МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СОВЕТ ПО СТАНДАРТИЗАЦИИ, МЕТРОЛОГИИ И СЕРТИФИКАЦИИ
(МГС)

INTERSTATE COUNCIL FOR STANDARDIZATION, METROLOGY AND CERTIFICATION
(ISC)

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ
СТАНДАРТ

**ГОСТ
34660—
2020**

МЕТОДЫ ИСПЫТАНИЯ ПО ВОЗДЕЙСТВИЮ ХИМИЧЕСКОЙ ПРОДУКЦИИ НА ОРГАНИЗМ ЧЕЛОВЕКА

Микроядерный анализ на эритроцитах млекопитающих

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. № 912-ст межгосударственный стандарт ГОСТ 34660—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 № 474:2016 «Руководство по испытанию химических веществ. Микроядерный тест на эритроцитах млекопитающих» («Guideline for Testing of Chemicals. Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test», MOD) путем.

- включения дополнительного раздела 1, дополнительных терминологических статей (2.1.8—2.1.10) и сокращений (подраздел 2.2), 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 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, 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, определения и сокращения 1
3 Основные положения 2
4 Принцип метода испытаний 2
5 Верификация квалификации лаборатории 3
6 Описание метода 4
7 Проведение испытаний 6
8 Данные испытаний и отчет 10
Приложение А (справочное) Факторный дизайн для определения половых различий в микроядерном анализе *in vivo* 14
Приложение ДА (справочное) Сопоставление структуры настоящего стандарта со структурой примененного в нем международного документа 15
Библиография 18

Введение

Руководства Организации экономического сотрудничества и развития (OECD) по испытаниям химических веществ периодически пересматриваются в связи с научным прогрессом, меняющимися нормативными требованиями и гуманным отношением к животным. Первоначальная версия руководства OECD Test № 474 была принята в 1983 г. В 1997 г. она была пересмотрена на основе достигнутого к этому времени научного прогресса. Настоящая версия руководства отражает научные знания более чем тридцатилетнего опыта проведения этого анализа, интерпретации данных и особенно достижений в области автоматизированных технических средств балльной оценки и потенциальных возможностей для интеграции или объединения этого испытания с другими исследованиями общей токсичности или генотоксичности. Настоящее руководство является частью серии руководств по генетической токсикологии. Был разработан документ, который предоставляет краткую информацию об исследовании генетических токсикологий и обзор последних изменений, которые были внесены в настоящее руководство[1)].

Микроядерный анализ на эритроцитах млекопитающих *in vivo* особенно важен для оценки генотоксичности, и несмотря на то, что она может отличаться у разных видов, факторы метаболизма *in vivo*, фармакокинетики и процессов репарации *ДНК* активны и способствуют ответным реакциям. Анализ *in vivo* также полезен для дальнейшего исследования генотоксичности, обнаруженной системой *in vitro*.

Микроядерный анализ на эритроцитах млекопитающих *in vivo* используется для выявления повреждений хромосом или митотического аппарата эритробластов, вызванных исследуемым химическим веществом. Анализ обычно оценивает образование микроядер в эритроцитах, отобранных в костном мозге или в клетках периферической крови животных, обычно грызунов.

Когда эритробласт костного мозга превращается в незрелый эритроцит (иногда также называемый полихроматофильным эритроцитом или ретикулоцитом), основное ядро выдавливается, и любое сформировавшееся микроядро может остаться в цитоплазме. Визуализация или обнаружение микроядер в этих клетках облегчается тем, что у них отсутствует основное ядро. Повышение частоты микроядерных незрелых эритроцитов у животных, подвергшихся воздействию, является показателем индуцированных структурных или численных хромосомных аберраций.

Вновь образовавшиеся эритроциты с микроядрами идентифицируют и количественно определяют путем окрашивания с последующим визуальным подсчетом с использованием микроскопа или автоматического анализатора. Подсчет соответствующего количества незрелых эритроцитов в периферической крови или костном мозге половозрелых животных значительно облегчается использованием автоматизированной скоринговой платформы. Такие платформы являются приемлемой альтернативой ручной оценке[2)]. Сравнительные исследования с использованием соответствующих калибровочных стандартов показали, что такие методы могут обеспечить лучшую внутри- и межлабораторную воспроизводимость и чувствительность, чем ручные микроскопические методы[3)]. Автоматизированные системы, которые могут измерять количество микроядерных эритроцитов, включают (не ограничиваясь ими) проточные цитометры[4)], платформы для анализа изображений[5)] и лазерные сканирующие цитометры[6)].

Несмотря на то, что обычно это не выполняют в рамках исследования, фрагменты хромосом можно отличить от целых хромосом по ряду критериев. К ним относится идентификация наличия или отсутствия кинетохор или центромерной *ДНК*, которые характерны для неповрежденных хромосом. Отсутствие кинетохоры или центромерной *ДНК* указывает на то, что микроядро содержит только фрагменты хромосом, а наличие — указывает на потерю хромосом.

---

1) См. [1].

2) См. [2].

3) См. [3], [4].

4) См. [5].

5) См. [6], [7].

6) См. [8].

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

МЕТОДЫ ИСПЫТАНИЯ ПО ВОЗДЕЙСТВИЮ ХИМИЧЕСКОЙ ПРОДУКЦИИ НА ОРГАНИЗМ ЧЕЛОВЕКА

Микроядерный анализ на эритроцитах млекопитающих

Methods of testing the impact of chemical products on the human body. Micronucleus analysis on the erythrocytes of mammals

Дата введения — 2021—07—01

1 Область применения

Настоящий стандарт устанавливает порядок проведения испытания химических веществ в микроядерном анализе на эритроцитах млекопитающих in vivo. Учет микроядер в эритроцитах млекопитающих in vivo используют для выявления индукции химическим веществом нарушений хромосом или митотического аппарата эритробластов при анализе эритроцитов в костном мозге или в периферической крови животных, обычно грызунов.

Целью микроядерного анализа является идентификация химического вещества, вызывающего цитогенетические нарушения, которые формируют микроядра, содержащие отставшие фрагменты хромосом или целые хромосомы.

При формировании в костном мозге полихроматофильного эритроцита из эритробласта ядро выталкивается из клетки. Образовавшиеся микроядра могут остаться в денуклеированной цитоплазме. Микроядра в этих клетках легко визуализируются из-за отсутствия в них ядра. Повышение частоты полихроматофильных эритроцитов с микроядрами у подопытных животных является показателем индуцированных нарушений хромосом.

2 Термины, определения и сокращения

2.1 В настоящем стандарте применены следующие термины с соответствующими определениями:

2.1.1 **центромера** (centromere): Участок(ки) хромосомы, с которым(и) связаны нити веретена деления во время клеточного деления, что позволяет дочерним (гомологичным) хромосомам двигаться к полюсам дочерних клеток.

2.1.2 **эритробласт** (erythroblast): Ранняя стадия развития эритроцитов, непосредственно предшествующая незрелому эритроциту (ретикулоциту), когда клетка все еще содержит ядро.

2.1.3 **кинетохор** (kinetochore): Белковая структура, формирующаяся на центромере эукариотических клеток, которая связывает хромосому с полимеризованными микротрубочками митотического веретена в митозе и мейозе и функционирует во время деления клетки для разделения сестринских хроматид.

2.1.4 **микроядра** (micronuclei): Структуры, образующиеся в телофазе митоза (мейоза) в результате отставания фрагментов хромосом или целых хромосом, отделенные от основного ядра клетки и дополняющие их.

2.1.5 **нормохромный или зрелый эритроцит** (normochromatic or mature erythrocyte): Эритроцит, потерявший остаточную *РНК*, остающуюся после энуклеации, и/или другие короткоживущие клеточные маркеры, которые обычно исчезают после энуклеации и окончательного деления эритробластов.

2.1.6 **полихроматофильный или незрелый эритроцит** (polychromatic or immature erythrocyte): Недавно сформировавшийся эритроцит на промежуточной стадии развития, который окрашивается как синими, так и красными компонентами классических красителей при окрашивании по методу Райта — Гимзы из-за присутствия остаточной *РНК* во вновь образовавшейся клетке.

Издание официальное

Примечание — Вновь образовавшиеся клетки примерно такие же, как ретикулоциты, которые визуализируются с использованием витальной окраски, приводящей к тому, что остаточная *РНК* слипается в ретикулум. В настоящее время для идентификации вновь образовавшихся красных кровяных клеток часто используют другие методы, включая монохроматическое окрашивание *РНК* флуоресцентными красителями или маркировку короткоживущих поверхностных маркеров, таких как CD71, флуоресцентными антителами. Полихроматофильные эритроциты, ретикулоциты и CD71-позитивные эритроциты являются незрелыми эритроцитами, хотя у каждого из них несколько иное распределение по возрасту.

2.1.7 **ретикулоцит** (reticulocyte): Вновь образовавшийся эритроцит, окрашенный витальным окрашиванием, приводящим к тому, что остаточная *РНК* слипается в ретикулум. Ретикулоциты и полихроматофильные эритроциты имеют аналогичное распределение клеток по возрасту.

2.1.8 ***праймер*** *(primer): Короткий фрагмент нуклеиновой кислоты (олигонуклеотид), комплементарный ДНК- или РНК-мишени, который служит затравкой для синтеза комплементарной цепи с использованием ДНК-полимеразы (при репликации ДНК).*

2.1.9 ***скоринг*** *(scoring): Математическая или статистическая модель процедуры классификации объектов в соответствии с их измеренными характеристиками, оценивающая вероятность наступления определенного события.*

2.1.10 ***платформа*** *(компьютерная) (platform): Совокупность взаимодействующих между собой аппаратных средств и операционной системы, под управлением которой функционируют прикладные программы и средства для их разработки.*

2.2 В настоящем стандарте использованы следующие сокращения.

ADME — абсорбция, распределение, метаболизм и выведение (токсических соединений);

C-charts — контрольная карта числа несоответствий;

DNA — дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК);

MTD — максимальная переносимая доза;

FISH — флуоресцентная гибридизация in situ;

PRINS — праймированное мечение in situ;

RNA — рибонуклеиновая кислота (РНК);

X-bar charts — гистограммы средних значений.

3 Основные положения

3.1 В настоящем испытании тканью-мишенью для генетического повреждения является костный мозг молодых, половозрелых грызунов, поскольку эритроциты вырабатываются в этой ткани. Количественное определение микроядер в незрелых эритроцитах периферической крови может быть приемлемым для других видов млекопитающих, если была продемонстрирована адекватная чувствительность обнаружения веществ, вызывающих структурные или количественные хромосомные аберрации в этих клетках (путем индукции микроядер в незрелых эритроцитах), и предоставлено научное обоснование. Частота появления микроядерных незрелых эритроцитов является главным признаком конечной точки. Частота появления зрелых эритроцитов, содержащих микроядра в периферической крови, также может быть использована в качестве конечной точки у используемых видов животных при отсутствии выраженной элиминации микроядерных клеток в селезенке, а также при непрерывном воздействии на животных в течение периода, превышающего продолжительность жизни эритроцитов (например, 4 недели и более для мышей).

3.2 При наличии доказательства, что исследуемое(ые) вещество(а) или его(их) метаболит(ы) не попадут в целевую ткань, использование этого испытания может быть нецелесообразным.

3.3 Перед использованием настоящего стандарта для смеси веществ с целью получения данных в целях регулирования следует рассмотреть вопрос о том, может ли испытание дать адекватные результаты для этой цели. Такие соображения не нужны, когда существует обязательное требование для испытания смеси.

4 Принцип метода испытаний

Животных подвергают воздействию исследуемого химического вещества, используя соответствующий путь введения. При использовании для анализа костного мозга животных умерщвляют гуманным способом в соответствующее время после введения, костный мозг выделяют, готовят препараты

и окрашивают[1]. При исследовании периферической крови ее берут в соответствующее время после воздействия, готовят препараты и окрашивают[2]. При исследовании острой токсичности важно выбрать время выделения костного мозга или сбора крови, при котором может быть обнаружена индукция микроядерных незрелых эритроцитов, связанная с воздействием исследуемого химического вещества. В случае забора периферической крови должно пройти достаточно времени, чтобы эти явления появились в циркулирующей крови. Подготовленные препараты анализируют на наличие микроядер визуально с использованием микроскопа или анализом изображений проточной или лазерной сканирующей цитометрией.

5 Верификация квалификации лаборатории

5.1 Проверка квалификации

Для подтверждения опыта, достаточного для проведения анализа, перед его использованием для рутинного испытания лаборатория должна продемонстрировать способность воспроизводить результаты из опубликованных данных[3] по частоте образования микроядер не менее чем для двух веществ положительного контроля (включая слабые ответы, индуцированные низкими дозами веществ положительного контроля), приведенных в таблице 1 и согласующихся с контрольным веществом носителя/растворителя (см. 6.3.2). В этих экспериментах следует использовать дозы, дающие воспроизводимые и зависящие от дозы увеличения, и продемонстрировать чувствительность и динамический диапазон исследуемой системы в интересующей ткани (костный мозг или периферическая кровь), умение использовать скоринг метод в лаборатории. Это требование не применяется к лабораториям, имеющим опыт, т. е. имеющим историческую базу данных, как установлено в 5.2.

Таблица 1 — Вещества положительного контроля

Вещество	Номер CAS
Этилметансульфонат	62-50-0
Метилметансульфонат	66-27-3
Этилнитрозомочевина	759-73-9
Митомицин С	50-07-7
Циклофосфамид	50-18-0
Циклофосфамид моногидрат	6055-19-2
Триэтиленмеламин	51-18-3
Колхицин (анеуген)	64-86-8
Винбластин (анеуген)	865-21-4

5.2 Исторические контрольные данные

5.2.1 В ходе проверок квалификации лаборатория должна установить:
- статистический диапазон положительного контроля и распределения;
- статистический диапазон отрицательного контроля и распределения.

5.2.2 При получении первых данных для статистического распределения отрицательного контроля параллельные отрицательные контроли должны соответствовать опубликованным контрольным данным, если они существуют. По мере добавления дополнительных экспериментальных данных к статистическому распределению контроля одновременные отрицательные контроли в идеале должны находиться в пределах 95 %-ного контрольного предела этого распределения. Историческая база данных отрицательного контроля лаборатории должна быть статистически устойчивой, чтобы обеспечить спо-

[1] См. [9]–[15].

[2] См. [12], [16]—[18].

[3] См. [17], [19]—[22].

собность лаборатории оценивать распределение своих данных отрицательного контроля. В научной литературе предполагается, что может потребоваться не менее 10 экспериментов, но для составления базы данных предпочтительно наличие результатов не менее 20 экспериментов, проведенных в сопоставимых условиях.

В лаборатории следует использовать методы контроля качества, такие как контрольные карты [например, контрольная карта числа несоответствий (*C-charts*) или гистограмма средних значений (*X-bar charts*)[1)]], чтобы определить вариабельность данных и показать, что процедура испытаний в лаборатории находится «под контролем». Дополнительные рекомендации о сборе и использовании исторических данных (т. е. критерии включения и исключения данных из исторической базы данных и критерии их приемлемости для данного эксперимента) приведены в документе[2)].

5.2.3 Если лаборатория не выполняет достаточного количества экспериментов для установления статистически надежного распределения отрицательного контроля (см. 5.2.2) во время проверок квалификации по 5.1, допустимо построить распределение во время первого рутинного испытания. Этот подход должен соответствовать рекомендациям[2)], и результаты отрицательного контроля, полученные в этих экспериментах, должны соответствовать опубликованным данным отрицательного контроля.

5.2.4 Любые изменения в протоколе эксперимента следует рассматривать с точки зрения их влияния на соответствие данным имеющейся в лаборатории контрольной базы данных. Только серьезные несоответствия должны приводить к созданию новой базы данных исторического контроля, в которой экспертная оценка устанавливает, насколько база данных отличается от предыдущего распределения (см. 5.2.2). Во время восстановления может потребоваться неполная база данных отрицательного контроля для обеспечения проведения фактического испытания, при условии, что лаборатория может продемонстрировать, что параллельные значения отрицательного контроля остаются в соответствии с их предыдущей базой данных или с соответствующими опубликованными данными.

5.2.5 Данные отрицательного контроля должны включать число незрелых эритроцитов с микроядрами у каждого животного. Предел допустимых отклонений результатов параллельного отрицательного контроля в идеале должен составлять 95 % от распределения статистической базы данных отрицательного контроля лаборатории. Если данные параллельного отрицательного контроля выходят за 95 %-ный предел допустимых отклонений, они могут быть приемлемыми для включения в данные распределения исторического контроля, если эти данные не являются экстремальными выбросами и имеются доказательства, что система испытаний находится «под контролем» (см. 5.2.2) и отсутствуют доказательства технической ошибки или ошибки оператора.

6 Описание метода

6.1 Подготовка

6.1.1 Выбор видов животных

Обычно используют лабораторные линии здоровых, молодых, половозрелых животных. Могут быть использованы мыши, крысы или другие подходящие виды млекопитающих. При исследовании периферической крови должно быть установлено, что удаление селезенкой микроядерных клеток из кровообращения не ставит под угрозу обнаружение индуцированных микроядер у выбранных видов. Это было четко продемонстрировано для периферической крови мышей и крыс[3)]. В отчете должно быть представлено научное обоснование использования других видов животных (кроме крыс и мышей). При использовании других видов животных рекомендуется включить определение индуцированных микроядер в другое подходящее испытание токсичности.

6.1.2 Условия содержания и кормления животных

Для грызунов температура в помещении для животных должна быть (22 ± 3) °С. Несмотря на то, что относительная влажность в идеале должна составлять от 50 % до 60 %, она должна быть не менее 40 % и, по возможности, не превышать 70 %, за исключением времени уборки помещения. Освещение должно быть искусственным, с чередованием периодов света (12 ч) и темноты (12 ч). Для кормления можно использовать обычный лабораторный корм с неограниченным обеспечением питьевой водой. На выбор корма может влиять необходимость обеспечения подходящей смеси исследуемого химиче-

---

1) См. [23].

2) См. [24].

3) См. [2].

ского вещества при введении этим путем. Грызунов содержат небольшими группами (не более пяти животных в одной клетке) одного пола и одной подопытной группы, если не ожидают агрессивного поведения, предпочтительно в клетках с твердым полом и соответствующим обогащением (улучшением) окружающей среды. Животные могут быть размещены индивидуально только в том случае, если это научно обосновано.

6.1.3 Подготовка животных

Обычно используют здоровых, молодых, половозрелых животных (для грызунов идеальный возраст — от 6 до 10 недель в начале испытания, но допускается использовать животных и старше), которых распределяют случайным образом на контрольную и подопытную группы. Животных идентифицируют индивидуально уникальным образом с использованием гуманного, минимально инвазивного метода (например, кольцевания, мечения, микрочипирования или биометрической идентификации, но не клипируют уши или пальцы) и позволяют акклиматизироваться не менее пяти дней в лабораторных условиях. Клетки должны быть расположены таким образом, чтобы возможные последствия, связанные с размещением клетки, были сведены к минимуму. Следует избегать перекрестного загрязнения пробы положительного контроля и исследуемого химического вещества. В начале исследования отклонение массы тела животных должно быть минимальным и не превышать ±20 % от средней массы тела животных каждого пола.

6.1.4 Подготовка доз

Перед введением доз животным твердые исследуемые химические вещества должны быть растворены или суспендированы в соответствующих растворителях/носителях или смешаны с пищей, питьевой водой. Жидкие исследуемые вещества могут быть введены непосредственно или могут быть разбавлены перед введением доз. При ингаляционном воздействии исследуемые химические вещества могут быть введены в виде газа, пара или твердого/жидкого аэрозоля в зависимости от их физико-химических свойств. Используют свежеприготовленные препараты исследуемого химического вещества, если данные о его стабильности не подтверждают приемлемость хранения и не устанавливают соответствующие условия хранения.

6.2 Условия испытаний

6.2.1 Растворитель/носитель

Растворитель/носитель не должен оказывать токсического воздействия при используемых уровнях дозы и не должен вступать в химическую реакцию с исследуемыми веществами. Если используют неизвестные растворители/носители, их включение должно сопровождаться справочными данными, указывающими на их совместимость. Рекомендуется, по возможности, сначала рассмотреть вопрос о применении водного раствора. Примеры обычно используемых совместимых растворителей/носителей включают воду, физиологический раствор, раствор метилцеллюлозы, раствор натриевой соли карбоксиметилцеллюлозы, оливковое и кукурузное масла. При отсутствии исторических или опубликованных контрольных данных, показывающих, что выбранный нетипичный растворитель/носитель не вызывает образования микроядер и других вредных воздействий, следует провести первоначальное исследование, чтобы установить приемлемость контроля растворителя/носителя.

6.3 Средства контроля

6.3.1 Положительные контроли

6.3.1.1 Обычно в каждое испытание включают группу животных, получающих вещество положительного контроля. От этого можно отказаться, если испытательная лаборатория продемонстрировала квалифицированность в проведении испытаний и установила диапазон исторического положительного контроля. Если группа положительного контроля не включена, в каждый эксперимент следует включать скоринг контроль (фиксированные и неокрашенные слайды или образцы суспензии клеток, в зависимости от метода оценки). Они могут быть получены включением в оценку исследования соответствующих контрольных образцов, которые были получены и сохранены из отдельного эксперимента с веществом положительного контроля, проводимого периодически (например, каждые 6—18 мес) во время проверки квалификации и регулярно после этого, при необходимости.

6.3.1.2 Вещества положительного контроля должны достоверно вызывать заметное увеличение частоты образования микроядер по сравнению с самопроизвольным уровнем. При использовании «ручной» оценки с помощью микроскопа дозы положительного контроля следует выбирать таким образом, чтобы эффекты были четкими, но не сразу выявляли (для исследователя) идентичность зашиф-

рованных образцов. Вещество положительного контроля допускается вводить путем, отличным от пути введения исследуемого химического вещества, с использованием другого графика введения вещества, но при этом отбор образцов следует проводить одновременно. Кроме того, при необходимости может быть рассмотрено использование веществ положительного контроля родственных классов. В таблице 1 приведены примеры веществ положительного контроля.

6.3.2 Группы отрицательного контроля

6.3.2.1 Группы животных отрицательного контроля следует включать каждый раз во время отбора образцов и обращаться с ними так же, как с животными подопытных групп, за исключением того, что они не должны получать исследуемое химическое вещество. Если для введения исследуемого химического вещества используют растворитель/носитель, контрольная группа должна получить этот растворитель/носитель. Однако, если для испытательной лаборатории историческими данными продемонстрированы согласующаяся изменчивость и частота наличия клеток с микроядрами между животными отрицательной контрольной группы каждый раз при отборе образцов, может потребоваться только один отбор образцов для этой группы отрицательного контроля. Если для группы отрицательного контроля используют однократный отбор образцов, это должно быть время первого отбора образцов в исследовании.

6.3.2.2 Для анализа периферической крови в период, предшествующий введению исследуемого вещества, для краткосрочных исследований допускается в качестве альтернативы использовать сопутствующую группу животных отрицательного контроля, если полученные данные согласуются с базой данных исторического контроля испытательной лаборатории. Было показано, что для крыс отбор небольшого объема образца перед введением исследуемого вещества (например, менее 100 мкл/день) оказывает минимальное влияние на исходную частоту микроядер[1)].

7 Проведение испытаний

7.1 Число и пол животных

7.1.1 Обычно микроядерный ответ у самцов и самок животных одинаковый. Поэтому большинство исследований можно проводить на животных любого пола[2)]. Данные, демонстрирующие значимые различия у самцов и самок (например, различия в системной токсичности, метаболизме, биодоступности, токсичности для костного мозга и т. д., включая, например, исследования по определению диапазона), будут служить основанием для использования животных обоих полов. В этом случае может быть целесообразным проведение исследования на животных обоих полов, например, как части исследования токсичности при многократном введении доз. Возможно, целесообразным может быть факторный дизайн при использовании животных обоих полов. Подробная информация об анализе данных с использованием этого дизайна приведена в приложении А.

7.1.2 В начале исследования должен быть установлен размер групп для обеспечения не менее пяти подопытных животных одного пола или каждого пола (при использовании в группе животных обоих полов). В тех случаях, когда воздействие химических веществ на человека может зависеть от пола (как, например, в случае некоторых фармацевтических препаратов), испытание следует проводить на животных соответствующего пола. В качестве руководства по максимально требуемому количеству животных при исследовании костного мозга, проводимом в соответствии с параметрами, приведенными в 7.5.2 [с тремя дозовыми группами и одновременными группами отрицательного и положительного контроля (каждая группа состоит из пяти животных одного пола)], потребуется от 25 до 35 животных.

7.2 Уровни доз

7.2.1 Если проводят предварительное исследование по выбору диапазона доз в связи с отсутствием доступных данных для выбора дозы, его следует проводить в той же лаборатории, используя те же виды, линии, пол животных и режим введения, которые будут использоваться в основном исследовании[3)]. Исследование должно быть направлено на выявление максимальной переносимой дозы (*MTD*), определяемой как максимальная доза, которая будет переноситься без доказательств токсичности, ограничивающей продолжительность периода исследования (например, вызывающей снижение

[1)] См. [25].

[2)] См. [26].

[3)] См. [27].

массы тела или цитотоксичность кроветворной системы, но не смерть или признаки боли, страдания или дистресса, требующие гуманной эвтаназии[1]).

7.2.2 Максимальная доза также может быть определена как доза, которая вызывает токсичность в костном мозге (например, снижение доли незрелых эритроцитов среди общего количества эритроцитов в костном мозге или периферической крови более чем на 50 %, но не менее чем на 20 % от контрольного значения). Однако при анализе CD71-позитивных клеток в периферическом кровообращении (например, проточной цитометрией) эта очень молодая фракция незрелых эритроцитов быстрее реагирует на токсичность вводимых веществ, чем большая *РНК*-позитивная группа незрелых эритроцитов. В связи с этим более высокая кажущаяся токсичность может проявляться при наличии признаков острого воздействия на рассматриваемую CD71-положительную фракцию незрелых эритроцитов по сравнению с теми, которые идентифицируют незрелые эритроциты на основе содержания *РНК*. По этой причине, когда в экспериментах исследуемое вещество вводят пять или менее дней, самый высокий уровень дозы исследуемых химических веществ, вызывающих токсичность, можно определить как дозу, которая вызывает статистически значимое снижение доли CD71-позитивных незрелых эритроцитов среди общего числа эритроцитов, но не менее 5 % контрольного значения[2]).

7.2.3 Вещества, проявляющие свойства токсикокинетического насыщения или вызывающие детоксикацию, которые могут привести к снижению воздействия после длительного введения вещества, могут быть исключениями из критериев установления уровня дозы и должны быть оценены в каждом конкретном случае.

7.2.4 Для получения информации о зависимости доза — ответ полное исследование должно включать группу отрицательного контроля и не менее трех групп животных с уровнями доз, как правило, различающимися на коэффициент 2, но не более 4. Если в результате исследования по подбору диапазона или на основе существующих данных было установлено, что исследуемое химическое вещество не вызывает токсичности, максимальная доза для периода введения 14 дней или более должна составлять 1000 мг/кг массы тела в день или для периодов введения менее 14 дней — 2000 мг/кг массы тела в день. Однако, если исследуемое химическое вещество вызывает токсичность, *MTD* должна быть самой высокой вводимой дозой, и используемые уровни дозы должны предпочтительно охватывать диапазон от максимальной дозы до дозы, вызывающей небольшую токсичность или не вызывающей ее. Когда наблюдают токсическое действие на ткани-мишени (костный мозг) при всех исследованных уровнях дозы, рекомендуется провести дальнейшее исследование при уровнях доз, не вызывающих токсических эффектов. Исследования, предназначенные для более полного определения количественных данных о зависимости доза — ответ, могут потребовать дополнительных дозовых групп. Для конкретных видов исследуемых химических веществ (например, фармацевтических препаратов для людей), на которые распространяются особые требования, эти границы могут варьироваться.

7.3 Определение предельных доз

Если эксперименты по определению диапазона доз или имеющиеся данные для родственных линий животных указывают на то, что метод воздействия с предельной дозой (описанный ниже) не дает наблюдаемых токсических эффектов (включая отсутствие депрессии пролиферации костного мозга или других признаков цитотоксичности ткани-мишени), и если генотоксичность не ожидается на основании исследований генотоксичности *in vitro* или данных для структурно родственных веществ, то полное исследование с использованием трех уровней доз может не считаться необходимым [если при этом было продемонстрировано, что исследуемое(ые) химическое(ие) вещество(а) достигает(ют) целевой ткани (костного мозга)]. В таких случаях может быть достаточно одного уровня дозы — предельной дозы. Когда вещество вводят в течение 14 дней или более, предельная доза составляет 1000 мг/кг массы тела в день. Для периодов введения менее 14 дней предельная доза составляет 2000 мг/кг массы тела в день.

7.4 Введение доз

При планировании исследования должен учитываться предполагаемый путь воздействия на человека. Поэтому может быть оправдан выбор таких путей воздействия, как: поступление с пищей, питьевой водой, местное подкожное, внутривенное, пероральное (через желудочный зонд), ингаляционное, эндотрахеальное или имплантационное. В любом случае путь введения должен быть выбран для обеспечения адекватного воздействия на ткань(и)-мишень(и). Внутрибрюшинную инъекцию, как правило,

[1]) См. [28].

[2]) См. [29].

не рекомендуется использовать, поскольку она не является предполагаемым путем воздействия на человека, и ее используют только в соответствии со специальным научным обоснованием. Если исследуемое химическое вещество смешано с пищей или питьевой водой (особенно в случае однократного введения), следует проследить, чтобы отсрочка между приемом пищи, воды и отбором проб была достаточной для проявления воздействия (см. 7.5.2). Максимальный объем жидкости, который можно ввести через зонд или с инъекцией за один раз, зависит от размера подопытного животного. Объем обычно не должен превышать 1 $см^3$/100 г массы тела, за исключением случаев, когда используют водные растворы, для которых можно использовать не более 2 $см^3$/100 г. Использование бóльших объемов должно быть обосновано. За исключением химических веществ, вызывающих раздражение или разъедание, воздействие которых, как правило, усугубляется при более высоких концентрациях, вариабельность вводимого объема следует минимизировать, регулируя концентрацию, для обеспечения введения постоянного объема по отношению к массе тела на всех уровнях дозы.

7.5 Режим введения

7.5.1 Предпочтительно проводить две или более процедуры введения вещества с интервалами 24 ч, особенно при включении этого испытания в другие исследования токсичности. В альтернативном варианте можно проводить однократное воздействие, если это научно обосновано (например, известно, что исследуемые химические вещества блокируют клеточный цикл). Для облегчения введения большого объема исследуемого химического вещества его можно вводить методом дробления дозы, то есть применяя два или более воздействия в один день, с интервалом не более чем 2—3 ч. Время отбора образцов в этих условиях или при введении исследуемого химического вещества ингаляцией следует планировать с учетом времени последнего введения дозы или окончания воздействия.

7.5.2 Испытание на мышах или крысах может быть выполнено одним из трех способов:

a) животных подвергают воздействию исследуемого химического вещества один раз. Образцы костного мозга отбираются не менее двух раз (у независимых групп животных), начиная не ранее чем через 24 ч после воздействия, но не позднее чем через 48 ч после воздействия с соответствующим интервалом (интервалами) между отбором образцов, если известно, что исследуемое вещество имеет исключительно длительный период полувыведения. Отбор проб ранее чем через 24 ч после воздействия должен быть обоснован. Образцы периферической крови отбирают не менее двух раз (у одной и той же группы животных), начиная не ранее чем через 36 ч после воздействия, с соответствующими интервалами, следующими за отбором первого образца, но не более 72 ч. При первом отборе проб для анализа должны быть собраны образцы от всех подвергнутых воздействию дозовых групп. Однако в более позднее время при отборе образцов необходимо получить образцы только для группы с максимальной дозой. При обнаружении положительного ответа во время первого отбора образцов дополнительный отбор образцов не проводят, если только не требуется информация о количественной зависимости доза — ответ. Приведенный период отбора является следствием кинетики появления и исчезновения микроядер в этих двух тканях (костном мозге и периферической крови) организма;

b) если используют две ежедневные процедуры введения вещества (например, вещество вводят два раза с интервалом 24 ч), образцы костного мозга отбирают один раз между 18 и 24 ч после последнего воздействия, образцы периферической крови — один раз между 36 и 48 ч после последнего воздействия[1)]. Приведенный период отбора является следствием кинетики появления и исчезновения микроядер в этих двух тканях организма;

c) при использовании трех или более ежедневных процедур введения вещества (например, веществом обрабатывают три или более раз с интервалом приблизительно 24 ч) образцы костного мозга отбирают не позднее чем через 24 ч после последнего воздействия, а периферическую кровь — не позднее чем через 40 ч после последнего воздействия[2)]. Этот вариант введения вещества предусматривает сочетание метода *РНК*-комет (например, отбор образцов через 2—6 ч после последнего воздействия) с анализом микроядер и интеграцией анализа микроядер с исследованиями токсичности при повторных дозах. Накопленные данные свидетельствуют о том, что индукция микроядер может наблюдаться через большие сроки, когда имели место 3 или более введений исследуемого вещества[3)].

---

1) См. [30].

2) См. [31].

3) См. [15].

7.5.3 Могут быть использованы другие схемы введения доз или отбора образцов, если это целесообразно и научно обосновано, а также для облегчения интеграции с другими испытаниями на токсичность.

7.6 Наблюдения

Следует проводить общие клинические наблюдения за подопытными животными и регистрировать клинические признаки не менее одного раза в день (предпочтительно в одно и то же время) с учетом пикового периода ожидаемых эффектов после введения дозы. Не менее двух раз в день в течение периода введения доз следует наблюдать всех животных на предмет заболеваемости и смертности. Всех животных взвешивают в начале исследования и не менее одного раза в неделю во время повторных введений дозы и при эвтаназии. В исследованиях продолжительностью более одной недели определяют потребление пищи не менее одного раза в неделю. Если исследуемое химическое вещество вводят с питьевой водой, измеряют потребление воды при каждой замене воды или не менее одного раза в неделю. Животных с несмертельными симптомами чрезмерной токсичности следует умерщвлять гуманным способом до завершения испытаний[1)]. При определенных обстоятельствах следует контролировать температуру тела животного, так как вызванные воздействием вещества гипертермия и гипотермия могут быть причиной получения ошибочных результатов[2)].

7.7 Воздействие на ткани-мишени

Образец крови должен быть взят в соответствующее время для того, чтобы можно было определить уровни исследуемых веществ в плазме с целью подтверждения того, что произошло воздействие на костный мозг, когда это обоснованно и отсутствуют другие данные о воздействии (см. 8.3.2).

7.8 Препараты костного мозга/крови

7.8.1 Клетки костного мозга обычно получают из бедренных или больших берцовых костей животных сразу после гуманной эвтаназии. Обычно выделяют клетки, готовят препараты и окрашивают клетки, используя установленные методы. Небольшие объемы периферической крови могут быть получены методами, соответствующими стандартам защиты животных, или методом, который позволяет выжить подопытному животному, — из хвостовой вены или другого подходящего кровеносного сосуда, или при эвтаназии животных путем пункции сердца, или отбора проб из большого сосуда. Клетки костного мозга и эритроцитов, полученные из периферической крови, в зависимости от метода анализа могут быть окрашены суправитально[3)] или могут быть приготовлены мазки и затем окрашены для исследования под микроскопом, или зафиксированы и окрашены соответствующим образом для проточного цитометрического анализа. Использование *ДНК*-специфического красителя [например, акридиновый оранжевый[4)] или Hoechst 33258 плюс пиронин-Y[5)]] может устранить некоторые артефакты (нежелательные визуальные помехи), связанные с использованием красителя, не специфичного для *ДНК*. Это преимущество не исключает использования обычных красителей (например, гимзы для микроскопического анализа). Дополнительные системы [например, колонки с целлюлозой для удаления клеток, содержащих ядра[6)]] также можно использовать при условии, что была продемонстрирована совместимость этих систем с подготовкой проб в лаборатории.

7.8.2 В тех случаях, когда эти методы применимы, кинетохор негативные антитела[7)], *FISH* с панцентромерными *ДНК* зондами (праймерами)[8)] или праймированно меченными in situ (*PRINS*) панцентромер-специфичными праймерами вместе с соответствующими контрастно окрашенными *ДНК*[9)] могут быть использованы для идентификации природы микроядер (хромосома/хромосомный фрагмент), чтобы определить, обусловлен ли механизм индукции микроядра кластогенной и/или анеугенной активностью. Могут быть использованы другие методы дифференциации между кластогенами и анеугенами, если доказано, что они эффективны.

---

1) См. [28].

2) См. [32]—[34].

3) См. [16]—[18].

4) См. [35].

5) См. [16].

6) См. [37], [38].

7) См. [39].

8) См. [40].

9) См. [41].

7.9 Анализ (ручной и автоматизированный)

7.9.1 Все препараты (мазки) или образцы для анализа, в том числе групп положительного контроля и отрицательного контроля (контрольной группы), перед любым анализом должны быть независимо зашифрованы и рандомизированы, чтобы оператор, выполняющий исследование вручную, не знал о введении вещества. Такое кодирование не обязательно при использовании автоматизированных систем оценки, которые не основаны на визуальном осмотре и не зависят от субъективности оценки оператора. Долю незрелых эритроцитов от общего количества эритроцитов (незрелых + зрелых) определяют для каждого животного путем подсчета в общей сложности не менее 500 эритроцитов для костного мозга и 2000 эритроцитов для периферической крови[1)]. Не менее 4000 незрелых эритроцитов каждого животного должны быть оценены на частоту появления незрелых эритроцитов с микроядрами[2)]. Если в исторической базе данных испытательной лаборатории для групп отрицательного контроля указано, что средняя фоновая частота незрелых эритроцитов в микроядрах составляет менее 0,1 %, следует рассмотреть возможность подсчета дополнительных клеток. При анализе образцов подопытных животных доля незрелых эритроцитов от общего количества эритроцитов должна составлять не менее 20 % от контрольной группы (получающей только носитель/растворитель) при подсчете с использованием микроскопа и не менее 5 % — при подсчете CD71 плюс количество незрелых эритроцитов цитометрическими методами[3)] (см. 7.2.2). Например, при анализе костного мозга с использованием микроскопа, если контрольная доля незрелых эритроцитов в костном мозге составляет 50 %, верхний предел токсичности составляет 10 % незрелых эритроцитов.

7.9.2 Поскольку селезенка крысы блокирует и разрушает микроядерные эритроциты, для обеспечения высокой чувствительности анализа периферической крови крысы предпочтительно ограничить анализ микроядер незрелых эритроцитов самой ранней фракцией. При использовании автоматизированных методов анализа незрелые эритроциты могут быть идентифицированы на основании высокого содержания *РНК* или высокого уровня рецепторов трансферрина (CD71 +), экспрессируемых на их поверхности[4)]. Однако непосредственное сравнение разных методов окрашивания показало, что удовлетворительные результаты могут быть получены разными способами, включая обычное окрашивание акридиновым оранжевым[5)].

8 Данные испытаний и отчет

8.1 Обработка результатов

Данные по отдельным животным должны быть представлены в табличной форме. Количество незрелых эритроцитов, количество незрелых эритроцитов с микроядрами и долю незрелых эритроцитов от общего количества эритроцитов следует указывать отдельно для каждого подопытного животного. При воздействии вещества на мышей длительное время (в течение 4 недель или более) данные о количестве и доле зрелых эритроцитов с микроядрами также должны быть предоставлены в случае их сбора. Также следует сообщать данные о токсичности для животных и клинических признаках.

8.2 Критерии приемлемости

Определяют следующие критерии приемлемости результатов испытаний:

a) параллельные данные для групп отрицательного контроля считаются приемлемыми для добавления в базу данных исторического контроля лаборатории (см. 5.2.2—5.2.5);

b) группы параллельного положительного контроля или скоринг контроля должны индуцировать ответы, согласующиеся с ответами, приведенными в исторической базе данных положительного контроля, и вызывать статистически значимое увеличение по сравнению с параллельными группами отрицательного контроля (см. 6.3.1.1, 6.3.1.2);

c) было проанализировано соответствующее число доз и количество клеток;

d) критерии выбора самой высокой дозы соответствуют критериям, приведенным в 7.2.

---

1) См. [42].

2) См. [43].

3) См. [29].

4) См. [31].

5) См. [3], [4].

8.3 Оценка и интерпретация результатов

8.3.1 При условии, что все критерии приемлемости выполнены, исследуемое химическое вещество считается однозначно положительным (является токсичным), если:

a) не менее чем в одной из подопытных групп наблюдается статистически значимое увеличение частоты микроядер незрелых эритроцитов по сравнению с группой одновременного отрицательного контроля;

b) это увеличение зависит от дозы при отборе как минимум одной пробы при оценке с использованием соответствующего тренд-теста и

c) любой из вышеперечисленных результатов находится вне пределов распределения исторических данных отрицательного контроля (например, 95 %-ного контрольного предела распределения Пуассона).

Если в конкретное время отбора образцов исследуют только максимальную дозу, исследуемое химическое вещество считается явно положительным (является токсичным) при наличии статистически значимого увеличения по сравнению с сопутствующей группой отрицательного контроля, и результаты находятся вне распределения исторических данных отрицательного контроля (например, 95 %-ного контрольного предела распределения Пуассона). Рекомендации по наиболее подходящим статистическим методам приведены в документах[1)]. При определении зависимости доза — ответ следует проанализировать не менее трех групп животных, подвергнутых воздействию доз. Статистические исследования должны использовать животное в качестве экспериментальной единицы. Положительные результаты в микроядерном анализе указывают на то, что исследуемое химическое вещество индуцирует микроядра, которые являются результатом хромосомного повреждения или повреждения митотического аппарата в эритробластах подопытных видов животных. Обнаружение центромер в микроядрах при анализе свидетельствует, что исследуемое химическое вещество продуцирует микроядра, содержащие центромеры (центромерные *ДНК* или кинетохоры, являющиеся признаком потери всей хромосомы), и доказывает, что исследуемое химическое вещество является анеугеном.

8.3.2 При условии, что все критерии приемлемости соблюдены, исследуемое химическое вещество считается явно отрицательным (не является токсичным), если в результате исследований в условиях эксперимента:

a) ни в одной из подопытных групп не наблюдают статистически значимого увеличения частоты микроядер незрелых эритроцитов по сравнению с параллельной группой отрицательного контроля;

b) отсутствует связанное с дозой повышение (в любое время отбора образцов) при оценке с использованием соответствующего тренд-теста;

c) все результаты находятся в пределах распределения исторических отрицательных контрольных данных (например, 95 %-ного контрольного предела распределения Пуассона);

d) произошло воздействие исследуемых(ого) веществ(а) на костный мозг.

Рекомендации по наиболее подходящим статистическим методам приведены в документах[1)]. Доказательством воздействия исследуемого вещества на костный мозг может быть снижение соотношения незрелых и зрелых эритроцитов или измерение уровней исследуемого вещества в плазме или крови. При внутривенном введении доказательство воздействия не требуется. Альтернативно данные *ADME*, полученные в независимом исследовании с использованием того же пути введения и тех же видов животных, могут быть использованы для демонстрации воздействия на костный мозг. Отрицательные результаты указывают на то, что в условиях испытания исследуемое химическое вещество не продуцирует микроядра в незрелых эритроцитах у разных видов подопытных животных.

8.3.3 Не требуется верификация явно положительного или явно отрицательного ответа.

8.3.4 В случаях, когда ответ не является явно отрицательным или явно положительным, и для того, чтобы помочь в установлении биологической значимости результата (например, слабого или пограничного возрастания), результаты должны быть подтверждены экспертной оценкой и/или дальнейшими исследованиями данных проведенных экспериментов. В некоторых случаях может быть полезным анализ большего количества клеток или выполнение повторного эксперимента с использованием модифицированных условий эксперимента.

8.3.5 В редких случаях (даже после проведения дальнейших исследований) исследуемое химическое вещество дает неоднозначные положительные или отрицательные результаты, и поэтому исследование будет считаться сомнительным.

[1)] См. [44]—[47].

8.4 Отчет об испытании

Отчет об испытании должен включать следующую информацию:

Краткий обзор.

8.4.1 Исследуемое химическое вещество:

- поставщик, номер партии, предельная дата использования (при наличии),
- стабильность исследуемого химического вещества, если известна.

8.4.1.1 Однокомпонентное вещество:

- внешний вид, растворимость в воде и дополнительные важные физико-химические свойства;
- химическая идентификация, например наименование по IUPAC или CAS, номер CAS, код спецификации упрощенного представления молекул в строке ввода (SMILES) или международного химического идентификатора (InChI), структурная формула, чистота, идентификация химических примесей (при необходимости и практической возможности) и т. д.

8.4.1.2 Многокомпонентное вещество, UVBCs (вещество неизвестного или переменного состава, продукты сложных реакций или биологические материалы) и смеси:

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

8.4.2 Подготовка химического вещества к исследованию:

- обоснование выбора носителя (растворителя);
- растворимость и стабильность исследуемого химического вещества в растворителе/носителе, если известны;
- приготовление пищи, питьевой воды или составов для ингаляции;
- аналитические определения составов (например, стабильность, однородность, номинальные концентрации), при проведении.

8.4.3 Подопытные животные:

- используемый вид/линия и обоснование использования;
- число, возраст и пол животных;
- источник, условия содержания, кормления и т. д.;
- способ уникальной идентификации животных;
- для краткосрочных исследований: индивидуальная масса тела животных в начале и в конце испытания; для исследований более одной недели: индивидуальная масса тела животных во время исследования и потребления пищи. Должны быть включены диапазон массы тела, среднее значение и стандартное отклонение для каждой группы.

8.4.4 Условия испытаний:

- данные положительного контроля и группы отрицательного контроля (носитель/растворитель);
- данные исследования по подбору диапазона доз, если проводили;
- обоснование выбора уровня дозы;
- детали подготовки исследуемого химического вещества;
- подробности введения исследуемого химического вещества;
- обоснование способа и продолжительности введения химического вещества;
- методы проверки того, что испытуемое(ые) вещество(а) достигло(и) общего кровотока или ткани-мишени;
- фактическая доза (мг/кг массы тела в сутки), рассчитанная на основе концентрации химического вещества в пище/питьевой воде (ppm) и потребления (при применении);
- данные о качестве пищи и воды;
- метод эвтаназии;
- метод анестезии (при использовании);
- подробное описание графиков введения и отбора образцов и обоснование выбора;
- методы подготовки препаратов;
- процедуры выделения и сохранения образцов;
- методы измерения токсичности;
- критерии оценки незрелых эритроцитов с микроядрами;
- количество анализируемых клеток на одно животное при определении частоты обнаружения незрелых эритроцитов с микроядрами и для определения соотношения незрелых и зрелых эритроцитов;
- критерии приемлемости исследования;

- методы, такие как использование антикинетохорных антител или специфичных для центромеры *ДНК*-зондов, чтобы определить, содержат ли микроядра целые или фрагментированные хромосомы (при применении).

8.4.5 Результаты:

- состояние животного перед испытаниями и в течение всего периода испытаний, включая признаки токсичности;
- доля незрелых эритроцитов среди общего количества эритроцитов;
- количество незрелых эритроцитов с микроядрами, приведенное отдельно для каждого животного;
- среднее значение ± стандартное отклонение количества незрелых эритроцитов с микроядрами на группу;
- соотношение доза — ответ, где это возможно;
- статистический анализ и применяемые методы;
- одновременные данные для групп отрицательного и положительного контроля с диапазонами, средними значениями и стандартными отклонениями;
- исторические данные результатов отрицательных и положительных контролей с диапазонами, средними значениями, стандартными отклонениями и 95 %-ными контрольными пределами распределения, а также охватываемым периодом времени и количеством точек данных;
- данные, подтверждающие воздействие на костный мозг;
- характеристические данные, указывающие, содержат ли микроядра цельные или фрагментированные хромосомы (при применении);
- критерии для положительного или отрицательного ответа, которые выполняются.

8.4.6 Обсуждение результатов

8.4.7 Заключение

8.4.8 Справочные материалы

Приложение А
(справочное)

Факторный дизайн для определения половых различий в микроядерном анализе *in vivo*

Факторный дизайн и его анализ

По этой схеме исследования проводят не менее чем на пяти самцах и пяти самках для каждого уровня концентрации, что предполагает использование не менее 40 животных (20 самцов и 20 самок) плюс животные соответствующих групп положительного контроля.

Дизайн, который является одним из более простых факторных дизайнов, эквивалентный двухфакторному дисперсионному анализу влияния основных эффектов — пола и уровня концентрации. Данные могут быть проанализированы с использованием разных стандартных программных пакетов для статистической обработки данных, таких как SPSS, SAS, STATA, Genstat, а также R.

Анализ вариабельности распределяет набор данных в зависимости от пола и концентрации и взаимосвязи между полом и концентрацией. Каждый из параметров проверяют на основании представленных данных предварительной оценки вариабельности между животными параллельных групп одного пола при одинаковой концентрации. Полная информация о базовой методологии доступна во многих стандартных статистических учебниках[1)] и в справочных средствах, предоставляемых со статистическими пакетами.

Анализ проводится путем проверки взаимодействия пол — концентрация в таблице *ANOVA*[2)]. В отсутствие взаимодействия, значимого с точки зрения совокупных значений между полом или между уровнями концентрации, обеспечиваются достоверные критерии значимости между уровнями, рассчитанными для объединенной в рамках группы изменчивости в терминах *ANOVA*.

Анализ продолжают распределением оценки между вариабельностью концентрации на контрасты, обеспечивающей статистический критерий для исследования линейных и квадратических контрастов откликов по уровням концентрации. При наличии выраженной взаимосвязи между полом и концентрацией этот параметр также можно разделить на линейный и квадратический отклики между полами. Эти термины предоставляют примеры того, являются ли ответы на концентрации параллельными для обоих полов или существует дифференцированный ответ между разными полами.

Оценку суммарной внутригрупповой вариабельности можно использовать для обеспечения попарных критериев расхождения между средними значениями. Эти сравнения могут быть сделаны между средними значениями для обоих полов и между средними значениями для разных уровней концентрации, например для сравнения с уровнями группы отрицательного контроля. В тех случаях, когда существуют сопоставимые значимые взаимодействия, можно провести сравнение между средними значениями для разных концентраций для одного пола или между средними значениями для одной концентрации для разных полов.

Имеется большое количество статистических учебников, в которых обсуждаются теория, дизайн, методология, анализ и интерпретация факторных дизайнов, начиная от простейших двухфакторных анализов и заканчивая более сложными формами, используемыми в методологии проектирования эксперимента. В некоторых учебниках представлены рабочие примеры сопоставимых конструкций и коды для выполнения анализа с использованием разных пакетов программного обеспечения[1)].

[1)] См. [48]—[54].

[2)] Статистики, использующие для моделирования метод общих линейных моделей (GLM), могут подходить к анализу другим, но сопоставимым способом, не обязательно выведут традиционную таблицу *ANOVA*, которая основана на алгоритмическом подходе к вычислению статистических данных, разработанных в докомпьютерную эпоху.

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 № 474:2016
Введение (1—8)	Введение 1 2 3 4 5 6 7 8
1 Область применения	
2 Термины, определения и сокращения (приложение 1)	
3 Основные положения (9—11) 3.1 3.2 3.3	Основные положения 9 10 11
4 Принцип метода испытаний (12)	Принцип метода испытаний 12
5 Верификация квалификации лаборатории (13—18) 5.1 5.2 Исторические контрольные данные 5.2.1 5.2.2 5.2.3 5.2.4 5.2.5	Верификация квалификации лаборатории 13 Исторические контрольные данные 14 15 16 17 18
6 Описание метода (19—27) 6.1 Подготовка 6.1.1 Выбор видов животных 6.1.2 Условия содержания и кормления животных 6.1.3 Подготовка животных 6.1.4 Подготовка доз 6.2 Условия испытаний 6.2.1 Растворитель/носитель 6.3 Средства контроля 6.3.1 Положительные контроли 6.3.1.1 6.3.1.2 6.3.2 Группы отрицательного контроля 6.3.2.1 6.3.2.2	Описание метода Подготовка Выбор видов животных 19 Условия содержания и кормления животных 20 Подготовка животных 21 Подготовка доз 22 Условия испытаний Растворитель/носитель 23 Средства контроля Положительные контроли 24 25 Группы отрицательного контроля 26 27

Продолжение таблицы ДА.1

Структура настоящего стандарта	Структура международного документа OECD Test № 474.2016
7 Проведение испытаний (28 — 44) 7.1 Число и пол животных 7.1.1 7.1.2 7.2 Уровни доз 7.2.1 7.2.2 7.2.3 7.2.4 7.3 Определение предельных доз 7.4 Введение доз 7.5 Режим введения 7.5.1 7.5.2 7.5.3 7.6 Наблюдения 7.7 Воздействие на ткани-мишени 7.8 Препараты костного мозга/крови 7.8.1 7.8.2 7.9 Анализ (ручной и автоматизированный) 7.9.1 7.9.2	Проведение испытаний Число и пол животных 28 29 Уровни доз 30 31 32 33 Определение предельных доз 34 Введение доз 35 Режим введения 36 37 38 Наблюдения 39 Воздействие на ткани-мишени 40 Препараты костного мозга/крови 41 42 Анализ (ручной и автоматизиро-ванный) 43 44
8 Данные испытаний и отчет (45—52) 8.1 Обработка результатов 8.2 Критерии приемлемости 8.3 Оценка и интерпретация результатов 8.3.1 8.3.2 8.3.3 8.3.4 8.3.5 8.4 Отчет об испытании 8.4.1 8.4.1.1 8.4.1.2 8.4.2 8.4.3 8.4.4 8.4.5 8.4.6 8.4.7 8.4.8	Данные испытаний и отчет Обработка результатов 45 Критерии приемлемости 46 Оценка и интерпретация результатов 47 48 49 50 51 52
*	Библиография
**	Приложение 1 Термины и определения
Приложение А Факторный дизайн для идентификации половых различий в микроядерном анализе *in vivo*	Приложение 2 Факторный дизайн для идентификации половых различий в микроядерном анализе *in vivo*
Приложение ДА Сопоставление структуры настоящего стандарта со структурой примененного в нем международного документа	

Окончание таблицы ДА.1

Структура настоящего стандарта	Структура международного документа OECD Test № 474:2016
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] Hayashi, M. et al. (2007), *In vivo* erythrocyte micronucleus assay III. Validation and regulatory acceptance of automated scoring and the use of rat peripheral blood reticulocytes, with discussion of non-hematopoietic target cells and a single dose-level limit test, Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, Vol. 627/1, pp. 10—30

[3] MacGregor, J.T. et al. (2006), Flow cytometric analysis of micronuclei in peripheral blood reticulocytes: II. An efficient method of monitoring chromosomal damage in the rat, Toxicology Sciences, Vol. 94/1, pp. 92—107

[4] Dertinger, S.D. et al. (2006), Flow cytometric analysis of micronuclei in peripheral blood reticulocytes: I. Intra- and interlaboratory comparison with microscopic scoring, Toxicological Sciences, Vol. 94/1, pp. 83—91

[5] Dertinger, S.D. et al. (2011), Flow cytometric scoring of micronucleated erythrocytes: an efficient platform for assessing *in vivo* cytogenetic damage, Mutagenesis, Vol. 26/1, pp. 139—145

[6] Parton, J.W., W.P. Hoffman, M.L. Garriott (1996), Validation of an automated image analysis micronucleus scoring system, Mutation Research, Vol. 370/1, pp. 65—73

[7] Asano, N. et al. (1998), An automated new technique for scoring the rodent micronucleus assay: computerized image analysis of acridine orange supravitally stained peripheral blood cells, Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, Vol. 404/1-2, pp. 149—154

[8] Styles, J.A. et al. (2001), Automation of mouse micronucleus genotoxicity assay by laser scanning cytometry, Cytometry, Vol. 44/2, pp. 153—155

[9] Heddle, J.A. (1973), A rapid in vivo test for chromosomal damage, Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, Vol. 18/2, pp. 187—190

[10] (10) Schmid, W. (1975), The micronucleus test, Mutation Research, Vol. 31/1, pp. 9—15

[11] Heddle, J.A. et al. (1983), The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program, Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology, Vol. 123/1, pp. 61—118

[12] Mavournin, K.H. et al. (1990), The *in vivo* micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program, Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology, Vol. 239/1, pp. 29—80

[13] MacGregor, J.T. et al. (1983), Micronuclei in circulating erythrocytes: a rapid screen for chromosomal damage during routine toxicity testing in mice, Developments in Toxicology Environmental Science, Vol. 11, pp. 555—558

[14] MacGregor, J.T. et al. (1987), Guidelines for the conduct of micronucleus assays in mammalian bone marrow erythrocytes, Mutation Research/Genetic Toxicology, Vol. 189/2, pp. 103—112

[15] MacGregor, J.T. et al. (1990), The *in vivo* erythrocyte micronucleus test: measurement at steady state increases assay efficiency and permits integration with toxicity studies, Fundamental and Applied Toxicology, Vol. 14/3, pp. 513—522

[16] Hayashi, M. et al. (1990), The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides, Mutation Research/Genetic Toxicology, Vol. 245/4, pp. 245—249

[17] CSGMT/JEMS.MMS — The Collaborative Study Group for the Micronucleus Test (1992), Micronucleus test with mouse peripheral blood erythrocytes by acridine orange supravital staining: the summary report of the 5th collaborative study, Mutation Research/Genetic Toxicology, Vol. 278/2-3, pp. 83—98

[18] CSGMT/JEMS.MMS — The Mammalian Mutagenesis Study Group of the Environmental Mutagen Society of Japan (1995), Protocol recommended by the CSGMT/JEMS.MMS for the short-term mouse peripheral blood micronucleus test. The Collaborative Study Group for the Micronucleus Test (CSGMT) (CSGMT/JEMS.MMS, The Mammalian Mutagenesis Study Group of the Environmental Mutagen Society of Japan), Mutagenesis, Vol. 10/3, pp. 153—159

[19] Salamone, M.F., K.H. Mavournin (1994), Bone marrow micronucleus assay: a review of the mouse stocks used and their published mean spontaneous micronucleus frequencies, Environmental and Molecular Mutagenesis, Vol. 23/4, pp. 239—273

[20] Krishna, G., G. Urda, J. Paulissen (2000), Historical vehicle and positive control micronucleus data in mice and rats, Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, Vol. 453/1, pp. 45—50

[21] Hayes, J. et al. (2009), The rat bone marrow micronucleus test--study design and statistical power, Mutagenesis, Vol. 24/5, pp. 419—424

[22] Wakata, A. et al. (1998), Evaluation of the rat micronucleus test with bone marrow and peripheral blood: summary of the 9th collaborative study by CSGMT/JEMS. MMS. Collaborative Study Group for the Micronucleus Test. Environmental Mutagen Society of Japan. Mammalian Mutagenicity Study Group, Environmental and Molecular Mutagenesis, Vol. 32/1, pp. 84—100

[23] Ryan, T.P. (2000), Statistical Methods for Quality Improvement, 2nd ed., John Wiley and Sons, New York

[24] Hayashi, M. et al. (2011), Compilation and use of genetic toxicity historical control data, Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, Vol. 723/2, pp. 87—90

[25] Rothfuss, A. et al. (2011), Improvement of *in vivo* genotoxicity assessment: combination of acute tests and integration into standard toxicity testing, Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, Vol. 723/2, pp. 108—120

[26] Hayashi, M. et al. (1994), *In vivo* rodent erythrocyte micronucleus assay, Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects, Vol. 312/3, pp. 293—304

[27] Fielder, R.J. et al. (1992), Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group. Dose setting in in vivo mutagenicity assays, Mutagenesis, Vol. 7/5, pp. 313—319

[28] OECD (2000), Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation, OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, No. 19, OECD Publishing, Paris

[29] LeBaron, M.J. et al. (2013), Influence of counting methodology on erythrocyte ratios in the mouse micronucleus test, Environmental and Molecular Mutagenesis, Vol. 54/3, pp. 222—228

[30] Higashikuni, N., S. Sutou (1995), An optimal, generalized sampling time of 30 +/– 6 h after double dosing in the mouse peripheral blood micronucleus test, Mutagenesis, Vol. 10/4, pp. 313-319

[31] Hayashi, M. et al. (2000), *In vivo* rodent erythrocyte micronucleus assay. II. Some aspects of protocol design including repeated treatments, integration with toxicity testing, and automated scoring, Environmental and Molecular Mutagenesis, Vol. 35/3, pp. 234—252

[32] Asanami, S., K. Shimono (1997), High body temperature induces micronuclei in mouse bone marrow, Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, Vol. 390/1-2, pp. 79—83

[33] (33) Asanami, S., K. Shimono, S. Kaneda (1998), Transient hypothermia induces micronuclei in mice, Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, Vol. 413/1, pp. 7—14

[34] Spencer, P.J. et al. (2007), Induction of micronuclei by phenol in the mouse bone marrow: I. Association with chemically induced hypothermia, Toxicological Sciences, Vol. 97/1, pp. 120—127

[35] Hayashi, M., T. Sofuni, M. Jr. Ishidate (1983), An application of Acridine Orange fluorescent staining to the micronucleus test, Mutation Research Letters, Vol. 120/4, pp. 241—247

[36] MacGregor, J.T., C.M. Wehr, R.G. Langlois (1983), A simple fluorescent staining procedure for micronuclei and RNA in erythrocytes using Hoechst 33258 and pyronin Y, Mutation Research, Vol. 120/4, pp. 269—275

[37] Romagna, F., C.D. Staniforth (1989), The automated bone marrow micronucleus test, Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, Vol. 213/1, pp. 91—104

[38] Sun, J.T., M.J. Armstrong, S.M. Galloway (1999), Rapid method for improving slide quality in the bone marrow micronucleus assay; an adapted cellulose column procedure, Mutation Research, Vol. 439/1, pp. 121—126

[39] Miller, B.M., I.D. Adler (1990), Application of antikinetochore antibody staining (CREST staining) to micronuclei in erythrocytes induced *in vivo*, Mutagenesis, Vol. 5/4, pp. 411—415

[40] Miller, B.M. et al. (1991), Classification of micronuclei in murine erythrocytes: immunofluorescent staining using CREST antibodies compared to *in situ* hybridization with biotinylated gamma satellite DNA, Mutagenesis, Vol. 6/4, pp. 297—302

[41] Russo, A. (2002), PRINS tandem labeling of satellite DNA in the study of chromosome damage, American Journal of Medical Genetics, Vol. 107/2, pp. 99—104

[42] Gollapudi, B.B., L.G. McFadden (1995), Sample size for the estimation of polychromatic to normochromatic erythrocyte ratio in the bone marrow micronucleus test, Mutation Research, Vol. 347/2, pp. 97—99

[43] OECD (2014), Statistical analysis supporting the revision of the genotoxicity Test Guidelines, OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, No. 198, OECD Publishing, Paris

[44] Richold, M. et al. (1990), *In Vivo* Cytogenetics Assays, in Basic Mutagenicity Tests, UKEMS Recommended Procedures. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report. Part I revised, Kirkland, D.J. (ed.), Cambridge University Press, Cambridge, pp. 115—141

[45] Lovell, D.P. et al. (1989), Statistical Analysis of *In Vivo* Cytogenetic Assays, in Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. UKEMS SubCommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing, Report, Part III, Kirkland, D.J. (ed.), Cambridge University Press, Cambridge, pp. 184—232

[46] Hayashi, M. et al. (1994), Statistical analysis of data in mutagenicity assays: rodent micronucleus assay, Environmental Health Perspectives, Vol. 102/Suppl 1, pp. 49—52

[47] Kim, B.S., M. Cho, H.J. Kim (2000), Statistical analysis of *in vivo* rodent micronucleus assay, Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, Vol. 469/2, pp. 233—241

[48] Box, G.E.P, Hunter, W.G. and Hunter, J.S. (1978). Statistics for Experimenters. An Introduction to Design, Data Analysis, and Model Building. New York: John Wiley & Sons

[49] Box G.E.P. & Draper, N.R. (1987) Empirical model-building and response surfaces. John Wiley & Sons Inc.

[50] Doncaster, C.P. & Davey, A.J.H. (2007) Analysis of Variance and Covariance: How to choose and Construct Models for the Life Sciences. Cambridge University Press

[51] Mead, R. (1990) The Design of Experiments. Statistical principles for practical application. Cambridge University Press

[52] Montgomery D.C. (1997) Design and Analysis of Experiments. John Wiley & Sons Inc.

[53] Winer, B.J. (1971) Statistical Principles in Experimental Design. McGraw Hill.

[54] Wu, C.F.J & Hamada, M.S. (2009) Experiments: Planning, Analysis and Optimization. John Wiley & Sons Inc.

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

Ключевые слова: методы испытания, воздействие химической продукции, организм человека, учет микроядер, эритроциты млекопитающих

БЗ 11—2020/250

Редактор *Г.Н. Симонова*
Технический редактор *В.Н. Прусакова*
Корректор *Л.С. Лысенко*
Компьютерная верстка *Л.А. Круговой*

Сдано в набор 23.10.2020. Подписано в печать 16.11.2020. Формат 60×84 $^{1}/_{8}$. Гарнитура Ариал.
Усл. печ. л. 3,26. Уч.-изд. л. 2,94.
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.
gost.e-ecolog.ru gost.e-ecolog.ru

gost.e-ecolog.ru