

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

«УТВЕРЖДАЮ»
Заместитель Министра
здравоохранения – Главный
государственный санитарный
врач Республики Беларусь



Н.П. Жуковс
2016 г.
Регистрационный № 055-1215

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

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК: Республиканское унитарное
предприятие «Научно-практический центр гигиены»

АВТОРЫ: к.м.н. Юркёзич Е.С., к.м.н. Ильюкова И.И., Борис О.А.,
Попель А.А., к.б.н. Войтович А.М., 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 № 055-1215

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ МУТАГЕННОГО 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, А.А. Попель, канд. биол. наук А.М. Войтович, В.А. Грынчак

Минск 2015

ГЛАВА 1 ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

1. В настоящей инструкции по применению (далее — инструкция) изложены гармонизированные с международными требованиями (OECD TG № 474 «Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test» / ОЭСР Руководство № 474 «Микроядерный тест на эритроцитах млекопитающих», OECD TG № 475 «Mammalian Bone Marrow Chromosome Aberration Test» / ОЭСР Руководство № 475 «Метод оценки хромосомных aberrаций в клетках костного мозга млекопитающих», OECD TG № 473 «*In vitro* Mammalian Chromosome Aberration Test» / ОЭСР Руководство № 473 «Метод оценки хромосомных aberrаций в клетках млекопитающих *in vitro*») методы оценки мутагенного действия химических веществ и их смесей, 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.

2. Настоящая инструкция устанавливает подходы, схемы и методы, предназначенные для проведения исследований по изучению мутагенного действия веществ на клетках млекопитающих *in vivo* и *in vitro*, позволяет оценить мутагенные эффекты химического вещества и минимизировать риск воздействия химического фактора на здоровье человека.

3. Методы, изложенные в настоящей инструкции, предназначены для специалистов организаций здравоохранения, осуществляющих государственный санитарный надзор, иных учреждений, реализующих мероприятия по медицинской профилактике неблагоприятного воздействия химической продукции на здоровье человека.

ГЛАВА 2 ТЕРМИНЫ И ОПРЕДЕЛЕНИЯ

В настоящей инструкции используются следующие термины и определения:

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

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

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

- митотический индекс — отношение числа клеток в метафазе к общему

числу клеток в наблюдаемой клеточной популяции; показатель степени пролиферации в данной клеточной популяции;

- нормохромный эритроцит — зрелый эритроцит, в котором отсутствуют рибосомы, отличающийся от незрелого, полихроматофильного эритроцита при селективном окрашивании на рибосомы;

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

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

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

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

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

- 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;

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

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

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

ГЛАВА 3 ОБЩИЕ УСЛОВИЯ ПРОВЕДЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЙ

1. До испытаний проводят анализ существующей информации по исследуемому веществу, включающий сведения о составе и химическом строении, физико-химических свойствах, результатах токсикологических испытаний *in vivo* и *in vitro*, токсикологические данные о структурно родственных веществах и оценку предполагаемых путей использования вещества. Полученная информация служит подтверждением необходимости проведения исследований и способствует выбору адекватной начальной дозы.

2. Твердые соединения растворяют или суспендируют в соответствующем растворителе и разводят, если необходимо, перед использованием. Жидкие вещества вводят непосредственно или разводят перед введением. Растворы исследуемых веществ следует хранить при соответствующих условиях и, если перед применением их стабильность не будет доказана, использовать свежие растворы.

3. Растворитель/разбавитель не должен оказывать токсическое действие при использованных уровнях доз (концентраций) и вступать в реакцию с исследуемым веществом. Использование малоизвестного растворителя/разбавителя следует обосновать данными о его совместимости с исследуемым веществом. Предпочтительно использовать водные растворы.

4. Приготовление растворов, подготовку проб и проведение исследований осуществляют при следующих условиях: температура окружающего воздуха $(20\pm 5)^{\circ}\text{C}$; относительная влажность воздуха не более 80% при $T = 25^{\circ}\text{C}$; атмосферное давление 84,0–106,7 кПа (630–800 мм рт. ст.).

5. 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. Эксперименты с лабораторными животными, культурами клеток 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

МИКРОЯДЕРНЫЙ ТЕСТ НА ЭРИТРОЦИТАХ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

1. Микроядерный тест на млекопитающих *in vivo* (OECD TG № 474) используют для выявления индукции исследуемым веществом нарушений хромосом или митотического аппарата эритробластов при анализе эритроцитов в костном мозге или периферической крови животных, обычно грызунов.

Цель микроядерного теста — идентифицировать вещества, вызывающие цитогенетические нарушения, которые формируют микроядра, содержащие отставшие фрагменты хромосом или целые хромосомы.

2. При формировании в костном мозге из эритробласта полихроматофильного эритроцита ядро выталкивается из клетки. Любые образовавшиеся микроядра могут остаться в денуклеированной цитоплазме.

Микроядра в этих клетках легко визуализируются из-за отсутствия в них ядра. Повышение частоты полихроматофильных эритроцитов с микроядрами у экспериментальных животных является показателем индуцированных нарушений хромосом.

3. Обычно исследуют костный мозг грызунов, поскольку полихроматофильные эритроциты образуются в этой ткани. Анализ незрелых (полихроматофильных) эритроцитов с микроядрами в периферической крови также приемлем у любых видов, у которых селезенка не способна элиминировать эритроциты с микроядрами, или для которых показана адекватная чувствительность в выявлении соединений, вызывающих структурные или численные нарушения хромосом. Микроядра можно различать по ряду критериев. Они включают идентификацию присутствия или отсутствия кинетохора или ДНК центромер в микроядре. Частота незрелых (полихроматофильных) эритроцитов — принципиальный показатель теста. Доля зрелых (нормохромных) эритроцитов с микроядрами в периферической крови от проанализированного числа зрелых эритроцитов также может быть использована как показатель, если обработка животных длится 4 и более недель.

Микроядерный тест на млекопитающих *in vivo* особенно адекватен при оценке мутагенной опасности, поскольку позволяет учесть такие факторы, как метаболизм, фармакокинетику вещества, процессы репарации ДНК, хотя они могут варьировать от вида к виду, в разных тканях и для разных генетических событий. Тест *in vivo* также полезен при дальнейшей оценке мутагенного эффекта, выявленного в тест-системах *in vitro*.

Этот тест не подходит для оценки, если установлено, что вещество или активный метаболит не достигают ткани-мишени.

4. *Принцип метода.* Животных подвергают воздействию исследуемого соединения, используя соответствующий путь введения. При работе с костным мозгом животных умерщвляют через определенный интервал времени после введения, выделяют костный мозг, готовят препараты и окрашивают их. При работе с периферической кровью, ее берут через определенный интервал времени после воздействия, готовят мазки и проводят окраску.

5. *Материалы.* Выбор животных. Работа с костным мозгом осуществляется у мышей или крыс, хотя могут использоваться и другие виды млекопитающих. При работе с периферической кровью рекомендуются мыши. Может быть использован любой другой вид млекопитающих, если показано, что у животных этого вида селезенка не элиминирует эритроциты с микроядрами, а также этот вид одинаково чувствителен при определении соединений, индуцирующих структурные и численные нарушения хромосом. Обычно используют молодых здоровых лабораторных животных. В начале исследования колебания массы животных должны быть минимальны, не превышая 20% средней массы животных каждого пола.

6. *Условия содержания и кормления.* Температура в экспериментальных комнатах вивария должна быть $22 \pm 3^\circ\text{C}$. Относительная влажность должна быть

не ниже 30% и не превышать 70% во время уборки, оптимально 50–60%. Освещение искусственное; световой режим: 12 ч освещения, 12 ч темноты. Может быть использована стандартная лабораторная диета без ограничения питьевой воды. На выбор диеты может влиять необходимость приготовления особой смеси корма при введении вещества с кормом. Животных содержат в клетках индивидуально или небольшими группами одного пола.

7. *Подготовка животных к исследованию.* Методом случайного отбора формируют контрольные и экспериментальные группы здоровых молодых животных. Каждое животное идентифицируют. Животных акклиматизируют к лабораторным условиям, по крайней мере, в течение 5 дней. Клетки располагают таким образом, чтобы минимизировать возможные эффекты вследствие их расположения.

8. *Контроли.* Соответствующие положительные и отрицательные (растворитель/разбавитель) контроли должны быть в каждом опыте для каждого пола. За исключением обработки тестируемым веществом животные контрольных групп должны находиться в тех же условиях, что и экспериментальные животные.

Соединения положительного контроля при выбранных уровнях экспозиции должны индуцировать значимое повышение уровня микроядер над контролем. Дозы положительного контроля следует подбирать так, чтобы был четкий эффект, но его уровень в то же время не позволял исследователю определить зашифрованное животное группы положительного контроля. Допускается введение положительного контроля путем, отличающимся от введения исследуемого вещества, и использование одного времени введения. Когда необходимо, возможно в качестве положительного контроля использовать вещество, по химическому классу сходное с известным веществом положительного контроля. Примеры веществ положительного контроля приведены в приложении 1.

Пока приемлемая вариабельность и частота клеток с микроядрами не будет показана по данным исторического контроля, в группе отрицательного контроля (контроль с растворителем/разбавителем) обработка животных проводится тем же путем и в том же режиме, что и экспериментальных животных. Если в группе отрицательного контроля делается однократное введение, наиболее подходящим является первое время забоя. Дополнительно контрольную группу без обработки следует также использовать до тех пор, пока исторические или опубликованные данные не покажут, что выбранный растворитель не индуцирует вредного или мутагенного эффекта.

При анализе периферической крови проба до обработки может быть также приемлема в качестве соответствующего отрицательного контроля, но лишь в случае коротких периодов воздействия (1–3-кратные введения), когда ожидают, что данные будут в пределах колебаний исторического контроля.

9. *Число и пол животных.* В каждой экспериментальной и контрольной группе должно быть не менее 5 животных каждого пола. Если ко времени проведения исследования имеются данные работ на том же виде животных и при той же схеме введения, которые показывают на отсутствие существенных

различий в токсичности между полами, тогда достаточно опыта на одном поле животных. Если у человека экспозиция веществом специфична для разных полов, например, для ряда лекарств, эксперимент может быть проведен на животных соответствующего пола.

10. *Схема введения.* Не может быть рекомендована стандартная схема затравки (т. е. 1, 2 и более введений с 24-часовым интервалом). Пробы при длительных режимах введения доз приемлемы, если положительный эффект был показан в работе, или при отрицательном ответе была выявлена токсичность, или использована максимальная доза и введение вещества проведено до времени отбора пробы. Исследуемое вещество можно вводить в дробных дозах, т.е. 2 введения в тот же день, разделенных по времени не более чем на несколько часов, чтобы ввести большой объем материала.

11. Эксперимент может быть проведен 2 способами:

а) животных обрабатывают однократно. Пробы отбирают, по крайней мере, 2 раза, начиная не ранее 24 ч после введения, но не превышая 48 ч после введения с соответствующим интервалом между пробами. Использование времени забоя менее 24 ч после введения должно быть обосновано. Пробы периферической крови также отбирают по крайней мере дважды, начиная не ранее 36 ч после введения с соответствующим временным интервалом после первой пробы, но не превышая 72 ч после введения. При выявлении положительного ответа при одном интервале времени забора пробы дополнительные интервалы времени для забора проб не требуются;

б) при режимах 2 и более ежедневных введений (т. е. два и более введения с интервалом 24 ч) пробу отбирают между 18–24 ч после последнего введения для костного мозга и между 36–48 ч после последнего введения для периферической крови.

Другие интервалы времени отбора проб могут быть использованы как дополнительные, когда это необходимо.

12. *Уровни доз.* Если проводится ряд исследований и нет подходящих данных, то эксперимент должен быть проведен в той же лаборатории, используя те же виды, линии, пол, режим обработки, которые были в основном исследовании. Если выявлена токсичность, то для первого срока забоя тестируют 3 дозы. Их диапазон должен быть в пределах от максимальной до минимальной токсичности или отсутствия токсичности. При более поздних сроках забоя необходимо использовать лишь максимальную дозу. Максимальную дозу определяют как дозу, вызывающую такие признаки токсичности, что при повышении доз при том же режиме затравки ожидается летальный эффект. Вещества со специфической биологической активностью при низких нетоксических дозах (такие как гормоны и митогены) могут быть исключением для критериев установления уровня доз, и дозы необходимо подбирать в каждом конкретном случае. Максимальная доза может также быть определена как доза, вызывающая ряд признаков токсичности в костном мозге (например, снижение доли незрелых эритроцитов от общего числа эритроцитов в костном мозге или периферической крови).

13. *Ограничения теста.* Если доза около 2000 мг/кг массы тела при однократном режиме воздействия или 2 введениях в один день не вызывает токсического эффекта, и если генотоксичность не предполагают по результатам исследований со структурно связанными соединениями, то полную схему исследований с использованием 3 уровней доз можно не проводить.

14. *Введение вещества.* Исследуемое вещество обычно вводят внутрижелудочно, используя желудочный зонд или подходящую интубационную канюлю, или внутривентриально. Возможно применение других способов введения при их обосновании. Максимальный объем жидкости, который вводят внутрижелудочно или путем инъекции, зависит от размеров экспериментальных животных. Обычно объем не превышает 2 мл на 100 г массы тела. Использование больших объемов должно быть обосновано. Исключения составляют раздражающие и разъедающие вещества, которые вызывают раздражающий эффект в высоких концентрациях. Вариации вводимых объемов должны быть минимизированы путем приготовления концентраций растворов, позволяющих вводить постоянный объем для всех 3 уровней доз.

15. *Приготовление препаратов костного мозга/периферической крови.* Клетки костного мозга обычно получают из бедренной или большой берцовой кости сразу после забоя. Клетки выделяют из бедренной или большой берцовой кости, готовят препараты и окрашивают, используя стандартные методы. Периферическую кровь берут из хвостовой вены или других кровеносных сосудов. Клетки крови окрашивают суправитально или делают мазок и затем окрашивают. Использование специфических красителей ДНК [акридиновый оранжевый или Hoechst 33258 плюс пиронин-У] могут элиминировать ряд артефактов, связанных с окрашиванием красителями, не специфичными к ДНК. Эти преимущества не мешают использованию обычных красителей (т. е. Гимза). Дополнительные системы [например, колонки с целлюлозой для удаления клеток, содержащих ядра] могут также применяться при условии, если было показано, что эти системы адекватно работают в лаборатории при учете микроядер.

16. *Микроскопический анализ.* Доля незрелых эритроцитов от общего (незрелые + зрелые) их числа определяется для каждого животного при подсчете по крайней мере 200 эритроцитов для костного мозга и 1000 — для периферической крови. Все препараты, включая отрицательный и положительный контроли, обязательно шифруют перед микроскопическим анализом. Минимум 2000 незрелых эритроцитов на животное анализируют для учета незрелых эритроцитов с микроядрами. Дополнительная информация может быть получена при подсчете зрелых эритроцитов с микроядрами. При анализе препаратов доля незрелых эритроцитов от общего числа эритроцитов должна быть не менее 20% от контрольного уровня. При затравке животных в течение 4 и более недель не менее 2000 зрелых эритроцитов на животное анализируют при учете микроядер. Системы автоматического анализа (анализ изображения и проточная цитометрия) — допустимая альтернатива традиционному анализу, если они обоснованы и валидированы.

17. *Обработка результатов.* Данные по каждому животному следует представлять в табличной форме. Экспериментальной единицей является животное. У каждого животного подсчитывают число незрелых эритроцитов, число незрелых эритроцитов с микроядрами, число незрелых эритроцитов от общего числа эритроцитов. При постоянной затравке в течение 4 недель и более также приводят данные о зрелых эритроцитах, если их подсчитывают. Долю незрелых эритроцитов от общего числа, и если считается необходимым, процент эритроцитов с микроядрами приводят по каждому животному. Если нет данных о различии показателей между животными разного пола, их можно объединить для статистического анализа.

18. *Оценка и интерпретация результатов.* Имеется несколько критериев определения положительного результата: зависимое от дозы повышение числа клеток с микроядрами или четкий рост количества клеток с микроядрами в одной дозовой группе при одном временном варианте эксперимента. Биологическая обоснованность результата должна приниматься во внимание в первую очередь. Для оценки результатов дополнительно используются статистические методы. Статистическая значимость не является единственным критерием для доказательства положительного ответа. Сомнительные (противоречивые) результаты следует проверять при дальнейшем тестировании преимущественно при использовании модифицированных экспериментальных условий.

Вещество, которое не соответствует вышеприведенным критериям, считается не мутагенным в данном тесте.

Обычно в большинстве экспериментов получают четко положительные или отрицательные результаты, только в редких случаях полученные данные не позволяют сделать однозначное заключение об активности исследуемого вещества. Результаты могут оставаться противоречивыми или сомнительными независимо от числа проведенных повторов. Положительные результаты в микроядерном тесте показывают, что вещество индуцирует микроядра, которые являются результатом хромосомных нарушений или повреждений митотического аппарата эритробластов у данного вида. Отрицательные результаты указывают, что при данных условиях эксперимента вещество не индуцирует микроядра в незрелых эритроцитах у исследованного вида.

Должна быть обсуждена вероятность, что испытуемое вещество или его метаболиты попадают в систему кровообращения или специфически в ткани-мишени (т.е. системная токсичность).

19. Отчет должен включать следующую информацию:

Исследуемое соединение: идентификационные данные и номер CAS, если известен; физическая природа и чистота; физико-химические параметры, имеющие значимость для данного исследования; стабильность веществ.

Растворитель/разбавитель: обоснование выбора растворителя; растворимость и стабильность исследуемого вещества в растворителе, если известно.

Животные: вид и линии животных; число животных, возраст и пол; откуда получены животные, условия содержания и кормления и т. д.; масса

каждого животного в начале опыта, включая для каждой группы колебания массы тела, среднее и стандартное отклонение.

Условия эксперимента: данные о положительном и отрицательном (растворитель/разбавитель) контроле; данные опыта о выборе диапазона доз (если проводили); обоснование выбора доз; детальное описание приготовления вещества; детальное описание введения вещества; обоснование пути введения вещества; методы для верификации того, что вещество циркулирует в организме или достигло ткани-мишени (если использовались); пересчет концентрации исследуемого вещества в питьевой воде или пище в дозу вещества (мг/кг массы тела в день) (если это проводили); детальное описание качества пищи или воды; детальное описание схемы обработки и забора материала; методы приготовления препаратов; методы оценки токсичности; критерии учета незрелых эритроцитов с микроядрами; число анализируемых клеток на животное; критерии учета вещества как положительное, отрицательное или сомнительное.

Результаты: признаки токсичности; доля незрелых эритроцитов от общего числа эритроцитов; число незрелых эритроцитов с микроядрами отдельно по каждому животному; среднее \pm стандартное отклонение для незрелых эритроцитов с микроядрами на группу; оценка зависимости эффекта от дозы, где это возможно; статистический анализ и использованные методы; данные об отрицательном контроле в опыте и исторические данные об отрицательном контроле; данные о положительном контроле.

Обсуждение результатов. Заключение.

ГЛАВА 5 МЕТОД ОЦЕНКИ ХРОМОСОМНЫХ АБЕРРАЦИЙ В КЛЕТКАХ КОСТНОГО МОЗГА МЛЕКОПИТАЮЩИХ

1. Метод оценки хромосомных aberrаций в клетках костного мозга млекопитающих *in vivo* (OECD TG № 475) используют для анализа структурных aberrаций хромосом, индуцированных исследованным соединением.

2. Имеется два типа aberrаций хромосом: хроматидные и хромосомные. Возрастание полиплоидии указывает на возможность индукции веществом нарушений числа хромосом. Подавляющее большинство химических мутагенов индуцирует aberrации хроматидного типа. В то же время возможно увеличение aberrаций хромосомного типа. Хромосомные мутации и связанные с ними события являются причиной многих генетических болезней человека. Имеются четкие данные, что хромосомные мутации и связанные с ними события, вызывающие нарушения в онкогенах и генах опухолевых супрессорах, вовлечены в процесс канцерогенеза у человека и экспериментальных тест-систем.

3. Обычно опыты ставят на грызунах. Тканью-мишенью является костный мозг, поскольку это высоковазулизируемая ткань, содержащая популяцию быстро делящихся клеток, которые можно легко выделить

и с которыми легко работать. Другие виды животных и ткани-мишени не являются предметом рассмотрения в данном документе.

Данный метод особенно подходит при оценке опасности мутагенов, т. к. опыт *in vivo* позволяет учесть такие факторы, как метаболизм, фармакокинетика и процессы репарации ДНК, хотя они могут варьировать между видами и между тканями. Тест *in vivo* также полезен при дальнейшей оценке мутагенного эффекта, выявленного в тест-системах *in vitro*.

Если известно, что вещество или активный метаболит не достигают ткани мишени, этот тест не подходит для оценки мутагенности.

4. *Принцип метода.* Животных подвергают воздействию исследуемого соединения при соответствующем пути введения и умерщвляют через определенное время после введения. Перед умерщвлением животным вводят вещество, блокирующее митоз на стадии метафазы (т. е. колхицин или колцемид). Затем готовят препараты клеток костного мозга, окрашивают и анализируют хромосомные aberrации в метафазах.

5. *Материалы.* Выбор животных. Обычно используют крыс, мышей и китайских хомячков, хотя можно использовать и другие виды млекопитающих. Наиболее часто опыты проводят на молодых, здоровых взрослых лабораторных животных. В начале эксперимента колебания массы животных должны быть минимальны, не превышая $\pm 20\%$ средней массы животных каждого пола.

6. *Условия содержания и кормления.* Температура в экспериментальных комнатах вивария должна быть $22 \pm 3^\circ\text{C}$. Относительная влажность должна быть не ниже 30% и не превышать 70% во время уборки, оптимально 50–60%. Освещение искусственное; световой режим: 12 ч освещения, 12 ч темноты. Может быть использована стандартная лабораторная диета без ограничения питьевой воды. На выбор диеты может влиять необходимость приготовления особой смеси корма при введении вещества с кормом. Животных содержат в клетках индивидуально или небольшими группами одного пола.

7. *Подготовка животных к исследованию.* Методом случайного отбора формируют контрольные и экспериментальные группы животных. Клетки располагают таким образом, чтобы минимизировать возможные эффекты вследствие их перемещения. Каждое животное идентифицируют. Животных акклиматизируют к лабораторным условиям, по крайней мере, в течение 5 дней.

8. *Контроли.* Соответствующие положительные и отрицательные (растворитель/разбавитель) контроли должны быть в каждом опыте для каждого пола. Исключая обработку животных тестируемым веществом, животных контрольных групп следует содержать в тех же условиях, что и экспериментальных.

Соединения положительного контроля при выбранных уровнях экспозиции должны индуцировать значимое превышение хромосомных aberrаций над контролем. Дозы положительного контроля следует подбирать так, чтобы был четкий эффект, но в то же время его уровень не позволял исследователю определить зашифрованный препарат группы положительного

контроля. Допускают введение положительного контроля способом, отличающимся от введения исследуемого вещества, и использование одного срока введения. Дополнительно, если это необходимо, в качестве положительного контроля можно использовать вещество, по химическому классу сходное с веществом положительного контроля. Примеры веществ положительного контроля приведены в приложении 1.

Пока приемлемая вариабельность частоты клеток с абберациями хромосом не будет показана по данным исторического контроля, в группе отрицательного контроля (контроль с растворителем/разбавителем) обработку животных проводят тем же путем и в том же режиме, что и экспериментальных животных. Если в группе отрицательного контроля проводят однократное введение, наиболее подходящим является первый срок забоя. Дополнительно следует формировать контрольную группу без обработки, пока исторические или опубликованные данные не покажут, что выбранный растворитель не индуцирует вредного или мутагенного эффекта.

9. *Проведение эксперимента.* Число и пол животных. В каждой экспериментальной и контрольной группе должно быть как минимум 5 животных каждого пола. Если ко времени проведения исследования имеются данные работ на том же виде животных и при той же схеме введения, которые указывают на отсутствие существенных различий в токсичности между полами, тогда достаточно опыта на животных одного пола. Если экспозиция человека веществом специфична для разных полов, например, для некоторых лекарств, эксперимент может быть проведен на животных соответствующего пола.

10. *Схема введения.* Применяют преимущественно схему однократного введения вещества. Исследуемое вещество может быть введено в дробных дозах, т. е. 2 введения в тот же день, разделенных не более, чем на несколько часов, чтобы ввести большой объем материала. Другие дозовые режимы должны быть научно обоснованы.

Забой животных следует проводить через 2 интервала времени после введения препарата. Для грызунов первый забой после введения вещества проводят через интервал, равный 1,5-кратной продолжительности нормального клеточного цикла, длительность которого в норме составляет 12–18 ч. Время, требуемое для поступления и метаболизма исследуемого вещества, а также возможное действие на кинетику клеточного цикла, могут влиять на оптимальное время для выявления аббераций хромосом; второй забой рекомендуется проводить через 24 ч после первого. Если используется больше, чем однодневный дозовый режим, рекомендуется один срок забоя после последнего введения вещества через интервал времени, равный 1,5-кратной продолжительности нормального клеточного цикла.

Перед забоем животным вводят внутрибрюшинно соответствующую дозу вещества, блокирующую митоз на стадии метафазы (т. е. колцемид или колхицин). Через определенный интервал времени животных забивают. Для мышей этот интервал составляет 3–5 ч, для китайских хомячков — 4–5 ч. Клетки отбирают из костного мозга, готовят препараты и анализируют хромосомные абберации.

11. *Уровни доз.* Если проведен ряд исследований и отсутствуют подходящие данные, то эксперимент должен быть проведен в той же лаборатории, используя те же виды, линии, пол, режим обработки, которые были в основном исследовании. Если выявлена токсичность, то для первого срока забоя тестируют 3 дозы. Диапазон доз должен быть в пределах от максимальной до минимальной токсичности или отсутствия токсичности. При более поздних сроках забоя необходимо использовать лишь максимальную дозу. Наибольшая доза определяется как доза, вызывающая такие признаки токсичности, которые при повышении уровня доз при том же режиме затравки указывают на возможность летального эффекта. Вещества со специфической биологической активностью в низких нетоксичных дозах (такие как гормоны и митогены) могут быть исключением для критериев установления дозы, и дозы должны устанавливаться для каждого конкретного случая. Наибольшая доза может также быть определена как доза, вызывающая ряд признаков токсичности в костном мозге (т.е. снижение митотического индекса более чем на 50%).

12. *Ограничения теста.* Если доза около 2000 мг/кг массы тела при однократном режиме воздействия или 2 введениях в один день, не оказывает токсического действия, и если не предполагают генотоксичность по результатам исследований со структурно связанными соединениями, то полную схему исследований с использованием 3 уровней доз можно не проводить. Для опытов с длительным введением максимальная доза составляет 2000 мг на кг массы тела в день при длительности введения до 14 дней и 1000 мг на кг массы тела в день при длительности введения более 14 дней. Ожидаемая экспозиция для человека может указывать на необходимость использования более высоких доз в опытах по установлению порогов.

13. *Введение вещества.* Исследуемое вещество обычно вводят внутрижелудочно, используя желудочный зонд или подходящую интубационную канюлю, или внутрибрюшинно. Возможно применение других способов введения, при их обосновании. Максимальный объем жидкости, который вводят внутрижелудочно или путем инъекции, зависит от размеров экспериментальных животных. Объем не должен превышать 2 мл на 100 г массы тела. Использование больших объемов должно быть обосновано. Исключение составляют раздражающие и разъедающие вещества, которые вызывают раздражающий эффект в высоких концентрациях. Вариации вводимых объемов должны быть минимизированы путем приготовления концентраций растворов, позволяющих вводить постоянный объем для всех 3 уровней доз.

14. *Приготовление препаратов метафазных хромосом.* Сразу после забоя выделяют костный мозг, проводят гипотоническую обработку клеток и фиксацию. Затем клетки раскапывают на стекла и окрашивают.

15. *Микроскопический анализ.* Следует оценить митотический индекс как показатель цитотоксичности, анализируя минимум по 1000 клеток на каждое экспериментальное животное, включая положительный и отрицательный контроль.

Для анализа aberrаций хромосом следует анализировать минимум по 100 метафаз на каждое животное. Число клеток может быть уменьшено, если наблюдают высокое число aberrаций. Все стекла, включая положительный и отрицательный контроль, перед микроскопическим анализом должны быть зашифрованы. При приготовлении препаратов часто возможна потеря хромосом, поэтому анализируемые метафазы должны содержать число центромер в пределах $2n \pm 2$.

16. *Обработка результатов.* Данные по каждому животному следует представлять в табличной форме. Экспериментальной единицей является животное. По каждому животному приводят число проанализированных клеток, число aberrаций на клетку и процент клеток со структурными aberrациями хромосом. Следует указать число и частоту разных типов структурных aberrаций хромосом для опытных и контрольных групп. Пробелы регистрируют отдельно, их не включают в общую частоту aberrаций. Если нет данных о различии показателей между животными разного пола, результаты по обоим полам можно объединить для статистического анализа.

17. *Оценка и интерпретация результатов.* Имеется несколько критериев определения положительного результата: зависимое от дозы повышение числа клеток с aberrациями хромосом или четкое повышение числа клеток с aberrациями хромосом в одной дозовой группе при одном временном варианте эксперимента. Биологическая обоснованность результата должна приниматься во внимание в первую очередь. Для оценки результатов могут быть использованы статистические методы. Статистическая значимость не является единственным критерием для доказательства положительного ответа. Сомнительные (противоречивые) результаты следует проверять при дальнейшем тестировании, используя преимущественно модификацию экспериментальных условий.

Увеличение полиплоидии может указывать, что исследуемое вещество, возможно, индуцирует изменение числа хромосом. Возрастание эндоредупликации может свидетельствовать, что испытываемое вещество, возможно, подавляет нормальное прохождение клеточного цикла.

Вещество, результаты исследования которого не соответствуют приведенным выше критериям, считается немутагенным в данном тесте.

Хотя в большинстве экспериментов получаются четко положительные или отрицательные результаты, в редких случаях данные не позволяют сделать однозначное заключение об активности исследуемого вещества. Результаты могут оставаться противоречивыми или сомнительными независимо от числа проведенных повторов.

Положительные результаты в тесте на хромосомные aberrации *in vivo* показывают, что вещество индуцирует aberrации хромосом в клетках костного мозга исследуемого вида животных. Отрицательные результаты указывают, что при данных условиях эксперимента вещество не индуцирует хромосомные aberrации в клетках костного мозга исследуемого вида животных.

Должна быть обсуждена вероятность, что испытываемое вещество или его метаболиты попадают в систему кровообращения или специфически в ткани-

мишени (т. е. системная токсичность).

18. Отчет должен включать следующую информацию:

Исследуемое соединение: идентификационные данные и номер CAS, если известен; физическую природу и чистоту; физико-химические параметры, имеющие значение для данного исследования; стабильность веществ.

Растворитель/разбавитель: обоснование выбора растворителя/разбавителя; растворимость и стабильность исследуемого вещества в растворителе/разбавителе, если известно.

Животные: вид и линии животных; число животных, возраст и пол; откуда получены животные, условия содержания и кормления и т. д.; масса каждого животного на начало опыта, включая для каждой группы колебания массы тела, среднее значение и стандартное отклонение.

Условия эксперимента: данные о положительном и отрицательном (растворитель/разбавитель) контроле; данные опыта о выборе диапазона доз (если проводили); обоснование выбора доз; детальное описание приготовления вещества; детальное описание введения вещества; обоснование пути введения вещества; методы для верификации того, что вещество циркулирует в организме или достигло ткани-мишени (если использовали); пересчет концентрации исследуемого вещества в питьевой воде или пище в дозу вещества (мг/кг массы тела в день) (если это проводили); детальное описание качества пищи или воды; детальное описание схемы обработки и забора материала; методы оценки токсичности; вещество, используемое для блокады метафаз, его концентрация и длительность экспозиции; метод приготовления препаратов метафазных хромосом; критерии анализа aberrаций хромосом; число анализируемых клеток на животное; критерии учета вещества как позитивное, негативное или сомнительное.

Результаты: признаки токсичности; митотический индекс; типы и число aberrаций, отдельно по каждому животному; общее число aberrаций хромосом на группу с указанием среднего значения и стандартного отклонения; число клеток с aberrациями хромосом на группу с указанием среднего значения и стандартного отклонения; изменения ploидности, если анализировали; оценка зависимости эффекта от дозы, где это возможно; статистический анализ, если проводили; данные отрицательного контроля; исторические данные отрицательного контроля с колебаниями показателя, среднего значения и стандартного отклонения; данные положительного контроля.

Обсуждение результатов. Заключение.

ГЛАВА 6 МЕТОД ОЦЕНКИ ХРОМОСОМНЫХ АБЕРРАЦИЙ В КЛЕТКАХ МЛЕКОПИТАЮЩИХ *IN VITRO*

1. Метод оценки хромосомных aberrаций в клетках млекопитающих *in vitro* (OECD TG № 473) используют для выявления факторов, которые индуцируют структурные aberrации хромосом в культивируемых клетках млекопитающих.

2. Тестирование *in vitro*, как правило, требует использования экзогенных источников метаболической активации. Системы метаболической активации *in vitro* не могут полностью имитировать условия метаболизма у млекопитающих *in vivo*. Таким образом, метод не дает прямой информации по мутагенному и канцерогенному потенциалу химического вещества в отношении млекопитающих.

3. Имеется два типа структурных aberrаций хромосом: хроматидные и хромосомные. Подавляющее большинство химических мутагенов индуцирует aberrации хроматидного типа. В то же время возможно появление aberrаций хромосомного типа. Повышение полиплоидии может указывать на возможность индукции веществом численных нарушений хромосомного набора. Однако данный документ не рассматривает учет численных нарушений хромосом, и данный метод обычно не используется для этой цели. Хромосомные мутации и связанные с ними события являются причиной ряда наследственных заболеваний человека. Имеются веские доказательства, что хромосомные мутации и связанные с ними события, вызывая изменения в онкогенах и генах супрессорах опухоли в соматических клетках, вовлечены в индукцию рака у человека и экспериментальных животных.

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

Тест используют для скрининга потенциальных мутагенов и канцерогенов для млекопитающих. Многие вещества, положительные в этом тесте, являются канцерогенами для млекопитающих. Однако нет точной корреляции между результатами в этом тесте и канцерогенностью для человека. Уровень корреляции зависит от класса химического соединения. Имеются канцерогенные вещества, которые не выявляются в данном тесте, потому что они действуют по иным механизмам, чем прямое повреждение ДНК.

5. Тесты *in vitro* обычно требуют использования экзогенной системы метаболической активации. Такая система метаболической активации не может полностью соответствовать метаболизму вещества у млекопитающих *in vivo*. Следует избегать условий, которые могут привести к положительному результату, не отражающему собственную мутагенность исследуемого вещества, возникающему вследствие изменения рН, осмотической концентрации или высокого уровня цитотоксичности.

6. *Принцип метода.* Экспозицию клеточных культур с изучаемым веществом проводят в вариантах без и в присутствии системы метаболической активации. Через определенное время после экспозиции исследуемым соединением в культуры вносят вещество, блокирующее клеточный цикл на стадии метафазы (например, Colcemid® или колхицин). Затем клетки фиксируют, красят и анализируют под микроскопом для обнаружения хромосомных aberrаций.

7. *Материалы. Клетки.* В экспериментах могут быть использованы различные клеточные линии (клетки яичников китайского хомячка СНО, клетки легких китайского хомячка V79, ТК6) или первичные культуры, включая лимфоциты периферической крови человека и млекопитающих.

8. *Среды и условия культивирования.* Для культивирования следует использовать соответствующие культуральные среды и условия инкубации (посуда для культивирования, концентрация CO₂, температура и влажность). Клеточные линии и штаммы, на которых проводят исследования, следует постоянно проверять на стабильность модального числа хромосом и отсутствие контаминации микоплазмой. Их нельзя использовать при изменении числа хромосом или контаминации микоплазмой. Для клеток и условий их культивирования должна быть известна нормальная продолжительность клеточного цикла.

9. *Подготовка культур.* Клеточные линии и штаммы размножают из коллекции, засевают в культуральной среде до плотности, при которой клетки не будут мешать друг другу до времени фиксации, и инкубируют при 37°C.

10. *Лимфоциты:* цельная кровь с антикоагулянтом (например, гепарином) или выделенные лимфоциты, полученные от здоровых доноров, вводят в культуральную среду, содержащую митоген (например, фитогемагглютинин), и инкубируют при 37°C.

11. *Метаболическая активация.* Клетки экспонируют с изучаемым веществом как в присутствии, так и без соответствующей системы метаболической активации. Обычно используют кофакторы и постмитохондриальную фракцию (S9), приготовленную из печени грызунов, обработанных индуктором ферментов Aroclor 1254, или комбинацией фенобарбитала и β-нафтофлавона. Постмитохондриальную фракцию обычно добавляют в объеме 1–10% от объема культуральной среды. Условия использования системы метаболической активации могут зависеть от химического класса изучаемого вещества. В некоторых случаях может быть уместным использование не одной, а нескольких концентраций постмитохондриальной фракции. Многие модификации, включая конструирование генно-инженерных клеточных линий, экспрессирующих специфические ферменты активации, могут быть использованы для эндогенной активации. Выбор используемых клеточных линий должен быть оправдан с научной точки зрения (например, необходимостью присутствия изозима цитохрома P450 для метаболизма испытуемого вещества).

12. *Растворитель/разбавитель.* Растворитель/разбавитель не должен вступать в химическую реакцию с испытуемым веществом, а также снижать выживаемость клеток и активность смеси S9. Если вместо хорошо изученных используются другие растворители/разбавители, их включение в эксперимент должно быть обосновано данными, указывающими на их совместимость с клетками и S9. Рекомендуются, если возможно, использовать водный растворитель (физиологический раствор или питательную среду). При тестировании веществ, водные растворы которых нестабильны, следует использовать безводный органический растворитель. Вода может быть удалена

при использовании молекулярного сита.

13. *Изучаемые концентрации.* К критериям, которые используют для определения максимальной концентрации вещества, относятся цитотоксичность, растворимость в культуральной среде, изменение pH и осмотическая концентрация.

14. Цитотоксичность следует определять как в присутствии, так и без метаболической активации в основном эксперименте. Ее индикаторами являются такие признаки целостности клеток и их роста, как степень слияния, количество жизнеспособных клеток, митотический индекс. Полезно определение цитотоксичности и растворимости в предварительном эксперименте.

15. Нужно исследовать, по крайней мере, 3 концентрации вещества, эффекты которых можно проанализировать. Если вещество обладает цитотоксическим действием, его следует изучать в таких концентрациях, которые покрывают диапазон от максимального до небольшого уровня токсичности или ее отсутствия. Обычно различия между концентрациями выбираются в диапазоне между 2 и 10. На момент фиксации максимальная концентрация должна показать значительное (более 50%) сокращение степени слияния, количества клеток или митотического индекса. Митотический индекс служит только косвенной (непрямой) мерой цитотоксических/цитостатических эффектов и зависит от времени после введения вещества в культуру. Однако митотический индекс приемлем для суспензионных культур, в которых другие измерения токсичности могут быть затруднены и трудноопределимы. Информацию о кинетике клеточного цикла, такую как среднее время генерации (СВГ), можно использовать в качестве дополнительной. Однако СВГ является средним значением для всей популяции и не всегда указывает на существование более медленно делящейся субпопуляции. Даже небольшое увеличение среднего времени генерации может быть связано с очень существенной задержкой времени оптимального выхода aberrаций. Для веществ с относительно низкой цитотоксичностью максимальная концентрация в культуре должна составить 5 мкл/мл, 5 мг/мл или 0,01M, выбирая из них ту, которая является самой низкой.

16. Для относительно не растворимых веществ, которые не токсичны в концентрациях ниже предела растворимости, максимальную концентрацию следует брать выше предела растворимости в конечной культуральной среде в конце обработки. В некоторых случаях (когда токсичность проявляется только в более высокой, чем самая низкая нерастворимая концентрация) желательно исследовать более одной концентрации с видимой преципитацией. Это может быть полезно для оценки растворимости в начале и конце периода обработки, так как в тест-системе растворимость может меняться в процессе обработки вследствие присутствия клеток, S9, сыворотки и т. д. Нерастворимость можно выявить невооруженным глазом. Преципитат не должен мешать анализу.

17. *Контроли.* Соответствующие положительные и отрицательные (растворитель или разбавитель) 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 следует применять реагент в концентрации, при которой имеется воспроизводимое и значимое повышение эффекта над контролем, чтобы охарактеризовать чувствительность тест-системы. Концентрации положительного контроля следует подбирать так, чтобы был четкий эффект, но в то же время его уровень не позволял исследователю определить зашифрованный препарат. Примеры веществ положительного контроля приведены в приложении.

В качестве положительного контроля могут быть использованы другие вещества. Если возможно, в качестве положительного контроля используют вещество, по химическому классу сходное с известным положительным контролем.

Отрицательный контроль, включающий введение только растворителя/разбавителя в культуральную среду, обработку клеток в том же режиме, как и в вариантах с исследуемым веществом, ставится для каждого времени фиксации. Дополнительно следует ставить контроль без обработки, пока исторический контроль лаборатории не покажет отсутствие вредных или мутагенных эффектов, индуцированных выбранным растворителем.

18. *Обработка культуры исследуемым веществом.* Пролиферирующие клетки обрабатывают исследуемым веществом в присутствии системы метаболической активации и без нее. Обработку лимфоцитов проводят через 48 ч после стимуляции митогеном.

19. Для каждой концентрации в норме ставят 2 культуры. То же настоятельно рекомендуется для отрицательного и положительного контролей. Когда исторические данные показывают минимальные вариации результатов между двумя культурами, возможно использование в эксперименте только одной культуры с каждой концентрацией.

20. Газообразные или летучие вещества тестируют соответствующими методами, например, в запечатанных культуральных сосудах.

21. *Время фиксации.* В первом опыте 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 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 времени фиксации, эквивалентного 1,5-кратной продолжительности клеточного цикла. Некоторые из химических веществ могут быть легче выявлены при длительности времени воздействия/фиксации более чем 1,5-кратной продолжительности клеточного цикла. В тех случаях, когда подтверждение отрицательного результата не считается необходимым, следует дать обоснование.

22. *Приготовление препаратов хромосом.* Обычно за 1–3 ч до фиксации в культуру клеток вводят Colcemid[®] или колхицин. Каждую культуру клеток

фиксируют отдельно для приготовления препаратов метафазных хромосом. Клетки подвергают гипотонической обработке, фиксируют и окрашивают.

23. *Анализ.* Все стекла, включая положительный и отрицательный контроль, перед микроскопическим анализом должны быть зашифрованы. Поскольку фиксация часто приводит к появлению метафаз с потерей хромосом, анализируемые метафазы должны содержать число центромер в пределах ± 2 от модального числа для исследуемого типа клеток. Следует анализировать минимум 200 хорошо разбросанных метафаз на концентрацию и контроль, равно деля это количество между 2 повторами, если они ставятся. Это число может быть снижено, если наблюдается большое число aberrаций.

24. Хотя основная цель теста — выявление структурных хромосомных aberrаций, важно учитывать также полиплоидию и эндоредупликацию, если эти события имеются.

25. *Результаты. Обработка результатов.* Экспериментальной единицей является клетка. Поэтому 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 их обычно не включают в общую частоту aberrаций.

Следует также проводить оценку цитотоксичности во всех экспериментальных и контрольных культурах.

Представляют данные по каждой культуре. Все данные суммируют в табличной форме.

Нет требований к верификации четко положительного результата. Противоречивые и сомнительные результаты следует проверять в дальнейших экспериментах, используя преимущественно модификацию экспериментальных условий. Необходимость подтверждения отрицательных результатов обсуждена в п. 15 гл. 4. Модификацию параметров исследования, степень изменения установленных условий следует проводить в последующих экспериментах. В параметры исследования, которые могут быть модифицированы, включают диапазон концентраций, условия метаболической активации.

26. *Оценка и интерпретация результатов.* Имеется несколько критериев определения положительного результата: зависимое от концентрации повышение числа клеток с aberrациями хромосом или воспроизводимое повышение числа клеток с aberrациями хромосом. Биологическая обоснованность результата должна приниматься во внимание в первую очередь. Для оценки результатов можно использовать статистические методы в качестве дополнительных. Статистическая значимость не является единственным критерием для доказательства положительного ответа.

Повышение частоты полиплоидных клеток может показывать, что вещество ингибирует процесс митоза и индуцирует численные хромосомные аномалии. Рост числа клеток с эндоредупликацией хромосом может указывать, что вещество ингибирует прогрессию клеточного цикла.

Вещества, результаты исследования которого не соответствуют вышеприведенным критериям, считаются не мутагенами в данной тест-системе.

Хотя в большинстве экспериментов получаются четко положительные или отрицательные результаты, в редких случаях полученные данные не позволяют сделать однозначное заключение об активности исследуемого вещества. Результаты могут оставаться противоречивыми или сомнительными независимо от числа проведенных повторов.

Положительные результаты в тесте на хромосомные aberrации *in vitro* показывают, что вещество индуцирует структурные aberrации хромосом в культивируемых соматических клетках млекопитающих. Отрицательные результаты указывают, что при данных условиях эксперимента вещество не индуцирует хромосомные aberrации в культивируемых соматических клетках млекопитающих.

27. Отчет должен включать следующую информацию:

Исследуемое соединение: идентификационные данные и номер CAS, если известен; физическую природу и чистоту; физико-химические параметры, имеющие значение для данного исследования; стабильность веществ (если известна).

Растворитель/разбавитель: обоснование выбора растворителя/разбавителя; растворимость и стабильность исследуемого вещества в растворителе/разбавителе, если известны.

Клетки: тип и источник клеток; особенности кариотипа и пригодность использованного типа клеток; отсутствие микоплазмы, если определяли; информация о длительности клеточного цикла; пол донора, использовали для культивирования цельную кровь или выделяли лимфоциты, митоген; число пассажей, если использовали; методы поддержания клеточных культур, если использовали; модальное число хромосом.

Условия эксперимента: препарат, использованный для метафазного блока, концентрация и длительность экспозиции; обоснование выбора концентраций и числа клеточных культур, например, данные о цитотоксичности и ограничения по растворимости, если имеются; состав среды, концентрация CO₂; концентрации исследуемого вещества; объем растворителя и количество добавленного исследуемого вещества; температура инкубации; длительность инкубации; длительность обработки культуры; клеточная плотность во время обработки (если оценивали); тип и состав системы метаболической активации, включая критерии приемлемости; положительные и отрицательные контроли; методика приготовления препаратов; критерии учета aberrаций хромосом; число проанализированных метафаз; методы оценки токсичности; критерии оценки результата как положительный, отрицательный или противоречивый.

Результаты: признаки токсичности, например: рост клеток, данные о клеточном цикле, числе клеток, митотическом индексе; признаки преципитации; данные о pH и осмотической концентрации во время обработки исследуемым веществом, если определяли; определение aberrаций, включая пробелы; число клеток с хромосомными aberrациями, типы хромосомных aberrаций для каждой экспериментальной и контрольной культуры; изменения ploидности, если есть; оценка зависимости эффекта от дозы, где это возможно;

статистический анализ, если проводили; данные отрицательного (растворитель/разбавитель) и положительного контроля; исторические данные отрицательного (растворитель/разбавитель) и положительного контроля с указанием пределов колебаний, средней величины и стандартного отклонения;

Обсуждение результатов. Заключение.

Примеры веществ положительного контроля

Вещество и номер CAS:
Триэтиленмеламин [№ CAS 51-18-3]
Этилметансульфонат [№ CAS 62-50-0]
Этилнитрозоомочевина [№ CAS 759-73-9]
Митомицин С [№ CAS 50-07-7]
Циклофосфамид (моногидрат) [№ CAS 50-18-0, № CAS 6055-19-2]