МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СОВЕТ ПО СТАНДАРТИЗАЦИИ, МЕТРОЛОГИИ И СЕРТИФИКАЦИИ
(МГС)
INTERSTATE COUNCIL FOR STANDARDIZATION, METROLOGY AND CERTIFICATION
(ISC)

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ
СТАНДАРТ

**ГОСТ
34556—
2019**

МЕТОДЫ ИСПЫТАНИЯ ПО ВОЗДЕЙСТВИЮ ХИМИЧЕСКОЙ ПРОДУКЦИИ НА ОРГАНИЗМ ЧЕЛОВЕКА

Испытания по оценке кожной сенсибилизации методом изучения реакции региональных лимфатических узлов

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 государственным унитарным предприятием «Российский научно-технический центр информации по стандартизации, метрологии и оценке соответствия» (ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ») на основе собственного перевода на русский язык англоязычной версии документа, указанного в пункте 5

2 ВНЕСЕН Федеральным агентством по техническому регулированию и метрологии

3 ПРИНЯТ Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации (протокол от 30 июля 2019 г. № 120-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
Беларусь	BY	Госстандарт Республики Беларусь
Киргизия	KG	Кыргызстандарт
Россия	RU	Росстандарт
Таджикистан	TJ	Таджикстандарт
Узбекистан	UZ	Узстандарт

4 Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 8 августа 2019 г. № 474-ст межгосударственный стандарт ГОСТ 34556—2019 введен в действие в качестве национального стандарта Российской Федерации с 1 июня 2020 г.

5 Настоящий стандарт является модифицированным по отношению к международному документу OECD, Test № 429:2010 «Руководство по тестированию химических веществ. Сенсибилизация кожи: анализ реакции локального лимфатического узла» («Guideline for the testing of chemicals. Skin sensitization: local lymph node assay», MOD), путем:

- включения в текст стандарта дополнительного раздела, термина и сокращений, выделенных курсивом;
- изменения его структуры для приведения в соответствие с правилами, установленными ГОСТ 1.5 (подразделы 4.2 и 4.3).

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

Сопоставление структуры настоящего стандарта со структурой указанного международного документа приведено в дополнительном приложении ДА

6 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

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, 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

Содержание

1 Область применения 1
2 Термины, определения и *сокращения* 1
3 Основные положения и ограничения 3
4 Принцип испытания 4
5 Сущность метода 4
6 Проведение испытаний 6
7 Наблюдения 9
8 Анализ и интерпретация данных 9
9 Данные и протокол испытаний 9
Приложение А (справочное) Рабочие стандарты для оценки кожной сенсибилизации в аналогичных или модифицированных LLNA 12
Приложение ДА (рекомендуемое) Сопоставление структуры настоящего стандарта со структурой примененного в нем международного документа 16
Библиография 18

Введение

OECD Guidelines для испытания химических веществ периодически пересматриваются с учетом последних достижений научного прогресса и изменяющихся правил гуманного обращения с животными. Первый вариант OECD Guidelines по оценке кожной сенсибилизации методом изучения реакции региональных лимфатических узлов [the Local Lymph Node Assay (LLNA)] принят в 2002 году [1]. Подробности валидации опубликованы в обзорах [2]—[11]. Актуализированный метод LLNA основан на оценке практических и научных данных и предназначен для определения чувствительности кожи к химическим веществам у животных [12]. С точки зрения гуманного отношения к подопытным животным метод LLNA имеет преимущества по сравнению с более ранними методами оценки кожной сенсибилизации, такими как тест максимизации на морских свинках и тест Бюхлера по документу [13]. Актуализированный метод LLNA включает набор стандартов испытаний (PS) (приложение А), которые могут быть использованы для валидации новых и/или модифицированных методов испытаний, аналогичных функционально и технически LLNA [14].

Метод LLNA изучает фазу индукции кожной сенсибилизации и позволяет получить количественные данные, необходимые для оценки зависимости «доза—ответ». Следует отметить, что слабые/умеренные сенсибилизаторы, которые рекомендуются в качестве подходящего положительного контроля (PC) в испытаниях на морских свинках по документу [13], пригодны и для использования в LLNA [6], [8], [15]. В настоящем стандарте также описывается редуцированный вариант метода LLNA (rLLNA), позволяющий на 40 % сократить использование животных [16]—[18]. Метод rLLNA может быть использован в тех случаях, когда необходимо официально подтвердить отрицательный прогноз об отсутствии у данного химического вещества способности к кожной сенсибилизации с соблюдением всех деталей протокола LLNA. Перед применением метода rLLNA следует предоставить четкую мотивацию и научное обоснование для его использования. Если вопреки ожиданиям в rLLNA будет получен положительный или сомнительный результат, потребуется дополнительное испытание для его интерпретации или выяснения причин обнаруженного эффекта. Метод rLLNA не должен использоваться для определения степени опасности исследуемого вещества при проведении испытания на кожную сенсибилизацию в том случае, когда требуется информация о результатах оценки зависимости «доза—ответ», например при классификации в соответствии с Согласованной на глобальном уровне системой классификации и маркировки химических веществ (СГС).

Поправка к ГОСТ 34556—2019 Методы испытания по воздействию химической продукции на организм человека. Испытания по оценке кожной сенсибилизации методом изучения реакции региональных лимфатических узлов

В каком месте	Напечатано	Должно быть		
Предисловие. Таблица согласования	—	Казахстан	KZ	Госстандарт Республики Казахстан

(ИУС № 8 2020 г.)

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

МЕТОДЫ ИСПЫТАНИЯ ПО ВОЗДЕЙСТВИЮ ХИМИЧЕСКОЙ ПРОДУКЦИИ НА ОРГАНИЗМ ЧЕЛОВЕКА

Испытания по оценке кожной сенсибилизации методом изучения реакции региональных лимфатических узлов

Methods of testing the chemicals of human hazard. Tests for the evaluation of skin sensitization by the method of studying the reaction of regional lymph nodes

Дата введения — 2020—06—01

1 Область применения

Настоящий стандарт устанавливает методы испытания, предназначенные для получения информации о сенсибилизирующем действии исследуемого вещества на организм, благодаря которой можно оценить и классифицировать вещество в соответствии с Согласованной на глобальном уровне системой классификации и маркировки химических веществ (СГС) для сведения к минимуму риска воздействия на здоровье человека.

Методы испытаний, приведенные в настоящем стандарте, предназначены для специалистов организаций здравоохранения, проводящих государственный санитарный надзор, а также иных учреждений, осуществляющих реализацию мероприятий по медицинской профилактике неблагоприятного воздействия химической продукции на здоровье человека.

2 Термины, определения и *сокращения*

2.1 В настоящем стандарте применены следующие термины с соответствующими определениями:

2.1.1 **точность** (accuracy): Степень соответствия результатов испытания и опорных значений, характеризующая метод и являющаяся критерием его правильности, обозначая долю правильных результатов метода [14].

2.1.2 **вещество для контрольного испытания** (benchmark test substance): Сенсибилизирующее или несенсибилизирующее вещество, используемое в качестве стандарта для сравнения с исследуемым веществом, обладающее следующими свойствами: унифицированным(ыми) и надежным(ыми) источником(ами) приобретения; структурным и функциональным сходством с классом исследуемых веществ; известными физическими/химическими характеристиками; наличием данных об известных эффектах; известной активностью в диапазоне желаемого ответа.

2.1.3 **расчетная пороговая концентрация** [estimated concentration threshold (ECt)]: Вычисленная концентрация исследуемого вещества, необходимая для получения индекса стимуляции, указывающего на положительный ответ.

2.1.4 **расчетная концентрация «3»** [estimated concentration three (EC3)]: Вычисленное значение концентрации исследуемого вещества, при которой индекс стимуляции равен трем.

2.1.5 **ложноотрицательный результат** (false negative): Неправильная идентификация исследуемого вещества с помощью настоящего метода испытания, как дающего отрицательный ответ или неактивного, в то время как в действительности вещество вызывает положительный ответ или является активным.

2.1.6 **ложноположительный результат** (false positive): Неправильная идентификация исследуемого вещества как дающего положительный ответ или активного, в то время как в действительности вещество дает отрицательный ответ или является неактивным.

Издание официальное

2.1.7 **опасность** (hazard): Потенциальная способность вещества вызывать неблагоприятное воздействие на здоровье человека или окружающую среду при достаточном уровне воздействия.

2.1.8 **внутрилабораторная воспроизводимость** (inter-laboratory reproducibility): Определение степени, с которой квалифицированный персонал одной и той же лаборатории может успешно воспроизводить результаты, используя конкретный протокол в разное время [14].

2.1.9 **межлабораторная воспроизводимость** (intra-laboratory reproducibility): Оценка степени, с которой квалифицированный персонал разных лабораторий, использующих один и тот же протокол и проводящих испытания одних и тех же исследуемых веществ, может давать качественно и количественно сходные результаты.

Примечание — Межлабораторную воспроизводимость определяют во время предварительной валидации и валидации (аттестации) методов. Межлабораторная воспроизводимость указывает степень совпадения результатов испытаний между разными лабораториями [14].

2.1.10 **похожий метод** (Me-too test): Разговорное выражение для метода испытаний, структурно и функционально подобного утвержденному стандартному методу испытания.

Примечание — Такой метод испытания может быть перспективным для утверждения, поэтому его используют как синоним аналогичному методу испытаний [14].

2.1.11 **выпадающие данные** (outlier): Это наблюдение эффекта с результатами, заметно отличающимися от других значений в случайной выборке из генеральной совокупности.

2.1.12 **рабочие стандарты;** PS (performance standards): Стандарты, основанные на валидированном методе испытаний и обеспечивающие основу для оценки сопоставимости предлагаемого метода испытаний, который функционально и механически подобен.

Примечание — Стандарты содержат основные компоненты метода испытаний: минимальный перечень эталонных химических веществ, выбранных из числа веществ, используемых для демонстрации приемлемой эффективности утвержденного метода испытаний; аналогичные уровни точности и надежности, основанные на результатах, полученных для утвержденного метода испытаний, которые предлагаемый метод испытаний должен подтверждать при оценке с использованием минимального набора эталонных химических веществ [14].

2.1.13 **патентованный метод испытаний** (proprietary test method): Метод испытаний, для которого производство продукта и его распространение ограничены патентами, авторскими правами, товарными знаками и т. д.

2.1.14 **обеспечение качества** (quality assurance): Процедура управления, в соответствии с которой соблюдение стандартов, требований и порядка проведения лабораторных испытаний, а также точность регистрации полученных данных осуществляются лицами, независимыми от сотрудников лаборатории, проводящих испытания.

2.1.15 **эталонные химические вещества** (reference chemicals): Химические вещества, выбранные для использования в процессе валидации, для которых известны ответы в контрольной системе испытаний *in vitro* или *in vivo* или для интересующих видов животных.

Примечание — Эти химические вещества должны быть представителями классов химических веществ, которые предполагается использовать в методе испытаний, и обеспечивать весь спектр ответных реакций — от сильных до слабых и отрицательных. На разных этапах валидации могут потребоваться разные наборы эталонных химических веществ в зависимости от методов и условий испытаний [14].

2.1.16 **соответствие** (relevance): Характеристика взаимосвязи испытания и оцениваемого эффекта, значение и практическая значимость для конкретной цели: диапазон, в пределах которого данное испытание корректно измеряет или прогнозирует интересующий исследователя биологический эффект, и оценка точности (соответствия) данного метода [14].

2.1.17 **надежность** (reliability): Оценка степени, с которой метод испытания может давать воспроизводимые результаты при длительном использовании по одному и тому же протоколу в одной лаборатории или между лабораториями.

Примечание — Оценивается путем определения внутри- и межлабораторной воспроизводимости [14].

2.1.18 **кожная сенсибилизация** (skin sensitization): Иммунологический процесс, происходящий в восприимчивом организме, который подвергся местному воздействию химического аллергена, вызвавшего кожную иммунную реакцию, и приводящий в некоторых случаях к развитию контактной сенсибилизации.

2.1.19 **индекс стимуляции** [stimulation Index (SI)]: Значение, рассчитанное для оценки потенциальной возможности исследуемого вещества вызывать кожную сенсибилизацию, которое является отношением пролиферации в подопытных группах и контрольной группе, которой вводили растворитель (носитель).

2.1.20 **исследуемое вещество** (test substance): Любой исследуемый материал независимо от того, является он индивидуальным соединением или состоит из нескольких компонентов (конечные продукты, смеси).

Примечание — При испытании смесей следует учитывать, что некоторые регулирующие органы требуют состав конечного испытуемого продукта, в то же время могут существовать требования к испытаниям активного(ых) ингредиента(ов), содержащихся в продукте.

2.1.21 **валидированный метод испытаний** (validated test method): Метод испытания, для которого проведено валидационное исследование, для определения соответствия (включая точность) и надежности для целевого назначения.

Примечание — Важно отметить, что валидированный метод испытаний может не иметь соответствующих характеристик с точки зрения точности и надежности, которые могут быть признаны приемлемыми для предлагаемой цели [14].

2.1.22 ***анализ реакции регионального лимфатического узла*** [*local lymph node assay* (LLNA)]: *Метод оценки способности химического вещества вызывать кожную сенсибилизацию у мышей путем измерения скорости пролиферации лимфоцитов в региональных лимфатических узлах.*

2.2 В настоящем стандарте применены следующие сокращения:

DPM — число распадов в минуту;

LNC — клетки лимфатических узлов;

NC — контрольная группа;

PBS — фосфатный забуференный физиологический раствор;

PC — положительный контроль.

3 Основные положения и ограничения

3.1 LLNA является альтернативным методом для определения потенциальной возможности исследуемого вещества оказывать сенсибилизирующее действие на кожу. Это не означает, что LLNA следует использовать во всех случаях вместо испытаний на морских свинках [13], скорее всего метод имеет одинаковую ценность и может быть использован в качестве альтернативного, когда положительные и отрицательные результаты больше не требуют дополнительного подтверждения. До проведения исследования в испытательной лаборатории должны изучить всю имеющуюся информацию об исследуемом веществе, в состав которой должно быть включено следующее: идентификация и химическая структура исследуемого вещества; его физико-химические свойства; результаты других исследований токсичности *in vitro* или *in vivo*; токсикологические данные для структурно родственных веществ. Эту информацию следует учитывать для определения применимости LLNA для исследуемого вещества (с учетом несовместимости ограниченных типов исследуемых веществ с LLNA см. 3.2) и для помощи в выборе дозы.

3.2 LLNA — это метод *in vivo*, поэтому не исключает использования животных при оценке аллергического контактного сенсибилизирующего действия. Однако он имеет потенциал для сокращения количества животных, необходимых для этой цели. При этом LLNA предлагает существенную модификацию (меньшую боль и дистресс) использования животных при испытании на аллергическую контактную сенсибилизацию. LLNA основан на рассмотрении иммунологических реакций, вызванных химическими веществами при индуктивной фазе сенсибилизации. В отличие от испытаний на морских свинках (см. [13]) настоящий стандарт не требует проявления кожных реакций, вызванных реакцией повышенной чувствительности. Кроме того, LLNA не требует использования адъюванта, что имеет место при максимизационном испытании на морских свинках по документу [13]. Таким образом, LLNA уменьшает боль и страдание животных. Следует отметить, что несмотря на преимущества LLNA по сравнению с методом по документу [13] существуют определенные ограничения, которые могут потребовать использования метода по документу [13] [например, ложноотрицательные результаты в LLNA с некоторыми металлами, ложноположительные результаты с некоторыми раздражителями кожи (такими как некоторые поверхностно-активные химические вещества [19], [20] или растворители исследуемого вещества)]. При

этом показано, что классы исследуемых веществ или вещества, содержащие функциональные группы, действуют как потенциальные факторы, искажающие результаты [21], что может потребовать использования испытаний на морских свинках методом по документу [13]. Кроме того, на основе ограниченной базы данных валидации, состоящей в основном из пестицидных препаратов, для LLNA более вероятен положительный результат для этих типов веществ [22], чем при испытаниях на морских свинках. При испытании препаратов для контрольного испытания можно рассмотреть включение аналогичных веществ с известными результатами, для того чтобы продемонстрировать, что LLNA работает должным образом (см. 5.5.6). Помимо таких выявленных ограничений метод LLNA может быть использован для испытания любых исследуемых веществ, если свойства этих веществ не мешают его точности.

4 Принцип испытания

Основным принципом, лежащим в основе LLNA, является способность сенсибилизаторов индуцировать пролиферацию лимфоцитов в лимфоузлах, дренирующих участок накожного нанесения испытуемого вещества. Скорость пролиферации лимфоцитов пропорциональна дозе и эффективности применяемого аллергена, что обеспечивает возможность количественного измерения сенсибилизации. Пролиферацию определяют путем сравнения средней пролиферации в каждой подопытной группе со средней пролиферацией в контрольной группе, обработанной растворителем (VC). До классификации исследуемого вещества в качестве потенциального сенсибилизатора кожи определяют отношение средней пролиферации в каждой подопытной группе и контрольной группе, обработанной растворителем (VC), называемое индексом стимуляции (SI), значение которого должно быть ≥3. Методы, приведенные в настоящем стандарте, основаны на измерении скорости пролиферации клеток в околоушных лимфатических узлах с помощью радиоизотопного анализа *in vivo*. При необходимости можно использовать другие способы оценки количества пролиферирующих клеток, если полностью удовлетворяются требования рабочих стандартов (PS) (см. приложение А).

5 Сущность метода

5.1 Выбор вида животных

Для исследований используют молодых взрослых нерожавших и небеременных самок мышей линии CBA/Ca или CBA/J. На момент начала эксперимента возраст животных должен быть от 8 до 12 нед с колебаниями массы тела ±20 % от среднего значения. При необходимости можно использовать другие линии животных и самцов, если в результатах метода LLNA не существует линейных/гендерных различий.

5.2 Условия содержания и кормления

Мыши должны быть размещены по клеткам в соответствии с разделением на подопытные группы [23], если не представлено соответствующее научное обоснование для индивидуального размещения животных. Температура в помещении, предназначенном для экспериментов на животных, должна составлять (22 ± 3) °С. Относительная влажность воздуха должна быть не менее 30 % и не более 70 % (допускается во время влажной уборки помещения), оптимальный диапазон влажности составляет от 50 % до 60 %. Освещение должно быть искусственным с чередованием 12 ч света и 12 ч темноты. Для кормления можно использовать стандартный лабораторный корм с неограниченным доступом к питьевой воде.

5.3 Подготовка животных

Животных отбирают случайным образом, маркируют для индивидуальной идентификации (любым способом, не затрагивающим область ушей) и содержат в клетках не менее пяти дней до начала введения исследуемого вещества, для того чтобы обеспечить их акклиматизацию к лабораторным условиям. До начала воздействия всех животных осматривают на предмет отсутствия видимых кожных повреждений.

5.4 Подготовка растворов

Перед нанесением на уши мышей твердые исследуемые вещества должны быть растворены или суспендированы в подходящих растворителях/носителях и при необходимости разбавлены. Жидкие ис-

следуемые вещества могут быть нанесены в чистом виде или в виде рабочих растворов необходимых концентраций. Нерастворимые вещества, которые можно обнаружить в медицинских изделиях, следует подвергать тщательной экстракции подходящим растворителем для выделения всех экстрагируемых компонентов перед нанесением на уши мышей. Растворы исследуемых препаратов готовят ежедневно, за исключением тех веществ, стабильность которых допускает хранение растворов в течение определенного времени.

5.5 Проверка надежности

5.5.1 *PC* используют для демонстрации надлежащей эффективности проведения анализа. С этой целью используют вещества с хорошо известной способностью к кожной сенсибилизации, позволяющие убедиться в адекватных и воспроизводимых результатах исследований. *PC* включают в каждый проводимый эксперимент для демонстрации компетентности лаборатории и ее способности проводить исследования, а также для оценки внутри- и межлабораторной воспроизводимости и сопоставимости результатов испытаний. Некоторые контролирующие органы также требуют проведения *PC* для каждого исследования, и поэтому пользователям настоящего стандарта рекомендуется проводить консультации с соответствующими органами до выполнения LLNA. Постоянное использование параллельных *PC* позволяет избегать дополнительного испытания на животных, необходимого для устранения проблем, возникающих при периодическом использовании *PC* (см. 5.5.2). Положительный ответ LLNA, вызванный воздействием *PC*, приводит к увеличению SI > 3 по сравнению с группой отрицательного контроля (*NC*). Выбранная доза *PC* не должна вызывать чрезмерной реакции воспаления кожи ушей или реакций системной токсичности; положительный эффект *PC* должен быть воспроизводимым, но не избыточным (то есть SI > 20). В качестве *PC*, как правило, используют 25 %-ный раствор гексилкоричного альдегида (CAS № 101-86-0) в смеси ацетона с оливковым маслом (4:1 по объему) и 5 %-ный раствор меркаптобензотиазола (CAS № 149-30-4) в N,N-диметилформамиде (см. таблицу А.1 приложения А). При достаточном обосновании можно использовать другие вещества, удовлетворяющие приведенным критериям.

5.5.2 Лабораториям, регулярно использующим метод LLNA (не реже одного раза в месяц), допускается применять *PC* периодически (один раз в полгода), например: лабораториям, имеющим достоверную базу экспериментальных данных с включением *PC*, демонстрирующую их компетентность относительно получения воспроизводимых и точных результатов (не менее 10 независимых испытаний с использованием *PC*, проводимых не реже одного раза в год, с получением согласованных положительных результатов).

5.5.3 Параллельная группа *PC* всегда должна быть включена при возникновении изменений в процедуре проведения LLNA, например: при замене обученного персонала, смене поставщиков материалов, реагентов и лабораторных животных, замене используемого оборудования, что обязательно должно быть зарегистрировано в отчете. Следует рассмотреть влияние этих изменений на адекватность ранее полученной экспериментальной базы данных и оценить необходимость формирования новой базы данных для обеспечения согласованности результатов ПК.

5.5.4 Исследователи должны понимать, что решение о проведении исследования *PC* на периодической основе вместо одновременного имеет последствия для адекватности и приемлемости отрицательных результатов исследования, полученных без одновременного *PC* в течение интервала между каждым периодическим исследованием *PC*. Например, если в периодическом исследовании *PC* получен ложноотрицательный результат, могут быть поставлены под сомнение отрицательные результаты исследуемого вещества, полученные в интервале между последним приемлемым периодическим исследованием *PC* и неприемлемым периодическим исследованием *PC*. Последствия этих результатов следует тщательно учитывать при определении того, включать ли параллельные *PC* или проводить только периодические *PC*. Следует также обсудить возможность использования меньшего количества животных в параллельной группе *PC*, если это оправдано с научной точки зрения и если лаборатория представит конкретные данные, демонстрирующие возможность использования меньшего количества мышей [12].

5.5.5 Несмотря на то что препараты, использующиеся в качестве *PC*, должны быть нанесены в растворителе (носителе) с известным ответным эффектом (например, ацетон/оливковое масло 4:1 по объему), возможно возникновение таких ситуаций, при которых необходимо проводить исследование с нестандартным растворителем (клинически/химически соответствующим препаратом) [24]. Если вещество *PC* и исследуемое вещество наносят, используя разные растворители, следует включить в опыт параллельный контроль для растворителя (VC).

5.5.6 Когда оценивают исследуемые вещества определенного химического класса или диапазона ответных реакций, можно также использовать вещества для контрольного испытания того же класса с известной активностью в LLNA, которые будут доказывать, что метод LLNA адекватен для выявления потенциальной кожной сенсибилизации исследуемыми веществами данного класса. Вещества, предназначенные для контрольного испытания, должны иметь следующие свойства:

- структурное и функциональное подобие классу исследуемого вещества;
- известные физические/химические характеристики;
- подтверждающие данные по LLNA;
- подтверждающие данные по другим испытаниям на животных и/или на человеке.

6 Проведение испытаний

6.1 Число животных и выбор доз

6.1.1 В каждую подопытную группу включают не менее четырех животных, всего испытывают не менее трех концентраций исследуемого вещества плюс параллельная контрольная группа (*NC*) для испытания растворителя исследуемого вещества и проведения *PC* (который может быть включен в данное исследование или могут быть использованы результаты недавно проведенного исследования в соответствии с политикой лаборатории по 5.5.1—5.5.6). Следует предусмотреть испытание нескольких доз *PC*, особенно при его периодическом использовании. Уход и все манипуляции с животными в контрольных группах должны быть идентичны условиям, используемым для подопытных групп, за исключением введения исследуемого вещества.

6.1.2 Выбор доз исследуемого вещества и растворителя должен быть основан на рекомендациях, приведенных в [3] и [5]. Последовательные дозы, как правило, выбирают из соответствующей серии концентраций, например 100 %; 50 %; 25 %; 10 %; 5 %; 2,5 %; 1 %; 0,5 % и т. д. Выбор концентраций следует сопровождать адекватным научным обоснованием. Следует предварительно изучить всю доступную информацию о токсичности исследуемого вещества (например, острая токсичность и способность вызывать раздражение кожи), его структуре и физико-химических свойствах, а также аналогичные характеристики структурно родственных веществ. На основании анализа этих данных выбирают три концентрации таким образом, чтобы самая высокая концентрация вызывала как можно более выраженный эффект, но при этом не приводила к системной токсичности и/или не вызывала чрезмерного раздражения кожи [3], [25]. При отсутствии такой информации может возникнуть необходимость в проведении предварительного испытания (см. 6.2.1—6.2.4).

6.1.3 Растворитель не должен искажать результаты исследования или косвенно влиять на них, и его следует выбирать по критериям максимальной растворимости в нем исследуемого вещества для получения наиболее высокой исходной концентрации раствора/суспензии, подходящей для применения исследуемого вещества. В общем случае рекомендованы носители: смесь ацетона с оливковым маслом (4:1 по объему), N, N-диметилформамид, метилэтилкетон, пропиленгликоль и диметилсульфоксид [19], при наличии достаточного научного обоснования также могут быть использованы другие растворители. В определенных ситуациях может возникнуть необходимость дополнительного контроля для оценки эффектов клинически значимых растворителей или коммерческих препаратов, в составе которых исследуемое вещество поступает в продажу.

Особое внимание следует уделить тому, чтобы гидрофильные вещества наносились на кожу в растворителе, который быстро впитывается в кожные покровы и тем самым не позволяет исследуемому раствору стекать с поверхности кожи; для этого в растворы включают соответствующие солюбилизаторы (например, Pluronic® L92 концентрацией 1 %). По вышеописанным причинам для нанесения на кожу следует избегать использования только водных растворов.

6.1.4 Состояние лимфатических узлов у отдельных мышей позволяет оценить внутригрупповую изменчивость и статистическую значимость различий между исследуемым веществом и растворителем (см. 8.4). Кроме того, анализ внутригрупповой вариабельности индивидуальных данных дает основание для объективной оценки возможности сокращения числа мышей в группе *PC* [12]. В одних странах национальные органы надзора требуют предоставления индивидуальных данных по отдельным животным, в других странах считают приемлемыми усредненные данные по каждой экспериментальной группе, что дает возможность исследователям выбирать способ представления результатов испытания в виде индивидуальных или усредненных данных.

6.2 Предварительные исследования

6.2.1 При отсутствии информации для определения максимальной дозы исследуемого вещества (см. 6.1.2) необходимо проводить предварительное исследование для определения уровня дозы, подходящего для испытания в LLNA. Цель предварительного исследования состоит в получении информации для выбора максимальной дозы исследуемого вещества при его использовании в основном испытании LLNA, т. е. в получении данных о концентрации, которая вызывает системную токсичность (см. 6.2.4) и/или чрезмерное местное раздражение кожи (см. 6.2.3). Максимальным уровнем исследуемой дозы следует считать 100 % исследуемого вещества для жидкостей или максимально возможную концентрацию для твердых веществ или суспензий.

6.2.2 Предварительное исследование выполняют в условиях, идентичных условиям основного исследования LLNA, но при этом не проводят оценку скорости пролиферации клеток лимфатических узлов и количество животных в группе может быть меньшим. Рекомендуется использовать одно или два животных на каждую дозу. Все мыши должны ежедневно осматриваться для выявления любых клинических проявлений системной токсичности или местного раздражения на месте аппликации вещества. Перед началом эксперимента и при его завершении (шестой день) регистрируют массу тела. Проводят наблюдение за обоими ушами каждой мыши, отмечают наличие эритемы и оценивают в баллах по таблице 1 [25]. Измерение толщины ушей проводят толщиномером (например, микрометром с цифровой индикацией или толщиномером с круговой шкалой фирмы Peacock) в первый день (перед нанесением вещества), на третий день (приблизительно через 48 ч после нанесения дозы) и на шестой день. Кроме того, на шестой день толщину уха можно дополнительно определить путем взвешивания образца ткани ушной раковины, полученного с помощью перфоратора после гуманного умерщвления животного. Раздражение кожи на месте аппликации вещества оценивают как чрезмерное при наличии эритемы с бальной оценкой 3 и более по шкале, приведенной в таблице 1, и/или при увеличении толщины уха на 25 % и более по сравнению с первоначальной в любой день измерения [26], [27].

Таблица 1 — Бальная оценка эритемы

Результат наблюдений	Баллы
Отсутствие эритемы	0
Очень незначительная эритема (едва заметная)	1
Четко выраженная эритема	2
От средней степени до тяжелой эритемы	3
Тяжелая эритема (покраснение бордово-красного цвета) до образования струпьев, затрудняющая оценку эритемы	4

В качестве максимальной дозы для основного исследования LLNA выбирают максимальную дозу из предварительного исследования (см. 6.1.2), после воздействия которой у животных отсутствовали признаки системной токсичности и/или чрезмерного местного раздражения кожи.

6.2.3 В дополнение к 25 %-ному увеличению толщины уха [26], [27] статистически значимое увеличение толщины ушей у мышей подопытных групп по сравнению с толщиной ушей у мышей контрольной группы также было использовано для идентификации раздражающих веществ в LLNA [28]—[34]. Несмотря на то что происходило статистически значимое увеличение толщины ушей менее 25 %, оно не было связано непосредственно с чрезмерным раздражением [30], [32]—[34].

6.2.4 О наличии системной токсичности могут свидетельствовать клинические наблюдения [35], [36] при их использовании в качестве элемента интегральной оценки для расчета максимальной дозы в основном методе LLNA, фиксирующие следующие изменения: в функции нервной системы (например, пилоэрекция, атаксия, тремор и судороги); в поведении (например, агрессивность, изменения в груминговой активности, заметные изменения в уровне активности); в типе дыхания (изменения частоты и интенсивности дыхания, такие как затрудненное дыхание, одышка и хрипы) и потреблении пищи и воды. Кроме того, следует регистрировать признаки летаргии и/или апатии, а также клинические признаки, которые проявлялись как более чем эпизоды незначительной или мгновенной боли и деструктивного стресса, снижение массы тела более чем на 5 % за период с первого до шестого дня и гибель животных. Животные в состоянии агонии, или страдающие от боли, или имеющие признаки серьезной и устойчивой патологии, должны быть гуманно умерщвлены [37].

6.3 Программа основного эксперимента

6.3.1 Используют график эксперимента, приведенный в 6.3.1.1—6.3.1.4.

6.3.1.1 Первый день

Индивидуально идентифицируют и регистрируют массу тела каждого животного, проводят визуальный осмотр. На тыльную сторону каждого уха наносят 25 мкл исследуемого вещества соответствующей концентрации, только растворителя или *PC* (если его проводят параллельно или результат последнего испытания, в зависимости от политики лаборатории в соответствии с 5.5.1—5.5.5).

6.3.1.2 Второй и третий дни

Повторяют процедуру нанесения, выполненную в первый день.

6.3.1.3 Четвертый и пятый дни

Нанесения не проводят.

6.3.1.4 Шестой день

Регистрируют массу тела каждого животного. Вводят в хвостовую вену всех мышей подопытных и контрольных групп по 250 мкл стерильного фосфатного забуференного физиологического раствора (*PBS*), содержащего 20 мкКи ($7{,}4 \cdot 10^5$ Бк) меченного тритием (^{3}H) метилтимидина. Альтернативный вариант — введение в хвостовую вену всех мышей по 250 мкл стерильного *PBS*, содержащего 2 мкКи ($7{,}4 \cdot 10^4$ Бк) ^{125}I-йододезоксиуридина и 10^{-5} М фтордезоксиуридина. Через 5 ч проводят гуманное умерщвление животных. Извлекают дренирующие околоушные лимфатические узлы и помещают их в *PBS* от каждого животного отдельно (индивидуальный подход к животным); в качестве альтернативы извлекают и помещают в *PBS* лимфатические узлы от мышей каждой подопытной группы (объединенный подход к подопытной группе). Подробная информация и графические изображения идентификации лимфатических узлов и их препарирования приведены в [12]. В протокол исследования могут быть также включены дополнительные параметры контроля изменений кожи уха на месте аппликации, например: баллы проявления эритемы уха или данные о толщине ушей (измеренной с помощью толщиномера или путем определения массы стандартных кусочков уха, полученных при некропсии с помощью перфоратора для взятия проб тканей ушной раковины).

6.4 Подготовка клеточной взвеси

Суспензию отдельных клеток лимфатических узлов (*LNC*) после билатерального извлечения (при индивидуальном сборе материала от каждой мыши или при альтернативном подходе с объединением лимфатических узлов всех мышей данной группы) получают мягкой механической дезагрегацией через сетку из нержавеющей стали с размером ячеек 200 мкм или с помощью других подходящих процедур. Полученные *LNC* дважды отмывают избытком *PBS* и осаждают DNA 5 %-ной трихлоруксусной кислотой (TCA) при температуре 4 °С в течение 18 ч [3]. Осадок повторно суспендируют в 1 мл TCA и переносят в сцинтилляционный флакон, содержащий 10 мл сцинтилляционной жидкости, для подсчета метки трития ^{3}H или в радиометрическую гамма-камеру для подсчета изотопа ^{125}I.

6.5 Определение клеточной пролиферации (включенной радиоактивности)

Включение меченого ^{3}H-метилтимидина измеряют сцинтилляционным β-счетчиком по числу распадов в минуту (*DPM*), включение меченого ^{125}I-йодоксиуридина — по ^{125}I также в *DPM*. В зависимости от используемого подхода включенная радиоактивность выражается как *DPM*/на мышь (при индивидуальном подходе к животным) или *DPM*/на подопытную группу мышей (при объединении биоматериала от всех мышей данной подопытной группы).

6.6 Редуцированный метод LLNA

6.6.1 В определенных ситуациях, когда возникает регуляторная необходимость подтверждения отрицательного прогноза о потенциальной способности вещества вызывать кожную сенсибилизацию, можно применять редуцированный протокол rLLNA [16]—[18] с использованием меньшего числа животных при условии соблюдения других характеристик протокола LLNA, изложенных в настоящем стандарте. Перед использованием метода rLLNA следует представить четкое обоснование и научное объяснение данного выбора. При получении положительного или вызывающего сомнения результата может потребоваться дополнительное исследование для объяснения или уточнения обнаруженного эффекта.

6.6.2 Сокращение количества изучаемых доз вещества и, соответственно, числа групп подопытных животных является единственной разницей между процедурами LLNA и rLLNA, и по этой причине rLLNA не дает информации о результатах оценки зависимости «доза—ответ», следовательно, его не

следует использовать, если требуется такая информация. Как и в полном варианте LLNA, концентрация исследуемого вещества в rLLNA должна быть наиболее максимальной из тех, которые не вызывают выраженной системной токсичности и/или чрезмерного местного раздражения кожи у мышей (см. 6.1.2).

7 Наблюдения

7.1 Клинические наблюдения

Каждую мышь следует тщательно осматривать не менее одного раз в день для выявления любых клинических признаков как местного раздражения на участке аппликации вещества, так и системной токсичности (см. 6.2.2). Все наблюдения должны систематически регистрироваться и содержать записи наблюдений для каждой мыши. В план мониторинга следует включать критерии быстрого выявления мышей с симптомами системной токсичности, чрезмерного местного раздражения кожи или изъязвления кожи для эвтаназии [37].

7.2 Масса тела

В соответствии с 6.3 индивидуальная масса тела животных должна быть определена в начале испытания и перед запланированным гуманным умерщвлением.

8 Анализ и интерпретация данных

8.1 Результаты испытания для каждой подопытной группы должны быть представлены в виде SI. При использовании индивидуального подхода к животным значение SI получают путем деления среднего значения *DPM* для одной мыши в каждой подопытной группе, включая группу *PC*, на среднее значение *DPM* для одной мыши в группе VC. Среднеарифметическое значение SI для VC равно одному. При использовании объединенного подхода к биоматериалу животных внутри подопытных групп SI определяют путем деления суммарной радиоактивности для каждой подопытной группы на соответствующее значение для объединенной группы VC; при этом сразу получают среднее значение SI.

8.2 Результат испытания оценивают как положительный при значении SI ≥ 3. В случае пограничных значений SI для трактовки результатов могут быть учтены выраженность зависимости «доза—ответ», статистическая значимость и непротиворечивость эффектов в контрольных группах и *PC* [4]—[6].

8.3 При необходимости уточнения полученных результатов следует проанализировать разные свойства исследуемого вещества, включая наличие структурного сходства с известными кожными сенсибилизаторами, а также вызывает ли оно чрезмерное местное раздражение кожи у мышей и какой характер имеет зависимость «доза—ответ». Эти и другие факторы подробно рассмотрены в [7].

8.4 Используя индивидуальный подход к сбору данных радиоактивности биоматериала мышей, можно проводить статистический анализ полученных данных на наличие и выраженность зависимости «доза—ответ». Статистическая оценка может включать оценку зависимости «доза—ответ», а также соответствующим образом скорректированное сравнение подопытных групп (например, одновременное попарное сравнение группы с введенной дозой и группы VC). Например, при статистическом анализе можно использовать метод линейной регрессии или тест Уильяма для оценки результатов зависимости «доза—ответ» и тест Даннетта для попарных сравнений. При выборе подходящего метода статистического анализа исследователь должен учесть возможное неравенство дисперсий изучаемой переменной внутри отдельных сравниваемых групп и другие сходные проблемы, которые могут потребовать преобразования данных или непараметрического статистического анализа. В любом случае исследователю может потребоваться вычисление SI и статистический анализ как с использованием полученных данных, так и при присутствии некоторых из них (называемых «выпадающие данные»).

9 Данные и протокол испытаний

9.1 Данные

Данные должны быть представлены в форме таблицы. При использовании индивидуального подхода к животным следует приводить индивидуальные значения *DPM* для каждого животного, средние значения *DPM* в каждой группе мышей с соответствующим значением ошибки его определения [например, среднеквадратическая ошибка (SD), стандартная погрешность среднего значения (SEM)], и

средние значения SI для каждой экспериментальной группы по отношению к группе VC. При использовании объединенного подхода к сбору экспериментального материала следует приводить полученные средние значения/медианы *DPM* и SI для каждой подопытной группы по отношению к параллельной группе VC.

9.2 Протокол испытаний

9.2.1 Протокол испытаний должен содержать информацию, приведенную в 9.2.1.1—9.2.1.7.

9.2.1.1 Исследуемое вещество и его контроль:

- данные идентификации (например, номер CAS, при наличии, источник, степень чистоты, известные примеси, номер партии);
- физико-химические свойства (летучесть, стабильность, растворимость);
- если это смесь, то указывают состав и относительное процентное содержание компонентов.

9.2.1.2 Растворитель/носитель:

- данные идентификации (степень чистоты, концентрация, при необходимости, используемый объем);
- обоснование выбора растворителя.

9.2.1.3 Подопытные животные:

- источник поступления мышей линии CBA;
- микробиологический статус животных, если известно;
- число и возраст животных;
- происхождение животных, условия содержания, корм и т. д.

9.2.1.4 Условия эксперимента:

- подробности подготовки и нанесения исследуемого вещества;
- обоснование выбора дозы (включая результаты предварительных экспериментов, в случае их проведения);
- используемый растворитель и концентрации исследуемого вещества и общее количество введенного исследуемого вещества;
- детали качества пищи и воды (включая тип/источник диеты, источник поступления воды);
- подробности проведения эксперимента и получения биологического материала;
- методы оценки токсичности;
- критерии интерпретации результатов исследования как положительных или отрицательных;
- детали любых отклонений от стандартного протокола и объяснения того, каким образом данное отклонение повлияло на схему исследования и результаты.

9.2.1.5 Проверка достоверности результатов исследования:

- резюме результатов последнего проводившегося контроля качества, включая информацию о исследуемом веществе, использовавшихся концентрациях и растворителе;
- текущий параллельный и/или ранее полученный *PC* и параллельный (*NC*) для данной лаборатории;
- если текущий параллельный *PC* не был включен, то необходимы данные и лабораторные протоколы последнего периодического *PC* и протоколов с подробным описанием данных периодического *PC*, которые служат для данной лаборатории обоснованием для отказа от проведения параллельного текущего *PC*.

9.2.1.6 Результаты:

- индивидуальные значения массы мышей перед началом опыта и перед запланированным умерщвлением, а также средние значения и соответствующие ошибки этих величин [например, среднеквадратическая ошибка (SD), стандартная погрешность среднего значения (SEM)] для каждой экспериментальной группы;
- динамика начала проявления и симптомы токсичности, включая кожное раздражение на участке аппликации вещества, при их наличии, для каждого животного;
- таблица значений *DPM* и SI для каждой мыши (при индивидуальном подходе к животным) или соответствующих средних значений/медиан (при объединенном подходе к экспериментальной группе) для каждой экспериментальной группы;
- среднее значение и соответствующая ошибка (например, SD или SEM) значений *DPM*/мышь для каждой экспериментальной группы и результаты анализа выпадающих данных внутри каждой экспериментальной группы при использовании индивидуального подхода к животным;

- вычисленное значение SI и соответствующей меры его вариабельности, учитывающей вариабельность эффектов, как в экспериментальных группах, так и в контрольных группах при использовании индивидуального подхода к животным;

- зависимость «доза—ответ»;

- статистический анализ при необходимости.

9.2.1.7 Обсуждение результатов.

- краткий комментарий к полученным результатам, включая характер зависимости «доза—ответ» и при необходимости статистический анализ с заключением о том, следует ли считать исследуемое вещество кожным сенсибилизатором.

Приложение А
(справочное)

Рабочие стандарты для оценки кожной сенсибилизации в аналогичных или модифицированных LLNA

А.1 Введение

А.1.1 Назначение рабочих стандартов (PS) состоит в том, чтобы проинформировать пользователей о новых экспериментальных методах, запатентованных (т. е. защищенных авторским правом, имеющих официально зарегистрированную торговую марку и зарегистрированных) и незапатентованных, которые могут быть определены как имеющие достаточную точность и надежность для специфических целей эксперимента. Данные PS на основе утвержденных и принятых методов испытаний могут быть использованы для оценки надежности и точности аналогичных методов испытания (в разговорной речи именуемых «похожий метод»), которые основаны на одних и тех же научных принципах и оценивают или прогнозируют тот же биологический или токсический эффект [14].

А.1.2 До принятия модифицированных методов испытания (т. е. предложенных потенциальных усовершенствований к утвержденному методу испытания) следует проводить оценку эффективности предложенных изменений и степени, в которой эти изменения влияют на другие компоненты процесса валидации. В зависимости от количества и характера предлагаемых изменений, полученных с их использованием, и подтверждающей документации для этих изменений, измененный метод подвергается полной процедуре валидации точно так же, как все новые методы испытаний, или, если это будет признано возможным, сокращенной процедуре оценки достоверности и обоснованности с использованием утвержденных PS [14].

А.1.3 Аналогичные или модифицированные методы испытания, предлагаемые для использования в соответствии с настоящим стандартом, должны быть подвергнуты оценке для определения их надежности и точности с использованием химических соединений, соответствующих полному диапазону балльной оценки LLNA. Для предотвращения необоснованного использования животных настоятельно рекомендуется основываться на принципах OECD до начала валидационного исследования в соответствии с PS и методологическими принципами, приведенными в настоящем стандарте.

А.1.4 Эти PS основаны на гармонизированных нормативных требованиях «Межведомственного координационного комитета по валидации альтернативных методов» (US-ICCVAM, EC-ECVAM и Japanes-JaCVAM) [12] к оценке достоверности аналогичных или модифицированных версий LLNA. В состав PS включены обязательные компоненты метода испытаний, рекомендуемые эталонные вещества и стандарты точности и надежности, которым должен соответствовать или превосходить предлагаемый метод испытаний.

А.2 Основные компоненты метода испытания

Для обеспечения функционального и механического соответствия аналогичного или модифицированного метода LLNA исходному методу LLNA оценивают один и тот же биологический эффект. В протокол метода испытаний должны быть включены следующие критерии:

- исследуемое вещество, которое должно быть нанесено на поверхность обоих ушей мыши;
- пролиферация лимфоцитов, которую следует определять в лимфатических узлах, дренирующих участок аппликации исследуемого вещества;
- пролиферация лимфоцитов, которую следует определять в течение фазы индукции кожной сенсибилизации;
- самая высокая доза исследуемого вещества, которая должна быть максимальной концентрацией, не вызывающей проявления системной токсичности и/или чрезмерного местного раздражения кожи мышей. Для позитивных контролей самая высокая доза должна давать значение EC3 и при этом не вызывать симптомов системной токсичности и/или чрезмерного местного раздражения кожи мышей (см. таблицу А.1);
- параллельный VC должен быть включен в каждое исследование, а при необходимости — параллельный *PC*;
- на каждую дозу следует использовать не менее четырех животных;
- данные могут быть получены как по отдельным животным, так и объединены по группам.

При отсутствии соответствия по любому из этих критериев данный PS не может быть использован для валидации аналогичного или модифицированного метода испытания.

А.3 Минимальный перечень эталонных веществ

Методы US-ICCVAM, EC-ECVAM и Japanes-JaCVAM, гармонизированные с PS [12], устанавливают не менее 18 основных эталонных веществ, которые рекомендованы к использованию, и четырех дополнительных веществ, которые могут давать ложноположительные или ложноотрицательные эффекты в LLNA по документу [13].

При выборе этих веществ следует руководствоваться следующими критериями:

- в список эталонных должны быть включены вещества, как правило, исследуемые на потенциальную возможность кожной сенсибилизации в диапазоне эффектов, которые LLNA способен измерять или прогнозировать;

- вещества должны иметь точно определенную химическую структуру;
- для этих веществ должны быть доступны данные LLNA, полученные в результате опытов на морских свинках по документу [13], и (при наличии) данные участников экспериментов;
- вещества должны быть в продаже.

Рекомендуемые эталонные вещества приведены в таблице А.1. Исследования с использованием предложенных эталонов следует проводить с растворителями, приведенными в таблице А.1. При недоступности данных веществ можно использовать другие вещества, соответствующие вышеуказанным критериям отбора.

А.4 Характеристика стандартов надежности и точности

А.4.1 Точность аналогичного или модифицированного метода испытаний LLNA должна соответствовать или превосходить точность PS LLNA, при этом сравнение должно быть проведено по результатам испытания с использованием полной минимальной базы, состоящей из 18 эталонных веществ. Новый или модифицированный метод LLNA должен правильно классифицировать эти эталонные вещества по принципу «да/нет», однако новый или модифицированный метод LLNA не сможет правильно классифицировать все используемые эталонные вещества.

Если, например, один из слабых сенсибилизаторов классифицирован неверно, необходимо представить обоснование неправильной классификации данного эталонного вещества и соответствующие дополнительные данные (например, результаты испытаний, обеспечивающих правильную классификацию других веществ, сходных с неверно классифицированным эталонным веществом по физическим, химическим и сенсибилизирующим свойствам), для того чтобы продемонстрировать эквивалентность результатов исследований.

При таких обстоятельствах результаты валидации нового или модифицированного метода испытаний LLNA должны быть оценены в каждом конкретном случае индивидуально.

А.4.2 Внутрилабораторная воспроизводимость

Внутрилабораторную воспроизводимость для нового или модифицированного методов испытаний LLNA определяют с использованием сенсибилизирующего вещества, хорошо охарактеризованного в настоящем методе. Поэтому PS LLNA основаны на вариативности результатов повторных испытаний гексилкоричного альдегида (HCA). Для оценки внутрилабораторной надежности должны быть получены значения предельной пороговой концентрации (*ECt*) для гексилкоричного альдегида (HCA) в четырех отдельных экспериментах с интервалом не менее одной недели между испытаниями. Приемлемая внутрилабораторная воспроизводимость соответствует значению пороговой концентрации (*ECt*) от 5 % до 20 % для средних концентраций EC3 в диапазоне от 0,5 EC3 до 2,0 EC3, приведенных для HCA (10 %) в LLNA (см. таблицу А.1).

А.5 Межлабораторная воспроизводимость

Межлабораторную воспроизводимость нового или модифицированного метода испытаний LLNA следует оценивать с использованием двух сенсибилизирующих веществ, которые четко охарактеризованы в LLNA. Поэтому PS LLNA основаны на вариативности результатов испытаний HCA и 2,4-динитрохлорбензола (DNCB) в разных лабораториях. Значения *ECt* должны быть получены в независимых исследованиях, проведенных не менее чем в трех разных лабораториях. Чтобы продемонстрировать приемлемую межлабораторную воспроизводимость каждая лаборатория должна получить значения *ECt* от 5 % до 20 % для HCA и от 0,025 % до 0,1 % для DNCB, что соответствует диапазону средних значений концентраций EC3 от 0,5 EC3 до 2,0 EC3, приведенных в таблице А.1 для HCA (10 %) и DNCB (0,05 %).

Таблица А.1 — Рекомендуемые эталонные вещества для PS LLNA

Наименование вещества[1]	Номер CAS	Физическое состояние	Раство-ритель[2]	EC3 %[3]	Число исследо-ваний[4]	Диапазон 0,5 · EC3 — 2,0 · EC3	Фактический диапазон EC3	LLNA для морской свинки	LLNA для человека
2-Метил-5-хлоризотиазолинон-3 (CMI)/ 2-метил-4-хлоризотиазолинон-3 (MI)[5]	26172-55-4/ 2682-20-4	Жидкость	DMF	0,009	1	0,0045—0,018	*NC*	+/+	+/+
Динитрохлорбензол (DNCB)	97-00-7	Твердое вещество	AOO	0,049	15	0,025—0,099	0,02—0,094	+/+	+/+
4-Фенилендиамин	106-50-3	Твердое вещество	AOO	0,11	6	0,055—0,22	0,07—0,16	+/+	+/+
Хлорид кобальта	7646-79-9	Твердое вещество	DMSO	0,6	2	0,3—1,2	0,4—0,8	+/+	+/+
2-Метокси-4-пропенилфенол (изоэвгенол)	97-54-1	Жидкость	AOO	1,5	47	0,77—3,1	0,5—3,3	+/+	+/+
2-Меркапто-бензотиазол	149-30-4	Твердое вещество	DMF	1,7	1	0,85—3,4	*NC*	+/+	+/+
Цитраль	5392-40-5	Жидкость	AOO	9,2	6	4,6—18,3	5,1—13	+/+	+/+
Гексилкоричный альдегид (HCA)	101-86-0	Жидкость	AOO	9,7	21	4,8—19,5	4,4—14,7	+/+	+/+
Эвгенол	97-53-0	Жидкость	AOO	10,1	11	5,05—20,2	4,9—15	+/+	+/+
Фенилбензоат	93-99-2	Твердое вещество	AOO	13,6	3	6,8—27,2	1,2—20	+/+	+/+
Коричный спирт	104-54-1	Твердое вещество	AOO	21	1	10,5—42	*NC*	+/+	+/+
Имидазолидинил-мочевина	39236-46-9	Твердое вещество	DMF	24	1	12—48	*NC*	+/+	+/+
Метилметакрилат	80-62-6	Жидкость	AOO	90	1	45—100	*NC*	+/+	+/+
Хлорбензол	108-90-7	Жидкость	AOO	25	1	NA	NA	–/–	–/*
Изопропиловый спирт	67-63-0	Жидкость	AOO	50	1	NA	NA	–/–	–/+
Молочная кислота	50-21-5	Жидкость	DMSO	25	1	NA	NA	–/–	–/*
Метилсалицилат	119-36-8	Жидкость	AOO	20	9	NA	NA	–/–	–/-
Салициловая кислота	69-72-7	Твердое вещество	AOO	25	1	NA	NA	–/–	–/–

Окончание таблицы А.1

Наименование вещества[1)]	Номер CAS	Физическое состояние	Растворитель[2)]	EC3, %[3)]	Число исследований[4)]	Диапазон 0,5 EC3 — 2,0 · EC3	Фактический диапазон EC3	LLNA для морской свинки	LLNA для человека
Дополнительные вещества для демонстрации улучшенных характеристик LLNA									
Лаурилсульфат натрия	151-21-3	Твердое вещество	DMF	8,1	5	4,05—16,2	1,5-17,1	+/–	+/–
Диметакрилат этиленгликоля	97-90-5	Жидкость	MEK	28	1	14—56	*NC*	+/–	+/+
Ксилол	1330-20-7	Жидкость	AOO	95,8	1	47,9—100	*NC*	+/**	+/–
Хлорид никеля	7718-54-9	Твердое вещество	DMSO	5	2	NA	NA	–/+	–/+

Сокращения: AOO — ацетон: оливковое масло (4:1 по объему); номер CAS — регистрационный номер CAS; DMF — N,N-диметилформамид; DMSO — диметилсульфоксид; EC3 — вычисленное значение концентрации, необходимое для получения индекса стимуляции 3; GP — результат испытания на морских свинках [24]; HCA — гексилкоричный альдегид; LLNA — результаты оценки локальных лимфатических узлов по настоящему стандарту; MEK — метилэтилкетон; NA — не применимо, т. к. индекс стимуляции < 3; *NC* — не вычислены, т. к. получены данные из одного исследования; Veh — растворитель для испытаний.

1) Растворы исследуемого вещества готовят ежедневно, если данные по стабильности не допускают возможности более длительного хранения.

2) Так как растворители потенциально способны влиять на результаты испытания LLNA, для каждого стандартного вещества следует использовать рекомендованный для него растворитель [24], [32].

3) Среднеарифметическое значение в тех случаях, когда доступно более одного значения EC3. Для веществ, не давших ожидаемого результата (т. е. с индексом стимуляции <3), приводят самую высокую из проверенных концентраций.

4) Число исследований LLNA, в которых получены данные.

5) Имеется в продаже как Kathon CG (CAS № 55965-84-9), который является смесью указанных компонентов CMI и MI в соотношении 3:1. Относительные концентрации каждого компонента в препарате Kathon CG варьируют от 1,1 % до 1,25 % для CMI и от 0,3 % до 0,45 % для MI. Неактивные компоненты — соли магния (от 21,5 % до 24 %) и нитрат меди (от 0,15 % до 0,17 %), остальные 74 % — 77 % — вода. Kathon CG можно приобрести через Sigma-Aldrich или Rohm & Haas (в настоящее время корпорация Dow Chemical).

* Предположение о том, что данное вещество не является сенсибилизирующим агентом, основано на факте отсутствия положительных результатов клинических кожных проб, отсутствии данного вещества в списках стандартных аллергенов и клинических случаев сенсибилизации у людей.

** Данные (GP), полученные на морских свинках, не доступны.

Приложение ДА
(рекомендуемое)

Сопоставление структуры настоящего стандарта со структурой примененного в нем международного документа

Таблица ДА.1

Структура настоящего стандарта	Структура международного документа OECD Test № 429:2010
Введение (1, 2)	Введение 1 2
1 Область применения	—
2 Термины, определения и сокращения (3, приложение 2)	Определения 3
3 Основные положения и ограничения (4, 5) 3.1 3.2	Основные положения и ограничения 4 5
4 Принцип испытания (6) 4.1	Принцип испытания 6
5 Сущность метода (7—16) 5.1 Выбор вида животных	Сущность метода Выбор вида животных 7
5.2 Условия содержания и кормления	Условия содержания и кормления 8
5.3 Подготовка животных	Подготовка животных 9
5.4 Подготовка растворов	Подготовка растворов 10
5.5 Проверка надежности 5.5.1 5.5.2 5.5.3 5.5.4 5.5.5 5.5.6	Проверка надежности 11 12 13 14 15 16
6 Проведение испытаний (17—29) 6.1 Число животных и выбор доз 6.1.1 6.1.2 6.1.3 6.1.4	Проведение испытаний Число животных и выбор доз 17 18 19 20
6.2 Предварительные исследования 6.2.1 6.2.2 6.2.3 6.2.4	Предварительные исследования 21 22 23 24
6.3 Программа основного эксперимента	Программа основного эксперимента 25
6.4 Подготовка клеточной взвеси	Подготовка клеточной взвеси 26

Окончание таблицы ДА.1

Структура настоящего стандарта	Структура международного документа OECD Test № 429:2010
6.5 Определение клеточной пролиферации (включенной радиоактивности)	Определение клеточной пролиферации (включенной радиоактивности) 27
6.6 Редуцированный метод LLNA 6.6.1 6.6.2	Редуцированный метод LLNA 28 29
7 Наблюдения (30, 31) 7.1 Клинические наблюдения 7.2 Масса тела	Наблюдения Клинические наблюдения 30 Масса тела 31
8 Анализ и интерпретация данных (32—35) 8.1 8.2 8.3 8.4	Анализ и интерпретация данных 32 33 34 35
9 Данные и протокол испытаний (36) 9.1 Данные	Данные и протокол испытаний Данные 36
9.2 Протокол испытаний (37)	Протокол испытаний 37
*	Библиография
Приложение А Стандарты испытаний для оценки кожной сенсибилизации в аналогичных или модифицированных методах LLNA (Приложение 1)	Приложение 1 Стандарты испытаний для оценки кожной сенсибилизации в аналогичных или модифицированных методах LLNA
**	Приложение 2 Определения
Приложение ДА Сопоставление структуры настоящего стандарта со структурой примененного в нем международного документа	—
Библиография	—

* Данный раздел приведен в конце стандарта для приведения в соответствие с требованиями ГОСТ 1.5.

** Термины и определения приведены в разделе 2 настоящего стандарта для приведения в соответствие с требованиями ГОСТ 1.5.

Примечание — После заголовков разделов настоящего стандарта приведены в скобках номера аналогичных параграфов международного документа. Приведено также соответствие подразделов настоящего стандарта параграфам международного документа.

Библиография

[1] OECD (2002), Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay. OECD Guideline for the Testing of Chemicals № 429, Paris. Available at: [gost.e-ecolog.ru]

[2] Kimber, I. and Basketter, D.A. (1992), The murine local lymph node assay; collaborative studies and new directions: A commentary, *Food Chem. Toxicol.*, 30, 165—169

[3] Kimber, I., Dearman, R.J., Scholes, E.W. and Basketter, D.A. (1994), The local lymph node assay: developments and applications, *Toxicol.*, 93, 13—31

[4] Kimber, I., Hilton, J., Dearman, R.J., Gerberick, G.F., Ryan, C.A., Basketter, D.A., Lea, L., House, R.V., Ladies, G.S., Loveless, S.E. and Hastings, K.L. (1998), Assessment of the skin sensitisation potential of topical medicaments using the local lymph node assay: An interlaboratory exercise, *J. Toxicol. Environ. Health,* 53, 563—79

[5] Chamberlain, M. and Basketter, D.A. (1996), The local lymph node assay: status of validation, *Food Chem. Toxicol.*, 34, 999—1002

[6] Basketter, D.A., Gerberick, G.F., Kimber, I. and Loveless, S.E. (1996), The local lymph node assay: A viable alternative to currently accepted skin sensitisation tests, *Food Chem. Toxicol.*, 34, 985—997

[7] Basketter, D.A., Gerberick, G.F. and Kimber, I. (1998), Strategies for identifying false positive responses in predictive sensitisation tests, *Food Chem. Toxicol.*, 36, 327—33

[8] Van Och, F.M.M., Slob, W., De Jong, W.H., Vandebriel, R.J. and Van Loveren, H. (2000), A quantitative method for assessing the sensitising potency of low molecular weight chemicals using a local lymph node assay: employment of a regression method that includes determination of uncertainty margins, *Toxicol.*, 146, 49—59

[9] Dean, J.H., Twerdok, L.E., Tice, R.R., Sailstad, D.M., Hattan, D.G., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: II. Conclusions and recommendations of an independent scientific peer review panel, *Reg. Toxicol. Pharmacol,* 34: 258—273

[10] Haneke, K.E., Tice, R.R., Carson, B.L., Margolin, B.H., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: III. Data analyses completed by the national toxicology program interagency center for the evaluation of alternative toxicological methods, *Reg. Toxicol. Pharmacol,* 34, 274—286

[11] Sailstad, D.M., Hattan, D., Hill, R.N., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: I. The ICCVAM review process, *Reg. Toxicol. Pharmacol,* 34: 249—257

[12] ICCVAM (2009), Recommended Performance Standards: Murine Local Lymph Node Assay, NIH Publication Number 09-7357, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Available at: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna-ps/LLNAPerfStds.pdf]

[13] OECD (1992), *Skin Sensitisation*. OECD Guideline for Testing of Chemicals № 406, OECD*, Paris. Available at: [gost.e-ecolog.ru]

[14] OECD (2005), *Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment*, Environment, Health and Safety Monograph, Series on Testing and Assessment No. 34, ENV/JM/MONO (2005)14, OECD, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

[15] Dearman, R.J., Hilton, J., Evans, P., Harvey, P., Basketter, D.A. and Kimber, I. (1998), Temporal stability of local lymph node assay responses to hexyl cinnamic aldehyde, *J. Appl. Toxicol.*, 18, 281—284

[16] Kimber, I., Dearman, R.J., Betts, C.J., Gerberick, G.F., Ryan, C.A., Kern, P.S., Patlewicz, G.Y. and Basketter, D.A. (2006), The local lymph node assay and skin sensitization: a cut-down screen to reduce animal requirements, *Contact Dermatitis*, 54, 181—185

[17] ESAC (2007), Statement on the Reduced Local Lymph Node Assay (rLLNA), European Commission Directorate General, Joint Research Centre, Institute for Health and Consumer Protection, European Centre for the Validation of Alternative Methods, April 2007. Available at: [gost.e-ecolog.ru]

[18] ICCVAM (2009), The Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) Test Method Evaluation Report. The Reduced Murine Local Lymph Node Assay: An Alternative Test Method Using Fewer Animals to Assess the Allergic Contact Dermatitis Potential of Chemicals and Products, NIH Publication Number 09-6439, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Available at: [gost.e-ecolog.ru]

[19] ICCVAM (1999), The Murine Local Lymph Node Assay: A Test Method for Assessing the Allergic Contact Dermatitis Potential of Chemicals/Compounds, The Results of an Independent Peer Review Evaluation Coordinated by the Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM), NIH Publication No. 99-4494, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Available at: [gost.e-ecolog.ru]

* Действует ГОСТ 32375—2013 «Методы испытания по воздействию химической продукции на организм человека. Испытания по оценке кожной сенсибилизации».

[20] Kreiling, R., Hollnagel, H.M., Hareng, L., Eigler, L., Lee, M.S., Griem, P., Dreessen, B., Kleber, M., Albrecht, A., Garcia, C. and Wendel, A. (2008), ComparISO n of the skin sensitizing potential of unsaturated compounds as assessed by the murine local lymph node assay (LLNA) and the guinea pig maximization test (GPMT), *Food Chem. Toxicol.*, 46, 1896—1904

[21] Basketter, D., Ball, N., Cagen, S., Carrilo, J.C., Certa, H., Eigler, D., Garcia, C., Esch, H., Graham, C., Haux, C., Kreiling, R. and Mehling, A. (2009), Application of a weight of evidence approach to assessing discordant sensitisation datasets: implications for REACH, *Reg. Toxicol. Pharmacol.*, 55, 90—96

[22] ICCVAM (2009), ICCVAM Test Method Evaluation Report. Assessment of the Validity of the LLNA for Testing Pesticide Formulations and Other Products, Metals, and Substances in Aqueous Solutions, NIH Publication Number 10-7512, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences, Available at: [gost.e-ecolog.ru]

[23] ILAR (1996), Institute of Laboratory Animal Research (ILAR) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 7th ed. Washington, DC: National Academies Press

[24] McGarry, H.F. (2007), The murine local lymph node assay: regulatory and potency considerations under REACH, *Toxicol.*, 238, 71—89

[25] OECD (2002), Acute Dermal Irritation/Corrosion. OECD Guideline for Testing of Chemicals No. 404, Paris, France. Available at: [http://www.oecd.org/document/40/0,3343,en_2649_34377_37051368_1_1_1_1,00.html]

[26] Reeder, M.K., Broomhead, Y.L., DiDonato, L. and DeGeorge, G.L. (2007), Use of an enhanced local lymph node assay to correctly classify irritants and false positive substances, *Toxicologist*, 96, 235

[27] ICCVAM (2009), Non-radioactive Murine Local Lymph Node Assay: Flow Cytometry Test Method Protocol (LLNA: BrdU-FC) Revised Draft Background Review Document, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Available at: [gost.e-ecolog.ru]

[28] Hayes, B.B., Gerber, P.C., Griffey, S.S. and Meade, B.J. (1998), Contact hypersensitivity to dicyclohexylcarbodiimide and diISO propylcarbodiimide in female B6C3F1 mice, *Drug. Chem. Toxicol.*, 21, 195—206

[29] Homey, B., von Schilling, C., Blumel, J., Schuppe, H.C., Ruzicka, T., Ahr, H.J., Lehmann, P. and Vohr, V.W. (1998), An integrated model for the differentiation of chemical-induced allergic and irritant skin reactions, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 153, 83—94

[30] Woolhiser, M.R., Hayes, B.B. and Meade, B.J. (1998), A combined murine local lymph node and irritancy assay to predict sensitization and irritancy potential of chemicals, *Toxicol. Meth.*, 8, 245—256

[31] Hayes, B.B. and Meade, B.J. (1999), Contact sensitivity to selected acrylate compounds in B6C3F1 mice: relative potency, cross reactivity, and comparISO n of test methods, *Drug. Chem. Toxicol.*, 22, 491—506

[32] Ehling, G., Hecht, M., Heusener, A., Huesler, J., Gamer, A.O., van Loveren, H., Maurer, T., Riecke, K., Ullmann, L., Ulrich, P., Vandebriel, R. and Vohr, H.W. (2005), A European inter-laboratory validation of alternative endpoints of the murine local lymph node assay: first round. *Toxicol.*, 212, 60—68

[33] Vohr, H.W. and Ahr, H.J. (2005), The local lymph node assay being too sensitive? *Arch. Toxicol.*, 79, 721—728

[34] Patterson, R.M., Noga, E. and Germolec, D. (2007), Lack of evidence for contact sensitization by Pfiesteria extract, *Environ. Health Perspect.*, 115, 1023—1028

[35] OECD (1987), *Acute Dermal Toxicity*, OECD Guideline for Testing of Chemicals No 402, Paris, France. Available at: [gost.e-ecolog.ru]

[36] ICCVAM (2009), Report on the ICCVAM-NICEATM/ECVAM/JaCVAM Scientific Workshop on Acute Chemical Safety Testing: Advancing *In Vitro* Approaches and Humane Endpoints for Systemic Toxicity Evaluations. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences, Available at: [gost.e-ecolog.ru]

[37] OECD (2000), *Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation*, Environmental Health and Safety Monograph, Series on Testing and Assessment №. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris. Available at: [gost.e-ecolog.ru]

УДК 615.038/615.012/615.014/615.2:006.354 МКС 75.080
11.020
11.120.01 MOD

Ключевые слова: воздействие химической продукции на организм человека, испытания по оценке кожной сенсибилизации, изучение реакции региональных лимфатических узлов

БЗ 7—2019/71

Редактор *Л.С. Зимилова*
Технический редактор *И.Е. Черепкова*
Корректор *М.И. Першина*
Компьютерная верстка *И.А. Налейкиной*

Сдано в набор 16.08.2019. Подписано в печать 29.08.2019. Формат 60×84 1/8. Гарнитура Ариал.
Усл. печ. л. 2,79. Уч.-изд. л. 2,51.
Подготовлено на основе электронной версии, предоставленной разработчиком стандарта

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

Поправка к ГОСТ 34556—2019 Методы испытания по воздействию химической продукции на организм человека. Испытания по оценке кожной сенсибилизации методом изучения реакции региональных лимфатических узлов

В каком месте	Напечатано	Должно быть		
Предисловие. Таблица согласования	—	Казахстан	KZ	Госстандарт Республики Казахстан

(ИУС № 8 2020 г.)

gost.e-ecolog.ru