МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СОВЕТ ПО СТАНДАРТИЗАЦИИ, МЕТРОЛОГИИ И СЕРТИФИКАЦИИ
(МГС)

INTERSTATE COUNCIL FOR STANDARDIZATION, METROLOGY AND CERTIFICATION
(ISC)

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ
СТАНДАРТ

**ГОСТ
32638—
2020**

МЕТОДЫ ИСПЫТАНИЯ ПО ВОЗДЕЙСТВИЮ ХИМИЧЕСКОЙ ПРОДУКЦИИ НА ОРГАНИЗМ ЧЕЛОВЕКА

Метод оценки генных мутаций на клетках млекопитающих *in vitro*

Издание официальное



Москва
Стандартинформ
2020

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 июня 2020 г. № 131-П)

За принятие проголосовали:

Краткое наименование страны по МК (ИСО 3166) 004--97	Код страны по МК (ИСО 3166) 004--97	Сокращенное наименование национального органа по стандартизации
Армения	AM	ЗАО «Национальный орган по стандартизации и метрологии» Республики Армения
Беларусь	BY	Госстандарт Республики Беларусь
Казахстан	KZ	Госстандарт Республики Казахстан
Киргизия	KG	Кыргызстандарт
Россия	RU	Росстандарт
Таджикистан	TJ	Таджикстандарт
Узбекистан	UZ	Узстандарт

4 Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 22 октября 2020 г. № 910-ст межгосударственный стандарт ГОСТ 32638—2020 введен в действие в качестве национального стандарта Российской Федерации с 1 июля 2021 г.

5 Настоящий стандарт является модифицированным по отношению к международному документу OECD Test № 476:2016 «Руководство по испытанию химических веществ. Метод оценки генных мутаций на клетках млекопитающих *in vitro* с использованием генов *Hprt* and *xprt*» («Guideline for testing of chemicals. *In Vitro* mammalian cell gene mutation tests using the *Hprt* and *xprt* genes», MOD) путем:

- включения дополнительного раздела 1, дополнительных слов, которые выделены в тексте курсивом;
- изменения его структуры для приведения в соответствие с правилами, установленными в ГОСТ 1.5 (подразделы 4.2 и 4.3).

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

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

6 ВЗАМЕН ГОСТ 32638—2014

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, 2020

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 и определения 1
3 Основные положения и ограничения 2
4 Принцип проведения испытаний 2
5 Описание метода 3
6 Условия проведения испытаний 6
7 Данные и отчет 8
Приложение А (справочное) Оценка цитотоксичности и частоты мутаций 11
Приложение ДА (справочное) Сопоставление структуры настоящего стандарта со структурой примененного в нем международного документа 12
Библиография 14

Введение

Руководства Организации экономического сотрудничества и развития (OECD) периодически пересматриваются с учетом научного прогресса, изменений в нормативном законодательстве и с целью защиты животных. Впервые руководство OECD Test № 476 было принято в 1984 г. В 1997 г. был принят пересмотренный документ, включающий новые данные, полученные в этой области, отражающий почти тридцатилетний опыт работ с использованием данного метода и также являющийся результатом разработки отдельного нового руководства, посвященного методу оценки генных мутаций на клетках млекопитающих *in vitro* с использованием гена тимидинкиназы. Настоящее руководство является частью серии руководств по генетической токсикологии. Настоящий документ предоставляет краткую информацию об исследованиях в области генетической токсикологии и обзор последних изменений, которые были внесены в руководства по испытаниям[1)].

Целью метода оценки генных мутаций на клетках млекопитающих *in vitro* является обнаружение генных мутаций, индуцируемых химическими соединениями. В клеточных линиях, используемых в экспериментах, измеряют прямые мутации репортерных генов (*генетических маркеров*), в частности эндогенных гипоксантин-гуанин-фосфорибозилтрансферазы (*Hprt* — в клетках грызунов, HPRT — в клетках человека, в настоящем руководстве обобщенно именуемые геном *Hprt* и геном HPRT) и трансген ксантин-гуанин-фосфорибозилтрансферазы (*gpt*) (обозначаемый XPRT).

Анализы мутации HPRT и XPRT выявляют разные спектры генетических событий. В дополнение к мутациям, обнаруженным анализом HPRT (например, замена пар оснований, сдвиг рамки считывания, небольшие делеции и вставки), аутосомное расположение трансгена *gpt* позволяет обнаружить мутации, возникающие в результате больших делеций и, возможно, митотической рекомбинации, не определяемой с использованием HPRT анализа, потому что ген *Hprt* расположен в Х-хромосоме[2)]. В настоящее время для нормативного регулирования XPRT анализ используют менее широко, чем HPRT анализ.

[1)] См. [1].

[2)] См. [2]—[7].

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

МЕТОДЫ ИСПЫТАНИЯ ПО ВОЗДЕЙСТВИЮ ХИМИЧЕСКОЙ ПРОДУКЦИИ НА ОРГАНИЗМ ЧЕЛОВЕКА

Метод оценки генных мутаций на клетках млекопитающих *in vitro*

Methods of testing the impact of chemical products on the human body.
Method for evaluating the gene mutations in mammalian cells *in vitro*

Дата введения — 2021—07—01

1 Область применения

Настоящий стандарт устанавливает требования к проведению испытаний по оценке генных мутаций на клетках млекопитающих in vitro, вызываемых химическими веществами, путем измерения прямых мутаций генов тимидинкиназы (ТК) и гипоксантин-гуанин-фосфорибозилтрансферазы (HPRT) и трансгена ксантин-гуанин-фосфорибозилтрансферазы (XPRT) и применяется для скрининга потенциальной мутагенности и канцерогенности веществ для млекопитающих.

2 Термины и определения

В настоящем стандарте применены следующие термины с соответствующими определениями:

2.1 **мутагены, замещающие пары оснований** (base pair substitution mutagens): Вещества, вызывающие замещение пар оснований в дезоксирибонуклеиновой кислоте (ДНК).

2.2 **эффективность клонирования** (cloning efficiency): Процент высеянных клеток низкой плотности, способных вырасти в колонию, которую можно подсчитать.

2.3 **концентрации** (concentrations): Конечные концентрации исследуемого химического вещества в культуральной среде.

2.4 **цитотоксичность** (cytotoxicity): Снижение относительной выживаемости клеток, подвергшихся воздействию, по сравнению с отрицательным контролем.

2.5 **прямая мутация** (forward mutation): Генная мутация от родительского типа к мутантному типу, которая приводит к изменению или потере активности фермента или функции кодируемого белка.

2.6 **мутаген, вызывающий мутации со сдвигом рамки считывания** (frameshift mutagens): Вещества, которые вызывают вставку или делецию одной или нескольких пар оснований в молекуле ДНК.

2.7 **генотоксичность** (genotoxic): Общий термин, охватывающий все типы повреждений ДНК или хромосом, включая разрывы ДНК, аддукты, перестройки, мутации, хромосомные аберрации и анеуплоидию.

Примечание — Не все виды генотоксических эффектов приводят к мутациям или стабильному повреждению хромосом.

2.8 **HAT-среда** (HAT medium): Среда, содержащая гипоксантин, аминоптерин, тимидин и используемая для очистки мутантов *Hprt*.

2.9 **митотическая рекомбинация** (mitotic recombination): Рекомбинация между гомологичными хроматидами во время митоза,

Примечание — Митотическая рекомбинация может приводить к индукции двухцепочечных разрывов ДНК или к потере гетерозиготности.

2.10 **среда MPA** (MPA medium): Среда, содержащая ксантин, аденин, тимидин, аминоптерин, микофеноловую кислоту, используемая для очистки мутаций x*prt*.

Издание официальное

2.11 **мутагенный** (mutagenic): Вызывающий наследуемое изменение последовательностей пар оснований ДНК в генах или в структуре хромосом (хромосомные аберрации).

2.12 **частота мутаций;** MF [mutant frequency (MF)]: Отношение числа выявленных мутантных клеток к общему числу выживших клеток.

2.13 **время фенотипической экспрессии** (phenotypic expression time): Период времени после воздействия, в течение которого генетическое изменение фиксируется в геноме и любые предшествующие генные продукты истощаются настолько, что изменяется фенотипический признак.

2.14 **относительная выживаемость;** RS [relative survival (RS)]: Мера цитотоксичности, связанная с воздействием.

Примечание — RS — это эффективность клонирования (CE) клеток, высеянных сразу после воздействия, с поправкой на потерю клеток в процессе воздействия, по сравнению с эффективностью клонирования в отрицательных контролях (выживаемость принимают равной 100 %).

2.15 **S9 фракция печени** (S9 liver fractions): Супернатант гомогената печени после 9000 g центрифугирования, экстракт сырой печени.

2.16 **смесь S9** (S9 mix): Смесь S9 фракции печени и кофакторов, необходимых для метаболической активности ферментов.

2.17 **контроль растворителя** (solvent control): Общий термин для определения контрольных культур только в растворителе, используемом для растворения исследуемого химического вещества.

2.18 **необработанный контроль** (untreated control): Культуры клеток, которые не подвергают обработке (т. е. отсутствуют химические вещества или растворители), но подвергают одновременно такому же анализу, что и культуры, обработанные исследуемым химическим веществом.

3 Основные положения и ограничения

3.1 Испытания, проводимые *in vitro*, обычно требуют использования экзогенного источника метаболической активации. Экзогенная система метаболической активации не может полностью воспроизводить условия *in vivo*.

3.2 Следует избегать условий, которые могут привести к положительным артефактам (например, возможному взаимодействию с испытуемой системой), не вызванным прямым взаимодействием между исследуемыми химическими веществами и генетическим материалом клетки. Такие условия касаются изменения значения pH или осмотической концентрации раствора[1)], взаимодействия с компонентами среды[2)] или высокого уровня цитотоксичности[3)]. Цитотоксичность, превышающую рекомендованные верхние уровни, приведенные в 5.2.2.3, считают чрезмерной для анализа HPRT.

3.3 Перед использованием настоящего стандарта для смеси с целью получения данных, предназначенных для целей регулирования, следует рассмотреть вопрос о возможности обеспечения достоверных результатов. Такое рассмотрение не требуется, если существует нормативное требование для испытания смеси.

4 Принцип проведения испытаний

4.1 Клетки-мутанты с дефицитом активности фермента *Hprt* в анализе HPRT или фермента *xprt* в анализе XPRT устойчивы к цитостатическим эффектам пуринового аналога 6-тиогуанина (TG). Клетки профицитные по *Hprt* (в HPRTанализе) или *gpt* (в анализе XPRT) чувствительны к TG, что вызывает ингибирование клеточного метаболизма и останавливает дальнейшее деление клеток. Таким образом, клетки-мутанты способны разрастаться (пролиферировать) в присутствии TG в отличие от нормальных клеток, содержащих фермент *Hprt* (в анализе HPRT) или *gpt* (в анализе XPRT), не обладающих такой способностью.

4.2 Клеточную суспензию или монослойную культуру подвергают воздействию исследуемого химического вещества как с экзогенным источником метаболической активации (см. 5.1.4), так и без него, в течение установленного периода времени (от 3 до 6 ч) и затем субкультивируют для определения

[1)] См. [8]—[10].

[2)] См. [11], [12].

[3)] См. [13].

цитотоксичности и фенотипической экспрессии до отбора мутантов[1]. Цитотоксичность определяется относительной выживаемостью (RS), то есть эффективностью клонирования, измеренной сразу после воздействия и скорректированной на любую потерю клеток во время воздействия по сравнению с отрицательным контролем (см. 5.2.2.2 и приложение А). Обработанные культуры клеток культивируют в среде для выращивания в течение соответствующего периода времени, характерного для каждого типа клеток, для обеспечения близкой к оптимальному значению фенотипической экспрессии индуцированных мутаций (обычно от 7 до 9 дней). Частоту мутаций после фенотипической экспрессии определяют путем посева известного количества клеток в культуральную среду, содержащую селективный агент для выявления мутантных колоний, и в среду без селективного агента для определения эффективности клонирования (жизнеспособности). После соответствующего времени инкубации подсчитывают колонии. Частоту мутаций определяют по количеству мутантных колоний, скорректированных по эффективности клонирования во время отбора мутантов.

5 Описание метода

5.1 Подготовка

5.1.1 Клетки

5.1.1.1 Типы клеток, используемые для анализов HPRT и XPRT, должны быть чувствительны к химическим мутагенам, иметь высокую эффективность клонирования, стабильный кариотип и стабильную частоту спонтанных мутантов. Клетки, наиболее часто используемые для анализа HPRT, включают линии CHO, CHL и V79 клеток китайского хомяка, клетки мышиной лимфомы L5178Y и лимфобластоидные клетки человека TK6[2].

Клетки AS52, полученные из CHO, содержащие трансген *gpt* (с удаленным геном *hprt*), используют для анализа XPRT[3]. HPRT анализ на клетках AS52 не может быть выполнен, поскольку ген *hprt* был удален. Использование других клеточных линий должно быть обосновано и подтверждено.

5.1.1.2 Клеточные линии следует регулярно проверять на стабильность модального числа хромосом и отсутствие загрязнения микоплазмой[4]. При наличии загрязнения или изменении модального числа хромосом клетки не используют. Должно быть установлено нормальное время клеточного цикла, используемое в испытательной лаборатории, соответствующее опубликованным характеристикам клеток. В исходной основной клетке также должна быть проверена частота спонтанных мутаций, и исходный запас не используют, если частота мутаций не соответствует требованиям.

5.1.1.3 Перед использованием в настоящем методе может потребоваться очищение культур от предшествующих мутантных клеток, например путем культивирования в среде HAT — для анализа HPRT и MPA — для анализа XPRT[5] (см. приложение А). Очищенные клетки могут быть заморожены и затем после размораживания использованы в качестве рабочих запасов. Свежеразмороженный рабочий материал можно использовать для испытания после достижения стандартного времени удвоения. При проведении анализа XPRT при обычной культуре клеток AS52 следует использовать условия, обеспечивающие поддержание трансгена *gpt*[6].

5.1.2 Среда и условия культивирования

Для поддержания культур используют соответствующую культуральную среду и условия инкубации (культуральные сосуды, увлажненную атмосферу с 5 %-ным содержанием CO_2 и температурой инкубации 37 °С). Культуры клеток всегда должны поддерживаться в условиях, обеспечивающих их рост в логарифмической фазе. Особенно важно, чтобы среда и условия культивирования были выбраны таким образом, чтобы обеспечить оптимальный рост клеток в течение периода экспрессии и оптимальную эффективность клонирования как для мутантных, так и для немутантных клеток.

---

[1] См. [14]—[17].

[2] См. [18], [19].

[3] См. [20], [21].

[4] См. [22], [23].

[5] См. [5], [24].

[6] См. [20].

5.1.3 Приготовление культур

Клеточные линии размножают из исходных культур, высевая в культуральную среду с такой плотностью, чтобы клетки в суспензиях или в монослоях продолжали расти экспоненциально в течение периодов обработки и экспрессии (например, следует избегать слияния клеток, растущих в монослоях).

5.1.4 Метаболическая активация

При использовании клеток с недостаточной эндогенной метаболической способностью применяют экзогенные метаболизирующие системы. Наиболее часто используемой системой (рекомендуемой по умолчанию) является пост-мито-хондриальная фракция (S9) с добавлением кофактора, полученного из печени грызунов (как правило, крыс), обработанных фермент-индуцирующими агентами, такими как Aroclor 1254[1)] или комбинация фенобарбитала и β-нафтофлавона[2)]. Комбинация последних химических веществ не противоречит Стокгольмской конвенции о стойких органических загрязнителях[3)], и было доказано, что она является такой же эффективной, как Aroclor 1254, для индукции оксидаз со смешанной функцией[4)]. Фракцию S9 обычно используют в концентрации от 1 % об. до 2 % об., но в окончательной исследуемой среде концентрация может быть увеличена до 10 % об. На выбор типа используемой экзогенной системы и концентрации метаболической активации или метаболического индуктора может влиять класс исследуемых веществ[5)].

5.1.5 Подготовка исследуемого вещества

Твердые исследуемые химические вещества готовят в соответствующих растворителях и при необходимости разбавляют до обработки клеток (см. 5.2.1). Жидкие исследуемые химические вещества могут быть добавлены непосредственно в анализируемую систему и/или разбавлены до обработки анализируемой системы. Испытания газообразных или легко испаряющихся химических веществ проводят путем внесения соответствующих изменений в стандартные протоколы, например обработкой в герметичных культуральных сосудах[6)]. Подготовку исследуемого химического вещества проводят непосредственно перед обработкой, за исключением случаев подтверждения стабильности при хранении.

5.2 Условия испытаний

5.2.1 Растворители

Растворитель выбирают таким образом, чтобы обеспечить оптимальные условия для растворения исследуемых химических веществ, не оказывая вредного воздействия на проведение испытания (например, изменение роста клеток, влияние на стабильность исследуемого химического вещества, реакции с культуральными сосудами, нарушения системы метаболической активации). Рекомендуется, по возможности, в первую очередь использовать водные растворы (или культуральные среды). Хорошо зарекомендовавшими себя растворителями являются вода и диметил-сульфоксид.

Как правило, содержание органических растворителей не должно превышать 1 % об., а водных растворителей (физиологический раствор или вода) — 10 % об. в среде при окончательной обработке. Если используют необщепризнанные растворители (например, этанол или ацетон), их использование подтверждают данными, указывающими на их совместимость с исследуемыми химическими веществами и испытуемой системой, а также отсутствием генетической токсичности в используемой концентрации. При отсутствии подтверждающих данных важно добавить необработанные контроли (см. приложение А) для подтверждения того, что выбранный растворитель не вызывает вредных или мутагенных эффектов.

5.2.2 Определение цитотоксичности и выбор воздействующих концентраций

5.2.2.1 При определении максимальной концентрации химического вещества в испытании следует избегать концентраций, которые вызывают положительные артефактные реакции, вызывающие чрезмерную цитотоксичность (см. 5.2.2.4), осаждение в культуральной среде (см. 5.2.2.5) или заметные изменение pH или осмоляльность. Если добавление исследуемого химического вещества вызывает заметное изменение pH среды, можно регулировать значение pH путем буферизации конечной среды для

---

1) См. [25]—[28].

2) См. [29]—[32].

3) См. [33].

4) См. [29], [31].

5) См. [34]—[36].

6) См. [37], [38].

предотвращения артефактных положительных результатов и обеспечения соответствующих условий культивирования.

5.2.2.2 Выбор концентрации основан на цитотоксичности и других показателях (см. 5.2.2.4—5.2.2.6). Несмотря на то, что оценка цитотоксичности в предварительном испытании может быть полезна для лучшего определения концентраций, которые будут использоваться в основном анализе, проведение предварительного испытания не требуется. Даже при проведении предварительной оценки цитотоксичности в основном испытании для каждой культуры все равно требуется измерение цитотоксичности. В качестве меры цитотоксичности используют показатель относительной выживаемости (RS), т. е. эффективности клонирования (CE) клеток, вычисляемый по отношению количества клеток, высеянных сразу после обработки (с поправкой на любую потерю клеток во время обработки), к откорректированной эффективности клонирования в отрицательном контроле (значение выживаемости принимают равным 100 %) (см. формулы в приложении А).

5.2.2.3 Используют не менее четырех концентраций [не считая отрицательный контроль (растворитель) и положительный контроль], которые отвечают критериям приемлемости (соответствующей цитотоксичности, количества клеток и т. д.). Принимая во внимание, что целесообразно использовать контрольные культуры, при каждой исследуемой концентрации можно использовать как параллельные, так и отдельно обработанные культуры. Результаты, полученные в независимых контрольных культурах при определенной концентрации, следует регистрировать отдельно, но их можно объединить для анализа данных[1)]. Для исследуемых химических веществ, имеющих незначительную или нулевую цитотоксичность, оптимальными являются интервалы концентраций от 2 до 3 раз. При возникновении цитотоксичности выбирают концентрации, охватывающие диапазон от концентрации, вызывающей цитотоксичность, до концентраций, при которых цитотоксичность является умеренной и незначительной или отсутствует. Многие исследуемые химические вещества имеют крутые кривые зависимости ответа от концентрации. Для охвата всего спектра цитотоксичности или подробного изучения зависимости ответа от концентрации может возникнуть необходимость в использовании более чем четырех близко расположенных концентраций, особенно в ситуациях, когда требуется повторение испытаний (см.7.3.5). При испытании отдельных культур особенно важным может быть использование более четырех концентраций.

5.2.2.4 Если максимальная концентрация основана на цитотоксичности, то она должна давать RS от 20 % до 10 %. Следует проявлять осторожность при интерпретации положительных результатов, обнаруженных при значении RS 10 % или менее (см. 7.3.5).

5.2.2.5 Несмотря на то, что цитотоксичность выше самой низкой концентрации нерастворимого вещества, рекомендуется проводить испытание только при одной концентрации, вызывающей помутнение или видимый осадок, поскольку в результате образования осадка могут возникать артифициальные эффекты. При концентрации вещества, приводящей к образованию осадка, следует принять меры, чтобы осадок не мешал проведению испытания. Может быть полезным определение растворимости вещества перед проведением испытания в культуральной среде.

5.2.2.6 Если отсутствует образование осадка или ограничение цитотоксичности, то максимальная анализируемая концентрация раствора должна соответствовать 10 ммоль, 2 мг/см^3 или 2 мкл/см^3, в зависимости от того, что является самым низким значением[2)]. Если исследуемое химическое вещество не имеет определенного состава, например вещество неизвестного или переменного состава, сложные продукты реакции или биологические материалы [т. е. химические вещества неизвестного или переменного состава (UVCB)][3)], сбросы/выбросы в окружающую среду и т. д., то при отсутствии достаточной цитотоксичности для увеличения концентрации каждого компонента максимальная концентрация вещества, возможно, должна быть выше (например, 5 мг/см^3). Требования к лекарственным препаратам для человека могут быть другими[4)].

5.2.3 Контроли

5.2.3.1 Параллельные отрицательные контроли (см. 5.2.1), предусматривающие внесение в обрабатываемую среду только растворителя и обрабатываемые так же, как испытуемые культуры, должны быть включены в каждое испытание.

---

1) См. [17].

2) См. [39], [40].

3) См. [41].

4) См. [42].

5.2.3.2 Параллельный положительный контроль необходим для демонстрации способности лаборатории идентифицировать мутагены в условиях используемого протокола испытаний и эффективности экзогенной системы метаболической активации, если это предусмотрено. Примеры веществ положительного контроля приведены в таблице 1. Допускается использовать альтернативные вещества положительного контроля, при обосновании. Поскольку испытания генетической токсичности *in vitro* на клетках млекопитающих достаточно стандартизированы, испытания с использованием обработки с экзогенной метаболической активацией и без нее допускается проводить только с использованием положительного контроля требующего метаболической активации. В данном случае этот единственный ответ положительного контроля будет демонстрировать как активность системы метаболической активации, так и чувствительность испытуемой системы. Каждый положительный контроль используют при одной или нескольких концентрациях, которые, возможно, дадут воспроизводимые и обнаруживаемые увеличения по сравнению с фоном, демонстрирующие чувствительность испытуемой системы, и ответ не должен негативно влиять на цитотоксичность, превышающую пределы, приведенные в 5.2.2.4.

Таблица 1 — Эталонные вещества, рекомендуемые для выбора положительных контролей и оценки квалификации лаборатории

Состояние метаболической активации	Локус	Химическое вещество (регистрационный номер CAS)
Отсутствие экзогенной метаболической активации	*Hprt*	Этилметансульфонат (62-50-0) Этилнитрозомочевина (759-73-9) 4-Нитрохинолин-1-оксид (56-57-5)
Отсутствие экзогенной метаболической активации	*xprt*	Стрептонигрин (3930-19-6) Митомицин С (50-07-7)
Присутствие экзогенной метаболической активации	*Hprt*	3-Метилхолантрен (56-49-5) 7,12-Диметилбензантрацен (57-97-6) Бенз(а)пирен (50-32-8)
	xprt	Бенз(а)пирен (50-32-8)

6 Условия проведения испытаний

6.1 Обработка клеток исследуемым химическим веществом

6.1.1 Пролиферирующие клетки обрабатывают исследуемым химическим веществом в присутствии и отсутствии системы метаболической активации. Длительность воздействия должна быть соответствующей (обычно достаточно от 3 до 6 ч).

6.1.2 Минимальное количество клеток, используемых для каждой испытуемой (контрольной и обработанной) культуры на каждой стадии испытания, определяют на основании частоты спонтанных мутаций. Общее правило состоит в том, чтобы обработать и вырастить достаточное количество клеток, обеспечивающих 10 спонтанных мутаций в каждой культуре на всех этапах испытания[1)]. Частота спонтанных мутаций обычно составляет от 5 до $20 \cdot 10^{-6}$. Для обеспечения достаточного количества спонтанных мутаций (10 или более) при частоте спонтанных мутаций $5 \cdot 10^{-6}$ даже для культур, обработанных веществом с концентрациями, вызывающими 90%-ную цитотоксичность (при RS, равной 10 %), необходимо обработать не менее $20 \cdot 10^{6}$ клеток. Кроме того, во время экспрессии необходимо культивировать достаточное количество клеток (не менее 2 млн) и высеять их для отбора мутаций[1)].

6.2 Время фенотипической экспрессии и измерение частоты мутаций

После периода обработки клетки культивируют для обеспечения экспрессии мутантного фенотипа. Для обеспечения почти оптимальной фенотипической экспрессии вновь индуцированных мутантов *Hprt* и *xprt* обычно достаточно от семи до девяти дней[2)]. В течение этого периода клетки регулярно субкультивируют для поддержания их в экспоненциальной фазе роста. После фенотипической экспрессии клетки повторно высевают в среду с селективным средством (6-тиогуанином) и без него для определения количества мутантов и эффективности клонирования на момент отбора соответственно.

1) См. [17].

2) См. [43], [44].

Посев может быть выполнен с использованием чашек для однослойных культур или микропланшетов для клеток в виде суспензии. Для отбора мутаций клетки следует высевать плотностью, обеспечивающей оптимальное выделение мутанта (т. е. избегать метаболического взаимодействия)[1]. Планшеты инкубируют в течение соответствующего периода времени для оптимального роста колоний (например, от 7 до 12 дней) и подсчитывают колонии. Частоту мутаций рассчитывают на основе количества мутантных колоний, скорректированных эффективностью клонирования во время отбора мутаций (см. формулы в приложении А).

6.3 Квалификация лаборатории

6.3.1 Для получения достаточного опыта с методом до его использования для рутинного испытания лаборатория должна провести серию испытаний с эталонными веществами положительного контроля, действующими разными способами (минимум одно активное с метаболической активацией и одно активное без метаболической активации, выбранные из веществ, приведенных в таблице 1) и разными отрицательными контролями (с использованием разных растворителей/сред). Положительные и отрицательные реакции на воздействия должны согласовываться с накопленными данными. Это не требуется для лабораторий, имеющих опыт, т. е. имеющих базу данных за прошлые периоды, как установлено в 6.4.1—6.4.4.

6.3.2 Выбирают вещества положительного контроля (см. таблицу 1) и исследуют как при отсутствии, так и при наличии метаболической активации, чтобы продемонстрировать способность лаборатории выявлять мутагенные вещества, определять эффективность системы метаболической активации и показать адекватность условий роста клеток при воздействии, фенотипической экспрессии и отборе мутаций и процедуре подсчета. Диапазон концентраций выбранных веществ следует выбирать таким образом, чтобы обеспечить воспроизводимые и зависящие от концентрации увеличения над фоном для демонстрации чувствительности и динамического диапазона испытуемой системы.

6.4 Данные исторического контроля

6.4.1 Лаборатория должна установить:

- исторический диапазон и распределение положительного контроля;
- исторический диапазон и распределение отрицательного контроля (без обработки веществом, только растворителем).

6.4.2 При первом получении данных для исторического распределения отрицательного контроля результаты параллельных отрицательных контролей должны соответствовать опубликованным данным контроля[2]. По мере добавления дополнительных данных по результатам испытаний к распределению контроля данные параллельных отрицательных контролей в идеале должны находиться в границах 95 %-ного предела распределения этого контроля[3].

6.4.3 Начальная база данных лаборатории по историческому отрицательному контролю должна создаваться на основе не менее чем 10 испытаний, но предпочтительно не менее чем 20 испытаний, проводимых в сопоставимых условиях. Лаборатории должны использовать методы контроля качества, такие как карты контроля (например, контрольные карты или гистограммы средних значений[4], для определения отклонения измеряемых параметров положительных и отрицательных контролей, чтобы продемонстрировать, что процедура испытаний в лаборатории находится «под контролем»[5]. Дополнительные рекомендации о построении и использовании статистических данных (т. е. критерии для включения и исключения из исторических данных и критерии приемлемости для данного испытания) приведены в [45].

6.4.4 Данные отрицательного контроля должны содержать частоту мутаций для отдельных или предпочтительно повторяющихся культур в соответствии с 5.2.3.1. В идеале данные параллельного отрицательного контроля должны находиться в пределах 95 %-ного распределения данных отрицательного контроля лаборатории[3]. Если данные параллельного отрицательного контроля выходят за границы 95 %-ного контрольного предела, они могут быть приемлемы для включения в историческое

---

[1] См. [17].

[2] См. [22].

[3] См. [17], [45], [46].

[4] См. [47].

[5] См. [46].

контрольное распределение, если не являются экстремальными выбросами и есть свидетельства того, что система испытания находится «под контролем» (см. выше) и имеются подтверждения отсутствия технических ошибок или ошибок оператора.

6.4.5 Любые изменения в протоколе испытания следует рассматривать с точки зрения их соответствия имеющимся в лаборатории контрольным базам данных. Любые серьезные несоответствия должны приводить к созданию новой базы данных исторического контроля.

7 Данные и отчет

7.1 Представление результатов

7.1.1 Представление результатов должно включать все данные, необходимые для вычисления цитотоксичности (выраженные как RS). Данные как для обработанных, так и для контрольных культур клеток должны включать количество клеток в конце обработки, количество клеток, высеянных сразу после обработки, и количество колоний (или количество лунок без колоний для метода микролунок). RS для каждой культуры выражают в процентах относительно параллельного контроля растворителя (определения терминов приведены в разделе 2).

7.1.2 Представление результатов должно также включать все данные, необходимые для вычисления частоты мутаций. Данные для обработанных и контрольных культур клеток должны включать: 1) количество клеток, высеянных с селективным средством и без него (когда клетки высевают для отбора мутаций), и 2) количество подсчитанных колоний (или количество лунок без колоний для метода микролунок) из чашек с селективным средством и без него. Частоту мутаций рассчитывают на основе количества мутантных колоний (в чашках с селективным средством), скорректированных на эффективность клонирования (из чашек без селективного средства). Частоту мутаций выражают отношением числа мутантных клеток на миллион жизнеспособных клеток (определения терминов приведены в разделе 2).

7.1.3 Должны быть приведены индивидуальные данные о культуре. Кроме того, все данные должны быть сведены в табличную форму.

7.2 Критерии приемлемости

7.2.1 Приемлемость метода основана на следующих критериях:

- параллельный отрицательный контроль считают приемлемым для добавления в базу данных исторического отрицательного контроля лаборатории в соответствии с 6.4.4;
- параллельные положительные контроли (см. 5.2.3.2) должны вызывать ответы, совместимые с результатами, приведенными в базе данных исторического положительного контроля, и обеспечивать статистически значимое увеличение по сравнению с параллельным отрицательным контролем;
- испытания были проведены при двух условиях (с метаболической активацией и без нее), если в одних условиях не было получено положительных результатов (см. 6.1.2);
- проанализировано достаточное количество клеток и концентраций (см. 6.1.1, 6.1.2 и 5.2.2.3);
- критерии выбора максимальной концентрации соответствуют критериям, приведенным в 5.2.2.4—5.2.2.6.

7.3 Оценка и интерпретация результатов

7.3.1 При соблюдении всех критериев приемлемости исследуемое химическое вещество считают явно положительным, если в любом из исследованных условий испытания:

a) минимум одна из испытуемых концентраций демонстрирует статистически значимое увеличение по сравнению с параллельным отрицательным контролем;

b) зависимость увеличения от концентрации оценена соответствующим испытанием тенденции;

c) любой из результатов выходит за пределы исторического распределения данных отрицательного контроля [например, 95%-ного контрольного предела распределения Пуассона (см. 6.4.4)].

При выполнении вышеуказанных критериев считают, что исследуемое химическое вещество способно вызывать мутации генов в культивируемых клетках млекопитающих в этой испытательной системе. Рекомендации по выбору наиболее подходящих статистических методов приведены в [46]—[48].

7.3.2 При выполнении всех критериев приемлемости исследуемое химическое вещество считают показавшим явно отрицательный результат, если:

a) ни одна из исследуемых концентраций не демонстрирует статистически значимого увеличения по сравнению с параллельным отрицательным контролем;

b) отсутствуют связанные с концентрацией увеличения при оценке с использованием соответствующего испытания тенденции;

c) все результаты находятся в пределах распределения исторических данных отрицательных контролей [например, 95%-ного контрольного предела распределения Пуассона (см. 6.4.4)].

В таком случае исследуемое химическое вещество считают неспособным индуцировать генные мутации в культивируемых клетках млекопитающих в данной системе испытаний.

7.3.3 Отсутствуют требования к верификации явно положительного или явно отрицательного ответов (эффектов).

7.3.4 В случаях, когда ответ не является ни явно отрицательным, ни явно положительным (как описано выше), или для помощи в установлении биологической значимости результата данные должны быть оценены экспертным заключением и/или дальнейшими исследованиями. Рекомендуется провести повторное испытание с изменением условий его проведения [например, изменение интервала концентраций, использование других условий метаболической активации (т. е. концентрации S9 или происхождения S9)].

7.3.5 В редких случаях после проведения повторных испытаний данные не позволяют сделать вывод о положительных или отрицательных результатах. Следовательно, отклик на воздействие исследуемого химического вещества должен быть признан сомнительным (интерпретируется с равной степенью вероятности как положительный или как отрицательный).

7.4 Отчет о результатах испытаний

7.4.1 Отчет должен содержать следующую информацию:

7.4.1.1 Исследуемое химическое вещество:

- поставщик, номер партии, срок хранения (при наличии);
- стабильность исследуемого химического вещества (если известна);
- растворимость и стабильность исследуемого химического вещества в растворителе (если известна);
- измерение значения pH, осмоляльности и осадка в культуральной среде, в которую было добавлено исследуемое химическое вещество (при необходимости).

Однокомпонентное вещество:

- физические свойства, растворимость в воде и дополнительные соответствующие физико-химические свойства;
- химическая идентификация, такая как наименование по IUPAC или CAS, номер CAS, код SMILES или InChI, структурная формула, чистота, химическая идентификация примесей (при необходимости и возможности определения) и т. д.

Многокомпонентное вещество, UVBC и смеси:

- характеризуют, по возможности, химическим наименованием (см. выше), количественным содержанием и соответствующими физико-химическими свойствами компонентов.

7.4.1.2 Растворитель:

- обоснование выбора растворителя;
- процентное содержание растворителя в конечной культуральной среде.

7.4.1.3 Клетки (для основных клеточных культур лаборатории):

- тип, источник клеточных линий;
- количество пассажей (если применяют) и накопленные результаты в лаборатории;
- особенности кариотипа и/или модальное число хромосом;
- методы поддержания клеточных культур;
- отсутствие микоплазмы;
- время удвоения клеток.

7.4.1.4 Условия проведения испытаний:

- обоснование выбора концентраций и количества культур, включая, например, данные цитотоксичности и ограничения по растворимости;
- состав среды, концентрация CO_2, влажность;
- концентрация исследуемого химического вещества, выраженная как конечная концентрация в культуральной среде (например, мкг или мг/см^3 или ммоль культуральной среды);

- концентрация (и/или объем) растворителя и исследуемого химического вещества, добавленного в культуральную среду;
- температура инкубации;
- время инкубации;
- продолжительность обработки;
- плотность клеток во время обработки;
- тип и состав системы метаболической активации (источник S9, способ приготовления смеси S9, концентрация или объем смеси S9 и S9 в конечной культуральной среде, контроль качества S9);
- вещества положительного и отрицательного контролей, конечные концентрации для каждого условия обработки;
- продолжительность периода экспрессии (включая число высеянных клеток, субкультивирование и схемы подпитки, при необходимости);
- идентификационные характеристики селективного агента и его концентрация;
- критерии приемлемости испытаний;
- методы, используемые для подсчета количества жизнеспособных и мутантных клеток;
- методы, используемые для измерения цитотоксичности;
- любая дополнительная информация, относящаяся к цитотоксичности и используемому методу;
- продолжительность инкубации после посева;
- критерии для оценки испытаний как положительных, отрицательных или сомнительных;
- методы определения pH, осмоляльности и осадка.

7.4.1.5 Результаты:

- количество обработанных клеток и количество клеток, субкультивированных для каждой культуры;
- измерения цитотоксичности и другие наблюдения, если предусмотрено;
- признаки осадков и время определения;
- количество клеток, высеянных в селективную и неселективную среды;
- количество колоний в неселективной среде, количество устойчивых колоний в селективной среде и соответствующие частоты мутаций;
- зависимость концентрация — ответ, где это возможно;
- данные параллельных отрицательных контролей (растворитель) и положительных контролей (концентрации исследуемого химического вещества и растворители);
- исторические данные отрицательных контролей (растворитель) и положительных контролей с диапазонами, средними значениями и стандартными отклонениями и доверительным интервалом (например, 95 %), а также количеством данных;
- статистический анализ (для отдельных культур и культур, объединенных в пул, при необходимости) и p-значения (при наличии).

7.4.1.6 Обсуждение результатов.

7.4.1.7 Выводы.

Приложение А
(справочное)

Оценка цитотоксичности и частоты мутаций

Цитотоксичность оценивают по относительной выживаемости (RS), т. е. по эффективности клонирования (CE) клеток, высеянных сразу после обработки, скорректированых на потерю во время воздействия по сравнению со скорректированной эффективностью клонирования в отрицательном контроле (выживаемость принимают за 100 %), вычисляемой по формуле А.2. Значение скорректированной эффективности клонирования $CE_{скорр}$ для культуры, обработанной исследуемым химическим веществом, вычисляют по формуле

$$CE_{скорр} = CE \frac{\text{Количество клеток в конце обработки}}{\text{Количество клеток в начале обработки}}. \quad (A.1)$$

Относительную выживаемость RS для культуры, обработанной исследуемым химическим веществом, вычисляют по формуле

$$RS = \frac{CE_{скорр} \text{ в обработанной культуре}}{CE_{скорр} \text{ в отрицательном контроле}} 100. \quad (A.2)$$

Частоту мутаций MF определяют делением эффективности клонирования CE мутантных колоний в селективной среде на эффективность клонирования в неселективной среде, измеренной для той же культуры во время отбора, по формуле

$$MF = \frac{\text{CE мутантных колоний в селективной среде}}{\text{CE в неселективной среде}} 100. \quad (A.3)$$

Эффективность клонирования при посеве в чашки Петри $CE_{(чП)}$ вычисляют по формуле

$$CE_{(чП)} = \frac{\text{Количество колоний}}{\text{Количество высеянных клеток}}. \quad (A.4)$$

При использовании микролуночных планшетов количество колоний на лунку соответствует распределению Пуассона P. Эффективность клонирования при использовании микролуночных планшетов $CE_{(мклПл)}$ вычисляют по формуле

$$CE_{(мклПл)} = \frac{-LnP(0)}{\text{Количество клеток, высеянных в лунку}}, \quad (A.5)$$

где -LnP(0) — вероятное число пустых лунок из общего числа засеянных лунок, определяемое по формуле

$$LnP(0) = -Ln \frac{\text{Число пустых лунок}}{\text{Число засеянных лунок}}. \quad (A.6)$$

Приложение ДА
(справочное)

Сопоставление структуры настоящего стандарта со структурой примененного в нем международного документа

Таблица ДА.1

Структура настоящего стандарта	Структура международного документа OECD Test № 476:2016
Введение (1—3)	Введение 1 2 3
1 Область применения	
2 Термины и определения (приложение 1)	
3 Основные положения и ограничения (4—6) 3.1 3.2 3.3	Основные положения и ограничения 4 5 6
4 Принцип испытаний (7,8) 4.1 4.2	Принцип испытаний 7 8
5 Описание метода (9—24) 5.1 Подготовка 5.1.1 Клетки 5.1.1.1 5.1.1.2 5.1.1.3 5.1.2 Среда и условия культивирования 5.1.3 Приготовление культур 5.1.4 Метаболическая активация 5.1.5 Подготовка исследуемого вещества 5.2 Условия испытаний 5.2.1 Растворители 5.2.2 Определение цитотоксичности и выбор воздействующих концентраций 5.2.2.1 5.2.2.2 5.2.2.3 5.2.2.4 5.2.2.5 5.2.2.6 5.2.3 Контроли 5.2.3.1 5.2.3.2	Описание метода Подготовка Клетки 9 10 11 Среда и условия культивирования 12 Приготовление культур 13 Метаболическая активация 14 Подготовка исследуемого вещества 15 Условия испытаний Растворители 16 Определение цитотоксичности и выбор воздействующих концентраций 17 18 19 20 21 22 Контроли 23 24

Окончание таблицы ДА.1

Структура настоящего стандарта	Структура международного документа OECD Test № 476:2016
6 Условия проведения испытаний (25—34) 6.1 Обработка клеток исследуемым химическим веществом 6.1.1 6.1.2 6.2 Время фенотипической экспрессии и измерение частоты мутаций 6.3 Квалификация лаборатории 6.3.1 6.3.2 6.4 Данные исторического контроля 6.4.1 6.4.2 6.4.3 6.4.4 6.4.5	Условия проведения испытаний Обработка клеток исследуемым химическим веществом 25 26 Время фенотипической экспрессии и измерение частоты мутаций 27 Квалификация лаборатории 28 29 Данные исторического контроля 30 31 32 33 34
7 Данные и отчет (35—44) 7.1 Представление результатов 7.1.1 7.1.2 7.1.3 7.2 Критерии приемлемости 7.3 Оценка и интерпретация результатов 7.3.1 7.3.2 7.3.3 7.3.4 7.3.5 7.4 Отчет о результатах испытаний	Данные и отчет Представление результатов 35 36 37 Критерии приемлемости 38 Оценка и интерпретация результатов 39 40 41 42 43 Отчет о результатах испытаний 44
*	Библиография
**	Приложение 1 Термины и определения
Приложение А Оценка цитотоксичности и частоты мутаций	Приложение 2 Оценка цитотоксичности и частоты мутаций
Приложение ДА Сопоставление структуры настоящего стандарта со структурой примененного в нем международного документа	
Библиография	

* Библиография размещена в конце настоящего стандарта.

** Приложение 1 размещено в разделе 2 настоящего стандарта.

Примечание — После заголовков разделов настоящего стандарта приведены в скобках номера аналогичных им параграфов международного документа.

Библиография

[1] OECD (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, No. 234, OECD, Paris

[2] Moore M.M., DeMarini D.M., DeSerres F.J. and Tindall, K.R. (Eds.). (1987). Banbury Report 28: Mammalian Cell Mutagenesis, Cold Spring Harbor Laboratory, New York

[3] Chu E.H.Y. and Malling H.V. (1968). Mammalian Cell Genetics. II. Chemical Induction of Specific Locus Mutations in Chinese Hamster Cells *In Vitro*, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 61, 1306—1312

[4] Moore M.M., Harrington-Brock K., Doerr C.L. and Dearfield K.L. (1989). Differential Mutant Quantitation at the Mouse Lymphoma TK and CHO HGPRT Loci. Mutagen. Res.,4, 394—403

[5] Aaron C.S. and Stankowski Jr. L.F. (1989). Comparison of the AS52/XPRT and the CHO/HPRT Assays: Evaluation of Six Drug Candidates. Mutation Res.,223, 121—128

[6] Aaron C.S., Bolcsfoldi G., Glatt H.R., Moore M., Nishi Y., Stankowski L., Theiss J. and Thompson E. (1994). Mammalian Cell Gene Mutation Assays Working Group Report. Report of the International Workshop on Standardisation of Genotoxicity Test Procedures. Mutation Res.,312, 235—239

[7] Li A.P., Gupta R.S., Heflich R.H. and Wasson J. S. (1988). A Review and Analysis of the Chinese Hamster Ovary/Hypoxanthine Guanine Phosphoribosyl Transferase System to Determine the Mutagenicity of Chemical Agents: A Report of Phase III of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-tox Program.Mutation Res., 196, 17—36

[8] Scott D., Galloway S.M., Marshall R.R., Ishidate M., Brusick D., Ashby J. and Myhr B.C. (1991). Genotoxicity Under Extreme Culture Conditions. A Report from ICPEMC Task Group 9. Mutation Res., 257, 147—204

[9] Morita T., Nagaki T., Fukuda I. and Okumura K. (1992). Clastogenicity of Low pH to Various Cultured Mammalian Cells. Mutation Res., 268, 297—305

[10] Brusick D. (1986). Genotoxic Effects in Cultured Mammalian Cells Produced by Low pH Treatment Conditions and Increased Ion concentrations. Environ. Mutagen., 8, 789—886

[11] Nesslany F., Simar-Meintieres S., Watzinger M., Talahari I. and Marzin D. (2008). Characterization of the Genotoxicity of Nitrilotriacetic Acid. Environ. Mol. Mutation Res., 49, 439—452

[12] Long L.H., Kirkland D., Whitwell J. and Halliwell B. (2007). Different Cytotoxic and Clastogenic Effects of Epigallocatechin Gallate in Various Cell-Culture Media Due to Variable Rates of its Oxidation in the Culture Medium, Mutation Res., 634, 177—183

[13] Kirkland D., Aardema M., Henderson L., and Müller L. (2005). Evaluation of the Ability of a Battery of Three *In Vitro* Genotoxicity Tests to Discriminate Rodent Carcinogens and Non-Carcinogens. I: Sensitivity, Specificity and Relative Predictivity. Mutation Res., 584, 1—256

[14] Li A.P., Carver J.H., Choy W.N., Hsie A.W., Gupta R.S., Loveday K.S., O'Neill J.P., Riddle J.C., Stankowski L.F. Jr. and Yang L.L. (1987). A Guide for the Performance of the Chinese Hamster Ovary Cell/Hypoxanthine-Guanine Phosphoribosyl Transferase Gene Mutation Assay. Mutation Res., 189, 135—141

[15] Liber H.L., Yandell D.W. and Little J.B. (1989). A Comparison of Mutation Induction at the TK and HPRT Loci in Human Lymphoblastoid Cells: Quantitative Differences are Due to an Additional Class of Mutations at the Autosomal TK Locus. Mutation Res., 216, 9—17

[16] Stankowski L.F. Jr., Tindall K.R. and Hsie A.W. (1986). Quantitative and Molecular Analyses of Ethyl Methanesulfonate- and ICR 191- Induced Molecular Analyses of Ethyl Methanesulfonate- and ICR 191- Induced Mutation in AS52 Cells. Mutation Res., 160, 133—147

[17] Arlett C.F., Smith D.M., Clarke G.M., Green M.H.L., Cole J., McGregor D.B. and Asquith J.C. (1989). Mammalian Cell Gene Mutation Assays Based upon Colony Formation. In: Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data, Kirkland, D.J. (Eds.), Cambridge University Press, pp. 66—101

[18] Hsie A.W., Casciano D.A., Couch D.B., Krahn (1981). The Use of Chinese Hamster Ovary Cells to Quantify Specific Locus Mutation and to Determine Mutagenicity of Chemicals; a Report of the Gene-Tox Program, Mutation Res., 86, 193—214

[19] Li A.P. (1981). Simplification of the CHO/HGPRT Mutation Assay Through the Growth of Chinese Hamster Ovary Cells as Unattached Cultures, Mutation Res., 85, 165—175

[20] Tindall K.R., Stankowski Jr., L.F., Machanoff R., and Hsie A.W. (1984). Detection of Deletion Mutations in pSV2gpt-Transformed Cells, Mol. Cell. Biol., 4, 1411—1415

[21] Hsie A. W., Recio L., Katz D. S., Lee C. Q., Wagner M., and Schenley R. L. (1986). Evidence for Reactive Oxygen Species Inducing Mutations in Mammalian Cells. Proc Natl Acad Sci., 83(24): 9616—9620

[22] Lorge E., Moore M., Clements J., Donovan M. O., Honma M., Kohara A., Van Benthem J., Galloway S., Armstrong M.J., Thybaud V., Gollapudi B., Aardema M., Kim J., Sutter A., Kirkland D.J. (2015). Standardized Cell Sources and Recommendations for Good Cell Culture Practices in Genotoxicity Testing. (Manuscript in preparation)

[23] Coecke S., Balls M., Bowe G., Davis J., Gstraunthaler G., Hartung T., Hay R., Merten O.W., Price A., Schechtman L., Stacey G. and Stokes W. (2005). Guidance on Good Cell Culture Practice. A Report of the Second ECVAM Task Force on Good Cell Culture Practice, ATLA, 33, 261—287

[24] Rosen M.P., San R.H.C. and Stich H.F. (1980). Mutagenic Activity of Ascorbate in Mammalian Cell Cultures, Can. Lett. 8, 299—305

[25] Natarajan A.T., Tates A.D, Van Buul P.P.W., Meijers M. and de Vogel N. (1976). Cytogenetic Effects of Mutagens/Carcinogens after Activation in a Microsomal System In Vitro, I. Induction of Chromosomal Aberrations and Sister Chromatid Exchanges by Diethylnitrosamine (DEN) and Dimethylnitrosamine (DMN) in CHO Cells in the Presence of Rat-Liver Microsomes. Mutation Res., 37, 83—90

[26] Abbondandolo A., Bonatti S., Corti G., Fiorio R., Loprieno N. and Mazzaccaro A. (1977). Induction of 6Thioguanine-Resistant Mutants in V79 Chinese Hamster Cells by Mouse-Liver Microsome-Activated Dimethylnitrosamine. Mutation Res., 46, 365—373

[27] Ames B.N., McCann J. and Yamasaki E. (1975). Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian-Microsome Mutagenicity Test. Mutation Res., 31, 347—364

[28] Maron D.M. and Ames B.N. (1983). Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test. Mutation Res., 113, 173, 215

[29] Elliott B.M., Combes R.D., Elcombe C.R., Gatehouse D.G., Gibson G.G., Mackay J.M. and Wolf R.C. (1992) Alternatives to Aroclor 1254-Induced S9 in *In Vitro* Genotoxicity Assays. Mutagen, 7, 175—177

[30] Matsushima T., Sawamura M., Hara K. and Sugimura T. (1976). A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems. In: *In Vitro* Metabolic Activation in Mutagenesis Testing, de Serres F.J., Fouts J.R., Bend J.R. and Philpot R.M. (Eds), Elsevier, North-Holland, pp. 85—88

[31] Ong T.-m., Mukhtar M., Wolf C.R. and Zeiger E. (1980). Differential Effects of Cytochrome P450Inducers on Promutagen Activation Capabilities and Enzymatic Activities of S-9 from Rat Liver, J. Environ. Pathol. Toxicol., 4, 55—65

[32] Johnson T.E., Umbenhauer D.R. and Galloway S.M. (1996). Human Liver S-9 Metabolic Activation: Proficiency in Cytogenetic Assays and Comparison with Phenobarbital/beta-Naphthoflavone or Aroclor 1254 Induced Rat S-9, Environ. Mol. Mutagen., 28, 51—59

[33] UNEP (2001). Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants, United Nations Environment Programme (UNEP). Available at: gost.e-ecolog.ru

[34] Tan E.-L. and Hsie A.W. (1981). Effect of Calcium Phosphate and Alumina C Gels on the Mutagenicity and Cytotoxicity of Dimethylnitrosamine as Studied in the CHO/HGPRT System. Mutation Res., 84, 147—156

[35] O'Neill J.P., Machanoff R., San Sebastian J.R., Hsie A.W. (1982). Cytotoxicity and Mutagenicity of Dimethylnitrosamine in Cammalian Cells (CHO/HGPRT system): Enhancement by Calcium Phosphate. Environ. Mol. Mutation., 4, 7—18

[36] Li, A.P. (1984). Use of Aroclor 1254-Induced Rat Liver Homogenate in the Assaying of Promutagens in Chinese Hamster Ovary Cells. Environ. Mol. Mutation, 4, 7—18

[37] Krahn D.F., Barsky F.C. and McCooey K.T. (1982). CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids. In: Tice, R.R., Costa, D.L., Schaich, K.M. (eds.) Genotoxic Effects of Airborne Agents. New York, Plenum, pp. 91—103

[38] Zamora P.O., Benson J.M., Li A.P. and Brooks A.L. (1983). Evaluation of an Exposure System Using Cells Grown on Collagen Gels for Detecting Highly Volatile Mutagens in the CHO/HGPRT Mutation Assay. Environ. Mutagen.,5, 795—801

[39] OECD (2014). Document Supporting the WNT Decision to Implement Revised Criteria for the Selection of the Top Concentration in the In Vitro Mammalian Cell Assays on Genotoxicity (Test Guidelines 473, 476 and 487). Available upon request from the Organisation for Economic Cooperation and Development

[40] Brookmire L., Chen J.J. and Levy D.D. (2013). Evaluation of the Highest Concentrations Used in the *In Vitro* Chromosome Aberrations Assay, Environ. Mol. Mutation, 54, 36—43

[41] EPA, Office of Chemical Safety and Pollution Prevention. (2011). Chemical Substances of Unknown or Variable Composition, Complex Reaction Products and Biological Materials: UVCB Substances, http://www.epa.gov/opptintr/newchems/pubs/uvcb.txt]

[42] USFDA (2012). International Conference on Harmonisation (ICH) Guidance S2 (R1) on Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended for Human Use. Available at: [https://federalregister.gov/a/2012-13774].

[43] O'Neill J.P. and Hsie A.W. (1979) Phenotypic Expression Time of Mutagen-Induced 6-thioguranine resistance in Chinese hamster ovary cells (CHO/HGPRT system), Mutation, Res., 59, 109—118

[44] Chiewchanwit T., Ma H., El Zein R., Hallberg L., and Au W.W. (1995). Induction of Deletion Mutations by Methoxyacetaldehyde in Chinese Hamster Ovary (CHO)-AS52 cells. Mutation, Res., 1335(2):121-8

[45] Hayashi M., Dearfield K., Kasper P., Lovell D., Martus H.J., and Thybaud V. (2011). Compilation and Use of Genetic Toxicity Historical Control Data, Mutation,Res., 723, 87—90

[46] OECD (2014). Statistical Analysis Supporting the Revision of the Genotoxicity Test Guidelines. Environmental, Health and Safety, Series on testing and assessment (No. 199.), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris

[47] Richardson C., Williams D.A., Allen J.A., Amphlett G., Chanter D.O., and Phillips B. (1989). Analysis of Data from *In Vitro* Cytogenetic Assays. In: Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. Kirkland, D.J., (Ed) Cambridge University Press, Cambridge, pp. 141—154

[48] Fleiss J. L., Levin B., and Paik M. C. (2003). Statistical Methods for Rates and Proportions, Third Edition, New York: John Wiley & Sons

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

Ключевые слова: методы испытания, воздействие химической продукции на организм человека, метод оценки, генные мутации на клетках млекопитающих *in vitro*

БЗ 12—2020

Редактор *В.Н. Шмельков*
Технический редактор *И.Е. Черепкова*
Корректор *Л.С. Лысенко*
Компьютерная верстка *М.В. Лебедевой*

Сдано в набор 23.10.2020. Подписано в печать 03.11.2020 Формат 60×84⅛. Гарнитура Ариал.
Усл. печ. л. 2,79. Уч.-изд. л. 2,37.

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 info@gostinfo.ru

gost.e-ecolog.ru