МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СОВЕТ ПО СТАНДАРТИЗАЦИИ, МЕТРОЛОГИИ И СЕРТИФИКАЦИИ
(МГС)

INTERSTATE COUNCIL FOR STANDARDIZATION, METROLOGY AND CERTIFICATION
(ISC)

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

ГОСТ 32648— 2014

МЕТОДЫ ИСПЫТАНИЯ ПО ВОЗДЕЙСТВИЮ ХИМИЧЕСКОЙ ПРОДУКЦИИ НА ОРГАНИЗМ ЧЕЛОВЕКА

Токсикология генетическая: метод оценки сцепленных с полом рецессивных летальных мутаций у Drosophila melanogaster

Издание официальное

Москва
Стандартинформ
2019

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

Цели, основные принципы и общие правила проведения работ по межгосударственной стандартизации установлены ГОСТ 1.0 «Межгосударственная система стандартизации. Основные положения» и ГОСТ 1.2 «Межгосударственная система стандартизации. Стандарты межгосударственные, правила и рекомендации по межгосударственной стандартизации. Правила разработки, принятия, обновления и отмены»

Сведения о стандарте

1 ПОДГОТОВЛЕН Федеральным бюджетным учреждением здравоохранения «Российский регистр потенциально опасных химических и биологических веществ» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ФБУЗ «Российский регистр потенциально опасных химических и биологических веществ» Роспотребнадзора), Федеральным государственным унитарным предприятием «Всероссийский научно-исследовательский центр стандартизации, информации и сертификации сырья, материалов и веществ» (ФГУП «ВНИЦСМВ»), Техническим комитетом по стандартизации № 339 «Безопасность сырья, материалов и веществ» Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии на основе собственного перевода на русский язык англоязычной версии стандарта, указанного в пункте 5

2 ВНЕСЕН Федеральным агентством по техническому регулированию и метрологии

3 ПРИНЯТ Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации (протокол от 28 марта 2014 г. № 65-П)

За принятие проголосовали:

Краткое наименование страны по МК (ИСО 3166) 004 – 97	Код страны по МК (ИСО 3166) 004—97	Сокращенное наименование национального органа по стандартизации
Армения	AM	Минэкономики Республики Армения
Беларусь	BY	Госстандарт Республики Беларусь
Молдова	MD	Молдова-Стандарт
Россия	RU	Росстандарт
Таджикистан	TJ	Таджикстандарт
Узбекистан	UZ	Узстандарт

4 Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 29 сентября 2014 г. № 1235-ст межгосударственный стандарт ГОСТ 32648—2014 введен в действие в качестве национального стандарта Российской Федерации с 1 июня 2015 г.

5 Настоящий стандарт идентичен международному документу OECD Test № 477:1984 «Генетическая токсикология: метод оценки сцепленных с полом рецессивных летальных мутаций у Drosophila melanogaster» («Genetic Toxicology: Sex-linked Recessive Lethal Test in Drosophila melanogaster», IDT).

Наименование настоящего стандарта изменено относительно наименования указанного международного документа для приведения в соответствие с ГОСТ 1.5 (подраздел 3.6)

6 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

7 ПЕРЕИЗДАНИЕ. Сентябрь 2019 г.

Информация о введении в действие (прекращении действия) настоящего стандарта и изменений к нему на территории указанных выше государств публикуется в указателях национальных стандартов, издаваемых в этих государствах, а также в сети Интернет на сайтах соответствующих национальных органов по стандартизации.

В случае пересмотра, изменения или отмены настоящего стандарта соответствующая информация будет опубликована на официальном интернет-сайте Межгосударственного совета по стандартизации, метрологии и сертификации в каталоге «Межгосударственные стандарты»

© Стандартинформ, оформление, 2015, 2019

В Российской Федерации настоящий стандарт не может быть полностью или частично воспроизведен, тиражирован и распространен в качестве официального издания без разрешения Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии

Введение

Представляемые данные по соединению:
- твердое, жидкое, парообразное или газообразное вещество;
- химическая идентификация вещества;
- чистота (примеси) вещества;
- растворимость;
- температура плавления/кипения вещества;
- pH (где необходимо);
- давление паров (если имеются данные).

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

МЕТОДЫ ИСПЫТАНИЯ ПО ВОЗДЕЙСТВИЮ ХИМИЧЕСКОЙ ПРОДУКЦИИ НА ОРГАНИЗМ ЧЕЛОВЕКА

Токсикология генетическая: метод оценки сцепленных с полом рецессивных летальных мутаций у Drosophila melanogaster

OECD guidelines for the testing of chemicals.
Genetic toxicology: Sex-linked recessive lethal test in Drosophila melanogaster

Дата введения — 2015—06—01

1 Область применения

Метод оценки сцепленных с полом рецессивных летальных мутаций на Drosophila melanogaster (СПРЛМ) применяют для выявления как точковых мутаций, так и небольших делеций в половых клетках насекомых. Это прямой тест выявления мутаций распространяется на 800 локусов *X*-хромосомы, что составляет около 80 % всех локусов на *X*-хромосоме. *X*-хромосома представляет приблизительно 1/5 полного генома дрозофилы [2].

2 Термины и определения

В настоящем стандарте применены следующие термины с соответствующими определениями:

2.1 **летальная мутация** (lethal mutation): Изменение в геноме, проявление которого вызывает гибель носителя.

2.2 **рецессивная мутация** (recessive mutation): Изменение в геноме, которое проявляется в гомозиготном или гемизиготном состоянии.

2.3 **положительные контроли** (reference substances): Вещества, которые используются как положительные контроли:

- этилметансульфонат;
- N-нитрозодиметиламин.

2.4 **сцепленные с полом гены** (sex-linked): Гены находятся на половых (*X* и *Y*) хромосомах. В контексте настоящего стандарта термин «сцепленные с полом гены» распространяется на гены, локализованные на X-хромосоме.

3 Принцип исследования

Мутации в *X*-хромосоме Drosophila melanogaster фенотипически экспрессируются у самцов, несущих мутантный ген. Когда мутация летальна в гемизиготном состоянии, ее действие проявляется в отсутствии в потомстве одного из двух классов самцов, которые нормально появляются у гетерозиготных самок.

Метод СПРЛМ имеет преимущество в том, что проводится со специально маркированными и перестроенными хромосомами.

Издание официальное

4 Описание метода

Методы проведения теста СПРЛМ на Drosophila melanogaster описаны в работах [2] и [3]. Самцов дикого типа обрабатывают исследуемым веществом и скрещивают с определенными самками. Самок потомства скрещивают с их братьями. В следующей генерации потомства от каждого индивидуального скрещивания фенотипически подсчитывают самцов дикого типа. Отсутствие этих самцов указывает на то, что рецессивные сцепленные с полом летальные мутации возникли в половых клетках Р1 самцов.

4.1 Материалы

4.1.1 Линии

Могут применять самцов хорошо определяемого дикого типа и самок линии Muller-5. Также возможно применение других соответственно маркированных линий самок с множественными инверсиями *X*-хромосомы.

4.1.2 Тестируемое вещество

Исследуемое вещество растворяют в воде. Нерастворимые в воде вещества можно растворять или суспендировать в подходящих растворителях (например, смеси этанола и Tween-60 или Tween-80), а затем перед введением разводят в воде или физиологическом растворе. Следует избегать использования диметилсульфоксида в качестве растворителя.

4.2 Условия тестирования

4.2.1 Пути введения исследуемого вещества

Возможно введение оральное, инъекционное или ингаляционное с газом или парами. Кормление с исследуемым веществом может быть проведено с помощью раствора сахара. При необходимости вещество можно растворить в 0,7%-ном растворе NaCl и инъецировать в грудную клетку или живот подопытного животного.

4.2.2 Уровни экспозиции

В начале оценки мутагенности применяют одну экспозицию исследуемого вещества, которая является максимально переносимой концентрацией или вызывает ряд признаков токсичности. Если метод применяют для верификации, то проводят по крайней мере два дополнительных уровня экспозиции.

4.2.3 Контроли

Необходимо включать негативный контроль с растворителем. Однако если в лаборатории накоплен большой исторический контроль, то нет необходимости ставить конкурентные контроли.

4.3 Проведение эксперимента

Самцов дикого типа (в возрасте 3—5 дней) обрабатывают исследуемым веществом и скрещивают индивидуально с избытком виргинных самок линии Muller-5 или самками других соответственно маркированных (с множественными инверсиями *X*-хромосомы) линий. Каждые 2—3 дня самок заменяют на новых виргинных самок, проводя таким образом анализ полного цикла половых клеток. Потомство этих самок позволяет учитывать летальные эффекты при воздействии на зрелую сперму, сперматиды на средней и поздней стадии, ранние сперматиды, сперматоциты и сперматогонии.

Гетерозиготных самок (F1) предыдущих скрещиваний индивидуально (одна самка на пробирку) спаривают с их братьями. В F2-генерации в каждой культуре определяют отсутствие самцов дикого типа. Если F1-самка несет летальную *X*-хромосому отца (т. е. наблюдается отсутствие самцов с обработанной хромосомой), дочерей этих самок с тем же генотипом следует исследовать, чтобы оценить, передается ли летальность следующим генерациям.

Для теста должны быть заранее установлены чувствительность и сила. Число особей в каждой группе должно определяться этими параметрами. Спонтанная частота мутантов, наблюдаемая в соответствующем контроле, сильно влияет на число обработанных хромосом, которое необходимо проанализировать, чтобы выявить вещества, индуцирующие частоту мутаций, близкую к таковой в контроле.

Результаты теста должны быть подтверждены в отдельном эксперименте.

5 Результаты и отчет

5.1 Обработка результатов

Данные следует представлять в табличной форме, указывая число тестируемых хромосом, число нефертильных самок, число летальных хромосом для каждой концентрации вещества, каждого периода скрещивания на каждого обработанного самца. Следует представить число кластеров разных размеров на самца.

Для оценки сцепленных с полом рецессивных летальных мутаций применяют различные статистические методы. Кластеры рецессивных леталей от одного самца следует учитывать и оценивать соответствующими статистическими приемами.

5.2 Оценка результатов

Существуют разные критерии определения позитивного результата, один из которых — статистически значимое повышение частоты сцепленных с полом рецессивных летальных мутаций с возрастанием дозы. Другой критерий — воспроизводимый, статистически значимый положительный эффект хотя бы на одной экспериментальной точке.

Вещество, не вызывающее ни статистически значимого повышения частоты сцепленных с полом рецессивных летальных мутаций с возрастанием дозы, ни статистически значимого положительного эффекта хотя бы на одной экспериментальной точке, считается не мутагеном в настоящей тест-системе.

Как биологическая, так и статистическая значимость должны оцениваться совместно при анализе результатов.

5.3 Отчет

Отчет должен содержать следующую информацию:

- сток: сток и линии применяемых дрозофил; возраст насекомых; число обработанных самцов; число стерильных самцов; число поставленных F2-культур; число F2-культур без потомства; число исследованных хромосом; число хромосом, несущих летальные мутации для половых клеток каждой стадии;
- условия тестирования: детальное описание схемы обработки и проведения опыта; уровни экспозиции, данные по токсичности, негативные (растворитель) и позитивные контроли;
- критерии учета летальных мутаций;
- анализ зависимости «экспозиция — эффект» (там, где проводилась);
- статистическую оценку.

5.4 Интерпретация результатов

Положительный результат в тесте на сцепленную с полом рецессивную леталь (СПРЛМ) на дрозофиле показывает, что вещество индуцирует мутации в половых клетках насекомого. Отрицательный результат предполагает, что при указанных условиях тестирования вещество не индуцирует мутации в половых клетках насекомого.

Библиография

[1] Руководящий документ OECD Test № 477 «Genetic Toxicology: Sex-linked Recessive Lethal Test in Drosophila melanogaster»
[2] F.H. Sobels and E. Vogel, Mutation Res. 41, 95-106 (1976)
[3] F.E. Würgler, H. Sobels and E. Vogel, in Handbook of Mutagenicity Test Procedures (edited by B.J. Kilbey, et al.), pp. 335—373, Elsevier, Amsterdam (1977)

УДК 661:615.099 МКС 13.020.01

Ключевые слова: химическая продукция, воздействие на организм человека, метод испытаний, генетическая токсикология, сцепленные с полом рецессивные летальные мутации, Drosophila melanogaster

Редактор *Н.Е. Рагузина*
Технические редакторы *В.Н. Прусакова, И.Е. Черепкова*
Корректор *Е.Р. Ароян*
Компьютерная верстка *Л.В. Софейчук*

Сдано в набор 23.09.2019. Подписано в печать 30.09.2019. Формат 60 × 84 1/8. Гарнитура Ариал.
Усл. печ. л. 0,93. Уч.-изд. л. 0,60.

Подготовлено на основе электронной версии, предоставленной разработчиком стандарта

ИД «Юриспруденция», 115419, Москва, ул. Орджоникидзе, 11.
gost.e-ecolog.ru gost.e-ecolog.ru

Создано в единичном исполнении во ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ»
для комплектования Федерального информационного фонда стандартов,
117418 Москва, Нахимовский пр-т, д. 31, к. 2.
gost.e-ecolog.ru gost.e-ecolog.ru

gost.e-ecolog.ru