

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

«УТВЕРЖДАЮ»

Заместитель Министра
здравоохранения – Главный
государственный санитарный
врач Республики Беларусь



Н.П. Жукова

« 30 » 2016 г.

Регистрационный № 051-1215

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СЕНСИБИЛИЗИРУЮЩЕГО ДЕЙСТВИЯ
ХИМИЧЕСКОЙ ПРОДУКЦИИ (ХИМИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ
И ИХ СМЕСЕЙ)

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 № 051-1215

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ СЕНСИБИЛИЗИРУЮЩЕГО ДЕЙСТВИЯ
ХИМИЧЕСКОЙ ПРОДУКЦИИ
(ХИМИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ И ИХ СМЕСЕЙ)**

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) изложены гармонизированные с международными требованиями OECD TG № 406 «Skin Sensitization» (ОЭСР Руководство 406 «Кожная сенсibilизация»)/OECD TG № 429 «Skin Sensitization: Local Lymph Node Assay» (ОЭСР Руководство № 429 «Кожная сенсibilизация: исследование реакции региональных лимфоузлов») методы исследований по изучению сенсibilизирующего действия веществ: применяемые в комплексе медицинских услуг, направленных на медицинскую профилактику неблагоприятного действия потенциально опасной для человека продукции: чистые химические вещества, их растворы и смеси химических веществ, в т. ч. пестициды, доклинические формы лекарственных средств медицинского и ветеринарного применения, пищевые и кормовые добавки.

2. Настоящая инструкция устанавливает подходы, схемы и методы испытания, предназначенные для оценки сенсibilизирующего действия химических веществ и продукции на их основе, обеспечивает получение информации о сенсibilизирующем действии исследуемого вещества на организм, позволяет оценить и классифицировать вещество 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 настоящих методических рекомендациях применены следующие термины с соответствующими определениями:

- внутрилабораторная воспроизводимость — определение степени, в которой квалифицированный персонал одной и той же лаборатории может успешно воспроизвести результаты, используя конкретный протокол в разное время;

- выброс данных — это наблюдение эффекта с заметно отличающимися величинами от других значений в случайной выборке из генеральной совокупности;

- гарантия качества — административная процедура, в соответствии с которой проверка соответствия стандартам и требованиям данного метода, а также проверка регистрации полученных данных и аккуратности их переноса,

осуществляется лицами, независимыми от сотрудников данной лаборатории, выполняющих тестирование;

- запатентованный метод — метод, проведение и распространение которого ограничены патентами, авторскими правами, торговыми марками и т. д.;

- значимость — характеристика взаимосвязи теста и оцениваемого эффекта, значение и практическая значимость для конкретной цели: диапазон, в пределах которого данный тест корректно измеряет или прогнозирует интересующий исследователя биологический эффект, и оценка точности (соответствия) данного метода;

- индекс стимуляции (ИС) — величина, характеризующая потенциальную способность данного вещества вызывать кожную сенсibilизацию и измеряемая как соотношение скоростей пролиферации лимфоцитов регионального лимфоузла в экспериментальных группах и параллельной контрольной группе, которой вводили растворитель;

- индукционная экспозиция (Induction exposure) — экспериментальное воздействие на объект исследуемым веществом с расчетом вызвать состояние гиперчувствительности;

- индукционный период (Induction period) — период, составляющий как минимум неделю после индуктивной экспозиции, во время которого может развиваться состояние гиперчувствительности;

- кожная сенсibilизация (аллергический дерматит) (Skin sensitization) — иммунологически опосредованная кожная реакция на вещество, проявляющаяся у человека реакциями в виде зуда, эритемы, отека, папул, нарывов, волдырей или их комбинации; у животных чаще всего наблюдаются только эритема или отек;

- кожная сенсibilизация — иммунологический процесс, происходящий в восприимчивом организме, который подвергся местному воздействию химического аллергена, вызвавшего кожную иммунную реакцию, и приводящий в некоторых случаях к развитию контактной сенсibilизации;

- ложноотрицательный результат — случаи неправильной идентификации тестируемого вещества, проведенной с помощью данного метода, когда для вещества получен отрицательный эффект или отсутствие активности, в то время как в действительности вещество вызывает положительный эффект или активно;

- ложноположительный результат — тестируемое вещество неправильно идентифицируется как дающее положительный эффект или активное, в то время как в действительности данное вещество дает отрицательный эффект или неактивно;

- межлабораторная воспроизводимость — оценка степени качественного и количественного сходства между результатами тестирования, полученными при исследовании одних и тех же веществ в разных квалификационных лабораториях по единому протоколу; выявляется во время предварительной и / или окончательной валидации и указывает на степень, в которой тест может быть успешно применен в других лабораториях;

- надежность — оценка степени, в которой данный метод может давать воспроизводимые результаты при длительном использовании по одному и тому же протоколу в пределах одной лаборатории или между лабораториями, которая оценивается путем определения внутри / межлабораторной воспроизводимости;

- опасность — потенциальная способность вещества вызывать неблагоприятный экологический эффект при достаточно высокой экспозиции или влиять на здоровье населения;

- провокационная экспозиция (Challenge exposure) — следующее за индуктивным периодом экспериментальное воздействие исследуемым веществом на объект, ранее подвергавшийся воздействию этим же веществом, для определения ответной реакции объекта в виде развития состояния гиперчувствительности;

- расчетная концентрация «3» (EC3) — расчетная концентрация исследуемого вещества, при которой индекс стимуляции равен трем;

- расчетная пороговая концентрация (ECt) — концентрация тестируемого вещества, дающая индекс стимуляции, указывающий на положительную реакцию;

- реперное вещество — сенсibiliзирующее или несенсибилизирующее вещество, используемое в качестве стандарта для сравнения тестируемого вещества, обладающее следующими свойствами: унифицированный и надежный источник (и) приобретения; структурное и функциональное сходство с классом тестируемых веществ; известные физические / химические характеристики; наличие данных об известных эффектах; определенная активность в диапазоне желаемой реакции;

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

- стандарты соответствия (CC) — стандарты, основанные на утвержденном методе тестирования и обеспечивающие основу для сравнения с ним нового метода, функционально и технически аналогичного исходному, и включающие: основные компоненты метода, минимальный список стандартных (эталонных) химических веществ, гарантирующих соответствие валидируемого метода исходному, сходные уровни точности и надежности, полученные с помощью исходного и валидируемого методов с использованием минимального списка эталонных химических веществ;

- стандарты (эталонные вещества) — химические вещества с известными эффектами в системе эталонного тестирования *in vitro* или *in vivo*, предназначенные для валидации метода, представляющие определенные классы химических соединений, которые предположительно будут тестироваться данным методом, и должны гарантировать полный спектр ожидаемых для этих химических соединений эффектов от сильного к слабому или отрицательному; при этом для различных стадий валидации, разных

методов и вариантов их использования могут понадобиться разные наборы эталонных химических веществ;

- тестируемое вещество — любой тестируемый материал как однокомпонентное вещество, так и смесь (конечные продукты, сложные препараты), для тестирования которых чаще всего используют конечный продукт и реже – его активный ингредиент(ы);

- точность — степень соответствия результатов тестирования и опорных значений, характеризующая метод и являющаяся критерием его правомочности, обозначая долю правильных эффектов;

- утвержденный метод испытаний — валидированный метод с установленной областью применения, который не всегда может иметь достаточную оценку точности и надежности, но при этом признается соответствующим заявленной цели;

- 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;

- Local Lymph Node Assay, LLNA — метод оценки способности химического вещества вызывать кожную сенсibilизацию у мышей путем измерения скорости пролиферации лимфоцитов в региональных лимфоузлах.

ГЛАВА 3 ОБЩИЕ УСЛОВИЯ ПРОВЕДЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЙ

1. До испытаний необходимо провести анализ существующей информации по исследуемому веществу, включающий сведения о составе и химическом строении, физико-химических свойствах, результатах токсикологических испытаний *in vivo* и *in vitro*, токсикологических данных по структурно родственных веществам и оценку предполагаемых путей использования вещества. Полученная информация подтверждает необходимость проведения исследований и способствует выбору адекватной начальной дозы.

2. Исследуемые вещества не должны применяться в дозах, являющихся причиной возникновения выраженных болевых ощущений и недомоганий за счет разъедающего или сильно раздражающего действия. Агонизирующих и испытывающих непереносимую боль животных умерщвляют гуманным способом, при подведении итогов исследования их учитывают как погибших во время исследования.

3. *Животные. Выбор вида.* Для исследований используют грызунов, самцов или не беременных и не рожавших самок от 8 до 12 недель, с колебаниями массы $\pm 20\%$ от среднего значения.

4. *Условия содержания и кормления.* Температурный режим в лабораторной комнате — $22(\pm 3)^\circ\text{C}$, относительная влажность — 30–70% (оптимально 50–60%), за исключением времени уборки помещения, освещение — искусственное (последовательно 12 ч — день, 12 ч — ночь). При кормлении используется обычная лабораторная диета с неограниченным количеством питьевой воды. Очень важно, чтобы животные получали необходимые дозы аскорбиновой кислоты.

5. *Подготовка животных.* Адаптация к лабораторным условиям — не менее 5 дней до начала испытания. Животных разделяют на группы методом случайной выборки, помечают и содержат в клетках. В зависимости от метода испытания для удаления шерсти используется срезание, бритье или химическая депиляция. Шерсть удаляют аккуратно, избегая повреждений кожного покрова. Животных взвешивают до начала и в конце испытания.

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

6. 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 ($100\text{--}220^\circ\text{C}$) (по ГОСТ 24437); анализатор потенциометрический с погрешностью измерений $\text{pH} \pm 0,1$ (рН-метр) с набором электродов (по ГОСТ 19881); холодильник бытовой (по ГОСТ 16317); микрометр, морозильная камера; баня водяная с терморегулятором, позволяющая поддерживать температуру ($55 \pm 0,5^\circ\text{C}$) (по ГОСТ 12026) или инактиватор; стаканы химические ($50\text{--}100 \text{ см}^3$), цилиндры (по ГОСТ 1770) и колбы (по ГОСТ 25336) разной вместимости (10, 100, 1000 см^3); штативы для пробирок; шпатели стеклянные; стандарт-титры для приготовления образцовых буферных растворов для рН-метрии (по ГОСТ 8.135 ГСИ); бумага индикаторная универсальная (ТУ 6-091181-76); бумага фильтровальная лабораторная (по ГОСТ 12026); 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 этом следует руководствоваться рекомендациями изготовителя.

7. Исследования проводят в помещениях, оснащенных приточно-вытяжной вентиляцией и водопроводной водой.

Приготовление растворов, подготовку проб и проведение исследований осуществляют при следующих условиях: температура окружающего воздуха (20 ± 5)°С; относительная влажность воздуха не более 80% при $T = 25$ °С; атмосферное давление 84,0–106,7 кПа (630–800 мм рт. ст.).

8. 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 МЕТОД КОЖНОЙ СЕНСИБИЛИЗАЦИИ

1. Метод позволяет оценить количественную зависимость «структура – активность» при изучении кожной сенсibilизации.

2. В настоящее время предпочтительными тестами на морских свинках считают максимизационный тест (GPMT) Магнуссона и Клигмана (адьювантный) и тест Бюхлера (неадьювантный), используемые в качестве альтернативы ранее широко применяемым адьювантным тестам, в которых сенсibilизацию инициировали введением полного адьюванта Фрейнда (ПАФ), и неадьювантным тестам. Однако при определенных обстоятельствах для получения необходимой информации о сенсibilизации использование других методов также признается возможным.

3. Иммунная система мыши обладает рядом преимуществ: возможность объективной оценки конечного результата испытания, короткая продолжительность и минимальная процедура обработки животных. Для оценки сенсibilизационного потенциала на мышах считают перспективными тест на отек уха мыши (MEST) и метод локальных лимфатических узлов (LLNA), которые позволяют выявлять умеренные и сильные сенсibilизаторы. Методы LLNA или MEST могут использоваться в качестве первого этапа оценки сенсibilизационного потенциала. При получении в обоих испытаниях положительного результата исследуемое вещество признают потенциальным сенсibilизатором и дальнейших испытаний на морских свинках не проводят. При получении отрицательного результата в тестах LLNA или MEST дальнейшие испытания на морских свинках (GPMT или тест Бюхлера) проводят с использованием ниже приведенной процедуры.

4. Исследуемое вещество вводят экспериментальным животным путем подкожной инъекции и /или наносят на кожу (индукционная экспозиция). Животных обрабатывают провокационной дозой, через 10–14 дней (индукционный период) ожидают развития иммунной реакции. Величину и степень кожной реакции на провокационную дозу у подопытных животных сравнивают с реакцией животных, которые подвергались фиктивному воздействию в индукционный период и получили провокационную дозу вещества.

5. Чувствительность и надежность используемой экспериментальной техники оценивают каждые 6 мес. с помощью стандартных веществ, обладающих легким и умеренным сенсibiliзирующим действием.

В правильно проведенном испытании для легких/умеренных сенсibiliзаторов должны наблюдаться отклики: как минимум 30% для адьювантного теста и не менее 15% для неадьювантного. В качестве стандартных веществ используют предпочтительно гексилциннамальдегид (CAS № 101-86-0), меркаптобензотиазол (CAS № 149-30-4) и бензокаин (CAS № 94-09-7). При соответствующем обосновании возможно использование иных контрольных веществ, отвечающих приведенным критериям.

6. Для удаления исследуемого вещества используют воду или растворитель, не влияющий на полученную реакцию и целостность кожного покрова.

7. Процедура испытаний.

7.1. Максимизационный тест на морских свинках (GPMT).

7.1.1. *Количество животных.* Группа животных, подвергающихся воздействию, должна содержать не менее 10 особей, а контрольная группа — 5. Однозначный вывод о том, является ли вещество сенсibiliзатором, можно сделать только при использовании не менее 20 тестовых и 10 контрольных животных, поэтому обязательным является использование в эксперименте дополнительных животных.

7.1.2. *Уровни доз.* Концентрация исследуемого вещества для индукционной экспозиции должна быть физиологически переносима и вызывать легкое / умеренное раздражение кожи, а концентрация в провокационной экспозиции не должна вызывать раздражение. При отсутствии доступных данных соответствующие концентрации определяют в предварительном испытании на 2–3 животных, желательно, ПАФ-обработанных.

7.1.3. Индукционная экспозиция: подкожные инъекции.

День 0 — опытная группа.

Три пары подкожных инъекций объемом 0,1 мл вводят в область плеча, очищенную от шерсти таким образом, чтобы инъекции были по обе стороны срединной линии:

- инъекция 1: смесь 1:1 (по объему) ПАФ / вода или физиологический раствор;

- инъекция 2: исследуемое вещество в соответствующем растворителе в установленной ранее концентрации;

- инъекция 3: исследуемое вещество в установленной ранее концентрации в смеси 1:1 (по объему) ПАФ / вода или физиологический раствор.

В инъекции 3 растворимые в воде вещества до смешивания с ПАФ растворяют в воде. Жирорастворимые или нерастворимые вещества до перемешивания с водой растворяют в ПАФ. Конечная концентрация исследуемого вещества должна быть равна концентрации в инъекции 2.

Инъекции 1 и 2 вводят поочередно с небольшим интервалом в тестовую область, максимально близко к голове животного, а инъекцию 3 вводят ближе к хвостовой части тестовой области.

День 0 — контрольная группа.

Три пары подкожных инъекций объемом 0,1 мл вводят в одно и то же место животным, не подвергшимся обработке:

- инъекция 1: смесь 1:1 (по объему) ПАФ / вода или физиологический раствор;
- инъекция 2: неразбавленный растворитель;
- инъекция 3: 50% растворитель в смеси 1:1 (по объему) ПАФ/вода или физиологический раствор.

7.1.4. Индукционная экспозиция: местные аппликации:

День 5–7 — тестовая и контрольная группы.

Приблизительно за 24 ч до нанесения вещества, не являющегося раздражающим для кожи, тестовую область после стрижки или бритья обрабатывают 0,5 мл 50% натрий-лаурилсульфата в вазелине, чтобы вызвать местное раздражение.

День 6–8 — тестовая группа.

С тестовой области удаляют шерсть, затем накладывают на нее фильтровальную бумагу (2×4 см), полностью пропитанную исследуемым веществом в соответствующем растворителе, закрывают герметичной повязкой и оставляют на 48 ч для контакта с кожей. Выбор растворителя обосновывают. Твердые вещества измельчают и смешивают с соответствующим растворителем. Жидкости при необходимости можно наносить неразбавленными.

День 6–8 — контрольная группа.

С тестовой области удаляют шерсть, затем аналогичным способом наносят на нее только растворитель и оставляют для контакта с кожей под герметичной повязкой на 48 ч.

7.1.5. Провокационная экспозиция: местная аппликация.

День 20–22 — тестовая и контрольная группы.

С боковых частей тела опытных и контрольных животных удаляют шерсть, затем на один бок животного накладывают пластырь, заполненный тестовым веществом, и при необходимости пластырь, заполненный растворителем, также может быть наложен на другой бок. Пластырь фиксируют герметичной повязкой и оставляют для контакта с кожей на 24 ч.

7.1.6. Наблюдения: тестовая и контрольная группы.

Приблизительно через 21 ч после удаления пластыря контрольную область очищают, коротко остригают, бреют или, если необходимо, депилируют шерсть.

Примерно через 3 ч (через 48 ч с начала контрольного нанесения) наблюдают кожную реакцию и регистрируют изменения в соответствии с классификацией, приведенной ниже.

Примерно через 24 ч после первого наблюдения (72 ч) проводят второе и регистрируют реакции. Тестовые и контрольные группы оценивают независимо.

Шкала Магнуссона–Клигмана для оценки реакций в провокационном тесте.

- 0 — отсутствие видимых изменений;
- 1 — мелкоочаговая или неоднородная эритема;
- 2 — умеренная и сплошная эритема;
- 3 — интенсивная эритема и отек.

7.1.7. Повторную обработку проводят при необходимости уточнения результатов, полученных на первом контроле. Повторный контроль выполняют примерно через неделю после первого с новой контрольной группой. Повторный контроль также может быть и с первой контрольной группой.

7.1.8. *Клинические наблюдения.* Все кожные реакции и другие наблюдения, включая соматические реакции, являющиеся результатом индукционных и провокационных экспозиций, наблюдают и регистрируют. Другие исследования, например, гистопатологическое измерение толщины кожных складок, могут быть проведены для прояснения сомнительных результатов.

7.2. Тест Бюхлера.

7.2.1. Количество животных в тестовой группе должно составлять не менее 20, в контрольной — как минимум 10.

7.2.2. *Уровни доз.* Концентрация исследуемого вещества для каждой индукционной экспозиции должна быть максимально возможной, вызывающей слабое раздражение, а в провокационной экспозиции — максимальной, не вызывающей раздражения. Соответствующие концентрации определяют в предварительном тесте с использованием 2–3 животных, если другая информация отсутствует.

Для растворимых веществ в качестве растворителя используют воду или не вызывающий раздражение раствор ПАВ. Для других исследуемых веществ для индукционной экспозиции применяют 80% смесь этанола/воды, для провокационной — ацетон.

7.2.3. Индукционная экспозиция: местное нанесение.

День 0 — тестовая группа.

С одного бока животного удаляют (коротко остригают) шерсть, затем накладывают тестовый пластырь, полностью заполненный исследуемым веществом в соответствующем растворителе, выбор которого должен быть обоснован, жидкие вещества при возможности наносят не разбавленными. Исследуемое вещество удерживают в контакте с кожей герметичной повязкой или пластырем в течение 6 ч.

Тестовая система должна быть герметичной, для чего подходит круглый или квадратный ватный диск, размером примерно 4–6 см², который для гарантии герметичности фиксируют соответствующей повязкой. При использовании манжеты возможна дополнительная экспозиция.

День 0 — контрольная группа.

На одном боку животного удаляют (коротко остригают) шерсть, затем аналогичным способом наносят растворитель, который удерживают в контакте с кожей герметичным пластырем или подходящей повязкой в течение 6 ч. В опыте могут использоваться животные, не подвергавшиеся обработке, если имеются сведения, что фиктивная контрольная группа не требуется.

День 6–8 и 13–15 — тестовая и контрольная группы.

На 6–8, а затем на 13–15 дни ту же тестовую область того же бока животного (шерсть удаляют, если необходимо) обрабатывают аналогичным способом, что и в 0 день.

7.2.4. Провокационная экспозиция.

День 27–29 — тестовая и контрольная группы.

С необработанного бока животных опытной и контрольной групп удаляют (коротко остригают) шерсть. На заднюю часть бока животных обеих групп накладывают повязку с исследуемым веществом в максимально возможной концентрации, не вызывающей раздражения. При необходимости, повязку или пластырь с растворителем накладывают на переднюю часть необработанного бока животных обеих групп. Пластырь удерживают герметичной повязкой в контакте с кожей в течение 6 ч.

7.2.5. Наблюдения: тестовая и контрольная группы:

– примерно через 21 ч после удаления пластыря с контрольной области удаляют шерсть;

- примерно через 3 ч (через 30 ч после наложения контрольного пластыря) наблюдают кожные реакции и регистрируют в соответствии с классификацией, приведенной для максимизационного теста;

- примерно через 24 ч после осмотра на 30 часу (через 54 ч после наложения контрольного пластыря) кожные реакции повторно наблюдают и регистрируют.

Тестовые и контрольные группы оценивают независимо.

7.2.6. Повторная обработка при необходимости уточнения результатов, полученных на первом контроле. Повторный контроль проводят примерно через неделю после первого с новой контрольной группой. Повторный контроль также может быть проведен и с первой контрольной группой.

7.2.7. Клинические наблюдения всех кожных реакций и другие наблюдения, включая соматические реакции, являющиеся результатом индукционных и провокационных экспозиций, наблюдают и регистрируют. Иные исследования, например, гистопатологическое измерение толщины кожных складок могут быть проведены для прояснения сомнительных результатов.

ГЛАВА 5

КОЖНАЯ СЕНСИБИЛИЗАЦИЯ: ИССЛЕДОВАНИЕ РЕАКЦИИ РЕГИОНАЛЬНЫХ ЛИМФОУЗЛОВ

1. Метод оценки кожной сенсibilизации мышей по реакции региональных лимфоузлов (Local Lymph Node Assay, LLNA) предназначен для

выявления химических веществ, обладающих способностью вызывать кожную сенсibilизацию.

2. Метод LLNA является альтернативным по отношению к методу оценки кожной сенсibilизации ОЭСР № 406 (тест максимизации на морских свинках и тест Бюхлера) и имеет следующие преимущества: возможность сократить количество животных, уменьшить проявления боли и дистресса, получить более точную количественную оценку эффекта, не проводить регистрации кожных реакций гиперчувствительности, вызванных нанесением вещества; не требует использования адьювантов.

При этом положительные и отрицательные результаты, полученные с использованием всех методов, как правило, не требуют дальнейшего подтверждения.

3. Метод LLNA основан на измерении скорости пролиферации лимфоцитов в лимфоузлах, дренирующих участок кожного нанесения тестируемого вещества. Скорость пролиферации лимфоцитов, выделенных из лимфоузлов, оценивается методом радиоизотопного анализа. Допустимо применение иных способов оценки количества пролиферирующих клеток при условии полного удовлетворения требованиям Стандартов соответствия (приложение 1).

4. Критериальным показателем в тесте LLNA является значение индекса стимуляции (ИС), измеряемого как отношение скорости пролиферации лимфоцитов в опытной и контрольной группах мышей.

Критерием для отнесения тестируемого вещества к классу потенциально способных вызывать кожную сенсibilизацию является значение ИС ≥ 3 .

5. Основным принципом, лежащим в основе LLNA, заключается в том, что *сенсibilизаторы обладают способностью ускорять пролиферацию лимфоцитов в тех лимфатических узлах, которые дренируют место нанесения исследуемого вещества*. Скорость пролиферации лимфоцитов пропорциональна дозе и мощности нанесенного на кожу аллергена, что позволяет количественно оценить способность вещества вызывать сенсibilизацию.

6. Метод LLNA изучает фазу индукции кожной сенсibilизации и позволяет получить количественные данные, необходимые для оценки зависимости доза – эффект. При этом слабые/умеренные сенсibilизаторы, используемые в качестве положительного контроля (ПК) в тестах на морских свинках (ОЭСР № 406), пригодны и для использования в LLNA.

7. Кроме того, в случаях, когда необходимо официально подтвердить имеющийся прогноз об отсутствии у данного химического вещества способности к кожной сенсibilизации, может использоваться и *редуцированный вариант LLNA (rLLNA)*, с соблюдением всех деталей протокола LLNA позволяющий сократить расход животных на 40%.

Применение метода rLLNA должно быть четко обосновано, т. к. в случае получения положительного или сомнительного результата потребуются дополнительное тестирование для интерпретации или выяснения причин обнаруженного эффекта.

Метод rLLNA не должен использоваться для определения степени опасности испытуемого вещества в тесте кожной сенсибилизации, когда требуется информация о зависимости доза – эффект, в частности, при классификации для Глобальной Гармонизированной Системы классификации ООН и Маркировки химических веществ.

8. Перед тестом LLNA изучают всю имеющуюся информацию об исследуемом веществе с целью определения возможности применения метода для тестирования данного вещества и подбора диапазона доз.

9. Ограничения метода LLNA: некоторые металлы дают в LLNA ложноотрицательные эффекты, а некоторые кожные раздражители (отдельные разновидности сурфактантов) — ложноположительные; могут быть сложности с растворимостью тестируемого вещества; определенные типы химических веществ или их функциональные группы могут вызывать побочные эффекты, искажающие результаты LLNA; пестицидные препараты чаще дают положительные эффекты в LLNA, чем в тестах на морских свинках, и как следствие, требуют включать в опыт в качестве положительного контроля сходные вещества с известным эффектом, чтобы убедиться в адекватности результатов по методу LLNA.

Метод LLNA применяют для тестирования любых химических веществ, кроме тех, для которых уже имеются данные, свидетельствующие об их потенциальной возможности исказить результаты LLNA.

10. При проведении исследования используют молодых половозрелых нерожавших и небеременных самок мышей линий CBA / Ca или CBA / J.

11. *Подготовка дозированных растворов.* Твердые вещества растворяют или суспендируют в соответствующих растворителях /базовых жидкостях и при необходимости разводят. Жидкие вещества наносят неразбавленными или разводят для получения рабочих растворов необходимых концентраций. Нерастворимые вещества подвергают длительной экстракции в соответствующем растворителе с целью выделения всех способных экстрагироваться компонентов. Растворы исследуемых препаратов готовят ежедневно, за исключением веществ с известной стабильностью, допускающей хранение растворов в течение определенного времени.

12. Контроль качества.

Положительные контроли (ПК) используют для демонстрации надлежащего качества проведения анализа, для чего используют вещества с хорошо известной способностью к кожной сенсибилизации, позволяющие убедиться в адекватных и воспроизводимых результатах используемой тест-системы. ПК включают в каждый проводимый эксперимент для демонстрации компетентности лаборатории и ее способности проводить исследования, а также для оценки внутри- и межлабораторной воспроизводимости и сравнимости результатов теста.

Постоянное использование параллельных ПК позволяет избежать дополнительного тестирования на животных, необходимого для устранения проблем, возникающих при периодическом использовании ПК. Выбранная доза ПК не должна вызывать чрезмерной реакции воспаления кожи ушей или

реакций системной токсичности; положительный эффект ПК должен быть воспроизводимым, но не избыточным (ИС — не больше 20).

В качестве ПК, как правило, используют: 25% раствор гексилкоричного альдегида (CAS № 101-86-0) в смеси ацетона с оливковым маслом (4:1, v/v) и 5% раствор меркаптобензотиазола (CAS № 149-30-4) в *N,N*-диметилформамиде (приложение 1). При достаточном обосновании возможно использование других веществ, удовлетворяющих критериям.

13. Для лабораторий, использующих метод LLNA регулярно (не реже 1 раза в месяц), допускается применение ПК периодически (1 раз в полгода), например, для имеющих солидную базу экспериментальных данных с включением ПК, демонстрирующую способность лаборатории получать воспроизводимые и точные результаты (не менее 10 отдельных опытов с использованием ПК, проведенных не реже 1 раза в год, с ожидаемыми по выраженности положительными эффектами на введение ПК).

14. Параллельно группе ПК включают всегда при возникновении каких-либо изменений в процедуре проведения LLNA: замена обученного персонала, смена поставщиков материалов, реагентов и лабораторных животных, замена используемого оборудования, что обязательно регистрируют в отчете. Следует рассмотреть влияние проводимых изменений на соответствие данных ранее полученным и оценить необходимость формирования новой базы данных для достижения непротиворечивости в документации результатов ПК.

15. Исследователи должны понимать, что решение применять ПК на периодической основе вместо постоянного параллельного использования сказывается на уверенности в том, что новые вещества, тестирувавшиеся в промежутке между опытами с включением ПК и давшие в них отрицательный результат, действительно не обладают способностью к кожной сенсibilизации. В частности, если при периодическом использовании ПК вдруг обнаружится сбой системы в виде ложноотрицательного эффекта в группе животных ПК, под сомнением окажутся не только результаты данного эксперимента, но и результаты всех остальных, проведенных в промежутке между данным экспериментом и последним из тех, в которых ПК давал ожидаемый положительный эффект. Вероятность таких последствий должна тщательно оцениваться при решении вопроса о включении ПК параллельно с каждым опытом или только периодически. Следует также обсудить возможность использования меньшего количества животных в параллельной группе ПК, если это оправдано с научной точки зрения и если лаборатория докажет, основываясь на своей базе данных, что возможно использование меньшего количества мышей.

16. Несмотря на то, что препараты, использующиеся в качестве ПК, должны наноситься в растворителе с известным ответным эффектом (например, ацетон: оливковое масло; 4:1 v/v), возможны ситуации, в которых будет также необходимо провести исследование на нестандартном растворителе (клинически/химически соответствующий препарат) (24). Если вещество положительного контроля и тестируемое вещество наносятся

разных растворителях, следует включить в опыт отдельный контроль на растворитель ПК.

17. В случаях, когда оцениваются исследуемые вещества определенного химического класса или диапазона ответных реакций, можно также использовать «реперные» вещества того же класса с известной активностью в LLNA, которые будут доказывать, что метод LLNA адекватен для выявления потенциальной кожной сенсibilизации к исследуемым веществам данного класса. Вещества, предназначенные для «реперного» тестирования, должны иметь следующие свойства:

- структурное и функциональное подобие классу исследуемого вещества;
- известные физические / химические характеристики;
- дополнительные данные по активности в тесте LLNA;
- дополнительные данные по другим тестам на животных и/или на человеке.

18. Процедура исследования. Количество животных и выбор доз

19. В каждую экспериментальную группу включают как минимум четырех животных, всего тестируют как минимум три концентрации исследуемого вещества плюс параллельные группы негативного контроля (НК) для тестирования растворителя исследуемого вещества и положительного контроля (ПК); последняя может быть включена в данное исследование или данные берутся из недавно проведенного исследования в зависимости от политики лаборатории по данному вопросу. Следует обсудить вопрос о количестве доз ПК, особенно при периодическом использовании ПК. Уход и все манипуляции с животными в контрольных группах должны быть идентичны тем, которые используются для экспериментальных групп, за исключением введения самого тестируемого вещества.

20. Выбор доз тестируемого вещества и выбор растворителя должны быть основаны на рекомендациях. Последовательные дозы обычно выбираются из подходящего ряда концентраций, например, 100; 50; 25; 10; 5; 2,5; 1; 0,5% и т. д. Выбор используемого ряда концентраций следует сопровождать адекватным научным объяснением. Следует предварительно изучить всю доступную информацию о токсичности данного вещества (например, острой токсичности и способности вызывать раздражение кожи), его структуре и физико-химических свойствах, а также аналогичные характеристики близких по структуре веществ); на основании анализа этих данных выбирают три концентрации так, чтобы самая высокая из них вызывала как можно более выраженный эффект, но при этом не обладала системной токсичностью и/или не вызывала чрезмерного раздражения кожи на месте нанесения. При отсутствии такой информации может возникнуть необходимость в проведении предварительного пробного опыта.

21. Растворитель не должен искажать результаты исследования или косвенно влиять на них; следует выбирать растворитель по критериям максимальной растворимости в нем тестируемого вещества, чтобы получить наиболее высокую исходную концентрацию; в то же время для выполнения данного теста можно использовать как растворы веществ, так и их суспензии.

В общем случае могут быть рекомендованы следующие растворители: смесь ацетона с оливковым маслом (4:1, v/v), N, N-диметилформамид, метилэтилкетон, пропиленгликоль и диметилсульфоксид, а также другие растворители, если для этого имеется достаточное научное обоснование. В определенных ситуациях может возникнуть необходимость в дополнительных контролях для оценки эффектов клинически значимых растворителей или компонентов коммерческих препаратов, в составе которых тестируемое вещество поступает в продажу. Особое внимание следует уделить тому, чтобы водорастворимые вещества наносились на кожу в растворителе, хорошо смачивающем кожные покровы и тем самым не позволяющем тестируемому раствору быстро скатываться с поверхности кожи; для этого в растворы включают подходящие компоненты (например, ПАВ Pluronic® L92 в концентрации 1%). По вышеописанным причинам следует избегать использования простых водных растворов для нанесения на кожу.

22. Преимуществом данного метода является возможность проведения внутреннего контроля, для чего сравнивают состояние лимфоузлов одной и той же мыши на стороне нанесения препарата и противоположной стороне; это позволяет оценить внутригрупповую вариабельность эффекта у отдельных животных и статистическую значимость различий между тестируемым веществом и растворителем. Кроме того, анализ внутригрупповой вариабельности индивидуальных данных дает основание для объективной оценки возможности сокращения числа мышей в группе ПК. В некоторых странах органы надзора требуют предоставления индивидуальных данных по отдельным животным, в других странах принимаются и усредненные данные по каждой экспериментальной группе, что дает возможность исследователям выбрать способ представления результатов тестирования в виде индивидуальных или усредненных данных.

Предварительные исследования.

23. В отсутствие информации, позволяющей рассчитать максимальную дозу тестируемого вещества, следует провести предварительное исследование для выявления диапазона доз, подходящего для тестирования методом LLNA. Цель предварительного исследования состоит в получении информации для выбора максимальной дозы тестируемого вещества при его использовании в основном исследовании LLNA, т. е. в получении данных о системном и кожно-раздражающем эффектах изучаемого препарата. Максимальным уровнем исследуемой дозы следует считать 100% исследуемого вещества для жидкостей или максимально возможную концентрацию для твердых частиц или суспензий.

23.1. Предварительное исследование выполняется при условиях, идентичных условиям основного исследования LLNA, но оценка скорости пролиферации клеток лимфоузлов не проводится и количество животных в группе может быть меньшим. Рекомендуется использовать группы по одному или два животных на каждую дозу. Все мыши должны ежедневно осматриваться на предмет выявления любых клинических проявлений системной токсичности или местного раздражения на участке аппликации

вещества. Массу тела регистрируют перед началом эксперимента и перед его завершением (День 6). Проводят наблюдение за обоими ушами каждой мыши, оценивая наличие эритемы в баллах. Замеры толщины уха получают, используя калибромметр (например, электронный микрометр или стрелочный калибромметр Пикока), в День 1 (перед нанесением вещества), День 3 (спустя приблизительно 48 ч после первой дозы) и День 6. Кроме того, в День 6 толщину ушей можно дополнительно оценить путем взвешивания стандартного по площади образца ткани ушной раковины, полученного с помощью перфоратора после гуманного умерщвления животных. Раздражение кожи на месте аппликации вещества оценивается как чрезмерное при наличии эритемы с выраженностью 3 и более баллов по шкале таблицы и/или при увеличении толщины уха на 25% и более по сравнению с первоначальной в любой день осмотра животных. В качестве максимальной дозы для основного исследования LLNA выбирают максимальную из тех доз предварительного исследования, которые не вызывали признаков системной токсичности и/или чрезмерного местного раздражения кожи.

24. В дополнение к увеличению толщины уха на 25% и более по сравнению с первоначальной, для идентификации веществ-ирритантов в LLNA также используется статистически значимое увеличение среднего значения толщины уха в группе экспериментальных мышей по сравнению с аналогичной величиной в группе контрольных мышей. Однако, если различия этих величин статистически достоверны, но составляют менее 25%, они не могут быть квалифицированы как свидетельство избыточного раздражения ткани уха данной дозой тестируемого вещества.

25. Следующие клинические наблюдения могут свидетельствовать о наличии системной токсичности при их использовании в качестве элемента интегральной оценки для расчета максимальной дозы в основном методе LLNA: изменения в функции нервной системы (например, взъерошивание шерсти, атаксия, тремор и конвульсии); изменения в поведении (например, агрессивность, изменения в груминговой активности, заметные изменения в уровне активности); изменения дыхательной активности (изменения в частоте и интенсивности дыхания, такие как затрудненное дыхание, одышка и хрипы) и изменений в потреблении пищи и воды. Кроме того, следует регистрировать: признаки летаргии и/или апатии; любые клинические признаки, которые проявлялись как более чем эпизоды незначительной или мгновенной боли и дистресса; снижение массы тела более чем на 5% за период от Дня 1 до Дня 6; гибель животных. Умиравшие животные или животные, очевидно страдающие от боли или показывающие признаки серьезного и устойчивого дистресса, должны гуманно умерщвляться.

26. План основного эксперимента.

День 1: определение и регистрация веса каждого животного и их визуальный осмотр. Проводят аппликацию 25 мкл соответствующего разведения исследуемого вещества, одного растворителя или ПК (если он проводится параллельно в каждом эксперименте; в противном случае берут

данные последнего опыта с использованием ПК), на тыльную сторону каждого уха.

Дни 2 и 3: повторить процедуру аппликации, выполненную в День 1.

Дни 4 и 5: аппликаций не проводят.

День 6: регистрируют вес каждого животного. Вводят в хвостовую вену всех мышей экспериментальных и контрольных групп по 250 мкл стерильного забуференного физиологического раствора (PBS), содержащего 20 мкКи ($7,4 \times 10^5$ Бк) меченного тритием (^3H) метилтимидина. Альтернативный вариант: вводят в хвостовую вену всех мышей по 250 мкл стерильного PBS, содержащего 2 мкКи ($7,4 \times 10^4$ Бк) ^{125}I -йододезоксиуридина и 10^{-5} М флюородезоксиуридина. Через 5 ч производят гуманный забой животных. Извлекают дренирующие околоушные лимфоузлы и помещают их в PBS от каждого животного отдельно (индивидуальный подход к животным); иной вариант: извлечь и поместить в PBS лимфоузлы от мышей каждой экспериментальной группы (объединенный подход к экспериментальной группе). Детали и диаграммы идентификации лимфоузлов и их препарирования могут быть найдены в ссылке. В протокол исследования могут быть также включены дополнительные параметры контроля местных изменений кожи уха на месте аппликации, например, баллы проявления эритемы уха или данные о толщине ушей (измеренной с помощью калибратора толщины или определения веса стандартных кусочков уха, полученных при некропсии с помощью перфоратора для взятия проб тканей ушной раковины).

Подготовка клеточной взвеси.

27. Суспензию отдельных клеток лимфоузлов (КЛУ) после их билатерального извлечения (на основе индивидуального сбора материала от каждой мыши или при альтернативном подходе, объединяя лимфоузлы всех мышей данной группы) получают мягкой механической дезагрегацией, продавливая извлеченные лимфоузлы через сетку из нержавеющей стали с ячейками около 200 мкм или с помощью иных подходящих приемов. Полученные КЛУ дважды отмывают избытком PBS и преципитируют ДНК 5%-й трихлоруксусной кислотой (ТХУ) при 4°C в течение 18 ч. Осадок либо повторно суспендируется в 1 мл ТХУ и переносится в сцинтилляционный флакон содержащий 10 мл сцинтилляционной жидкости для подсчета метки трития ^3H , либо сразу переносится в γ -радиометрическую камеру для подсчета изотопа ^{125}I .

Определение клеточной пролиферации (включенной радиоактивности).

28. Включение меченного ^3H -метилтимидина измеряют сцинтилляционным β -счетчиком в распадах в минуту (РМ); включение меченного ^{125}I -йодоксиуридина — по ^{125}I также в РМ. В зависимости от используемого подхода включенная радиоактивность выражается как количество распадов в минуту на мышь (при индивидуальном подходе к животным) или количество распадов в минуту на всю экспериментальную группу мышей (при объединении биоматериала от всех мышей данной экспериментальной группы).

Редуцированный метод LLNA

29. В определенных ситуациях, когда возникает потребность подтвердить отрицательный прогноз о потенциальной способности вещества вызывать кожную сенсибилизацию для нормирования данного вещества, можно применять редуцированный протокол rLLNA с использованием меньшего количества животных при условии соблюдения всех других деталей протокола LLNA, изложенных в данных МР. Перед использованием метода rLLNA следует представить четкое обоснование и научное объяснение данного выбора. При получении положительного или сомнительного результата может потребоваться дополнительное исследование для объяснения или уточнения обнаруженного эффекта.

30. Сокращение количества изучаемых доз вещества и соответственно количества экспериментальных групп животных — единственное различие между протоколами LLNA и rLLNA; метод rLLNA не дает информации о зависимости доза – эффект, поэтому метод rLLNA не следует использовать, если требуется информация о дозовой зависимости эффекта. Как и в полном варианте LLNA с использованием нескольких доз, концентрация вещества в редуцированном протоколе rLLNA должна быть максимальной из тех, которые не вызывают выраженной системной токсичности и/или чрезмерного местного раздражения кожи мышей.

31. *Клинические наблюдения.* Каждую мышь следует тщательно осматривать по крайней мере 1 раз в день для выявления любых клинических признаков, как местного раздражения на участке аппликации вещества, так и системной токсичности. Все наблюдения должны систематически регистрироваться и включать записи наблюдений за каждой мышью по отдельности. В план мониторинга следует включать критерии быстрой идентификации мышей с выявленными симптомами системной токсичности, чрезмерного местного раздражения, изъязвления кожи для последующей эвтаназии.

32. *Масса тела.* Следует определять индивидуальные массы тела животных в начале эксперимента и перед запланированным гуманным умерщвлением.

ГЛАВА 6

АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ ДАННЫХ

1. Результаты опыта должны быть представлены в виде индекса стимуляции (ИС) для каждой экспериментальной группы. Используя индивидуальный подход к животным, значение ИС получают путем деления среднего значения РМ на одну мышь в каждой экспериментальной группе, включая группу ПК, на среднее значение РМ на одну мышь в группе контроля растворителя (VC). В этом случае среднее значение ИС для групп контроля растворителя (VC) подсчитывают как среднее арифметическое данных по отдельным мышам внутри этой группы. При использовании объединенного подхода к биоматериалу животных внутри экспериментальных групп ИС

определяют путем деления данных по включению радиоактивной метки для каждой экспериментальной группы на соответствующие (усредненные уже при сборе биоматериала) данные по включению радиоактивной метки для группы контроля на растворитель; при этом сразу получают среднее значение ИС.

2. Результат тестирования оценивают как положительный при значении $ИС \geq 3$. В случае пограничных значений ИС для трактовки результатов можно также учитывать выраженность зависимости доза – ответ, статистическую значимость и непротиворечивость эффектов в группах положительного (ПК) и отрицательного (VC) контроля.

3. Если имеется необходимость уточнить полученные результаты, следует проанализировать различные свойства тестируемого вещества, включая наличие у него структурного сходства с известными кожными сенсibilизаторами; вызывает ли оно чрезмерное местное раздражение кожи у мышей и какой характер имеет зависимость доза – ответ. Эти и другие соображения подробно рассмотрены в работе.

4. Используя индивидуальный подход к сбору биоматериала от животных, можно провести статистический анализ полученных данных на наличие и выраженность зависимости доза–ответ. Для этого можно использовать любой статистический тест на наличие связи между переменными, а также подходящие методы сравнения межгрупповых различий (например, метод попарного сравнения экспериментальных данных для опытной группы с соответствующими данными для группы контроля на растворитель). Например, при статистическом анализе можно использовать метод линейной регрессии или тест Уильяма для оценки тренда зависимости доза – ответ и тест Даннетта для попарных сравнений. При выборе подходящего метода статистического анализа исследователь должен учесть возможное неравенство дисперсий изучаемой переменной внутри отдельных сравниваемых групп и другие сходные проблемы, которые могут потребовать преобразования данных или непараметрического статистического анализа. При наличии экспериментальных точек, далеко отстоящих от соответствующих значений данной величины у других мышей данной группы (иногда называемых «выбросами»), приходится проводить статистический анализ дважды: с выпадающими точками и без них.

ГЛАВА 7 ПОДГОТОВКА ОТЧЕТА

1. Данные должны быть представлены в форме таблицы. При использовании индивидуального подхода к животным следует привести индивидуальные значения РПМ для каждого животного, средние значения РПМ в каждой группе мышей с соответствующим значением ошибки его определения (например, стандартное отклонение или среднеквадратическая ошибка среднего значения, стандартная погрешность средней величины) и средние величины СИ для каждой опытной группы по отношению к группе контроля растворителя. При использовании объединенного подхода к сбору

экспериментального материала следует привести полученные средние значения или медианы величин РПМ и СИ для каждой опытной группы по отношению к группе контроля растворителя.

2. Протокол эксперимента должен содержать следующую информацию:

- испытуемое вещество и его контроль: данные идентификации (например, номер CAS, если имеется; источник; степень чистоты; известные примеси; номер партии); физические и физико-химические свойства (летучесть, стабильность, растворимость); если это сложная смесь, то указать состав и относительные проценты компонентов;

- растворитель/носитель: данные идентификации (степень чистоты; концентрация, если целесообразно; используемый объем); обоснование выбора растворителя;

- проверка животных: источник поступления мышей линии СВА; микробиологический статус животных, если известно; количество и возраст животных; источник поступления животных, условия содержания, диета и т. д.;

- условия эксперимента: детали подготовки и нанесения тестируемого вещества; обоснование выбора дозы (включая результаты предварительных экспериментов, если проводились); концентрации тестируемого вещества и растворителя и общее количество вводимого тестируемого вещества; детали качества пищи и воды (включая тип/источник диеты, источник поступления воды); детали схемы проведения эксперимента и получения биологического материала; методы оценки токсичности; критерии интерпретации результатов исследования как положительных или отрицательных; детали любых отклонений от стандартного протокола и объяснения того, как данное отклонение повлияло на схему исследования и результаты;

- контроль качества: резюме результатов последнего из проводившихся контроля качества, включая информацию относительно тестируемого вещества, использовавшихся концентраций и растворителя; параллельный и/или исторический ПК и параллельные данные НК для данной лаборатории; если параллельный ПК не был включен, наличие данных и лабораторных протоколов для последнего из периодических ПК и протоколов, детализирующих данные исторического ПК, который служит для данной лаборатории обоснованием для отказа от осуществления параллельного ПК;

- результаты: индивидуальные значения веса мышей перед началом опыта и перед плановым забоем, а также средние значения и соответствующие ошибки этих величин (например, стандартное отклонение или среднеквадратическая ошибка среднего значения) для каждой экспериментальной группы; динамика начала проявления и симптомов токсичности, включая кожное раздражение на участке аппликации вещества, если таковые имеются, для каждого животного; таблица значений РПМ и СИ для каждой мыши (при индивидуальном подходе к животным) или соответствующих средних значений/медиан (при объединенном подходе к экспериментальной группе) для каждой экспериментальной группы; среднее значение и соответствующая ошибка (например, стандартное отклонение или среднеквадратическая ошибка среднего значения) величины РПМ для каждой

экспериментальной группы и результаты анализа резко отклоняющихся значений внутри каждой экспериментальной группы при использовании индивидуального подхода к животным; вычисленное значение СИ и надлежащей меры его вариабельности, учитывающей вариабельность эффектов как в экспериментальных группах, так и в группах контроля при использовании индивидуального подхода к животным; зависимость доза – ответ; статистический анализ этой зависимости при необходимости;

- обсуждение результатов: краткий комментарий к полученным результатам, включая характер зависимости доза – эффект и при необходимости ее статистический анализ с заключением относительно того, следует ли тестируемое вещество считать кожным сенсibilизатором.

**Стандарты соответствия для оценки кожной сенсibilизации
в предложенном или модифицированном тесте LLNA**

Введение

Цель Стандартов Соответствия (СС) состоит в том, чтобы проинформировать пользователей о той основе, на которой новые экспериментальные методы, запатентованные (т. е. защищенные авторским правом, имеющие официально зарегистрированную торговую марку, зарегистрированные) и незапатентованные, могут быть определены как имеющие достаточную точность и надежность для специфических целей эксперимента. Данные СС, основанные на ратифицированных и принятых методах испытания, могут использоваться для оценки надежности и точности других аналогичных экспериментальных методов (в разговорной речи именуемых методами «Я тоже»), базирующихся на аналогичных научных принципах и оценивающих или прогнозирующих тот же биологический или токсический эффект

До принятия модифицированных методов испытания (т. е. предложенных потенциальных усовершенствований к одобренному методу испытания) следует провести оценку эффективности предложенных изменений и степени, в которой эти изменения влияют на другие компоненты процесса валидации. В зависимости от количества и природы предложенных изменений, полученных с их использованием данных и соответствующей сопроводительной документации, измененный метод или проходит полный процесс валидации, как все новые тесты, или, если это будет признано возможным, только сокращенную процедуру оценки надежности и правомерности с использованием утвержденных СС

Сходные или модифицированные методы тестирования, предложенные для использования в рамках данной инструкции, должны быть подвергнуты оценке для выявления их надежности и точности с использованием стандартных химических соединений, соответствующих полному диапазону шкалы баллов LLNA. Во избежание необоснованного использования животных настоятельно рекомендуется основываться на принципах OECD до начала валидационного исследования в соответствии с СС и руководством, представленным в данных методах

Данные СС основаны на гармонизации документов «Координационных комитетов по утверждению альтернативных методов (CCVAM)» – USA–ICCVAM, EC–ECVAM и Japanese–JaCVAM (12) — для оценки валидности аналогичных или модифицированных вариантов LLNA. СС состоят из описания основных компонентов метода тестирования, компонентов метода тестирования стандартных эталонов (позитивных контролей), списка рекомендованных эталонов и стандартов для оценки степени точности и надежности, которые предлагаемый усовершенствованный метод должен обеспечить или превысить

I. Основные компоненты метода испытания

Чтобы гарантировать, что аналогичный или модифицированный метод LLNA является функционально и механистически соответствующим данному методу LLNA и оценивает тот же самый биологический эффект, в протокол метода должны быть включены следующие компоненты:

тестируемое вещество должно быть нанесено на кожу на оба уха мыши; пролиферацию лимфоцитов следует оценивать в лимфоузлах, дренирующих участок аппликации тестируемого вещества; пролиферацию лимфоцитов следует оценивать в течение фазы индукции кожной сенсибилизации;

самая высокая доза тестируемого вещества должна быть максимальной концентрацией, еще не вызывающей проявлений системной токсичности и /или чрезмерного местного раздражения кожи мышей. Для позитивных контролей самая высокая доза должна давать значение ИС не менее 3 и при этом не вызывать симптомов системной токсичности и /или чрезмерного местного раздражения кожи мышей;

в каждое исследование следует включать параллельно контроль на растворитель и, где предусмотрено, параллельный ПК;

следует использовать группу как минимум из четырех животных на каждую дозу;

можно отбирать биологический материал как от каждой мыши отдельно, так и объединяя его по группам.

Если нет соответствия по любому из этих критериев, данный СС не может быть использован для валидации аналогичного или модифицированного метода испытания

II. Минимальный список веществ-эталонов

Гармонизация СС USA–ICCVAM, ЕС–ECVAM и Japanes–JaCVAM позволяет создать список из 18 основных веществ-эталонов, которые рекомендовано использовать, и четырех дополнительных опциональных эталонов (веществ, которые давали ложноположительные или ложноотрицательные эффекты в LLNA при сравнении с результатами, полученными на людях и морских свинках (см. МР 406), и тем самым дающими равноценную или лучшую результативность, чем LLNA). Критерии для выбора этих веществ нижеследующие:

в список эталонов включены вещества, неоднократно протестированные на потенциальную возможность вызывать состояние кожной сенсибилизации в диапазоне эффектов, которые LLNA способен оценить или предсказать;

все вещества имели точно определенные химические структуры;

для этих веществ были доступны данные LLNA, полученные в опытах на морских свинках (см. МР 406) и (где возможно) данные, полученные на людях;

все эти вещества можно было приобрести в виде коммерческих препаратов.

Рекомендованные эталоны перечислены в приложении 3. Исследования с использованием предложенных эталонов следует проводить с растворителями, перечисленными в приложении 3. В случае недоступности перечисленных веществ можно использовать другие вещества,

удовлетворяющие вышеупомянутым критериям отбора с соответствующим обоснованием

III. Определенные стандарты надежности и точности

Точность аналогичного или модифицированного теста LLNA должна быть не ниже точности исходного метода LLNA, причем сравнение должно проводиться по результатам тестирования полной минимальной базы из 18 эталонных веществ. Новый или модифицированный метод LLNA должен дать правильную классификацию этих эталонов, основанную на заключениях «да/нет». Однако новый или модифицированный метод LLNA может правильно классифицировать не все основные эталоны, которые следует использовать. Если, например, один из слабых сенсibilизаторов был неправильно классифицирован, необходимо представить разумное объяснение неправильной классификации данного эталона и соответствующие дополнительные данные (например, результаты испытаний, давших правильную классификацию других веществ, сходных с неверно классифицированным эталоном по физическим, химическим и сенсibilизирующим свойствам), чтобы показать равноценность сравниваемых методов. При таких обстоятельствах валидация нового или модифицированного метода LLNA должна будет проводиться в каждом конкретном случае заново

**Рекомендованные вещества-эталонны для стандартизации
соответствия LLNA**

№	Вещество ¹	CAS No	Форма	Раств ²	ЕСЗ % ³	№ ⁴	0.5x - 2.0x ЕСЗ	Актуаль-ный диа-пазон ЕСЗ	LLNA vs. м/св.	LLNA vs. че-ловек
1	5-хлор-2-метил-4-изотиазолин-3-он (ХМИ)/ 2-метил-4- изотиазолин-3-он (МИ) ⁵	26172-55-4/ 2682-20-4	Ж	ДМФ	0,009	1	0.0045-0.018	NC	+/+	+/+
2	ДНХБ	97-00-7	С	АОМ	0,049	15	0,025-0,099	0,02-0,094	+/+	+/+
3	4-фенилендиамин	106-50-3	С	АОМ	0,11	6	0,055-0,22	0,07-0,16	+/+	+/+
4	хлорид кобальта	7646-79-9	С	ДМСО	0,6	2	0,3-1,2	0,4-0,8	+/+	+/+
5	изойгенол	97-54-1	Ж	АОМ	1,5	47	0,77-3,1	0,5-3,3	+/+	+/+
6	2-меркаптобензотиазол	149-30-4	С	ДМФ	1,7	1	0,85-3,4	NC	+/+	+/+
7	цитраль	5392-40-5	Ж	АОМ	9,2	6	4,6-18,3	5,1-13	+/+	+/+
8	ГКА	101-86-0	Ж	АОМ	9,7	21	4,8-19,5	4,4-14,7	+/+	+/+
9	эйгенол	97-53-0	Ж	АОМ	10,1	11	5,05-20,2	4,9-15	+/+	+/+
10	фенилбензоат	93-99-2	С	АОМ	13,6	3	6,8-27,2	1,2-20	+/+	+/+
11	коричный спирт	104-54-1	С	АОМ	21	1	10,5-42	NC	+/+	+/+
12	имидазолидинил-мочевина	39236-46-9	С	ДМФ	24	1	12-48	NC	+/+	+/+
13	метил метакрилат	80-62-6	Ж	АОМ	90	1	45-100	NC	+/+	+/+
14	хлорбензол	108-90-7	Ж	АОМ	25	1	NA	NA	-/-	-/*
15	изопропанол	67-63-0	Ж	АОМ	50	1	NA	NA	-/-	-/+
16	молочная кислота	50-21-5	Ж	ДМСО	25	1	NA	NA	-/-	-/*
17	метилсалицилат	119-36-8	Ж	АОМ	20	9	NA	NA	-/-	-/-
18	салициловая кислота	69-72-7	С	АОМ	25	1	NA	NA	-/-	-/-
Оptionальные стандарты для демонстрации улучшения характеристик LLNA										
19	натриевая соль лаурилсульфата	151-21-3	С	ДМФ	8,1	5	4,05-16,2	1,5-17,1	+/-	+/-
20	этиленгликоль диметакрилат	97-90-5	Ж	МЭК	28	1	14-56	NC	+/-	+/+
21	ксилол	1330-20-7	Ж	АОМ	95,8	1	47,9-100	NC	+/**	+/-
22	хлорид никеля	7718-54-9	С	ДМСО	5	2	NA	NA	-/+	-/+