТТ (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолий бромид), который, в зависимости от измеряемого конечного показателя и протокола испытания, коррелирует с общим числом и / или жизнеспособностью функционирующих клеток;

МТТ – 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолий бромид, тиазолил синий тетразолия бромид;

отрицательная контрольная проба (далее – ОК) – имитированная проба, включающая в себя все составляющие исследуемой системы и обрабатываемая с использованием вещества, заведомо не дающего положительный ответ;

положительная контрольная проба (далее – ПК) – имитированная проба, включающая в себя все составляющие исследуемой системы и обрабатываемая с использованием вещества, заведомо дающего положительный отклик (натрия додецилсульфат (далее – НДС) или Тритон X-100);

раздражение кожи – обратимое повреждение тканей кожных покровов вследствие нанесения на кожу исследуемого образца продукции на срок, не превышающий 4 часов.

растворитель – вещество, используемое для разбавления, суспензирования, экстрагирования или растворения испытуемой продукции;

формазан – восстановленный МТТ, 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-3,5-дифенилформазан;

ET<sub>50</sub> (Effective Time) – время воздействия, необходимое для снижения жизнеспособности клеток на 50 % после использования референсного вещества (НДС или Тритон X-100) с заданным значением концентрации;

IC<sub>50</sub> (Inhibitory Concentration) – концентрация, при которой референсное вещество (НДС или Тритон X-100) снижает жизнеспособность тканей на 50 % по истечении заданного периода воздействия;

5. Метод основан на применении тест-модели *in vitro*, в которой используется реконструированный человеческий эпидермис (далее – РЧЭ) достоверно имитирующий биохимические и физиологические характеристики верхних слоев человеческой кожи, то есть собственно эпидермиса. О наличии раздражающего кожу действия исследуемого образца ПКП судят по изменению показателя жизнеспособности клеток в модели РЧЭ.

6. Жизнеспособность клеток в моделях РЧЭ определяется на основе ферментативного преобразования витального красителя МТТ в синеокрашенную соль формазана, точное количество которой измеряется после ее экстрагирования из тканей.

7. Метод может быть использован для исследований твердых, полутвердых и воскоподобных образцов продукции, жидкостей. Жидкости могут иметь водную или неводную основу, твердые образцы могут быть растворимыми или не растворимыми в воде. По возможности твердые образцы перед исследованием измельчаются до тонкого порошкообразного состояния.

Исследуются образцы ПКП в состоянии, готовом для применения потребителями. Никакой другой предварительной обработки пробы не требуется, если иное не указано в инструкции производителя.

8. Исследуемые образцы ПКП, поглощающие свет в том же спектральном диапазоне, что и МТТ-формазаза, а также образцы, которые способны напрямую восстанавливать витальный краситель МТТ (до МТТ-формазаза), могут препятствовать правильному определению жизнеспособности клеток и требуют дополнительного использования контрольных проб, содержащих только исследуемый образец, для внесения соответствующих поправок в результаты.

9. Для оценивания характеристик исследуемого образца продукции достаточно одиночного цикла испытаний, при котором были параллельно использованы не менее трех образцов ткани, если полученные при этом результаты могут быть однозначно интерпретированы.

Если полученные результаты носят пограничный характер, в том числе, когда результаты измерений на разных образцах противоречат друг другу и/или среднее значение показателя жизнеспособности составляет  $(50 \pm 5) \%$ , может быть принято решение о проведении повторного цикла испытаний, а также третьего – в случае расхождения результатов между первыми двумя.

10. Для исследования кожно-раздражающего действия ПКП на модели реконструированного эпидермиса используют следующее оборудование, материалы, реактивы:

весы лабораторные по ГОСТ OIML R 76-1, высокого класса точности, с наибольшим пределом взвешивания 200 г;

дозаторы лабораторные с переменным объемом по ГОСТ 28311;

термостат электрический суховоздушный с автоматическим терморегулятором до  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ , позволяющий поддерживать заданную температуру с погрешностью  $\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ ;

термометр жидкостный стеклянный по ГОСТ 29224, с диапазоном измерения температур от  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$  до  $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ , с ценой деления  $1\text{ }^{\circ}\text{C}$ ;

pH-метр любой марки с набором электродов;

стандарт-титры для приготовления буферных растворов для pH-метрии по ГОСТ 8.135 (допускается приготовление буферных растворов по ГОСТ 4919.2);

ламинарный бокс II класса биобезопасности;

CO<sub>2</sub>-инкубатор;

центрифуга настольная для пробирок на 15 мл;

микроскоп инвертированный;

пинцет медицинский по ГОСТ 21241;

бумага фильтровальная лабораторная по ГОСТ 12026;

ножницы по ГОСТ 21239;

пестик 1-2 по ГОСТ 9147;

ступка 2-3 по ГОСТ 9147;

флаконы культуральные площадью 25 см<sup>2</sup>;

пробирки центрифужные типа эппендорф 1,5-2,0 мл;

пробирки центрифужные 15 мл;

планшеты культуральные плоскодонные 12-луночные;

камера Горяева для подсчета клеток;

планшетный ридер (фотометр) со светофильтрами близкими к 490, 530 и 620 нм;

поликарбонатные вставки для 12-луночных планшетов с порами размером 0,4 мкм;

вода дистиллированная и бидистиллированная по ГОСТ 6709;

раствор антибиотиков (AAS, Antibiotic-antimycotic solution);

раствор трипсина-ЭДТА 0,25 %;

диметилсульфоксид;

натрия додецилсульфат (НДС);

Тритон X-100;

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

раствор Хэнкса;

коллаген (например, набор Coating Matrix Kit);

питательная среда для кератиноцитов (например, EpiGRO™ Human Epidermal Keratinocyte Complete Culture Media Kit).

Для исследования согласно методу, описанному в настоящей Инструкции, допускается применение оборудования и материалов, которые имеют те же технические и метрологические характеристики и назначение, что и указанные оборудование и материалы. При их применении руководствуются рекомендациями изготовителя.

### **ГЛАВА 3**

#### **КУЛЬТИВИРОВАНИЕ ТРЕХМЕРНОЙ МОДЕЛИ РЕКОНСТРУИРОВАННОГО ЭПИДЕРМИСА ЧЕЛОВЕКА**

11. Источником клеточного материала для создания трехмерной модели эпидермиса, которая обладала бы реалистичными гистологическими показателями и цитоархитектурой, в испытательной системе на базе РЧЭ выступают нетрансформированные эпидермальные кератиноциты человека.

Культура кератиноцитов высевается на светопроницаемые вставки из поликарбоната в концентрации  $3,5 \times 10^5$  клеток на лунку в объеме 1 мл (для 12-луночных планшетов). Синтетическая мембрана поликарбонатных вставок разделяет лунку на два компартмента и имеет поры размером 0,4 мкм. Размер пор не позволяет клеткам мигрировать из вставки в нижнюю часть лунки, но при этом обеспечивает беспрепятственное поступление питательной среды к клеткам. Мембрана поликарбонатных вставок предварительно перед культивированием покрывается коллагеном (например, при помощи набора Coating Matrix Kit).

12. Кератиноциты культивируются в погруженном в питательную среду виде. Используется среда для культивирования кератиноцитов (например, EpiGRO™ Human Epidermal Keratinocyte Complete Culture



Media Kit) в объеме 1 мл на лунку. Среда для культивирования кератиноцитов содержит 0,2 % бычьего экстракта гипофиза, 0,2 нг/мл рекомбинантного эпидермального фактора роста человека, 0,18 мкг/мл гидрокортизона, 5 мкг/мл трансферрина и 0,01 мкг/мл рекомбинантного инсулиноподобного фактора роста I.

13. После формирования в лунке монослоя из кератиноцитов (3-5 день культивирования) для стимулирования стратификации кератиноцитов и формирования эпидермального барьера питательная среда из вставки удаляется, культивирование клеток продолжается на границе «среда-воздух» со сменой питательной среды каждые 2-3 дня (объем 0,3 мл на лунку).

Для стимулирования дифференцировки кератиноцитов в питательную среду добавляется хлорид кальция (конечная концентрация  $\text{Ca}^{2+}$  в среде 1,5 мМ), 50 мкг/мл аскорбиновой кислоты и 10 нг/мл фактора роста кератиноцитов.

14. Формирование многослойного эпидермиса завершается на 14-17 день культивирования. Модель РЧЭ состоит из эпидермальных кератиноцитов человека, выращенных таким образом, чтобы получить многослойную, высокодифференцированную копию естественного человеческого эпидермиса. В ней выделяются отчетливо выраженные базальный, шиповатый и зернистый слои, а также слоистый роговой слой (*stratum corneum*) с межклеточными ламеллярными липидными слоями, представляющими основные классы липидов, по аналогии с теми, которые можно идентифицировать в эпидермисе *in vivo*.

15. Общие параметры модели.

Для реконструкции эпителия под функциональным роговым слоем (*stratum corneum*) расположены несколько слоев жизнеспособных эпителиальных клеток (базальный, шиповатый и зернистый слои).

Подтверждение наличия у РЧЭ описанной структуры проводится путем гистологического исследования модели.

*Stratum corneum* состоит из нескольких слоев с соответствующим липидным профилем для создания функционального барьера, достаточно устойчивого к быстрому проникновению референсных цитотоксических химических веществ, например, таких как НДС или Тритон X-100.

16. Перед проведением исследований образцов ПКП подтверждается эффективность барьера, обеспечиваемого используемой моделью, оценка которой выполняется либо путем определения концентрации, при которой НДС или Тритон X-100 снижает жизнеспособность РЧЭ на 50 % ( $IC_{50}$ ) по истечении заданного периода воздействия, либо путем определения времени, необходимого для снижения жизнеспособности ткани на 50 % ( $ET_{50}$ ) после нанесения референсного химического вещества с известной заданной концентрацией. Сдерживающие свойства модели РЧЭ препятствуют прохождению исследуемого материала в жизнеспособные ткани в обход *stratum corneum*, так как это снижало бы достоверность моделирования воздействия образцов на кожу.

17. Диапазоны приемлемости (верхний и нижний пределы) значений  $IC_{50}$  или  $ET_{50}$  устанавливаются графически в эксперименте и для используемой модели РЧЭ составляют:

нижний предел  $ET_{50}=5,2$  часа (обработка 1 % Тритон X-100);

верхний предел  $ET_{50}=9,6$  часов (обработка 1 % Тритон X-100);

нижний предел  $IC_{50}=1$  мг/мл (обработка НДС в течение 18 часов);

верхний предел  $IC_{50}=4,3$  мг/мл (обработка НДС в течение 18 часов).

## ГЛАВА 4

### ПОРЯДОК ПРОВЕДЕНИЯ ИСПЫТАНИЙ

18. Нанесение исследуемых и контрольных образцов.

Исследуемый образец ПКП наносится местно на трехмерную модель РЧЭ. При каждом испытании для каждого исследуемого образца и каждой контрольной пробы используют не менее трех параллельно обрабатываемых образцов РЧЭ. Выбирается такая дозировка наносимых жидких или твердых образцов ПКП, чтобы она обеспечивала их равномерное распределение по поверхности эпидермиса, но не была избыточной (количества наносимых твердых или жидких образцов приведены в Приложении к настоящей Инструкции).

19. Перед нанесением твердых образцов продукции поверхность РЧЭ увлажняют водным буферным раствором или дистиллированной водой для улучшения контакта между кожей и исследуемым образцом (0,1-0,3 мл). По возможности исследуемый твердый образец должен быть измельчен до состояния порошка тонкого помола. Время воздействия образца ПКП 60 мин. Значение температуры, при которой выдерживаются образцы, находится на уровне  $(20 \pm 2)$  °С.

20. По окончании заданного периода воздействия исследуемый образец тщательно смывают с поверхности эпидермиса водным буферным раствором (фосфатным солевым раствором, раствором Хэнкса или 0,9 % раствором NaCl). Промытый образец ткани помещают в свежую среду для культивирования кератиноцитов на 42 часа, после чего производят измерение жизнеспособности клеток в РЧЭ.

21. Параллельные отрицательные (ОК) и положительные (ПК) контрольные пробы используют в каждом цикле испытаний для подтверждения того, что уровни жизнеспособности (по данным, полученным при помощи ОК), эффективности барьерных функций (по данным, полученным при помощи ПК) тканей находятся в пределах установленного диапазона, основанного на результатах предыдущих наблюдений. В качестве ПК рекомендуется использовать 5 % водный

раствор НДС. Чтобы обеспечить возможность учитывать изменчивость во времени отклика, получаемого при положительном контроле, этот положительный отклик не должен быть отчетливо выраженным. Роль ОК может выполнять раствор Хэнкса, фосфатный буферный солевой раствор (ФБС).

22. Результаты испытаний положительных и отрицательных контрольных проб, полученные с применением соответствующего метода, обладают долговременной воспроизводимостью.

23. Критерии приемлемости. Для каждого метода испытаний с использованием модели РЧЭ, образцы тканей, обработанные отрицательной контрольной пробой, демонстрируют показатели ОП, свидетельствующие об их надлежащем уровне качества. Эти контрольные значения ОП не должны выходить за рамки значений стандартного отклонения ( $100 \pm 18$  %). Аналогичным образом, ткани, обработанные ПК, то есть 5 % водным раствором НДС, демонстрируют способность соответствующим образом реагировать на воздействие раздражающего фактора. Необходимые сопутствующие показатели изменчивости между параллельно обрабатываемыми образцами ткани не должны выходить за допустимые пределы, установленные для применяемого метода испытаний (Приложение к настоящей Инструкции).

24. Для выполнения измерений жизнеспособности клеток используется МТТ-тест. Образец ткани помещают в раствор МТТ (например, в приготовленный раствор МТТ набора CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS), Promega, США) с необходимой концентрацией (согласно протоколу производителя реактива) на 3 часа. Жизнеспособные клетки преобразуют МТТ в формазан. После экстрагирования формазана из ткани РЧЭ (производится согласно протоколу фирмы-производителя) измеряется оптическая плотность

экстракта из каждой лунки (для набора CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay оптическая плотность измеряется на длине волны 490 нм).

25. Проводится анализ изменения концентрации формазана (фотометрическое измерение показателей оптической плотности) в опытных пробах по сравнению с контрольными.

26. Если исследуемый образец продукции непосредственно вступает в реакцию с МТТ (например, является его восстановителем), имеет выраженную естественную окраску или приобретает окраску в ходе обработки образцов тканей, необходимо предусмотреть использование дополнительных контрольных проб и соответствующих расчетов для выявления потенциальных помех, вызываемых исследуемыми образцами продукции согласно рекомендациям ГОСТ 34639-2020.

## ГЛАВА 5

### ОЦЕНКА И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

27. Оценка раздражающего действия на кожу образца ПКП проводится по значению жизнеспособности клеток после контакта с исследуемым образцом исходя из значений оптической плотности анализируемых проб.

Жизнеспособность рассчитывается по формуле 1:

$$\text{Жизнеспособность (\%)} = (\text{ОП}_o - \text{ОП}_c) / (\text{ОП}_k - \text{ОП}_c) \times 100 \%, \quad (1)$$

где  $\text{ОП}_o$  – средняя оптическая плотность опытных лунок;

$\text{ОП}_c$  – средняя оптическая плотность модельной среды;

$\text{ОП}_k$  – средняя оптическая плотность в лунках отрицательного контроля.

28. Интерпретация полученных результатов.

Исследуемый образец ПКП обладает раздражающим действием на кожу, если среднее процентное значение жизнеспособности ткани после воздействия этого образца и дальнейшего инкубирования используемой в эксперименте РЧЭ в неактивной среде не превышает 50 %.

Исследуемый образец ПКП может быть признан нераздражающим для кожи, если жизнеспособность ткани после воздействия этого образца и дальнейшего инкубирования используемых в эксперименте образцов РЧЭ в неактивной среде сохраняется на уровне более 50 %.

29. Метод испытаний с использованием модели РЧЭ выявляет наличие или отсутствие, но не позволяет оценить выраженность раздражающего кожу действия испытуемой продукции. В случае положительного результата в тесте *in vitro* для установления окончательного решения о выраженности раздражающего кожу действия образцов продукции тестирование проводится *in vivo* согласно рекомендациям ГОСТ 33506-2015.

Приложение  
к Инструкции по применению  
«Метод тестирования *in vitro*  
раздражающего действия парфюмерно-  
косметической продукции»  
(Справочное)

**ПАРАМЕТРЫ ПРОТОКОЛА ВЫПОЛНЕНИЯ ИСПЫТАНИЙ ДЛЯ  
ИСПОЛЬЗУЕМОЙ МОДЕЛИ РЕКОНСТРУИРОВАННОГО  
ЭПИДЕРМИСА В ТЕСТИРОВАНИИ *IN VITRO* РАЗДРАЖАЮЩЕГО  
ДЕЙСТВИЯ ПАРФЮМЕРНО-КОСМЕТИЧЕСКОЙ ПРОДУКЦИИ**

Наименование параметра	Значение параметра
Предварительное инкубирование	
Время преинкубирования	18-24 часа
Объем используемой среды	1 см <sup>3</sup>
Нанесение исследуемого образца ПКП	
Продукция косметическая жидкая	26-83 мг/см <sup>2</sup>
Твердые образцы ПКП	26-83 мг/см <sup>2</sup> + водный буферный раствор (0,1-0,3 мл)
Суммарное время воздействия	60 мин
Поддерживаемая температура	Комнатная температура
Объем используемой среды при дополнительном инкубировании	
Объем используемой среды	1 см <sup>3</sup>
Максимальная допустимая изменчивость образцов	
Стандартное отклонение между параллельно обрабатываемыми образцами ткани	18 %