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

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

ГОСТ 32634— 2020

Методы испытаний по воздействию химической продукции на организм человека

РАЗЪЕДАНИЕ КОЖИ IN VITRO

Методы с использованием реконструированного человеческого эпидермиса

(OECD 431:2016, Guideline for the testing of chemicals. In vitro skin corrosion: reconstructed human epidermis (RHE) 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 стандартизации Республики Беларусь

3 ПРИНЯТ Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации (протокол 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
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. № 376-ст межгосударственный стандарт ГОСТ 32634—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 431:2016 «Руководство по тестированию химических веществ. Разъедание кожи in vitro: метод испытания реконструированного человеческого эпидермиса (RHE)» («Guideline for the testing of chemicals. In vitro skin corrosion: reconstructed human epidermis (RHE) 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 ВЗАМЕН ГОСТ 32634—2014

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

В случае пересмотра, изменения или отмены настоящего стандарта соответствующая информация будет опубликована на официальном интернет-сайте Межгосударственного совета по стандартизации, метрологии и сертификации в каталоге «Межгосударственные стандарты»

© Стандартинформ, оформление, 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

Разъедание кожи согласно определению, приведенному в Согласованной на Глобальном уровне системе классификации и маркировки химической продукции Организации Объединенных Наций (СГС ООН) [1], представляет собой необратимое повреждение кожи, которое проявляется видимым некрозом эпидермиса и дермы, после нанесения на кожу исследуемой химической продукции. Обновленная редакция Руководства по проведению испытаний № 431 (OECD 431), на основе которого подготовлен настоящий стандарт, устанавливает метод *in vitro*, позволяющий идентифицировать вещества и смеси, вызывающие или не вызывающие разъедание кожи, как это предусмотрено требованиями СГС ООН [1]. Данное Руководство обеспечивает возможность классификации продукции, обладающей разъедающим действием, на соответствующие подклассы опасности.

Оценка способности химической продукции вызывать разъедание кожи обычно предполагает использование лабораторных животных (Руководство OECD по проведению испытаний № 404 (OECD 404); впервые принято в 1981 г., пересмотрено в 1992, 2002 и 2015 гг.) [2]. В дополнение к методу OECD 431 валидированы и приняты также два других метода испытаний *in vitro* для определения разъедающего действия химической продукции, приведенных в OECD 430 [3] и OECD 435 [4] соответственно. Кроме того, OECD 439 [5] включает метод испытаний *in vitro* для определения способности химической продукции вызывать раздражение кожи. Специальный документ по интегрированным подходам к испытаниям и оценке (Integrated Approaches to Testing and Assessment — IATA), распространяющийся на оценку раздражающего и разъедающего действия на кожу, включает в себя несколько модулей, в пределах которых сгруппированы применяемые источники информации и методы исследований, и содержит необходимые указания, касающиеся: (i) обобщения и использования имеющихся данных, полученных в ходе испытаний или иным путем для оценки способности химической продукции вызывать раздражение и разъедание кожи, а также (ii) выбора оптимального подхода при возникновении потребности в дополнительных испытаниях [6].

Документ OECD 431 был впервые принят в 2004 г., а затем дважды подвергался изменениям: в 2013 г., когда в него были включены дополнительные методы испытаний на реконструированном человеческом эпидермисе (RhE) с возможностью применения таких методов для классификации разъедающей химической продукции с разделением на подклассы опасности, и в 2015 г., когда он был приведен в соответствие с положениями руководящего документа IATA и дополнен описанием альтернативного метода измерений жизнеспособности клетки.

В OECD 431 приведены четыре валидированных метода испытаний, каждый из которых основан на использовании серийно выпускаемых образцов RhE. Исследования на этапе предварительной валидации [7], а также последующие валидационные исследования [8]—[10] были проведены в отношении следующих двух методов, представленных на рынке [11], [12]. EpiSkin™ Standard Model (SM) и EpiDerm™ Skin Corrosivity Test (SCT) (EPI-200) (валидированные референтные методы (ВРМ)). По итогам исследований были подготовлены рекомендации, в соответствии с которыми применение упомянутых выше ВРМ в сфере государственного регулирования допускается для различения разъедающих (Р) и неразъедающих (НР) веществ, а EpiSkin™ также может использоваться для определения принадлежности разъедающих веществ к установленным для них подклассам опасности [13]—[15]. Как было определено в ходе валидации на основе принятых стандартов эффективности, два других доступных на рынке метода испытаний на разъедание кожи *in vitro* с использованием модели RhE обеспечивают получение результатов, которые аналогичны получаемым при помощи ВРМ EpiDerm™ [16]—[18]. Данные методы, SkinEthic™ RHE[1)]) и epiCS® (ранее известный как EST-1000), также могут применяться в сфере государственного регулирования для различения разъедающих и неразъедающих веществ [19], [20]. Исследования, проведенные после валидации изготовителями моделей RhE в период с 2012 по 2014 гг. с использованием доработанного протокола для учета мешающих воздействий, возникающих при неспецифическом восстановлении МТТ исследуемой химической продукцией, позволили не только повысить результативность различения Р/НР-веществ, но и оптимизировать процесс определения их принадлежности к установленным подклассам опасности [21], [22]. Последующий статистический анализ данных, полученных для EpiDerm™ SCT, SkinEthic™ RHE и EpiCS® после валидации, был направ-

---

[1)] Сокращение RhE (Reconstructed human Epidermis — реконструированный человеческий эпидермис) применяется для обозначения всех моделей, реализуемых на основе технологий RhE. Сокращение RHE в обозначении модели SkinEthic™ имеет аналогичную расшифровку, однако как часть торгового наименования для соответствующего метода испытаний оно записывается целиком заглавными буквами.

лен на выявление альтернативных моделей прогнозирования, повышающих вероятность построения достоверных прогнозов в части разделения продукции на подклассы опасности [23].

До начала применения в сфере государственного регулирования какого-либо предлагаемого подобного или модифицированного метода испытаний на разъедание кожи *in vitro* на модели RhE, отличного от ВРМ, необходимо убедиться, что его надежность, релевантность (точность), а также ограничения, которые касаются условий его предполагаемого применения, сопоставимы с аналогичными показателями ВРМ, исходя из требований стандартов эффективности (СЭ) [24], разработанных с учетом принципов Руководящего документа № 34 [25]. Присоединение к системе взаимного признания данных гарантируется только при условии, что предлагаемый новый или усовершенствованный метод испытаний, отвечающий требованиям СЭ, успешно прошел рассмотрение и его описание было включено в OECD 431. Методы, включенные в OECD 431, 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.

М Е Ж Г О С У Д А Р С Т В Е Н Н Ы Й С Т А Н Д А Р Т

Методы испытаний по воздействию химической продукции на организм человека

РАЗЪЕДАНИЕ КОЖИ IN VITRO

Методы с использованием реконструированного человеческого эпидермиса

Methods for studying the effects of chemicals on the human body. In vitro skin damage. Reconstructed human epidermis methods

Дата введения — 2021—07—01

1 Область применения

Настоящий стандарт распространяется на проведение испытаний, позволяющих выявить химическую продукцию, обладающую разъедающим действием на кожу. При испытаниях предусматривается использование так называемого реконструированного человеческого эпидермиса (Reconstructed human Epidermis (RhE)) (получаемого из нетрансформированных эпидермальных кератиноцитов человека), достоверно имитирующего гистологические, морфологические, биохимические и физиологические характеристики верхних слоев человеческой кожи, т. е. собственно эпидермиса.

2 Термины, определения и сокращения

В настоящем стандарте применены следующие термины и сокращения 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 IC_{50}).

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

2.6 **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}.

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

Издание официальное

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

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

2.10 **контрольная проба НСО$_{\text{нежизнеспособных}}$** (NSC$_{\text{killed}}$ control): Контрольная проба для оценки неспецифического окрашивания в нежизнеспособных тканях.

2.11 **контрольная проба НСО$_{\text{жизнеспособных}}$** (NSC$_{\text{living}}$control): Контрольная проба для оценки неспецифического окрашивания в жизнеспособных тканях.

2.12 **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.

2.13 **МТТ** (MTT): 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия бромид; тиазолил синий тетразолия бромид.

2.14 **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 [25].

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

2.16 **НР** (NC — non corrosive): Неразъедающая.

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

2.18 **ОП** (OD — optical density): Оптическая плотность.

2.19 **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.

2.20 **разъедание кожи *in vivo*** (skin corrosion *in vivo*): Возникновение необратимого повреждения кожи, которое проявляется видимым некрозом эпидермиса и дермы, возникающее после нанесения исследуемой химической продукции на срок до 4 ч. Разъедающее действие классифицируется по наличию язв, кровотечений, кровавых струпьев, а через 14 сут — по изменению оттенка кожи, вызванному ее обесцвечиванием, появлению участков выпадения волос (алопеции) и шрамов. В сомнительных случаях должно проводиться гистопатологическое исследование пораженных участков.

2.21 **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 [25].

2.22 **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].

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

2.24 **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 по-

ложительный или отрицательный результат. Согласованность в значительной степени зависит от преобладания среди исследуемой химической продукции таких видов продукции, которая при испытании дает положительный результат.

2.25 **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 [25].

2.26 **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 [25].

2.27 **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 [25].

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

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

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

2.31 **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 [25].

3 Исходные положения

3.1 Настоящий стандарт обеспечивает идентификацию разъедающих и не разъедающих кожу веществ и смесей в соответствии с положениями СГС ООН [1]. Кроме того, настоящий стандарт может применяться для определения принадлежности разъедающих веществ и смесей к подклассу опасности 1А в соответствии с положениями СГС ООН [1] либо к комбинации подклассов 1В и 1С [21]—[23]. Ограничения применения настоящего стандарта заключаются в том, что он не позволяет четко дифференцировать химическую продукцию подклассов опасности 1В и 1С в соответствии с СГС ООН [1] по причине недостаточного количества известных, хорошо изученных разъедающих веществ *in vivo*, относящихся к подклассу опасности 1С. Методы испытаний EpiSkin™, EpiDerm™ SCT, SkinEthic™ RHE и epiCS® позволяют проводить классификацию, при которой разделяется химическая продукция подклассов опасности 1А и 1В, а также подкласса опасности 1С и НР.

3.2 В процессе валидации методов испытаний, включенных в настоящий стандарт, для идентификации разъедающей кожу продукции было исследовано большое количество химической продукции, являющейся в основном веществами; всего эмпирическая база данных для валидации насчитывала 60 химических веществ, соответствующих широкому спектру классов химических соединений [8]—[10]. Испытания с целью подтверждения необходимых чувствительности, специфичности, точности и внутрилабораторной воспроизводимости каждого метода для классификации веществ с разделением на подклассы опасности проводились непосредственно его разработчиками, а результаты проведенных испытаний оценивались специалистами ОЭСР [21]—[23]. Насколько позволяет судить объем собранных данных, методы настоящего стандарта могут применяться для исследования химической продукции, являющейся представителем широкого спектра классов и агрегатных состояний, включая жидкую, твердую и воскообразную. Жидкая продукция может иметь водную или неводную основу; твердая продукция может быть растворимой или нерастворимой в воде. По возможности твердая химическая

продукция перед исследованием должна быть измельчена до тонкого порошкообразного состояния; никакой другой предварительной обработки пробы не требуется. При наличии свидетельств, подтверждающих непригодность методов испытаний, установленных в настоящем стандарте, для конкретного вида химической продукции, эти методы не должны применяться при исследованиях данной химической продукции. Кроме того, допускается методы испытаний настоящего стандарта в случае их пригодности для исследований отдельных химических веществ применять для исследований смесей таких веществ. 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 [26]), настоящий стандарт не должен применяться для исследований данных смесей. Перед применением настоящего стандарта для смесей веществ с целью получения информации, применяемой в сфере государственного регулирования, следует изучить вопрос, может ли (а 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. Оценка воздействия газов и аэрозолей не проводилась в рамках валидационных исследований [8]—[10]. Это означает, что, невзирая на теоретическую осуществимость испытаний газов и аэрозолей с применением технологий RhE, настоящим стандартом такая возможность не предусмотрена.

3.3 Исследуемая химическая продукция, которая поглощает свет в том же спектральном диапазоне, что и МТТ-формазан, а также исследуемая продукция, которая способна непосредственно восстанавливать витальный краситель МТТ (МТТ-формазан), может препятствовать правильному определению жизнеспособности тканей и требует дополнительного использования контрольных проб для внесения соответствующих поправок в результаты. Вид контрольных проб может варьироваться в зависимости от характера мешающих воздействий, создаваемых исследуемой химической продукцией, и от применяемой методики измерений количества МТТ-формазана (подробнее см. в 7.4.2—7.4.8).

3.4 Поскольку настоящий стандарт не содержит необходимой информации по определению раздражающего действия на кожу, на исследования такого воздействия *in vitro* с точки зрения его влияния на здоровье человека распространяется руководство OECD 439, которое предусматривает использование той же испытательной системы RhE, но с другим протоколом [5]. Полная информация по оценке местного влияния химических веществ на кожу при их однократном воздействии представлена в Руководящем документе по интегрированным подходам к испытаниям и оценке (IATA) № 203 [6]. В соответствии с указанным документом IATA испытания *in vitro* на разъедание (как установлено в настоящем стандарте) и на раздражение кожи проводятся до испытаний на живых животных. Отмечается также, что при использовании человеческой кожи следует руководствоваться требованиями национальных и международных этических норм и стандартов.

4 Сущность метода испытаний

4.1 Исследуемая химическая продукция наносится местно на трехмерную модель реконструированного человеческого эпидермиса (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 (*stratum corneum*) с межклеточными ламеллярными липидными слоями, представляющими основные классы липидов, аналогичные тем, которые можно встретить *in vivo*.

4.2 Для целей испытаний с использованием модели RhE предполагается, что разъедающая кожу химическая продукция может проникать в роговой слой путем диффузии или эрозии, оказывая цитотоксическое действие на нижележащие слои клеток. Жизнеспособность клеток определяется на основе ферментативного преобразования витального красителя МТТ (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия бромид; тиазолиловый синий тетразолия бромид; CAS 298-93-1) в синеокрашенную соль формазана, количество которой измеряется после ее экстрагирования из тканей [27]. Разъедающая кожу химическая продукция выявляется по ее способности снижать жизнеспособность клеток ниже установленных пороговых значений (см. пункты 7.6.3, 7.6.4). Применение методов испытаний на разъедание кожи с использованием модели RhE подтвердило возможность прогнозировать с их помощью разъедающее действие на кожу, наблюдаемое при проведении экспериментов *in vivo* на кроликах в соответствии с OECD 404 [2].

5 Подтверждение квалификации

5.1 До того как приступить к регулярному применению какого-либо из четырех методов испытаний с использованием модели RhE, лаборатории должны подтвердить свою техническую компетентность, правильно классифицировав двенадцать специально отобранных веществ, перечисленных в таблице 1. Если применяемый метод используется для классификации на подклассы опасности, также должен быть правильно присвоен подкласс опасности. В случае если лаборатория не располагает каким-либо веществом, указанным в перечне, или когда это может быть оправдано, допускается использовать другое вещество, для которого имеются соответствующие справочные данные по испытаниям *in vivo* и *in vitro* (например, взятое из перечня стандартной химической продукции [24]), при условии, что к его выбору применяются те же самые критерии, что и в таблице 1.

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

Вещество	Регистрационный номер CAS	Класс химических соединений [2)]	Класс опасности согласно СГС ООН по результатам испытаний *in vivo* [3)]	Класс опасности согласно ВРМ по результатам испытаний *in vitro* [4)]	Восстановление МТТ [5)]	Агрегатное состояние
Разъедающие вещества *in vivo*. Подкласс 1А						
Бромуксусная кислота	79-08-3	Органические кислоты	1А	[3] 1А	—	Т
Дигидрат трифторида бора	13319-75-0	Неорганические кислоты	1А	[3] 1А	—	Ж
Фенол	108-95-2	Фенолы	1А	[3] 1А	—	Т
Дихлорацетилхлорид	79-36-7	Электрофилы	1А	[3] 1А	—	Ж
Разъедающие вещества *in vivo*. Комбинация подклассов 1В и 1С						
Глиоксиловая кислота моногидрат	563-96-2	Органические кислоты	1В и 1С	[3] 1В и 1С	—	Т
Молочная кислота	598-82-3	Органические кислоты	1В и 1С	[3] 1В и 1С	—	Ж
Этаноламин	141-43-5	Органические основания	1В	[3] 1В и 1С	Да	Вязкая жидкость
Соляная кислота (14,4 %)	7647-01-0	Неорганические кислоты	1В и 1С	[3] 1В и 1С	—	Ж
Не разъедающие вещества *in vivo*						
Фенилэтил-бромид	103-63-9	Электрофилы	НР	[3] НР	Да	Ж
4-амино-1,2,4-триазол	584-13-4	Органические основания	НР	[3] НР	—	Т
4-(Метилтио) бензальдегид	3446-89-7	Электрофилы	НР	[3] НР	Да	Ж
Лауриновая кислота	143-07-7	Органические кислоты	НР	[3] НР	—	Т

Сокращения: CAS — Реферативная служба по химии (Chemical Abstracts Service), СГС ООН — Согласованная на Глобальном уровне система классификации и маркировки химической продукции Организации Объединенных наций [1], ВРМ — валидированный референтный метод, НР = неразъедающее.

Окончание таблицы 1

[1] В перечень веществ, которые рекомендованы к использованию для целей проверки квалификации, упорядоченный по признаку разъедания/неразъедания, затем по подклассам повреждающей опасности и по принадлежности к тому или иному классу химических соединений, были включены вещества, которые использовались в ходе валидационных исследований, проводившихся ECVAM для EpiSkinTM и EpiDermTM [8]—[10], а также в ходе исследований на этапе поствалидации с применением данных, полученных от разработчиков EpiSkinTM [22], EpiDerm™, SkinEthic™ и epiCS®[23]. Если не указано иное, степень чистоты исследуемых веществ соответствовала предлагаемой их коммерческими поставщиками [8], [10]. Для испытаний по возможности были отобраны такие вещества, которые: (1) представляют градации разъедающего действия (т. е., например, неразъедающие вещества, вещества со слабым и с сильным разъедающим действием), для оценки или прогнозирования свойств которых адаптирован ВРМ; (2) относятся к классам химических соединений, использованных в валидационных исследованиях; (3) обладают хорошо изученной химической структурой; (4) обеспечивают получение воспроизводимых результатов при использовании ВРМ; (5) позволяют получить однозначные результаты при использовании соответствующего референтного метода испытаний *in vivo*; (6) доступны для коммерческого приобретения; (7) не требуют неоправданных затрат на их последующую утилизацию.

[2] Химический класс согласно Barratt *et al.* [8].

[3] Подклассы опасности 1А, 1В и 1С согласно СГС ООН соответствуют группам I, II и III по классификации ООН соответственно.

[4] Приведенные в таблице прогнозные заключения *in vitro* были получены с применением методов EpiSkin™ и EpiDerm™ (ВРМ) в ходе дальнейших испытаний на этапе поствалидации, проводившихся разработчиками этих методов.

[5] Данные по жизнеспособности по результатам исследований, проведенных ECVAM с целью валидации методов по оценке разъедающего действия на кожу, приведены без учета поправок на непосредственное восстановление МТТ исследуемыми веществами (контрольные пробы с нежизнеспособными клетками в ходе этих исследований не использовались). Напротив, включенные в таблицу данные последующей валидации, представленные разработчиками соответствующих методов, были получены с использованием таких контрольных проб [23].

5.2 Рекомендуется, чтобы в рамках подтверждения квалификации пользователь самостоятельно проверял 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 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.

6 Описание метода испытаний

В настоящем стандарте приведено общее описание параметров и процедур методов испытаний для оценки разъедающего действия на кожу с использованием модели RhE. Модели RhE, использование которых было признано научно обоснованным, а именно EpiSkin™ (SM), EpiDerm™ (EPI-200), SkinEthic™ RHE и epiCS® [16], [17], [19], [28]—[33], могут быть приобретены у коммерческих поставщиков. Разработаны стандартные операционные процедуры (СОП) для всех методов испытаний с использованием перечисленных моделей [34]—[37]; основные параметры методов испытаний обобщены в приложении А. Этими СОП следует руководствоваться при внедрении и применении любого из методов в условиях лаборатории. Испытания с применением четырех методов испытаний на основе моделей RhE, описанных в настоящем стандарте, должны соответствовать приведенным ниже требованиям.

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)* должно быть расположено несколько слоев жизнеспособных эпителиальных клеток (базальный, шиповатый (*stratum spinosum)* и зернистый (*stratum granulosum)* слои). Роговой слой должен состоять из нескольких слоев с соответствующим липидным профилем для создания функционального барьера, достаточно устойчивого для быстрого про-

никновения стандартных цитотоксических химических веществ, например таких, как додецилсульфат натрия (ДСН) или Тритон Х-100. Должна быть подтверждена эффективность барьера, обеспечиваемого используемой моделью, оценка которой выполняется либо путем определения концентрации стандартной химической продукции, при которой снижается жизнеспособность ткани 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 (см. 7.2.2.1). Защитные 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 тканей проводится по результатам применения МТТ-теста [27]. Жизнеспособные клетки модели ткани RhE превращают витальный краситель МТТ в сине-окрашенный МТТ-формазан, который затем экстрагируется из этой ткани при помощи изопропанола (или аналогичного растворителя). Оптическая плотность растворителя-экстрагента должна быть достаточно низкой: ОП < 0,1. Количество экстрагированного МТТ-формазана может определяться путем стандартных измерений ОП или посредством ВЭЖХ/УВЭЖХ-спектрофотометрии [38]. 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 должен устанавливаться разработчиком/поставщиком модели RhE. Соответствующие диапазоны приемлемости значений ОП отрицательных контрольных проб для четырех валидированных методов испытаний с использованием моделей 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 результаты измерений ОП).

Таблица 2 — Диапазоны приемлемости значений ОП отрицательных контрольных проб, применяемых для контроля качества партии

	Нижний предел приемлемости	Верхний предел приемлемости
EpiSkin™ (SM)	≥0,6	≤1,5
EpiDerm™ SCT (EPI-200)	≥0,8	≤2,8
SkinEthic™ RHE	≥0,8	≤3,0
epiCS®	≥0,8	≤2,8

7.2.2 Барьерные функции

Роговой слой и его липидные составляющие должны обладать достаточной устойчивостью к быстрому проникновению определенных стандартных цитотоксических химических веществ (например, таких как ДСН или Тритон Х-100) в соответствии с установленными значениями IC_{50} или ET_{50} (см. таблицу 3).Эффективность барьерных функций каждой партии используемой модели RhE должна быть подтверждена разработчиком/поставщиком модели RhE после доставки тканей конечному пользователю (см. 7.2.5).

7.2.3 Морфология

Гистологическое исследование модели RhE проводится с целью подтверждения наличия у нее многослойной структуры, подобной структуре человеческого эпидермиса и включающей в себя базальный (*stratum basale*), шиповатый (*stratum spinosum*), зернистый (*stratum granulosum*) и роговой (*stratum corneum*) слои, а кроме того, обладающей липидным составом, аналогичным липидному составу человеческого эпидермиса. Проведение гистологического исследования каждой партии используемой модели RhE, подтверждающего соответствие предъявляемым требованиям морфологии тканей, должно обеспечиваться разработчиком/поставщиком модели RhE после доставки тканей конечному пользователю (см. 7.2.5).

7.2.4 Воспроизводимость

Воспроизводимость методов испытаний должна периодически контролироваться пользователями с использованием положительных и отрицательных контрольных проб. Кроме того, каждый метод испытаний должен применяться только при условии предоставления разработчиком/поставщиком соответствующей модели RhE данных, подтверждающих долговременную воспроизводимость результатов при исследованиях разъедающих и неразъедающих химических веществ, например веществ, включенных в перечень для проведения проверки квалификации (см. таблицу 1). При использовании метода испытаний для классификации на подклассы опасности воспроизводимость результатов испытаний по отнесению исследуемых веществ к подклассам опасности также должна быть подтверждена.

7.2.5 Контроль качества (КК)

Модель RhE должна использоваться только при условии подтверждения разработчиком/поставщиком соответствия каждой партии предлагаемой к использованию модели RhE критериям приемки, в первую очередь требованиям, предъявляемым к жизнеспособности (см. 7.2.1), барьерным функциям (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. Только результаты испытаний, полученные при использовании партий тканей с приемлемым контролем качества, могут допускаться для классификации по разъедающему действию. Диапазон приемлемости (верхний и нижний пределы) значений IC_{50} или ET_{50} определяется разработчиком/поставщиком модели RhE. Диапазоны приемлемости для четырех валидированных методов испытаний приведены в таблице 3.

Таблица 3 — Контроль качества. Критерии приемки партий

	Нижний допустимый предел	Верхний допустимый предел
EpiSkin™ (SM) (обработка ДСН в течение 18 ч) [33]	IC_{50} = 1,0 мг/см^3	IC_{50} = 3,0 мг/см^3
EpiDerm™ SCT (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
epiCS®(1 % Тритон X-100) [36]	ET_{50} = 2,0 ч	ET_{50} = 7,0 ч

7.3 Нанесение исследуемой химической продукции и контрольных химических веществ

7.3.1 Не менее двух параллельно испытываемых образцов кожи должно использоваться для каждой химической продукции и каждой контрольной пробы для каждого времени воздействия. Количество наносимой на ткани жидкой или твердой химической продукции должно быть таким, чтобы оно обеспечивало их равномерное распределение по поверхности эпидермиса, не будучи при этом избыточной дозой, т. е. по меньшей мере 70 мм^3/см^2 либо 30 мг/см^2. В зависимости от применяемых методов перед нанесением твердой химической продукции может потребоваться увлажнение поверхности эпидермиса деионизированной или дистиллированной водой для улучшения контакта между кожей и исследуемой химической продукцией [34]—[37]. По возможности твердая продукция должна испытываться в виде тонко измельченного порошка. Способ нанесения должен быть подходящим для исследуемой химической продукции (см., например, документы по ссылкам [34]—[37]). По окончании заданного периода воздействия исследуемая химическая продукция должна быть тщательно смыта с поверхности *эпидермиса* водным буферным раствором или 0,9 %-ным раствором NaCl. В зависимости от того, какой из четырех валидированных методов испытаний с использованием модели RhE был выбран, применяют два или три периода воздействия для каждой исследуемой химической продукции (для всех четырех валидированных моделей RhE: 3 мин и 1 ч соответственно; для EpiSkin™ предусмотрен также дополнительный период воздействия продолжительностью 4 ч). В зависимости от применяемого метода испытаний с использованием модели RhE и заданного периода воздействия значение температуры в течение периода воздействия может варьироваться от комнатной до 37 °С.

7.3.2 Отрицательные и положительные (ПК) контрольные пробы должны использоваться параллельно в каждой серии испытаний для подтверждения того, что жизнеспособность (по данным, полученным при помощи отрицательных контрольных проб), 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 зависимости от используемой модели RhE в качестве ПК рекомендуется использовать ледяную уксусную кислоту или 8н раствор КОН. Следует учитывать, что 8н раствор КОН обладает способностью непо-

средственно восстанавливать МТТ, что может потребовать использования дополнительных контрольных проб, как указано в 7.4.2 и 7.4.3. В качестве рекомендованных отрицательных контрольных проб могут использоваться 0,9 %-ный (масса/объем) раствор NaCl или вода.

7.4 Определение жизнеспособности клеток

7.4.1 Согласно настоящему стандарту для определения жизнеспособности клеток должен применяться метод с использованием МТТ, являющийся количественным методом [27]. Образец ткани помещают в раствор МТТ соответствующей концентрации (0,3 или 1 мг/см^3) на 3 ч. 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. 7.4.7 и 7.4.8) [38].

7.4.2 Исследуемая химическая продукция может оказывать мешающее воздействие на выполнение метода с использованием МТТ за счет непосредственного восстановления МТТ в синий формазан и/или за счет цветовых помех, если исследуемая химическая продукция абсорбирует МТТ самопроизвольно или вследствие обработки в том же диапазоне ОП, что и у формазана, — (570 ± 30) нм, как правило, это характерно для сине- и пурпурноокрашенной химической продукции. Для выявления потенциальных мешающих воздействий, вызываемых исследуемой химической продукцией, таких как неспецифическое восстановление МТТ и неспецифическое окрашивание, и внесения соответствующих поправок используются дополнительные контрольные пробы — НСМТТ и НСО соответственно (см. 7.4.3—7.4.7). Это особенно важно в тех случаях, когда исследуемую химическую продукцию не удается полностью удалить с поверхности ткани при промывании или когда она проникает в толщу эпидермиса и, таким образом, присутствует в тканях во время проведения испытаний на жизнеспособность с использованием МТТ. Подробное описание порядка внесения поправок на непосредственное восстановление МТТ и цветовые помехи, создаваемые вызывающими окрашивание реагентами, содержится в СОП для соответствующих методов испытаний [34]—[37].

7.4.3 Для выявления химической продукции, непосредственно восстанавливающей МТТ, каждая исследуемая химическая продукция должна быть добавлена в свежеприготовленную среду, содержащую МТТ [34]—[37]. Если после смешивания среда приобретает синюю/пурпурную окраску, исследуемую химическую продукцию признают способной непосредственно восстанавливать МТТ и переходят к следующей функциональной проверке, которая проводится на нежизнеспособном эпидермисе, независимо от того, планируется ли оценивать количество 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 точно так же, как и жизнеспособные ткани. Каждую химическую продукцию, способную восстанавливать МТТ, параллельно наносят не менее чем на два образца нежизнеспособной ткани для каждого заданного периода воздействия, которые подвергают полному испытанию на разъедание кожи. Фактическая жизнеспособность ткани определяется как отношение разности жизнеспособности тканей (в процентах), полученной на жизнеспособных тканях, подвергнутых воздействию продукции, способной восстанавливать МТТ, и показателя неспецифического восстановления МТТ (в процентах), полученного на нежизнеспособных тканях, которые подвергнуты воздействию той же продукции, к результату испытаний отрицательной контрольной пробы, проводившихся в серии испытаний параллельно с испытаниями, результаты которых предполагается скорректировать (%НСМТТ).

7.4.4 Для выявления потенциальных мешающих воздействий, создаваемых окрашенной исследуемой химической продукцией или исследуемой химической продукцией, которая приобретает окраску при контакте с водой или изопропанолом, и принятия решения о необходимости в этой связи дополнительных контрольных проб проводят спектральный анализ данной продукции в воде (среде, в которой происходит воздействие на кожу) и в изопропаноле (экстрагирующем растворителе). Если исследуемая химическая продукция в смеси с водой и/или изопропанолом поглощает свет в диапазоне (570 ± 30) нм, проводят контроль окрашивания или в качестве альтернативы применяют метод ВЭЖХ/УВЭЖХ-спектрофотометрии — в этом случае такие испытания не требуются (см. 7.4.7, 7.4.8). При стандартных измерениях ОП каждая создающая мешающее воздействие окрашенная исследуемая химическая продукция параллельно наносится не менее чем на два образца жизнеспособной ткани для каждого заданного периода воздействия, на которых полностью воспроизводят испытания на разъедание кожи,

с тем исключением, что для их обработки используют среду, не содержащую МТТ, обеспечивая таким образом контроль неспецифического окрашивания пробы ($НСО_{жизнеспособных}$). Контрольная проба $НСО_{жизнеспособных}$ должна испытываться одновременно для каждого заданного периода воздействия параллельно с каждой окрашенной исследуемой химической продукцией (в каждой серии испытаний), что обусловлено необходимостью учитывать вариабельность 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, выдерживались в растворе МТТ, и показателя неспецифического окрашивания (в процентах), полученного на жизнеспособных тканях, которые подвергались воздействию мешающей химической продукции, но выдерживались в среде, не содержащей МТТ, в серии испытаний параллельно с испытаниями, результаты которых предполагается скорректировать ($\%НСО_{жизнеспособных}$).

7.4.5 Исследуемая химическая продукция, которая идентифицирована как непосредственно восстанавливающая МТТ (см. 7.4.3) и одновременно мешающая определению жизнеспособности по причине окрашивания (см. 7.4.4), при стандартных измерениях ОП требует в дополнение к контролю НСМТТ и проб $НСО_{жизнеспособных}$, рассмотренным выше, проведения контрольных испытаний третьего вида. Такая необходимость обычно возникает в случае с темноокрашенной исследуемой химической продукцией, затрудняющей применение метода с МТТ (например, сине-, пурпурно- и черноокрашенной), поскольку свойственная ей окраска препятствует оценке способности восстанавливать МТТ, как указано в 7.4.3. 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 цветовые помехи, обусловленные соединением окрашенной продукции с нежизнеспособными клетками. Это может привести к двойной поправке, вносимой в результаты исследований для учета неспецифического окрашивания, поскольку испытания контрольной пробы $НСО_{жизнеспособных}$ уже корректируют мешающее воздействие окрашивания при соединении исследуемой химической продукции с жизнеспособными клетками. Для исключения вероятного двойного применения поправки должна применяться третья разновидность контрольных проб на неспецифическое окрашивание нежизнеспособных тканей ($НСО_{нежизнеспособных}$). В соответствии с этой дополнительной процедурой контроля исследуемая химическая продукция наносится не менее чем на два образца нежизнеспособной ткани для каждого заданного периода воздействия, которые подвергают полной процедуре испытаний, с тем исключением, что на этапе их обработки используется среда, не содержащая МТТ. Для каждой исследуемой химической продукции достаточно только одной контрольной пробы $НСО_{нежизнеспособных}$, вне зависимости от количества независимых испытаний/серий, однако ее испытания должны проводиться параллельно с контролем 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, которые подвергались воздействию создающей помехи продукции (в процентах), но выдерживались в среде, не содержащей МТТ, к результату испытаний отрицательной контрольной пробы, проводившихся в серии испытаний параллельно с испытаниями, результаты которых предполагается скорректировать ($\%НСО_{жизнеспособных}$).

7.4.6 Важно иметь в виду, что мешающие воздействия, обусловленные неспецифическим восстановлением МТТ и цветовыми помехами, могут приводить к завышенным показаниям спектрофотометрического оборудования при анализе вытяжки 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. В частности, 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 из тканей для та-

кой исследуемой химической продукции без внесения поправок на непосредственное восстановление МТТ и/или цветовые помехи не выходят за пределы линейного диапазона спектрофотометра либо если нескорректированная жизнеспособность (в процентах), полученная для данной химической продукции, уже позволяет рассматривать ее как разъедающую (см. 7.6.3 и 7.6.4). Вместе с тем, если результаты %НСМТТ и/или $\%НСО_{жизнеспособных}$, полученные для исследуемой химической продукции, ≥50 % результата для отрицательной контрольной пробы, они должны использоваться с осторожностью.

7.4.7 При исследованиях темноокрашенной химической продукции, стандартные измерения ОП которой не могут быть выполнены по причине определенных мешающих воздействий при применении метода МТТ, количество МТТ-формазана может определяться альтернативным методом ВЭЖХ/УВЭЖХ-спектрофотометрии (см. 7.4.7) [37]. Метод ВЭЖХ/УВЭЖХ-спектрофотометрии обеспечивает возможность разделения МТТ-формазана и исследуемой химической продукции до начала количественного определения [38]. Это означает, что в случае применения ВЭЖХ-УВЭЖХ-спектрофотометрии необходимость в использовании контрольных проб $НСО_{жизнеспособных}$ или $НСО_{нежизнеспособных}$ отсутствует, независимо от того, какая именно химическая продукция исследуется. Тем не менее контроль НСМТТ следует использовать, 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 7.4.3). 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 для 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) ткани, полученной на жизнеспособных тканях, которые подвергались воздействию исследуемой химической продукции, и значения %НСМТТ. Следует также иметь в виду, что, если химическая продукция, которая способна непосредственно восстанавливать МТТ и одновременно 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) для экстрактов исследуемых тканей выходит за пределы линейного диапазона используемого спектрофотометра, подготовить достоверную оценку их разъедающей способности не представляется возможным, хотя вероятность наличия подобной химической продукции чрезвычайно мала.

7.4.8 Метод ВЭЖХ/УВЭЖХ-спектрофотометрии может использоваться для измерений количества формазана при исследовании любой химической продукции (окрашенной, неокрашенной, восстаналивающей и не восстанавливающей МТТ) [38]. С учетом большого разнообразия спектрофотометрических методов на основе ВЭЖХ/УВЭЖХ, 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 (FDA) [38], [39]. Данные ключевые параметры и их критерии приемлемости приведены в приложении В. Если система метода ВЭЖХ/УВЭЖХ-спектрофотометрии обеспечивает соблюдение критериев согласно приложению В, она признается пригодной для выполнения количественных измерений МТТ-формазана в условиях проведения испытаний, предусмотренных настоящим стандартом.

7.5 Критерии приемлемости

Для каждого метода испытаний с использованием пригодных моделей RhE ткани, обработанные отрицательной контрольной пробой, должны показывать значения ОП, которые свидетельствуют об их соответствии таблице 2 и были бы не хуже установленных ранее предельных значений. Ткани, обработанные ПК, т. е. ледяной уксусной кислотой или 8 н раствором КОН, должны проявлять способность соответствующим образом реагировать на воздействие разъедающей химической продукции в условиях метода испытаний (см. приложение А). Вариабельность характеристик для образцов тканей при параллельном нанесении на них исследуемой химической продукции и/или контрольных химических веществ

не должна выходить за пределы, установленные требованиями к каждой валидированной модели RhE (см. приложение А) (так, например, расхождение показателей жизнеспособности двух образцов ткани не должно превышать 30 %). Если при испытании отрицательной контрольной пробы или ПК в рамках одной серии испытаний не обеспечивается соблюдение установленных пределов, результаты таких испытаний рассматривают как не соответствующие установленным критериям и проводят испытания повторно. Если вариабельность результатов испытаний исследуемой химической продукции выходит за пределы установленного диапазона, испытания такой продукции также должны быть проведены повторно.

7.6 Интерпретация результатов и модель построения прогнозов

7.6.1 Значения ОП, полученные для каждой исследуемой химической продукции, должны использоваться для вычисления жизнеспособности (в процентах) относительно результата, полученного для отрицательной контрольной пробы, который принимается 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) для разделения разъедающей и неразъедающей исследуемой химической продукции (или разделения ее на подклассы опасности по разъедающему действию) для каждого метода испытаний настоящего стандарта приведены в 7.6.3, 7.6.4 и должны использоваться для интерпретации получаемых результатов.

7.6.2 Одной серии испытаний, предусматривающей параллельное испытание не менее двух образцов ткани, должно быть достаточно для оценки свойств исследуемой химической продукции, если полученные при этом результаты обеспечивают ее однозначную классификацию. В случае получения сомнительных результатов, когда результаты измерений на разных образцах не обладают согласованностью, может быть принято решение о проведении второй серии испытаний, а также третьей — в случае расхождения результатов в первой и второй сериях.

7.6.3 Система оценки вероятности проявления разъедающего действия на кожу для метода испытаний с использованием EpiSkin™ [9], [34], [22], соответствующая системе классификации СГС ООН [1], приведена в таблице 4.

Таблица 4 — Система оценки для EpiSkin™

Определенная жизнеспособность для периода воздействия (t = 3, 60 и 240 мин)	Вероятный прогноз
<35 % после воздействия в течение 3 мин	Разъедающая: По усмотрению — подкласс опасности 1А *
≥35 % после воздействия в течение 3 мин и, <35 % после воздействия в течение 60 мин или ≥35 % после воздействия в течение 60 мин, и <35 % после воздействия в течение 240 мин	Разъедающая: По усмотрению — комбинация подклассов опасности 1В и 1С
≥35 % после воздействия в течение 240 мин	Неразъедающая
* Данные, собранные при анализе применимости методов испытаний с использованием модели RhE для разделения на подклассы опасности, свидетельствуют о том, что приблизительно 22 % результатов, полученных с применением метода испытаний EpiSkin™ и указывающих на подкласс опасности 1А, в действительности соответствуют веществам/смесям, принадлежащим к подклассам опасности 1В или 1С (т. е. имеет место завышение оценки) (см. приложение Б).	

7.6.4 Система оценки вероятности проявления разъедающего действия на кожу для метода испытаний с использованием EpiDerm™ SCT [10] [23] [35], SkinEthic™ RHE [17] [18] [23] [36], а также epiCS® [16] [23] [37], соответствующая системе классификации СГС ООН [1], приведена в таблице 5.

Таблица 5 — Система оценки для EpiDermTM SCT, SkinEthicTM RHE и epiCS®

Определенная жизнеспособность для периода воздействия (t = 3, 60 мин)	Вероятный прогноз
Шаг 1 для EpiDerm™ SCT, SkinEthic™ RHE и epiCS®	
<50 % после воздействия в течение 3 мин	Разъедающая
≥50 % после воздействия в течение 3 мин и <15 % после воздействия в течение 60 мин	Разъедающая
≥50 % после воздействия в течение 3 мин и ≥15 % после воздействия в течение 60 мин	Неразъедающая
Шаг 2 для EpiDerm™ SCT — для веществ/смесей, классифицированных как разъедающие согласно шагу 1	
<25 % после воздействия в течение 3 мин	По усмотрению — подкласс опасности 1А *
≥25 % после воздействия в течение 3 мин	По усмотрению — комбинация подклассов опасности 1В и 1С
Шаг 2 для SkinEthic™ RHE — для веществ/смесей, классифицированных как разъедающие согласно шагу 1	
<18 % после воздействия в течение 3 мин	По усмотрению — подкласс опасности 1А *
≥18 % после воздействия в течение 3 мин	По усмотрению — комбинация подклассов опасности 1В и 1С
Шаг 2 для epiCS® — для веществ/смесей, классифицированных как разъедающие согласно шагу 1	
<15 % после воздействия в течение 3 мин	По усмотрению — подкласс опасности 1А *
≥15 % после воздействия в течение 3 мин	По усмотрению — комбинация подклассов опасности 1В и 1С
* Данные, собранные при анализе применимости методов испытаний с использованием модели RhE для разделения на подклассы опасности, свидетельствуют о том, что приблизительно 29 %, 31 % и 33 % результатов, полученных с применением методов испытаний EpiDerm™ SCT, SkinEthic™ RHE and epiCS® соответственно и указывающих на подкласс 1А, в действительности относятся к веществам/смесям, принадлежащим к подклассу опасности 1В или 1С (т. е. имеет место завышение оценки) (см. приложение Б).	

8 Данные и отчеты об испытаниях

8.1 Данные

Для каждого испытания информация для отдельных образцов ткани (например, значения ОП и вычисленные значения жизнеспособности (в процентах) после воздействия каждой исследуемой химической продукции, а также результаты ее классификации) должна быть представлена в табличной форме с включенными в нее при необходимости данными, собранными при проведении повторных экспериментов. Помимо этого указывают средние арифметические значения и диапазоны жизнеспособности, а также коэффициенты вариации для параллельно обрабатываемых образцов ткани в каждом испытании. О наблюдаемых взаимодействиях с реактивом МТТ в результате способности непосредственно восстанавливать МТТ или окраске исследуемой химической продукции должно быть указано для каждой исследуемой продукции.

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

- физические свойства, растворимость в воде, а также любые другие значимые физико-химические показатели;

- 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 с соответствующим обоснованием (при наличии).

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 параметров системы ВЭЖХ/УВЭЖХ-спектрофотометра, если такая система используется;

- полный объем сопроводительной информации о конкретной используемой модели RhE, включая сведения о ее функциональных характеристиках. Данная информация включает следующие (но не ограничивается) данные:

1) жизнеспособность;

2) барьерные функции;

3) морфологию;

4) воспроизводимость и достоверность;

5) сведения о контроле качества (КК) данной модели;

- справочная информация о ранее полученных данных для модели. Данная информация должна включать (но не ограничиваться) сведения 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) периода воздействия и значение (я) температуры, при котором осуществлялось это воздействие;

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

- количество образцов ткани, параллельно используемых для испытаний каждых исследуемых химической продукции и контрольных проб (ПК, отрицательной контрольной пробы, а также НСМТТТ, $НСО_{жизнеспособных}$ и $НСО_{нежизнеспособных}$, если требуется) и для каждого заданного периода воздействия;

- описание применяемых критериев принятия решений/модели построения прогнозов в зависимости от используемой модели RhE,

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

Критерии приемлемости результатов испытания и серии:

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

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

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

Результаты:

- таблица данных для каждых исследуемых химической продукции и контрольной пробы для каждого заданного периода воздействия, каждой серии испытаний и каждого параллельно испытанного образца с указанием значений ОП или площади пика для МТТ-формазана, жизнеспособности ткани (в процентах), среднего арифметического значения жизнеспособности ткани (в процентах), расхождений результатов испытаний параллельно обрабатываемых образцов, а также стандартных отклонений и/или коэффициентов вариации, если применимо;

- в случае необходимости также результаты испытаний контрольных проб, используемых для исследования химической продукции, способной непосредственно восстанавливать МТТ, и/или окрашенной продукции, включая данные по ОП или площади пика МТТ-формазана, %НСМТТ, $\%НСО_{жизнеспособных}$, $\%НСО_{нежизнеспособных}$, расхождения результатов испытаний параллельно обрабатываемых образцов ткани, стандартные отклонения и/или коэффициенты вариации (если приемлемо) 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;

- описание прочих явлений, наблюдавшихся в ходе испытаний;

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

Анализ результатов

Выводы

Приложение А
(обязательное)

Основные параметры методов испытаний на разъедание кожи с использованием модели RhE

Параметры метода испытаний	EpiSkin™	EpiDerm™ SCT	SkinEthic™ RHE	epiCS®
Площадь поверхности модели	0,38 $см^2$	0,63 $см^2$	0,5 $см^2$	0,6 $см^2$
Количество параллельно обрабатываемых образцов тканей	Не менее 2 из расчета на каждый заданный период воздействия	2—3 из расчета на каждый заданный период воздействия	Не менее 2 из расчета на каждый заданный период воздействия	Не менее 2 из расчета на каждый заданный период воздействия
Используемые дозы и применение	Жидкая и вязкая химическая продукция: (50 ± 3) $мм^3$ (131,6 $мм^3/см^2$)	Жидкая химическая продукция: 50 $мм^3$ (79,4 $мм^3/см^2$) с использованием или без нейлоновой сетки Требуется предварительная проверка совместимости исследуемой химической продукции с нейлоновой сеткой	Жидкая и вязкая химическая продукция: (40 ± 3) $мм^3$ (80 $мм^3/см^2$) с использованием нейлоновой сетки Требуется предварительная проверка совместимости исследуемой химической продукции с нейлоновой сеткой	Жидкая химическая продукция: 50 $мм^3$ (83,3 $мм^3/см^2$) с использованием нейлоновой сетки Требуется предварительная проверка совместимости исследуемой химической продукции с нейлоновой сеткой
		Полутвердая химическая продукция: 50 $мм^3$ (= 79,4 $мм^3/см^2$)		Полутвердая химическая продукция: 50 $мм^3$ (= 83,3 $мм^3/см^2$)
	Твердая химическая продукция: (20 ± 2) мг (52,6 $мг/см^2$) + + (100 ± 5) $мм^3$ раствора NaCl (9 $г/дм^3$)	Твердая химическая продукция: 25 $мм^3$ H_2O (при необходимости больше) + 25 мг (39,7 $мг/см^2$)	Твердая химическая продукция: (20 ± 2) $мм^3$ H_2O + (20 ± 3) мг (40 $мг/см^2$)	Твердая химическая продукция: 25 мг (41,7 $мг/см^2$) + 25 $мм^3$ H_2O (при необходимости больше)
	Воскообразная/клейкая химическая продукция: (50 ± 2) мг (131,6 $мг/см^2$) с использованием нейлоновой сетки	Воскообразная химическая продукция: плоские, в форме диска фрагменты диаметром приблизительно 8 мм помещают поверх образца ткани, увлажненного 15 $мм^3$ H_2O	Воскообразная/клейкая химическая продукция: (20 ± 3) мг (40 $мг/см^2$) с использованием нейлоновой сетки	Воскообразная химическая продукция: плоские, в форме диска фрагменты диаметром приблизительно 8 мм помещают поверх образца ткани, увлажненного 15 $мм^3$ H_2O

Продолжение таблицы

Параметры метода испытаний	EpiSkin™	EpiDerm™ SCT	SkinEthic™ RHE	epiCS®
Предварительная проверка на способность восстанавливать МТТ	50 мм^3 (жидкой химической продукции) или 20 мг (твердой химической продукции) + + 2 см^3 раствора МТТ концентрацией 0,3 мг/см^3 в течение (180 ± 5) мин при 37 °С, 5 % CO_2, относительной влажности 95 %, если раствор становится синим/пурпурным, следует применять контрольные пробы с нежизнеспособными клетками после воздействия воды	50 мм^3 (жидкой химической продукции) или 25 мг (твердой химической продукции) + 1 см^3 раствора МТТ концентрацией 1 мг/см^3 в течение 60 мин при 37 °С, 5 % CO_2, относительной влажности 95 %, если раствор становится синим/пурпурным, следует применять контрольные пробы с нежизнеспособными клетками после замораживания	40 мм^3 (жидкой химической продукции) или 20 мг (твердой химической продукции) + 1 см^3 раствора МТТ концентрацией 1 мг/см^3 в течение (180 ± 5) мин при 37 °С, 5 % CO_2 относительной влажности 95 %, если раствор становится синим/пурпурным, следует применять контрольные пробы с нежизнеспособными клетками после замораживания	50 мм^3 (жидкой химической продукции) или 25 мг (твердой химической продукции) + 1 см^3 раствора МТТ концентрацией 1 мг/см^3 в течение 60 мин при 37 °С, 5 % CO_2, относительной влажности 95 %, если раствор становится синим/пурпурным, следует применять контрольные пробы с нежизнеспособными клетками после замораживания
Предварительная проверка на наличие цветовых помех	10 мм^3 (жидкой химической продукции) или 10 мг (твердой химической продукции) + + 90 мм^3 H_2O перемешивают в течение 15 мин при комнатной температуре › в случае окрашивания раствора выполняют испытания на контрольных пробах с жизнеспособными клетками	50 мм^3 (жидкой химической продукции) или 25 мг (твердой химической продукции) + + 300 мм^3 H_2O в течение 60 мин при 37 °С, 5 % CO_2, относительной влажности 95 % › в случае окрашивания раствора выполняют испытания на контрольных пробах с жизнеспособными клетками	40 мм^3 (жидкой химической продукции) или 20 мг (твердой химической продукции) + 300 мм^3 H_2O перемешивают в течение 60 мин при комнатной температуре › в случае окрашивания исследуемой химической продукции выполняют испытания на контрольных пробах с жизнеспособными клетками	50 мм^3 (жидкой химической продукции) или 25 мг (твердой химической продукции) + + 300 мм^3 H_2O в течение 60 мин при 37 °С, 5 % CO_2, относительной влажности 95 % › в случае окрашивания раствора выполняют испытания на контрольных пробах с жизнеспособными клетками
Период воздействия и температура	3, (60 ± 5) и (240 ± 10) мин в вентилируемом боксе, комнатная температура (от 18 °С до 28 °С)	3 мин при комнатной температуре и 60 мин при 37 °С, 5 % CO_2, относительной влажности 95 %	3 мин при комнатной температуре и 60 мин при 37 °С, 5 % CO_2, относительной влажности 95 %	3 мин при комнатной температуре и 60 мин при 37 °С, 5 % CO_2, относительной влажности 95 %
Промывание	25 см^3 фосфатно-солевой буфер (ФБС) (1х) (2 см^3/на одно промывание)	20 раз непрерывным слабым потоком ФБС (1х)	20 раз непрерывным слабым потоком ФБС (1х)	20 раз непрерывным слабым потоком ФБС (1х)
Отрицательная контрольная проба	50 мм^3 раствора NaCl (9 г/дм^3) Подвергают испытанию в течение каждого периода воздействия	50 мм^3 H_2O Подвергают испытанию в течение каждого периода воздействия	40 мм^3 H_2O Подвергают испытанию в течение каждого периода воздействия	50 мм^3 H_2O Подвергают испытанию в течение каждого периода воздействия

Продолжение таблицы

Параметры метода испытаний	EpiSkin™	EpiDerm™ SCT	SkinEthic™ RHE	epiCS®
Положительная контрольная проба	50 мм^3 ледяной уксусной кислоты Подвергают испытанию только в течение периода воздействия 4 ч	50 мм^3 8 н раствора КОН Подвергают испытанию в течение каждого периода воздействия	40 мм^3 8 н раствора КОН Подвергают испытанию только в течение периода воздействия 1 ч	50 мм^3 8 н раствора КОН Подвергают испытанию в течение каждого периода воздействия
Раствор МТТ	2 см^3 концентрацией 0,3 мг/см^3	300 мм^3 концентрацией 1 мг/см^3	300 мм^3 концентрацией 1 мг/см^3	300 мм^3 концентрацией 1 мг/см^3
Время и температура обработки МТТ	180 мин (±15 мин) при 37 °С, 5 % CO_2, относительной влажности 95 %	180 мин при 37 °С, 5 % CO_2, относительной влажности 95 %	180 мин (±15 мин) при 37 °С, 5 % CO_2, относительной влажности 95 %	180 мин при 37 °С, 5 % CO_2, относительной влажности 95 %
Растворитель для экстракции	500 мм^3 подкисленного изопропанола (0,04 н раствор HCl в изопропаноле) (образец ткани полностью погружен)	2 см^3 изопропанола (экстрагирование из верхней и нижней частей вставки)	1,5 см^3 изопропанола (экстрагирование из верхней и нижней частей вставки)	2 см^3 изопропанола (экстрагирование из верхней и нижней частей вставки)
Время и температура экстрагирования	Оставляют на ночь при комнатной температуре в защищенном от света месте	Оставляют на ночь без встряхивания при комнатной температуре или на 120 мин со встряхиванием (~120 об/мин) при комнатной температуре	Оставляют на ночь без встряхивания при комнатной температуре или на 120 мин со встряхиванием (~120 об/мин) при комнатной температуре	Оставляют на ночь без встряхивания при комнатной температуре или на 120 мин со встряхиванием (~120 об/мин) при комнатной температуре
Определение ОП	570 нм (от 545 до 595 нм) без фильтра сравнения	570 нм (или 540 нм) без фильтра сравнения	570 нм (от 540 до 600 нм) без фильтра сравнения	От 540 до 570 нм без фильтра сравнения
Контроль качества образцов ткани	Обрабатывают ДСН концентрацией 1,0 мг/см^3 ≤ IC_{50} ≤ 3,0 мг/см^3 в течение 18 ч	Обрабатывают Тритоном X-100 концентрацией 1 % в течение 4,08 ч ≤ ET_{50} ≤ 8,7 ч	Обрабатывают Тритоном X-100 концентрацией 1 % в течение 4,0 ч ≤ ET_{50} ≤ 10,0 ч	Обрабатывают Тритоном X-100 концентрацией 1 % в течение 2,0 ч ≤ ET_{50} ≤ 7,0 ч
Критерии приемлемости	1 Среднее арифметическое значение ОП для образцов ткани, параллельно обработанных отрицательной контрольной пробой (NaCl), должно составлять ≥0,6 и ≤1,5 для каждого заданного периода воздействия.	1 Среднее арифметическое значение ОП для образцов ткани, параллельно обработанных отрицательной контрольной пробой (H_2O), должно составлять ≥0,8 и ≤2,8 для каждого заданного периода воздействия.	1 Среднее арифметическое значение ОП для образцов ткани, параллельно обработанных отрицательной контрольной пробой (H_2O), должно составлять ≥0,8 и ≤3,0 для каждого заданного периода воздействия.	1 Среднее арифметическое значение ОП для образцов ткани, параллельно обработанных отрицательной контрольной пробой (H_2O), должно составлять ≥0,8 и ≤2,8 для каждого заданного периода воздействия.

Окончание таблицы

Параметры метода испытаний	EpiSkin™	EpiDerm™ SCT	SkinEthic™ RHE	epiCS®
Критерии приемлемости	2 Среднее арифметическое значение жизнеспособности образцов ткани, параллельно подвергавшихся воздействию положительной контрольной пробы (ледяной уксусной кислоты) в течение 4 ч, в % от результата для отрицательной контрольной пробы, должно составлять ≤20 %. 3 В диапазоне жизнеспособности от 20 % до 100 % и при значениях ОП ≥ 0,3 расхождение показателей жизнеспособности двух образцов ткани не должно превышать 30 %	2 Среднее арифметическое значение жизнеспособности образцов ткани, параллельно подвергавшихся воздействию положительной контрольной пробы (8 н КОН) в течение 1 ч, в % от результата для отрицательной контрольной пробы, должно составлять <15 %. 3 В диапазоне жизнеспособности от 20 % до 100 % коэффициент вариации (КВ) параллельно обработанных образцов ткани должен составлять ≤30 %	2 Среднее арифметическое значение жизнеспособности образцов ткани, параллельно подвергавшихся воздействию положительной контрольной пробы (8 н КОН) в течение 1 ч (а также, если требуется, 4 ч), в % от результата для отрицательной контрольной пробы, должно составлять <15 %. 3 В диапазоне жизнеспособности от 20 % до 100 % и при значениях ОП ≥ 0,3 расхождение показателей жизнеспособности двух параллельно обработанных образцов ткани не должно превышать 30 %	2 Среднее арифметическое значение жизнеспособности образцов ткани, параллельно подвергавшихся воздействию положительной контрольной пробы (8 н КОН) в течение 1 ч, в % от результата для отрицательной контрольной пробы, должно составлять <20 %. 3 В диапазоне жизнеспособности от 20 % до 100 % и при значениях ОП ≥ 0,3 расхождение показателей жизнеспособности двух параллельно обработанных образцов ткани не должно превышать 30 %

Приложение Б
(справочное)

Эффективность методов испытаний для целей классификации

В таблице ниже приведена информация об эффективности применения четырех методов испытаний, которая была подготовлена по итогам испытаний химической продукции восьмидесяти наименований, проводившихся разработчиками данных методов. Вычисления выполнялись представителями Секретариата ОЭСР, после чего полученные данные были проанализированы и одобрены специализированной экспертной подгруппой [21], [23].

Методы с использованием моделей человеческой кожи EpiSkin™, EpiDerm™, SkinEthic™ и epiCS® являются пригодными для проведения классификации химической продукции на подклассы опасности (т .е. для дифференцирования IA от 1B и 1C от HP).

Сведения об эффективности, доле завышенных и заниженных оценок, а также точности (достоверности прогнозирования) четырех методов испытаний для химической продукции восьмидесяти наименований, каждая из которых испытывалась в 2—3 сериях с применением всех перечисленных методов, могут быть представлены следующим образом:

Таблица Б.1 — Информация об эффективности применения четырех методов испытаний

Статистические данные достоверности прогноза полного перечня исследованной химической продукции (каждая из *n* = 80 химической продукции была подвергнута 2 независимым сериям испытаний на модели epiCS® и 3 независимым сериям испытаний на моделях Epiderm™ SCT, EpiSkin™ и SkinEthic™ RHE, что означает 159 * и 240 попыток их классификации соответственно)				
	EpiSkin™	EpiDerm™	SkinEthic™	epiCS®
Завышенная оценка:				
1B и 1C ошибочно классифицированы как 1A	21,50 %	29,0 %	31,2 %	32,8 %
HP ошибочно классифицировано как 1B и 1C	20,7 %	23,4 %	27,0 %	28,4 %
HP классифицировано как 1A	0,00 %	2,7 %	0,0 %	0,00 %
Ошибочно классифицирована как разъедающая	20,7 %	26,1 %	27,0 %	28,4 %
Общая доля завышенных оценок (все категории)	17,9 %	23,3 %	24,5 %	25,8 %
Заниженная оценка:				
1A ошибочно классифицирована как 1B и 1C	16,7 %	16,7 %	16,7 %	12,5 %
1A ошибочно классифицирована как HP	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
1B и 1C ошибочно классифицированы как HP	2,2 %	0,00 %	7,5 %	6,6 %
Общая доля заниженных оценок (все категории)	3,3 %	2,5 %	5,4 %	4,4 %
Правильная оценка:				
Правильно классифицирована как 1A	83,3 %	83,3 %	83,3 %	87,5 %
Правильно классифицирована как 1B и 1C	76,3 %	71,0 %	61,3 %	60,7 %
Правильно классифицирована как HP	79,3 %	73,9 %	73,0 %	71,62 %
Общая точность	78,8 %	74,2 %	70 %	69,8 %

* В связи с дефицитом одного из веществ его испытания на модели epiCS® были проведены только один раз (23).

HP — неразъедающее вещество.

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 [37], [38]	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 % площади$_{LLOQ}$ [1)]
Прецизионность	Образцы для контроля качества (т. е. раствор МТТ-формазан концентрацией 1,6; 16 и 160 мкг/см^3) в изопропаноле (n = 5)	КВ ≤ 15 % или ≤ 20 % для LLOQ
Точность	Образцы для контроля качества в изопропаноле (n = 5)	% отклонения ≤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 % площади$_{LLOQ}$
Воспроизводимость (в течение дня)	3 независимые 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: % отклонения ≤ 15 % или ≤20 % для LLOQ Образцы для контроля качества: % отклонения ≤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 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	% отклонения ≤ 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)	% отклонения ≤ 15 %

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

[2)] ULOQ (Upper Limit of Quantification) — верхний предел количественного определения, который устанавливается равным 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 OECD 431:2016	
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	

Продолжение таблицы ДА.1

Структура настоящего стандарта			Структура международного документа OECD 431:2016	
Разделы	Подразделы	Перечисления	Разделы	Перечисления
	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	
4	4.1		11	
	4.2		12	
5	5.1		13	
	5.2		14	
6	—		15	
7	7.1		16	
	7.2.1		17	
	7.2.2		18	
	7.2.3		19	
	7.2.4		20	
	7.2.5		21	
	7.3.1		22	
	7.3.2		23	
	7.4.1		24	
	7.4.2		25	
	7.4.3		26	
	7.4.4		27	
	7.4.5		28	
	7.4.6		29	
	7.4.7		30	
	7.4.8		31	
	7.5		32	
	7.6.1		33	
	7.6.2		34	
	7.6.3		35	
	7.6.4		36	

Окончание таблицы ДА.1

Структура настоящего стандарта			Структура международного документа OECD 431:2016	
Разделы	Подразделы	Перечисления	Разделы	Перечисления
8	8.1		37	
	8.2		38	
Приложение А			Приложение 2	
Приложение Б			Приложение 3	
Приложение В			Приложение 4	
Библиография			Литература	

Библиография

[1] UN. (2013). United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Fifth Revised Edition, UN New York and Geneva. Available at: [http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html] (Согласованная на Глобальном уровне Система классификации и маркировки химической продукции (СГС) Организации Объединенных Наций. Пятое, пересмотр. изд.)

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

[3] OECD. (2015). Guideline for the Testing of Chemicals (No. 430.): *In Vitro* Skin Corrosion: Transcutaneous Electrical Resistance (TER). Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris (Руководство по проведению испытаний химической продукции. (№ 430). Разъедание кожи *in vitro*. Транскожное электрическое сопротивление (TER). Организация экономического сотрудничества и развития, Париж)

[4] OECD. (2015). Guideline for the Testing of Chemicals (No. 435.): *In Vitro* Membrane Barrier Test Method. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. (5) OECD. (2015) (Руководство по проведению испытаний химической продукции. (№ 435): Метод мембранного барьера *in vitro*. Организация экономического сотрудничества и развития, Париж)

[5] Guideline for the Testing of Chemicals (No. 439.): *In Vitro* Skin Irritation: Reconstructed Human Epidermis Test Method. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris (Руководство по проведению испытаний химической продукции. (№ 439). Раздражение кожи. Метод испытаний на реконструированном человеческом эпидермисе. Организация экономического сотрудничества и развития, Париж)

[6] OECD. (2014). Guidance Document on Integrated Approaches to Testing and Assessment of 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 повреждения кожи. Публикации по охране труда, окружающей среды и технике безопасности. Серия по испытаниям и оценке (№ 203). Организация экономического сотрудничества и развития, Париж)

[7] Botham P.A., Chamberlain M., Barratt M.D., Curren R.D., Esdaile D.J., Gardner J.R., Gordon V.C., Hildebrand B., Lewis R.W., Liebsch M., Logemann P., Osborne R., Ponec M., Regnier J.F., Steiling W., Walker A.P., and Balls M. (1995). A Prevalidation Study on *In Vitro* Skin Corrosivity Testing. The report and Recommendations of ECVAM Workshop 6.*ATLA* 23, 219—255 (Исследование в целях предварительной валидации методов испытаний на повреждение кожи *in vitro*. Отчет и рекомендации по итогам семинара ECVAM)

[8] Barratt M.D., Brantom P.G., Fentem J.H., Gerner I., Walker A.P., and Worth A.P. (1998). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Skin Corrosivity. 1. Selection and distribution of the Test Chemicals. *Toxicol. In Vitro* 12, 471—482 (Международное исследование ECVAM по вопросам валидации методов испытаний на разъедание *in vitro*.1. Выбор и распределение исследуемой химической продукции)

[9] Fentem J.H., Archer G.E.B., Balls M., Botham P.A., Curren R.D., Earl L.K., Esdaile D.J., Holzhutter H.- G., and Liebsch M. (1998). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Skin Corrosivity. 2. Results and Evaluation by the Management Team. *Toxicol.in Vitro* 12, 483—524 (Международное исследование ECVAM по вопросам валидации методов испытаний на разъедание *in vitro*. 2. Результаты и оценка руководящей группы)

[10] Liebsch M., Traue D., Barrabas C., Spielmann H., Uphill, P., Wilkins S., Wiemann C., Kaufmann T., Remmele M. and Holzhütter H. G. (2000). The ECVAM Prevalidation Study on the Use of EpiDerm for Skin Corrosivity Testing, *ATLA* 28, pp. 371-401 (Превалидационное исследование ECVAM по использованию EpiDerm для испытаний на разъедание кожи)

[11] Balls M., Blaauboer B.J., Fentem J.H., Bruner L., Combes R.D., Ekwall B., Fielder R.J., Guillouzo A., Lewis R.W., Lovell D.P., Reinhardt C.A., Repetto G., Sladowski D., Spielmann H. et Zucco F. (1995). Practical Aspects of the Validation of Toxicity Test Procedures. The Report and Recommendations of ECVAM Workshops, *ATLA* 23, 129—147. (12) ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods) (1997) (Практические аспекты валидации методик испытаний на токсичность. Отчет и рекомендации по итогам семинаров ECVAM)

[12] Validation and Regulatory Acceptance of Toxicological Test Methods. NIH Publication No. 97—3981. National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, USA. Available at: [http://www.iccvam.niehs.nih.gov/docs/guidelines/validate.pdf] (Валидация и законодательное признание методик испытаний на токсичность. Отчет и рекомендации по итогам семинаров ECVAM)

[13] ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods). (2002). ICCVAM evaluation of EpiDerm™ (EPI-200), EPISKIN™ (SM), and the Rat Skin Transcutaneous Electrical Resistance (TER) Assay: *In Vitro* Test Methods for Assessing Dermal Corrosivity Potential of Chemicals. NIH Publication No. 02-4502. National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods, National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, USA. Available at: [gost.e-ecolog.ru nih.gov/methods/epiddocs/epis_brd.pdf] (ICCVAM-анализ характеристик EpiDerm™ (EPI-200), EPISKIN™ (SM) и метода измерений транскожного электрического сопротивления (TER) на образцах кожи крысы. Методы испытаний in vitro для оценки способности химической продукции вызывать разъедание кожных покровов)

[14] EC-ECVAM. (1998). Statement on the Scientific Validity of the EpiSkin™ Test (an *In Vitro* Test for Skin Corrosivity), Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC10), 3 April 1998. Available at: [gost.e-ecolog.ru ec.europa.eu.html] (Заключение о научной обоснованности применения EpiSkin™ (метода испытаний *in vitro* на разъедание кожи))

[15] EC-ECVAM. (2000). Statement on the Application of the EpiDerm™ Human Skin Model for Skin Corrosivity Testing, Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC14), 21 March 2000. Available at: [gost.e-ecolog.ru ec.europa.eu] (Заключение о пригодности модели человеческой кожи EpiDerm™ для проведения испытаний на разъедание кожи)

[16] Hoffmann J., Heisler E., Karpinski S., Losse J., Thomas D., Siefken W., Ahr H.J., Vohr H.W. and Fuchs H.W. (2005). Epidermal-Skin-Test 1000 (EST-1000)-A New Reconstructed Epidermis for *In Vitro* Skin Corrosivity Testing. *Toxicol. In Vitro* 19, 925—929 (Эпидермальный кожный тест 1000 (EST-1000) — новая разновидность реконструированного эпидермиса для испытаний на разъедание кожи *in vitro*)

[17] Kandárová H., Liebsch M., Spielmann,H., Genschow E., Schmidt E., Traue D., Guest R., Whittingham A., Warren N, Gamer A.O., Remmele M., Kaufmann T., Wittmer E., De Wever B., and Rosdy M. (2006). Assessment of the Human Epidermis Model SkinEthic RHE for *In Vitro* Skin Corrosion Testing of Chemicals According to New OECD TG 431. *Toxicol.In Vitro* 20, 547—559 (Оценка пригодности модели человеческого эпидермиса SkinEthic RHE для испытаний химической продукции на разъедание кожи *in vitro* в соответствии с требованиями новой редакции Руководства ОЭСР TG 431)

[18] Tornier C., Roquet M. and Fraissinette A.B. (2010). Adaptation of the Validated SkinEthic™ Reconstructed Human Epidermis (RHE) Skin Corrosion Test Method to 0.5 cm^2 Tissue Sample. *Toxicol. In Vitro* 24, 1379—1385 (Адаптация валидированного метода испытаний на разъедание кожи на основе реконструированного человеческого эпидермиса (RHE) SkinEthic™ для работы с образцами тканей размером 0,5 $см^2$)

[19] EC-ECVAM. (2006). Statement on the Application of the SkinEthic™ Human Skin Model for Skin Corrosivity Testing, Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC25), 17 November 2006. Available at: gost.e-ecolog.ru jrc.ec.europa.eu.html] (Заключение о пригодности модели человеческой кожи SkinEthic™ для проведения испытаний на разъедание кожи)

[20] EC-ECVAM. (2009). ESAC Statement on the Scientific Validity of an *In-Vitro* Test Method for Skin Corrosivity Testing: the EST-1000, Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC30), 12 June 2009. Available at: [http://www.ecvam.jrc.ec.europa.eu.html] (Заключение ESAC о научной обоснованности применения метода испытаний на разъедание кожи *in vitro*: EST-1000)

[21] OECD. (2013). Summary Document on the Statistical Performance of Methods in OECD Test Guideline 431 for Sub-categorisation. Environment, Health, and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 190.). Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris (Итоговый документ по статистической результативности методов согласно Руководству ОЭСР по проведению испытаний 431 для целей классификации на подклассы опасности. Публикации по охране труда, окружающей среды и технике безопасности. Серия по испытаниям и оценке (№ 190))

[22] Alépée N., Grandidier M.H., and Cotovio J. (2014). Sub-Categorisation of Skin Corrosive Chemicals by Revision of OECD Test Guideline 431. *Toxicol. In Vitro* 28, 131—145 (Классификация химической продукции, вызывающей разъедание кожи, на подклассы опасности в соответствии с положениями пересмотренного Руководства ОЭСР по проведению испытаний TG 431)

[23] Desprez B., Barroso J., Griesinger C., Kandárová H., Alépée N., and Fuchs, H. (2015). Two Novel Prediction Models Improve Predictions of Skin Corrosive Sub-categories by Test Methods of OECD Test Guideline No. 431. Toxicol. In Vitro 29, 2055—2080 (Две инновационные модели построения прогнозов, повышающие качество прогнозирования при классификации на подклассы опасности по признаку разъедающего действия на кожу с применением методов испытаний, предусмотренных Руководством ОЭСР по проведению испытаний TG 431)

[24] OECD. (2015). Performance Standards for the Assessment of Proposed Similar or Modified In Vitro Reconstructed Human Epidermis (RHE) Test Methods For Skin Corrosion in Relation to OECD TG 431. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 219). Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris (Стандарты эффективности для оценки предлагаемых подобных или модифицированных методов испытаний *in vitro* на реконструированном человеческом эпидермисе (RHE). Методы испытаний на разъедание кожи согласно OECD TG 431. Публикации по охране труда, окружающей среды и технике безопасности. Серия по испытаниям и оценке (№ 219). Организация экономического сотрудничества и развития, Париж)

[25] 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)

[26] 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 разъедание и раздражение кожи в рамках европейской системы законодательного регулирования. Рекомендации семинара)

[27] 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)

[28] Tinois E., et al. (1994). The Episkin Model: Successful Reconstruction of Human *Epidermis In Vitro*. In: *In Vitro* Skin Toxicology. Rougier A., Goldberg A.M and Maibach H.I. (Eds): 133—140 (Модель Episkin. Успешная реконструкция человеческого эпидермиса *in vitro*)

[29] Cannon C. L., Neal P.J., Southee J.A., Kubilus J. and Klausner M. (1994), New Epidermal Model for Dermal Irritancy Testing. *Toxicol.in Vitro* 8, 889—891 (Новая модель эпидермиса для испытаний на раздражение дермы)

[30] Ponec M., Boelsma E, Weerheim A, Mulder A, Bouwstra J and Mommaas M. (2000). Lipid and Ultrastructural Characterization of Reconstructed Skin Models. Inter. J. Pharmaceu. 203, 211—225 (Липидные и ультраструктурные характеристики реконструированных моделей кожи)

[31] Tinois E., Tillier, J., Gaucherand, M., Dumas, H., Tardy, M. and Thivolet J. (1991). *In Vitro* and Post Transplantation Differentiation of Human Keratinocytes Grown on the Human Type IV Collagen Film of a Bilayered Dermal Substitute. *Exp. Cell Res.* 193: 310—319 (Дифференциация человеческих кератиноцитов, выращенных на двухслойном заменителе дермы в виде пленки из коллагена человеческого типа IV, в условиях *in vitro* и после проведенной трансплантации)

[32] Parenteau N.L., Bilbo P, Nolte CJ, Mason VS and Rosenberg M. (1992). The Organotypic Culture of Human Skin Keratinocytes and Fibroblasts to Achieve Form and Function. *Cytotech.* 9, 163—171 (Органотипическая культура кератиноцитов и фибробластов человеческой кожи для обеспечения их соответствующей формы и функций)

[33] Wilkins L.M., Watson SR, Prosky SJ, Meunier SF and Parenteau N.L. (1994). Development of a Bilayered Living Skin Construct for Clinical Applications. *Biotech.Bioeng.*43/8, 747—756 (Разработка двухслойного биоинженерного эквивалента живой кожи для клинического применения)

[34] EpiSkin™. (December 2011). SOP, *INVITTOX* Protocol (No. 118). EpiSkin™ Skin Corrosivity Test. Available at: [http://www.ecvam .jrc.ec.europa.eu.htm] (EpiSkin™ (декабрь 2011 г.), СОП. Протокол *INVITTOX* (№ 118). Испытания на разъедание кожи по методу EpiSkin™)

[35] EpiDerm™ SOP. (February 2012). Version MK-24-007-0024Protocol for: *In Vitro* EpiDerm™ Skin Corrosion Test (EPI-200-SCT), for Use with MatTek Corporation's Reconstructed Human Epidermal Model EpiDerm. Available at: [http://www.ecvam.jrc.ec.europa.eu.html] (EpiDerm™, СОП (февраль 2012 г.). Версия MK-24-007-0024. Протокол испытаний на разъедание кожи *in vitro* по методу EpiDerm™ (EPI-200-SCT), предназначенного для применения на модели реконструированного человеческого эпидермиса производства MatTek Corporation)

[36] SkinEthic™ RHE SOP, *INVITTOX* Protocol (January 2012). Skin Ethic™ Skin Corrosivity Test. Available at: [http://gost.e-ecolog.ru] (SkinEthic™ RHE, СОП. Протокол *INVITTOX* (январь 2012 г.). Испытания на разъедание кожи по методу Skin Ethic™)

[37] EpiCS® SOP, Version 4.1 (January 2012). *In Vitro* Skin Corrosion: Human Skin Model Test Epidermal Skin Test 1000 (epiCS®) CellSystems. Available at: [http://gost.e-ecolog.ru] (EpiCS®, СОП. Версия 4.1 (январь 2012 г.). Разъедание кожи *in vitro*. Модель человеческой кожи «Эпидермальный кожный тест 1000» (epiCS®) производства CellSystems)

[38] 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 средств 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 исследуемой химической продукции, характеризующейся сильным окрашиванием)

[39] 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)

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, разъедание кожи *in vitro*, реконструированный человеческий эпидермис (RHE)

Технический редактор *И.Е. Черепкова*
Корректор *Е.Д. Дульнева*
Компьютерная верстка *Л.А. Круговой*

Сдано в набор 19.05.2021. Подписано в печать 04.06.2021. Формат 60×84⅛. Гарнитура Ариал.
Усл. печ. л. 4,18. Уч.-изд. л. 3,60.

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