ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО

ПО ТЕХНИЧЕСКОМУ РЕГУЛИРОВАНИЮ И МЕТРОЛОГИИ

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ГОСТ Р 57130— 2016

ЛЕКАРСТВЕННЫЕ СРЕДСТВА ДЛЯ МЕДИЦИНСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ

Исследование генотоксичности и интерпретация полученных данных

(ICH S2:2011, Guidance on genotoxicity testing and data interpretation for pharmaceuticals intended for human use, IDT)

Издание официальное

Москва
Стандартинформ
2016

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

1 ПОДГОТОВЛЕН Государственным бюджетным образовательным учреждением высшего профессионального образования «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (Первый МГМУ имени И.М. Сеченова) на основе собственного перевода на русский язык англоязычной версии стандарта, указанного в пункте 4

2 ВНЕСЕН Техническим комитетом по стандартизации ТК 458 «Разработка, производство и контроль качества лекарственных средств»

3 УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 10 октября 2016 г. № 1345-ст

4 Настоящий стандарт идентичен международному документу ICH S2:2011 «Руководство по изучению генотоксичности и интерпретации полученных данных для лекарственных препаратов для медицинского применения» («Guidance on genotoxicity testing and data interpretation for pharmaceuticals intended for human use», IDT) Международной конференции по гармонизации технических требований для регистрации лекарственных средств для медицинского применения (International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use; ICH).

Наименование настоящего стандарта изменено относительно наименования международного документа в связи с особенностями построения межгосударственной системы стандартизации

5 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

*Правила применения настоящего стандарта установлены в статье 26 Федерального закона от 29 июня 2015 г. № 162-ФЗ «О стандартизации в Российской Федерации». Информация об изменениях к настоящему стандарту публикуется в ежегодном (по состоянию на 1 января текущего года) информационном указателе «Национальные стандарты», а официальный текст изменений и поправок — в ежемесячном информационном указателе «Национальные стандарты». В случае пересмотра (замены) или отмены настоящего стандарта соответствующее уведомление будет опубликовано в ближайшем выпуске ежемесячного информационного указателя «Национальные стандарты». Соответствующая информация, уведомление и тексты размещаются также в информационной системе общего пользования — на официальном сайте национального органа Российской Федерации по стандартизации в сети Интернет (*gost.e-ecolog.ru

© Стандартинформ, 2016

Настоящий стандарт не может быть воспроизведен, тиражирован и распространен в качестве официального издания без разрешения Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии

Содержание

1 Область применения . . . 1
1.1 Общие принципы . . . 1
2 Набор стандартных тестов для оценки генотоксичности . . . 1
2.1 Общие подходы . . . 1
2.2 Описание двух вариантов стандартного набора тестов . . . 3
2.3 Изменения стандартного набора тестов . . . 4
2.4 Определение мутагенов зародышевых клеток . . . 5
3 Рекомендации в отношении тестов *in vitro* . . . 5
3.1 Повторение тестов и интерпретация их результатов . . . 5
3.2 Рекомендованный протокол выявления бактериальных мутаций . . . 5
3.3 Рекомендованные протоколы для проведения испытаний на клетках млекопитающих . . . 6
4 Рекомендации по проведению испытаний *in vivo* . . . 8
4.1 Тесты, проводимые с целью определения хромосомных повреждений *in vivo* . . . 8
4.2 Другие испытания генотоксичности *in vivo* . . . 9
4.3 Выбор доз в рамках анализа *in vivo* . . . 10
4.4 Демонстрация концентраций в целевых тканях при отрицательных результатах анализов *in vivo* . . . 11
4.5 Пробоотбор/время проведения анализов *in vivo* . . . 12
4.6 Количество анализируемых животных . . . 12
4.7 Использование самцов/самок грызунов в исследованиях генотоксичности *in vivo* . . . 12
4.8 Путь введения . . . 12
4.9 Использование положительного контроля в исследованиях *in vivo* . . . 12
5 Рекомендации по оценке результатов испытаний и стратегий контрольных испытаний . . . 13
5.1 Оценка биологической актуальности . . . 13
5.2 Оценка результатов, полученных в испытаниях *in vitro* . . . 13
5.3 Оценка результатов, полученных в испытаниях *in vivo* . . . 14
5.4 Стратегии последующей разработки при получении положительных результатов . . . 15
5.5 Последующий анализ генотоксичности применительно к результатам опухолевого роста в биологическом анализе канцерогенности . . . 16
6 Термины . . . 16
Библиография . . . 19

Введение

Данный стандарт направлен на оптимизацию набора стандартных испытаний генотоксичности, обеспечивающих прогноз потенциального риска для человека, и описание общепринятых подходов к интерпретации результатов с конечной целью совершенствования оценки риска канцерогенных эффектов, связанных с изменением генетического материала. Стандарт содержит описание согласованных на международном уровне стандартных испытаний и подходов к интерпретации положительных результатов *in vitro* и *in vivo*, полученных при проведении стандартного набора тестов на генотоксичность, включая оценку нерелевантных результатов.

В стандарте учтены актуальные рекомендации последнего руководства Организации экономического сотрудничества и развития (OECD) и отчеты Международных семинаров по испытаниям генотоксичности (IWGT). Отличия от рекомендаций OECD или IWGT, при их наличии, указанные в тексте стандарта. Стандарт применяется совместно с другими ГОСТ по лекарственным средствам для медицинского применения и (или) руководствами ICH.

Настоящий стандарт идентичен Руководству ICH S2 по изучению генотоксичности и интерпретации полученных данных для лекарственных препаратов для медицинского применения (ICH S2 Guidance on genotoxicity testing and data interpretation for pharmaceuticals intended for human use) Международной конференции по гармонизации технических требований для регистрации лекарственных средств для медицинского применения (International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use; ICH).

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ЛЕКАРСТВЕННЫЕ СРЕДСТВА ДЛЯ МЕДИЦИНСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ

Исследование генотоксичности и интерпретация полученных данных

Medicines for medical application. Genotoxicity testing and data interpretation

Дата введения — 2017—05—01

1 Область применения

Настоящий стандарт распространяется только на лекарственные средства для медицинского применения химического происхождения, то есть малых молекул, и не распространяется на биологические препараты. Рекомендации относительно времени проведения исследований в рамках клинической разработки представлены в ГОСТ Р 56701—2015.

1.1 Общие принципы

К испытаниям генотоксичности относятся тесты, проводимые *in vitro* и *in vivo* в целях выявления компонентов, индуцирующих генетическое повреждение вследствие различных механизмов. Данные испытания позволяют определить риск в отношении повреждения ДНК и фиксации. Фиксация повреждения ДНК в форме генных мутаций, более обширные хромосомные повреждения или рекомбинация, в целом необходимая для наследуемых эффектов и в рамках многоэтапного процесса развития злокачественного новообразования — сложного процесса, в рамках которого генетические изменения, возможно, играют роль лишь частично.

Числовые хромосомные изменения также были обусловлены туморогенезом и могут указывать на возможную анеуплоидию в зародышевых клетках.

Вещества, дающие положительный результат в испытаниях по определению подобных нарушений могут иметь канцерогенный и/или мутагенный потенциал для человека. Поскольку связь между концентрацией определенных препаратов и канцерогенезом установлена для человека, в то время как подобную связь трудно доказать для наследственных болезней, испытания генотоксичности применялись, главным образом, для установления канцерогенности. Несмотря на это, поскольку мутации зародышевой линии имеют четкую связь с заболеванием у человека, подозрение на то, что лекарственное вещество может провоцировать наследственные эффекты, считается не менее серьезным, чем подозрение на канцерогенные эффекты вещества. Кроме того, результаты исследований генотоксичности имеют большое значение для интерпретации исследований канцерогенности.

2 Набор стандартных тестов для оценки генотоксичности

2.1 Общие подходы

Регистрация лекарственных средств требует полноценной оценки генотоксического потенциала. Обширный анализ показал, что многие вещества, показавшие свойства мутагенности при проведении теста Эймса на обратную мутацию бактерий, являются канцерогенами для грызунов. Кроме того, испытания на тканях млекопитающих *in vitro* повышают чувствительность к детекции канцерогенов у грызунов и расширяют спектр выявляемых генетических нарушений, при этом снижая специфичность определения, т. е. повышают частоту положительных результатов, что не коррелирует с данными о канцероген-

Издание официальное

ности у грызунов. Кроме того, использование батарей тестов целесообразно, поскольку ни один тест отдельно не способен выявить все генотоксические механизмы развития туморогенеза.

Общие характеристики стандартной батареи тестов:

i. Оценка мутагенности в виде теста обратной мутации бактерий. Данный тест позволяет выявить соответствующие генетические изменения и большинство канцерогенов человека и грызунов с генотоксическим потенциалом.

ii. Генотоксичность также следует оценивать в клетках млекопитающих *in vitro* и/или *in vivo* следующим образом.

Несколько систем анализа клеток млекопитающих *in vitro* широко используются и могут считаться в достаточной степени валидированными. Анализ хромосомных аберраций в метафазе *in vitro*, микроядерные пробы *in vitro* (примечание 1) и анализ генных мутаций клеток лимфомы мышей L5178Y *Tk* (тимидинкиназы) (MLA). Данные три анализа в настоящее время считают в одинаковой степени актуальными, а следовательно, и взаимозаменяемыми при анализе повреждения хромосом при использовании в сочетании с другими испытаниями генотоксичности в рамках стандартной батареи тестов лекарственных средств, в случае если используются протоколы испытаний, представленных в настоящем стандарте.

Примечание 1

Микроядерная проба in vitro широко изучалась в рамках международных совместных исследований (Kirsch-Volders et al., 2003), is validated by ECVAM (Corvi et al., 2008), и описана в руководстве OEC 487 (2010).

Испытания *in vivo* включены в батарею тестов, поскольку некоторые вещества показывают мутагенность *in vivo*, но не *in vitro* (примечание 2), а также потому, что желательно включить анализы, учитывающие такие факторы, как всасывание, распределение, метаболизм и выведение. По данной причине также проведен выбор анализа микрочастиц в эритроцитах (в крови и костном мозге) или хромосомных аберраций в клетках костного мозга в метафазе (примечание 3). Лимфоциты, культивируемые от животных, получавших лечение, также могут использоваться для цитогенетического анализа, несмотря на ограниченный опыт проведения подобного анализа.

Примечание 2

Имеется небольшое, но значительное количество генотоксических канцерогенов, которые возможно надежно выявить в анализах хромосомных поломок, но которые показали отрицательные/слабоположительные/сомнительные результаты в анализах *in vitro в стандартной батарее. Канцерогены, такие как прокарбазин, гидрохинон, уретан и бензин, попадают в эту категорию. Некоторые другие примеры, полученные по результатам исследования, проведенного компаниями, описаны Tweats et al., 2007, II.*

Примечание 3

В принципе, микроядра в гемопоэтических клетках можно исследовать на костном мозге любого биологического вида и в крови тех животных, которые не отфильтровывают циркулирующие микроядерные эритроциты в селезенке. У лабораторных мышей микроядра измеряют в полихроматических эритроцитах крови, а при терапии мышей продолжительностью 4 недели и более могут использоваться зрелые (нормохроматические) эритроциты. Несмотря на то, что в организме крыс микроядерные эритроциты быстро покидают кровоток, было установлено, что в ретикулоцитах крови крыс обнаруживается микроядерная индукция, обусловленная целым рядом кластогенов (Wakata et al., 1998; Hamada et al., 2001). Кровь крыс может использоваться для микроядерного анализа, учитывая методы, используемые для обеспечения анализа вновь сформированных ретикулоцитов (Hayashi et al., 2007; MacGregor et al., 2006), при достаточно большом размере выборки для обеспечения статистической чувствительности при более низком уровне микроядер в крови крыс, по сравнению с костным мозгом (Kissling et al., 2007). Независимо от выбранного метода, анализа в костном мозге или в крови, автоматизированного или ручного анализа, каждая лаборатория должна устанавливать соответствующий размер выборки для обеспечения уровня ошибки ниже уровня вариативности между животными.

В настоящее время имеется определенный опыт микроядерной индукции в организме собак и макак-резус (Harper et al., 2007; Hotchkiss et al., 2008). Одним из примеров полезности данного альтернативного вида может быть оценка метаболита человека, в недостаточной степени представленного у грызунов, но сформированного у собак и макак.

Испытания *in vitro* и *in vivo* для оценки хромосомных аберраций клеток в метафазе выявляют широкий спектр нарушений хромосомной целостности. Поломка хроматид или хромосом может привести к формированию микроядер в случае образования ацентрического фрагмента, поэтому анализы, позволяющие определить хромосомные аберрации или микроядра, подходят для выявления кластогенов. Микроядра могут образоваться вследствие задержки одной или нескольких цельных хромосом в анафазе, поэтому микроядерные пробы потенциально позволяют определить некоторые индукторы анеуплоидии. MLA позволяет выявить мутации гена *Tk*, обусловленные генными мутациями и хромосомными

повреждениями. Имеются сведения о том, что при помощи MLA также возможно выявить утрату хромосом.

Существуют некоторые дополнительные анализы *in vivo,* которые можно использовать в рамках батареи тестов или в качестве дополнительных тестов для получения необходимого объема доказательств при оценке результатов анализов *in vitro* и *in vivo* (см. ниже). Отрицательных результатов соответствующих анализов *in vivo* (обычно двух) с достаточным обоснованием конечных точек и демонстрацией концентраций (см. раздел 4.4) обычно оказывается достаточно для подтверждения отсутствия существенного риска генотоксичности.

2.2 Описание двух вариантов стандартного набора тестов

Следующие два варианта стандартной батареи тестов считаются в равной степени приемлемыми (примечание 4):

Вариант 1

i. Испытание генных мутаций в бактериях.

ii. Цитогенетический тест хромосомных повреждений (анализ хромосомных аберраций в метафазе *in vitro* или микроядерная проба *in vitro*) либо анализ генных мутаций *Tk* в лимфоме мышей *in vitro*.

iii. Тест генотоксичности *in vivo*, обычно тест на хромосомные поломки на гемопоэтических клетках мышей в виде либо микроядерной пробы, либо анализа на хромосомные аберрации в метафазе.

Вариант 2

i. Испытание генных мутаций в бактериях.

ii. Оценка генотоксичности *in vivo* двух разных тканей, обычно микроядерная проба с использованием гемопоэтических клеток грызунов и второй анализ *in vivo*. Как правило, используется анализ поломки нитей ДНК в печени, если не указано иного (см. ниже, раздел 2 и примечание 12).

Примечание 4

Несмотря на возможность использования обоих вариантов батареи тестов, конкретные данные об индивидуальном испытуемом веществе могут свидетельствовать о предпочтительности одного из вариантов. Например, если системные концентрации в моделях животных равны либо менее ожидаемой клинической концентрации, могут использоваться анализы in vitro: вариант 1 (см. также разделы 2.3.4 и 4.4.1). С другой стороны, вариант 2, включая испытания в печени, рекомендован в случаях, когда предполагается, что в печени генерируются короткоживущие реактивные метаболиты.

Исторически опыт выбора варианта 1 шире, отчасти потому, что он основан на версии S2A и B. Однако аргументами в пользу взаимозаменяемости вариантов 1 и 2 включают: при получении положительного результата анализа на клетках млекопитающих *in vitro*, четкие отрицательные результаты двух проведенных анализов *in vivo* в соответствующих тканях при подтвержденной достаточной концентрации считаются достаточными для подтверждения отсутствия генотоксического потенциала *in vivo* (см. пункт 5.4.1.1). Таким образом, стратегия проведения анализа, при которой проводятся два анализа *in vivo*, аналогична стратегии контроля положительного результата *in vitro* (примечание 4).

При проведении испытаний в разных вариантах может использоваться дизайн исследований *in vivo* острой или хронической токсичности. При многократном введении предпринимались попытки включить конечные точки генотоксичности в исследования токсичности, с учетом научной обоснованности. При оценке *in vivo* нескольких конечных точек предпочтительнее включать их в одно исследование. Зачастую имеется достаточно информации о вероятной пригодности доз в рамках исследования длительной токсичности до начала исследования, позволяющих определить целесообразность проведения острого теста или комплексного испытания.

В случае получения отрицательных результатов использование одного из вариантов стандартной батареи тестов, проводимых и оцениваемых в соответствии с текущими рекомендациями, обеспечит достаточные доказательства отсутствия генотоксической активности и в этом случае дополнительных тестов не требуется. В случае получения положительных результатов стандартной батареи тестов в зависимости от их терапевтической пользы, вещество подлежит более тщательному исследованию (см. раздел 5).

Несколько анализов *in vivo* могут быть использованы во второй части оценки *in vivo* в рамках варианта 2 (см. раздел 4.2), некоторые из которых могут быть интегрированы в исследования токсичности многократных доз. Предпочтительной тканью является печень, благодаря характеристикам достигаемых концентраций и метаболизма, но выбор ткани для анализов *in vivo* и видов анализов должен быть основан на понимании потенциального механизма метаболизма *in vivo* или тканей, подверженных воздействию.

Информацию о числовых изменениях можно получить в результате анализов на клетках млекопитающих *in vitro* и микроядерных проб *in vitro* или *in vivo*. Элементы стандартных протоколов, способные

указывать на подобный потенциал, включают повышение митотического индекса, индукцию полиплоидии и микроядерную оценку. Также имеются экспериментальные доказательства того, что в результате MLA могут быть выявлены веретенные яды. Предпочтительным цитогенетическим тестом *in vivo* в соответствии с вариантом 2 является микроядерный анализ, а не тест на хромосомные аберрации, поскольку он имеет больше возможностей для выявления утраты хромосом (потенциал анеуплоидии).

Предполагаемый стандартный набор тестов не подразумевает, что другие тесты генотоксичности являются несостоятельными или нецелесообразными. Для дальнейшего исследования результатов анализа генотоксичности, полученных в результате применения стандартной батареи тестов, могут потребоваться дополнительные анализы (см. разделы 4.2 и 5). Также при условии достаточной валидации могут использоваться другие виды животных, включая не относящихся к грызунам.

При условиях, при которых один или несколько тестов в стандартной батарее не могут быть использованы по техническим причинам, альтернативные валидированные тесты могут обеспечить адекватную замену при условии достаточного научного обоснования.

2.3 Изменения стандартного набора тестов

В следующих разделах представлены ситуации, в которых может потребоваться модификация стандартного набора тестов.

2.3.1 Поисковые клинические исследования

В некоторых поисковых клинических исследованиях может использоваться меньше анализов генотоксичности либо различных критериев обоснования максимальной дозы *in vivo*.

2.3.2 Испытуемые препараты с бактериотоксическим действием

В случае, если вещество имеет бактериотоксические свойства (например, некоторые антибиотики), тем не менее, следует провести тест Эймса на обратную мутацию бактерий, кроме того, должно проводиться испытание цитотоксических веществ в клетках млекопитающих, поскольку мутагенность может возникать при более низких и менее токсичных концентрациях. В подобных случаях также следует провести один из анализов в клетках млекопитающих *in vitro*, т. е. следует проводить анализы по 1-му варианту.

2.3.3 Вещества, по своей структуре имеющие генотоксический потенциал

Вещества с подозрительной структурой (примечание 5) обычно выявляются в рамках стандартного набора тестов, поскольку большинство структурно подозрительных веществ определяют в контексте бактериальной мутагенности. Известно несколько химических классов веществ, которые лучше поддаются определению в рамках анализа повреждения хромосом в клетках млекопитающих, по сравнению с анализами бактериальной мутации. Таким образом, отрицательные результаты проведения стандартного набора тестов для вещества с подозрительной структурой обычно учитывают достаточное доказательство отсутствия генотоксичности. Однако для веществ с подозрительной структурой может быть целесообразна модификация стандартных протоколов (примечание 5). Выбор дополнительных тестов или модификации протокола зависит от химического состава, химической активности и данных о метаболизме вещества с подозрительной структурой.

Примечание 5

Установлено, что некоторые структурно настораживающие химические соединения имеют причинную связь с канцерогенным и/или мутагенным потенциалом химических препаратов. Примеры веществ с опасной структурой включают алкилирующие электрофильные центры, нестабильные эпоксиды, ароматические амины, азо-структуры, N-нитрозогруппы и ароматические нитрогруппы (Ashby and Paton, 1994). Для некоторых классов веществ со специфическими рисками установлено, что специфическая модификация протоколов/дополнительные испытания необходимы для оптимального выявления генотоксичности (например, молекулы, содержащие азогруппу, гликозиды, такие компоненты как нитроимидазолы, которым для активации необходима нитроредукция, такие вещества как фенацетин, требующие для метаболической активации другого вида грызунов S9).

2.3.4 Ограничения по применению тестов in vivo

Существует множество веществ, в отношение которых тесты *in vivo* (обычно в костном мозге, крови или печени) не дают полезной дополнительной информации. К ним относятся вещества, в отношении которых данные о токсикокинетике и фармакокинетике указывают на отсутствие их системной абсорбции, а следовательно, они не попадают в целевые ткани. Примерами таких веществ являются рентгеноконтрастные вещества, антациды на основе алюминия, некоторые ингаляционные препараты, а также лекарственные средства кожного или иного топикального применения. В случаях, когда модификация пути введения не обеспечивает достижения достаточной концентрации в целевых тканях, и если нет воз-

можности провести подходящий анализ генотоксичности в наиболее подверженной воздействию ткани, может быть целесообразным в оценке опираться только на исследования *in vitro*. В некоторых случаях целесообразно проведение оценки генотоксических эффектов в участке контакта, при том что подобные исследования до сих пор не получили широкого распространения (примечание 6).

Примечание 6

Имеется определенный опыт анализов in vivo микроядерной индукции в коже и толстой кишке (Hayashi et al., 2007), и анализы поломки ДНК в этих тканях также могут быть целесообразным заменителем.

2.4 Определение мутагенов зародышевых клеток

Результаты сравнительных исследований показали, что в количественном отношении большинство мутагенов зародышевых клеток могут быть обнаружены по генотоксичности в испытаниях соматических клеток, так что отрицательные результаты испытаний генотоксичности соматических клеток *in vivo* в целом указывают на отсутствие эффектов со стороны зародышевых клеток.

3 Рекомендации в отношении тестов *in vitro*

3.1 Повторение тестов и интерпретация их результатов

Воспроизводимость результатов тестов — важнейший аспект исследований, проводимых с использованием инновационных методов или неожиданных результатов, однако плановый анализ препаратов с использованием стандартных широко применяемых испытаний генотоксичности зачастую не требует повторного проведения. Данные тесты в достаточной степени характеризованы и имеют достаточный внутренний контроль, так что повторение тестов с определенно положительным или отрицательным результатом анализа, как правило, не требуется. В идеале должна быть возможность указать, что в результате проведения теста были достигнуты определенно отрицательные или определенно положительные результаты. Однако результаты испытаний иногда не удовлетворяют установленным критериям положительного или отрицательного результата и, таким образом, их считают «сомнительными». Применение статистических методов анализа может улучшить интерпретацию данных, при этом достаточная биологическая интерпретация имеет критически важное значение. При повторном проведении теста, в результате которого был достигнут сомнительный результат, может быть достигнут (i) определенно положительный результат, тогда общий результат будет положительным, (ii) отрицательный результат, в этом случае результат будет признан невоспроизводимым, а следовательно, и общий результат испытания будет отрицательным, или (iii) еще один сомнительный результат, при котором общий результат остается сомнительным.

3.2 Рекомендованный протокол выявления бактериальных мутаций

Рекомендации по протоколу представлены в руководстве OECD (1997) и отчете IWGT (Gatehouse et al., 1994).

3.2.1 Выбор высоких доз

Максимальные дозы

Максимальная рекомендованная доза составляет 5000 мкг/тарелка (для испытуемых веществ в жидкой форме), без ограничений, обусловленных свойствами растворимости или цитотоксичности.

Предел растворимости

Для бактериальных культур проводят оценку преципитирующих доз при условии, что преципитат не влияет на обработку, токсичность не является лимитирующей, а максимальная концентрация не превышает 5000 мкг/тарелка (или 5 мкл/тарелка — для испытуемых веществ в жидкой форме). В отсутствие наблюдаемой цитотоксичности самую низкую преципитирующую дозу следует использовать в качестве максимальной. Если отмечается цитотоксичность или мутагенность, независимо от растворимости, максимальная доза должна быть установлена с учетом цитотоксичности, как описано ниже.

Предел цитотоксичности

В тесте Эймса установленные дозы должны показывать признаки значительной токсичности, при этом не превышая максимальной дозы 5000 мкг/тарелка. Токсичность может быть установлена по снижению числа ревертантов и/или очистка, и/или уменьшение бактериального газона.

3.2.2 Дизайн исследования / протокол тестов

Рекомендованный набор бактериальных штаммов (OECD) включает штаммы, позволяющие определить замещение основания и мутации со сдвигом рамки считывания следующим образом:

- *Salmonella typhimurium* TA98;

- *Salmonella typhimurium* TA100;
- *Salmonella typhimurium* TA1535;
- *Salmonella typhimurium* TA1537 или TA97, или TA97a;
- и *Salmonella typhimurium* TA102 или *Escherichia coli* WP2 *uvrA*, или *Escherichia coli* WP2 *uvrA* (pKM101).

Одним из отличий от рекомендаций, изложенных в OECD и IWGT, является то, что по имеющемуся опыту испытаний лекарственных средств, однократного теста Эймса оценки обратных бактериальных мутаций достаточно при определенно отрицательном или положительном результате, а также при условии проведения испытания в полном соответствии с протоколом, включая все штаммы с метаболической активацией и без нее, соответствующий диапазон доз, удовлетворяющий критериям для выбора максимальной дозы и соответствующий положительный и отрицательный контроль. Кроме того, при испытании лекарственных средств как включение тарелки, так и метод предварительной инкубации может быть целесообразен для данного однократного эксперимента (примечание 7). Спорные или слабоположительные результаты могут указывать на целесообразность повторного проведения испытания, возможно в рамках модифицированного протокола, например, с установлением соответствующих интервалов между уровнями доз.

Примечание 7

Некоторые химические вещества проще выявить при помощи высевания в тарелки или методом предварительной инкубации несмотря на то, что различия носят обычно количественный, а не качественный характер (Gatehouse et al., 1994). Опыт в фармацевтической области, в рамках которого препараты изучали в рамках обоих протоколов, не привели к получению разных результатов для двух методов, и в отчете IWGT (Gatehouse et al., 1994) примеры химических классов, которые причислены к более просто определяемым в рамках протокола преинкубации, обычно не относятся к классу лекарственных средств и показывают положительный результат в исследованиях генотоксичности in vivo. *К ним относятся короткоцепочечные алифатические нитрозамины, двухвалентные металлы, альдегиды (например, формальдегид, кротональдегид), азокрасители (например, желтый краситель для масла), пирролизидиновые алкалоиды, аллильные вещества (аллилизотиоцианат, аллилхлорид) и нитровещества (ароматические, алифатические).*

3.3 Рекомендованные протоколы для проведения испытаний на клетках млекопитающих

Рекомендации по протоколам изложены в руководстве OECD (1997) и в публикациях IWGT (например, Kirsch-Volders et al., 2003; Moore et al., 2006). Также имеются рекомендации по интерпретации результатов MLA (Moore et al., 2006), включая применение глобального поправочного коэффициента. Здесь приведены некоторые различия от приведенных здесь рекомендаций при испытании лекарственных средств, в частности, при выборе максимальной концентрации (см. подробности ниже).

3.3.1 Выбор максимальной концентрации

Максимальная концентрация

Максимально рекомендованная концентрация составляет 1 мМ или 0,5 мг/мл, в зависимости от того, что ниже, при отсутствии ограничений, обусловленных растворимостью в растворителе или питательной среде или цитотоксичностью (примечание 8).

Примечание 8

Обоснование максимальной концентрации 1 мМ для анализов в клетках млекопитающих in vitro включает следующие компоненты. Батарея тестов включает тест Эймса и анализ in vivo. Данная батарея позволяет оптимизировать определение генотоксических канцерогенов, не опираясь на результаты отдельных тестов. Существует низкая вероятность того, что соответствующие вещества (канцерогены, повреждающие ДНК), не выявляемые в тесте Эймса или анализе генотоксичности in vivo, определимы в анализе в клетках млекопитающих in vitro в концентрациях более 1 мМ. Во-вторых, предельный уровень 1 мМ позволяет поддержать идентификацию элемента риска выше клинического воздействия известных лекарственных средств, включая вещества, концентрирующиеся в тканях (Goodman & Gilman, 2001), что также выше уровней, обычно достигаемых в доклинических исследованиях in vivo. Подтверждено, что в случае некоторых препаратов для достижения терапевтического эффекта требуются достаточно высокие клинические концентрации. Хотя спонсорам может быть интересно сравнение активности с зарегистрированными препаратами, возможно, даже свыше 1 мМ, для определения безопасности для человека наибольшую актуальность имеют анализы in vivo. Для лекарственных средств с нестандартно низкой молекулярной массой (например, менее 200) следует рассмотреть возможность достижения более высоких концентраций исследуемого препарата.

Предел растворимости

В случае ограничивающих характеристик растворимости максимальной концентрацией, при условии ограничения со стороны цитотоксичности, должна быть наиболее низкая концентрация, при которой в культурах присутствует минимальный осадок, при условии отсутствия побочного влияния на расшиф-

ровку. Оценка преципитации может осуществляться на глаз или при помощи инструментальных методов, таких как световая микроскопия, отслеживая осадок, который сохраняется либо появляется в процессе культивирования (к концу терапии).

Цитотоксичность

При проведении цитогенетических анализов *in vitro* хромосомных аберраций в метафазе либо микроядерных проб цитотоксичность может приводить к снижению роста клеток не более чем на 50 % (примечания 9 и 10). Для MLA максимальной дозой должна быть доза, вызывающая 80—90 %-ную цитотоксичность, измеряемая по RTG в пределах 20—10 % (примечание 9).

Примечание 9

Несмотря на то, что некоторые генотоксичные канцерогены не определимы в рамках анализов генотоксичности in vitro, кроме случаев, когда исследуемые концентрации индуцируют определенную степень цитотоксичности, препараты, повреждающие ДНК, обычно определяют лишь при среднем уровне токсичности (Greenwood et al., 2004). По мере роста цитотоксичности другие механизмы, помимо прямого повреждения ДНК веществом или его метаболитами, могут привести к получению «положительных» результатов, обусловленных цитотоксичностью, а не генотоксичностью. Подобная косвенная индукция повреждения ДНК вследствие повреждения не ДНК-структур, вероятнее всего, может возникнуть при концентрации, превышающей определенный порог. Нарушения клеточных процессов не предполагаются при более низких фармакологически актувальных концентрациях.

В цитогенетических анализах даже слабые кластогены с канцерогенными свойствами дают положительный результат, не достигая 50 %-ного снижения числа клеток. С другой стороны, вещества, не обладающие повреждающим ДНК эффектом, мутагенным либо канцерогенным потенциалом, могут вызывать поломку хромосом в токсических концентрациях. Для цитогенетических анализов in vitro, анализа хромосомных аберраций и микроядерной пробы in vitro целесообразным является предельное снижение роста на 50 %.

Для цитогенетических анализов в клеточных линиях изменение популяции клеток с течением времени (за счет измерения изменения числа клеток во время культивирования относительно контроля, например, методом удвоения популяции (PD, примечание 10), является полезным параметром оценки цитотоксичности, поскольку известно, что подсчет числа клеток может привести к недооценке токсичности. Для культур лимфоцитов подавление пролиферации, не превышающее около 50 %, считается достаточным, что может быть определено по митотическому индексу (МИ) для анализа аберраций в метафазе и по индексу, основанному на блокировке цитокинеза для микроядерных тестов in vitro. *Кроме того, для микроядерного теста in vitro, поскольку микроядра оценивают в интерфазе после митотического деления, необходимо подтвердить прохождение клетками клеточного цикла. Этого можно достичь за счет использования цитохалазина В для обеспечения ядерного деления, а не клеточного деления, так что микроядра можно оценить в двухъядерных клетках (предпочтительный метод в случае анализа в лимфоцитах). Для клеточных линий могут применяться другие методы, показывающие пролиферацию клеток, включая рост популяции с течением времени (PD), как описано выше (Kirsch-Volders et al., 2003).*

Для MLA достаточной чувствительности можно достичь за счет ограничения максимальной концентрации, близкой к 20 % относительного общего роста (RTG) (10—20 %) для методов с использованием как мягкого агара, так и микролунок (Moore et al., 2002). Анализ опубликованных данных с использованием текущих критериев определил малое количество веществ с положительным результатом MLA только в концентрациях менее 20 % RTG, представляющих собой канцерогены для крыс, при этом отсутствуют убедительные свидетельства генотоксического канцерогенеза для данной категории. По общему мнению, необходимо с осторожностью подходить к интерпретации результатов при увеличении мутации ниже 20 % RTG, и результат не считался бы положительным при увеличении мутантной фракции при ≤ 10 % RTG.

Таким образом, следует с осторожностью подходить к интерпретации результатов в виде снижения роста/выживаемости или превышающих 50 % для цитогенетического анализа либо 80 % — для MLA. Установлено, что оценка клеток, обрабатываемых при данном уровне цитотоксичности/клональной выживаемости, может привести к повышению чувствительности, но и к более высокому риску нерелевантных положительных результатов. Батарейный подход к анализу генотоксичности должен обеспечить необходимую чувствительность, не опираясь на индивидуальные анализы в клетках грызунов in vitro при высокой цитотоксичности.

Для достижения соответствующего диапазона токсичности необходимо проведение предварительного исследования по подбору диапазона доз в широком диапазоне концентраций, но при проведении анализа генотоксичности зачастую важно использовать различные концентрации с достаточно близкими интервалами (менее чем двукратная степень разведения). Дополнительные концентрации возможно исследовать, но не все концентрации следует оценивать на предмет генотоксичности. Не предполагается проведения множественных экспериментов до достижения четкого 50 %-ного снижения роста либо четкого 80 %-ного снижения RTG.

Примечание 10

Для цитогенетических анализов in vitro целесообразно использовать параметры относительного роста клеток с целью оценки токсичности, поскольку при подсчете клеток токсичность может быть недооценена (Greenwood et al., 2004). При помощи расчетного удвоения популяции (см. Глоссарий) для оценки 50 %-ного уровня

снижения роста было установлено, что частота положительных результатов для веществ без мутагенного или канцерогенного потенциала снижена, в то время как вещества, действующие за счет прямого взаимодействия с ДНК, обеспечивают надежные положительные результаты.

3.3.2 Дизайн исследования /Протоколы испытаний

В целях цитогенетической оценки повреждений хромосом в клетках метафазы *in vitro*, протокол испытания должен включать проведение испытаний с метаболической активацией и без, с использованием соответствующего положительного и отрицательного контроля. Терапия исследуемыми препаратами должна иметь продолжительность от 3 до 6 часов, а время пробоотбора должно приблизительно в 1,5 раза превышать обычный клеточный цикл от начала терапии. Непрерывная терапия без метаболической активации продолжительностью, приблизительно в 1,5 раза превышающей нормальный клеточный цикл, должна проводиться при получении отрицательных или сомнительных результатов обоих циклов краткосрочной терапии с метаболической активацией и без нее. Аналогичные принципы распространяются на микроядерную пробу *in vitro*, с тем отличием, что время пробоотбора, как правило, составляет 1,5—2 нормальных клеточных цикла от начала терапии, чтобы обеспечить возможность полного прохождения клетками митоза и вхождения в следующую интерфазу. Для обоих цитогенетических анализов *in vitro* может потребоваться модификация протокола к определенным типам химических веществ, которые проще определить при более длительной терапии, отсрочивании пробоотбора или периода восстановления, например, некоторые нуклеозидные аналоги и некоторые нитрозамины. В метафазном анализе аберраций информацию о плоидическом статусе получают за счет регистрации частот полиплоидных (включая эндоредуплицированные) метафаз в виде процента от числа клеток в метафазе. Для MLA протокол испытания должен включать проведение испытаний с метаболической активацией и без с соответствующим положительным и отрицательным контролем при продолжительности терапии исследуемым препаратом 3—4 часа. Длительная терапия без метаболической активации продолжительностью около 24 часов должна проводиться в случае получения отрицательного или сомнительного результата обоих краткосрочных циклов терапии с метаболической активацией и без нее. Стандартный MLA должен включать (i) положительный контроль, индуцирующий, главным образом, малые колонии, и (ii) изменение размера колоний для положительного контроля, контроль растворителей и минимум одну положительную концентрацию исследуемого компонента (при наличии), включая культуру, характеризующуюся наибольшей частотой выявления мутаций.

Для исследований на клетках млекопитающих *in vitro* должны использоваться встроенные подтверждающие элементы, подобные перечисленным выше (например, различная продолжительность терапии, тесты с метаболической активацией и без нее). После подобных анализов дальнейшие подтверждающие испытания в случае получения определенно отрицательных или положительных результатов, как правило, не требуются. При получении сомнительных или слабоположительных результатов могут потребоваться повторные тесты, возможно, в рамках модифицированного протокола, например, с установлением иных интервалов исследуемых концентраций.

3.3.3 Положительный контроль

Одновременное проведение тестов на положительных контрольных образцах важно, однако тесты на клетках млекопитающих с целью выявления генетической токсичности в достаточной степени стандартизированы, так что использование положительных контрольных образцов обычно ограничивается использованием их в случае метаболической активации (при одновременном проведении с тестами без активации) с целью продемонстрировать активность системы метаболической активации и восприимчивости тест-системы.

4 Рекомендации по проведению испытаний *in vivo*

4.1 Тесты, проводимые с целью определения хромосомных повреждений *in vivo*

Для определения кластогенов подходит либо анализ хромосомных аберраций, либо измерение микроядерных полихроматических эритроцитов в костном мозге *in vivo*. Для проведения микроядерной пробы в костном мозге в качестве модели подходят и крысы, и мыши. Микроядра также можно исследовать в незрелых (например, полихроматических) эритроцитах в периферической крови мышей либо в новообразованных ретикулоцитах в крови крыс (примечание 3). Аналогичным образом также могут использоваться незрелые эритроциты животных любого другого вида, характеризующиеся аналогичной чувствительностью к определению индукторов кластогенов/анеуплоидии в костном мозге или периферической крови (примечание 3). При условии надлежащей валидации могут использоваться системы автоматизированного анализа (визуальный анализ и проточная цитометрия) (OECD, 1997; Hayashi et al.,

2000; 2007). Анализ хромосомных аберраций также можно провести в периферических лимфоцитах, полученных от грызунов, получавших терапию (примечание 11).

Примечание 11

В некоторых случаях полезно исследовать хромосомные аберрации в метафазе в лимфоцитах, взятых от испытуемых животных после одного или нескольких введений исследуемого вещества, а также могут использоваться клетки костного мозга в метафазе. Поскольку лимфоциты циркулирующей крови не размножаются, предполагается, что вещества, требующие репликации для выявления генотоксического действия (например, некоторые нуклеозидные аналоги), не должны выявляться в клетках данного типа. Поскольку некоторые лимфоциты имеют достаточно высокую продолжительность жизни, в принципе, существует потенциал аккумуляции непарного повреждения ДНК in vivo, который может привести к аберрациям при стимуляции деления клеток in vitro. Анализ лимфоцитов in vivo полезен при контроле показаний кластогенности, но в целом другие ткани, такие как печень, представляют собой более информативную замену теста микроядер в гемопоэтических клетках, поскольку концентрации препарата и метаболитов в печени зачастую выше.

4.2 Другие испытания генотоксичности *in vivo*

Аналогичные испытания *in vivo*, описанные в качестве второго испытания в рамках стандартного набора тестов (вариант 2), могут использоваться в качестве контрольных испытаний для получения необходимого набора данных для оценки результатов анализов *in vitro* или *in vivo* (примечания 11 и 12). Несмотря на то, что тип эффектов, наблюдаемых *in vitro,* и знание механизма может помочь при выборе анализа *in vivo*, проведение исследований хромосомных аберраций или генных мутаций эндогенных генов в большинстве тканей нецелесообразно проводить стандартными методами. Несмотря на то, что мутации можно определять в трансгенах грызунов, это подразумевает более продолжительную терапию (например, в течение 28 дней) для экспрессии, фиксации и аккумуляции мутаций, особенно в тканях с медленно делящимися клетками (примечание 12). Таким образом, во втором анализе *in vivo* в качестве суррогатной конечной точки проводят оценку повреждения ДНК. Анализы с наиболее полным опубликованным опытом и рекомендациями в рамках протоколов включают анализы поломки нитей ДНК, в том числе анализ единичной клетки методом гель-электрофорез («Кометный анализ») и анализ разрывов ДНК, анализы трансгенных мутаций на мышах *in vivo* и анализы ковалентного связывания ДНК (любой из которых может применяться во многих тканях, примечание 12), и анализ репаративного синтеза ДНК в печени (анализ UDS).

Примечание 12

Включение второго анализа in vivo в батарею тестов должно обеспечить отсутствие генотоксичности за счет использования тканей, в которых достигаются высокие концентрации препарата и/или его метаболитов, небольшое число канцерогенов, предполагающих генотоксичность, обеспечили достижение положительных результатов теста в печени, но имели отрицательный результат цитогенетического анализа in vivo в костном мозге. Эти примеры, вероятно, отражают отсутствие необходимой метаболической активности либо отсутствие поступления реактивных промежуточных продуктов в гемопоэтические клетки костного мозга.

Анализ разрывов нитей ДНК, ДНК-аддукты и мутации трансгенов имеют преимуществом возможность использования во многих типах тканей. Протоколы, согласованные на международном уровне, пока не разработаны для всех анализов in vivo, хотя существует достаточный опыт и опубликованные данные, и рекомендации протокола в отношении анализов поломки нитей ДНК (кометный анализ и анализ методом щелочной элюции), аддукт ДНК (ковалентное связывание) и анализа мутации на трансгенных грызунах, помимо анализа UDS. Для веществ с положительным результатом анализа MLA in vitro и индуцирующего преимущественно крупные колонии, а также не вызывающего поломку хромосом в метафазном анализе in vitro, вместо анализа разрыва нитей ДНК следует рассмотреть анализ мутаций in vivo, например, анализ мутаций на трансгенных мышах. Анализ UDS считается полезным, главным образом, для веществ, индуцирующих объемные аддукты ДНК либо с положительным результатом теста Эймса. Поскольку цитотоксичность провоцирует разрыв нитей ДНК, во избежание искажения результатов анализа разрыва нитей ДНК следует провести тщательную оценку цитотоксичности. Это явление хорошо описано в отношении теста методом щелочной элюции in vitro *(Storer et al., 1996), при этом не полностью валидировано для кометного анализа. В принципе, анализ разрыва нитей ДНК может применяться в рамках токсикологических исследований многократных доз с необходимым уровнем доз и продолжительностью пробоотбора.*

Поскольку печень зрелых животных не отличается высокой митотической активностью, для второго анализа часто используют не цитогенетическую конечную точку, но при наличии делящихся гепатоцитов, например, после частичной гепатэктомии, либо у молодых крыс (Hayashi et al., 2007), возможно проведение микроядерного анализа в печени, позволяющего выявить известные генотоксические вещества.

4.3 Выбор доз в рамках анализа *in vivo*

Обычно анализ проводят с использованием трех уровней доз (Hayashi et al., 2005).

4.3.1 Краткосрочные исследования

Для краткосрочных исследований (1—3 дозы) максимально рекомендованная доза для исследований генотоксичности представляет собой предельную дозу 2000 мг/кг при условии хорошей переносимости либо максимально переносимую дозу, определяемую (например, для микроядерного анализа (OECD)) как дозу, вызывающую признаки токсичности такой степени выраженности, чтобы более высокие дозы при сохранении аналогичного режима дозирования привели бы к летальному исходу. Аналогичные рекомендации действуют в отношении кометного анализа (Hartmann et al., 2003) и трансгенного анализа мутаций (Heddle et al., 2000). Подавление продукции эритроцитов костным мозгом также следует учитывать при выборе дозы. Интервалы между более низкими дозами, как правило, в два-три раза ниже заданного.

4.3.2 Исследования многократного применения

Вариант 1 набора

В случае если анализ генотоксичности *in vivo* интегрирован в токсикологическое исследование многократного применения, дозы, как правило, считаются подходящими, если токсикологическое исследование отвечает критериям исследования, подкрепляющего клинические исследования с участием человека, что может отличаться от критериев выбора дозы в руководстве OECD при проведении микроядерной пробы *in vivo*. Это относится и к случаям отрицательных результатов анализа на клетках млекопитающих *in vitro* («несвойственно положительный», см. раздел 5).

Пострегистрационные исследования или набор тестов по варианту 2

При проведении пострегистрационных исследований с целью проверки любого из показаний по генотоксичности или при использовании 2-го варианта без проведения анализа на клетках млекопитающих *in vitro* следует учитывать несколько факторов для определения целесообразности максимальной дозы для оценки генотоксичности. Любого из нижеприведенных критериев достаточно для того, чтобы подтвердить, что максимальная доза в токсикологическом исследовании (обычно на крысах) подходит для микроядерной пробы и для других оценок генотоксичности:

i. Максимально допустимая доза (МПД) на основании физико-химических свойств препарата в основе (при условии, что МПД для данной основы аналогична МПД, достигаемой при остром введении; примечание 13).

ii. Предельная доза 1000 мг/кг для исследований продолжительностью 14 дней и больше, при условии удовлетворительной переносимости.

iii. Максимально возможная концентрация достигается за счет достижения плато/насыщения концентрации либо за счет накопления вещества. Напротив, при существенном снижении концентрации исходного препарата с течением времени (например, ≥ 50 % снижение от начальной концентрации) исследование может быть дисквалифицировано (за исключением случаев, когда доступен образец крови, взятый в первые несколько дней). Если данный эффект наблюдается у животных одного пола, как правило, у животных с меньшей концентрацией не будет проводиться оценки в конце исследования, за исключением случаев повышения концентрации интересующего метаболита.

iv. Максимальная доза составляет 50 % от максимальной дозы, используемой в экспериментах по однократному приему, т. е. приближена к минимальной летальной дозе, если подобные острые данные доступны по какой-либо иной причине (максимальная доза для микроядерных проб при однократном приеме, описанных в руководстве OEDC в качестве дозы, выше которой можно ожидать летальности), аналогичные рекомендации предоставляют и для других анализов *in vivo* (например, Hartmann et al., 2003).

Выбор максимальной дозы на основании только коэффициента концентрации (многократное и клиническое воздействие) без признаков токсичности не является достаточно обоснованным.

Примечание 13

Это, как правило, актуально для распространенных основ, таких как водный раствор метилцеллюлозы, но для таких основ, как Твин 80, вводимый объем может быть в 30 раз ниже, чем в острых экспериментах.

4.3.3 Испытуемые препараты, оказывающие токсическое действие на кровь и костный мозг

Многие вещества, индуцирующие анеуплоидию, такие как мощные веретенные яды, определимы в микроядерных пробах костного мозга или крови *in vivo* только в узком диапазоне доз, приближенных к токсическим. Это справедливо и для некоторых кластогенов. В случае, если токсикологические данные свидетельствуют о тяжелой токсичности в отношении эритроцитов (например, выраженная супрессия

полихроматических эритроцитов (ПХЭ) либо ретикулоцитов), интервал между учитываемыми дозы должен быть не более чем в 2 раза ниже максимальной цитотоксической дозы. Если подходящие дозы не включены в исследование продолжительностью несколько недель, дополнительные данные могут помочь выявить анеугены и некоторые токсичные кластогены любым из следующих способов:

i. По мере увеличения продолжительности терапии при выраженном нарастании токсичности рекомендовано раннее взятие образцов крови (на 3—4-й день). Например, если в микроядерной пробе в рамках многонедельного анализа используется кровь или костный мозг и ретикулоциты классифицируют, выраженная гематотоксичность может повлиять на способность к выявлению микроядер, т. е. доза, индуцирующая определимый рост микроядер после однократного введения, может быть чрезмерно токсичной в случае анализа при многократном введении (Hamada et al., 2001). Ранние образцы могут использоваться для обеспечения выявления кластогенов и потенциальных анеугенов (см. примечания 14 и 15).

ii. Микроядерная проба в клетках млекопитающих *in vitro*.

iii. Микроядерная проба в костном мозге при однократном введении.

Примечание 14

Необходимо с осторожностью подходить к токсикологическим исследованиям, включающим взятие дополнительных образцов крови, например, для определения концентраций. Кровотечение может привести к искажению результатов микроядерного анализа, поскольку эритропоэз, стимулируемый взятием крови, может спровоцировать рост числа микроядерных эритроцитов.

Примечание 15

Рост числа микроядер может произойти и без введения генотоксического агента вследствие нарушения эритропоэза (например, регенеративная анемия, экстрамедуллярный гемопоэз, стресс и гипо- и гипертермия (анализ Tweats et al., 2007, I)). В крови изменение функции селезенки, влияющее на клиренс микроядерных клеток из крови, могло привести к незначительному росту циркулирующих микроядерных эритроцитов.

4.4 Демонстрация концентраций в целевых тканях при отрицательных результатах анализов *in vivo*

Исследования *in vivo* играют важную роль в разработке стратегии исследований генотоксичности. Ценность результатов исследований *in vivo* напрямую связана с подтверждением достаточной концентрации испытуемого вещества в целевой ткани. Это особенно актуально при получении отрицательных результатов анализа *in vivo*, если испытания *in vitro* убедительно доказали наличие генотоксичных свойств или в случае, если не проводится анализ на клетках млекопитающих *in vitro*. Доказательством достаточной концентрации могут быть признаки токсичности в исследуемой ткани либо токсикокинетические данные, представленные в следующем разделе.

4.4.1 В случае положительного результата испытания генотоксичности in vitro (или если исследование не проводилось)

Оценка концентраций, достигнутых *in vivo*, должна проводиться при максимальной дозе или при других релевантных дозах на животных того же вида, линии и при аналогичном пути дозирования, используемого в рамках анализа генотоксичности. В случае, если оценку генотоксичности проводят в рамках токсикологических анализов, информация о концентрациях обычно доступна в рамках токсикологической оценки.

Оценка концентрации *in vivo* может проводиться по одному из следующих методов:

i. Цитотоксичность:

a. Для цитогенетических анализов: За счет достижения существенного изменения пропорции незрелых эритроцитов в числе общего пула эритроцитов в целевой ткани (костный мозг или кровь) в дозах и при времени пробоотбора в рамках микроядерной пробы или за счет измерения значительного снижения митотического индекса в рамках анализа хромосомных аберраций.

b. Для других анализов генотоксичности *in vivo*: Токсичность в печени или изучаемых тканях, например, методом гистопатологической оценки или индикаторов токсичности по показателям биохимического анализа крови.

ii. Воздействие препарата:

a. Измерение материала препарата в крови и плазме. Ткани костного мозга характеризуются высокой перфузией, а уровень лекарственного материала в крови или плазме в целом аналогичен такому в костном мозге. Предполагается, что системное воздействие препаратов на печень наблюдается независимо от пути введения.

b. Прямое измерение материала, связанного с препаратом, в целевых тканях, либо ауторадиографическая оценка тканевых концентраций.

Если системные концентрации одинаковы или ниже ожидаемой клинической концентрации, могут использоваться альтернативные стратегии, такие как:

i. Использование иного пути введения;

ii. Использование разных видов животных с более высокими концентрациями;

iii. Использование иной ткани или анализа (см. раздел 2.3.4, «Ограничения по использованию стандартных испытаний *in vivo*»).

При невозможности достижения достаточной концентрации (например, вещества с малой степенью доступности в целевых тканях) традиционные испытания генотоксичности *in vivo* проводить нецелесообразно.

4.4.2 Отрицательные результаты испытаний генотоксичности in vitro

Если анализы *in vitro* не показывают генотоксического потенциала, *in vivo* (системную) концентрацию можно оценить одним из вышеуказанных методов или вычислить по результатам стандартных исследований всасывания, распределения, метаболизма и выведения (ADME) на грызунах, проводившихся в иных целях.

4.5 Пробоотбор/время проведения анализов *in vivo*

Выбор времени пробоотбора в микроядерных пробах *in vivo* и испытаниях хромосомных аберраций и испытаний UDS должен осуществляться в соответствии с OECD (1997).

В случае, когда микроядерный анализ интегрируют в исследования продолжительностью несколько недель, отбор образцов крови или костного мозга может производиться на следующий день после последнего введения (см. рекомендации в отношении дополнительного времени пробоотбора выше).

Для других анализов генотоксичности время пробоотбора следует выбирать в соответствии с конечными точками, например, анализ поломок ДНК/нитей ДНК обычно производят через несколько (например, через 2—6) часов после последнего введения дозы препарата несколько раз в сутки. В случае однократного введения два момента пробоотбора следует использовать через несколько часов и через 24 часа после окончания терапии.

В принципе исследования любой продолжительности можно считать приемлемыми, учитывая достаточность максимальной дозы / концентрации.

4.6 Количество анализируемых животных

Количество анализируемых животных определяют в соответствии с текущими рекомендациями в отношении микроядерной пробы (OECD) или иных анализов генотоксичности и, как правило, их общее число не соответствует числу животных, получавших терапию в рамках токсикологического исследования. Животные, используемые для анализа генотоксичности, должны в случайном порядке отбираться из группы животных в токсикологическом исследовании.

4.7 Использование самцов/самок грызунов в исследованиях генотоксичности *in vivo*

В случае проведения испытаний препаратов, применяемых с учетом пола, анализ может проводиться на животных соответствующего пола. Испытания *in vivo* с краткосрочным протоколом обычно проводятся на животных одного пола. При проведении краткосрочных испытаний может быть рассмотрена возможность использования животных обоих полов, если существующие данные о токсичности, метаболизме и концентрациях препарата ($C_{макс}$ или AUC) указывают на токсикологически значимое межполовое различие у биологического вида, используемого при проведении испытаний. В противном случае для испытаний острой генотоксичности предпочтительнее использовать только самцов. В случае если испытание генотоксичности проводится в рамках токсикологического исследования многократных доз на животных обоего пола, образцы могут быть взяты у животных обоих полов, однако при отсутствии существенных межполовых различий в отношении токсичности/метаболизма оценку следует проводить по животным одного пола. Уровень доз для животных, проходящих оценку, должен соответствовать критериям выбора необходимого уровня доз (см. разделы 4.3.2 и 4.3.3).

Аналогичные принципы применимы к другим анализам генотоксичности *in vivo*.

4.8 Путь введения

Путем введения обычно является ожидаемый клинический путь, т. е. перорально, внутривенно или подкожно, но он может быть соответствующим образом модифицирован для достижения необходимых системных концентраций, например, для препаратов топикального пути введения (см. раздел 2.3.4).

4.9 Использование положительного контроля в исследованиях *in vivo*

В исследованиях *in vivo* считается достаточным использовать положительный контроль лишь периодически, а не параллельно с каждым анализом после подтверждения компетентности лаборатории в отношении применения данного анализа (примечание 16).

Примечание 16

Положительный контроль для краткосрочных исследований генотоксичности или исследований повторных доз:

Для микроядерных (и других цитогенетических) анализов цель положительного контроля заключается в подтверждении того, чтобы лица, проводящие оценку слайдов, могли с высокой степенью надежности выявить микроядерный рост. Это достижимо за счет использования образцов периодических исследований (через каждые несколько месяцев) малых групп животных (одного пола), получающих острую терапию с положительным контролем. При ручной оценке такие слайды могут быть включены в кодированные слайды, оценивавшиеся для каждого исследования. Положительные контрольные слайды не должны быть очевидными для аналитиков на основании свойств окрашивания либо частоты микроядер. В случае автоматической оценки для каждого анализа должны использоваться соответствующие образцы для контроля качества.

Для других генотоксических анализов in vivo цель положительного контроля заключается в подтверждении надежного определения нарастания поломок ДНК/мутагенности при помощи анализа на выбранном биологическом виде, ткани и в рамках выбранного протокола. После того, как лаборатория показала способность непрерывно выявлять соответствующие положительные контрольные вещества в множестве независимых экспериментов, периодическое выполнение положительных контрольных экспериментов в целом является достаточным при условии неизменности условий эксперимента. Однако в настоящее время наличие одновременного положительного контроля для кометного анализа крайне желательно.

5 Рекомендации по оценке результатов испытаний и стратегий контрольных испытаний

Сравнительные исследования убедительно показали, что каждая тест-система *in vitro* позволяет достичь ложноотрицательных и ложноположительных результатов в отношении характеристик канцерогенности у грызунов. Батареи тестов генотоксичности (*in vitro* и *in vivo*) позволяют определить канцерогены, механизм которых обусловлен непосредственно генетическими поломками, как в случае большинства известных канцерогенов человека. Следовательно, эти батареи тестов не способны выявить канцерогены, не обладающие генотоксическими свойствами. Условия проведения экспериментов, например вследствие ограниченной мощности систем активации метаболизма *in vitro*, могут привести к ложноотрицательным результатам. Применение батареи тестов направлено на снижение риска получения ложноотрицательных результатов для веществ с генотоксическим потенциалом. С другой стороны, положительный результат анализа генотоксичности не всегда означает, что данное вещество представляет собой опасность для человека с точки зрения генотоксичности/канцерогенности.

Несмотря на то, что положительные данные *in vitro* могут указывать на подлинные генотоксические свойства препарата, соответствующие данные *in vivo* в большинстве случаев позволяют установить биологическую значимость результатов, полученных *in vitro*. Кроме того, в связи с существованием нескольких непрямых механизмов генотоксичности, развивающихся лишь при небольшом повышении концентраций, возможно определить безопасный уровень (порог) для классов препаратов с признаками подобных механизмов (см. пункт 5.2 ниже, Müller and Kasper, 2000; Scott et al., 1991; Thybaud et al., 2007).

5.1 Оценка биологической актуальности

Нижеизложенные рекомендации предполагают, что испытание проводилось с необходимым интервалом между дозами, уровнем токсичности и т. д.

Небольшой рост явной генотоксичности *in vitro* или *in vivo* следует оценивать с точки зрения воспроизводимости и биологической значимости. Примеры результатов, не имеющих биологической значимости, включают:

i. Небольшой статистически значимый рост, по сравнению с отрицательным контролем или растворителем, но не выходящий за рамки доверительных интервалов соответствующего исторического контроля для данного испытательного центра.

ii. Слабый/сомнительный невоспроизводимый ответ.

При условии удовлетворения одному из вышеназванных условий, есть основания предполагать отсутствие генотоксического потенциала, результаты испытания считают отрицательными и не имеющими биологической актуальности, при этом дальнейших анализов проводить не требуется.

5.2 Оценка результатов, полученных в испытаниях *in vitro*

При оценке положительных результатов испытания бактериальной мутагенности следует учитывать чистоту испытуемого вещества с целью определения обусловленности положительного результата контаминантом.

5.2.1 Оценка положительных результатов, полученных в рамках анализа бактериальной мутации in vitro

Поскольку положительные результаты теста Эймса указывают на химическую активность ДНК, обширные пострегистрационные испытания с целью оценки мутагенного и канцерогенного потенциала *in vitro* необходимы для оценки потенциального риска при терапии пациентов, за исключением случаев, когда это обосновано соответствующим анализом оценки риска/пользы.

Имеются некоторые хорошо изученные примеры артефактного роста колоний, не являющихся истинно ревертантными. Они могут быть обусловлены контаминацией аминокислотами (т. е. представлением гистидина для штаммов *Salmonella typhimurium* или триптофаном для штаммов *Escherichia coli*), следовательно, анализ бактериальной реверсии не подходит для пептида, который может подлежать распаду. В некоторых случаях положительные результаты анализов бактериальной мутации могут не указывать на наличие генотоксического потенциала *in vivo* у человека, например в случае специфического бактериального метаболизма, например активация бактериальными нитроредуктазами.

5.2.2 Оценка положительных результатов анализов на клетках млекопитающих in vitro

Рекомендации по оценке совокупности данных и пострегистрационных испытаниях при получении положительных результатов анализа генотоксичности обсуждаются в отчетах IWGT (например, Thybaud et al., 2007). Кроме того, в научной литературе представлен ряд условий, которые могут привести к положительному результату анализа *in vitro* сомнительной значимости. Следовательно, любой положительный результат анализов *in vitro* следует оценивать с учетом совокупности данных, перечисленных ниже. Дан неполный список, однако он позволяет принять решение.

i. Данные условия не проявляются *in vivo* (pH; осмоляльность, преципитат).

(Следует учесть, что предельное значение 1 мМ позволяет избежать увеличения осмоляльности и если исследуемое вещество изменяет уровень pH, желательно скорректировать pH до нормального уровня pH в необработанных культурах в период терапии).

ii. Эффект развивается только при наиболее токсичных концентрациях.

При анализе MLA рост на ≥ 80 % приводит к снижению RTG.

В цитогенетических исследованиях *in vitro* при подавлении роста на ≥ 50 %.

В случае удовлетворения одному из вышеуказанных условий, если существующие данные свидетельствуют об отсутствии генотоксического потенциала, можно придерживаться стандартной батареи тестов (вариант 1). Таким образом, однократного испытания *in vivo* будет достаточно.

5.2.3 Оценка отрицательных результатов in vitro

Для отрицательных результатов анализов *in vitro* в особых случаях следует рассмотреть возможность проведения дополнительных анализов (приведен неполный список, примеры даны лишь для помощи при принятии решений). Структура вещества или известные свойства метаболизма указывают на то, что стандартная технология метаболической активации *in vitro* (например, печень грызунов S9) может быть недостаточной, структура либо подтвержденные свойства активности вещества указывают на возможную целесообразность использования иных методов/систем.

5.3 Оценка результатов, полученных в испытаниях *in vivo*

Испытания *in vivo* имеют преимущество анализа всасывания, распределения и выведения, не учитываемых в испытаниях *in vitro*, но потенциально актуальны и при применении у человека. Кроме того, характеристики метаболизма более актуальны *in vivo*, по сравнению с системами, обычно используемыми *in vitro*. Если результаты анализов *in vivo* и *in vitro* не согласуются между собой, различие можно учесть/объяснить в индивидуальном порядке (имеется в виду различие метаболизма, быстрого и эффективного выведения вещества *in vivo)*.

Анализы генотоксичности *in vivo* также потенциально могут дать ложноположительные результаты, не свидетельствующие об истинной генотоксичности. Например:

i. Микроядерный рост может возникнуть без введения генотоксического вещества в связи с нарушением эритропоэза (Tweats et al., 2007, I).

ii. Данные об аддукции ДНК следует интерпретировать в свете известного фонового уровня эндогенных аддуктов.

ii. Непрямые эффекты, связанные с токсичностью, могут повлиять на результаты анализов разрыва нитей ДНК (например, методом щелочной элюции или кометного анализа).

Таким образом, при оценке данных генотоксичности важно учесть все токсикологические и гематологические результаты (примечание 15). Непрямые эффекты, связанные с токсикологическими изменениями, могут иметь резерв безопасности и не являться клинически значимыми.

5.4 Стратегии последующей разработки при получении положительных результатов

5.4.1 Последующая работа по результатам испытаний в клетках млекопитающих in vitro

В следующем обсуждении представлены отрицательные результаты теста Эймса на бактериальные мутации.

5.4.1.1 Последующие механистические/in vivo испытания

В случае недостаточного объема информации об отсутствии актуальности рекомендованные последующие испытания при положительном результате анализа на клетках млекопитающих необходимы для получения экспериментальных результатов в дополнительных исследований *in vitro* (см. i ниже) *или* за счет проведения двух соответствующих анализов *in vivo* (см. пункт ii ниже) следующим образом:

i. Механистическая информация, которая свидетельствует об отсутствии совокупности данных об отсутствии актуальной генотоксичности *in vitro*, например, данные о том, что испытуемое вещество, индуцирующее хромосомные аберрации или мутации в MLA, не повреждает ДНК (например, другие отрицательные результаты испытаний мутации/повреждения ДНК в дополнение к тесту Эймса; структурные аспекты), либо имеется свидетельство непрямого механизма, который может быть неактуальным *in vivo* или иметь пороговое значение (например, подавление синтеза ДНК, реактивный кислород, продуцируемый только в высоких концентрациях) (Galloway et al., 1998; Scott et al., 1991; Müller and Kasper, 2000). Сходные исследования могут использоваться для последующего анализа положительных результатов в микроядерной пробе *in vitro*, либо в данном случае свидетельства включают известный механизм, указывающий на потерю хромосом/анеуплоидию либо эксперименты по окрашиванию центромеров (примечание 17), подтверждающие выпадение хромосомы. Полиплоидия — часто встречаемый результат анализов хромосомных аберраций *in vitro*. Несмотря на то, что анеугены способны к индукции полиплоидии, только полиплоидия не указывает на анеугенный потенциал и может свидетельствовать об отклонении клеточного цикла, и также часто характеризуется ростом цитотоксичности. В случае полиплоидии в отсутствие структурной хромосомной поломки в анализе *in vitro*

ii. Аналогичные исследования могут использоваться для отслеживания положительного результата микроядерного анализа *in vitro* или в этом случае имеются свидетельства, включающие известный механизм выявления хромосомной поломки/анеуплоидии либо эксперименты по окрашиванию (примечание 17). При проведении исследований хромосомных аберраций *in vitro* часто обнаруживается полиплоидия. Хотя анеугены способны индуцировать полиплоидию, сама по себе она не указывает на анеугенный потенциал и может попросту свидетельствовать о нарушении клеточного цикла, при этом ее часто ассоциируют с ростом цитотоксичности. В случае полиплоидии, но при отсутствии структурных хромосомных поломок в анализе *in vitro*, как правило, отрицательный результат микроядерной пробы *in vivo*, при условии соответствующего воздействия, дает достаточное подтверждение отсутствия потенциала индукции анеуплоидии.

iii. Если вышеуказанная механистическая информация и совокупность имеющихся данных подтверждает отсутствие генотоксичности, для подтверждения отсутствия генотоксической активности используют лишь один анализ *in vivo*, при условии соответствующего воздействия. Как правило, речь идет о цитогенетическом анализе, а микроядерный анализ *in vivo* используют для дальнейших анализов хромосомных поломок.

При отсутствии достаточных данных или механистической информации для исключения соответствующего генотоксического потенциала, обычно проводят два испытания *in vivo* с соответствующими конечными точками и в соответствующих тканях (обычно две различные ткани) с целью достичь достаточной степени воздействия в моделях *in vivo*.

Либо

iv. Проводятся два соответствующих анализа *in vivo* с использованием разных тканей и подтверждающих степень воздействия.

Таким образом, отрицательные результаты соответствующих анализов *in vivo* с достаточным обоснованием измеряемых конечных точек и подтверждением степени воздействия (см. раздел 4.4.1) считаются достаточными для подтверждения отсутствия значительного генотоксического риска.

Примечание 17

Для того, чтобы определить, вызвана ли микроядерная индукция в первую очередь потерей хромосомы либо поломкой хромосомы, микроядра могут быть окрашены in vitro либо in vivo для установления наличия центромеров, например, в рамках анализа флуоресцентной гибридизации in situ (FISH) с зондами к последовательностям ДНК в центромерном участке, либо меченым антителом к белкам, содержащим кинетохору. Если большинство индуцированных микроядер содержат центромеры, это свидетельствует об утрате хромосомы (следует учесть, что даже мощные яды трубочек, такие как колхицин и винбластин, продуцируют кинето-

хор-положительные микроядра не в 100 %, а чаще в 70—80 % и являются основными анеугенами для оценки риска). Альтернативный подход заключается в проведении анализа *in vitro или in vivo структурных аберраций в метафазе. В случае отрицательного результата можно предположить, что индукция микроядер связана с утратой хромосом.*

5.4.1.2 Дальнейшие анализы после получения положительного результата анализа in vitro, в зависимости от активации S9

В случае, когда положительные результаты наблюдаются только в присутствии системы активации S9, вначале следует подтвердить, что этот результат достигнут только вследствие метаболической активации, а не иных различий в условиях (например, низкий уровень или отсутствие сыворотки в миксе S9 и ≥10 % сыворотки в неактивированных культурах). В этом случае стратегия последующих испытаний направлена на определение соответствия результатов исследований *in vitro* условиям *in vivo* и главным образом будет опираться на результаты анализов *in vivo* в печени (примечание 18).

Примечание 18

Стандартный индуцированный микс S9 имеет более высокие возможности к активации, чем S9 человека, при этом в нем отсутствует способность к детоксификации во второй фазе, за исключением случаев воздействия специфических кофакторов. Кроме того, неспецифическая активация может возникнуть in vitro при высоких концентрациях субстрата (см. Kirkland et al., 2007). Полезными могут оказаться испытания генотоксичности S9 человека либо других релевантных систем активации. Анализ профиля метаболитов в рамках испытаний генотоксичности по сравнению с известными профилями метаболитов в доклиническом виде (либо в неиндуцированных микросомах либо гепатоцитах, либо in vivo) или в препаратах, полученных от человека, также может помочь определить актуальность результатов испытания (Ku et al., 2007), а последующие исследования сконцентрируются на исследованиях в печени in vivo. Вещество, для которого были достигнуты положительные результаты in vitro для S9, могут не вызывать генотоксичности in vivo, поскольку метаболит не формируется, формируется в очень малых количествах либо метаболически детоксифицирован, либо быстро выводится, что свидетельствует об отсутствии риска in vivo.

5.4.2 Дальнейшие анализы в случае положительной микроядерной пробы in vivo

В случае увеличения числа микроядер *in vivo* следует провести оценку всех токсикологических данных для установления вероятности того, что основной причиной или сопутствующим фактором может быть негенотоксический эффект (примечание 15). В случае неспецифических эффектов нарушения эритропоэза или физиологии (например, гипо/гипертермия) более целесообразным может стать анализ хромосомных аберраций *in vivo*. При подозрении на «реальный» рост следует использовать стратегии, показывающие на обусловленность роста выпадением либо поломкой хромосом (примечание 17). Имеются свидетельства того, что индукция анеуплоидии, например веретенными ядами, приводит к нелинейному эффекту дозы. Следовательно, возможно установить пороговую концентрацию, ниже которой не предполагается выпадения хромосом, и установить наличие соответствующего коэффициента надежности, по сравнению с клиническими концентрациями.

Таким образом, оценка генотоксического потенциала вещества должна учитывать всю совокупность полученных данных и учитывает пользу и ограничения анализов *in vitro* и *in vivo*.

5.5 Последующий анализ генотоксичности применительно к результатам опухолевого роста в биологическом анализе канцерогенности

Дополнительные анализы генотоксичности в соответствующих моделях могут проводиться для веществ, показавших отрицательный результат в рамках стандартной батареи тестов, но при этом показавших опухолевый рост в биологических анализах канцерогенности при недостаточности свидетельств, подтверждающих негенотоксический механизм развития опухоли. Чтобы лучше понять способ действия, дополнительные анализы могут включать модифицированные условия метаболической активации в испытаниях *in vitro* или включать анализы *in vivo* с целью определения генетического повреждения в целевых органах опухоли, например, анализ разрыва нитей ДНК (например, кометный анализ либо анализ методом щелочной элюции), анализ UDS в печени, анализ ковалентного связывания ДНК (например, с последующей меткой ^{32}P), индукция мутаций в трансгенах либо молекулярная характеристика генетических изменений генов, связанных с опухолью (Kasper et al., 2007).

6 Термины

Аддукт ДНК (DNA adduct)	Продукт ковалентного связывания химического вещества с ДНК
Анализ ДНК методом щелочной элюции (Alkaline elution assay)	См. *анализ разрыва нитей ДНК*

Анализ единичной клетки методом гель-электрофореза (Single Cell Gel Electrophoresis assay)	Комет-анализ. *См. анализ разрыва нитей ДНК*
Анализ разрыва нитей ДНК (DNA strand break test)	Щелочная обработка, позволяющая конвертировать некоторые типы повреждений ДНК в разрывы нитей, которые могут быть определены методом щелочного элюирования с измерением скорости прохождения через фильтр или при помощи анализа единичной клетки методом гель-электрофореза либо кометного анализа (при котором клетки, помещенные в тонкий слой геля на стекла микроскопа, подвергают воздействию электрического тока, заставляющего более короткие участки ДНК мигрировать из ядра в «хвост кометы»). Степень миграции ДНК измеряют визуально под микроскопом на окрашенных клетках
Анеуплоидия (Aneuploidy)	Числовое отклонение модального числа хромосом в клетке или в организме
Выживаемость (в контексте испытаний мутагенности) (Survival (in the context of mutagenicity testing))	Доля живых клеток среди мертвых, обычно определяемая путем окрашивания и методом подсчета колоний по истечении определенного интервала времени
Генетическая конечная точка (Genetic endpoint)	Точный тип либо класс генетического изменения (например, генетических мутаций, хромосомных аберраций, разрыва нитей ДНК, репарации ДНК, формирования аддукта ДНК и т. д.)
Генотоксичность (Genotoxicity)	Широкий термин, относящийся к любому вредному изменению генетического материала, независимо от механизма индукции данного изменения
Замена основания (Base substitution)	Замена одного и более оснований в нуклеотидной последовательности. Это может привести к изменению белка
Кластоген (Clastogen)	Вещество, приводящее к структурной поломке хромосом, обычно определяемое методом световой микроскопии
Клеточная пролиферация (Cell proliferation)	Способность клеток к делению и формированию дочерних клеток
Комет-анализ (Comet assay)	*См. анализ поломок нитей ДНК*
Конфлюентность культуры (Culture confluency)	Количественное определение плотности клеток в культуре методом визуальной инспекции
Микроядро (Micronucleus)	Элемент клетки, содержащий нуклеарную ДНК. Она может содержать целую хромосому либо сломанную центрическую, либо ацентрическую часть хромосомы
Митотический индекс (Mitotic index)	Процент клеток в разных стадиях митоза среди клеток, не находящихся в митозе (интерфазе) в препарате (стекло)
Мутация гена (Gene mutation)	Определимое необратимое изменение одного гена либо его регулирующих последовательностей. Изменения могут представлять собой точечные мутации, вставки либо делеции
Мутация со сдвигом рамки (Frameshift mutation)	Мутация (изменение генетического кода), при которой одно основание или два соседних основания добавляются (встраиваются) либо удаляются из нуклеотидной последовательности гена. Это может привести к образованию измененного либо процессированного белка
ООР (относительный общий рост) (RTG (relative total growth))	Данный параметр оценки цитотоксичности учитывает относительный рост суспензии (на основании потери клеток и роста клеток с начала лечения до второго дня после окончания терапии), умноженный на относительную эффективность посева на этапе клонирования мутантного квантирования
Плазмида (Plasmid)	Генетический элемент в дополнение к нормальному бактериальному геному. Плазмида может быть включена в хромосому-хозяин либо может быть сформирован экстрахромосомный элемент
Полиплоидия (Polyploidy)	Числовое отклонение модального числа хромосом в клетке с приблизительно кратким увеличением гаплоидного числа. Эндоредупликация — это морфологическая форма полиплоидии, при которой хромосомные пары связаны в метафазе в виде «диплохромосом»

Полихроматический эритроцит (Polychromatic erythrocyte)	Незрелый эритроцит в промежуточной стадии развития, содержащий рибосомы, который можно отличить от зрелых нормохроматических эритроцитов (без рибосом) по окрашиванию пятен РНК
Разрыв нитей ДНК (DNA strand breaks)	Расщепление одной или двойной нити ДНК
Рекомбинация (Recombination)	Поломка и сбалансированное либо несбалансированное воссоединение ДНК
Репаративный синтез ДНК (РСД (Unscheduled DNA synthesis (UDS))	Синтез ДНК, происходящий на определенной стадии клеточного цикла, кроме S-фазы, в ответ на повреждение ДНК. Как правило, он связан с эксцизионной репарацией ДНК
Репарация ДНК (DNA repair)	Реконструкция оригинальной последовательности ДНК после повреждения ДНК
Точечные мутации (Point mutations)	Изменения генетического кода, обычно ограничиваемые единственной парой основания ДНК
Трансген (Transgene)	Экзогенный или чужеродный ген, встроенный в геном соматических или зародышевых клеток
Удвоение популяции или рост культуры (Population doubling or culture growth)	Можно рассчитать разными способами, например: Удвоение популяции (PD) = логарифм соотношения конечного количества (N) и начального (исходного) количества (Xo), разделенный на логарифм 2. Таким образом: PD = [log(N, Xo)], log 2
Центромер/кинетохор (Centromere/kinetochore)	Структуры в хромосомах, отвечающие за связь сестринских хроматид и присоединение нитей веретена, перемещающих дочерние хромосомы к полюсам и обеспечивающих включение в дочерние ядра
Цитогенетический анализ (Cytogenetic evaluation)	Анализ хромосомных структур в митозе или мейозе методом световой микроскопии или микроядерного анализа
Числовые хромосомные изменения (Numerical chromosome changes)	Количество хромосом, отличное от оригинального гаплоидного или диплоидного набора хромосом, для клеточных линий число хромосом, отличное от модального хромосомного набора
Эффективность клонирования (Cloning efficiency)	Способность единичных клеток к формированию клонов. Обычно определяют после высевания небольшого количества клеток в соответствующей среде

Библиография

1 Ashby J, Paton D. The influence of chemical structure on the extent and sites of carcinogenesis for 522 rodent carcinogens and 55 different human carcinogen exposures.Mutat Res 1994;286: 3—74.

2 Corvi R, Albertini S, Hartung T, Hoffmann S, Maurici D, Pfuhler S et al. ECVAM Retrospective Validation of the *in vitro* micronucleus test (MNT). Mutagenesis 2008; 23: 271—283.

3 Gatehouse D, Haworth S, Cebula T, Gocke E, Kier L, Matsushima T et al. Report from the working group on bacterial mutation assays: international workshop on standardisation of genotoxicity test procedures. Mutat Res 1994; 312: 217—33.

4 Goodman & Gilman. The pharmacological basis of therapeutics. Hardman JG, Limbird LE, Gilman AG, editors. 10th ed. New York: McGraw-Hill Professional 2001.

5 Greenwood SK, Hill RB, Sun JT, Armstrong MJ, Johnson TE, Gara JP et al. Population Doubling: A simple and more accurate estimation of cell growth suppression in the *in vitro* assay for chromosomal aberrations that reduces irrelevant positive results. Environ Mol Mutagen 2004;43: 36—44.

6 Hamada S., Sutou S, Morita T, Wakata A, Asanami S, Hosoya S et al. Evaluation of the rodent micronucleus assay by a 28-day treatment protocol: summary of the 13th collaborative study by the collaborative study group for the micronucleus test (CSGMT)/Environmental Mutagen Society of Japan (JEMS) — Mammalian Mutagenicity Study Group (MMS). Environ Mol Mutagen 2001;37: 93—110.

7 Hartmann A, Agurell E, Beevers C, Brendler-Schwaab S, Burlinson B, Clay P et al. Recommendations for conducting the *in vivo* alkaline Comet assay. Mutagenesis 2003;18: 45—51.

8 Hayashi M, MacGregor JT, Gatehouse DG, Adler I, Blakey DH, Dertinger SD et al. *in vivo* rodent erythrocyte micronucleus assay. II. Some aspects of protocol design including repeated treatments, integration with toxicity testing, and automated scoring. Environ Mol Mutagen 2000;35: 234—52.

9 Hayashi M, MacGregor JT, Gatehouse DG, Blakey DH, Dertinger SD, Abramsson-Zetterberg L et al. *in vivo* erythrocyte micronucleus assay. III. Validation and regulatory acceptance of automated scoring and the use of rat peripheral blood reticulocytes, with discussion of non-hematopoietic target cells and a single dose-level limit test. Mutat Res 2007;627: 10—30.

10 Heddle JA, Dean S, Nohmi T, Boerrigter M, Casciano D, Douglas GR et al. *in vivo* transgenic mutation assays. Environ Mol Mutagen 2000; 35: 253.

11 Hotchkiss CE, Bishop ME, Dertinger SD, Slikker W, Moore MM, MacGregor JT. Flow cytometric analysis of micronuclei in peripheral blood reticulocytes IV: an index of chromosomal damage in the rhesus monkey (macaca mulatta). Toxicol Sci 2008 ;102: 352—8.

12 Kasper P, Uno Y, Mauthe R, Asano N, Douglas G, Matthews E et al. Follow-up testing of rodent carcinogens not positive in the standard genotoxicity testing battery: IWGT workgroup report. Mutat Res 2007;627: 106—116.

13 Kenelly JC, Waters R, Ashby J, Lefevre PA, Burlinson B, Benford DJ et al. *in vivo* rat liver UDS assay. In: Supplementary Mutagenicity Tests, UKEMS Recommended Procedures. Kirkland DJ, Fox M, editors. Cambridge University Press 1993; 52—77.

14 Kirkland DJ, Pfuhler S, Tweats D, Aardema M, Corvi R, Darroudi F et al. How to reduce false positive results when undertaking *in vitro* genotoxicity testing and thus avoid unnecessary follow-up animal tests: report of the ECVAM workshop. Mutat Res 2007;628: 31—55.

15 Kirsch-Volders M, Sofuni T, Aardema M, Albertini S, Eastmond D, Fenech M et al. Report from the *in vitro* micronucleus assay working group. Mutat Res 2003;540: 153—63.

16 Kissling GE, Dertinger SD, Hayashi M, MacGregor JT. Sensitivity of the erythrocyte micronucleus assay: dependence on number of cells scored and inter-animal variability. Mutat Res 2007;634: 235—40.

17 Ku WW, Bigger A, Brambilla G, Glatt H, Gocke E, Guzzie PJ et al. Strategy for genotoxicity testing-metabolic considerations. Mutat Res 2007;627: 59—77.

18 MacGregor JT, Bishop ME, McNamee JP, Hayashi M, Asano N, Wakata A et al. Flow Cytometric analysis of micronuclei in peripheral blood reticulocytes: II. An efficient method of monitoring chromosomal damage in the rat. Toxicol Sci 2006;94: 92—107.

19 Moore MM, Honma M, Clements J, Harrington-Brock K, Awogi T, Bolcsfoldi G et al. Mouse lymphoma thymidine kinase locus gene mutation assay: follow-up international workshop on genotoxicity test procedures — New Orleans, Louisiana, April 2000. Environ Mol Mutagen 2002; 40:292—9.

20 Moore MM, Honma M, Clements J, Bolcsfoldi G, Burlinson B, Cifone M et al. Mouse lymphoma thymidine kinase gene mutation assay. follow-up meeting of the international workshop on genotoxicity testing — Aberdeen, Scotland, 2003 — Assay acceptance criteria, positive controls, and data evaluation. Environ Mol Mutagen 2006;47: 1—5.

21 Müller L, Kasper P. Human biological relevance and the use of threshold arguments in regulatory genotoxicity assessment: experience with pharmaceuticals. Mutat Res 2000;464: 9—34.

22 OECD Guidelines for Genetic Toxicology 1997.

23 Scott D, Galloway SM, Marshall RR, Ishidate M Jr, Brusick D, Ashby J et al. Genotoxicity under extreme culture conditions. A report from ICPEMC task group 9. Mutat Res 1991,257: 147—204.

24 Storer RD, McKelvey TW, Kraynak AR, Elia MC, Barnum JE, Harmon LS et al. Revalidation of the *in vitro* alkaline elution/rat hepatocyte assay for DNA damage: improved criteria for assessment of cytotoxicity and genotoxicity and results for 81 compounds. Mutat Res 1996;368: 59—101.

25 Suzuki H, Ikeda N, Kobayashi K, Terashima Y, Shimada Y, Suzuki T et al. Evaluation of liver and peripheral blood micronucleus assays with 9 chemicals using young rats. A study by the Collaborative Study Group for the Micronucleus Test (CSGMT)/Japanese Environmental Mutagen Society (JEMS) — Mammalian Mutagenicity Study Group (MMS). Mutat Res 2005;583: 133—45.

26 Thybaud V, Aardema M, Clements J, Dearfield K, Galloway S, Hayashi M et al. Strategy for genotoxicity testing: hazard identification and risk assessment in relation to *in vitro* testing. Mutat Res 2007;627: 41—58.

27 Tweats DJ, Blakey D, Heflich RH, Jacobs A, Jacobsen SD, Morita T et al. Report of the IWGT working group on strategies and interpretation of regulatory *in vivo* tests. I. Increases in micronucleated bone marrow cells in rodents that do not indicate genotoxic hazards. Mutat Res 2007;627: 78—91.

28 Tweats DJ, Blakey D, Heflich RH, Jacobs A, Jacobsen SD, Morita T et al. Report of the IWGT working group on strategy/interpretation of regulatory *in vivo* tests. II. Identification of *in vivo*-only positive compounds in the bone marrow micronucleus test. Mutat Res 2007;627: 92—105.

29 Wakata A, Miyamae Y, Sato S, Suzuki T, Morita T, Asano N et al. Evaluation of the rat micronucleus test with bone marrow and peripheral blood: summary of the 9th collaborative study by CSGMT/JEMS. MMS. Environ Mol Mutagen 1998;32: 84—100.

УДК 615.038:615.012/.014:615.2:006.354

ОКС 11.120.01
11.020

Ключевые слова: лекарственные средства для медицинского применения, доклинические исследования, генотоксичность, интерпретация полученных данных

Редактор *С.А. Константинова*
Технический редактор *В.Н. Прусакова*
Корректор *Е.Д. Дульнева*
Компьютерная верстка *А.Н. Золотаревой*

Сдано в набор 13.10.2016. Подписано в печать 21.10.2016. Формат 60 × 84 1/8. Гарнитура Ариал.
Усл. печ. л. 2,79. Уч.-изд. л. 2,52. Тираж 25 экз. Зак. 2613.
Подготовлено на основе электронной версии, предоставленной разработчиком стандарта

Издано и отпечатано во ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ», 123995 Москва, Гранатный пер., 4.

gost.e-ecolog.ru gost.e-ecolog.ru

gost.e-ecolog.ru