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

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

**ГОСТ ISO 10993-5— 2023**

# Изделия медицинские

# ОЦЕНКА БИОЛОГИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ МЕДИЦИНСКИХ ИЗДЕЛИЙ

## Часть 5

## Исследования на цитотоксичность методами *in vitro*

**(ISO 10993-5:2009, Biological evaluation of medical devices — Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity, IDT)**

Издание официальное

Москва
Российский институт стандартизации
2023

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 Автономной некоммерческой организацией «Институт медико-биологических исследований и технологий» (АНО «ИМБИИТ») на основе собственного перевода на русский язык англоязычной версии стандарта, указанного в пункте 5

2 ВНЕСЕН Федеральным агентством по техническому регулированию и метрологии

3 ПРИНЯТ Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации (протокол от 25 сентября 2023 г. № 165-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 |
| Киргизия | KG | Кыргызстандарт |
| Россия | RU | Росстандарт |
| Узбекистан | UZ | Узстандарт |

4 Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 10 октября 2023 г. № 1089-ст межгосударственный стандарт ГОСТ ISO 10993-5—2023 введен в действие в качестве национального стандарта Российской Федерации с 1 июня 2024 г.

5 Настоящий стандарт идентичен международному стандарту ISO 10993-5:2009 «Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 5. Исследования на цитотоксичность методами *in vitro*» (Biological evaluation of medical devices — Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity, IDT).

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

При применении настоящего стандарта рекомендуется использовать вместо ссылочных международных стандартов соответствующие им межгосударственные стандарты, сведения о которых приведены в дополнительном приложении ДА

6 ВЗАМЕН ГОСТ ISO 10993-5—2011

*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»*

© ISO, 2009
© Оформление. ФГБУ «Институт стандартизации», 2023



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

## Содержание

1 Область применения . . . . . 1
2 Нормативные ссылки . . . . . 1
3 Термины и определения . . . . . 1
4 Подготовка проб и контролей . . . . . 2
5 Линии клеток . . . . . 4
6 Культуральная среда . . . . . 5
7 Подготовка начальной культуры клеток . . . . . 5
8 Проведение исследований . . . . . 5
9 Отчет об исследовании . . . . . 9
10 Оценка результатов . . . . . 9
Приложение А (справочное) Исследование на цитотоксичность методами с нейтральным красным (NRU) . . . . . 10
Приложение В (справочное) Исследование на цитотоксичность по колониеобразованию . . . . . 15
Приложение С (справочное) Исследование на цитотоксичность с применением МТТ-теста . . . . . 18
Приложение D (справочное) Исследование на цитотоксичность с применением XTT-теста . . . . . 21
Приложение ДА (справочное) Сведения о соответствии ссылочных международных стандартов межгосударственным стандартам . . . . . 24
Библиография . . . . . 25

## Введение

ISO (Международная организация по стандартизации) является федерацией национальных органов по стандартизации (органов — членов ISO). Работу по подготовке международных стандартов проводят путем привлечения технических комитетов ISO. Каждая организация — член, заинтересованная в области деятельности, для которой создан технический комитет, имеет право быть представленной в данном комитете. Международные правительственные и неправительственные организации также принимают участие в работе ISO. ISO тесно сотрудничает с Международной электротехнической комиссией (IEC) по вопросам стандартизации электротехнической продукции.

Настоящий стандарт подготовлен в соответствии с редакционными правилами Директив ISO/IEC, часть 2.

Некоторые элементы настоящего стандарта могут быть объектом патентных прав. ISO снимает с себя ответственность за обозначение патентных прав.

Настоящий стандарт разработан Техническим комитетом ISO/TC 194 «Биологическая и клиническая оценка медицинских изделий».

Настоящий стандарт представляет собой третье пересмотренное издание и заменяет второе издание ISO 10993-5:1999, которое технически пересмотрено.

Перечень стандартов серии ISO 10993 приведен на официальном сайте ISO.

В связи с широким признанием и применением исследований на цитотоксичность методами *in vitro* при оценке обширного круга медицинских изделий и материалов, целью настоящего стандарта ISO 10993 является не установление одного исследования, а определение схемы испытаний, которая требует принятия решений посредством серии шагов. Такой подход должен привести к выбору наиболее подходящего исследования.

В настоящем стандарте рассмотрены три вида исследований: исследование экстрактов, исследование методом прямого контакта и исследование методом непрямого контакта.

Выбор вида исследований зависит от природы исследуемого образца, потенциальной области применения и характера использования.

Этот выбор определяет детали приготовления исследуемых образцов, приготовление клеточных культур, а также способ, при помощи которого клетки подвергаются воздействию образцов или их экстрактов.

В конце периода воздействия выявляют наличие цитотоксичности и проводят оценку степени цитотоксичности. Настоящий стандарт намеренно не ограничивает выбор типа оценки. Такая стратегия позволяет делать доступным целый ряд методов исследований и отражает подход многих исследовательских групп, поддерживающих биологические исследования методами *in vitro*.

Многочисленные используемые методы и конечные точки, измеряемые при определении цитотоксичности, могут быть объединены в категории по типу оценки:

- оценка повреждения клеток морфологическими методами;
- измерение повреждения клеток;
- измерение клеточного роста;
- измерение специфических аспектов клеточного метаболизма.

Следовательно, существует несколько альтернативных способов получения результатов в каждой из этих четырех категорий. Исследователь должен быть осведомлен о методах исследований, а также знать, к какому из них относится определенная методика, для того чтобы проводить сравнения с другими результатами на схожих медицинских изделиях или материалах и межлабораторные исследования. Примеры протоколов количественных исследований приведены в приложениях.

В настоящем стандарте представлено также руководство по интерпретации результатов.

**Поправка к ГОСТ ISO 10993-5—2023 Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 5. Исследования на цитотоксичность методами *in vitro***

| В каком месте | Напечатано | Должно быть | | |
|---|---|---|---|---|
| Предисловие. Таблица согласования | — | Таджикистан | TJ | Таджикстандарт |

(ИУС № 4 2024 г.)

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

**Изделия медицинские**

# ОЦЕНКА БИОЛОГИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ МЕДИЦИНСКИХ ИЗДЕЛИЙ

**Часть 5**

**Исследования на цитотоксичность методами *in vitro***

Medical devices. Biological evaluation of medical devices.
Part 5. Cytotoxicity studies by in vitro methods

**Дата введения — 2024—06—01**

## 1 Область применения

Настоящий стандарт распространяется на медицинские изделия (МИ) и материалы, применяемые для их изготовления, и устанавливает требования к проведению исследований цитотоксичности методами *in vitro*.

В методах, установленных в настоящем стандарте, предусмотрено проведение инкубации клеточных культур в контакте с МИ и/или экстрактами из материалов МИ либо непосредственно, либо путем диффузии.

Данные методы предназначены для обнаружения в условиях *in vitro* ответной биологической реакции клеток млекопитающих по заданным показателям.

## 2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы нормативные ссылки на следующие стандарты [для датированных ссылок применяют только указанное издание ссылочного стандарта, для недатированных — последнее издание (включая все изменения)]:

ISO 10993-1, Biological evaluation of medical devices — Part 1: Evaluation and testing within a risk management process* (Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 1. Оценка и исследования в рамках процесса менеджмента риска)

ISO 10993-12, Biological evaluation of medical devices — Part 12: Sample preparation and reference materials (Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 12. Приготовление проб и стандартные образцы)

## 3 Термины и определения

В настоящем стандарте применены термины по ISO 10993-1, а также следующие термины с соответствующими определениями:

3.1 **культуральная посуда** (culture vessels): Посуда, приемлемая для культуры клеток, включая стеклянные чашки Петри, пластмассовые культуральные чашки, пластмассовые многолуночные планшеты и планшеты для микротитрования.

---

* Исправлена ошибка оригинала

**Издание официальное**

Примечание — Она может быть взаимозаменяемой при условии, что соответствует требованиям по виду ткани и подходит для использования с клетками млекопитающих.

3.2 **положительный контроль** (positive control material): Материал и/или вещество с достаточно изученными характеристиками, которые при применении в конкретном методе подтверждают воспроизводимость этого метода и соответствие положительного или реактивного биологического ответа в тест-системе установленным требованиям.

Примечание — Назначение положительного контроля — продемонстрировать соответствующую ответную реакцию тест-системы. Например, стабилизированный органотином полиуретан[1)] используют в качестве положительного контроля для твердых материалов и экстрактов, при разведении фенола — в качестве положительного контроля для экстрактов. В дополнение к материалу можно также применять чистые химические вещества для демонстрации эффективности тест-системы.

3.3 **отрицательный контроль** (negative control material): Материал и/или вещество с достаточно изученными характеристиками, которые при применении в конкретном методе исследования подтверждают воспроизводимость этого метода и соответствие отрицательного, нереактивного или минимального биологического ответов в тест-системе установленным требованиям.

Примечание — Назначение отрицательного контрольного образца — продемонстрировать фоновую реакцию клеток. Например, в качестве отрицательного контрольного образца использовались полиэтилен высокой плотности[2)] для синтетических полимеров, стержни из окиси алюминия и керамики для стоматологических материалов.

3.4 **исследуемая проба** (test sample): Материал, МИ, часть МИ, компонент, экстракт или его часть, которые подвергаются биологическим или химическим исследованиям или оценке.

3.5 **субконфлюэнтность** (subconfluency): Примерно 80 % конфлюэнтности, т. е. завершение логарифмической фазы роста.

## 4 Подготовка проб и контролей

### 4.1 Общие положения

Исследование проводят:

a) на экстракте из исследуемой пробы;

и/или

b) исследуемой пробе.

Подготовку проб проводят в соответствии с ISO 10993-12.

Отрицательные и положительные контроли должны быть включены в каждое исследование.

### 4.2 Приготовление экстрактов из образцов

#### 4.2.1 Общие требования

Условия экстракции должны моделировать или преувеличивать условия клинического применения, чтобы определить потенциальную токсическую опасность, не вызывая при этом значительных изменений в исследуемой пробе, таких как сплавление, плавление или растворение, или изменение химической структуры, кроме тех случаев, когда это ожидается при клиническом использовании МИ. При этом ввиду природы отдельных материалов (например, биодеградируемые материалы) во время процедуры экстракции может произойти изменение в химической структуре.

Примечание — Концентрация любых эндогенных или посторонних веществ в экстракте, а следовательно, количество подвергающихся воздействию исследуемых клеток зависит от площади контакта, объема мо-

---

[1)] Полиуретаны ZDEC и ZDBC предоставляет FDA, Исследовательский институт Хатано (Ochiai 729-5, Hadanoshi, Kanagawa 257, Japan). Эта информация приведена для удобства пользователя настоящим стандартом и не является рекламой данной продукции со стороны ISO. Можно использовать эквивалентные продукты, если их применение позволяет получить аналогичные результаты.

[2)] Полиэтилен высокой плотности может быть приобретен в Фармакопее США (Rockville, Maryland, USA) и в FDA, Исследовательском институте Хатано (Ochiai 729-5, Hadanoshi, Kanagawa 257, Japan). Эта информация приведена для удобства пользователя настоящим стандартом и не является рекламой данной продукции со стороны ISO. Можно использовать эквивалентные продукты, если их применение позволяет получить аналогичные результаты.

дельной среды, pH, химической растворимости, скорости диффузии, осмоляльности, встряхивания, температуры, времени и других факторов.

Конечные МИ, которые получают путем смешивания двух или более компонентов в организме пациента для создания конечного МИ (например, костный цемент), не следует отмывать перед экстракцией. Эта процедура может снизить или удалить остаточные продукты, присутствующие на МИ.

Если исследуемая проба предназначена для применения в стерильных условиях, то для экстракции химических компонентов необходимо использовать стерильную исследуемую пробу.

**4.2.2 Экстрагирующая жидкость**

Выбор экстрагирующей жидкости (экстрагента) с учетом химических характеристик исследуемой пробы должен быть обоснован и задокументирован.

Для исследования клеток млекопитающих необходимо использовать следующие экстрагенты:

a) культуральную среду с сывороткой;

b) физиологический раствор;

c) другую подходящую модельную среду.

Выбор экстрагента должен отражать цель экстракции, причем необходимо рассмотреть использование и полярной, и неполярной жидкостей. Предпочтительной является культуральная среда с сывороткой. Использование культуральной среды с сывороткой более подходит для экстракции, так как она способна поддерживать клеточный рост, а также экстрагировать как полярные, так и неполярные вещества. В дополнение к культуральной среде с сывороткой необходимо рассмотреть применение культуральной среды без сыворотки для конкретной экстракции полярных веществ (например, ионных соединений). К другим подходящим экстрагентам относят очищенную воду и диметилсульфоксид (DMSO). DMSO является цитотоксическим в выбранных тест-системах при концентрации, превышающей 0,5 % (объемная доля). Действие на клетки концентрации экстрагируемых веществ в DMSO будет ниже из-за большего разбавления по сравнению с экстракцией в культуральной среде с сывороткой.

Примечание 1 — Могут быть применены различные типы сыворотки (например, эмбриональная, бычья/телячья сыворотка, сыворотка новорожденного теленка), а выбор сыворотки обусловлен типом клеток.

Примечание 2 — Следует помнить, что сыворотка/белок может в определенной степени связывать экстрагируемые вещества.

**4.2.3 Условия проведения экстракции**

4.2.3.1 Экстракцию следует проводить в стерильных, химически инертных, закрытых емкостях с соблюдением правил асептики в соответствии с ISO 10993-12.

4.2.3.2 Рекомендуемыми условиями экстракции являются:

a) (24 ± 2) ч при температуре (37 ± 1) °C;

b) (72 ± 2) ч при температуре (50 ± 2) °C;

c) (24 ± 2) ч при температуре (70 ± 2) °C;

d) (1,0 ± 0,2) ч при температуре (121 ± 2) °C.

Описанные выше условия экстракции, которые использовались для определения потенциальной опасности в оценке риска МИ или материала, основаны на историческом прецеденте. Другие условия, например: продленные или укороченные сроки экстракции при температуре 37 °C, имитирующие экстракцию, происходящую при клиническом применении, или позволяющие адекватно оценить потенциальную опасность, могут быть использованы, но должны быть обоснованы и зафиксированы документально. Для неимплантируемых МИ, находящихся в кратковременном контакте (не более чем 4 ч общей длительности контакта) с неповрежденной кожей или слизистой, продолжительность экстракции может быть менее чем 24 ч, но не менее чем 4 ч, при температурах, рекомендуемых в перечислениях a) и c).

Клеточную культуральную среду с сывороткой следует использовать только в соответствии с перечислением a), потому что температура экстракции выше (37 ± 1) °C может негативно повлиять на химический состав и/или стабильность сыворотки и других составляющих культуральной среды.

Для исследуемых проб из полимеров температура экстракции не должна превышать температуру стеклования, так как более высокая температура может изменить состав экстрагента.

4.2.3.3 Если экстракт фильтруют, центрифугируют или обрабатывают другим способом, то это необходимо внести в окончательный отчет вместе с обоснованием в соответствии с разделом 9. Любое изменение pH экстракта фиксируют в отчете. Манипуляции с экстрактом, например подбор значения pH, необходимо избегать, так как они могут повлиять на результат.

### 4.3 Подготовка пробы для исследования методом прямого контакта

#### 4.3.1 Форма исследуемой пробы

Образцы различных форм, размеров или физических состояний (например, жидкое или твердое) в исследованиях на цитотоксичность изучают без изменений.

Предпочтительно, чтобы хотя бы одна из сторон исследуемой пробы была плоской. При отсутствии такой возможности требуется внести изменения для получения плоских поверхностей.

#### 4.3.2 Стерильность исследуемой пробы

4.3.2.1 Необходимо принимать во внимание стерильность исследуемой пробы.

4.3.2.2 С исследуемыми пробами стерильных МИ обращаются с соблюдением правил асептики в течение всего процесса исследования.

4.3.2.3 Исследуемые пробы МИ, которые выпускают нестерильными, но подвергают стерилизации перед применением, стерилизуют способом, рекомендованным изготовителем, и применяют с соблюдением правил асептики в течение всего процесса исследования.

Воздействие способа стерилизации или стерилизующих агентов на МИ принимают во внимание при выборе приготовления пробы до ее использования в тест-системе.

4.3.2.4 Исследуемые пробы МИ, которые можно применять нестерильными, используют в таком виде, в каком они выпускаются, процесс приготовления экстрактов проводят с соблюдением правил асептики в течение всего процесса исследования. Стерилизация исследуемой пробы может быть обоснована только во избежание микробного загрязнения культуры клеток; тем не менее процесс стерилизации не должен изменять свойства исследуемой пробы.

Нестерильные исследуемые пробы необходимо проверить на предмет микробного (бактериального) загрязнения, так как оно может привести к ложной оценке цитотоксичности.

#### 4.3.3 Жидкие исследуемые пробы

Жидкие исследуемые пробы исследуют:

a) прямым нанесением

или

b) нанесением на биологически инертную абсорбирующую матрицу.

Для этой цели подходят фильтровальные диски.

#### 4.3.4 Абсорбирующие исследуемые пробы

При необходимости исследуемые пробы, которые являются абсорбирующими, должны быть пропитаны культуральной средой перед исследованием, чтобы избежать адсорбцию культуральной средой в испытательной посуде.

### 4.4 Подготовка контролей

Контроли подготавливают, следуя такой же процедуре, как и при подготовке исследуемой пробы.

## 5 Линии клеток

Предпочтение отдается линиям клеток, полученным из официальных источников[1)].

Если требуется специфическая чувствительность, то первичные клеточные культуры, линии клеток и органотипические культуры, полученные непосредственно из живых тканей, следует использовать только в том случае, если можно продемонстрировать воспроизводимость и точность ответной реакции.

Маточная культура линии клеток сохраняется при температуре минус 80 °С или ниже в соответствующей культуральной среде, содержащей вещество, защищающее от воздействия низких температур (криопротектор), например диметилсульфоксид или глицерин. Длительное хранение (от нескольких месяцев до многих лет) возможно только при температуре минус 130 °С или ниже.

Для исследования используют клетки, не содержащие микоплазму. Перед использованием маточные культуры должны быть проверены на отсутствие микоплазмы.

---

[1)] Например, рекомендуемыми линиями клеток являются American Type Culture Collection CCL 1 (NCTC клон 929), CCL 163 (Balb/3T3 клон A31), CCL 171 (MRC-5) и CCL 75 (WI-38), CCL 81 (Vero) и CCL 10 [(BHK-21 (C-13)] и V-79 379A. Данная информация приведена для удобства пользования настоящим стандартом и не является рекламой этой продукции со стороны ISO. Возможно использование других линий клеток, если доказано, что они приводят к таким же или более релевантным результатам.

Важно регулярно проверять клетки (например, морфологию, время удвоения, модальное число хромосом), так как чувствительность исследований может варьироваться в зависимости от количества пассажей.

Необходимо использовать надлежащие методы работы с клеточными культурами [5].

## 6 Культуральная среда

Культуральная среда должна быть стерильной.

Культуральная среда с сывороткой или без нее должна соответствовать условиям, требованиям роста или поддержания жизнеспособности определенной линии клеток.

Можно включить в состав среды антибиотики, убедившись в том, что они не оказывают неблагоприятного воздействия на пробы.

Необходимо обосновать условия хранения.

Примечание — Стабильность культуральной среды может различаться в зависимости от ее состава и условий хранения.

pH культуральных сред поддерживают на уровнях от 7,2 до 7,4.

## 7 Подготовка начальной культуры клеток

Используя выбранную линию клеток и культуральную среду, готовят достаточное количество клеток для проведения исследования. Если клетки должны быть выращены из культур, взятых из хранилища, то необходимо удалить криопротектор при его наличии. Перед использованием клеточную культуру пересевают как минимум один раз.

Клетки снимают и ресуспендируют путем ферментативной и/или механической дезагрегации, используя наиболее подходящий метод для своей линии клеток.

## 8 Проведение исследований

### 8.1 Число дублей

Для исследуемых проб и контроля используют не менее трех дублей.

### 8.2 Исследование экстрактов

8.2.1 Данное исследование позволяет оценить цитотоксичность как качественно, так и количественно.

8.2.2 Определенное количество постоянно перемешиваемой клеточной суспензии капают в каждый сосуд для экспонирования с экстрактом. Равномерно распределяют клетки по поверхности каждого сосуда легким вращением.

8.2.3 Культуры инкубируют при температуре (37 ± 1) °C в воздушной среде с 5 %-ной (доля объема) двуокисью углерода или без нее в соответствии с выбранной для культуральной среды буферной системой.

Исследования следует проводить на субконфлюэнтном монослое или на только что суспендированных клетках.

В исследовании на колониеобразование следует использовать соответствующую низкую плотность клеток.

8.2.4 Перед началом исследования субконфлюэнтность и морфологию культур клеток проверяют с помощью микроскопа.

В исключительных случаях экспоненциально растущие клетки (например, зародышевые клетки, активно пролиферирующие клетки) могут высеваться в начальной точке исследования.

8.2.5 Исследование проводят:

a) на исходном экстракте и

b) на серии разведений экстрактов, используя в качестве разбавителя культуральную среду.

Как альтернатива, если известно или предполагается наличие материалов с ограниченной растворимостью, то растворение достигается изменением первоначального соотношения экстракта из исследуемой пробы к культуральной среде.

Если в исследовании используют монослой клеток, то культуральную среду следует удалить и добавить кратное количество экстракта или его разведения в каждый из сосудов.

Если в исследовании используют клеточную суспензию, то добавляют экстракт или его разведение в каждый из дублирующих сосудов непосредственно после приготовления клеточной суспензии.

8.2.6 Если используют неизотонический экстракт, например воду, то исследуют экстракт при наиболее физиологически совместимой концентрации после разведения в культуральной среде.

Примечание — Рекомендуется использовать концентрированную культуральную среду, например 2×, 5×, для разведения водных экстрактов.

8.2.7 Добавляют определенное количество исходного реактива, отрицательного и положительного контролей в дополнительные дублирующие сосуды.

Примечание — При необходимости исследуют контрольную свежую культуральную среду.

8.2.8 Сосуды инкубируют, используя условия, описанные в 8.2.3, в течение периода времени, соответствующего специфическим условиям исследуемой пробы.

8.2.9 После периода инкубации длительностью по меньшей мере 24 ч определяют эффект цитотоксичности в соответствии с 8.5.

### 8.3 Исследование методом прямого контакта

8.3.1 Данное исследование позволяет оценить цитотоксичность как качественно, так и количественно.

8.3.2 Определенное количество постоянно перемешиваемой клеточной суспензии капают в каждый из необходимого количества сосудов, предназначенных для прямого контакта клеток с исследуемой пробой. Клетки равномерно распределяют по поверхности каждого сосуда, осторожно его вращая в горизонтальной плоскости.

8.3.3 Культуру клеток инкубируют при температуре (37 ± 1) °С в воздушной среде с 5 %-ной (доля объема) двуокисью углерода или без нее в соответствии с выбранной для культуральной среды буферной системой до тех пор, пока культуры не вырастут до субконфлюэнтности.

8.3.4 Перед началом исследования субконфлюэнтность и морфологию культур проверяют с помощью микроскопа.

8.3.5 Удаляют культуральную среду. Затем в каждый сосуд доливают свежую культуральную среду.

8.3.6 Осторожно помещают отдельный образец исследуемой пробы на клеточный слой в центре каждого дублирующего сосуда и убеждаются в том, что образец исследуемой пробы покрывает приблизительно 1/10 поверхности клеточного слоя. При доказательном обосновании можно использовать другие соотношения поверхности образца исследуемой пробы и поверхности клеточного слоя.

Проявляют осторожность для предотвращения нежелательного перемещения образцов исследуемой пробы, поскольку это может привести к физическому повреждению клеток, например их смещению.

Примечание — При необходимости, образцы исследуемой пробы помещают в культуральный сосуд перед добавлением клеток.

8.3.7 Готовят дублирующие сосуды для отрицательного и положительного контролей.

8.3.8 Сосуды инкубируют в условиях, описанных в 8.3.3, в течение необходимого периода времени (не менее 24 ч), соответствующего специфическим условиям конкретной пробы.

8.3.9 Надосадочную культуральную среду сливают и определяют цитотоксический эффект в соответствии с 8.5.

### 8.4 Исследование методом непрямого контакта

#### 8.4.1 Исследование методом диффузии на агаре

8.4.1.1 Данное исследование используют только для качественной оценки цитотоксичности. Исследование непригодно для вымываемых веществ, которые не могут диффундировать через слой агара или которые вступают в реакцию с агаром. Применение метода диффузии на агаре для определения цитотоксичности должно быть обосновано.

8.4.1.2 Для исследования капают определенное количество постоянно перемешиваемой клеточной суспензии в каждый из достаточного числа дублирующих сосудов. Клетки равномерно распределяют по поверхности каждого сосуда, осторожно вращая сосуды в горизонтальном направлении.

8.4.1.3 Культуру клеток инкубируют при температуре (37 ± 1) °С в воздушной среде с 5 %-ной (доля объема) двуокисью углерода или без нее в соответствии с выбранной для культуральной среды буферной системой до тех пор, пока культуры не вырастут приблизительно до конфлюэнтности в конце логарифмической фазы кривой роста.

8.4.1.4 Перед началом исследования субконфлюэнтность и морфологию клеточной культуры проверяют с помощью микроскопа.

8.4.1.5 Удаляют из сосуда культуральную среду. Затем смешивают свежую культуральную среду, содержащую сыворотку с растопленным агаром, чтобы окончательная концентрация агара составляла от 0,5 % до 2 %, и вносят соответствующий объем в каждый сосуд. Используют исключительно агар, который подходит для выращивания клеток млекопитающих в культуре. Смесь культуральной среды с агаром должна находиться в жидком состоянии при температуре, совместимой с температурой клеток млекопитающих.

Примечание — Агар доступен в различных диапазонах молекулярной массы и чистоты.

8.4.1.6 Осторожно помещают несколько образцов исследуемой пробы на отвердевший слой агара в каждый сосуд. Следует убедиться в том, что образец покрывает приблизительно 1/10 поверхности клеточного слоя.

При должном обосновании можно использовать другие соотношения поверхности исследуемого образца и поверхности клеточного слоя.

Все абсорбирующие материалы до помещения на агар следует предварительно поместить в культуральную среду во избежание дегидратации агара.

8.4.1.7 Готовят дублирующие сосуды как с отрицательным контрольным образцом, так и с положительным контрольным образцом.

8.4.1.8 Сосуды инкубируют в условиях, описанных в 8.4.1.3, от 24 до 72 ч.

8.4.1.9 Осматривают клетки для определения цитотоксичности до и после осторожного удаления образцов с поверхности агара. Использование витальной окраски, например нейтрального красного, может способствовать обнаружению цитотоксичности. Витальный краситель можно добавлять до или после инкубации с образцом. Если краситель добавлен перед инкубацией, то культуры защищают от воздействия света во избежание повреждения клеток вследствие фотоактивации витального красителя.

**8.4.2 Исследование методом диффузии на фильтр**

8.4.2.1 Данное исследование используют только для качественной оценки цитотоксичности.

8.4.2.2 Свободный от поверхностно-активных веществ фильтр с размером пор 0,45 мкм помещают в каждый сосуд и добавляют определенное количество постоянно перемешиваемой клеточной суспензии в каждый из достаточного числа дублирующих сосудов для испытания. Осторожным вращением клетки равномерно распределяют по поверхности каждого фильтра.

8.4.2.3 Культуры инкубируют при температуре (37 ± 1) °С в воздушной среде с 5 %-ной (доля объема) двуокисью углерода или без нее в соответствии с выбранной для культуральной среды буферной системой до тех пор, пока культуры не вырастут приблизительно до конфлюэнтности в конце логарифмической фазы кривой роста.

8.4.2.4 Удаляют из сосудов культуральную среду. Затем фильтр стороной, на которой находятся клетки, помещают на слой застывшего агара (см. 8.4.1.5).

8.4.2.5 Осторожно помещают дублирующие исследуемые образцы на верхнюю (без клеток) сторону фильтра. Экстракты и свежеприготовленные смеси помещают на фильтр в удерживающих инертных кольцах.

8.4.2.6 Готовят дублирующие фильтры как с отрицательным, так и с положительным контрольным образцами.

8.4.2.7 Сосуды инкубируют в условиях, описанных в 8.4.2.3, в течение 2 ч ± 10 мин.

8.4.2.8 Осторожно удаляют образцы с фильтра и отделяют фильтр от поверхности агара.

8.4.2.9 Выявляют цитотоксические эффекты, используя соответствующую методику окрашивания.

**8.5 Определение цитотоксичности**

8.5.1 Выявляют цитотоксические эффекты качественным или количественным методами. Количественная оценка цитотоксичности предпочтительнее. Качественные методы подходят для скрининговых целей.

При качественной оценке исследуют клетки через микроскоп, при необходимости используя цитохимическую окраску, чтобы оценить изменения, например: изменение общей морфологии, вакуоли-

зацию, расщепление, лизис клеток и целостность мембран. Отклонение от нормальной морфологии регистрируют в отчете об исследовании описательно или в цифровом выражении. В таблицах 1 и 2 приведен удобный способ оценки испытуемых материалов.

Таблица 1 — Качественная морфологическая шкала цитотоксичности экстрактов

| Уровень, баллы | Реакция | Состояние клеточной культуры |
|---|---|---|
| 0 | Отсутствует | Дискретные интрацитоплазматические гранулы, лизис клеток отсутствуют, снижения роста клеток не наблюдается |
| 1 | Незначительная | Не более чем 20 % клеток круглые, свободно прикреплены и без интрацитоплазматических гранул или показывают изменения в морфологии; в наличии отдельные лизированные клетки, заметна только незначительная задержка роста |
| 2 | Слабая | Не более чем 50 % клеток закруглены, свободны от интрацитоплазматических гранул, отсутствует обширный лизис клеток; наблюдается не более чем 50 % задержка роста |
| 3 | Умеренная | Не более чем 70 % слоев клеток содержат круглые или лизированные клетки, клеточные слои не полностью разрушены, но наблюдается более чем 50 % задержка роста |
| 4 | Резкая | Почти полное или полное разрушение клеточных слоев |

Таблица 2 — Шкала реактивности для испытания методом диффузии на агаре, на фильтре и прямым контактом

| Уровень, баллы | Реактивность | Описание зоны реактивности |
|---|---|---|
| 0 | Отсутствует | Наблюдаемая зона вокруг образца или под ним отсутствует |
| 1 | Незначительная | Отдельные плохо сформировавшиеся или дегенерировавшие клетки под образцом |
| 2 | Слабая | Зона ограничивается областью под образцом пробы |
| 3 | Умеренная | Зона превышает размер образца до 1,0 см |
| 4 | Резкая | Зона распространяется более чем на 1,0 см от образца |

Метод оценки описывают в отчете. Метод и результаты оценки должны быть включены в отчет об исследовании.

Исходя из данных таблиц 1 и 2 достижение количества баллов по шкале выше чем 2 считают цитотоксическим эффектом.

При количественной оценке измеряют число погибших клеток, замедление роста клеток, пролиферацию клеток или образование колоний. Число клеток, количество белка, высвобождение ферментов, высвобождение или сокращение витальной окраски или другой измеримый параметр могут быть количественно оценены с помощью объективных средств. Объективные средства и результат регистрируют в отчете об исследовании.

Снижение жизнеспособности клеток более чем на 30 % считают цитотоксическим эффектом. Другие критерии, включая отличные от стандартных точки отсечения или приемлемое соотношение результата опыт/контроль, должны быть обоснованы для альтернативных линий клеток или многослойных тканевых конструкций. Критерий должен быть обоснован и отражен документально.

Протоколы, приведенные в приложениях A—D, могут быть использованы для количественного определения цитотоксичности экстрактов.

Примечание — Протоколы A и B приемлемы для химических веществ, что доказано в ходе валидационных международных исследований, и для медицинских устройств, что подтверждено в ходе международных циклических испытаний. Для цитотоксических материалов они позволяют ранжировать цитотоксический эффект путем вычисления значения IC50 (ингибирующая концентрация, примерно на 50 % влияющая на рассматриваемую конечную точку).

В приложениях C и D приведены другие протоколы, широко используемые для количественного определения цитотоксичности.

Для отдельных методов определения цитотоксичности может потребоваться контроль нулевого времени или базовая линия культуры клеток.

8.5.2 Необходимо убедиться в тщательности выбора методов исследования, так как результаты исследования могут оказаться недействительными, если исследуемая проба выделяет вещества, создающие помехи в тест-системе или в измерении.

Материалы, которые могут выделять формальдегид, можно достоверно исследовать только при оценке жизнеспособности клеток.

8.5.3 При наличии очевидных различий в результатах исследований между дублирующими сосудами с культурой клеток исследование следует считать неприемлемым или неудовлетворительным. В таком случае исследование необходимо повторить или использовать альтернативную методику.

8.5.4 Если отрицательный, положительный контрольные образцы или любой другой контроль (стандарта, среды, экстрагента, реагента и т. д.) не вызывают ожидаемого ответа в тест-системе, то исследование повторяют.

## 9 Отчет об исследовании

Отчет об исследовании должен содержать, по крайней мере, следующие сведения:

a) название и адрес исследовательского центра;

b) ФИО лиц(а), проводивших(его) исследование;

c) даты начала и конца исследования:

d) описание образца;

e) линии клеток, их источник и обоснование выбора;

f) наименование компании и партии культуральной среды, сыворотки и антибиотиков, если добавлялись;

g) метод исследования и его обоснование;

h) процедура экстракции по применимости и, при возможности, характер и концентрация вымываемых веществ;

i) отрицательный, положительный контрольные образцы и контроли других видов;

j) клеточный ответ и другие наблюдения;

k) любые другие соответствующие данные, необходимые для оценки результатов.

## 10 Оценка результатов

Общие результаты исследования должны оцениваться лицами, способными принимать обоснованные решения на основе данных исследования. Сведения о цитотоксичности оценивают во взаимосвязи с другими данными по биосовместимости и предназначенным применением МИ.

Интерпретация результатов исследования цитотоксичности должна учитывать классификацию МИ согласно ISO 10993-1.

При цитотоксическом эффекте возможно провести дальнейшую оценку, например:

a) дополнительные исследования (наличие/отсутствие сыворотки, изменение уровня сыворотки в культуральной среде);

b) анализ экстракта (например, остаточные количества стерилизующих агентов и других производственных процессов), если применимо;

c) анализ зависимости ответной реакции от концентрации;

d) химические характеристики вымываемых компонентов;

e) другие процедуры исследования.

Любой цитотоксический эффект является предметом пристального внимания. Это, в первую очередь, указывает на потенциальную токсичность *in vivo,* тем не менее МИ не обязательно признается непригодным для конкретного клинического применения исключительно на основании данных цитотоксичности.

## Приложение А
## (справочное)

## Исследование на цитотоксичность методами с нейтральным красным (NRU)

### А.1 Общие положения

Методы исследований основаны и описывают только те части приложения С [1], которые относятся к данному исследованию.

### А.2 Проведение исследований

#### А.2.1 Общие положения

Клетки BALB/c 3T3 высевают в 96-луночные планшеты и содержат в культуре 24 ч (~1 период удвоения) для формирования полуконфлюэнтного монослоя (см. [5] для дополнительной информации по обеспечению жизнеспособности клеток и процедуры культивирования). Затем в лунки с клетками вносят исследуемое вещество в нескольких концентрациях. После инкубации клеток с исследуемым веществом (время воздействия) в течение 24 ч определяют концентрацию нейтрального красного в клетках для каждой концентрации исследуемого вещества и сравнивают с результатом, определенным в контрольных культурах. Для каждой концентрации исследуемого вещества вычисляется процент задержки роста (процент жизнеспособных клеток), если экстракт оказывает цитотоксический эффект на клетки. Значение $IC_{50}$ (т. е. концентрация, снижающая содержание нейтрального красного на 50 %) рассчитывается по зависимости концентрации и выражается в процентах разбавления экстракта. Исходный экстракт обозначается как 100 % экстракт.

#### А.2.2 Материалы

А.2.2.1 Линия клеток

Клетки линии BALB/c 3T3, клон 31 [например, ECACC86110401, Европейская коллекция клеточных культур, Солсбери, Уилтшир SP4 0JG, Великобритания; CCL-163, Американская коллекция типовых культур (ATCC), Манассас, Вирджиния, США] и JCRB 9005, приготовленные из CCL-163 (ATCC), Банк научно-исследовательских ресурсов, Осака, Япония.

А.2.2.2 Оборудование

А.2.2.2.1 Инкубатор, температура 37 °С, с увлажнением, 5 % $CO_2$/воздух [альтернативно, при отсутствии подходящего буфера в клеточной культуральной среде можно применить 7,5 % $CO_2$/воздух, потому что клетки крайне чувствительны к изменениям в pH; тем не менее в большинстве лабораторий чаще используют 5 %, а HEPES (кислоту) добавляют для качественной буферизации].

А.2.2.2.2 Шкаф с ламинарным потоком воздуха, стандарт: «биологическая опасность».

А.2.2.2.3 Водяная баня, температура 37 °С.

А.2.2.2.4 Инверсионный фазово-контрастный микроскоп.

А.2.2.2.5 Лабораторная горелка.

А.2.2.2.6 Центрифуга, как вариант, снабженная микропланшетным ротором.

А.2.2.2.7 Лабораторные весы.

А.2.2.2.8 Фотометр для 96-луночных планшетов, оснащенный фильтром 540 нм.

А.2.2.2.9 Встряхиватель для микротитрационных планшетов.

А.2.2.2.10 Счетчик клеток или гемоцитометр.

А.2.2.2.11 Устройство для пипетирования.

А.2.2.2.12 Пипетки, 8-канальные пипетки, блок разбавления.

А.2.2.2.13 Криопробирки.

А.2.2.2.14 Колбы для тканевых культур, 80 $см^2$, 25 $см^2$.

А.2.2.2.15 96-луночные микротитрационные планшеты для тканевых культур.

А.2.2.3 Химические реагенты, среды и сыворотки

А.2.2.3.1 Модифицированная по Дульбекко среда «Игла» (DMEM), без L-глутамина.

А.2.2.3.2 L-глутамин, 200 мМ или глутамакс.

А.2.2.3.3 Сыворотка новорожденного теленка (NBCS).

**ВАЖНО — Запрещено использовать фетальную (эмбриональную) сыворотку теленка (FCS). FCS вызывает сильное снижение OD из-за образования вакуолей в клетках.**

Из-за вариаций партий NBCS необходимо сначала проверить партию на свойства стимулировать рост клеток 3T3 (период удвоения 20 до 25 ч) и затем оставить достаточное количество NBCS.

А.2.2.3.4 Раствор трипсин/EDTA.

А.2.2.3.5 Фосфатно-буферный физиологический раствор (PBS), без $Ca^{2+}$ и $Mg^{2+}$ (для трипсинизации).

А.2.2.3.6 HEPES (см. А.2.2.2.1).

А.2.2.3.7 PBS с $Ca^{2+}$ и $Mg^{2+}$ (для промывания).

А.2.2.3.8 Раствор пенициллин/стрептомицин.

А.2.2.3.9 Нейтральный красный (NR).

A.2.2.3.10 Диметилсульфоксид (DMSO), аналитической чистоты.

A.2.2.3.11 Этанол (EtOH), аналитической чистоты.

A.2.2.3.12 Ледяная уксусная кислота, аналитической чистоты.

A.2.2.3.13 Дистиллированная вода или любая очищенная вода, пригодная для клеточного культивирования.

A.2.2.4 Стадия подготовки

A.2.2.4.1 Общие требования

Все растворы (кроме исходного раствора NR, среды NR и десорбирующего NR раствора), стеклянная посуда и т. д. должны быть стерильными. Все процедуры следует проводить в условиях асептики и в стерильных условиях шкафа с ламинарным потоком воздуха (стандарта биологической опасности).

A.2.2.4.2 Среды

DMEM (забуференная бикарбонатом натрия), дополненная (приводят рабочие концентрации DMEM).

a) Для замораживания:
   - 20 % NBCS;
   - от 7 % до 10 % DMSO.

b) Для обычного культивирования:
   - 10 % NBCS;
   - 4 мМ L-глутамина или глутамакса;
   - 100 IU/мл пенициллина;
   - 100 мг/мл стрептомицина;
   - 20 мМ HEPES.

c) Для обработки исследуемыми образцами:
   - 5 % NBCS;
   - 4 мМ глутамина или глутамакса;
   - 100 IU/мл пенициллина;
   - 100 мг/мл стрептомицина;
   - 20 мМ HEPES.

Готовые среды следует хранить при температуре 4 °С не более 2 нед.

Концентрация сыворотки в среде обработки сокращена до 5 %, так как белки сыворотки могут скрыть токсичность исследуемого вещества. Сыворотку полностью не исключают, так как рост клеток заметно сокращается при ее отсутствии.

A.2.2.4.3 Исходный раствор нейтрального красного (NR):

- 0,4 г красителя NR;
- 100 мл $H_2O$.

Раствор следует приготовить предварительно перед использованием и хранить в темноте при комнатной температуре не более 2 мес. Коммерчески приготовленные исходные растворы нейтрального красного могут быть использованы до истечения их срока годности при хранении согласно этикетке.

A.2.2.4.4 Среда с нейтральным красным (NR):

- 1 мл исходного раствора NR;
- 79 мл DMEM.

Среда с NR должна быть инкубирована за ночь при температуре 37 °С и центрифугирована при 600 g на 10 мин (для удаления кристаллов NR) перед добавлением к клеткам. Альтернативные процедуры (например, миллипоровое фильтрование) могут быть применены при условии гарантии, что среда NR не содержит кристаллов. Аликвоты среды с NR следует поддерживать при температуре 37 °С (например, на водяной бане) перед добавлением к клеткам. Они должны быть использованы в течение 30 мин после приготовления и в течение 15 мин после удаления из хранения при температуре 37 °С.

A.2.2.4.5 Раствор этанол/уксусная кислота (десорб NR):

- 1 % раствора ледяной уксусной кислоты;
- 50 % этанола;
- 49 % $H_2O$.

Раствор следует готовить непосредственно перед использованием и хранить не более 1 ч.

A.2.2.4.6 Приготовление экстракта из пробы

Исследуемые пробы экстрагируют в соответствии с требованиями ISO 10993-12.

**A.2.3 Методы исследований**

A.2.3.1 Общие положения

Информация о стандартных методах культивирования клеток приведена в приложении С [1].

A.2.3.2 Проверка качества пробы (I); положительный контроль (PC)

Положительный контроль должен быть включен в каждое исследование цитотоксичности.

Как показал многолетний опыт внутри- и межлабораторных повторных исследований, из многих химических веществ лаурилсульфат натрия (SLS, CAS # 151-21-3) является одним из наиболее часто применяемых в качестве PC. Рекомендуется испытывать SLS в диапазоне четырех концентраций: 0,05; 0,1; 0,15; 0,2 мг/мл.

Справочное среднее значение SLS ($IC_{50}$) (Spielmann et. al., 1991 [10]) равно 0,093 мг/мл, с доверительным интервалом при 95 % от 0,070 до 0,116 мг/мл.

Исследование отвечает критерию приемлемости, если $IC_{50}$ для SLS находится в рамках 95 % надежности.

В качестве положительных и отрицательных стандартных образцов рекомендуется использовать, например, ZDEC и ZDBC (см. сноску 1) на с. 2 и 3.2 и 3.4)].

А.2.3.3 Проверка качества пробы (II); контрольный экстрагент

Абсолютная величина (без относительно контроля) оптической плотности [$OD_{540}$ для исследования на цитотоксичность с нейтральном красным (NRU)], полученная в контроле (клетки, не взаимодействующие с исследуемым веществом), показывает, выросли ли экспоненциально клетки в количестве $1 \cdot 10^4$, посеянные на лунку, с нормальным временем удвоения в течение двух дней пробы.

Исследование отвечает критерию приемлемости, если среднее значение $OD_{540}$ контролей ≥0,3.

Для проверки систематических ошибок высевания клеток контроли обрабатывают при условиях экстракции (см. А.2.2.4.6) и помещают на левую (ряд 2) и на правую (ряд 11) стороны 96-луночного планшета (ряд 1 и ряд 12 не следует использовать; для схемы планшета, см. приложение Е [1]).

Исследование отвечает критерию приемлемости, если левое и правое средние значения контролей не отличаются более чем на 15 % от среднего значения всех контролей.

Проверки на ошибки высевания клеток также можно проводить путем осмотра каждого планшета под фазовым контрастным микроскопом для того, чтобы убедиться в постоянстве количества клеток. Микроскопическая оценка устраняет необходимость в двух рядах контролей.

А.2.3.4 Проверка зависимости «концентрация—реакция»

$IC_{50}$, полученный из кривой «концентрация—реакция», должен быть обоснован по меньшей мере двумя или, если возможно, тремя реакциями между 10 % и 90 % ингибирования NRU. Если этого не происходит и коэффициент прогрессирования концентрации можно уменьшить, то следует прекратить исследование и повторить его с меньшим коэффициентом прогрессирования.

А.2.3.5 Концентрации экстрактов из исследуемой пробы

А.2.3.5.1 Определение диапазона концентраций

Исследуют восемь концентраций экстракта из исследуемой пробы путем разведения исходного раствора в достаточно широком диапазоне. Если уменьшение жизнеспособности клеточной культуры при наивысшей концентрации экстракта образца составляет 30 % или менее, то образец должен быть признан нецитотоксичным и дальнейшие исследования не нужны.

А.2.3.5.2 Проведение исследования

Зависящий от угла наклона кривой «концентрация — ответ», вычисленного для найденного диапазона концентраций, фактор растворения в сериях концентрации основного исследования должен быть еще меньше (например, $\sqrt[6]{10} = 1{,}47$). Разделяют соответствующий диапазон концентраций (между 10 % и 90 % эффекта) по меньшей мере тремя точками отмеченного эффекта, избегая слишком многих нецитотоксичных и/или 100 %-ных цитотоксичных концентраций.

А.2.3.6 Проведение исследования

**ВАЖНО — После размораживания начальной культуры клеток проводят два или три пассажа клеток перед их использованием в исследовании.**

В таблице А.1 приведен порядок проведения исследования 3Т3-клетками на цитотоксичность с NRU.

Первые сутки:

- готовят клеточную суспензию из $1 \cdot 10^5$ клеток/мл в культуральной среде. Используя многоканальную пипетку, распределяют 100 мкл культуральной среды только в периферийные лунки 96-луночного микротитрационного планшета для тканевых культур (тоже делают для контрольных планшет, см. [1]). В оставшиеся лунки помещают 100 мкл клеточной суспензии из $1 \cdot 10^5$ клеток/мл (или $1 \cdot 10^4$ клеток/лунку). Готовят один планшет для исследуемого экстракта, один планшет для РС и один планшет для отрицательного контрольного образца, при их использовании;
- инкубируют клетки 24 ч (5 % $CO_2$, 37 °С, > 90 % влажности), чтобы клетки сформировали полуконфлюэнтный монослой. Этот период инкубации обеспечивает нормализацию состояния клеток, адгезию и переход к фазе экспоненциального роста;
- осматривают каждый планшет под фазово-контрастным микроскопом, чтобы убедиться в том, что рост клеток относительно равномерен по всему микротитрационному планшету. Данную проверку проводят для выявления ошибок.

Вторые сутки:

- после 24 ч инкубации удаляют культуральную среду из лунок;
- в каждую лунку добавляют 100 мкл среды, содержащей либо соответствующую концентрацию экстракта из испытуемой пробы, либо отрицательный контроль, либо РС, либо исключительно среду (контроль);
- инкубируют клетку 24 ч (5 % $CO_2$, 37 °С, > 90 % влажности).

Третьи сутки:

- после 24 ч инкубации осматривают каждый планшет под фазовым контрастным микроскопом для определения систематических ошибок высевания клеток и характеристик роста клеток, обработанных экстрактом, и клеток контроля. Регистрируют изменения в морфологии клеток из-за цитотоксических эффектов экстракта иссле-

дуемого образца, но не используют эти записи для вычисления наивысшей переносимой дозы (HTD) или другого количественного измерения цитотоксичности. Нежелательные характеристики роста клеток в контроле могут указывать на ошибку и быть причиной прекращения исследования.

Исследование на цитотоксичность с нейтральным красным (NRU) базируется на методе Эллен Боренфройнд (см. [3]). Поглощение нейтрального красного NR лизосомами/эндосомами и вакуолями живых клеток используется как количественное показание количества и жизнеспособности клеток;

- промывают клетки 150 мкл подогретого PBS, удаляют промывочный раствор легким постукиванием и добавляют 100 мкл среды нейтрального красного NR, затем инкубируют при температуре 37 °С в увлажненной атмосфере 5 % $CO_2$ в течение 3 ч;
- после инкубации удаляют среду NR и промывают клетки 150 мкл PBS;
- полностью удаляют PBS (например, центрифугируют перевернутый планшет);
- добавляют 150 мкл раствора для десорбции NR (этанол/уксусная кислота) во все лунки, включая контроли;
- быстро встряхивают микротитрационный планшет на встряхивателе для микротитрационных планшетов в течение 10 мин до тех пор, пока NR не экстрагируется из клеток и не сформирует гомогенный раствор;
- измеряют абсорбцию полученного окрашенного раствора при длине волны 540 нм на ридере для микротитрационных планшетов, используя контрольный экстрактант в качестве стандарта для сравнения. Сохраняют необработанные данные в компьютерном формате (например, ASCII, TXT, XLS), подходящем для дальнейшего анализа кривой «концентрация—отклик» и вычисления $IC_{50}$.

**А.2.4 Анализ данных**

Расчет жизнеспособности клеток, обозначаемой NRU, проводят для каждой концентрации экстракта из пробы путем использования среднего значения NRU шести повторных значений на исследуемую концентрацию экстракта. Это значение сравнивают со средним NRU всех контрольных значений (если контроли отвечают критерию приемлемости). Относительную жизнеспособность клеток затем выражают как процент от значений выживаемости клеток в контроле. При возможности, восемь концентраций каждого исследуемого экстракта должны быть в диапазоне значений от отсутствия эффекта до полного ингибирования жизнеспособности клеток.

Таблица А.1 — Порядок проведения исследования с 3Т3-клетками на цитотоксичность NRU

| Время, ч | Действие |
|---|---|
| 00:00 | Засеивают 96-луночные планшеты: $1 \cdot 10^4$ клеток/100 мл культуральной среды DMEM на лунку. Инкубируют (37 °С/5 % $CO_2$/22 до 24 ч) |
| 24:00 | Удаляют культуральную среду |
| 24:00 | Обрабатывают восемь концентраций экстракта исследуемого образца в среде обработки (100 мкл) (контроль = среда обработки). Инкубируют (37 °С/5 % $CO_2$/24 ч) |
| 48:00 | Микроскопическая оценка морфологических изменений<br>Удаляют среду обработки.<br>Промывают один раз 150 мкл PBS.<br>Добавляют 100 мкл среды NR.<br>Инкубируют (37 °С/5 % $CO_2$/3 ч) |
| 51:00 | Удаляют среду NR.<br>Промывают один раз с 150 мкл PBS.<br>Добавляют 150 мкл десорбирующего фиксатора NR (этанол/раствор уксусной кислоты) |
| 51:40 | Встряхивают планшет в течение 10 мин |
| 51:50 | Определяют NR при длине волны 540 нм (т. е. жизнеспособность клеток) |

Если относительная жизнеспособность клеток для наивысшей концентрации экстракта образца (100 %-ный экстракт) меньше, чем 70 % от контрольной группы, то концентрацию исследуемого химического вещества, отражающую 50 %-ное ингибирование жизнеспособности клеток (т. е. $IC_{50}$), определяют по кривой «концентрация — отклик».

Это можно сделать, применив:

- либо ручной графический метод подбора кривой.

Рекомендуется применение вероятностной сетки со шкалами «$X$ = лог» и «$Y$ = пробит», так как во многих случаях функция «концентрация — отклик» становится почти линейной в соответствующем диапазоне. Для этого метода также подходит полулогарифмическая бумага;

- либо любую подходящую нелинейную процедуру регрессии (предпочтительно функция Хилла[1)] или логистическая регрессия) к данным «концентрация — отклик».

Перед использованием $IC_{50}$ для дальнейших вычислений качество соответствия следует должным образом проверить.

Если относительная жизнеспособность клеток для наивысшей концентрации экстракта образца (100 %-ный экстракт) ≥ 70 % от контрольной группы, то материал признают нецитотоксичным.

1) Функции Хилла монотонны и сигмоидальной формы и представляют приемлемую модель для многих кривых «доза — отклик».

**Приложение В**
**(справочное)**

## Исследование на цитотоксичность по колониеобразованию

### В.1 Общие положения

Методы исследований основаны на части I исследования на цитотоксичность руководства по основным биологическим исследованиям медицинских материалов и изделий (см. [2]).

Примечание — В данном приложении приведены только сведения из разделов Части I, относящиеся к исследованию цитотоксичности.

### В.2 Проведение исследований

#### В.2.1 Основная процедура

Клетки V79 высевают в шестилуночные планшеты и поддерживают в культуре 24 ч до начала роста в логарифмической фазе. Затем в каждую лунку вносят исследуемое соединение с разверткой по концентрации. Планшеты инкубируют шесть дней для создания достаточно крупных для подсчета колоний. Колонии фиксируют метанолом, окрашивают раствором Гимза и подсчитывают. Если экстракт оказывает цитотоксический эффект, вычисляют $IC_{50}$ (концентрация с ингибирующей эффективностью культуры клеток до 50 %) и выражают как процент экстракта.

#### В.2.2 Материал

В.2.2.1 Линия клеток

Клетки V79 (JCRB 0603, Банк научно-исследовательских ресурсов, Осака, Япония, доступны из других банков клеток в США и ЕС).

Примечание — Рекомендуются клетки V79, так как они формируют большие и четкие колонии.

В.2.2.2 Техническое оборудование

В.2.2.2.1 Инкубатор, температура 37 °С, увлажненный, 5 % $CO_2$/воздух.

В.2.2.2.2 Шкаф с ламинарным потоком воздуха, стандарт: «биологическая опасность».

В.2.2.2.3 Водяная баня, температура 37 °С.

В.2.2.2.4 Инверсионный фазово-контрастный микроскоп.

В.2.2.2.5 Стереомикроскоп.

В.2.2.2.6 Лабораторная горелка.

В.2.2.2.7 Лабораторные весы.

В.2.2.2.8 Счетчик клеток или гемоцитометр.

В.2.2.2.9 Устройство для пипетирования.

В.2.2.2.10 Пипетки.

В.2.2.2.11 Флаконы для тканевых культур, 75; 25 $см^2$ или чашка для тканевых культур диаметром 100 мм.

В.2.2.2.12 Шестилуночные микротитрационные планшеты для тканевых культур.

В.2.2.3 Химические вещества, среды и сыворотки

В.2.2.3.1 Минимальная эссенциальная среда «Игла» (MEM), содержащая сбалансированный солевой раствор «Игла».

В.2.2.3.2 Фетальная сыворотка теленка (FCS).

Примечание — Из-за вариаций между партиями FCS необходимо сначала проверить партию на свойства стимуляции роста с клетками V79 и затем оставить достаточное количество FCS.

В.2.2.3.3 Раствор трипсин/EDTA.

В.2.2.3.4 Фосфатно-буферный физиологический раствор (PBS), без $Ca^{2+}$ и $Mg^{2+}$ (для трипсинизации).

В.2.2.3.5 Раствор пенициллин/стрептомицин.

В.2.2.3.6 Диметилсульфоксид (DMSO) аналитического класса.

В.2.2.3.7 Метанол аналитического класса.

В.2.2.3.8 Раствор Гимза.

В.2.2.3.9 Фосфатно-буферный раствор.

В.2.2.3.10 Дистиллированная вода или любая очищенная вода, пригодная для клеточного культивирования.

В.2.2.3.11 Бикарбонат натрия.

В.2.2.3.12 L-глутамин.

В2.2.3.13 MEM раствор неосновных аминокислот.

В.2.2.3.14 Пируват натрия, 100 mM.

В.2.2.4 Стадия подготовки

В.2.2.4.1 Общая часть

Все растворы (кроме раствора Гимза), стеклянная посуда и т. д. должны быть стерильными, и все процедуры следует проводить в условиях асептики и в стерильных условиях вытяжного шкафа с ламинарным потоком воздуха (стандарт биологической опасности).

B.2.2.4.2 Среды

1000 мл MEM «Игла» дополняют следующим образом:

a) для замораживания и обычного культивирования используют среду с 10 % FCS (MEM 10):
   - 111 мл FCS,
   - 2,2 г бикарбоната натрия,
   - 0,292 г L-глутамина;

b) для экстракции и обработки используют среду с 5 % FCS (MEM 05):
   - 53,5 мл FCS,
   - 5 мл MEM раствор неосновных аминокислот,
   - 10 мл пирувата натрия, 100 мМ,
   - 0,292 г L-глутамина,
   - 2,2 г бикарбоната натрия.

Готовые среды следует хранить при температуре 4 °C не более 1 мес.

Концентрация сыворотки в среде обработки сокращена до 5 %, так как белки сыворотки могут скрыть токсичность исследуемого вещества. Сыворотку не исключают полностью, так как рост клеток заметно сокращается при ее отсутствии. Подходящее количество антибиотиков может быть добавлено в описанную выше среду, если они не оказывают неблагоприятного воздействия на пробу.

B.2.2.4.3 5 %-ный раствор Гимза:

- 5 мл раствора Гимза;
- 95 мл любой фосфатно-буферного раствор с pH от 6,5 до 7,5.

Раствор следует приготовить непосредственно перед использованием.

B.2.2.4.4 Приготовление экстракта из исследуемой пробы

Исследуемую пробу экстрагируют в соответствии с ISO 10993-12, но рекомендуется, чтобы соотношение площади поверхности экстрагируемого образца к объему экстрактанта было 6 $см^2$/мл, а массы к объему экстрактанта — 0,1 г/мл (см. [6], [7], [11]).

Экстракт отделяется декантацией, является 100 %-ым экстрактом, который разбавляют средой MEM05 для получения различных процентных соотношений разбавленного экстракта.

**B.2.3 Методы исследований**

B.2.3.1 Общие положения

Информация об установленных методах клеточных культур приведена в приложении C и [1].

B.2.3.2 Проверка качества пробы (I); положительный контроль и отрицательный контроль

Положительный и отрицательный контрольные образцы должны быть включены в каждое исследование цитотоксичности. В качестве положительных и отрицательных контрольных образцов рекомендуется использовать, например, ZDEC и ZDBC (см. 3.2, примечание).

Следующий критерий приемлемости следует использовать для ZDEC и ZDBC:

a) $IC_{50}$ для ZDEC не должен превышать 7 %;

b) $IC_{50}$ для ZDBC не должен превышать 80 %.

B.2.3.3 Проверка качества пробы (II); контрольный экстрагент

Исследование отвечает критерию приемлемости, если среднее число колоний в контроле составляет по меньшей мере 70 % от числа клеток, высеянных на лунку.

B.2.3.4 Проверка зависимости «концентрация — отклик»

$IC_{50}$, полученный по кривой «концентрации — отклик», должен быть подтвержден, по меньшей мере, значениями двух или, если возможно, трех реакций в диапазоне от 10 % до 90 % ингибирования контроля. Если этого не происходит и коэффициент прогрессирования концентрации можно уменьшить, то исследование прекращают и проводят его повторно с меньшим коэффициентом прогрессирования.

B.2.3.5 Концентрации экстрактов из испытуемой пробы

B.2.3.5.1 Определение диапазона концентраций

Исследуют четыре концентрации экстракта пробы путем разведения исходного раствора постоянным фактором, покрывая широкий диапазон, например 1 ≥ 1/10 ≥ 1/100 ≥ 1/1000. Если снижение жизнеспособности клеточной культуры при наивысшей концентрации экстракта образца составляет 30 % или менее, то материал должен быть признан нецитотоксичным и дальнейшие исследования не нужны.

B.2.3.5.2 Проведение исследования

В зависимости от угла наклона кривой «концентрация—отклик», вычисленной при нахождении диапазона, фактор растворения/концентрации в сериях концентрации основного исследования должен быть меньше. По возможности покрывают соответствующий диапазон концентрации (между 10 % и 90 % эффекта) по меньшей мере тремя точками измеренного отклика, избегая слишком многих нецитотоксичных и/или 100 %-ных цитотоксичных концентраций.

B.2.3.6 Проведение исследования

**ВАЖНО — После размораживания начальной культуры клеток следует провести два или три пассажа клеток перед их использованием в исследовании.**

Первые сутки:

- готовят клеточную суспензию из 33,3 клеток/мл в среде МЕМ05. Помещают 3 мл суспензии в каждую лунку 6-луночного планшета.

Вторые сутки:

- после 24 ч инкубации удаляют культуральную среду из каждой лунки. Добавляют 2 мл 100 %-ного или разведенного экстракта, приготовленного со средой МЕМ05. Исследуют каждую концентрацию три раза. Инкубируют в инкубаторе еще шесть дней.

Восьмые сутки:

- удаляют среду обработки из каждой лунки, тщательно промывают лунки ФБ, фиксируют колонии метанолом, окрашивают их 5 %-ным раствором Гимза и определяют число колоний в каждой лунке.

B.2.3.7 Обработка результатов

Обработка результатов:

- осматривают лунки при помощи стереомикроскопа и определяют число колоний, состоящих из 50 или более клеток в каждой лунке;
- регистрируют число колоний в лунке;
- определяют среднее число колоний для каждой концентрации экстракта;
- делят это число на число, полученное от контрольной группы, и выражают коэффициент (эффективность культивирования, ЭК РЕ) в процентах;
- если эффективность культивирования для наивысшей концентрации экстракта образца (100 %-ный экстракт) менее чем 70 % контрольной группы, то материал признают потенциально цитотоксичным и цитотоксичность исследуемых образцов выражают со значением $IC_{50}$ как процентное соотношение;
- $IC_{50}$ (концентрация, ингибирующая ЭК РЕ до 50 %) вычисляют как дозу с 50 %-ной относительной степенью выживания, определяемую от линии, которая проходит через дозу с более высоким выживанием, и дозу с выживанием менее 50 %;
- если эффективность культивирования ≥70 % контрольной группы, то материал признают нецитотоксичным.

Примечание — Если эффективность культивирования при наивысшей концентрации находится между 50 % и 70 %, то допускается не вычислять значение $IC_{50}$ при наивысшей концентрации.

**B.2.4 Отчет об исследовании**

Отчет об исследовании должен содержать сведения в соответствии с разделом 9, в который дополнительно включают следующее:

a) контроль ЭК РЕ в заданных условиях;

b) все данные исследования, включая число колоний, кривые ингибирования формирования колоний, и, по возможности, значения $IC_{50}$, полученные для исследуемых проб.

## Приложение С
## (справочное)

## Исследование на цитотоксичность с применением МТТ-теста

### С.1 Общие положения

Метод исследования основан на измерении жизнеспособности клеток через их метаболическую активность [9]. Желтый водорастворимый МТТ [3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолий бромида] в процессе метаболизма в жизнеспособных клетках превращается в сине-фиолетовый формазан. Количество жизнеспособных клеток соответствует интенсивности цвета, определяемой фотометрическими измерениями после растворения формазана в спирте.

### С.2 Проведение исследований

#### С.2.1 Основная процедура

Клетки L929 высевают в 96-луночные планшеты и поддерживают в культуре 24 ч (~1 период удвоения) для формирования полуконфлуэнтного монослоя (см. ссылку [5] для дополнительной информации по процедуре культивирования). Затем в каждую лунку вносят исследуемое соединение в нескольких концентрациях. После 24 ч инкубации количество формазана определяют для каждой концентрации исследуемого вещества и сравнивают с контрольными культурами. Для каждой концентрации вычисляют степень ингибирования роста в процентах.

#### С.2.2 Материалы

С.2.2.1 Линия клеток

Клетки L-929 [NCTC клон 929: CCL 1, Американская коллекция типовых культур (ATCC), Манассас, Вирджиния, США; ECACC No. 88102702, Европейская коллекция клеточных культур, Солсбери, Уилтшир SP4 0JG, Великобритания]. Клеточные культуры должны быть свободными от микоплазмы.

С.2.2.2 Техническое оборудование

С.2.2.2.1 Инкубатор, температура 37 °С, с увлажнением, 5 % $CO_2$/воздух.

С.2.2.2.2 Шкаф с ламинарным потоком воздуха, стандарт: «биологическая опасность».

С.2.2.2.3 Водяная баня, температура 37 °С.

С.2.2.2.4 Инверсионный фазово-контрастный микроскоп.

С.2.2.2.5 Лабораторная горелка.

С.2.2.2.6 Центрифуга, снабженная микропланшетным ротором.

С.2.2.2.7 Лабораторные весы.

С.2.2.2.8 96-луночный планшетный фотометр, оснащенный фильтром 570 нм (основная длина волны 650 нм).

С.2.2.2.9 Встряхиватель для микротитрационных планшетов.

С.2.2.2.10 Счетчик клеток или гемоцитометр.

С.2.2.2.11 Устройство для пипетирования.

С.2.2.2.12 Пипетки, 8-канальные пипетки, блок разбавителя.

С.2.2.2.13 Криопробирки.

С.2.2.2.14 Флаконы для тканевых культур или чашки Петри для тканевых культур.

С.2.2.2.15 96-луночные микротитрационные планшеты для тканевых культур.

С.2.2.3 Химические реагенты, среды и сыворотки

С.2.2.3.1 Минимальная эссенциальная среда «Игла» (MEM) без фенолового красного, без глутамина и без $NaHCO_3$.

С.2.2.3.2 Фетальная сыворотка теленка (FCS).

С.2.2.3.3 Раствор трипсин/EDTA.

С.2.2.3.4 Фосфатно-буферный физиологический раствор (PBS).

С.2.2.3.5 МТТ [3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолий бромида].

С.2.2.3.6 Изопропанол аналитической чистоты.

С.2.2.4 Стадия подготовки

С.2.2.4.1 Общая часть

Все растворы, стеклянная посуда и т. д. должны быть стерильными, и все процедуры следует проводить в условиях асептики и в стерильных условиях шкафа с ламинарным потоком воздуха (стандарта биологической опасности).

С.2.2.4.2 Среды

MEM (забуференная бикарбонатом натрия), дополненная (приводят финальные концентрации в MEM):

a) для замораживания:
   - 20 % FCS,
   - 7 % до 10 % DMSO;

b) для обычного культивирования:
   - 10 % FCS,

- 4 мМ глутамина или глутамакса,
- 100 IU/мл пенициллина,
- 100 mg/мл стрептомицина.

Готовые среды следует хранить при температуре 4 °С не более 2 нед.

С.2.2.4.3 Раствор МТТ

МТТ растворяют в свежем виде в МЕМ без добавок и без фенолового красного при концентрации 1 мг/мл.

Раствор стерилизуют, используя шприцевые фильтры (размер пор ≤ 0,22 мкм). Раствор должен быть использован в тот же день.

С.2.2.4.4 Приготовление экстракта из исследуемой пробы

Исследуемые пробы экстрагируют в соответствии с ISO 10993-12.

**С.2.3 Методы исследований**

С.2.3.1 Общие положения

Информация о стандартных методах культивирования клеток приведена в [1].

С.2.3.2 Проверка качества пробы (I); положительный контроль и отрицательный контроль.

Положительный и отрицательный контроли должны быть включены в каждое исследование цитотоксичности. В качестве положительных и отрицательных стандартных образцов рекомендуется использовать, например, ZDEC и ZDBC (см. 3.2, примечание).

С.2.3.3 Проверка качества пробы (II); контрольный экстрагент

Абсолютная величина оптической плотности $OD_{570}$, полученная в контроле, показывает, выросли ли экспоненциально клетки в количестве $1 \cdot 10^4$, посеянные на лунку, с нормальным временем удвоения пробы в течение двух дней.

Исследование отвечает критерию приемлемости, если среднее значение $OD_{570}$ контролей ≥ 0,2.

Для проверки систематических ошибок при высевании клеток контроли помещают на левую (ряд 2) и на правую (ряд 11) стороны 96-луночного планшета (ряд 1 и ряд 12 не следует использовать; для схемы планшета см. [1]).

Исследование отвечает критерию приемлемости, если левое и правое средние значения контролей не отличаются более чем на 15 % от среднего значения всех контролей.

Проверка на ошибки при посеве клеток также может быть выполнена путем осмотра каждого планшета под фазово-контрастным микроскопом для того, чтобы убедиться в постоянстве количества клеток. Микроскопическая оценка устраняет необходимость в двух дублях контролей.

С.2.3.4 Проведение исследований

**ВАЖНО — После размораживания начальной культуры клеток следует провести два или три пассажа клеток перед их использованием в исследовании.**

В таблице С.1 приведен порядок проведения исследований.

Первые сутки после выращивания клеток из замороженного сырья:

- культуры клеток удаляют из флаконов для культур путем ферментативного отслаивания (трипсин/ЭДТА) и центрифугируют клеточную суспензию (200 *g*, 3 мин). Клетки затем ресуспендируют в культуральной среде и клеточную суспензию устанавливают при плотности в $1 \cdot 10^5$ клеток/мл. Используя мультиканальную пипетку, помещают 100 мкл только культуральной среды (контроль) в периферийные лунки 96-луночного микротитрационного планшета для тканевых культур (= контроли, см. [1]). В оставшиеся лунки помещают 100 мкл клеточной суспензии из $1 \cdot 10^5$ клеток/мл (=$1 \cdot 10^4$ клеток/лунку);
- инкубируют клетки 24 ч (5 % $CO_2$, 37 °С, > 90 % влажности), чтобы клетки сформировали полуконфлюэнтный монослой. Этот период инкубации обеспечивает восстановление клеток, адгезию и переход к фазе экспоненциального роста;
- осматривают каждый планшет под фазово-контрастным микроскопом для того, чтобы убедиться в том, что рост клеток относительно равномерен по всему микротитрационному планшету. Данную проверку проводят для выявления ошибок.

Вторые сутки:

- после 24 ч инкубации удаляют культуральную среду из лунок;
- в лунку добавляют 100 мкл среды, содержащей либо соответствующую концентрацию экстракта образца, либо отрицательный контроль, либо положительный контроль, либо исключительно среду (контроль). Необходимо исследовать по меньшей мере четыре разные концентрации экстракта исследуемого образца или экстракта положительного контроля. Наибольшей концентрацией должен быть 100 %-ный экстракт, а другие концентрации должны быть разумно размещены в пределах одного логарифмического диапазона. Для отрицательного контроля исследуют только 100 %-ный экстракт. Культуральную среду используют как контроль;
- инкубируют клетки в течение 24 ч (5 % $CO_2$, 37 °С, > 90 % влажности).

Третьи сутки:

- после 24 ч инкубации осматривают каждый планшет под фазово-контрастным микроскопом для определения систематических ошибок высевания клеток и характеристик роста клеток в присутствии экстракта и клеток контроля. Регистрируют изменения в морфологии клеток, связанные с цитотоксичностью экстракта исследуемого образца, но не используют эти записи для вычисления какого-либо количественного измерения цитотоксичности.

Нежелательные характеристики роста контрольных клеток могут означать ошибку эксперимента и могут быть причиной отказа от продолжения исследования.

После осмотра планшетов осторожно удаляют из них культуральную среду, что существенно с учетом того, что химические восстановители в экстракте также могут снизить действие МТТ, приводя к ложным отрицательным результатам. 50 мкл раствора МТТ (см. С.2.2.4.3) добавляют к каждой тестовой лунке и планшеты инкубируют еще 2 ч в инкубаторе при температуре 37 °С. Раствор МТТ удаляют и добавляют 100 мкл изопропанола к каждой лунке. Покачивают планшет и затем переносят его на ридер микротитрационных планшетов, оснащенный фильтром 570 нм для считывания абсорбции (опорная длина волны 650 нм).

Таблица С.1 — Порядок проведения исследования на цитотоксичность с применением МТТ-теста

| Время, ч | Действие |
|---|---|
| 00:00 | Засеивают 96-луночные планшеты: $1\times10^4$ клеток/100 мкл культуральной среды МЕМ на лунку<br>Инкубируют (37 °С/5 % $CO_2$/от 22 до 26 ч) |
| 24:00 | Удаляют культуральную среду |
| 24:00 | Обрабатывают ≥ 4 концентрациями экстракта исследуемой пробе в среде обработки (100 мкл) (необработанный контроль = среда обработки).<br>Инкубируют (37 °С/5 % $CO_2$ /24 ч) |
| 48:00 | Микроскопическая оценка морфологических изменений<br>Удаляют культуральную среду.<br>Добавляют 50 мкл раствора МТТ.<br>Инкубируйте (37 °С/5 % $CO_2$ /2 ч) |
| 51:00 | Удаляют раствор МТТ.<br>Добавляют 100 мл изопропанола в каждую лунку.<br>Покачивают планшет |
| 51:30 | Определяют абсорбцию при длине волны 570 нм (опорная длина волны 650 нм) |

**С.2.4 Представление результатов**

Полученные данные сохраняют в файл необработанных данных. Результаты представляют в табличной форме, включая экспериментальные группы с предметом исследования, отрицательным и положительным контролями и с контролем экстрактанта.

**С.2.5 Обработка результатов**

Уменьшение количества жизнеспособных клеток приводит к снижению их метаболической активности в присутствии образца. Это снижение напрямую коррелирует с количеством образовавшегося сине-фиолетового формазана при регистрации оптической плотности раствора при длине волны 570 нм. Снижения жизнеспособности клеток по сравнению с контролем экстрактанта вычисляют по формуле

$$\text{Жизнеспособность } \% = \frac{100 \cdot OD_{570e}}{OD_{570b}}, \qquad (C.1)$$

где $OD_{570e}$ — среднее значение измеренной оптической плотности 100 % экстрактов исследуемой пробы;

$OD_{570b}$ — среднее значение измеренной оптической плотности контролей.

Чем ниже значение жизнеспособности в процентах, тем выше цитотоксический потенциал объекта исследования.

Если жизнеспособность снижается до < 70 % от контрольного экстракта, объект исследования обладает цитотоксичностью. 50 %-ный экстракт исследуемой пробы должен обладать так же или более высокой жизнеспособностью, чем 100 %-ный экстракт. В противном случае исследование следует повторить.

**Приложение D**
**(справочное)**

## Исследование на цитотоксичность с применением XTT-теста

### D.1 Общие положения

Метод исследования основан на измерении жизнеспособности клеток посредством митохондриальных дегидрогеназ [9].

XTT [2,3-бис(2-метокси-4-нитро-5-сульфофенил)-5-[(фениламино)карбонил] -2H-гидроксид тетразолия] в процессе метаболизма жизнеспособных клеток превращается в водорастворимый оранжевый формазан. Число жизнеспособных клеток коррелирует с интенсивностью цвета, определяемой фотометрическими измерениями.

### D.2 Проведение исследований

#### D.2.1 Основная процедура

Клетки L929 высевают в 96-луночные планшеты и поддерживают в культуре 24 ч (~1 период удвоения) для формирования полуконфлюэнтного монослоя (см. ссылку [5] для дополнительной информации по процедуре культивирования). Затем в каждую лунку вносят испытуемое соединение в нескольких концентрациях. После 24 ч инкубации количество формазана определяют для каждой концентрации пробы и сравнивается с контрольными культурами. Для каждой концентрации вычисляют ингибирование роста в процентах.

#### D.2.2 Материалы

D.2.2.1 Линия клеток

Клетки линии L-929 (NCTC клон 929: CCL 1, Американская коллекция типовых культур [ATCC], Манассас, Вирджиния, США; ECACC No. 88102702, Европейская коллекция клеточных культур, Солсбери, Уилтшир SP4 0JG, Великобритания). Клеточные культуры должны быть свободными от микоплазмы.

D.2.2.2 Техническое оборудование

D.2.2.2.1 Инкубатор температура 37 °C, с увлажнением, 5 % $CO_2$/воздух.

D.2.2.2.2 Шкаф с ламинарным потоком воздуха, стандарт: «биологическая опасность».

D.2.2.2.3 Водяная баня, температура 37 °C.

D.2.2.2.4 Инверсионный фазово-контрастный микроскоп.

D.2.2.2.5 Лабораторная горелка.

D.2.2.2.6 Центрифуга, снабженная микропланшетным ротором.

D.2.2.2.7 Лабораторные весы.

D.2.2.2.8 Фотометр для 96-луночных планшетов, оснащенный фильтром 450 нм (опорная длина волны 60 нм).

D.2.2.2.9 Встряхиватель для микротитрационных планшетов.

D.2.2.2.10 Счетчик клеток или гемоцитометр.

D.2.2.2.11 Устройство для пипетирования.

D.2.2.2.12 Пипетки, 8-канальные пипетки, блок разбавления.

D.2.2.2.13 Криопробирки.

D.2.2.2.14 Флаконы для тканевых культур или чашки Петри для тканевых культур.

D.2.2.2.15 96-луночные микротитрационные планшеты для тканевых культур.

D.2.2.3 Химические реагенты, среды и сыворотки

D.2.2.3.1 Минимальная эссенциальная среда «Игла» (MEM) без фенолового красного, без глутамина и без $NaHCO_3$.

D.2.2.3.2 Фетальная сыворотка теленка (FCS).

D.2.2.3.3 Раствор трипсин/ЭДТА.

D.2.2.3.4 Фосфатно-буферный соляной раствор (ФБ).

D.2.2.3.5 XTT (2,3-бис[2-метокси-4-нитро-5-сульфофеник]-2H-тетразолий-5-карбоксианилидная внутренняя соль).

D.2.2.3.6 МСФ (метосульфат феназина).

D.2.2.4 Стадия подготовка

D.2.2.4.1 Общая часть

Все растворы, стеклянная посуда и т. д. должны быть стерильными. Все процедуры следует проводить в условиях асептики и в стерильных условиях шкафа с ламинарным потоком воздуха (стандарта биологической опасности).

D.2.2.4.2 Среды

MEM (забуференная бикарбонатом натрия), дополненная (приводят конечные концентрации в MEM):

а) для замораживания:

- 20 % FCS,
- 7 % до 10 % DMSO;

b) для обычного культивирования:
- 10 % FCS,
- 4 мМ глутамина или глутамакса,
- 100 IU/мл пенициллина,
- 100 мг/мл стрептомицина.

Готовые среды следует хранить при температуре 4 °С не более 2 нед.

D.2.2.4.3 Раствор XTT/PMS

XTT растворяют в свежем виде при температуре от 56 °С до 60 °С MEM без фенолового красного при концентрации 1 мг/мл с помощью встряхивателя. Раствор стерилизуют фильтрацией через шприцевые фильтры (размер пор — ≤ 0,22 мкм). Раствор PMS добавляют к раствору XTT, готовят как раствор 5 мМ в ФБ и стерильно фильтруют через стерильный фильтр 0,22 мкм.

Раствор PMS добавляют к раствору XTT незадолго до использования в концентрации 25 мкм (5 мкл 5 мМ PMS/мл раствора XTT). Раствор XTT/PMS затем немедленно вводят в лунки с пробой.

D.2.2.4.4 Приготовление экстракта из пробы

Пробы экстрагируют в соответствии с ISO 10993-12, используя MEM без фенолового красного и с FBS.

**D.2.3 Методы исследований**

D.2.3.1 Общие положения

Информация о стандартных методах культивирования клеток приведены в [1].

D.2.3.2 Проверка качества пробы (I); положительный контроль (PC) и отрицательный контроль (NC)

Положительный и отрицательный контроли должны быть включены в каждое исследование цитотоксичности. В качестве положительных и отрицательных стандартных образцов рекомендуется использовать, например, ZDEC и ZDBC (см. примечания к 3.2 и 3.4).

D.2.3.3 Проверка качества пробы (II); контроль

Абсолютное значение оптической плотности $OD_{450}$, полученное в контроле, показывает, выросли ли экспоненциально клетки в количестве $1 \cdot 10^4$, посеянные на лунку, с нормальным временем удвоения в течение двух дней анализа.

Исследование отвечает критерию приемлемости, если средняя $OD_{450}$ контролей ≥0,2.

Для проверки систематических ошибок при высевании клеток контроли помещают на левую (ряд 2) и на правую (ряд 11) стороны 96-луночного планшета (ряд 1 и ряд 12 не следует использовать; для схемы планшета — см. [1]).

Исследование отвечает критерию приемлемости, если левое и правое средние значения контролей не отличаются более чем на 15 % от среднего значения всех контролей.

Проверка на ошибки при посеве клеток также может быть выполнена путем осмотра каждого планшета под фазово-контрастным микроскопом для того, чтобы убедиться в постоянстве количества клеток. Микроскопическая оценка устраняет необходимость в двух дублях контролей.

D.2.3.4 Проведение исследований

**ВАЖНО — После размораживания начальной культуры клеток следует провести два или три пассажа клеток перед их использованием в исследовании.**

В таблице D.1 приведен порядок проведения исследования на цитотоксичность с применением XTT-теста.

Первые сутки после выращивания клеток из замороженного сырья:

- культуры клеток удаляют из флаконов для культур путем ферментативного отслаивания (трипсин/ДТА) и центрифугируют клеточную суспензию (200 *g*, 3 мин). Затем клетки ресуспендируют в культуральной среде и клеточную суспензию устанавливают при плотности в $1 \cdot 10^5$ клеток/мл. Используя мультиканальную пипетку, помещают 100 мкл только культуральной среды (контроль) в периферийные лунки 96-луночного микротитрационного планшета для тканевых культур (= контроли, см. [1]). В оставшиеся лунки помещают 100 мкл клеточной суспензии из расчета $1 \cdot 10^5$ клеток/мл (= $1 \cdot 10^4$ клеток/лунка);
- инкубируют клетки 24 ч (5 % $CO_2$, 37 °С, > 90 % влажности), чтобы клетки сформировали полуконфлюэнтный монослой. Этот период инкубации обеспечивает восстановление клеток, адгезию и переход к фазе экспоненциального роста;
- осматривают каждый планшет под фазово-контрастным микроскопом для того, чтобы убедиться в том, что рост клеток относительно равномерен по всему микротитрационному планшету. Данную проверку проводят для выявления ошибок.

Вторые сутки:

- после 24 ч инкубации удаляют культуральную среду из лунок;
- в лунку добавляют 100 мкл среды, содержащей либо соответствующую концентрацию экстракта пробы, либо отрицательный контроль, либо PC, либо исключительно контрольный экстрагент. Необходимо испытать по меньшей мере четыре разные концентрации экстракта исследуемой пробы или экстракта положительного контроля. Наибольшей концентрацией должен быть 100 %-ный экстракт, а другие концентрации должны быть размещены в пределах одного логарифмического диапазона. Для отрицательного контроля испытывают только 100 %-ный экстракт. Культуральную среду используют как контроль;
- инкубируют клетки 24 ч (5 % $CO_2$, 37 °С, > 90 % влажности).

Третьи сутки:

- после 24 ч инкубации осматривают каждый планшет под фазово-контрастным микроскопом для определения систематических ошибок высевания клеток и характеристик роста клеток в присутствии экстракта и клеток контроля. Регистрируют изменения в морфологии клеток, связанные с цитотоксичностью экстракта исследуемой пробы, но не используют эти записи для вычисления какого-либо количественного измерения цитотоксичности. Нежелательные характеристики роста контрольных клеток могут означать ошибку эксперимента и могут быть причиной отказа от продолжения исследования.

После осмотра планшетов к каждой лунке добавляют 50 мкл раствора XTT/PMS. Затем планшеты инкубируют еще от 3 до 5 ч в инкубаторе при температуре 37 °С. Планшеты должны содержаться в темноте. Планшеты осторожно покачивают и аликвоту в 100 мкл переносят из каждой лунки в соответствующую лунку нового планшета. Затем этот планшет переносят на ридер микротитрационных планшетов, оснащенный фильтром 450 нм для считывания абсорбции (опорная длина волны 630 нм).

Таблица D.1 — Порядок проведения исследований на цитотоксичность с применением XTT-теста

| Время, ч | Действие |
|---|---|
| 00:00 | Засеивают 96-луночные планшеты: $1 \cdot 10^4$ клеток/100 мкл культуральной среды MEM на лунку.<br>Инкубируют (37 °С/5 % $CO_2$/22 до 26 ч) |
| 24:00 | Удаляют культуральную среду |
| 24:00 | Обрабатывают ≥ 4 концентрациями экстракта исследуемого образца в среде обработки (100 мкл) (необработанный контроль = среда обработки).<br>Инкубируют (37 °С/5 % $CO_2$/24 ч) |
| 48:00 | Микроскопическая оценка морфологических изменений<br>Добавляют 50 мкл раствора XTT/PMS.<br>Инкубируют (37 °С/5 % $CO_2$/3 ч до 5 ч) |
| 51:00 | Покачивают планшет.<br>Переносят 100 мкл из каждой лунки на новый планшет |
| 51:30 | Определяют абсорбцию при длине волны 450 нм (опорная длина волны — 630 нм) |

**D.2.4 Представление результатов**

Полученные необработанные данные сохраняют в файл. Результаты представляют в форме таблицы, включая экспериментальные группы с предметом исследования, контролем и отрицательным и положительным контролями.

**D.2.5 Обработка результатов**

Уменьшение числа жизнеспособных клеток приводит к снижению общей деятельности митохондриальных дегидрогеназ в присутствии образца. Это снижение напрямую коррелирует с количеством образовавшегося оранжевого формазана регистрации оптической плотности раствора при длине волны 450 нм. Снижение жизнеспособности по сравнению с контролем вычисляют по формуле

$$\text{Жизнеспособность } \% = \frac{100 \cdot OD_{450e}}{OD_{450b}}, \qquad \text{(D.1)}$$

где $OD_{450e}$ — среднее значение измеренной оптической плотности 100 %-ного экстракта исследуемой пробы;

$OD_{450b}$ — среднее значение измеренной оптической плотности контрольного экстрактанта.

Чем ниже значение жизнеспособности в процентах, тем выше цитотоксический потенциал объекта исследования.

Если жизнеспособность снижается до < 70 % от контрольного экстрактанта, объект исследования обладает цитотоксичностью. 50 %-ный экстракт исследуемой пробы должен обладать, по меньшей мере, такой же или более высокой жизнеспособностью, чем 100 %-ный экстракт. В противном случае исследование следует повторить.

## Приложение ДА
## (справочное)

## Сведения о соответствии ссылочных международных стандартов межгосударственным стандартам

Таблица ДА.1

| Обозначение и наименование международного стандарта | Степень соответствия | Обозначение и наименование межгосударственного стандарта |
|---|---|---|
| ISO 10993-1 | IDT | ГОСТ ISO 10993-1—2021 «Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 1. Оценка и исследования в процессе менеджмента риска» |
| ISO 10993-12 | IDT | ГОСТ ISO 10993-12—2023 «Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 12. Отбор и подготовка образцов для проведения исследований» |
| Примечание — В настоящей таблице использовано следующее условное обозначение степени соответствия стандартов:<br>- IDT — идентичные стандарты. | | |

## Библиография

[1] Guidance Document on Using In Vitro Data to Estimate In Vivo Starting Doses for Acute Toxicity, 2001. NIH Publication No. 01-4500 available under( gost.e-ecolog.ru )

[2] Guidelines for preclinical biological evaluation of medical materials and devices. MHLW (Ministry of Health, Labour and Welfare, Japan) memorandum, JIMURENRAKU Iryokiki-Shinsa, 36, 2003

[3] BORENFREUND E. and PUERNER J.A. Toxicity determination *in vitro* by morphological alterations and neutral red absorption, Toxicological Letters, 24, pp. 119—124, 1985

[4] United States Pharmacopeia

[5] COECKE S., BALLS M., BOWE G., DAVIS J., CSTRAUNTHALER G., HARTUNG T., HAY R., MERTEN O., PRICE A., SCHECTMAN L., STACEY G. and STOKES W. Guidance on Good Cell Culture Practice, A Report of the Second ECVAM Task Force on Good Cell Culture Practice, ATLA, 33, pp. 261—287, 2005

[6] ISAMA K., MATSUOKA A., HAISHIMA Y. and TSUCHIYA T. Proliferation and differentiation of normal human osteoblasts on dental Au-Ag-Pd casting alloy: Comparison with cytotoxicity using fibroblast L929 and V79 cells. Mater. Trans., 43, pp. 3155—3159, 2002

[7] TSUCHIYA T. Studies on the standardization of cytotoxicity tests and new standard reference materials useful for evaluating the safety of biomaterials. J. Biomaterials Applications, 5, pp. 139—157, 1994

[8] MOSMANN T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. J. Immun. Methods, 65, pp. 55—63, 1983

[9] SCUDIERO D.A., SHOEMAKER R.H., PAULL K.D., MONKS A., TIERNEY S., NOFZIGER T.H., CURRENS M.J., SENIFF, D. and BOYD, M.R. Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. Cancer Res., 48, pp. 4827—4833, 1988

[10] SPIELMANN H. et al. Interlaboratory assessment of alternatives to the Draize eye irritation test in Germany, Toxicol. In Vitro, 5, pp. 539—542, 1991

[11] HEXIG B., NAKAOKA R. and TSUCHIYA T. Safety evaluation of surgical materials by cytotoxicity testing. J. Artif. Organs, 11, pp. 204—211, 2008

УДК 615.46:002:006.354 МКС 11.100.20 IDT

Ключевые слова: медицинские изделия, оценка биологического действия, цитотоксичность, исследования, субконфлюэнтность, методы *in vitro*

Редактор *Л.С. Зимилова*
Технический редактор *И.Е. Черепкова*
Корректор *С.И. Фирсова*
Компьютерная верстка *Е.А. Кондрашовой*

Сдано в набор 11.10.2023. Подписано в печать 23.10.2023. Формат 60×84⅛. Гарнитура Ариал.
Усл. печ. л. 3,72. Уч.-изд. л. 3,34.

Подготовлено на основе электронной версии, предоставленной разработчиком стандарта

Создано в единичном исполнении в ФГБУ «Институт стандартизации»
для комплектования Федерального информационного фонда стандартов,
117418 Москва, Нахимовский пр-т, д. 31, к. 2.
gost.e-ecolog.ru gost.e-ecolog.ru

**Поправка к ГОСТ ISO 10993-5—2023 Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 5. Исследования на цитотоксичность методами *in vitro***

| В каком месте | Напечатано | Должно быть | | |
|---|---|---|---|---|
| Предисловие. Таблица согласования | — | Таджикистан | TJ | Таджикстандарт |

(ИУС № 4 2024 г.)

gost.e-ecolog.ru