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

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

ГОСТ 34639— 2020

Методы испытаний по воздействию химической продукции на организм человека

РАЗДРАЖЕНИЕ КОЖИ IN VITRO

Методы с использованием реконструированного человеческого эпидермиса

(OECD 439:2015, Guideline for the testing of chemicals. In Vitro Skin Irritation: Reconstructed Human Epidermis Test Method, MOD)

Издание официальное

Москва
Стандартинформ
2021

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 Республиканским унитарным предприятием «Белорусский государственный институт метрологии» (БелГИМ) на основе собственного перевода на русский язык англоязычной версии документа, указанного в пункте 5

2 ВНЕСЕН Государственным комитетом по стадартизации Республики Беларусь

3 ПРИНЯТ Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации (протоколом от 30 января 2020 г. № 126-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
Азербайджан	AZ	Азстандарт
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 18 мая 2021 г. № 379-ст межгосударственный стандарт ГОСТ 34639—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 439:2015 «Руководство по тестированию химических веществ. Раздражение кожи in vitro: метод испытаний с использованием реконструированного человеческого эпидермиса» («Guideline for the testing of chemicals. In Vitro Skin Irritation: Reconstructed Human Epidermis Test Method», MOD) путем изменения его структуры для приведения в соответствие с правилами, установленными в ГОСТ 1.5 (подразделы 4.2 и 4.3).

Международный документ разработан Организацией экономического сотрудничества и развития OECD (Organisation for Economic Cooperation and Development).

Наименование настоящего стандарта изменено относительно наименования указанного международного документа для увязки с наименованиями, принятыми в существующем комплексе межгосударственных стандартов.

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

6 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

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

Информация об изменениях к настоящему стандарту публикуется в указателе (каталоге) «Межгосударственные стандарты», а текст этих изменений — в информационных указателях «Межгосударственные стандарты». В случае пересмотра или отмены настоящего стандарта соответствующая информация будет опубликована в информационном указателе «Межгосударственные стандарты»

© Стандартинформ, оформление, 2021

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

Введение

Раздражение кожи согласно определению, приведенному в согласованной на глобальном уровне системе классификации и маркировки химической продукции (СГС) Организации Объединенных Наций (ООН) [1], представляет собой обратимое повреждение тканей кожных покровов после нанесения на кожу исследуемой химической продукции на срок, не превышающий 4 ч. Руководство по проведению испытаний № 439 (OECD 439), на основе которого подготовлен настоящий стандарт, содержит описание метода in vitro, который может применяться для определения опасности раздражающей химической продукции (веществ и смесей), относящейся к классу опасности 2 согласно СГС ООН [1], [2]. На территории государств или регионов, в которых не применяется дополнительный класс опасности 3 согласно СГС ООН (слабая раздражающая продукции), указанное Руководство по проведению испытаний также может использоваться для идентификации химической продукции за пределами действующей классификации. Соответственно, в зависимости от условий законодательного регулирования и применяемой системы классификации, испытания в соответствии с OECD 439 могут как полностью замещать собой отдельные испытания для определения способности химической продукции вызывать раздражение кожи in vivo, так и выступать в качестве частичной замены подобного рода испытаний в рамках более широкой стратегии испытаний [3].

Оценка раздражающего воздействия химической продукции на кожу обычно предполагает использование лабораторных животных (Руководство OECD по проведению испытаний № 404 (OECD 404); впервые принято в 1981 г., пересматривалось в 1992, 2002 и 2015 гг.) [4]. Разъедающее действие на кожу может оцениваться с применением трех валидированных методов испытаний in vitro, установленных в OECD 430, OECD 431 и OECD 435, соответственно [5]—[7]. Документ по интегрированным подходам к испытаниям и оценке (Integrated Approaches to Testing and Asses-sment (IATA)), распространяющийся на оценку раздражающего и разъедающего воздействия на кожу, включает в себя несколько модулей, в пределах которых сгруппированы применяемые источники информации и методы исследований, и содержит необходимые указания, касающиеся: (1) обобщения и использования имеющихся данных, полученных в ходе испытаний или иным путем, для оценки способности химической продукции вызывать раздражение и разъедание кожи, а также (2) выбора оптимального подхода при возникновении потребности в дополнительных испытаниях [3].

Исследования на стадиях предварительной валидации и оптимизации и последующие валидационные исследования были успешно завершены для четырех доступных на рынке методов испытаний in vitro [10]—[28] с использованием испытательной системы RhE (с чувствительностью — 80 %, специфичностью — 70 % и точностью — 75 %). Данные четыре метода включены в настоящий стандарт (см. приложение А), содержащий также сведения о валидационных исследованиях, проведенных в отношении каждого из этих методов. Разработка OECD 439 и действующих стандартов эффективности (СЭ) [8] осуществлялась с учетом требований валидированного референтного метода (ВРМ). СЭ, пригодные для валидации и оценки других подобных или модифицированных методов испытаний с использованием модели RhE, используются в соответствии с принципами Руководящего документа № 34 [8], [9].

Присоединение к системе взаимного признания данных для методов испытаний, прошедших валидацию в соответствии с СЭ [8], гарантируется только при условии, что эти методы были рассмотрены и одобрены OECD. Методы, включенные в OECD 439, могут использоваться для приведения в соответствие требований к результатам испытаний на разъедание кожи *in vitro*, одновременно обеспечивая признание на взаимной основе результатов, полученных с использованием этих методов.

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

Методы испытаний по воздействию химической продукции на организм человека

РАЗДРАЖЕНИЕ КОЖИ IN VITRO

Методы с использованием реконструированного человеческого эпидермиса

Methods for studying the effects of chemicals on the human body. In vitro skin irritation. Test method using reconstructed human epidermis

Дата введения —2021—07—01

1 Область применения

Настоящий стандарт распространяется на проведение испытаний, позволяющих выявить химическую продукцию, обладающую раздражающим действием на кожу. При испытаниях *in vitro* предусмотрено использование так называемого реконструированного человеческого эпидермиса (reconstructed human epidermis (RhE)), достоверно имитирующего биохимические и физиологические характеристики верхних слоев человеческой кожи, т. е. собственно эпидермиса. Источником клеток для создания такой модели эпидермиса, которая обладала бы реалистичными гистологическими показателями и цитоархитектурой, в испытательной системе с использованием RhE выступают нетрансформированные эпидермальные кератиноциты человека.

2 Термины, сокращения и их определения

В настоящем стандарте применены следующие термины с соответствующими определениями.

2.1 **вещество** (substance): Химические элементы и их соединения, представленные в естественном состоянии или полученные при выполнении производственного процесса, включая любые добавки, необходимые для сохранения стабильности продукта, а также любые примеси, наличие которых обусловлено применяемым процессом, но исключая любые растворители, удаление которых не сказывается на стабильности вещества или на его составе.

2.2 **ВЭЖХ** (HPLC — High Performance Liquid Chromatography): Высокоэффективная жидкостная хроматография.

2.3 **ET_{50}:** Показатель, значение которого может быть оценено путем определения времени воздействия, необходимого для снижения жизнеспособности клеток на 50 %, после использования стандартного химического вещества с заданным значением концентрации, см. также IC50.

2.4 **жизнеспособность клеток** (cell viability): Параметр, определяющий суммарную активность клеточной популяции, например способность клеточных митохондриальных дегидрогеназ восстанавливать витальный краситель МТТ(3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолий бромид, тиазолил синий), который в зависимости от измеряемого конечного показателя и протокола испытания коррелирует с общим числом и/или выживаемостью клеток.

2.5 **замещающие испытания** (replacement test): Испытания, которые предназначены для замены регулярно проводимых испытаний и одобрены для целей выявления опасностей и/или оценки рисков, обеспечивают доказанный аналогичный или более высокий уровень защиты здоровья человека, животных или охраны окружающей среды, в зависимости от того, что имеет место, по сравнению

Издание официальное

с принятыми испытаниями, независимо от условий проведения испытаний и выбора исследуемой химической продукции [9].

2.6 **избыточная доза** (infinite dose): Количество исследуемой химической продукции, наносимой на эпидермис, превышающее количество, которое необходимо для полного и равномерного покрытия поверхности эпидермиса.

2.7 **исследуемая химическая продукция** (test chemical): Продукция, которая подвергается испытаниям.

2.8 **IATA** (Integrated Approach on Testing and Assessment): Интегрированный подход к испытаниям и оценке.

2.9 **IC_{50}:** Показатель, значение которого может быть оценено путем определения концентрации стандартного вещества, при которой снижается жизнеспособность тканей на 50 % (IC_{50}) по истечении заданного периода воздействия, см. также ET_{50}.

2.10 **многокомпонентное вещество** (multi-constituent substance): Вещество, характеризуемое количественным составом, в котором две или более основные структурные составляющие содержатся в количестве ≥10 % (по массе), но <80 % (по массе). Образование многокомпонентного вещества происходит в процессе производства. Различие между смесью и многокомпонентным веществом состоит в том, что смесь образуется путем соединения двух или более веществ при отсутствии химической реакции. Многокомпонентное вещество, напротив, образуется в результате химической реакции.

2.11 **МТТ:** 3-(4,5-Диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия бромид; тиазолил синий тетразолия бромид.

2.12 **надежность** (reliability): Показатель того, что метод испытаний может быть реализован с получением воспроизводимых результатов в рамках одной или различных лабораторий в разное время при применении одного и того же протокола. Он оценивается путем вычисления внутри- и межлабораторной воспроизводимости [9].

2.13 **НСМТТ** (NSMTT): Неспецифическое восстановление МТТ.

2.14 **$НСО_{нежизнеспособных}$** (NSC_{killed}): Неспецифическое окрашивание нежизнеспособных тканей.

2.15 **$НСО_{жизнеспособных}$** (NSC): Неспецифическое окрашивание жизнеспособных тканей.

2.16 **однокомпонентное вещество** (mono-constituent substance): Вещество, характеризуемое количественным составом, в котором одна основная структурная составляющая содержится в количестве не менее чем 80 % (по массе).

2.17 **ПК** (PC — positive control): Положительная контрольная проба, содержащая все компоненты исследуемой системы и обрабатываемая с использованием вещества, заведомо дающего положительный отклик. Чтобы обеспечить возможность учитывать изменчивость во времени отклика, получаемого для положительного контроля, этот положительный отклик не должен быть слишком завышенным.

2.18 **раздражение кожи** (skin irritation) in vivo: Возникновение обратимого повреждения кожи вследствие нанесения на кожу исследуемой химической продукции на срок до 4 ч. Раздражение кожи — это локально возникающая реакция пораженных тканей кожных покровов, наблюдаемая вскоре после воздействия [29]. Раздражение обусловлено местным воспалительным процессом, в котором задействована врожденная (неспецифическая) иммунная система тканей кожных покровов. Отличительной чертой раздражения является его обратимый характер, в том числе обратимость воспалительных реакций и большинства типичных клинических симптомов (эритрема, отечность, зуд и болезненность), обусловленных воспалительным процессом.

2.19 **релевантность** (relevance): Описание соответствия метода испытаний результату, полученному при исследованиях, а также его обоснованности и пригодности для определенных целей применения. Данная характеристика указывает пределы, в которых метод испытаний позволяет правильно измерить или спрогнозировать исследуемый биологический эффект. Релевантность включает рассмотрение точности (соответствия) метода испытаний [9].

2.20 **смесь** (mixture): Смесь или раствор, состоящие из двух или более веществ, в которых они не вступают в реакцию друг с другом.

2.21 **согласованность** (concordance): Показатель эффективности метода испытаний, применимый к тем методам, которые позволяют получить однозначные результаты, и являющийся одним из аспектов релевантности. Данный термин, иногда применяемый взамен термина «точность», обозначает долю химической продукции, достоверно классифицированной как дающую при испытаниях положительный или отрицательный результат. Согласованность в значительной степени зависит от преобладания среди исследуемой химической продукции таких видов продукции, которая при испытании дает положительный результат [9].

2.22 **специфичность** (specificity): Доля всей дающей отрицательный результат/неактивной химической продукции, которая была правильно классифицирована с применением соответствующего метода испытаний. Этот показатель является мерой точности для метода испытаний, позволяющего получать однозначные результаты, и служит важной отправной точкой при оценке релевантности такого метода [9].

2.23 **СГС** (Согласованная на глобальном уровне система классификации и маркировки химической продукции (ООН) (GHS (Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (UN))): Система, предусматривающая классификацию химической продукции (веществ и смесей) в зависимости от характерных видов и уровней физической опасности, опасности для здоровья человека или опасности для окружающей среды, с применением соответствующих средств информирования, таких как пиктограммы, сигнальные слова, краткая характеристика опасности, меры по предупреждению опасности и паспорта безопасности, чтобы обеспечить информацией о ее негативном воздействии с целью защиты людей (в том числе сотрудников, работников, перевозчиков, потребителей и представителей аварийных служб) и окружающей среды [1].

2.24 **стандарты эффективности;** СЭ (Performance standards (PS)): Стандарты, основанные на применении валидированного метода испытаний и служащие для сравнительной оценки других, предлагаемых методов испытаний, подобных ему с механистической и функциональной точки зрения. Стандарты устанавливают: (1) важнейшие составляющие метода испытаний, (2) минимальный перечень стандартных химических веществ, отобранных из числа веществ, которые применялись для подтверждения пригодности валидированного метода испытаний, а также (3) аналогичные уровни надежности и точности по результатам использования валидированного метода испытаний, которые предлагаемый метод испытаний должен демонстрировать при его оценке с использованием этого минимального перечня стандартных химических веществ [9].

2.25 **точность** (accuracy): Близость результата испытаний, полученного с применением соответствующего метода испытаний, к принятому эталонному значению величины. Точность является показателем эффективности метода и одним из аспектов релевантности. Данный термин часто применяется как взаимозаменяемый термину «согласованность» (concordance) для указания доли корректных результатов, полученных с применением соответствующего метода испытаний [9].

2.26 **УВЭЖХ** (UPLC): Ультравысокоэффективная жидкостная хроматография.

2.27 **химическая продукция** (chemical): Вещество или смесь веществ.

2.28 **серия испытаний** (run): Испытания одной или более химической продукции параллельно с отрицательной контрольной пробой и ПК.

2.29 **чувствительность** (sensitivity): Доля всей дающей положительный результат/активной химической продукции, которая была правильно классифицирована с применением соответствующего метода испытаний. Этот показатель является мерой точности для методов испытаний, позволяющих получать однозначные результаты, и служит важной отправной точкой при оценке релевантности таких методов [9].

2.30 **UVCB** (unknown, of variable composition, or of biological origin): Вещества неизвестного или переменного состава, продукты комплексных реакций или вещества биологического происхождения.

3 Исходные положения и ограничения

3.1 Основное ограничение методов настоящего стандарта, предусматривающих использование моделей RhE, как свидетельствуют результаты полномасштабного проспективного исследования с целью их валидации [6], заключается в том, что их применение не обеспечивает возможность классификации химической продукции к дополнительному классу опасности 3 согласно СГС ООН (слабые раздражающие вещества) [1]. Порядок применения настоящего стандарта на территории стран-участниц определяется требованиями, действующими в сфере государственного регулирования этих стран. Полные сведения по оценке местного влияния химической продукции на кожу при ее однократном воздействии, приведены в Руководящем документе по интегрированным подходам к испытаниям и оценке (IATA) № 203 [3]. При использовании человеческой кожи следует руководствоваться требованиями национальных и международных этических норм и стандартов.

3.2 Настоящий стандарт предназначен для исследования раздражения кожи, являющегося показателем здоровья человека. Поскольку настоящий стандарт не содержит необходимой информации по определению разъедающего действия на кожу, на исследования разъедания кожи распространяется Руководство OECD 431, которое предусматривает использование такой же испытательной системы

RhE, но с другим протоколом [6]. Настоящий стандарт предусматривает использование моделей RhE с человеческими кератиноцитами, которые имитируют органы-мишени человека при проведении испытаний *in vitro*. Кроме того, в нем непосредственно рассмотрен начальный этап механизма развития воспалительного процесса (разрушения клеток и тканей и, как следствие, локальной травмы), который наблюдается при раздражении кожи *in vivo*. В процессе валидации методов испытаний настоящего стандарта было исследовано большое количество химической продукции; всего базовый перечень для валидации насчитывал 58 наименований химической продукции [16], [18], [23]. Настоящий стандарт может применяться для исследований твердой, жидкой, полутвердой и воскоподобной продукции. Жидкая продукция может иметь водную или неводную основу; твердая может быть растворимой или нерастворимой в воде. По возможности твердая продукция перед исследованием должна быть измельчена до тонкого порошкообразного состояния; никакой другой предварительной обработки пробы не требуется. Оценка воздействия газов и аэрозолей не проводилась в рамках валидационных исследований [29]. Это означает, что, невзирая на теоретическую осуществимость испытаний газов и аэрозолей с применением технологий на основе RhE, настоящим стандартом такая возможность не предусмотрена.

3.3 Перед применением настоящего стандарта для смесей веществ с целью получения информации, применяемой в сфере государственного регулирования, следует изучить вопрос, может ли (если может, то почему) такое его использование обеспечить достижение приемлемых с точки зрения поставленной цели результатов. Изучение вопроса не требуется, если необходимость испытаний соответствующей смеси веществ прямо установлена действующими требованиями. Тем не менее с учетом того, что понятие «смесь» охватывает широкий диапазон видов и составов продукции, количество доступной информации об испытаниях различных смесей в настоящее время ограничено, в случае получения возможных свидетельств, указывающих на неприменимость положений стандарта к определенному виду таких смесей (например, в соответствии со стратегией, предложенной в публикации Eskes et al., 2012) [30]), настоящий стандарт не должен применяться для исследований данных смесей. Аналогичным образом следует поступать, если была подтверждена невозможность применения положений настоящего стандарта для проведения испытаний химических соединений определенных классов или химической продукции с определенными физико-химическими характеристиками.

3.4 Исследуемая химическая продукция, которая поглощает свет в том же спектральном диапазоне, что и МТТ-формазан, а также исследуемая химическая продукция, которая способна непосредственно восстанавливать витальный краситель МТТ (до МТТ-формазана), может препятствовать правильному определению жизнеспособности клеток и требует дополнительного использования контрольных проб для внесения соответствующих поправок в результаты (см. 7.4.3—7.4.9).

3.5 Одной серии испытаний, в которой были параллельно использованы не менее трех образов ткани, должно быть достаточно для оценки исследуемой химической продукции, если при этом обеспечивается ее однозначная классификация. В случае получения сомнительных результатов, таких как несогласованность результатов параллельных определений, и/или в случае если среднее арифметическое значение показателя жизнеспособности составляет (50 ± 5) %, может быть принято решение о проведении второй серии испытаний, а также третьей — в случае расхождения результатов в первой и второй сериях.

4 Сущность метода испытаний

4.1 Исследуемую химическую продукцию наносят местно на трехмерную модель человеческой кожи (RhE), состоящую из нетрансформированных эпидермальных кератиноцитов человека, выращенных таким образом, чтобы получить многослойную, высокодифференцированную копию естественного человеческого эпидермиса. В ней должны выделяться отчетливо выраженные базальный, шиповатый и зернистый слои, а также слоистый роговой слой с межклеточными ламеллярными липидными слоями, представляющими основные классы липидов, по аналогии с теми, которые можно встретить *in vivo*.

4.2 Химически вызванное раздражение кожи, обычно проявляющееся в виде эритемы и отеков, — это результат совокупности явлений, начиная с проникновения химической продукции сквозь роговой слой, за которым может следовать повреждение нижележащих слоев кератиноцитов и других клеток кожи. Поврежденные клетки могут выделять медиаторы воспаления или запускать воспалительные процессы, охватывающие, в том числе, клетки дермы, в первую очередь клетки стромы и эндотелия кровеносных сосудов. Наблюдаемые далее эритема и отеки в свою очередь обусловлены дилатацией и повышением проницаемости клеток эндотелия [29]. Именно методы испытаний с использованием модели RhE позволяют при полном отсутствии васкуляризации в испытательной системе *in vi-*

tro определять начальные процессы воспаления, например повреждение клеток/тканей [16], [17]; в качестве измеряемого показателя при этом выступает жизнеспособность клеток.

4.3 Жизнеспособность клеток в моделях RhE определяется на основе ферментативного восстановления витального красителя МТТ [3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия бромида; тиазолила синего тетразолия бромида; CAS 298-93-1] в синеокрашенную соль формазана, точное количество которой измеряется после ее экстрагирования из тканей [27]. Раздражающая химическая продукция выявляется по ее способности уменьшать жизнеспособность клеток ниже установленных пороговых значений (т. е. ≤50 %) для класса опасности 2 согласно СГС ООН. В зависимости от условий государственного регулирования и области применения настоящего стандарта исследуемая химическая продукция, воздействие которой не приводит к уменьшению жизнеспособности клеток ниже установленного порогового значения, может рассматриваться как нераздражающая (т. е. жизнеспособность >50 %, класс опасности отсутствует).

5 Подтверждение квалификации

5.1 До того как приступить к регулярному применению какого-либо из четырех методов настоящего стандарта (см. приложение А), лаборатории должны подтвердить свою техническую компетентность, используя десять специально отобранных веществ, перечисленных в таблице 1. В случаях когда, например, лаборатория не располагает каким-либо веществом, указанным в перечне, вместо него допускается использовать другое вещество, для которого имеются необходимые справочные данные по испытаниям *in vivo* и *in vitro* (например, взятое из перечня стандартной химической продукции [8]), при условии, что к его выбору применяются те же критерии, что и в таблице 1. Использование альтернативных веществ для проверки квалификации должно быть обосновано.

5.2 Рекомендуется, чтобы в рамках подтверждения квалификации пользователи самостоятельно проверяли барьерные свойства тканей после их получения в соответствии с указаниями изготовителя соответствующей модели RhE. Это особенно важно в том случае, если транспортирование тканей осуществляется на большие расстояния и/или занимает много времени. После успешного внедрения в практику соответствующего метода испытаний, а также приобретения и подтверждения достаточной квалификации для его применения постоянное проведение таких проверок не требуется. Тем не менее, если метод испытаний применяется на постоянной основе, рекомендуется оценку барьерных характеристик используемых тканей проводить через равные промежутки времени.

Таблица 1 — Перечень рекомендованных веществ для проверки квалификации[1)]

Вещество	Регистрационный номер CAS	Присвоенные баллы *in vivo* [2)]	Агрегатное состояние	Класс опасности согласно СГС ООН
Неклассифицируемые вещества (класс опасности согласно СГС ООН отсутствует)				
Нафталинуксусная кислота	86-87-3	0	Твердое	Класс опасности отсутствует
Изопропанол	67-63-0	0,3	Жидкое	Класс опасности отсутствует
Метилстеарат	112-61-8	1	Твердое	Класс опасности отсутствует
Гептил бутират	5870-93-9	1,7	Жидкое	Класс опасности отсутствует (доп. класс опасности 3)[3)]
Гексил салицилат	6259-76-3	2	Жидкое	Класс опасности отсутствует (доп. класс опасности 3)[3)]
Классифицированные вещества (класс опасности 2 согласно СГС ООН)				
Цикламенальдегид	103-95-7	2,3	Жидкое	Класс опасности 2
1-бромгексан	111-25-1	2,7	Жидкое	Класс опасности 2
Калия гидроксид (5 %-ный водный раствор)	1310-58-3	3	Жидкое	Класс опасности 2

Окончание таблицы 1

Вещество	Регистрационный номер CAS	Присвоенные баллы *in vivo* [2]	Агрегатное состояние	Класс опасности согласно СГС ООН
1-метил-3-фенил-1-пиперазин	5271-27-2	3,3	Твердое	Класс опасности 2
Гептанал	111-71-7	3,4	Жидкое	Класс опасности 2

[1] Перечень веществ, рекомендованных для проверки квалификации, включает в себя вещества, ранее использовавшиеся при валидации, их выбор был обусловлен следующими критериями: (1) эти химические вещества доступны для коммерческого приобретения; (2) представляют весь диапазон раздражающих свойств по балльной шкале Дрейза (от нераздражающих до сильно раздражающих); (3) обладают хорошо изученной химической структурой; (4) представляют определенный набор функциональных химических параметров, использованных в процессе валидации; (5) обеспечивают получение воспроизводимых результатов для серий испытаний *in vitro* в разных лабораториях; (6) поддаются корректному прогнозированию *in vitro*; (7) не относятся к веществам с экстремально токсичным действием (например, канцерогенным или токсичным для репродуктивной системы) и не требуют неоправданных затрат на их последующую утилизацию.

[2] Баллы оценки раздражающих свойств *in vivo* в соответствии с Руководством OECD 404 [4].

[3] В соответствии с настоящим стандартом принадлежность к дополнительному классу опасности 3 (слабое раздражающее действие) согласно СГС ООН [1] интерпретируется как «класс опасности отсутствует».

6 Описание метода испытаний

В настоящем стандарте приведено описание параметров и процедур методов испытаний с использованием модели RhE для оценки раздражающего действия на кожу (см. также параметры для каждого отдельного метода испытаний в приложении Б). Разработаны стандартные операционные процедуры (СОП) для четырех методов испытаний, предусмотренных настоящим стандартом [32]—[35].

7 Параметры методов испытаний с использованием модели RhE

7.1 Общие положения

Для создания эпителия должны использоваться нетрансформированные кератиноциты человека. Под функциональным роговым слоем (*stratum corneum*) должны быть расположены несколько слоев жизнеспособных эпителиальных клеток (базальный, шиповатый (*stratum spinosum*) и зернистый (*stratum granulosum*) слои). Роговой слой в свою очередь должен состоять из нескольких слоев с соответствующим липидным профилем для создания функционального барьера, достаточно устойчивого к быстрому проникновению стандартных цитотоксических химических веществ, *например*, таких как натрия додецилсульфат (НДС) или Тритон Х-100. Должна быть подтверждена эффективность барьера, обеспечиваемого используемой моделью, оценка которой выполняется либо путем определения концентрации стандартной химической продукции, при которой жизнеспособность ткани снижается на 50 % (IC_{50}) по истечении заданного периода воздействия, либо путем определения времени, необходимого для снижения жизнеспособности ткани на 50 % (ET_{50}) после нанесения стандартной химической продукции с известной заданной концентрацией. Сдерживающие свойства модели RhE должны препятствовать прохождению исследуемой продукции в жизнеспособные ткани в обход рогового слоя, так как это снижало бы достоверность моделирования воздействия химической продукции на кожу. Модель RhE не должна быть заражена бактериями, вирусами, микоплазмами или грибами.

7.2 Функциональные свойства

7.2.1 Жизнеспособность

Количественная оценка жизнеспособности проводится по результатам применения МТТ-теста [31]. Жизнеспособные клетки искусственной модели ткани RhE обладают способностью восстанавливать витальный краситель МТТ в синеокрашенный МТТ-формазан преципитата, который затем экстрагируется из этой ткани при помощи изопропанола (или иного аналогичного растворителя). Оптиче-

ская плотность (ОП) растворителя-экстрагента должна быть достаточно низкой: ОП < 0,1. Количество экстрагированного МТТ-формазана может определяться путем стандартных измерений ОП или посредством ВЭЖХ/УВЭЖХ-спектрофотометрии [36]. Пользователи модели RhE должны следить за тем, чтобы каждая используемая партия RhE удовлетворяла действующим критериям, установленным для отрицательной контрольной пробы. Диапазон приемлемости (верхний и нижний пределы) значений ОП отрицательной контрольной пробы (в условиях, предусмотренных методом испытаний на раздражение кожи) должен устанавливаться разработчиком/поставщиком модели RhE. Соответствующие диапазоны приемлемости для четырех валидированных методов испытаний с использованием модели RhE, включенных в настоящий стандарт, приведены в таблице 2. При использовании метода ВЭЖХ/УВЭЖХ-спектрофотометрии диапазоны ОП отрицательных контрольных проб, приведенные в таблице 2, следует рассматривать как критерии приемлемости для этих отрицательных контрольных проб. Следует документировать, что ткани, обработанные отрицательной контрольной пробой, являются стабильными при культивировании (обеспечивают аналогичные показатели жизнеспособности).

Таблица 2 — Диапазоны приемлемости значений ОП отрицательных контрольных проб для четырех методов испытаний, включенных в настоящий стандарт

	Нижний предел приемлемости	Верхний предел приемлемости
EpiSkin™ (SM)	≥0,6	≤1,5
EpiDerm™ SIT (EPI-200)	≥0,8	≤2,8
SkinEthic™ RHE	≥0,8	≤3,0
LabCyte EPI-MODEL24 SIT	≥0,7	≤2,5

7.2.2 Барьерные функции

Роговой слой и его липидные составляющие должны обладать достаточной устойчивостью к быстрому проникновению стандартных цитотоксических химических веществ (например, таких как НДС или Тритон Х-100) в соответствии с установленными значениями IC_{50} или ET_{50} (см. таблицу 3).

7.2.3 Морфология

Гистологическое исследование модели RhE проводится с целью подтверждения наличия у нее структуры, подобной структуре человеческого эпидермиса (включая многослойный роговой слой).

7.2.4 Воспроизводимость

Результаты испытаний положительных и отрицательных контрольных проб, полученные с применением соответствующего метода, должны обладать долговременной воспроизводимостью.

7.2.5 Контроль качества (КК)

Модель RhE должна использоваться только при условии подтверждения разработчиком/поставщиком соответствия каждой партии предлагаемой к использованию модели критериям приемки, в первую очередь требованиям, предъявляемым к жизнеспособности (см. 7.2.1), эффективности барьерных функций (см. 7.2.2) и морфологии (см. 7.2.3). Эти данные должны быть предоставлены пользователям методов, чтобы они могли отражать соответствующую информацию в своих отчетах об испытаниях. Диапазон приемлемости (верхний и нижний пределы) значений IC_{50} или ET_{50} должен быть определен разработчиком/поставщиком модели RhE. Только результаты, полученные при использовании тканей, удовлетворяющих установленным критериям, могут быть пригодными для достоверного прогнозирования раздражающих свойств. Диапазоны приемлемости для четырех валидированных методов испытаний с использованием модели RhE, включенных в настоящий стандарт, приведены в таблице 3.

Таблица 3 — Контроль качества. Критерии приемки партий тканей для методов испытаний, включенных в настоящий стандарт

	Нижний допустимый предел	Верхний допустимый предел
EpiSkin™ (SM) (обработка НДС в течение 18 ч) [33]	IC_{50} = 1,0 мг/см^3	IC_{50} = 3,0 мг/см^3

Окончание таблицы 3

	Нижний допустимый предел	Верхний допустимый предел
EpiDerm™ SIT (EPI-200) (1 % Тритон X-100) [34]	ET_{50} = 4,0 ч	ET_{50} = 8,7 ч
SkinEthic™ RHE (1 % Тритон X-100) [35]	ET_{50} = 4,0 ч	ET_{50} = 10,0 ч
LabCyte EPI-MODEL24 SIT (обработка НДС в течение 18 ч) [36]	IC_{50} = 1,4 мг/см^3	IC_{50} = 4,0 мг/см^3

7.3 Нанесение исследуемой химической продукции и контрольных химических веществ

7.3.1 Не менее трех параллельно испытываемых образцов кожи должно использоваться для каждой исследуемой химической продукции и контрольных проб в каждой серии испытаний. Количество наносимой жидкой или твердой химической продукции должно быть таким, чтобы оно обеспечивало ее равномерное распределение по поверхности эпидермиса, не будучи при этом избыточной дозой, т. е. находилось в диапазоне от 26 до 83 мм^3/см^2 (мг/см^2) (см. приложение Б). Перед нанесением твердой химической продукции поверхность эпидермиса должна быть увлажнена деионизированной или дистиллированной водой для улучшения контакта между кожей и исследуемой химической продукцией. По возможности исследуемая твердая продукция должна быть измельчена до состояния порошка тонкого помола. В некоторых случаях более равномерное распределение исследуемого вещества можно обеспечить при помощи нейлоновой сетки (см. приложение Б). По окончании заданного периода воздействия исследуемую химическую продукцию тщательно смывают с поверхности эпидермиса водным буферным раствором или 0,9 % раствором NaCl. В зависимости от конкретного метода с использованием модели RhE время воздействия химической продукции может составлять от 15 до 60 мин, а значение температуры, при которой выдерживаются образцы, находиться на уровне от 20°С до 37°С. Значения времени воздействия и температуры оптимизируются для каждого отдельного метода испытаний с использованием модели RhE и отражают различия присущих этим методам внутренних характеристик (например, барьерные функции) (см. приложение Б).

7.3.2 Отрицательные (ОК) и положительные (ПК) контрольные пробы должны использоваться параллельно в каждой серии испытаний для подтверждения того, что жизнеспособность (по данным, полученным при помощи ОК), барьерные функции и обеспечиваемая в итоге чувствительность (по данным, полученным при помощи ПК) тканей находятся в пределах установленного диапазона приемлемых значений, основанного на результатах предыдущих наблюдений. В качестве ПК рекомендуется использовать 5 %-ный водный раствор НДС. Роль ОК может выполнять фосфатный буферный солевой раствор (ФБС) или вода.

7.4 Определение жизнеспособности клеток

7.4.1 В соответствии с процедурой методов настоящего стандарта определение жизнеспособности выполняется не сразу после воздействия исследуемой химической продукции, а после достаточно долгого восстановительного инкубационного периода промытого образца ткани в свежей среде. Такой период способствует сглаживанию слабых побочных цитотоксических эффектов и более отчетливому проявлению искомых цитотоксических эффектов. Оптимальной продолжительностью восстановительного инкубационного периода образцов по результатам испытаний, которые проводились с целью дальнейшего усовершенствования двух из четырех методов с использованием RhE, было решено считать 42 ч [11]—[15].

7.4.2 В рамках настоящего стандарта для определения жизнеспособности должен применяться стандартизованный метод с использованием МТТ, который является количественным методом. Данный метод пригоден для применения с объемными, трехмерными моделями тканей. Образец ткани помещают в раствор МТТ соответствующей концентрации (например, 0,3—1 мг/см^3) на 3 ч. Жизнеспособные клетки восстанавливают МТТ в формазан с синей окраской. Затем образовавшийся в результате реакции синий формазан экстрагируют из ткани при помощи растворителя (например, изопропанола, подкисленного изопропанола) и определяют его концентрацию путем измерения ОП раствора при длине волны 570 нм с использованием фильтра, имеющего полосу пропускания не более ±30 нм, либо путем проведения ВЭЖХ/УВЭЖХ-спектрофотометрического анализа (см. 7.4.9) [36].

7.4.3 Оптические свойства исследуемой химической продукции или ее химическая активность по отношению к МТТ (так, например, отдельные виды химической продукции препятствуют окрашиванию или вызывают обесцвечивание уже окрашенных тканей, или же, наоборот, сами вызывают такое окрашивание) могут стать причиной искажения результатов исследования, что выражается в неверной оценке жизнеспособности тканей. Такая ситуация возможна, когда какую-либо исследуемую химическую продукцию не удается полностью удалить с поверхности ткани при промывании или когда она проникает глубоко в толщу эпидермиса. Если исследуемая химическая продукция непосредственно вступает в реакцию с МТТ (например, восстанавливает МТТ), имеет выраженную естественную окраску или приобретает окраску в ходе обработки образцов тканей, необходимо предусмотреть использование дополнительных контрольных проб для выявления потенциальных мешающих воздействий, вызываемых исследуемой продукцией при определении жизнеспособности тканей указанным способом (см. 7.4.4 и 7.4.8). Подробное описание внесения поправок на непосредственное восстановление МТТ и мешающие воздействия, создаваемые вызывающими окрашивание реагентами, содержится в СОП для четырех валидированных методов испытаний, включенных в настоящий стандарт [32]—[35].

7.4.4 Для выявления химической продукции, непосредственно восстанавливающей МТТ, каждую исследуемую химическую продукцию помещают в свежеприготовленный раствор МТТ. Если смесь, содержащая исследуемую химическую продукцию, приобретает синюю/фиолетовую окраску, исследуемую химическую продукцию признают способной непосредственно восстанавливать МТТ и переходят к следующей функциональной проверке, которая проводится на нежизнеспособных тканях модели RhE независимо от того, планируется ли оценка количества красителя на основе результатов стандартных измерений ОП или посредством ВЭЖХ/УВЭЖХ-спектрофотометрии. Эта дополнительная функциональная проверка предусматривает использование нежизнеспособных тканей, в которых имеют место лишь остаточные явления обменной активности, но которые при этом могут абсорбировать исследуемую химическую продукцию таким же образом, как и жизнеспособные ткани. Каждую исследуемую химическую продукцию, способную восстанавливать МТТ, параллельно наносят не менее чем на два образца нежизнеспособной ткани и полностью воспроизводят на них процесс испытаний для наблюдения за неспецифическим восстановлением МТТ (НСМТТ) [32]—[35]. Для каждой исследуемой химической продукции достаточно только одной контрольной пробы НСМТТ независимо от количества независимых серий испытаний. Фактическая жизнеспособность ткани определяется как отношение разности жизнеспособности (в процентах), полученной на жизнеспособных тканях, которые подвергались воздействию химической продукции, способной восстанавливать МТТ, и показателя неспецифического восстановления МТТ (в процентах), полученного на нежизнеспособных тканях, которые подвергались воздействию той же химической продукции, к результату испытаний отрицательной контрольной пробы, проводившихся в серии испытаний параллельно с испытаниями, результаты которых предполагается скорректировать (% НСМТТ).

7.4.5 Для выявления потенциальных мешающих воздействий, создаваемых окрашенной исследуемой химической продукцией или такой исследуемой химической продукцией, которая окрашивается при контакте с водой или изопропанолом, и принятия решения о необходимости в этой связи дополнительных контрольных проб проводят спектральный анализ исследуемой химической продукции в воде (среде, в которой происходит воздействие на кожу) и изопропаноле (экстрагирующем растворителе). Если исследуемая химическая продукция в смеси с водой и/или изопропанолом поглощает свет в диапазоне (570 ± 30) нм, проводят контроль окрашивания либо в качестве альтернативы применяют метод ВЭЖХ/УВЭЖХ-спектрофотометрии — в этом случае такой контроль не требуется (см. 7.4.8—7.4.9). При стандартных измерениях ОП каждую создающую мешающие воздействия окрашенную исследуемую химическую продукцию параллельно наносят не менее чем на два образца жизнеспособной ткани и полностью воспроизводят на них процесс испытаний, с тем исключением, что на этапе их обработки вместо раствора МТТ используют среду без МТТ, обеспечивая таким образом контроль неспецифического окрашивания пробы ($НСО_{жизнеспособных}$). Контроль с использованием $НСО_{жизнеспособных}$ должен проводиться параллельно с испытаниями окрашенной исследуемой химической продукции или в случае серий испытаний, независимые пробы для контроля $НСО_{жизнеспособных}$ необходимо включать в каждое отдельное испытание (серию испытаний), что обусловлено необходимостью учитывать изменчивость биологических характеристик, свойственную жизнеспособным тканям. Фактическая жизнеспособность ткани определяется как разность жизнеспособности (в процентах), полученной на жизнеспособных тканях, которые подвергались воздействию создающей помехи химической продукции и выдерживались в растворе МТТ, и показателя неспецифического окрашивания (в процентах), полученного на жизнеспособных тканях, которые подвергались воздействию создающей помехи химической продукции, но вы-

держивались в среде, не содержащей МТТ, в серии испытаний параллельно с испытаниями, результаты которых предполагается скорректировать (% $НСО_{жизнеспособных}$).

7.4.6 Исследуемая химическая продукция, которая непосредственно восстанавливает МТТ (см. 7.4.4) и одновременно мешает определению жизнеспособности по причине характерного окрашивания (см. 7.4.5), при стандартных измерениях ОП требует в дополнение к испытаниям контрольных проб НСМТТ и $НСО_{жизнеспособных}$, рассмотренным выше, проведения контроля третьего вида. Такая необходимость обычно возникает при работе с темноокрашенной исследуемой химической продукцией, затрудняющей применение метода с МТТ (например, сине-, фиолетово- и черноокрашенной), свойственная ей окраска препятствует оценке способности восстанавливать МТТ, как указано в 7.4.4. Данная исследуемая химическая продукция может соединяться как с жизнеспособными, так и нежизнеспособными тканями, и вследствие этого контроль НСМТТ может корректировать не только потенциальную способность исследуемой химической продукции непосредственно восстанавливать МТТ, но также и мешающее воздействие, обусловленное соединением окрашенной продукции с нежизнеспособными тканями. Таким образом, совокупный размер поправки, вносимой в результаты исследований для учета неспецифического окрашивания, может удвоиться, поскольку испытания контрольной пробы $НСО_{жизнеспособных}$ уже предполагают получение отдельной поправки на окрашивание при соединении исследуемой химической продукции с жизнеспособными тканями. Для исключения вероятного двойного применения поправки на неспецифическое окрашивание должна применяться третья разновидность контрольных проб, позволяющая проследить за окрашиванием нежизнеспособных тканей ($НСО_{нежизнеспособных}$). В соответствии с этой дополнительной процедурой контроля исследуемую химическую продукцию параллельно наносят не менее чем на два образца нежизнеспособной ткани и полностью воспроизводят на них процесс испытаний, с тем исключением, что на этапе их обработки вместо раствора МТТ используют среду без МТТ. Для каждой исследуемой химической продукции достаточно только одной контрольной пробы $НСО_{нежизнеспособных}$, независимо от количества независимых серий/испытаний, однако ее анализ должен проводиться параллельно с анализом пробы НСМТТ и, по возможности, на образцах ткани из одной и той же партии. Фактическая жизнеспособность ткани определяется как отношение разности жизнеспособности (в процентах), полученной на жизнеспособных тканях, подвергавшихся воздействию исследуемой химической продукции, % НСМТТ и % $НСО_{жизнеспособных}$, которая суммирована с показателем неспецифического окрашивания (в процентах), полученного на нежизнеспособных тканях, подвергнутых воздействию создающей мешающие воздействия химической продукции, но выдерживались в среде, не содержащей МТТ, к результату испытаний отрицательной контрольной пробы, проводившихся в серии испытаний параллельно с испытаниями, результаты которых предполагается скорректировать (% $НСО_{жизнеспособных}$).

7.4.7 Важно иметь в виду, что мешающие воздействия, обусловленные неспецифическим восстановлением МТТ и неспецифическим окрашиванием, могут приводить к завышенным показаниям спектрофотометрического оборудования при анализе экстракта из тканей, которые выходят за пределы его линейного диапазона. С учетом этого, приступая к испытаниям исследуемой химической продукции, результаты которых предназначаются для применения в сфере государственного регулирования, каждая лаборатория должна предварительно определить линейный диапазон своего спектрофотометра с использованием МТТ-формазана (CAS № 57360-69-7), приобретаемого у коммерческих поставщиков. Результаты стандартных измерений ОП, выполняемых при помощи спектрофотометра, могут использоваться для оценки исследуемой химической продукции, которая способна непосредственно восстанавливать МТТ и обладает мешающей окраской, если значения ОП экстракта тканей для такой исследуемой химической продукции без внесения поправок на непосредственное восстановление МТТ и/или неспецифическое окрашивание не выходят за пределы линейного диапазона спектрофотометра либо если нескорректированная жизнеспособность (в процентах), полученная для данной химической продукции, уже составляет ≤50 %. Вместе с тем, если результаты % НСМТТ и/или % $НСО_{жизнеспособных}$, полученные для исследуемой химической продукции, ≥50 % относительно результата для отрицательной контрольной пробы, они должны использоваться с осторожностью, поскольку этот уровень является пороговым для различения классифицируемой и неклассифицируемой химической продукции (см. 7.6.1).

7.4.8 При исследованиях темноокрашенной химической продукции, стандартные измерения ОП которой не могут быть выполнены по причине неприемлемо высоких мешающих воздействий при применении метода с использованием МТТ, количество МТТ-формазана может определяться альтернативным методом ВЭЖХ/УВЭЖХ-спектрофотометрии (см. 7.4.9) [36]. Система ВЭЖХ/УВЭЖХ-спектрофотометрии обеспечивает возможность разделения МТТ-формазана и исследуемой химической

продукции до начала количественного определения [36]. Это означает, что в случае применения методов ВЭЖХ/УВЭЖХ-спектрофотометрии необходимость в использовании контрольных проб $НСО_{жизнеспособных}$ или $НСО_{мертвых}$ отсутствует независимо от того, какая именно химическая продукция исследуется. Необходимость испытаний контрольной пробы НСМТТ напротив сохраняется, если исследуемая химическая продукция предположительно способна к непосредственному восстановлению МТТ или имеет окраску, которая затрудняет оценку ее способности к непосредственному восстановлению МТТ (как описано в 7.4.4). Если для измерений количества МТТ-формазана применяется метод ВЭЖХ/УВЭЖХ-спектрофотометрии, жизнеспособность тканей определяется как процентное отношение площади пика МТТ-формазана, полученного на жизнеспособных тканях после воздействия на них исследуемой химической продукции, к площади пика МТТ-формазана, полученного для параллельно испытываемой отрицательной контрольной пробы. Для исследуемой химической продукции, способной непосредственно восстанавливать МТТ, фактическую жизнеспособность определяют как разность жизнеспособности (в процентах), полученной на жизнеспособных тканях, которые подвергались воздействию исследуемой химической продукции, и значения % НСМТТ. Следует также иметь в виду, что если продукция, которая способна непосредственно восстанавливать МТТ и обладает мешающей проведению анализа окраской, задерживается в тканях после обработки и восстанавливает МТТ настолько интенсивно, что уровень ОП (при стандартных измерениях ОП) или площади пиков (при измерениях посредством УВЭЖХ/ВЭЖХ-спектрофотометрии) экстрактов испытуемых тканей выходят за пределы линейного диапазона используемого спектрофотометра, то подготовить достоверную оценку их раздражающей способности не представляется возможным, хотя вероятность наличия подобной продукции чрезвычайно мала.

7.4.9 Метод ВЭЖХ/УВЭЖХ-спектрофотометрии аналогичным образом может использоваться для измерений количества формазана при исследовании любой химической продукции (окрашенной, неокрашенной, преобразующей МТТ и не преобразующей МТТ) [36]. С учетом большого разнообразия систем ВЭЖХ/УВЭЖХ-спектрофотометрии до начала использования выбранной системы для целей количественного определения МТТ-формазана в экстрактах тканей необходимо убедиться в ее соответствии критериям приемлемости, установленным для стандартных квалификационных параметров, основанных на положениях руководства по валидации биоаналитических методов в промышленности, которое было разработано американским Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов [36], [37]. Данные ключевые параметры и действующие для них критерии приемлемости приведены в приложении В. Если система ВЭЖХ/УВЭЖХ-спектрофотометрии обеспечивает соблюдение критериев согласно приложению В, она признается пригодной для выполнения количественных измерений МТТ-формазана в аналитических условиях, предусмотренных настоящим стандартом.

7.5 Критерии приемлемости

Для каждого метода испытаний с использованием проверенных партий моделей RhE (см. 7.2.5), образцы тканей, обработанные отрицательной контрольной пробой, должны иметь показатели ОП, свидетельствующие об их надлежащем уровне качества, после того как они были доставлены, получены и прошли все подготовительные операции согласно действующему протоколу. Эти контрольные значения ОП не должны быть хуже ранее установленных предельных значений. Аналогично ткани, обработанные ПК, т. е. 5 %-ным водным раствором НДС, должны проявлять способность соответствующим образом реагировать на воздействие раздражающей химической продукции в условиях метода испытаний (см. приложение Б, а также СОП для четырех методов испытаний, включенных в настоящий стандарт [32]—[35]). Показатели вариабельности параллельно обрабатываемых образцов ткани, т. е. стандартные отклонения (СО), не должны выходить за допустимые пределы, установленные для применяемого метода испытаний (см. приложение Б).

7.6 Интерпретация результатов и модель построения прогнозов

Значения ОП, полученные для каждой исследуемой химической продукции, должны использоваться для вычисления жизнеспособности (в процентах) по отношению к результату, полученному для отрицательной контрольной пробы и принятому равным 100 %. В случае применения метода ВЭЖХ/УВЭЖХ-спектрофотометрии жизнеспособность (в процентах) ткани вычисляется как отношение площади пика для МТТ-формазана, полученного на жизнеспособных тканях после воздействия на них исследуемой химической продукции, к площади пика для МТТ-формазана, полученного при параллельном

испытании отрицательной контрольной пробы. Пороговые значения жизнеспособности (в процентах) клеток для различения раздражающей и неклассифицируемой (нераздражающей) химической продукции, а также статистические методы для анализа результатов испытаний и идентификации раздражающей химической продукции должны быть четко определены, документированы и признаны обоснованными (подробнее см. СОП для применяемых методов испытаний). Информация об использовании пороговых значений для прогнозирования раздражающего действия на кожу представлена ниже:

- следует считать, что для исследуемой химической продукции требуется присвоение класса опасности (класс опасности 2 или класс опасности 1 согласно СГС ООН) и нанесение соответствующей маркировки, если среднеарифметическое значение жизнеспособности (в процентах) ткани после воздействия этой химической продукции и восстановительного инкубационного периода меньше или равно (≤) 50 %. Исходя из того, что методы испытаний с использованием модели RhE, включенные в настоящий стандарт, не позволяют разделять продукцию между классами опасности 1 и 2, окончательное решение о соответствующей классификации химической продукции может приниматься только при условии получения дополнительной информации о ее разъедающей способности (см. также руководящий документ IATA [3]). Если установлено, что исследуемая химическая продукция не является разъедающей (например, по результатам испытаний, предусмотренных OECD 430, OECD 431 или OECD 435), при этом жизнеспособность ткани после воздействия этой продукции и восстановительного инкубационного периода меньше или равна (≤) 50 %, она признается раздражающей для кожи с присвоением ей класса опасности 2 согласно СГС ООН;

- в зависимости от условий государственного регулирования на территории стран-участниц исследуемая химическая продукция может быть признана нераздражающей для кожи без присвоения класса опасности согласно СГС ООН, если жизнеспособность ткани после воздействия этой продукцией и восстановительного инкубационного периода более (>) 50 %.

8 Данные и отчеты об испытаниях

8.1 Данные

8.1.1 Для каждой серии испытаний информацию об отдельных образцах ткани (например, значения ОП и вычисленную жизнеспособность (в процентах) клеток после воздействия каждой исследуемой химической продукции, а также результаты ее классификации) представляют в табличной форме, включая при необходимости в нее данные, полученные при проведении повторных экспериментов. Дополнительно указывают средние арифметические значения ± стандартные отклонения для каждой серии испытаний. Если исследуемая химическая продукция взаимодействует с реактивом MTT или имеет выраженную собственную окраску, об этом в каждом случае также указывают в отчете.

8.2 Отчет об испытаниях

Отчет об испытаниях должен включать в себя следующую информацию:

Исследуемая химическая продукция и контрольные вещества:

- однокомпонентное вещество: химическое наименование, а именно по IUPAC или CAS, номер CAS, код SMILES или InChI, структурная формула, степень чистоты, химическое наименование примесей, в случае возможности и практической целесообразности, и т. п.;

- многокомпонентное вещество, вещества неопределенного или переменного состава (UVCB) или смесь веществ: как можно более полное химическое описание (см. выше), количественное содержание и соответствующие физико-химические характеристики составляющих компонентов;

- наблюдаемые физические свойства, растворимость в воде, а также другие значимые физико-химические характеристики;

- происхождение, номер серии (при наличии сведений);

- способ обработки исследуемой химической продукции/контрольного вещества перед началом испытаний, если такая обработка проводилась (например, подогрев, измельчение);

- стабильность исследуемой химической продукции, предельные сроки использования или сроки проведения повторного анализа, если они известны;

- условия хранения.

Выбранные модель RhE и протокол выполнения исследований (по возможности с соответствующим обоснованием выбора).

Условия испытаний:

- используемая модель RhE (включая номер партии);

- сведения о калибровке средств измерений (например, спектрофотометра), длине волны и полосе пропускания (при необходимости), используемых для количественного определения МТТ-фармазана, и линейном диапазоне средства измерений;

- описание метода, используемого для количественного определения МТТ-формазана;

- описание квалифицирующих параметров системы ВЭЖХ/УВЭЖХ-спектрофотометрии, если такая система используется;

- полный объем сопроводительной информации о конкретной используемой модели RhE, включая сведения о ее функциональных характеристиках. Эта информация должна включать, но не ограничиваться следующими данными:

1) жизнеспособность;

2) барьерные функции;

3) морфология;

4) воспроизводимость и достоверность;

5) сведения о контроле качества (КК) модели;

- справочная информация о ранее полученных данных для модели. Эта информация должна включать, но не ограничиваться сведениями о приемлемости результатов КК со ссылкой на накопленные данные о соответствующей партии ткани;

- подтверждение достаточной квалификации для применения данного метода испытаний перед началом его регулярного применения путем проведения испытаний специально отобранных для этого веществ.

Порядок испытаний:

- подробное описание применяемой методики испытаний (включая операции промывания по истечении заданного периода воздействия);

- использованные дозы исследуемой химической продукции и контрольных веществ;

- длительность и температура периода воздействия химического вещества, а также восстановительного инкубационного периода;

- результаты контроля для исследуемой химической продукции, способной непосредственно восстанавливать МТТ, и/или окрашенной продукции, если требуется;

- количество образцов ткани, параллельно используемых для испытаний каждой исследуемой химической продукции или контрольных веществ (ПК, отрицательной контрольной пробы, а также НСМТТТ, $НСО_{жизнеспособных}$ и $НСО_{нежизнеспособных}$, при необходимости);

- описание применяемых критериев принятия решений/модели построения прогнозов на основе выбранной модели RhE;

- описание всех изменений, внесенных в методику испытаний (включая операции промывания).

Критерии приемлемости результатов испытаний и серии испытаний:

- средние арифметические значения, полученные для положительных и отрицательных контрольных проб и диапазоны приемлемости, основанные на накопленных данных,

- допустимая вариабельность характеристик образцов ткани, на которые наносились положительные и отрицательные контрольные пробы;

- допустимая вариабельность характеристик образцов ткани, на которые наносилась исследуемая химическая продукция.

Результаты:

- таблица данных для каждой исследуемой химической продукции и контрольной пробы, для каждой серии испытаний и каждого параллельно испытанного образца с указанием значений ОП или площади пика для МТТ-формазана, жизнеспособности ткани (в процентах), среднего арифметического процентного значения жизнеспособности ткани (в процентах) и СО;

- в случае необходимости также результаты испытаний контрольных проб для химической продукции, способной непосредственно восстанавливать МТТ, и/или окрашенной исследуемой химической продукции, включая данные по ОП или площади пика МТТ-формазана, % НСМТТ, % $НСО_{жизнеспособных}$, % $НСО_{нежизнеспособных}$, стандартное отклонение и окончательное скорректированное значение жизнеспособности ткани (в процентах);

- результаты, полученные для исследуемой химической продукции и контрольных веществ, с точки зрения их соответствия критериям приемлемости для испытаний и серии испытаний;

- описание прочих явлений, наблюдавшихся в ходе испытаний;

- результаты классификации со ссылкой на применявшуюся модель построения прогнозов/критерии принятия решений.

Анализ результатов

Выводы

Приложение А
(справочное)

Методы испытаний, включенные в настоящий стандарт

Таблица А.1 — Перечень методов испытаний с использованием RhE

№	Наименование метода испытаний	Характер валидационных исследований	Ссылки
1	EpiSkin™	Полномасштабные валидационные иследования (2003—2007 гг.). Параметры этого метода испытаний были использованы для уточнения перечня существенных параметров метода в рамках первоначальной и актуализированной редакции СЭ ECVAM [39], [40], [21] *. Кроме того, показатели метода, имеющие отношение к идентификации неклассифицируемых и классифицируемых веществ, послужили основой для установления значений специфичности и чувствительности первоначальной редакции СЭ *	[2], [10], [11], [14]—[21], [23], [32], [39], [40]
2	EpiDerm™ SIT (EPI-200)	EpiDerm™ (*исходная версия*): Первые полномасштабные валидационные исследования метода испытаний наряду с методом, указанным в пункте 1, в период с 2003 по 2007 гг. Параметры данного метода испытаний были использованы для уточнения перечня существенных параметров метода в рамках первоначальной и актуализированной редакции СЭ ECVAM [39], [40], [21] *. EpiDerm™ SIT (EPI-200): модифицированная разновидность оригинального метода EpiDerm™ валидирована с применением первоначальной редакции СЭ ECVAM [21] в 2008 г. *	[2], [10], [12], [13], [15]—[18], [20], [21], [23], [33], [39], [40] [2], [21]—[23], [33]
3	SkinEthicTM RHE	Валидационные исследования на основе первоначальной редакции СЭ ECVAM [21] в 2008 г. *	[2], [21]—[23], [31]
4	LabCyte EPI-MODEL24 SIT	Валидационные исследования (2011—2012 гг.) на основе СЭ согласно OECD 439 [8], основанных на актуализированной редакции СЭ ECVAM * [39], [40]	[24]—[28], [35], [39], [40] и СЭ настоящего стандарта [8] *

* Первоначальная редакция СЭ ECVAM [21] была разработана в 2007 г. по окончании полномасштабных валидационных исследований [16], которые проводились с целью оценки эффективности методов, перечисленных в пунктах 1 и 2, применительно к системе классификации, описанной в 28-й поправке к Директиве ЕС по опасным веществам [41]. В 2008 г. с введением СГС ООН [1] пороговое значение оценки *in vivo* для различения веществ, подлежащих и не подлежащих классификации, фактически увеличилось с 2,0 до 2,3. В целях приведения в соответствие с изменившимися нормативными требованиями действующие значения точности и перечень стандартных химических веществ для СЭ ECVAM были обновлены и переработаны в 2009 г. [2], [39], [40]. Как и СЭ в исходной редакции, эти актуализированные СЭ в значительной мере основывались на имеющихся данных для методов, указанных в пунктах 1 и 2 [16], но также дополнительно при их подготовке учитывалась информация о стандартных химических веществах в соответствии с методом, указанным в пункте 3. В 2010 г. актуализированные СЭ ECVAM были использованы при подготовке и утверждении СЭ, действующих в рамках настоящего стандарта [8]. Для целей настоящего стандарта валидированным референтным методом (ВРМ) следует считать метод с использованием модели EpiSkin™, поскольку именно он был взят за основу при определении всех критериев для действующих СЭ. Подробные сведения о работах, проводившихся с целью валидации методов, сводку полученных данных, а также общую информацию о внесенных изменениях в СЭ в связи с внедрением СГС ООН можно найти в пояснительном справочном документе ECVAM/BfR к руководящему документу OECD [23].

SIT (Skin Irritation Test): Испытания на раздражение кожи.

RHE (Reconstructed Human Epidermis): Реконструированный человеческий эпидермис.

Приложение Б
(обязательное)

Параметры протокола выполнения испытаний для методов испытаний, включенных в настоящий стандарт

Методы испытаний с использованием RhE предполагают применение в значительной степени схожих между собой протоколов, в том числе восстановительного инкубационного периода в течение 42 ч [32]—[35]. Различия касаются в основном трех параметров, имеющих отношение к барьерным функциям: A) продолжительности предварительного инкубирования и объема используемой при этом среды, B) нанесения исследуемой химической продукции, а также C) объема используемой среды при восстановительном инкубировании.

Таблица Б.1 — Параметры методов испытаний с использованием RhE

	EpiSkin™ (SM)	EpiDerm™ SIT (EPI-200)	SkinEthic RHE™	LabCyte EPI-MODEL24 SIT
A) Предварительное инкубирование				
Продолжительность инкубирования	18—24 ч	18—24 ч	≥2 ч	15—30 ч
Объем используемой среды	2 $см^3$	0,9 $см^3$	0,3 или 1 $см^3$	0,5 $см^3$
B) Нанесение исследуемой химической продукции				
Для жидкостей	10 $мм^3$ (26 $мм^3$/ $см^2$)	30 $мм^3$ (47 $мм^3$/$см^2$)	16 $мм^3$ (32 $мм^3$/$см^2$)	25 $мм^3$ (83 $мм^3$/$см^2$)
Для твердой химической продукции	10 мг (26 мг/$см^2$) + ДВ (5 $мм^3$)	25 мг (39 мг/$см^2$) + ДФБС (25 $мм^3$)	16 мг (32 мг/$см^2$) + ДВ (10 $мм^3$)	25 мг (83 мг/$см^2$) + ДВ (25 $мм^3$)
Нейлоновая сетка	Не используется	Используется при необходимости	Используется	Не используется
Суммарное время воздействия	15 мин	60 мин	42 мин	15 мин
Поддерживаемая температура	КТ	a) 25 мин при КТ; b) 35 мин при 37°C	КТ	КТ
C) Объем используемой среды при восстановительном инкубировании				
Объем используемой среды	2 $см^3$	0,9 $см^3$ × 2	2 $см^3$	1 $см^3$
D) Максимальная допустимая вариабельность образцов				
Стандартное отклонение для параллельно обрабатываемых образцов ткани	CO ≤ 18	CO ≤ 18	CO ≤ 18	CO ≤ 18

КТ — комнатная температура;
ДВ — дистиллированная вода;
ДФБС — фосфатный буферный солевой раствор Дульбекко.

Приложение В
(обязательное)

Ключевые параметры и критерии приемлемости для признания системы ВЭЖХ/УВЭЖХ-спектрофотометрии, пригодной для выполнения измерений МТТ-формазана, экстрагируемого из тканей RhE.

Таблица В.1 — Параметры и критерии приемлемости применения метода ВЭЖХ/УВЭЖХ-спектрофотометрии

Параметр	Протокол выполнения измерений согласно руководству FDA [36], [37]	Критерии приемлемости
Избирательность	Исследование изопропанола, контрольной пробы, полученной из жизнеспособной ткани (изопропанолового экстракта из жизнеспособных тканей RhE, не подвергавшихся какой-либо обработке), контрольной пробы, полученной из нежизнеспособных клеток (изопропанолового экстракта из нежизнеспособных тканей RhE, не подвергавшихся какой-либо обработке)	Площадь$_{помехи}$ ≤ 20 % от площади$_{LLOQ}$ [1)]
Прецизионность	Образцы для контроля качества (т. е. раствор МТТ-формазана с концентрацией 1,6 мкг/см^3, 16 мкг/см^3 и 160 мкг/см^3) в изопропаноле (n = 5)	КВ ≤ 15 % или ≤ 20 % для LLOQ
Точность	Образцы для контроля качества в изопропаноле (n = 5)	% отклонение ≤ 15 % или ≤ 20 % для LLOQ
Влияние матрицы	Образцы для контроля качества представляют собой контрольную пробу, полученную из жизнеспособных тканей (n = 5)	85 % ≤ влияние матрицы % ≤ 115 %
Перенос	Анализ изопропанола после исследования стандартной пробы для ULOQ [2)]	Площадь$_{помехи}$ ≤ 20 % от площадь$_{LLOQ}$ [1)]
Воспроизводимость (в течение дня)	3 отдельные градуировочные кривые (для 6 последовательно разбавленных 1 : 3 растворов МТТ-формазана в изопропаноле, начиная с ULOQ, т. е. 200 мкг/см^3). Образцы для контроля качества в изопропаноле (n = 5)	Градуировочные кривые: % отклонение ≤ 15 % или ≤ 20 % для LLOQ. Образцы для контроля качества: % отклонение ≤ 15 % и КВ ≤ 15 %
Воспроизводимость (в разные дни)	День 1: 1 градуировочная кривая и образцы для контроля качества в изопропаноле (n = 3). День 2: 1 к градуировочная кривая и образцы для контроля качества в изопропаноле (n = 3). День 3: 1 градуировочная кривая и образцы для контроля качества в изопропаноле (n = 3)	
Краткосрочная стабильность МТТ-формазана в экстракте из ткани RhE	Контрольные пробы для контроля качества, полученные из жизнеспособных тканей (n = 3), анализируются в день приготовления и после 24 ч хранения при комнатной температуре	% отклонение ≤ 15 %
Долгосрочная стабильность МТТ-формазана в экстракте из ткани RhE, при необходимости	Контрольные пробы для контроля качества, полученные из жизнеспособных тканей (n = 3), исследуются в день приготовления и после нескольких дней хранения при заданном значении температуры (например, 4 °С, −20 °С, −80 °С)	% отклонение ≤ 15 %

[1)] LLOQ: (Lower Limit of Quantification) — нижний предел количественного определения, который должен соответствовать 1—2 % показателя жизнеспособности тканей, т. е. 0,8 мкг/см^3.

[2)] ULOQ: (Upper Limit of Quantification) — верхний предел количественного определения, который должен соответствовать приблизительно двухкратному значению максимальной ожидаемой концентрации МТТ-формазана в изопропаноловых экстрактах для отрицательных контрольных проб, т. е. 200 мкг/см^3.

Приложение ДА
(справочное)

Сравнение структуры настоящего стандарта со структурой примененного в нем международного документа

Таблица ДА.1

Структура настоящего стандарта			Структура международного документа	
Разделы	Подразделы	Перечисления	Разделы	Перечисления
Введение	—	—	1, 2, 4, 5	
1	—	—	3	
2	—		6	
	2.1		Приложение 1	
	2.2		Приложение 1	
	2.3		Приложение 1	
	2.4		Приложение 1	
	2.5		Приложение 1	
	2.6		Приложение 1	
	2.7		Приложение 1	
	2.8		Приложение 1	
	2.9		Приложение 1	
	2.10		Приложение 1	
	2.11		Приложение 1	
	2.12		Приложение 1	
	2.13		Приложение 1	
	2.14		Приложение 1	
	2.15		Приложение 1	
	2.16		Приложение 1	
	2.17		Приложение 1	
	2.18		Приложение 1	
	2.19		Приложение 1	
	2.20		Приложение 1	
	2.21		Приложение 1	
	2.22		Приложение 1	
	2.23		Приложение 1	
	2.24		Приложение 1	
	2.25		Приложение 1	
	2.26		Приложение 1	
	2.27		Приложение 1	
	2.28		Приложение 1	
	2.29		Приложение 1	
	2.30		Приложение 1	
3	3.1		7	
	3.2		8	
	3.3		9	
	3.4		10	
	3.5		11	
4	4.1		12	
	4.2		13	
	4.3		14	
5	5.1		15	
	5.2		16	

Окончание таблицы ДА.1

Структура настоящего стандарта			Структура международного документа	
Разделы	Подразделы	Перечисления	Разделы	Перечисления
6	—		17	
7	7.1		18	
	7.2.1		19	
	7.2.2		20	
	7.2.3		21	
	7.2.4		22	
	7.2.5		23	
	7.3.1		24	
	7.3.2		25	
	7.4.1		26	
	7.4.2		27	
	7.4.3		28	
	7.4.4		29	
	7.4.5		30	
	7.4.6		31	
	7.4.7		32	
	7.4.8		33	
	7.4.9		34	
	7.5		35	
	7.6		36	
8	8.1		37	
	8.2		38	
Приложение А			Приложение 2	
Приложение Б			Приложение 3	
Приложение В			Приложение 4	
Библиография			Литература	

Библиография

[1] United Nations (UN). (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Second Revised Edition, UN New York and Geneva, 2013. Available at: [gost.e-ecolog.ru ghs/ghs rev05/05files e.html] (Согласованная на Глобальном уровне Система классификации и маркировки химической продукции (СГС). Второе пересмотренное издание)

[2] EURL-ECVAM. (2009). Statement on the "Performance Under UN GHS of Three In Vitro Assays for Skin Irritation Testing and the Adaptation of the Reference Chemicals and Defined Accuracy Values of the ECVAM Skin Irritation Performance Standards", Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC30), 9 April 2009. Available at: [http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_activities/alt-animal- testing] (Заключение по теме «Результативность применения трех методов испытаний на раздражение кожи in vitro в рамках требований СГС ООН и адаптация эталонной химической продукции и установленных значений точности в соответствии со стандартами эффективности ECVAM для методов испытаний на раздражение кожи)

[3] OECD. (2014). Guidance Document on Integrated Approaches to Testing and Assessment for Skin Irritation/Corrosion. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 203), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris (Руководящий документ по интегрированным подходам к испытаниям и оценке разъедания кожи. Публикации по охране труда, окружающей среды и технике безопасности. Серия по испытаниям и оценке (№ 203) Организация экономического сотрудничества и развития, Париж)

[4] OECD. (2015). OECD Guideline for Testing of Chemicals. (No. 404.): Acute Dermal Irritation, Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris (Руководство по проведению испытаний химической продукции. (№ 404). Острое раздражение кожи. Организация экономического сотрудничества и развития, Париж)

[5] OECD. (2015). OECD Guideline for the Testing of Chemicals (No. 430.): In Vitro Skin Corrosion: Transcutaneous Electrical Resistance (TER) (Руководство по проведению испытаний химической продукции. (№ 430). Разъедание кожи in vitro. Транскожное электрическое сопротивление (TER))

[6] OECD. (2015). OECD Guideline for the Testing of Chemicals (No. 431.): In Vitro Skin Model. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris (Руководство по проведению испытаний химической продукции. (№ 431) Модель кожи in vitro. Организация экономического сотрудничества и развития, Париж)

[7] OECD. (2015). Guideline for the Testing of Chemicals (No. 435.): In Vitro Membrane Barrier Test Method, Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris (Руководство по проведению испытаний химической продукции. (№ 435). Метод мембранного барьера in vitro. Организация экономического сотрудничества и развития, Париж)

[8] OECD. (2015). Performance Standards for the Assessment of Proposed Similar or Modified In Vitro Reconstructed Human Epidermis (RhE) Test Methods for Skin Irritation in Relation to TG 439. Environment, health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 220). Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris (Стандарты эффективности для оценки предлагаемых идентичных или модифицированных методов испытаний in vitro на реконструированном человеческом эпидермисе (RhE). Методы испытаний на раздражение кожи согласно TG 439. Публикации по охране труда, окружающей среды и технике безопасности. Серия по испытаниям и оценке (№ 220) Организация экономического сотрудничества и развития, Париж)

[9] OECD. (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 34.) Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris (Руководящий документ по валидации и международному признанию новых или актуализированных методов испытаний для оценки опасностей. Публикации по охране труда, окружающей среды и технике безопасности. Серия по испытаниям и оценке (№ 34) Организация экономического сотрудничества и развития, Париж)

[10] Fentem, J.H., Briggs, D., Chesne, C., Elliot, G.R., Harbell, J.W., Heylings, J.R., Portes, P., Roguet, R., van de Sandt, J.J. M. and Botham, P. (2001). A Prevalidation Study on In Vitro Tests for Acute Skin Irritation, Results and Evaluation by the Management Team, Toxicol. in Vitro 15, 57-93 (Исследование в целях предварительной валидации методов испытаний на острое раздражение кожи in vitro. Результаты и оценка руководящей группы)

[11] Portes, P., Grandidier, M.-H., Cohen, C. and Roguet, R. (2002). Refinement of the EPISKIN Protocol for the Assessment of Acute Skin Irritation of Chemicals: Follow-Up to the ECVAM Prevalidation Study, Toxicol. in Vitro 16, 765-770 (Усовершенствование протокола проведения испытаний EPISKIN для оценки острого раздражения кожи при воздействии химической продукции. По итогам превалидационных исследований ECVAM)

[12] Kandarova, H., Liebsch, M., Genschow, E., Gerner, I., Traue, D., Slawik, B. and Spielmann, H. (2004). Optimisation of the EpiDerm Test Protocol for the Upcoming ECVAM Validation Study on In Vitro Skin Irritation Tests, ALTEX21, 107-114 (Оптимизация протокола проведения испытаний EpiDerm для подготовки к исследованиям ECVAM, посвященным валидации методов испытаний на раздражение кожи in vitro)

[13] Kandarova, H., Liebsch, M., Gerner, I., Schmidt, E., Genschow, E., Traue, D. and Spielmann, H. (2005). The EpiDerm Test Protocol for the Upcoming ECVAM Validation Study on In Vitro Skin Irritation Tests — An Assessment of the Performance of the Optimised Test, ATLA 33, 351-367 (Оптимизация протокола проведения испытаний EpiDerm в рамках подготовки к исследованиям ECVAM, посвященным валидации методов испытаний на раздражение кожи in vitro. Оценка результативности оптимизированного метода испытаний)

[14] Cotovio, J., Grandidier, M. -H., Portes, P., Roguet, R. and Rubinsteen, G. (2005). The In Vitro Acute Skin Irritation of Chemicals: Optimisation of the EPISKIN Prediction Model Within the Framework of the ECVAM Validation Process, ATLA 33, 329-349 (Острое раздражение кожи при воздействии химической продукции in vitro. Оптимизация модели построения прогнозов EPISKIN в рамках процесса валидации ECVAM)

[15] Zuang, V., Balls, M., Botham, P.A., Coquette, A., Corsini, E., Curren, R.D., Elliot, G.R., Fentem, J.H., Heylings, J.R., Liebsch, M., Medina, J., Roguet, R., van De Sandt, J.J.M., Wiemann, C. and Worth, A. (2002). Follow-Up to the ECVAM Prevalidation Study on In Vitro Tests for Acute Skin Irritation, The European Centre for the Validation of Alternative Methods Skin Irritation Task Force report 2, ATLA 30, 109-129 (Итоги превалидационных исследований методов испытаний на острое раздражение кожи in vitro. Отчет специальной комиссии по испытаниям на раздражение кожи Европейского центра по валидации альтернативных методов испытаний)

[16] Spielmann, H., Hoffmann, S., Liebsch, M., Botham, P., Fentem, J., Eskes, C., Roguet, R., Cotovio, J., Cole, T., Worth, A., Heylings, J., Jones, P., Robles, C., Kandarova, H., Gamer, A., Remmele, M., Curren, R., Raabe, H., Cockshott, A., Gerner, I. and Zuang, V. (2007). The ECVAM International Validation Study on In Vitro Tests for Acute Skin Irritation: Report on the Validity of the EPISKIN and EpiDerm Assays and on the Skin Integrity Function Test, ATLA 35, 559-601 (Международные исследования ECVAM с целью валидации методов испытаний на острое раздражение кожи in vitro. Отчет об обоснованности применения методов испытаний на основе моделей EPISKIN и EpiDerm и теста на функциональную целостность кожи)

[17] Hoffmann S. (2006). ECVAM Skin Irritation Validation Study Phase II: Analysis of the Primary Endpoint MTT and the Secondary Endpoint IL1-a. Available at: [http://ihcp.j rc.ec.europa.eu/our_activities/alt-animal-testing] (Валидация метода испытаний на раздражение кожи ECVAM. Стадия II. Анализ основных конечных показателей MTT и дополнительных конечных показателей IL1-α)

[18] Eskes C., Cole, T., Hoffmann, S., Worth, A., Cockshott, A., Gerner, I. and Zuang, V. (2007). The ECVAM International Validation Study on In Vitro Tests for Acute Skin Irritation: Selection of Test Chemicals, ATLA 35, 603-619 (Международные исследования ECVAM с целью валидации методов испытаний на острое раздражение кожи in vitro. Выбор химической продукции для исследований)

[19] Cotovio, J., Grandidier, M.-H., Lelievre, D., Roguet, R., Tinois-Tessonneaud, E. and Leclaire, J. (2007). In Vitro Acute Skin Irritancy of Chemicals Using the Validated EPISKIN Model in a Tiered Strategy — Results and Performances with 184 Cosmetic Ingredients, AATEX, 14, 351-358 (Испытания на острое раздражение кожи при воздействии химической продукции in vitro с использованием валидированной модели EPISKIN в рамках многоуровневой стратегии. Результаты и показатели анализа 184 косметических ингредиентов)

[20] EURL-ECVAM. (2007). Statement on the Validity of In Vitro Tests for Skin Irritation, Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC26), 27 April 2007. Available at: [gost.e-ecolog.ru our_activities/alt-animal-testing] (Заключение об обоснованности применения методов испытаний на раздражение кожи in vitro)

[21] EURL-ECVAM. (2007). Performance Standards for Applying Human Skin Models to In Vitro Skin Irritation Testing. Available at: [gost.e-ecolog.ru] (Стандарты эффективности для использования моделей человеческой кожи при испытаниях на раздражение кожи in vitro) Примечание. Это исходная редакция СР, на основе которой ранее уже проводилась валидация двух методов испытаний. Дальнейшее применение этих СР, однако, нежелательно, ввиду наличия более новой редакции (8)

[22] EURL-ECVAM. (2008). Statement on the Scientific Validity of In Vitro Tests for Skin Irritation Testing, Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC29), 5 November 2008. Available at: [gost.e-ecolog.ru our_activities/alt-animal-testing] (Заключение о научной обоснованности методов испытаний на раздражение кожи)

[23] OECD. (2010). Explanatory Background Document to the OECD Draft Test Guideline on In Vitro Skin Irritation Testing. Environment, Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment, (No. 137.), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris (Пояснительный справочный документ к проекту Руководства ОЭСР по проведению испытаний на раздражение кожи in vitro. Публикации по охране труда, окружающей среды и технике безопасности. Серия по испытаниям и оценке (№. 137) Организация экономического сотрудничества и развития, Париж)

[24] Katoh, M., Hamajima, F., Ogasawara, T. and Hata K. (2009). Assessment of Human Epidermal Model LabCyte EPI-MODEL for In Vitro Skin Irritation Testing According to European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM)-Validated Protocol, J Toxicol Sci, 34, 327-334 (Оценка пригодности модели человеческого эпидермиса LabCyte EPI-MODEL для целей испытаний на раздражение кожи in vitro в соответствии с протоколом, одобренным Европейским центром валидации альтернативных методов испытаний (ECVAM))

[25] Katoh, M. and Hata K. (2011). Refinement of LabCyte EPI-MODEL24 Skin Irritation Test Method for Adaptation to the Requirements of OECD Test Guideline 439, AATEX, 16, 111-122 (Усовершенствование метода испытаний на раздражение кожи на основе LabCyte EPI-MODEL24 в целях адаптации к требованиям Руководства по проведению испытаний OECD TG 439)

[26] OECD. (2011). Validation Report for the Skin Irritation Test Method Using LabCyte EPI-MODEL24. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 159.), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris (Отчет о валидации метода испытаний на раздражение кожи с использованием LabCyte EPI-MODEL24. Публикации по охране труда, окружающей среды и технике безопасности. Серия по испытаниям и оценке (№ 159) Организация экономического сотрудничества и развития, Париж)

[27] OECD. (2011). Peer Review Report of Validation of the Skin Irritation Test Using LabCyte EPI-MODEL24. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 155.), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris (Отчет о проведении внешней оценки для валидации метода испытаний на раздражение кожи с использованием LabCyte EPI-MODEL24. Публикации по охране труда, окружающей среды и технике безопасности. Серия по испытаниям и оценке (№ 155) Организация экономического сотрудничества и развития, Париж)

[28] Kojima, H., Ando, Y., Idehara, K., Katoh, M., Kosaka, T., Miyaoka, E., Shinoda, S., Suzuki, T., Yamaguchi, Y., Yoshimura, I., Yuasa, A., Watanabe, Y. and Omori, T. (2012). Validation Study of the In Vitro Skin Irritation Test with the LabCyte EPI-MODEL24. Altern Lab Anim, 40, 33-50 (Исследования с целью валидации метода испытаний на раздражение кожи in vitro с использованием LabCyte EPI-MODEL24)

[29] Welss, T., Basketter, D.A. and Schroder, K.R. (2004). In Vitro Skin Irritation: Fact and Future. State of the Art Review of Mechanisms and Models, Toxicol. In Vitro 18, 231-243 (Раздражение кожи in vitro. Действительность и перспективы. Обзор современных моделей и механизмов)

[30] Eskes, C. et al. (2012). Regulatory Assessment of In Vitro Skin Corrosion and Irritation Data within the European Framework: Workshop Recommendations. Regul.Toxicol.Pharmacol. 62, 393-403 (Оценка данных испытаний in vitro на повреждение и раздражение кожи в рамках европейской системы законодательного регулирования. Рекомендации семинара)

[31] Mosmann, T. (1983). Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays, J. Immunol. Methods 65, 55-63 (Колориметрический экспресс-контроль роста и выживаемости клеток. Применение при выполнении анализа пролиферации и анализа на цитотоксичность)

[32] EpiSkin™. (February 2009). SOP, Version 1.8 ECVAM Skin Irritation Validation Study: Validation of the EpiSkin™ Test Method 15 min - 42 hours for the Prediction of acute Skin Irritation of Chemicals. Available at: [gost.e-ecolog.ru jrc.ec.europa.eu/our_activities/alt-animal-testing.html] (EpiSkin™ (февраль 2009 г.). СОП. Версия 1.8. Исследования с целью валидации методов испытаний на раздражение кожи ECVAM. Валидация метода испытаний с использованием EpiSkin™ по схеме 15 мин — 42 ч для прогнозирования острого раздражения кожи при воздействии химической продукции)

[33] EpiDerm™. (Revised March 2009). SOP, Version 7.0, Protocol for: In Vitro EpiDerm™ Skin Irritation Test (EPI-200-SIT), for Use with MatTek Corporation's Reconstructed Human Epidermal Model EpiDerm (EPI-200). Available at: [gost.e-ecolog.ru] (EpiDerm™ (пересмотрено в марте 2009 г.). СОП. Версия 7.0. Протокол выполнения испытаний на раздражение кожи in vitro по методу EpiDerm™ (EPI-200-SIT). Для использования с моделью реконструированного человеческого эпидермиса (EPI-200) производства компании MatTek Corporation)

[34] SkinEthic™ RHE SOP, Version 2.0 (February 2009), SkinEthic Skin Irritation Test-42bis Test Method for the Prediction of Acute Skin Irritation of Chemicals: 42 Minutes Application + 42 Hours PostIncubation. Available at: [http://gost.e-ecolog.ru] (SkinEthic™ RhE. СОП. Версия 2.0 (февраль 2009 г.). Метод испытаний на раздражение кожи с использованием SkinEthic по схеме 42-бис для прогнозирования острого раздражения кожи при воздействии химической продукции. Воздействие химическоой продукции в течение 42 мин + последующее инкубирование образцов в течение 42 ч)

[35] LabCyte. (June 2011). EPI-MODEL24 SIT SOP, Version 8.3, Skin Irritation Test Using the Reconstructed Human Model "LabCyte EPI-MODEL24" Available at: (LabCyte (июнь 2011 г.). EPI-MODEL24 SIT. СОП. Версия 8.3. Испытания на раздражение кожи с использованием модели реконструированного человеческого эпидермиса "LabCyte EPI-MODEL24")

[36] Alépée, N., Barroso, J., De Smedt, A., De Wever, B., Hibatallah, J., Klaric, M., Mewes, K.R., Millet, M., Pfannenbecker, U., Tailhardat, M., Templier, M., and McNamee, P. Use of HPLC/UPLC-Spectrophotometry for Detection of MTT Formazan in In Vitro Reconstructed Human Tissue (RhT)-Based Test Methods Employing the MTT Assay to Expand their Applicability to Strongly Coloured Test Chemicals. Manuscript in preparation (Применение метода ВЭЖХ/УВЭЖХ-спектрофотометрии с целью обнаружения МТТ-формазана при реализации методов испытаний in vitro на реконструированных человеческих тканях (RhT), обеспечивающее возможность использования МТТ-теста для исследуемых химической продукции, характеризующихся сильным окрашиванием)

[37] US FDA. (2001). Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration. May 2001. Available at: [http://gost.e-ecolog.ru ucm070107.pdf] (Руководство для промышленности. Валидация биоаналитических методов)

[38] Harvell, J.D., Lamminstausta, K., and Maibach, H.I. (1995). Irritant Contact Dermatitis, in: Practical Contact Dermatitis, pp 7-18, (Ed. Guin J. D.). Mc Graw-Hill, New York (Ирритантный контактный дерматит. Опубликовано в: Практическая контактная дерматология)

[39] EURL-ECVAM. (2009). Performance Standards for In Vitro Skin Irritation Test Methods Based on Reconstructed Human Epidermis (RhE).Available at: [http://www.ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_activities/alt-animal-testing] (Стандарты эффективности для методов испытаний на раздражение кожи in vitro с использованием реконструированного человеческого эпидермиса). Примечание. Это редакция СЭ ECVAM по состоянию на 2009 г., после актуализации в связи с внедрением СГС ООН. Дальнейшее применение этих СЭ, однако, нежелательно, ввиду наличия более новой редакции (8), действующей для настоящего Руководства

[40] EURL-ECVAM. (2009). ESAC Statement on the Performance Standards (PS) for In Vitro Skin Irritation Testing Using Reconstructed Human Epidermis, Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC31), 8 July 2009. Available at: [gost.e-ecolog.ru animal-testing] (ESAC Statement on the Performance Standards (PS) for In Vitro Skin Irritation Testing Using Reconstructed Human Epidermis (Заключение ESAC о применении стандартов эффективности (СЭ) для испытаний на раздражение кожи in vitro с использованием реконструированного человеческого эпидермиса)

[41] EC. (2001). Commission Directive 2001/59/EC of 6 August 2001 Adapting to Technical Progress for the 28th Time Council Directive 67/548/EEC on the Approximation of Laws, Regulations and Administrative Provisions Relating to the Classification, Packaging and Labelling of Dangerous Substances, Official Journal of the European Union L225, 1-333 (Директива Комиссии 2001/59/ЕС от 6 августа 2001 г. о 28-м приведении в соответствие с достижениями научно-технического прогресса Директивы Совета 67/548/ЕЕС о сближении законов, регламентов и административных положений, касающихся классификации, упаковки и маркировки опасных веществ)

УДК 613:63.086.4:611.771(083.74)(476) МКС 71.040.10; 13.020.01 MOD

Ключевые слова: химическая продукция, воздействие на организм человека, раздражение кожи *in vitro*, метод испытаний на реконструированном человеческом эпидермисе

Технический редактор *В.Н. Прусакова*
Корректор *И.А. Королева*
Компьютерная верстка *А.Н. Золотаревой*

Сдано в набор 19.05.2021. Подписано в печать 27.05.2021. Формат 60×84¼. Гарнитура Ариал.
Усл. печ. л. 3,26. Уч.-изд. л. 2,95.

Подготовлено на основе электронной версии, предоставленной разработчиком стандарта

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

gost.e-ecolog.ru