

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ  
Заместитель Министра –  
Главный государственный  
санитарный врач  
Республики Беларусь



\_\_\_\_\_ А.А.Тарасенко

«14» декабря 2022 г.

Регистрационный № 052-1222

**МЕТОДЫ ОЦЕНКИ МУТАГЕННОГО И КАНЦЕРОГЕННОГО  
ДЕЙСТВИЯ ХИМИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ В ТЕСТАХ *IN VITRO***

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. Дудчик Н.В.,  
к.б.н. Емельянова О.А., Васильева М.М., Иода В.И., к.б.н. Камлюк С.Н.

Минск, 2022

## ГЛАВА 1 НАЗНАЧЕНИЕ И ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

1. В настоящей Инструкции по применению (далее – Инструкция) изложены методы определения мутагенного и канцерогенного действия химических веществ в тестах *in vitro*, которые могут быть использованы в комплексе медицинских услуг по медицинской профилактике заболеваний, связанных с возникновением мутаций, опухолевой трансформацией клеток.

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:

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

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

анеуген – любое соединение или процесс, которые, взаимодействуя с компонентами цикла деления митотических и мейотических клеток, приводят к анеуплоидии в клетках или организмах.

анеуплоидия – любое отклонение от нормального диплоидного (или гаплоидного) числа хромосом на одну или более хромосом, но не на полный набор хромосом (полиплоидия);

апоптоз – запрограммированная клеточная гибель, характеризующаяся серией этапов, ведущих к дезинтеграции клеток в мембранно-связанные частицы, которые затем элиминируются затем фагоцитозом или выбросом;

генотоксичность – общий термин, охватывающий все типы повреждений ДНК или хромосом, включающий разрывы, аддукты,

перестройки, мутации, хромосомные aberrации и анеуплоидию. Не все типы генотоксических эффектов приводят к мутациям или стабильным хромосомным нарушениям;

индекс пролиферации при цитокинетическом блоке (CBPI) – доля клеток второго деления в обработанной популяции относительно контроля без обработки;

индекс репликации (RI) – доля завершенных циклов клеточного деления в обработанных культурах по отношению к культурам без обработки в течение периода экспозиции и восстановления;

интерфазные клетки – клетки не в стадии митоза;

кластоген – любое соединение или процесс, которые вызывают структурные хромосомные aberrации в популяции клеток или организмов.

микроядра – небольшие ядерные образования, отделенные от основного ядра клетки, образовавшиеся во время телофазы митоза или мейоза в результате отставания хромосомных фрагментов или целых хромосом;

митоз – деление клеточного ядра, обычно подразделяющееся на профазу, прометафазу, метафазу, анафазу и телофазу;

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

мутагенность – образование наследуемых изменений последовательности пар оснований в ДНК или структуры хромосом;

относительное возрастание количества клеток (RICC) – показатель цитотоксичности химического вещества, применяемый в вариантах теста, в которых не используется цитохалазин Б;

относительное удвоение популяции (RPD) – метод измерения цитотоксичности в методиках, при которых не используется ЦХВ;

пролиферативный индекс (PI) – показатель цитотоксичности химического вещества применяемый в вариантах теста, в которых не используется цитохалазин Б;

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

цитокinesis – процесс клеточного деления сразу после митоза, формирующий дочерние клетки, каждая из которых содержит одно ядро.

5. Настоящая Инструкция предлагает комплекс методов *in vitro* для оценки мутагенного и канцерогенного действия химических веществ с учетом их генотоксического и негенотоксического механизмов действия.

Канцерогенный потенциал химических веществ генотоксического механизма действия оценивается следующими методами:

- метод оценки мутагенного потенциала химических веществ в тесте Эймса;
- метод оценки мутагенного потенциала химических токсикантов в SOS-хромотесте;
- метод оценки хромосомных aberrаций в клетках млекопитающих *in vitro*;
- метод ДНК-комет *in vitro* на клетках млекопитающих;
- микроядерный тест *in vitro* на клетках млекопитающих.

Канцерогенный потенциал химических веществ негенотоксического механизма действия оценивается в тесте на неопластическую трансформацию клеток грызунов в культуре.

### **ГЛАВА 3**

## **ОБЩИЕ УСЛОВИЯ ПРОВЕДЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЙ *IN VITRO* ПО ВЫЯВЛЕНИЮ МУТАГЕННОГО И КАНЦЕРОГЕННОГО ДЕЙСТВИЯ ХИМИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ**

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

7. Растворитель не должен оказывать токсическое действие при использованных дозах (концентрациях).

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

8. Тестирование *in vitro* проводится в системе с метаболической активацией и без нее. Положительные контроли должны быть подобраны для тест-систем как с метаболической активацией, так и без нее. Отрицательные контроли обеспечивают статистически значимое изменение анализируемых показателей по сравнению с одновременным отрицательным контролем.

9. Критерии выбора исследуемых концентраций и условий культивирования должны быть обоснованы для каждой тест-модели в отдельности.

## ГЛАВА 4

### МЕТОД ОЦЕНКИ МУТАГЕННОГО ПОТЕНЦИАЛА ХИМИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ В ТЕСТЕ ЭЙМСА

10. Принцип метода основан на использовании штаммов *Salmonella typhimurium*, ауксотрофных по гистидину. При наличии у испытуемого вещества мутагенной активности происходит реверсия тест-штаммов к прототрофности и, следовательно, их рост на безгистидиновой питательной среде.

Для учета генных мутаций на индикаторных бактериях используются штаммы *Salmonella typhimurium* TA1537, TA98, TA100 и др.

11. Необходимо испытание 5 доз веществ. Максимальная доза исследуемого химического вещества должна соответствовать 1 мг на чашку. В случае наличия у вещества антибактериальных свойств, максимальная доза должна соответствовать дозе, вызывающей антибактериальный эффект.

12. В эксперимент должны быть включены группы негативного и позитивного контроля. Группа, получающая растворитель, служит негативным контролем, известные мутагены – позитивным контролем в группах с наличием и отсутствием микросомальной активирующей смеси (S9). В качестве позитивных контролей используются мутагены, позволяющие оценить эффективность ответа тест-штаммов бактерий и системы метаболической активации (приложение 1 к настоящей Инструкции), либо другие мутагены, позволяющие адекватно оценить эффективность ответа тест-штаммов.

13. При проведении исследования должна быть проведена проверка тест-штаммов на соответствие генотипу.

14. Накануне проведения исследования культуры с косяка мясо-пептонного агара засевают петлей в 10 мл мясо-пептонного бульона или среды TS или триптон-соевого бульона и инкубируют 15–18 часов при  $37 \pm 1$  °C до плотности 200–300 млн. клеток.

15. Процедура исследования при проведении тестирования без метаболической активации.

В день проведения испытания подготовить чашки Петри с минимальным нижним агаром (из расчета – по 3 чашки для каждой концентрации исследуемого вещества и для контролей) и пустые стерильные пробирки. Приготовить растворы исследуемого вещества.

Исследование проводится в 3 параллелях. Верхний полужидкий минимальный агар расплавить и разлить по 2 мл в стерильные пробирки. Поддерживать температуру агара 43–48 °C.

В каждую пробирку с верхним полужидким минимальным агаром внести:

- 0,5 мл стерильного фосфатного буфера 0,1 мМ;
- 0,1 мл исследуемого вещества или его раствора;
- 0,1 мл тест-культуры.

В позитивных контролях вместо исследуемого вещества добавить соответствующие мутагены. Негативные контроли выполнить с растворителем или средой, без исследуемого вещества.

Содержимое пробирок быстро перемешать на шейкере типа вортекс и вылить на чашки Петри со слоем нижнего минимального агара, при этом продолжительность времени перемешивания и разлива полужидкого агара на чашку не должна превышать 10–15 секунд. Чашку оставить при комнатной температуре на 30–40 минут до полного застывания агара, затем перевернуть и поместить в термостат. Инкубация 48 часов при  $37 \pm 1$  °С.

#### 16. Процедура тестирования с метаболической активацией.

В день эксперимента подготовить чашки Петри с минимальным нижним агаром (из расчета – по 3 чашки для каждой концентрации исследуемого вещества и для контролей) и пустые стерильные пробирки. Приготовить растворы исследуемого вещества и микросомальную активирующую смесь (до использования хранить на льду). Допускается использование микросомальной активирующей смеси из коммерческих наборов.

Исследование проводится в 3 параллелях. Верхний полужидкий минимальный агар расплавить и разлить по 2 мл в стерильные пробирки. Поддерживать температуру агара 43–48 °С.

В каждую пробирку с верхним полужидким минимальным агаром внести:

- 0,5 мл микросомальной активирующей смеси;
- 0,1 мл исследуемого вещества или его раствора;
- 0,1 мл тест-культуры.

В позитивных контролях вместо исследуемого вещества добавить соответствующие мутагены. Негативные контроли выполнить с растворителем или средой, без исследуемого вещества.

Содержимое пробирок быстро перемешать на шейкере типа вортекс и вылить на чашки Петри со слоем нижнего минимального агара, при этом продолжительность времени перемешивания и разлива полужидкого агара на чашку не должна превышать 10–15 секунд. Чашку оставить при комнатной температуре на 30–40 минут до полного застывания агара, затем перевернуть и поместить в термостат. Инкубация 48 часов при  $37 \pm 1$  °С.

17. Учет результатов. После 48 часов инкубации чашки извлекаются из термостата и производится подсчет колоний-ревертантов на опытных и

контрольных чашках. Для каждой исследуемой концентрации вещества, позитивных и негативных контролей рассчитывается среднее значение числа колоний ревертантов, а также стандартное отклонение.

18. Оценивается ответ тест-штаммов на стандартные мутагены и баланс позитивного и негативного контролей. Число колоний-ревертантов в позитивном контроле должно превышать число колоний-ревертантов в негативном контроле как минимум в 3 раза.

19. Оценка полученных результатов. Проводится на основании расчета отношения среднего значения количества колоний-ревертантов на чашках с исследуемым веществом к среднему значению количества колоний-ревертантов на чашках с негативным контролем.

В случае, если количество колоний-ревертантов на чашках с исследуемым веществом не превышает в 2 раза количество колоний-ревертантов на чашках с негативным контролем, делается вывод о том, что в использованном варианте тестирования не выявлена мутагенная активность исследуемого вещества в тестируемой концентрации.

В случае, если количество колоний-ревертантов на чашках с исследуемым веществом в 2–10 раз превышает количество колоний-ревертантов на чашках с негативным контролем, делается вывод о том, что в использованном варианте тестирования выявлена слабая мутагенная активность исследуемого вещества в тестируемой концентрации.

В случае, если количество колоний-ревертантов на чашках с исследуемым веществом в 10–100 раз превышает количество колоний-ревертантов на чашках с негативным контролем, делается вывод о том, что в использованном варианте тестирования выявлена средняя мутагенная активность исследуемого вещества в тестируемой концентрации.

В случае, если количество колоний-ревертантов на чашках с исследуемым веществом более, чем в 100 раз превышает количество колоний-ревертантов на чашках с негативным контролем, делается вывод о том, что в использованном варианте тестирования выявлена сильная мутагенная активность исследуемого вещества в тестируемой концентрации.

20. Оценка результатов с помощью определения зависимости доза-эффект: зависимое от концентрации увеличение числа колоний-ревертантов на чашках с исследуемым веществом и/или воспроизводимое увеличение числа колоний-ревертантов на чашку при одной или более концентрациях на одном или более тест-штамме свидетельствует о наличии генотоксического эффекта исследуемого вещества.

21. Положительные результаты в методе оценки мутагенного потенциала химических веществ в тесте Эймса на чашках Петри свидетельствуют о том, что исследуемое вещество индуцирует мутации в

геноме тест-штаммов в условиях проведения испытания. Отрицательные результаты показывают, что исследуемое вещество в условиях проведения испытания не обладает генотоксической активностью в отношении тест-штаммов.

## ГЛАВА 5

### МЕТОД ОЦЕНКИ МУТАГЕННОГО ПОТЕНЦИАЛА ХИМИЧЕСКИХ ТОКСИКАНТОВ В SOS-ХРОМОТЕСТЕ

22. SOS-хромотест позволяет выявить генотоксичные вещества, проявляющие мутагенные свойства только при активации в жидкой среде.

Основой SOS-хромотеста является штамм *Escherichia coli* K12 PQ37, сконструированный путем объединения гена *lacZ*, отвечающего за синтез фермента β-галактозидазы, с геном *sfiA*, контролируемым генеральным репрессором SOS-системы. При воздействии вещества с ДНК-повреждающими свойствами происходит индукция SOS-ответа и синтез β-галактозидазы, который может быть оценен по цветной реакции.

23. Условия испытаний. Исследование в обязательном порядке сопровождается позитивным (4-нитрохинолин-N-оксид для варианта тестирования без метаболической активации и 2-аминоантрацен для варианта тестирования с метаболической активацией) и негативным (растворитель) контролями.

24. Подготовка к исследованию. Тест-штамм следует хранить в слое 0,6 % мясопептонного агара под стерильным вазелиновым маслом. При необходимости культура из-под масла пересеивается на 2 % скошенный мясопептонный агар. Косяк допустимо использовать без пересеивов в течение 2 недель. Допускается хранение лиофилизированных культур при температуре -80 °С.

Накануне проведения исследования культуру с косяка мясопептонного агара засеять петлей в 10 мл Луриа бульона с добавлением ампициллина (20 мкг/мл) и инкубировать 15–18 часов при 37 ± 1 °С до OD<sub>600</sub> = 0,4.

25. Процедура исследования.

Эксперимент проводят не менее, чем в 3 повторностях для каждой концентрации исследуемого вещества. В день проведения исследования подготовить пустые стерильные пробирки (из расчета – по 1 пробирке на этап инкубации, этап проверки активности щелочной фосфатазы и этап экспрессии β-галактозидазы для каждого опытного образца, позитивный и негативный контроли при проведении исследования в 1 повторности). Приготовить растворы исследуемого вещества и положительного контроля (рекомендуемый шаг разведения – 1:2, оптимальный растворитель –

10%-ный раствор диметилсульфоксида) и микросомальную активирующую смесь (до использования хранить на льду).

Допускается использование микросомальной активирующей смеси из коммерческих наборов.

26. Ночную культуру бактерий разбавить в 10 раз Лурия бульоном (для варианта тестирования без метаболической активации) либо микросомальной активирующей смесью (для варианта тестирования с метаболической активацией).

В каждую стерильную пробирку внести:

0,6 мл разбавленной тест-культуры;

20,0 мкл раствора исследуемого вещества.

27. В позитивном контроле вместо исследуемого вещества добавить раствор 4-нитрохиолин-N-оксида (для варианта тестирования без метаболической активации) либо раствор 2-аминоантрацена (для варианта тестирования с метаболической активацией). Негативные контроли выполнить с растворителем, без исследуемого вещества.

28. Пробирки с содержимым инкубировать со встряхиванием в течение 2 часов инкубации при температуре  $37 \pm 1$  °С. По истечении этого времени выполнить оценку роста бактерий (проверка активности щелочной фосфатазы, являющейся маркером роста бактерий) и определение  $\beta$ -галактозидазы.

28.1. Оценка роста тест-культуры.

В пустую стерильную пробирку внести:

0,3 мл тест-культуры;

2,7 мл Т-буфера;

0,1 мл 0,1%-ного раствора додецилсульфата натрия;

0,15 мл хлороформа.

Содержимое пробирки тщательно перемешать и инкубировать 10 минут при температуре 28–30 °С, что приведет к лизису клеток.

К лизированным образцам добавить 0,6 мл раствора р-нитрофенилфосфата в Т-буфере (концентрация раствора 4 мг/мл). Инкубировать 30–40 минут.

После развития желтой окраски остановить реакцию путем добавления 1,0 мл 2М натрия хлористого. Через 5 минут добавить 1,0 мл 2М Трис-буфера.

Измерить оптическую плотность образцов на спектрофотометре при длине волны 420 нм.

28.2. Определение активности  $\beta$ -галактозидазы.

В пустую стерильную пробирку внести:

0,3 мл тест-культуры;

2,7 мл Z-буфера;

0,1 мл 0,1%-ного раствора додецилсульфата натрия;

0,15 мл хлороформа.

Содержимое пробирки тщательно перемешать и инкубировать 10 минут при температуре 28–30 °С. Это вызовет лизис бактериальных клеток.

К лизированным образцам добавить 0,6 мл раствора о-нитрофенил-β-D-галактопиранозида в Z-буфере (концентрация раствора 4 мг/мл). Инкубировать 30–40 минут.

После развития желтой окраски остановить реакцию путем добавления 2,0 мл 1М натрия углекислого. Через 5 минут добавить 1,0 мл 2М Трис-буфера.

Измерить оптическую плотность образцов на спектрофотометре при длине волны 420 нм.

28.3. Расчет активности щелочной фосфатазы и β-галактозидазы для исследуемого вещества и негативного контроля проводится по формуле (1):

$$A = \frac{OD_{420}}{TV} \times 1000 \quad (1)$$

где: A – активность фермента (щелочной фосфатазы либо β-галактозидазы)

OD<sub>420</sub> – оптическая плотность пробы при 420 нм;

T – время реакции (мин);

V – объем вносимой пробы (мл).

## 29. Оценка полученных результатов.

Вывод о наличии или отсутствии генотоксического эффекта у исследуемого образца делают на основании величины фактора индукции (IF), рассчитываемого по формуле (2):

$$IF = \frac{R(S)}{R(N)} \quad (2)$$

где:

$$R(S) = \frac{A_{\beta\text{-галактозидазы в опыте}}}{A_{\text{щелочной фосфатазы в опыте}}} \quad (2.1)$$

$$R(N) = \frac{A_{\beta\text{-галактозидазы в негативном контроле}}}{A_{\text{щелочной фосфатазы в негативном контроле}}} \quad (2.2)$$

На основании результатов 3 параллельных исследований находят среднее арифметическое значение фактора индукции:

при  $IF > 1,5$  делается вывод о том, что исследуемое соединение обладает генотоксическим эффектом.

при  $IF \leq 1,5$  считается, что исследуемое вещество не проявляет мутагенной активности в отношении тест-штамма в условиях проведения испытания.

Если средние значения фактора индукции в вариантах тестирования без метаболической активации и с метаболической активацией различаются, вывод делается по большему значению данного показателя.

SOS-хромотест может проводиться с помощью коммерческих наборов, предназначенных для оценки генотоксичности химических веществ.

## **ГЛАВА 6**

### **МЕТОД ОЦЕНКИ ХРОМОСОМНЫХ АБЕРРАЦИЙ В КЛЕТКАХ МЛЕКОПИТАЮЩИХ *IN VITRO***

30. Принцип метода оценки хромосомных aberrаций в клетках млекопитающих *in vitro* заключается в микроскопическом анализе фиксированных на предметном стекле клеток для обнаружения хромосомных aberrаций. В исследовании культивируемые клетки подвергаются воздействию изучаемого вещества с последующей остановкой деления на стадии метафазы (например, колцемидом или колхицином).

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

32. В экспериментах используют:

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

первичные культуры клеток, включая лимфоциты периферической крови человека и млекопитающих.

Используемые клетки отбирают на основе способности к росту в культуре, стабильности кариотипа, числа и разнообразия хромосом и спонтанного уровня хромосомных aberrаций.

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

Клеточные линии, на которых проводят исследования, следует постоянно проверять на стабильность модального числа хромосом и

отсутствие контаминации микоплазмой (для клеток должна быть известна нормальная, свойственная им, продолжительность клеточного цикла).

33. Клеточные культуры рассеивают в культуральной среде до плотности, при которой клетки не будут мешать друг другу до времени фиксации и инкубируют при 37 °С.

34. При метаболической активации клетки инкубируют с изучаемым веществом. Используют кофакторы и постмитохондриальную фракцию (S9). Постмитохондриальную фракцию добавляют в объеме 1–10 % от объема культуральной среды.

Критериями определения максимальной концентрации изучаемого вещества являются: цитотоксичность, растворимость в культуральной среде, изменение рН и осмотическая концентрация.

35. Исследуют не менее трех доз (концентраций) вещества.

Если вещество обладает цитотоксическим действием, его следует изучать в дозах (концентрациях) в диапазоне от максимального уровня токсичности до ее отсутствия. На момент фиксации максимальная концентрация должна показать значительное (более 50 %) сокращение количества клеток или митотического индекса.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

42. Анализируемые метафазы должны содержать число центромер в пределах  $\pm 2$  от модального числа для исследуемого типа клеток. Анализируют не менее 200 разбросанных метафаз в каждом опыте. При значительном числе aberrаций количество наблюдений может быть снижено. Необходимо учитывать полиплоидии и эндоредупликации при их наличии.

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

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

воспроизводимое повышение числа клеток с aberrациями хромосом.

Повышение частоты полиплоидных клеток показывает, что вещество ингибирует процесс митоза и индуцирует численные хромосомные аномалии. Повышение числа клеток с эндоредупликацией хромосом

указывает, что вещество ингибирует прогрессию клеточного цикла. Положительные результаты в тесте на хромосомные aberrации *in vitro* показывают, что вещество индуцирует структурные хромосомные aberrации в культивируемых соматических клетках млекопитающих.

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

## ГЛАВА 7 МЕТОД ДНК-КОМЕТ *IN VITRO* НА КЛЕТКАХ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

45. Метод ДНК-комет *in vitro* на клетках млекопитающих основан на регистрации различной подвижности в постоянном электрическом поле поврежденной ДНК и/или фрагментов ДНК индивидуальных лизированных клеток, заключенных в агарозный гель. При этом ДНК мигрирует к аноду, формируя электрофоретический след, визуально напоминающий «хвост кометы», параметры которого зависят от степени поврежденности ДНК.

46. В качестве тест-объекта используют клетки первичных и перевиваемых клеточных культур человека (лимфоциты периферической крови и фибробласты человека, карцинома шейки матки HeLa, карцинома легкого А-549, карцинома гортани Нер2 и др.).

47. Общая схема метода включает получение гель-слайдов (подложки), получение микропрепаратов, лизис, щелочную денатурацию, электрофорез, нейтрализацию, окрашивание и микроскопический анализ.

Гель-слайды готовятся с использованием предметных стекол, покрываемых агарозным гелем. Исследуемые образцы инкубируют с клетками, затем в агарозном геле на подготовленные гель-слайды. После затвердевания геля клетки подвергают лизису, приводящему к разрушению клеточных и ядерных мембран, диссоциации ДНК-белковых комплексов. Проводится щелочная денатурация ( $\text{pH} > 13$ ), которая переводит щелочно-лабильные сайты ДНК в одонитевые разрывы, затем проводят электрофорез. Далее слайды нейтрализуют, окрашивают и изучают под флуоресцентным микроскопом. Далее проводят компьютерный анализ цифровых изображений комет с помощью специализированного программного обеспечения и определяют основной показатель процент ДНК в хвосте кометы и другие параметры.

#### 48. Подготовка к исследованию.

##### 48.1. Подготовка растворов и буферов.

Фосфатно-солевой буфер (ФСБ) pH 7,4 (хранят при 4 °С).

Фосфатно-солевой буфер с 1мМ ЭДТА-Na (ФСБ + ЭДТА) pH 7,4 (хранят при 4 °С).

Универсальная 1 % агароза. Готовят 10 мл 1 % раствора универсальной агарозы в ФСБ + ЭДТА в стеклянном флаконе с крышкой на водяной бане до получения полностью прозрачного геля.

Легкоплавкая 1 % агароза. Готовят 1%-ный раствор легкоплавкой агарозы в ФСБ + ЭДТА и инкубируют в микротермостате при 70 °С до получения полностью прозрачного агарозного геля. Приготовленный агарозный гель охлаждают до  $(39 \pm 2)$  °С.

Основной лизирующий раствор. Готовят основной лизирующий раствор – 10мМ Трис-HCl (pH 10) 2,5М NaCl, 100 мМ ЭДТА-Na. Раствор хранится при комнатной температуре в течение месяца.

Рабочий лизирующий раствор готовится и используется непосредственно в день эксперимента.

Готовят 1%-ный раствор Тритон-X100 в основном лизирующем растворе.

Щелочной раствор для электрофореза (pH13). Готовят раствор 0,3М NaOH и 1мМ ЭДТА-Na. Раствор охлаждают до 4 °С.

Раствор этидиум бромид. Готовят раствор с концентрацией этидиум бромид 2 мкг/см<sup>3</sup> в ФСБ. Полученный раствор хранят при 4 °С.

SYBR Green I. Готовят раствор SYBR Green I 1:10000 в ТЕ-буфере. Хранят при 4 °С не более 2 недель.

48.2. Подготовка стекол для микропрепаратов. Обезжиренные предметные стекла выкладывают на термостатируемую поверхность электрической плитки, нагретой до 65–70 °С. Расправленную 1 % агарозу из расчета 20 мм<sup>3</sup> на площадь стекла 25 мм<sup>2</sup>, дозатором наносят на край стекла и равномерно распределяют по всей поверхности. После полного высыхания геля стекла снимают и охлаждают до комнатной температуры. Приготовленные стекла для микропрепаратов могут храниться 1 месяц при комнатной температуре.

##### 48.3 Подготовка перевиваемых клеток.

Культивирование перевиваемых культур клеток. Клетки культивируют в среде DMEM с 0,3 мг/мл L-глутамина с добавлением 10 % эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота, 100 ед/мл пенициллина и 0,1 мг/мл стрептомицина в контролируемых условиях (37 °С, 5 % CO<sub>2</sub>) в пластиковых флаконах с площадью дна 25 см<sup>2</sup> (посевная концентрация  $1 \times 10^6$  клеток / флакон).

Непосредственно перед тестированием клеточный монослой 2 раза промывают ФСБ без  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Mg}^{2+}$  и заливают на 5 минут 0,05 % раствором трипсина (1 см<sup>3</sup> на флакон). Затем инактивируют трипсин средой для культивирования клеток, осторожно пипетируют клетки в среде до образования однородной суспензии и осаждают центрифугированием (5 мин 400 g). После этого клетки еще 2 раза отмывают в охлажденном растворе ФСБ + ЭДТА (4 °С).

Оценку жизнеспособности клеток проводят окраской 0,4 % трипанового синего или любым другим методом, используемым в лаборатории. До получения микропрепаратов возможно хранение клеток при 4 °С не более 3 часов.

49. Условия проведения исследования.

49.1. В качестве растворителей используют:

бидистиллированную воду при работе с гидрофильными веществами; диметилсульфоксид или этиловый спирт в конечной концентрации не более 1 % при работе с гидрофобными веществами.

При необходимости допускается использование других растворителей в концентрациях, не вызывающих токсического эффекта, что должно быть установлено экспериментально.

49.2. Контроли.

негативный контроль – растворитель, вносимый в эквивалентных объемах;

позитивный контроль – пероксид водорода, приготовленный непосредственно перед использованием готовят 1 мМ раствор пероксида водорода в охлажденном (4 °С) ФСБ.

49.3. Исследуемые концентрации. Во избежание ложноположительных или ложноотрицательных результатов образцы исследуются в концентрациях, не вызывающих изменение рН инкубационной среды и/или осмотического давления.

50. Процедура тестирования.

50.1. Исследование начинают с определения цитотоксичности *in vitro*. В качестве максимальной исследуемой концентрации принимается 1/2 ЛК<sub>50</sub>. Если 1/2 ЛК<sub>50</sub> превышает 10 мМ, то в качестве максимальной концентрации принимается последняя. Для низкотоксичных и нетоксичных образцов в качестве максимальной используется концентрация 5 мг/см<sup>3</sup>, 5 мкл/см<sup>3</sup> либо 10 мМ. Две последующие концентрации для исследования составляют 1/10 и 1/100 от максимальной.

50.2. Инкубация клеток с исследуемыми образцами. В микропробирки, содержащие 5 мм<sup>3</sup> ФСБ, вносят 20 мм<sup>3</sup> раствора исследуемого образца и 225 мм<sup>3</sup> клеточной суспензии (1 × 10<sup>6</sup> клеток/см<sup>3</sup>). Клеточную суспензию с образцами инкубируют при 37 °С в течение 30 мин

и 3 ч. По окончании инкубации пробирки центрифугируют при 400 g в течение 5 мин. Надосадочную жидкость сливают и осажденные клетки дважды отмывают в ФСБ + ЭДТА центрифугированием при 400 g 5 мин. После второй отмывки осажденные клетки разводят ФСБ + ЭДТА и сразу приступают к процедуре получения микропрепаратов. Каждая экспериментальная точка проводится не менее чем в двух повторностях, по три микропрепарата на каждую повторность.

Для приготовления образцов отрицательного контроля в микропробирки приливают 5 мм<sup>3</sup> ФСБ, 20 мм<sup>3</sup> растворителя и 225 мм<sup>3</sup> клеточной суспензии ( $1 \times 10^6$  клеток/см<sup>3</sup>). В случае положительного контроля в микропробирки вносят 25 мм<sup>3</sup> раствора пероксида водорода и добавляют 225 мм<sup>3</sup> клеточной суспензии ( $1 \times 10^6$  клеток/мл).

### 50.3. Приготовление микропрепаратов.

При использовании предметных стекол нестандартного размера для получения микропрепаратов исследуемые клетки иммобилизируют в трехслойные агарозные блоки по принципу «сэндвича». На стекла с высушенной универсальной 1 % агарозой наносят слой универсальной 1 % агарозы. Охлаждают 5 мин 4 °С для застывания геля. В микропробирке быстро смешивают в равных частях (1:1) 1 % легкоплавкую агарозу с суспензией клеток после воздействия исследуемых образцов и наносят следующим слоем. Охлаждают 5 мин при 4 °С для застывания геля. После этого наносят третий слой – 0,5 % легкоплавкую агарозу и охлаждают 5 мин при 4 °С.

При использовании стандартных стекол в микроцентрифужные пробирки с 240 мм<sup>3</sup> агарозного геля вносят 60 мм<sup>3</sup> клеточной суспензии 2–3 раза прокачивают дозатором. В центральную часть предметного стекла наносят 60 мм<sup>3</sup> полученного агарозного геля с клетками и накрывают покровным стеклом под углом, так, чтобы не было пузырей. Предметные стекла кладут на поверхность емкости со льдом и оставляют на 10 мин для затвердевания геля. Аккуратно снимают покровные стекла (тянут за край) и предметные стекла помещают в стеклянную кювету.

Далее все манипуляции проводятся только в затемненном месте при свете желтой или зеленой лампы.

### 50.4. Лизис.

В кювету с микропрепаратами заливают рабочий лизирующий раствор пока раствор не покроет микропрепараты на 2–3 мм, накрывают крышкой и инкубируют при 4 °С в течение 1 ч. Допускается нахождение препаратов в лизирующем растворе до 24 ч.

### 50.5. Щелочная денатурация.

По окончании лизиса, микропрепараты вынимают из лизирующего раствора и переносят в кювету с охлажденным (4 °С) щелочным раствором для электрофореза (рН 13). Инкубируют при 4 °С в течение 20 мин.

#### 50.6. Щелочной электрофорез.

Микропрепараты раскладывают на поверхности камеры для горизонтального электрофореза. Электрофорез осуществляют в свежей порции охлажденного (4 °С) щелочного раствора для электрофореза (рН 13) при температуре окружающей среды 20–25 °С. Отклонения в указанных температурных режимах может приводить к вариабельности получаемых результатов. Электрофорез проводят в течение 20 мин при напряженности электрического поля 1В на 1 см длины площадки для микропрепаратов.

#### 50.7. Окрашивание.

Микропрепараты помещают в кювету и заливают бидистиллированной водой. Проводят нейтрализацию в течение 5 мин при комнатной температуре. Процедуру нейтрализации повторяют дважды в свежей порции H<sub>2</sub>O. При окраске препаратов красителем SYBR Green I препараты после электрофореза фиксируются в 70 % растворе этанола в течение 15 мин и высушиваются при комнатной температуре.

Для окрашивания «ДНК-комет» этидиум бромидом микропрепараты погружают в кювету с раствором красителя и инкубируют в темном месте при 4 °С не менее 1 ч. Непосредственно перед проведением анализа микропрепарат, выбранный для регистрации «ДНК-комет», промывают в дистиллированной воде 2–3 раза.

Для окраски ДНК-комет SYBR Green I краситель наносят на микропрепарат из расчета 100 мм<sup>3</sup> на площадь 25 мм<sup>2</sup> и проводят окраску в течение 20 мин. По окончании окраски остающийся на микропрепаратах краситель не удаляется.

#### 50.8. Микроскопический анализ.

Микропрепараты анализируют под флуоресцентным микроскопом. Рекомендуемое увеличение x200 – x400.

С каждого микропрепарата рандомизированно анализируется не менее 50 ДНК-комет без наложений хвостов. Получение изображения и обработку данных осуществляют с помощью программно-аппаратного комплекса, включающего в себя высокочувствительную камеру или цифровой фотоаппарат, совмещенные с микроскопом, и специализированное программное обеспечение. В зависимости от имеющегося программного обеспечения анализ параметров ДНК-комет проводится в режиме «реального времени» либо с сохраненных цифровых изображений. В качестве показателя поврежденности ДНК используют % ДНК в хвосте кометы.

51. Статистическая обработка экспериментальных данных проводится по всем повторностям каждой экспериментальной точки путем сравнения показателей поврежденности ДНК в опытной и контрольной группах. Данные двух повторностей объединяются и определяется среднее, если 95 % доверительные интервалы перекрываются.

52. Оценка результатов.

Критериями положительного результата являются статистически достоверное, дозозависимое увеличение показателя поврежденности ДНК или статистически достоверный, воспроизводимый эффект по крайней мере для одной экспериментальной точки. Позитивный результат в данном тесте указывает на то, что исследуемое соединение индуцирует ДНК-повреждения в данном типе клеток в условиях *in vitro*.

## ГЛАВА 8 МИКРОЯДЕРНЫЙ ТЕСТ *IN VITRO* НА КЛЕТКАХ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

53. Микроядерный тест *in vitro* (МЯТ) – метод оценки генотоксичности по выявлению микроядер (МЯ) в цитоплазме интерфазных клеток. Микроядра могут образовывать ацентрические фрагменты хромосом (т. е. с отсутствием центромеры) или целые хромосомы, которые не способны мигрировать к полюсам на стадии анафазы клеточного деления. Таким образом, микроядерный тест *in vitro* является методом, дающим основание для исследования потенциала повреждения хромосом *in vitro*, путем определения кластогенного и анеугенного эффектов в клетках.

54. Для целей исследования используют первичные культуры лимфоцитов периферической крови человека или других млекопитающих и ряд клеточных линий грызунов:

клетки СНО, V79, CHL / IU и L5178Y;

клеточные линии человека, такие как ТК6.

Использование других клеточных линий, таких как HT29, Caco-2, НераRG, НерG2, A549 и первичных клеток эмбрионов сирийского хомяка, должно быть научно обосновано на основе их продемонстрированной эффективности в исследовании.

Лимфоциты периферической крови человека следует отбирать у молодых (приблизительно 18–35 лет), некурящих индивидов без известных заболеваний или недавних воздействий генотоксических агентов. Если клетки от более чем одного донора объединяются для использования, следует указать количество доноров. Культуры клеток поддерживают в

экспоненциальной фазе роста (клеточные линии) или стимулируют к делению (первичные культуры лимфоцитов).

55. Среда и условия культивирования. Для поддержания культур следует использовать подходящую культуральную среду и условия инкубации (культуральная посуда, увлажненный 5 % CO<sub>2</sub>, если это необходимо, температура 37 °С). Клеточные линии следует регулярно проверять на стабильность количества модальных хромосом и отсутствие контаминации микоплазмой. Должна быть установлена нормальная продолжительность клеточного цикла для клеточных линий или первичных культур, используемых в испытательной лаборатории, и она должно соответствовать опубликованным характеристикам клеток.

56. Клетки отбирают из исходных (сток) культур, высевают в культуральную среду с такой плотностью, чтобы клетки в суспензиях или в монослоях продолжали расти в геометрической прогрессии до времени сбора.

Цельную кровь, обработанную антикоагулянтом (например, гепарином), или выделенные лимфоциты культивируют (например, в течение 48 часов для лимфоцитов человека) в присутствии митогена (например, фитогемагглютинина (РНА) для лимфоцитов человека).

При работе с клетками с недостаточной эндогенной метаболической способностью следует использовать систему экзогенной метаболической активации. Обычно Фракция S9 используется в концентрациях от 1 до 2 %, но может быть увеличена до 10 % от конечного объема среды.

57. Растворители. Растворитель следует выбирать так, чтобы оптимизировать растворимость исследуемых химикатов, не оказывая неблагоприятного воздействия на проведение анализа, то есть на изменение роста клеток, на целостность исследуемого химического вещества, на реакцию с культуральными сосудами, на нарушение системы метаболической активации. Рекомендуется, если возможно, в первую очередь использовать водные растворы (или культуральные среды). Хорошо известными растворителями являются вода или диметилсульфоксид (ДМСО). Обычно органические растворители не должны превышать 1 %. Если ЦХВ (цитохалазин В) растворяется в ДМСО, общее количество органического растворителя, используемого для испытуемого химического вещества и ЦХВ, не должно превышать 1%. Водные растворители (физиологический раствор или вода) не должны превышать 10 % в конечной среде обработки.

58. Использование ЦХВ как блокатора цитокинеза. Одним из важнейших моментов проведения МЯТ является обеспечение того, что анализируемые клетки прошли митоз во время обработки или в период инкубации после обработки, если его использовали в методике. Поэтому

подсчет микроядер может быть ограничен клетками, которые прошли митоз во время или после воздействия. ЦХВ вещество, которое наиболее широко используется для блокирования цитокинеза. ЦХВ не является обязательным для других типов клеток, если можно установить, что они подверглись делению. Кроме того, ЦХВ обычно не используется, когда образцы оцениваются на микроядра с использованием методов проточной цитометрии.

Необходимые концентрации ЦХВ следует определить в лаборатории для каждого типа клеток, чтобы достичь оптимальной частоты двуядерных клеток в контрольных культурах с растворителем, и показать, что она дает хороший оценивающий результат двуядерных клеток. Подходящая концентрация ЦХВ обычно составляет от 3 до 6 мкг/мл.

59. Измерение клеточной пролиферации и цитотоксичности и выбор концентраций для воздействия. При определении максимальной исследуемой концентрации вещества следует избегать концентраций, которые могут вызвать искусственный положительный ответ, вызывая сильную цитотоксичность, преципитацию в культуральной среде или заметные изменения рН или осмотической концентрации.

Цитотоксичность следует определять в основном эксперименте с метаболической активацией и без нее, используя соответствующие индикаторы гибели и роста клеток.

60. Обработка культур ЦХВ и определение относительных частот одноядерных, двухъядерных и многоядерных клеток в культуре является точным методом установления количественного эффекта воздействия на клеточную пролиферацию, цитостатическую и цитотоксическую активность, и гарантирует, что только клетки, которые делятся во время или после обработки, оцениваются под микроскопом.

Количественная оценка цитостатической/цитотоксической активности воздействия проводится путем сравнения значений индекса пролиферации при цитокинезном блоке (СВРІ) или индекса репликации (RІ) не менее 500 клеток на культуру в экспериментальных и контрольных культурах. Оценка других показателей цитотоксичности (например, слияние клеток, апоптоза, некроза, подсчета метафаз, клеточного цикла) используется в дополнение к СВРІ или RІ.

61. Оценивается не менее трех экспериментальных концентраций, отвечающих критериям приемлемости (соответствующая цитотоксичность, количество клеток и т. д.). Могут использоваться как реплицированные, так и отдельно обработанные культуры в каждой протестированной концентрации. Для исследуемых химикатов с небольшой или нулевой цитотоксичностью, 2–3 кратные интервалы концентрации обычно являются приемлемыми.

Выбранные тестовые концентрации должны охватывать диапазон от концентрации, вызывающей цитотоксичность и включая концентрации, при которых наблюдается умеренная/незначительная цитотоксичность или совсем отсутствует.

62. Для веществ, у которых выявляется крутая зависимость концентрация-эффект для получения данных с низкой и умеренной цитотоксичностью, необходимо использовать более узкий интервал между концентрациями и / или более трех концентраций, в частности, в ситуациях, когда требуется повторный эксперимент.

63. Наибольшая концентрация должна вызывать цитотоксичность на уровне  $55 \pm 5 \%$  с использованием рекомендуемых параметров цитотоксичности. Следует проявлять осторожность при интерпретации положительных результатов, обнаруженных только в верхней части этого диапазона цитотоксичности  $55 \pm 5 \%$ .

64. Для малорастворимых исследуемых химикатов, не обладающим цитотоксичностью при концентрациях ниже предела растворимости, анализируемая наибольшая концентрация должна давать помутнение или осадок после воздействия, видимый на глаз или с помощью инвертированного микроскопа. Даже если цитотоксичность проявляется выше предела растворимости, рекомендуется проводить исследование только при одной концентрации, вызывающей помутнение, или видимый осадок, поскольку в результате осадка могут возникать артефактные эффекты.

Если цитотоксичность или преципитация не наблюдаются, максимальная исследуемая концентрация должна составлять 10 мМ, 2 мг/мл или 2 мкл/мл, выбирая из них наименьшую.

65. Контроли. Одновременные отрицательные контроли, состоящие из одного растворителя в среде обработки и обработанные так же, как и культуры обработки, должны быть включены в каждый опыт.

Для подтверждения способности лаборатории выявлять кластогены и анеугены в условиях используемого протокола испытаний и эффективность системы экзогенной метаболической активации требуется одновременный положительный контроль. Примеры эталонных веществ, рекомендованных для лабораторных квалификационных исследований и для выбора положительных контролей в микроядерном тесте *in vitro*, приведены в приложении 2 к настоящей Инструкции. При обосновании можно использовать другие вещества для позитивного контроля.

66. Схема обработки. Все виды обработки культуры должны начинаться и заканчиваться в период, когда клетки растут экспоненциально и клетки должны продолжать рост до момента отбора проб. Для лимфоцитов наиболее эффективный период воздействия исследуемым

химическим веществом составляет 44–48 ч после стимуляции РНА, в период асинхронного деления клеток.

67. Для детальной оценки, необходимой для заключения об отрицательном результате, должны выполняться три условия:

клетки должны подвергаться воздействию испытываемого химического вещества без метаболической активации в течение 3–6 часов и отбираться через период времени, соответствующий 1,5–2,0 нормальной продолжительности клеточного цикла после начала обработки;

клетки должны подвергаться воздействию исследуемого химического вещества с метаболической активацией в течение 3–6 часов и через период времени, соответствующий 1,5–2,0-кратным нормальным продолжительностям клеточного цикла после начала обработки;

клетки должны непрерывно подвергаться воздействию без метаболической активации до отбора проб в течении времени равного 1,5–2,0 нормальным продолжительностям клеточного цикла.

В случае, если любое из вышеупомянутых экспериментальных условий приводит к положительному ответу, можно не исследовать другие схемы обработки.

68. Фиксация клеток и приготовление препаратов. Приготовление препаратов может включать гипотоническую обработку, но этот этап не является необходимым, если по иным причинам достигнуто соответствующее распределение клеток.

При приготовлении предметных стекол можно использовать различные методы при условии получения качественных клеточных препаратов для оценки. Должна сохраняться цитоплазма клеток, чтобы определить микроядра и (при методе блока цитокинеза) реально идентифицировать двуядерные клетки.

69. Можно использовать различные методы окраски препаратов, такие как Гимза или специфические к ДНК флуоресцентные красители. Использование специфичных флуоресцентных красителей (например, акридин оранж или Hoechst 33258 плюс пиронин-У может убрать ряд артефактов, связанных с применением не специфичных к ДНК красителям.

В культурах с ЦХВ для оценки частоты микроядер следует анализировать не менее 2000 двуядерных клеток на каждую концентрацию и контроль, в равной степени разделенных между повторностями, если используются повторы. В опытах с одной культурой на дозу, следует анализировать не менее 2000 двуядерных клеток на концентрацию. Возможен подсчет одноядерных клеток, если показано, что исследуемое вещество влияет на активность ЦХВ.

В опытах с клеточными линиями без ЦХВ, микроядра анализируют не менее 2000 клетках на концентрацию и контроль.

70. Представление результатов. Если используется цитокинезный блок, то для оценки индукции микроядер используется только частота двуядерных клеток с микроядрами (независимо от числа микроядер на клетку).

Параллельно следует проводить оценку цитотоксичности и/или цитостатичности во всех обработанных и контрольных с растворителем/разбавителем культурах. Необходимо рассчитать СВРІ или RІ для всех обработанных и контрольных культур, как показатель задержки клеточного цикла при использовании ЦХВ. В отсутствии ЦХВ, следует использовать RPD или RІСС.

71. Оценка и интерпретация результатов.

При условии соблюдения критерия приемлемости, исследуемое химическое вещество считается мутагенным, если:

хотя бы одна из тестируемых концентраций химического вещества демонстрирует статистически значимое увеличение доли микроядер по сравнению с отрицательным контролем;

наблюдается дозозависимое увеличение количества микроядер хотя бы в одной временной экспериментальной точке;

Тестируемое химическое вещество не обладает мутагенными свойствами в микроядерном тесте, если во всех исследованных экспериментальных условиях:

ни одна из тестируемых концентраций не демонстрирует статистически значимого увеличения количества микроядер по сравнению с отрицательным контролем;

отсутствует дозозависимое увеличение количества микроядер по сравнению с отрицательным контролем;

все результаты микроядерного теста должны быть в пределах исторического контроля лаборатории.

В случае получения сомнительных результатов эксперимент может быть повторен, возможно, с использованием модифицированных экспериментальных условий.

## **ГЛАВА 9**

### **ТЕСТ НА НЕОПЛАСТИЧЕСКУЮ ТРАНСФОРМАЦИЮ КЛЕТОК ГРЫЗУНОВ В КУЛЬТУРЕ**

72. Принцип метода на неопластическую трансформацию клеток грызунов в культуре заключается в выявлении способности испытуемого соединения превращать в культуре клеток грызунов нормальные клетки в злокачественные. Метод основан на том, что в системе быстро размножающихся соматических клеток малигнизирующие способности

канцерогенов проявляются быстрее, чем в организме, где имеется иммунологический надзор.

73. В качестве тест-объекта используются первичные культуры клеток грызунов (например, клетки сирийского хомяка *Mesocricetus auratus*) и перевиваемые клеточные линии.

Культуры соматических клеток длительно пассируют на среде, содержащей тестируемое соединение. Клетки, не обладающие собственной системой метаболической активации, выращивают на монослое облученных клеток с высокой активностью метаболизирующих ферментов, или обрабатывают смесью S9 из постмитохондриальной фракции печени крыс. Эмбриональные клетки первых пассажей от эмбрионов третьего триместра беременности также пригодны, но спектр активирующих цитохромов у них ограничен.

74. Колонии трансформированных клеток морфологически отличаются от нормальных по внешнему виду и ростовым потребностям, а также по способности давать опухоли при перевивке сингенным животным. Сравнивают количество трансформированных колоний в культурах, обработанных тестируемым соединением, со спонтанным уровнем.

75. Для изучения канцерогенности испытуемого вещества в качестве максимальной используется минимальная ингибирующая рост и деление клеток концентрация, установленная в предварительном тесте на цитотоксичность.

76. Водорастворимые вещества непосредственно перед опытом растворяются в культуральной среде. Нерастворимые в воде вещества обычно растворяют в диметилсульфоксиде.

77. В каждом эксперименте необходимо наличие контролей. Негативный контроль: необработанная культура и растворитель. В качестве позитивного контроля может быть использован 20-метилхолантрен либо другой известный канцероген, предпочтительно того же ряда, что и тестируемое соединение, испытанный ранее в культуре клеток.

78. Проведение эксперимента. В чашки Петри диаметром 50–60 мм или в 4-луночный планшет высевают от 300 до 1000 клеток-мишеней и через 24 часа добавляют испытуемое вещество в концентрациях с шагом 1/2, с максимальной концентрацией, которая оказалась минимально токсичной в тесте на цитотоксичность. Контролями служат чашки с растворителем а максимальной для данной серии концентрации (в случае ДМСО не более 0,5 %), чашки без какого-либо воздействия и чашки с заранее известным канцерогеном в работающей концентрации (положительный контроль).

При работе с эмбриональными клетками хомяка, клетки выращивают в течение 9 суток без замены среды, после чего культуру отмывают любым

солевым раствором и окрашивают принятым в лаборатории методом. При работе с клетками иммортализованных клепочных линий, культуру отмывают от канцерогена через 24–48 ч или позже, а затем клетки культивируют 4–6 недель без пересева, сменяя среду 1–2 раза в неделю. После этого чашки промывают и окрашивают как и в тесте с использованием эмбриональных клеток хомяка.

79. Данные представляют в виде количества трансформированных колоний на чашку. Для тестируемого соединения, позитивных и негативных контролей указывают число колоний для каждой чашки, среднее количество трансформированных колоний для каждой чашки и стандартное отклонение.

Все результаты должны быть подтверждены в независимом эксперименте.

80. Оценка результатов.

О трансформирующем действии испытуемого вещества судят по характеру колоний клеток или очагов роста. Колонии трансформированных клеток распознают по их монослойному росту, отсутствию однонаправленной ориентированности. Такие колонии состоят из резко поляризованных, перекрещивающихся, расположенных в несколько слоев клеток. Окраска их более интенсивна за счет многослойности. Клеточные штаммы, полученные из клеток таких линий, обладают пониженной чувствительностью к концентрации сыворотки в культуральной среде, образуют колонии в полужидком агаре, а при прививке сингенным животным приводят к росту у этих животных опухолей.

Показателем активности испытуемого вещества является соотношение колоний трансформированных клеток и нетрансформированных клеток.

Критериями позитивного результата являются или статистически достоверное, зависимое от дозы, увеличение количества трансформированных колоний, или воспроизводимый и статистически достоверный позитивный ответ по крайней мере для одной экспериментальной точки.

81. Интерпретация результатов. Тестируемое соединение, не вызывающее статистически достоверного, зависимого от дозы увеличения количества трансформированных колоний или воспроизводимого и статистически достоверного позитивного ответа для какой-либо экспериментальной точки, рассматривается как неканцерогенное в данном тесте.

## ГЛАВА 10

## ОЦЕНКА ПОТЕНЦИАЛЬНОЙ КАНЦЕРОГЕННОСТИ И МУТАГЕННОСТИ ВЕЩЕСТВ В ТЕСТАХ *IN VITRO*

82. При оценке результатов тестирования исходят из того, что положительный эффект имеет большую прогностическую значимость, чем отрицательный. Интегральный положительный результат системы тестов *in vitro* с гораздо большей степенью вероятности свидетельствует о потенциальной канцерогенной опасности вещества, чем общий отрицательный результат – о ее полном отсутствии.

### 83. Этап 1.

Для прогноза мутагенности и канцерогенности существенное значение имеют результаты, полученные в системе мутагенной оценки при учете генных мутаций (на бактериях) и хромосомных aberrаций.

В случае получения положительных результатов в обоих тестах (и в тесте Эймса, и в тесте на индукцию хромосомных aberrаций) делается заключение о наличии мутагенного и канцерогенного действия у исследуемого химического вещества. В остальных случаях необходимо проведение уточняющих экспериментов (этап 2).

### 84. Этап 2.

На втором этапе в дополнение к проведенным тестам на генные мутации и хромосомные aberrации проводятся дополнительные исследования, среди которых наиболее информативными являются учет повреждений ДНК (тест ДНК-комет и SOS-хромотест у бактерий) и микроядерный тест *in vitro*.

### 85. Интерпретация результатов.

В случае получения отрицательных результатов во всех тестах первого и второго этапов тестирования, делается заключение об отсутствии канцерогенной и/или мутагенной опасности.

В случае получения положительных результатов как минимум в двух тестах (в общей сложности на 1-м и 2-м этапах) дальнейшие исследования прекращают, делается заключение о наличии канцерогенной и мутагенной опасности.

Для отдельных групп химических веществ (например, прогнозируемого гормоноподобного действия), несмотря на отрицательные ответы во всех использованных тестах, может оказаться необходимым применение одного из прямых экспресс-тестов на опухолеобразование: неопластическую трансформацию клеток в культуре.

В случаях одного положительного результата переходят к следующему этапу исследований. Стратегия работы на этом этапе связана с подтверждением или отрицанием способности исследуемого препарата

индуцировать определенный тип генетических эффектов, выявленный на первых этапах. Исследование проводится на тест-системах *in vivo*.

Приложение 1  
к Инструкции по применению  
«Методы оценки мутагенного и  
канцерогенного действия химических  
веществ в тестах *in vitro*»

**ВЕЩЕСТВА ДЛЯ ПОЗИТИВНЫХ КОНТРОЛЕЙ В РАЗЛИЧНЫХ  
ВАРИАНТАХ ТЕСТА ЭЙМСА**

<b>Вещество</b>	<b>Тест-штамм</b>
<b>С метаболической активацией:</b>	
2-аминоантрацен	<i>Salmonella typhimurium</i> TA 1535, TA 1536, TA 1537, TA 97, TA 97a, TA 100, TA 98, TA 102.
7,12-диметилбенз[а]антрацен	
9,10-диметилантрацен	
Бензо[а]пирен	
Циклофосфамид	
Циклофосфамид моногидрат	
<b>Без метаболической активации:</b>	
2-нитрофлуарен	<i>Salmonella typhimurium</i> TA 98
9-аминоакридин	<i>Salmonella typhimurium</i> TA 1537, TA 97 и TA 97a
Азид натрия	<i>Salmonella typhimurium</i> TA 1535, TA 100
Кумен гидропероксид	<i>Salmonella typhimurium</i> TA 102
Митомицин С	<i>Salmonella typhimurium</i> TA 102
Фурилфурамид (AF2)	Плазмидосодержащие штаммы
ICR 191	<i>Salmonella typhimurium</i> TA 1537, TA 97 и TA 97a

Приложение 2

К Инструкции по применению  
«Методы оценки мутагенного и  
канцерогенного действия химических  
веществ в тестах *in vitro*»

**ЭТАЛОННЫЕ ВЕЩЕСТВА, РЕКОМЕНДОВАННЫЕ ДЛЯ  
ЛАБОРАТОРНЫХ КВАЛИФИКАЦИОННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ И  
ДЛЯ ВЫБОРА ПОЛОЖИТЕЛЬНЫХ КОНТРОЛЕЙ В  
МИКРОЯДЕРНОМ ТЕСТЕ *IN VITRO***

<b>Категория</b>	<b>Вещество</b>	<b>CAS N</b>
Анеугены	Винбластин	143-67-9
	Колхицин	64-86-8
Кластогены, активные без метаболической активации	4-нитрохинолин-N-оксид	56-57-5
	Метилметансульфонат	66-27-3
	Митомицин С	50-07-7
	Цитозинарабинозид	147-94-4
Кластогены, требующие метаболической активации	Бензо(а)пирен	50-32-8
	Циклофосфамид	50-18-0