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

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

ГОСТ 34735— 2021

МЕТОДЫ ИСПЫТАНИЙ ПО ВОЗДЕЙСТВИЮ ХИМИЧЕСКОЙ ПРОДУКЦИИ НА ОРГАНИЗМ ЧЕЛОВЕКА

Методы испытаний с применением реконструированного рогового эпителия человека (RhCE) для определения химической продукции, не требующей классификации опасности как вызывающей раздражение или серьезное повреждение глаз

(OECD 492:2019, Guidelines for the testing of chemicals. Reconstructed human Cornea-like Epithelium (RhCE) test method for identifying chemicals not requiring classification and labelling for eye irritation or serious eye damage, MOD)

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 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 июня 2021 г. № 141-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 16 ноября 2023 г. № 1408-ст межгосударственный стандарт ГОСТ 34735—2021 введен в действие в качестве национального стандарта Российской Федерации с 1 мая 2024 г.

5 Настоящий стандарт является модифицированным по отношению к международному документу OECD 492:2019 «Руководство по тестированию химической продукции. Метод испытания с применением реконструированного рогового эпителия человека (RhCE) для определения химической продукции, не требующей классификации и маркировки как вызывающей раздражение или серьезное повреждение глаз» («Guidelines for the testing of chemicals. Reconstructed human Cornea-like Epithelium (RhCE) test method for identifying chemicals not requiring classification and labelling for eye irritation or serious eye damage», MOD) путем изменения его структуры для приведения в соответствие с правилами, установленными в ГОСТ 1.5 (подразделы 4.2 и 4.3).

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

Международный документ разработан Международной организацией экономического сотрудничества и развития (OECD).

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

6 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

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

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»

© 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 Термины, определения и сокращения 1
3 Исходные положения 5
4 Сущность метода испытаний 8
5 Подтверждение квалификации 9
6 Методика испытаний 10
7 Составляющие методов испытаний с использованием RhCE 14
8 Данные и отчеты об испытаниях 23
Приложение А (обязательное) Основные параметры методов испытаний с использованием RhCE, валидированных для определения химической продукции, не требующей классификации и маркировки как вызывающей раздражение или серьезное повреждение глаз 26
Приложение В (обязательное) Блок-схема для наглядного представления процесса выявления веществ, способных непосредственно восстанавливать МТТ и/или обладающих мешающей окраской, и дальнейших операций с ними согласно СОП для VRM1 33
Приложение С (обязательное) Блок-схема для наглядного представления процесса выявления веществ, способных непосредственно восстанавливать МТТ и/или обладающих мешающей окраской, и дальнейших операций согласно СОП для VRM2 34
Приложение D (обязательное) Блок-схема для наглядного представления процесса выявления веществ, способных непосредственно восстанавливать WST и/или обладающих мешающей окраской, и дальнейших операций с ними согласно СОП для LABCYTE CORNEA-MODEL24 EIT 35
Приложение Е (обязательное) Ключевые параметры и критерии приемлемости для признания спектрофотометрической системы ВЭЖХ/УВЭЖХ пригодной для количественного определения МТТ-формазана, экстрагируемого из моделей тканей RhCE 36
Приложение ДА (справочное) Сопоставление структуры настоящего стандарта со структурой международного документа 37
Библиография 40

Введение

Под серьезным повреждением глаз, в соответствии с Согласованной на глобальном уровне системой классификации и маркировки химической продукции Организации Объединенных Наций (СГС ООН) [1] понимают такие повреждения глазных тканей либо такое обусловленное физическими причинами существенное ухудшение зрения после воздействия на глаза исследуемой химической продукции, которые не могут быть полностью обратимы. Напротив, раздражение глаз, также описанное в рамках СГС ООН, обозначает изменения, происходящие в глазах после воздействия на них исследуемой химической продукции, которые являются полностью обратимыми. Исследуемую химическую продукцию, вызывающую серьезные повреждения глаз, необходимо относить к классу опасности 1, а вызывающую раздражение глаз — к классу опасности 2 в соответствии с классификацией СГС ООН. Исследуемая химическая продукция, которая не была классифицирована как способная вызывать раздражение или серьезное повреждение глаз, рассматривается как не отвечающая условиям для отнесения ее к классу опасности 1 или 2 (подклассы опасности 2А или 2В) согласно СГС ООН, т. е. как продукция, для которой класс опасности согласно СГС ООН отсутствует.

Оценивание проявлений серьезного повреждения/раздражения глаз обычно предполагает использование для этой цели лабораторных животных (Руководство OECD по проведению испытаний (OECD 405); впервые принято в 1981 г., пересмотрено в 1987, 2002 и 2017 гг.) [2]. Выбор наиболее подходящего метода исследований, а также реализация положений настоящего стандарта должны осуществляться с учетом требований Руководящего документа по интегрированным подходам к исследованиям и оценке (Integrated Approaches on Testing and Assessment — IATA) серьезного повреждения и раздражения глаз [3].

Общепризнанно, что в обозримом будущем не следует ожидать появления одного единственного метода *in vitro*, который мог бы полностью заменить метод *in vivo* Дрейза [2], [18], позволяющий спрогнозировать весь диапазон серьезного повреждения/раздражения глаз, вызываемого химической продукцией различных классов. Тем не менее выверенное сочетание нескольких альтернативных методов испытаний, реализуемое в рамках единых (многоуровневых) стратегий исследования, основанных на «восходящем»/«нисходящем» подходе, вполне может оказаться способным заменить собой вышеупомянутый метод Дрейза [19]. Предполагается, что применение «восходящего» подхода уместно для случаев, когда, исходя из уже имеющейся информации, способность исследуемой химической продукции вызывать раздражение глаз, предположительно, в недостаточной степени выражена для присвоения ей конкретного класса опасности, в то время как к «нисходящему» подходу следует прибегать в ситуациях, когда ее воздействие, по всей вероятности, должно приводить к серьезному повреждению глаз.

Применение методов EpiOcular™ EIT, SkinEthic™ HCE EIT, LabCyte CORNEA-MODEL24 EIT и MCTT HCETM EIT рекомендовано для определения химической продукции, не требующей классификации как вызывающей раздражение или серьезное повреждение глаз в рамках СГС ООН (класс опасности отсутствует согласно СГС ООН) [1] без необходимости проведения дальнейших исследований в рамках соответствующей стратегии испытаний на основе «восходящего»/«нисходящего» подхода, предложенного Scott et al., например, на ранних этапах реализации «восходящего» подхода либо на заключительных этапах реализации «нисходящего» подхода. В то же время методы EpiOcular™ EIT, SkinEthic™ HCE EIT, LabCyte CORNEA-MODEL24 EIT и MCTT HCETM EIT не предназначены для присвоения химической продукции класса опасности 1 согласно СГС ООН (серьезное повреждение глаз) или класса опасности 2 согласно СГС ООН (раздражение глаз). Разделение химической продукции на эти два класса опасности должно обеспечиваться на другом уровне выбранной стратегии исследования [3]. Исследуемая химическая продукция, которая идентифицируется как вызывающая раздражающее действие/серьезные повреждения глаз при применении методов EpiOcular™ EIT, SkinEthic™ HCE EIT, LabCyte CORNEA-MODEL24 EIT или MCTT HCE™ EIT, в дальнейшем подлежит обязательным исследованиям (*in vitro* и/или *in vivo*) для подготовки окончательного заключения о ее классификации (класс опасности отсутствует, класс опасности 2 или класс опасности 1 согласно СГС ООН), например, с использованием методов, установленных в [4], [5], [6], [7] либо в [2].

Настоящий стандарт распространяется на методы испытаний для оценки потенциальной опасности для глаз исследуемой химической продукции, исходя из ее способности вызывать цитотоксичность при контакте с тканью RhCE, которая определяется посредством использования тетразолиевого красителя (ТК) (например, MTT [3-(4,5-диметилтиазола-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия бромида; тиазолила синего тетразолия бромида; CAS № 298-93-1} для методов VRM1 и VRM2, WST-8 [2-(2-метокси-4-нитрофенил)-3-(4-нитрофенил)-5-(2,4-дисульфофенил)-2Н-тетразолия, мононатриевой соли;

CAS № 193149-74-5] для метода LabCyte CORNEA-MODEL24 EIT или WST-1 [4-[3-(4-йодофенил)-2-(4-нитрофенил)-2H-5-тетразолио]-1,3-бензол дисульфоната; CAS № 150849-52-8] для метода MCTT HCE™ EIT) [20]—[22] (см. 4.3). Жизнеспособность тканей RhCE после воздействия испытуемой химической продукции определяют относительно тканей, обработанных отрицательной контрольной пробой (% жизнеспособности), и затем прогнозируют потенциальную опасность испытуемой химической продукции для глаз.

Стандарты результативности [23] являются пригодными для обеспечения проведения валидации новых или модифицированных методов испытаний *in vitro*, подобных методам, например, EpiOcular™ EIT, SkinEthic™ HCE EIT, LabCyte CORNEA-MODEL24 EIT и MCTT HCE™ EIT в соответствии с принципами [24], и обеспечивают возможность своевременного внесения соответствующих изменений в OECD 492 с целью включения в него этих новых методов. Присоединение к системе взаимного признания данных (Mutual Acceptance of Data — MAD) для методов испытаний, успешно прошедших валидацию в соответствии со стандартами результативности, гарантируется только при условии, что эти методы были одобрены и включены в OECD 492.

Поправка к ГОСТ 34735—2021 Методы испытаний по воздействию химической продукции на организм человека. Методы испытаний с применением реконструированного рогового эпителия человека (RhCE) для определения химической продукции, не требующей классификации опасности как вызывающей раздражение или серьезное повреждение глаз

В каком месте	Напечатано	Должно быть		
Предисловие. Таблица согласования	—	Казахстан	KZ	Госстандарт Республики Казахстан

(ИУС № 5 2025 г.)

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

МЕТОДЫ ИСПЫТАНИЙ ПО ВОЗДЕЙСТВИЮ ХИМИЧЕСКОЙ ПРОДУКЦИИ НА ОРГАНИЗМ ЧЕЛОВЕКА

Методы испытаний с применением реконструированного рогового эпителия человека (RhCE) для определения химической продукции, не требующей классификации опасности как вызывающей раздражение или серьезное повреждение глаз

Methods for studying the effects of chemicals on the human body.
Reconstructed human corneal epithelium (RhCE) test methods to determine chemicals not requiring hazard classification as irritating or serious eye damage

Дата введения — 2024—05—01

1 Область применения

1.1 Настоящий стандарт устанавливает методы испытаний *in vitro* для определения химической продукции (веществ и смесей), не требующей классификации и маркировки как вызывающей раздражение или серьезное повреждение глаз в соответствии с требованиями СГС ООН [1]. Данные методы предусматривают использование так называемого реконструированного эпителия роговицы человеческого глаза (reconstructed human cornea-like epithelium — RhCE), достоверно имитирующего гистологические, морфологические, биохимические и физиологические характеристики эпителия роговицы глаза человека. Для определения химической продукции, способной вызывать серьезные повреждения глаз, существенные для конечных показателей здоровья человека, или не требующей такой классификации, могут применяться также четыре альтернативных валидированных метода испытаний *in vitro*, признанные научно обоснованными и изложенные в [4], [5], [6] и [7].

1.2 Все четыре метода испытаний — EpiOcular™, Eye Irritation Test (EIT), SkinEthic™ Human Corneal Epithelium (HCE) EIT, LabCyte CORNEA-MODEL24 EIT и MCTT HCETM EIT, на которые распространяется настоящий стандарт, основаны на использовании в качестве испытательной системы поставляемых на рынок моделей тканей RhCE. Для оценки способности химической продукции вызывать раздражение/серьезное повреждение глаз [8]—[15] были проведены валидационные исследования указанных методов испытаний, два из которых (EpiOcular™ EIT и SkinEthic™ HCE EIT) далее по тексту упоминаются как валидированные референтные методы испытания (VRM1 и VRM2 соответственно). По результатам валидационных исследований и внешней независимой экспертизы [10], [13], [16], [17] сделано заключение о том, что методы EpiOcular™ EIT, SkinEthic™ HCE EIT, LabCyte CORNEA-MODEL24 EIT и MCTT HCETM EIT позволяют достоверно определять химическую продукцию (как вещества, так и смеси), не требующую классификации и маркировки как вызывающую раздражение и серьезное повреждение глаз в соответствии с требованиями СГС ООН [1], и данные методы были рекомендованы как научно обоснованные для данной цели. В приложениях А—Е обобщены важнейшие положения предлагаемых методов испытаний, а также представлены блок-схемы, иллюстрирующие последовательность действий, которую следует выбирать при проведении испытаний в зависимости от конкретной ситуации.

2 Термины, определения и сокращения

В настоящем стандарте применены следующие термины и сокращения с соответствующими определениями:

Издание официальное

2.1 **валидированный метод испытаний** (validated test method): Метод испытаний, для которого завершены валидационные исследования с целью определения его релевантности (включая точность) и надежности для конкретной цели. Важно отметить, что валидированный метод не обязательно обеспечивает достаточную результативность с точки зрения его точности и надежности для признания его пригодным для конкретной цели [24].

2.2 **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 [1].

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

2.4 **воспроизводимость** (reproducibility): Согласованность результатов, получаемых при неоднократных испытаниях одной и той же химической продукции при применении одного и того же протокола (см. термин «надежность») [24].

2.5 **восходящий подход** (Bottom-Up Approach): Поэтапный подход, применяемый при исследовании химической продукции, предположительно не требующей классификации и маркировки как вызывающей раздражение или серьезное повреждение глаз, при котором в первую очередь определяется химическая продукция, не требующая классификации (отрицательный отклик), для выделения ее из числа прочей химической продукции (положительный отклик) [3].

2.6 **доля ложноположительных заключений** (false positive rate): Доля всей химической продукции, дающей отрицательный отклик, которая ошибочно идентифицирована как дающая положительный отклик. Это один из показателей результативности метода.

2.7 **доля ложноотрицательных заключений** (false negative rate): Доля всей химической продукции, дающей положительный отклик, которая ошибочно была идентифицирована как дающая отрицательный отклик. Это один из показателей результативности метода.

2.8 **жизнеспособность тканей** (tissue viability): Показатель, определяющий суммарную активность клеточной популяции в реконструированной ткани как ее способность восстанавливать краситель МТТ, который в зависимости от измеряемого конечного показателя и применяемого протокола испытаний коррелирует с общим числом и/или выживаемостью клеток.

2.9 **замещающие испытания** (replacement test): Испытания, которые предназначены для замены регулярно проводимых испытаний и одобрены для целей выявления опасностей и/или оценки рисков, обеспечивают доказанный аналогичный или более высокий уровень защиты здоровья человека, животных или охраны окружающей среды по сравнению с принятыми методами испытаний независимо от условий проведения испытаний и выбора исследуемой химической продукции [24].

2.10 **избыточная доза** (infinite dose): Количество исследуемой химической продукции, наносимой на модель ткани RhCE, превышающее количество, требуемое для полного и равномерного покрытия поверхности эпителия.

2.11 **испытание** (test): Отдельное испытание исследуемой химической продукции, проводимое по меньшей мере на двух параллельно обрабатываемых образцах ткани, как установлено соответствующими СОП.

2.12 **исследуемая химическая продукция** (test chemical): Химическая продукция (вещества или смеси), которая подвергается испытаниям.

2.13 **класс опасности 1 согласно Согласованной на глобальном уровне системе классификации и маркировки химической продукции Организации Объединенных Наций;** класс опасности 1 согласно СГС ООН (UN GHS Category 1): См. термины «серьезные повреждения глаз» и/или «необратимые последствия для глаз».

2.14 **класс опасности 2 согласно Согласованной на глобальном уровне системе классификации и маркировки химической продукции Организации Объединенных Наций;** класс опасности 2 согласно СГС ООН (UN GHS Category 2): См. термины «раздражение глаз» и/или «обратимые последствия для глаз».

2.15 **класс опасности согласно Согласованной на глобальном уровне системе классификации и маркировки химической продукции Организации Объединенных Наций отсутствует; класс опасности согласно СГС ООН отсутствует** (UN GHS No Category): Химическая продукция, не удовлетворяющая критериям классификации для химической продукции класса опасности 1 или 2 (подклассы опасности 2А или 2В) согласно СГС ООН. Синоним термина «не требует классификации».

2.16 **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.

2.17 **многоуровневая стратегия исследования** (tiered testing strategy): Стратегия, предусматривающая поэтапное проведение исследования, при котором вся существующая информация об исследуемой химической продукции анализируется в определенном порядке, с рассмотрением на каждом уровне совокупности имеющихся свидетельств с целью определения достаточности доступной информации для принятия решения о классификации по степени опасности, перед переходом на следующий уровень. Если способность исследуемой химической продукции вызывать раздражение может быть подтверждена на основе существующей информации, дальнейшее исследование не требуется [24].

2.18 **МТТ** (MTT): 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия бромид; тиазолил синий тетразолия бромид (CAS № 298-93-1).

2.19 **надежность** (reliability): Показатель того, что метод испытаний может быть реализован с получением воспроизводимых результатов в рамках одной или различных лабораторий в течение продолжительного времени при применении одного и того же протокола. Он оценивается путем вычисления внутри- и межлабораторной воспроизводимости и внутрилабораторной повторяемости. [24]

2.20 **необратимые последствия для глаз** (irreversible effects on the eye): См. «серьезные повреждения глаз».

2.21 **не требует классификации** (Not Classified): Химическая продукция, которая не подлежит классификации как вызывающая раздражение (класс опасности 2, подклассы опасности 2A или 2B согласно СГС ООН) или серьезное повреждение глаз (класс опасности 1 согласно СГС ООН). Синоним термина «класс опасности согласно СГС ООН отсутствует».

2.22 **нисходящий подход** (Top-Down Approach): Поэтапный подход, применяемый для исследования химической продукции, предположительно вызывающей серьезное повреждение глаз, при котором в первую очередь определяется химическая продукция, способная быть причиной серьезного повреждения глаз (положительный отклик), для выделения ее из числа прочей химической продукции (отрицательный отклик). [3]

2.23 **обратимые последствия для глаз** (reversible effects on the eye): См. термин «раздражение глаз».

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

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

2.26 **опасность** (hazard): Изначально присущее свойство конкретной химической продукции или ситуации, заключающееся в их потенциальной способности вызывать деструктивные последствия в случаях, когда организм, система или субпопуляция подвергаются их воздействию.

2.27 **отрицательная контрольная проба** (negative control): Проба, включающая в себя все составляющие исследуемой системы и обрабатываемая с использованием вещества, заведомо не способного давать положительный отклик в данной системе. Данная проба используется параллельно с пробами, содержащими исследуемую химическую продукцию, а также другими контрольными пробами и служит для определения 100 %-ного уровня жизнеспособности ткани.

2.28 **оценивание по совокупности имеющихся свидетельств** (weight-of-evidence): Процесс рассмотрения преимуществ и недостатков различной имеющейся информации при подготовке и обосновании заключения о потенциальной опасности исследуемой химической продукции.

2.29 **положительная контрольная проба** (positive control): 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 данной пробы, этот положительный отклик не должен быть слишком завышенным.

2.30 **раздражение глаз** (eye irritation): Изменения, происходящие в глазах после воздействия на их поверхность исследуемой химической продукцией, которые являются полностью обратимыми по истечении 21 дня с момента такого воздействия. Синоним терминов «обратимые последствия для глаз» или «класс опасности 2 согласно СГС ООН» [1].

2.31 **релевантность** (relevance): Характеристика 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 [22].

2.32 **роговица** (cornea): Прозрачная часть передней оболочки глазного яблока, закрывающая радужную оболочку и зрачок и пропускающая лучи света внутрь глаза.

2.33 **Согласованная на глобальном уровне система классификации и маркировки химической продукции Организации Объединенных Наций; СГС** (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].

2.34 **серия испытаний** (run): Испытания одной химической продукции или более параллельно с отрицательной и положительной контрольными пробами.

2.35 **серьезные повреждения глаз** (serious eye damage): Развитие повреждений глазных тканей либо обусловленное физическими причинами существенное ухудшение зрения после воздействия на поверхность глаза испытуемой химической продукцией, которые не являются полностью обратимыми по истечении 21 дня с момента такого воздействия. Синоним терминов «необратимые последствия для глаз» или «класс опасности 1 согласно СГС ООН» [1].

2.36 **смесь** (mixture): Смесь или раствор, состоящие из двух или более веществ, в которых они не вступают в реакцию друг с другом [1].

2.37 **согласованность** (concordance): См. точность «точность».

2.38 **специфичность** (specificity): Доля всей дающей отрицательный результат/неактивной химической продукции, которая была правильно классифицирована при применении 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 [24].

2.39 **стандартные операционные процедуры;** СОП (Standard Operating Procedures — SOP): Выполняемые в рамках протокола процедуры, письменно оформленные и подробно описывающие, каким образом должна быть организована повседневная деятельность в определенной области и каким должен быть порядок выполнения операций в лаборатории при проведении конкретных видов исследований. Их наличие предусмотрено надлежащей лабораторной практикой.

2.40 **стандарты результативности** (performance standards): Стандарты, основанные на применении валидированного метода испытаний, который признан научно обоснованным, и обеспечивающие основу 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 эталонных химических веществ, отобранных из числа веществ, которые применялись для подтверждения пригодности валидированного метода испытаний, а также (3) сопоставимые уровни надежности и точности по результатам использования валидированного метода испытаний, которые предлагаемый метод испытаний должен демонстрировать при его оценке с использованием этого минимального перечня эталонных химических веществ [24].

2.41 **СО** (SD — Standard Deviation): Стандартное отклонение.

2.42 **тетразолиевый краситель;** ТК (tetrazolium dye (TD)): Соли тетразолия МТТ, WST-8 и WST-1.

2.43 **точность** (accuracy): Близость результата испытаний, полученного с применением соответствующего метода испытаний, к принятому эталонному значению величины. Точность является показателем результативности 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 [24].

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

2.45 **формазановый краситель; ФК** (Formazan dye (FD)): Пигментообразующий продукт восстановления МТТ, WST-8 или WST-1.

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

2.47 **чувствительность** (sensitivity): Доля всей дающей положительный результат/активной химической продукции, которая была правильно классифицирована при применении 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 [24].

2.48 **эталонная химическая продукция** (benchmark chemical): Химическая продукция, используемая как эталон для сравнения с испытуемой химической продукцией. Эталонная химическая продукция должна (1) происходить из стабильного и надежного источника (источников); обладать следующими свойствами: (2) структурным и функциональным сходством с классом исследуемой продукции; (3) хорошо изученными физико-химическими характеристиками; (4) наличием подтверждающих данных об известных воздействиях, а также (5) известным уровнем активности в диапазоне ожидаемого отклика.

2.49 **CV** (Coefficient of Variation): Коэффициент вариации.

2.50 **Dev** (Deviation): Отклонение.

2.51 **IC_{50}:** Концентрация эталонной химической продукции, при которой жизнеспособность ткани снижается на 50 % по истечении заданного периода воздействия (например, после обработки в течение 30 или 60 мин НДС (натрия додецилсульфат)).

2.52 **EIT** (Eye Irritation Test): Испытание на раздражение глаз.

2.53 **ET_{50}:** Время воздействия, необходимое для снижения жизнеспособности ткани на 50 % после нанесения эталонной химической продукции с заданным значением концентрации.

2.54 **EURL ECVAM** (European Union Reference Laboratory for Alternatives to Animal Testing): Референтная лаборатория по валидации альтернативных методов Европейского союза.

2.55 **HCWST** (NSWST): Неспецифическое восстановление WST-8 или WST-1.

2.56 **HCE** (Human Corneal Epithelium): Модель эпителия роговицы человеческого глаза SkinEthic™.

2.57 **HCMTT** (NSMTT): Неспецифическое восстановление MTT.

2.58 **$HCO_{нежизнеспособных}$** (NSC_{killed}): Неспецифическое окрашивание нежизнеспособных тканей.

2.59 **$HCO_{жизнеспособных}$** ($NSC_{cliving}$): Неспецифическое окрашивание жизнеспособных тканей.

2.60 **LLOQ** (Lower Limit of Quantification): Нижний предел количественного определения.

2.61 **LogP:** Логарифм коэффициента распределения октанол — вода.

2.62 **RhCE** (Reconstructed human Cornea-like Epithelium): Реконструированный эпителий роговицы человеческого глаза.

2.63 **ULOQ** (Upper Limit of Quantification): Верхний предел количественного определения.

2.64 **UVCB** (substances of Unknown or Variable Composition, complex reaction products or Biological materials): Вещества неизвестного или переменного состава, продукты комплексных реакций или вещества биологического происхождения.

2.65 **VRM** (Validated Reference Method): Валидированный референтный метод.

2.66 **VRM1:** EpiOcular™ EIT, рассматриваемый как валидированный референтный метод 1.

2.67 **VRM2:** SkinEthic™ HCE EIT, рассматриваемый как валидированный референтный метод 2.

2.68 **WST:** Водорастворимая соль тетразолия.

2.69 **WST-1:** Водорастворимая соль тетразолия-1 [4-[3-(4-йодофенил)-2-(4-нитрофенил)-2H-5-тетразолио]-1,3-бензол-дисульфонат (CAS № 150849-52-8).

2.70 **WST-8:** Водорастворимая соль тетразолия-8 [2-(2-метокси-4-нитрофенил)-3-(4-нитрофенил)-5-(2,4-дисульфофенил)-2H-тетразолий, мононатриевая соль (CAS № 193149-74-5).

3 Исходные положения

3.1 В методах настоящего стандарта используются поставляемые на рынок трехмерные модели тканей RhCE, основой для получения которых являются первичные эпидермальные кератиноциты человека (EpiOcular™ OCL-200), иммортализованные эпителиальные клетки роговицы человека (SkinEthic™ HCE/S) либо первичные эпителиальные клетки роговицы человека (LabCyte CORNEA-MODEL24 и MCTT HCE™). Модели тканей EpiOcular™ OCL-200, SkinEthic™ HCE/S, LabCyte CORNEA-MODEL24 и MCTT HCETM имеют трехмерную структуру, аналогичную структуре эпителия роговицы, наблюдаемой *in vivo*, и выращиваются с использованием клеток соответствующих видов [25]—[28]. Методы испытаний с использованием данных моделей тканей позволяют непосредственно определять цитотоксическое воздействие, связанное с проникновением химической продукции в роговицу и повреждением клеток и тканей вследствие дальнейшего контакта с ней, по результатам которых может быть сделан вывод о серьезном повреждении/раздражении глаз *in vivo*. Нарушение жизнедеятельности

клеток может быть вызвано несколькими механизмами действия (см. 4.2), однако именно цитотоксическое действие имеет чрезвычайно большое, если не решающее значение для определения общей способности химической продукции вызывать серьезное повреждение/раздражение глаз, основными признаками которого *in vivo* обычно являются помутнение роговицы, воспаление радужной оболочки и покраснение и/или отек конъюнктивы, вне зависимости от того, какими именно физико-химическими процессами была обусловлена подобная реакция.

3.2 В рамках валидационных исследований методов испытаний настоящего стандарта было испытано большое количество химической продукции, принадлежащей к различным классам, различающейся по значению молекулярной массы и LogP, химической структуре и т. д. Базовый перечень химической продукции, применявшейся для валидации метода EpiOcular™ EIT, включал 113 наименований химической продукции, представляющих 95 различных органических функциональных групп, о чем свидетельствуют данные анализа с применением программного инструментария QSAR, разработанного [9]. В перечень в основном были включены однокомпонентные вещества, однако некоторое количество многокомпонентных веществ (включая 3 гомополимера, 5 сополимеров и 10 квазиполимеров) также использовалось в валидационных исследованиях. По своему агрегатному состоянию и присвоенному классу опасности согласно СГС ООН химическая продукция (113 наименований) распределилась следующим образом: 13 жидкостей класса опасности 1, 15 твердых продуктов класса опасности 1, 6 жидкостей подкласса опасности 2А, 10 твердых продуктов подкласса опасности 2А, 7 жидкостей подкласса опасности 2В, 7 твердых продуктов подкласса опасности 2В, 27 жидкостей и 28 твердых продуктов, для которых класс опасности отсутствует [8]. Базовый перечень химической продукции, применявшейся для валидации метода SkinEthic™ HCE EIT, насчитывал 200 наименований химической продукции, представляющей 165 различных органических функциональных групп [9], [11], [12]. Хотя большинство позиций в перечне занимали однокомпонентные вещества, некоторое количество многокомпонентных веществ (включая 10 полимеров) также было включено в валидационное исследование. По своему агрегатному состоянию и присвоенному классу опасности согласно СГС ООН химическая продукция (200 наименований) распределилась следующим образом: 27 жидкостей класса опасности 1, 24 твердых продуктов класса опасности 1, 19 жидкостей подкласса опасности 2А, 10 твердых продуктов подкласса опасности 2А, 9 жидкостей подкласса опасности 2В, 8 твердых продуктов подкласса опасности 2В, 50 жидкостей и 53 твердых продукта, для которых класс опасности отсутствует [11], [12]. Базовый перечень химической продукции, применявшийся для последующей валидации метода CORNEA-MODEL24 EIT, насчитывал 30 наименований эталонной химической продукции, перечисленной в стандартах результативности [23] для методов настоящего стандарта. Базовый перечень химической продукции, применявшейся параллельно для валидации метода MCTT HCE™ EIT, также насчитывал 30 наименований эталонной химической продукции, перечисленной в стандартах результативности [23] для настоящего стандарта.

3.3 Методы настоящего стандарта применимы для испытаний веществ и смесей, которые являются жидкостями, твердыми, полутвердыми и воскоподобными продуктами. Жидкости могут иметь водную или неводную основу; твердые вещества могут быть растворимыми или нерастворимыми в воде. Твердые вещества по возможности перед испытанием должны быть измельчены до тонкого порошкообразного состояния; никакой другой предварительной обработки пробы не требуется. Работы по валидации методов настоящего стандарта для газов и аэрозолей не проводились. Это означает, что, невзирая на теоретическую осуществимость испытаний газов и аэрозолей с применением технологий на основе RhCE, настоящим стандартом такая возможность не предусмотрена. Перед испытанием смесей веществ, сложной для испытаний химической продукции (например, нестабильной) или такой химической продукции, которая не может быть с уверенностью отнесена к области применения настоящего стандарта, в каждом случае следует уточнять, являются ли результаты такого исследования научно обоснованными. Изучение данного вопроса не требуется, если необходимость испытаний соответствующей смеси веществ установлена действующими требованиями.

3.4 Исследуемая химическая продукция, которая поглощает свет в том же спектральном диапазоне, что и формазановый краситель (ФК) в естественном состоянии или после обработки, а также исследуемая химическая продукция, которая способна непосредственно восстанавливать витальный краситель ТК (до ФК), может препятствовать правильному определению жизнеспособности тканей и требует дополнительного использования контрольных проб для внесения соответствующих поправок в результаты. Вид контрольных проб может различаться в зависимости от характера помех, создаваемых исследуемой химической продукцией, и от применяемой в каждом случае методики количественного определения ФК (подробнее см. 7.2.7.2—7.2.7.8).

3.5 Результаты, полученные на этапе предварительной валидации [29]—[32] и последующей валидации [9], [11], [12], [14], [15] методов EpiOcular™ EIT, SkinEthic™ HCE EIT, LabCyte CORNEA-MODEL24 EIT и MCTT HCE™ EIT, подтверждают возможность их реализации в лабораториях, не обладающих обширным опытом подобных работ, а также их высокую внутри- и межлабораторную воспроизводимость. Согласно результатам валидационных исследований ожидаемый уровень воспроизводимости, исходя из согласованности заключений в случае применения метода EpiOcular™ EIT и согласно данным, полученным для химической продукции 113 наименований, составляет 95 % в пределах одной лаборатории и 93 % в пределах нескольких лабораторий. Уровень воспроизводимости, исходя из согласованности прогнозных заключений в случае применения метода SkinEthic™ HCE EIT и согласно данным, полученным для химической продукции 120 наименований, составляет 92 % в пределах одной лаборатории и 95 % в пределах нескольких лабораторий. Уровень воспроизводимости, исходя из согласованности прогнозных заключений в случае применения метода LabCyte CORNEA-MODEL24 EIT и согласно данным, полученным для 30 наименований эталонной химической продукции, указанной в стандартах результативности [23], составляет 96 % в пределах одной лаборатории и 87 % в пределах нескольких лабораторий. Уровень воспроизводимости, исходя из согласованности прогнозных заключений в случае применения метода MCTT HCE™ EIT и согласно данным для 30 наименований эталонной химической продукции, перечисленной в стандартах результативности [23], составляет 93 % в пределах одной лаборатории и 90 % в пределах нескольких лабораторий.

3.6 Метод EpiOcular™ EIT может применяться для идентификации химической продукции, не требующей классификации как вызывающей раздражение или серьезное повреждение глаз в рамках системы СГС ООН [1]. В соответствии с данными, полученными при проведении валидационных исследований [9], метод EpiOcular™ EIT имеет общую точность на уровне 80 % (для химической продукции 112 наименований), чувствительность на уровне 96 % (для химической продукции 57 наименований), долю ложноотрицательных заключений на уровне 4 % (для химической продукции 57 наименований), специфичность на уровне 63 % (для химической продукции 55 наименований) и долю ложноположительных заключений на уровне 37 % (для химической продукции 55 наименований) относительно результатов, полученных при классификации согласно СГС ООН [1], проведенной по данным испытаний на глазу кролика *in vivo* [2], [18]. Данные испытаний при применении метода EpiOcular™ EIT для 97 жидких составов агрохимического назначения подтверждают результативность метода для таких смесей, аналогичную полученной при его валидации [33]. По итогам контрольных испытаний на глазу кролика *in vivo* [2], [18] указанные 97 химических составов были классифицированы следующим образом: 21 — класс опасности 1, 19 — подкласс опасности 2А, 14 — подкласс опасности 2В и 43 — класс опасности отсутствует согласно СГС ООН [1]. Исходя из данной информации, полученная общая точность метода составляет 82 % (для 97 составов), чувствительность — 91 % (для 54 составов), доля ложноотрицательных заключений — 9 % (для 54 составов), специфичность — 72 % (для 43 составов), а доля ложноположительных заключений — 28 % (для 43 составов) [33].

3.7 Метод SkinEthic™ HCE EIT может применяться для идентификации химической продукции, не требующей классификации как вызывающей раздражение или серьезное повреждение глаз в рамках системы СГС ООН [1]. В соответствии с данными, полученными при проведении валидационных исследований [11], [12], метод SkinEthic™ HCE EIT имеет общую точность на уровне 84 % (для химической продукции 200 наименований), чувствительность на уровне 95 % (для химической продукции 97 наименований), долю ложноотрицательных заключений на уровне 5 % (для химической продукции 97 наименований), специфичность на уровне 72 % (для химической продукции 103 наименований) и долю ложноположительных заключений на уровне 28 % (для химической продукции 55 наименований) относительно результатов, полученных при классификации согласно СГС ООН [1], проведенной по данным испытаний на глазу кролика *in vivo* [2], [18].

3.8 Метод LabCyte CORNEA-MODEL EIT может применяться для идентификации химической продукции, не требующей классификации как вызывающей раздражение или серьезное повреждение глаз в рамках системы СГС ООН [1]. В соответствии с данными, полученными при проведении последующего валидационного исследования [14], метод LabCyte CORNEA-MODEL EIT удовлетворяет критериям воспроизводимости и воспроизводимой способности, предусмотренным стандартами результативности для методов настоящего стандарта [23]. Кроме того, следует отметить, что базой данных, включающей результаты испытаний химической продукции 139 наименований, располагает разработчик модели ткани.

3.9 Метод MCTT HCE™ EIT может применяться для идентификации химической продукции, не требующей классификации как вызывающей раздражение или серьезное повреждение глаз в рамках системы СГС ООН [1]. В соответствии с данными, полученными при проведении последующих вали-

дационных исследований [15], метод MCTT HCE™ EIT удовлетворяет критериям воспроизводимости и воспроизводимой способности, предусмотренным стандартами результативности для методов настоящего стандарта [23]. Дополнительно были проведены испытания химической продукции 141 наименования [15], согласно которым метод MCTT HCE™ EIT имеет общую точность на уровне 86 % (для химической продукции 141 наименования), чувствительность на уровне 99 % (для химической продукции 80 наименований), долю ложноотрицательных заключений на уровне 1 % (для химической продукции 80 наименований), специфичность на уровне 69 % (для химической продукции 61 наименования) и долю ложноположительных заключений на уровне 31 % (для химической продукции 61 наименования) относительно результатов, полученных при классификации согласно СГС ООН [1], проведенной по данным испытаний на глазу кролика *in vivo* [2], [18].

3.10 Доля ложноотрицательных заключений, полученных при применении этих методов испытаний с использованием RhCE для веществ или смесей, находится в пределах значения вариабельности, установленного для метода Дрейза *in vivo* и равного 12 % [34]. Ложноотрицательные заключения при применении любого из методов испытаний с использованием RhCE для веществ или смесей в данных обстоятельствах не являются критическими, поскольку любая исследуемая химическая продукция, воздействие которой приводит к снижению жизнеспособности тканей до уровней, равных или меньших, чем установленные предельные значения (см. 7.2.9.1), должна подвергаться дальнейшим испытаниям с применением другого (их) метода (ов) *in vitro* либо испытываться на подопытных кроликах в зависимости от конкретных действующих нормативных требований и с учетом положений Руководящего документа по интегрированным подходам к испытаниям и оценке серьезного повреждения глаз и раздражения глаз [3]. Данные методы пригодны для испытаний всех видов химической продукции, для которой отрицательный результат испытаний должен свидетельствовать, что данная продукция не требует классификации по способности вызывать раздражение или серьезное повреждение глаз (класс опасности согласно СГС ООН отсутствует). Применение методов EpiOcular™ EIT, SkinEthic™ HCE EIT, LabCyte CORNEA-MODEL24 EIT и MCTT HCE™ EIT в рамках классификации, отличной от установленной СГС ООН, должно быть согласовано с соответствующими регулирующими органами.

3.11 Недостатком методов настоящего стандарта является то, что они не позволяют разделять химическую продукцию, оказывающую раздражающее воздействие (обратимые последствия для глаз), т. е. продукцию класса опасности 2, и химическую продукцию, вызывающую серьезные повреждения (необратимые последствия для глаз), т. е. продукцию класса опасности 1, а также продукцию с сильным (подкласс опасности 2А) и слабым (подкласс опасности 2В) раздражающим воздействием на глаза, как это предусмотрено СГС ООН [1]. В подобных случаях требуется проведение дальнейших испытаний с соблюдением требований Руководящего документа по интегрированным подходам к исследованиям и оценке серьезного повреждения и раздражения глаз [3].

3.12 Термин «исследуемая химическая продукция» в настоящем стандарте применяется для обозначения объекта испытания и не связан с возможностью применения метода RhCE для испытаний тех или иных веществ и/или их смесей.

4 Сущность метода испытаний

4.1 Исследуемую химическую продукцию наносят на поверхность не менее чем двух образцов трехмерной модели ткани RhCE и определяют жизнеспособность тканей непосредственно после воздействия и по истечении следующего за обработкой периода инкубирования. Для получения тканей RhCE используют первичные эпидермальные кератиноциты человека, иммортализованные эпителиальные клетки роговицы человека либо первичные эпителиальные клетки роговицы человека, которые культивируют в течение нескольких дней до формирования из них высокодифференцированного многослойного плоского эпителия, сходного по строению с эпителием роговицы человеческого глаза. Модели тканей RhCE для методов EpiOcular™, LabCyte CORNEA-MODEL24 и MCTT HCE™ должны состоять не менее чем из трех слоев жизнеспособных клеток и иметь некератинизированную поверхность, формируя таким образом структуру, подобную роговице в методе *in vivo* [27]. Модель ткани RhCE для метода SkinEthic™ HCE предполагает наличие не менее четырех слоев жизнеспособных клеток, включающих в себя цилиндрические базальные клетки, шиповатые промежуточные клетки и чешуйчатые поверхностные клетки, аналогично обычному роговичному эпителию человека [26], [35].

4.2 Химически вызванное серьезное повреждение/раздражение глаз, основными признаками которого *in vivo* обычно являются помутнение роговицы, воспаление радужной оболочки, покраснение и/или отек конъюнктивы, представляет собой результат цепочки событий, начинающейся с проник-

новения химической продукции через роговицу и/или конъюнктиву и заканчивающейся разрушением клеток. В повреждении клеток могут быть задействованы различные механизмы, в том числе: лизис клеточной мембраны (например, поверхностно-активными веществами, органическими растворителями); коагуляция макромолекул, в частности белков (например, поверхностно-активными веществами, органическими растворителями, щелочами и кислотами); омыление жиров (например, щелочами); а также алкилирование или иного рода ковалентное взаимодействие с макромолекулами (например, при участии отбеливающих средств, пероксидов и алкиляторов) [19], [36], [37]. В то же время доказано, что именно цитотоксический аспект имеет чрезвычайно большое, если не решающее значение для определения общей способности химической продукции вызывать серьезное повреждение/раздражение глаз, вне зависимости от того, какими конкретно физико-химическими процессами была спровоцирована подобная реакция [38], [39]. Более того, потенциальная способность вызывать серьезное повреждение/раздражение глаз в целом определяется размером первичных повреждений [36], коррелирующих с количеством погибших клеток [38], а также с масштабом дальнейших реакций и вероятных последствий воздействия [40], [41]. Таким образом, если химическая продукция, способная вызывать самое легкое раздражение, как правило, воздействует лишь на поверхностный слой эпителия роговицы, то от химической продукции со слабой и средней раздражающей способностью страдают главным образом эпителий и поверхность стромы, а химическая продукция с сильной раздражающей способностью разрушает эпителий, глубоко строму и в отдельных случаях эндотелий роговицы [39], [42]. В основе определения жизнеспособности ткани модели RhCE после воздействия нанесенной на ее поверхность химической продукции с целью идентификации химической продукции, которая не требует классификации как вызывающая серьезное повреждение/раздражение глаз (класс опасности согласно СГС ООН отсутствует), лежит предположение, что всякая химическая продукция, при воздействии которой развивается серьезное повреждение или раздражение глаз, вызывает цитотоксические реакции в эпителии роговицы и/или в конъюнктиве.

4.3 Традиционно жизнеспособность ткани RhCE может быть определена благодаря осуществляемому жизнеспособными клетками этой ткани процессу ферментного преобразования ТК (МТТ для VRM1 и VRM2, WST-8 для LabCyte CORNEA-MODEL24 EIT или WST-1 для МСТТ HCE™ EIT) в ФК (синеокрашенный МТТ-формазан либо желтоокрашенный WST-8/WST-1-формазан). Для количественного определения синеокрашенного МТТ ФК его вначале необходимо экстрагировать из тканей [20], тогда как желтоокрашенные WST-8 ФК или WST-1 ФК не нуждаются в дополнительном экстрагировании, поскольку являются водорастворимыми и для определения их количества непосредственно используется раствор красителя, в котором происходило инкубирование тканей при проведении испытания с использованием WST-8 [21] или WST-1 [22] соответственно. К химической продукции, не требующей классификации и маркировки согласно СГС ООН (класс опасности отсутствует), относят такую химическую продукцию, при воздействии которой жизнеспособность тканей не опускается ниже установленного предела (т. е. показатель жизнеспособности должен составлять >60 % для методов EpiOcular™EIT и SkinEthic™ HCE EITL; >50 % для метода SkinEthic™ HCE EITS; >40 % для метода LabCyte CORNEA-MODEL24 EIT либо >35 % для жидкостей и >60 % для твердой продукции при применении метода МСТТ HCE™ EIT) (см. 7.2.9.1).

5 Подтверждение квалификации

5.1 До того как приступить к регулярному применению методов испытаний с использованием RhCE для целей технического регулирования, лаборатории должны подтвердить свою техническую компетентность, правильно классифицировав химическую продукцию, перечисленную в таблице 1. Данная продукция была выбрана из химической продукции, которая использовалась при валидационных исследованиях методов VRM1 и VRM2 [9], [11], [12]. Выбор был обусловлен тем, что данная химическая продукция:

- представляет различные агрегатные состояния;
- представляет весь диапазон ответных реакций *in vivo* при серьезном повреждении/раздражении глаз на основе достоверных результатов испытаний на глазу кролика [2], [16] и системы классификации СГС ООН (т. е. класс опасности 1, подклассы опасности 2А, 2В или класс опасности отсутствует) [1];
- обеспечивает различные основания для классификации при испытаниях *in vivo* [34], [43];
- относится к классам химической продукции, которая использовалась при валидационных исследованиях [9], [11], [12];
- представляет весь спектр органических функциональных групп [9], [11], [12];

- обладает хорошо изученной химической структурой [9], [11], [12];
- имеет выраженную собственную окраску и/или способна непосредственно восстанавливать ТК;
- обеспечивает получение воспроизводимых результатов при применении методов с использованием RhCE при проведении их валидации;
- должным образом была идентифицирована при применении методов с использованием RhCE на этапе валидационных исследований;
- охватывает весь диапазон ответных реакций *in vitro* на основе достоверных данных, полученных при применении методов с использованием RhCE (жизнеспособность от 0 % до 100 %);
- является доступной для коммерческого приобретения;
- не требует неоправданных затрат на закупку и/или последующую утилизацию.

В случае когда лаборатория не располагает каким-либо веществом, приведенным в перечне, или оно не может быть использовано в силу каких-либо иных уважительных причин, вместо него допускается использовать другое вещество, удовлетворяющее критериям, приведенным выше, например, из числа химических веществ, на примере которых проводилась валидация VRM. Для таких отступлений от общего правила должны быть убедительные обоснования.

5.2 Рекомендуется, чтобы в рамках проверки квалификации пользователи самостоятельно контролировали барьерные свойства тканей после их получения в соответствии с указаниями разработчика данной модели тканей RhCE (см. 7.1, 7.2.2 и 7.2.5). Это особенно важно в том случае, если транспортирование тканей осуществляется на большие расстояния и/или занимает много времени. После успешного внедрения в практику соответствующего метода испытаний, а также приобретения и подтверждения достаточной квалификации для его применения систематическое проведение таких проверок не требуется. Тем не менее, если метод исследования применяется на постоянной основе, проверки рекомендуется продолжать и с регулярной периодичностью оценивать барьерные характеристики используемых тканей.

6 Методика испытаний

Методы EpiOcular™ EIT, SkinEthic™ HCE EIT, LabCyte CORNEA-MODEL24 EIT и MCTT HCE™ EIT признаны научно обоснованными [10], [13]—[15]; первые два из них также упоминаются по тексту как валидированные референтные методы (VRM1 и VRM2 соответственно). Для методов с использованием RhCE разработаны и должны соблюдаться в процессе их внедрения и применения в условиях лаборатории соответствующие стандартные операционные процедуры (СОП) [44]—[47]. В последующих разделах, а также в приложении А описаны основные параметры и процедуры методов испытаний с использованием RhCE.

Таблица 1 — Перечень рекомендованных веществ для проверки квалификации

Вещество	Регистрационный номер CAS	Органическая функциональная группа[1)]	Агрегатное состояние	Жизнеспособность при применении VRM1 (%)[2)]	Жизнеспособность при применении VRM2 (%)[3)]	Жизнеспособность при применении LabCyte (%)[3-1)]	Жизнеспособность при применении MCTT HCE™ (%)[3-2)]	Прогноз при применении VRM[7)]	Демонстрирует окраску
Класс опасности 1 по итогам исследований *in vivo*[4)]									
Метилтиогликолят	2365-48-2	Эфир карбоновой кислоты; тиоспирт	Ж	10,9 ± 6,4	5,5 ± 7,4	1,7 ± 1,2	25,3 ± 6,0	Прогнозирование не представляется возможным	Нет
Гидроксиэтил акрилат	818-61-1	Акрилат; спирт	Ж	7,5 ± 4,75[5)]	1,6 ± 1,0	7,5 ± 4,75	9,8 ± 7,7	Прогнозирование не представляется возможным	Нет
2,5-диметил-2,5-гександиол	110-03-2	Спирт	Т	2,3 ± 0,2	0,2 ± 0,1	2,8 ± 2.6	0,5 ± 0,1	Прогнозирование не представляется возможным	Нет
Натрия оксалат	62-76-0	Оксикарбоновая кислота	Т	29,0 ± 1,2	5,3 ± 4,1	3,7 ± 1,5	30,6 ± 6,3	Прогнозирование не представляется возможным	Нет
Подкласс опасности 2А по итогам исследований *in vivo*[4)]									
2,4,11,13-Тетра-аза-тетрадекан-диими-дамид, N,N″-бис(4-хлорфенил)-3,12-диимино-, ди-D-глюконат (20 %, водный раствор)[6)]	18472-51-0	Ароматический гетероциклический галогенид; арилгалогенид; дигидроксильная группа; гуанидин	Ж	4,0 ± 1,1	1,3 ± 0,6	0,4 ± 0,4	1,8 ± 0,1	Прогнозирование не представляется возможным	Да (слабое)
Натрия бензоат	532-32-1	Арил; карбоновая кислота	Т	3,5 ± 2,6	0,6 ± 0,1	2,9 ± 2,6	1,1 ± 0,5	Прогнозирование не представляется возможным	Нет
Подкласс опасности 2В по итогам испытаний *in vivo*[4)]									
Диэтилтолуамид	134-62-3	Бензамид	Ж	15,6 ± 6,3	2,8 ± 0,9	32,4 ± 9,3	2,3 ± 2,2	Прогнозирование не представляется возможным	Нет

Продолжение таблицы 1

Вещество	Регистрационный номер CAS	Органическая функциональная группа[1)]	Агрегатное состояние	Жизнеспособность при применении VRM1 (%)[2)]	Жизнеспособность при применении VRM2 (%)[3)]	Жизнеспособность при применении LabCyte (%)[3-1)]	Жизнеспособность при применении MCTT HCE^{TM} (%)[3-2)]	Прогноз при применении VRM[7)]	Демонстрирует окраску
2,2-диметил-3-метиленбицикло [2.2.1] гептан	79-92-5	Алкан разветленный с третичным атомом углерода; алкен; бициклогептан; карбоциклические соединения, содержащие кольцо с внутренним мостиком; циклоалканы	Т	4,7 ± 1,5	15,8 ± 1,1	2,2 ± 2,6	22,9 ± 11,5	Прогнозирование не представляется возможным	Нет
Класс опасности отсутствует по итогам исследований *in vivo* [4)]									
1-этил-3-метилимидазолий этилсульфат	342573-75-5	Алкоксигруппа; аммониевая соль; арил; имидазол	Ж	79,9 ± 6,4	79,4 ± 6,2	48,0 ± 8,9	56,8 ± 3,4	Класс опасности отсутствует	Нет
Дикаприловый эфир	629-82-3	Алкоксигруппа, эфир	Ж	97,8 ± 4,3	95,2 ± 3,0	92,7 ± 5,0	89,9 ± 8,9	Класс опасности отсутствует	Нет
Пиперонилбутоксид	51-03-6	Алкоксигруппа; бензодиоксол; бензил; эфир	Ж	104,2 ± 4,2	96,5 ± 3,5	95,6 ± 14,0	82,4 ± 14,5	Класс опасности отсутствует	Нет
Полиэтиленгликоль (PEG-40) гидрогенизированное касторовое масло	61788-85-0	Ацилали; спирт; аллил; эфир	Вязкая жидкость	77,6 ± 5,4	89,1 ± 2,9	62,6 ± 11,5	72,1 ± 14,8	Класс опасности отсутствует	Нет
1-(4-хлорфенил)-3-(3,4-дихлорфенил) мочевина	101-20-2	Ароматический гетероциклический галогенид; арилгалогенид; производные мочевины	Т	106,7 ± 5,3	101,9 ± 6,6	77,8 ± 9,0	94,5 ± 5,9	Класс опасности отсутствует	Нет
2,2′-метилен-бис-(6-(2Н-бензотриазол-2-ил)-4-(1,1,3,3-тетраметилбутил) фенол)	103597-45-1	Алкан разветленный с четвертичным атомом углерода; конденсированные карбоциклические ароматические соединения; конденсированные насыщенные гетероциклические соединения; прекурсорные хиноидные соединения; трет-бутил	Т	102,7 ± 13,4	97,7 ± 5,6	90,2 ± 5,8	98,8 ± 10,1	Класс опасности отсутствует	Нет

Окончание таблицы 1

Вещество	Регистрационный номер CAS	Органическая функциональная группа[1)]	Агрегатное состояние	Жизнеспособность при применении VRM1 (%)[2)]	Жизнеспособность при применении VRM2 (%)[3)]	Жизнеспособность при применении LabCyte (%)[3-1)]	Жизнеспособность при применении MCTT HCE™ (%)[3-2)]	Прогноз при применении VRM[7)]	Демонстрирует окраску
Тетрафторборат калия	14075-53-7	Неорганические соли	Т	88,6 ± 3,3	92,9 ± 5,1	66,6 ± 0,2	90,5 ± 6,3	Класс опасности отсутствует	Нет

Сокращения: CAS — Реферативная служба по химии (Chemical Abstracts Service); VRM1 — валидированный референтный метод EpiOcular™ EIT; VRM2 — валидированный референтный метод SkinEthic™ HCE EIT.

1) Органическая функциональная группа согласно результатам анализа с использованием программного обеспечения Toolbox 3.1 [9].

2) На основе результатов, полученных с применением метода EpiOcular™ EIT в ходе совместных с EURL ECVAM/Cosmetics Europe валидационных исследований методов определения раздражающего воздействия на глаза [9].

3) На основе результатов, полученных с применением SkinEthic™ HCE EIT в ходе валидационных исследований [11], [12].

3-1) На основе результатов, полученных с применением LabCyte CORNEA-MODEL24 EIT в ходе валидационных исследований [14].

3-2) На основе результатов, полученных с применением MCTT HCE™ EIT в ходе валидационных исследований [15].

4) На основе результатов испытаний на глазу кролика *in vivo* [2], [18] с учетом СГС ООН [1].

5) На основе результатов, полученных в ходе исследований, организованных CEFIC в рамках консорциума по стратегии проведения испытаний на раздражение глаз *in vitro* (CON4EI).

6) Присвоение подкласса опасности 2А или 2В зависит от интерпретации критериев СГС ООН, которые являются отличительными признаками для этих двух подклассов опасности, т. е. от того, необходимо ли для присвоения подкласса опасности 2А подтверждать наличие последствий на 7-й день после проведения эксперимента у одного из трех или двух из трех подопытных животных. Исследованиям *in vivo* подвергались три животных. Все показатели помимо помутнения роговицы у одного из животных вернулись к норме на 7-й день или ранее. Единственному животному, которое не смогло полностью восстановиться за 7 дн, был присвоен 1 балл по помутнению роговицы (на 7-й день), признаки которого окончательно исчезли на 9-й день.

7) Прогноз при применении VRM: подробнее об интерпретации модели построения прогнозов см. в 7.2.9.1.

7 Составляющие методов испытаний с использованием RhCE

7.1 Общие параметры моделей

Для получения трехмерной ткани, подобной эпителию роговицы, должен использоваться соответствующий клеточный материал человека, состоящий из уже начавших дифференцироваться, но еще не ороговевших клеток. Модель тканей RhCE выращивается во вставках с пористой синтетической мембраной, через которую в клетки попадают питательные вещества. Готовый реконструированный эпителий роговицы должен состоять из нескольких слоев жизнеспособных некератинизированных клеток. Поверхность эпителиальной ткани RhCE должна находиться на воздухе, чтобы непосредственное воздействие на нее исследуемой химической продукции при местном нанесении происходило в тех же условиях, что и при их попадании на эпителий роговицы *in vivo*. Модель ткани RhCE должна обладать сформированным функциональным барьером, достаточно устойчивым, чтобы противостоять быстрому проникновению эталонных цитотоксических веществ, таких как тритон X-100 или натрия додецилсульфат (НДС). Барьерные функции должны быть подтверждены, их оценка может проводиться либо путем определения времени, необходимого для снижения жизнеспособности ткани на 50 % (ET_{50}) после нанесения эталонного вещества с известной заданной концентрацией (например, от 50 до 100 мкл 0,3 %-ного (по объему) раствора тритона X-100), либо путем определения концентрации, при которой эталонное вещество снижает жизнеспособность ткани на 50 % (IC_{50}) по истечении заданного периода воздействия (например, после 30 мин обработки 50 мкл НДС или 60 мин обработки 25 мкл НДС) (см. 7.2.5).Сдерживающие свойства модели RhCE должны препятствовать проникновению исследуемой химической продукции за края жизнеспособных тканей, так как это может снизить достоверность моделирования его воздействия на роговицу глаза. Клеточный материал человека, используемый для создания модели ткани RhCE, не должен быть контаминирован бактериями, вирусами, микоплазмой или грибами. Модели ткани должны контролироваться поставщиком на отсутствие грибов и бактерий.

7.2 Функциональные параметры модели

7.2.1 Жизнеспособность

Для оценки жизнеспособности ткани используют подходящий тетразолиевый краситель (ТК) (а именно: MTT для VRM1 и VRM2, WST-8 для LabCyte CORNEA-MODEL24 EIT или WST-1 для MCTT HCE™ EIT) [19], [21]. Жизнеспособные клетки модели ткани RhCE восстанавливают витальный краситель MTT до синеокрашенного MTT-формазан преципитата, который затем экстрагируют из этой ткани при помощи изопропанола (или иного аналогичного растворителя). Альтернативно жизнеспособные клетки ткани RhCE восстанавливают витальный краситель WST-8 или WST-1, превращая его в водорастворимый желтый формазан. Количество экстрагированного формазанового красителя (ФК) может определяться путем измерений поглощения (ОП) или посредством ВЭЖХ/УВЭЖХ-спектрофотометрии [48]. Значение ОП холостого раствора (им может быть растворитель-экстрагент для MTT, разбавленная среда WST-8 для испытаний с использованием WST-8 или разбавленная среда WST-1 для испытаний с использованием WST-1) должно быть достаточно низким, т. е. ОП < 0,1. Пользователи модели ткани RhCE должны следить за тем, чтобы каждая используемая партия материала удовлетворяла действующим критериям отрицательной контрольной пробы. Диапазоны приемлемости значений ОП отрицательной контрольной пробы для методов VRM1, VRM2, LabCyte CORNEA-MODEL24 и MCTT HCE™ приведены в таблице 2. При использовании метода ВЭЖХ/УВЭЖХ-спектрофотометрии диапазоны значений ОП отрицательной контрольной пробы, приведенные в таблице 2, следует рассматривать как критерии соответствия отрицательных контрольных проб. В отчете об испытаниях должно быть задокументировано, что ткани, обработанные отрицательной контрольной пробой, являются неизменяемыми при культивировании (обеспечивают одинаковые показатели жизнеспособности) на протяжении заданного периода воздействия при проведении испытаний. Аналогичный порядок должен соблюдаться разработчиком/поставщиком ткани как часть действий по контролю качества партии материала, хотя применяемые критерии при этом могут отличаться от установленных в таблице 2. Диапазон приемлемости (верхний и нижний пределы) значений ОП отрицательной контрольной пробы (при контроле качества) должен соответствовать указанному разработчиком/поставщиком модели ткани RhCE.

Таблица 2 — Диапазоны приемлемости значений ОП отрицательных контрольных проб (для пользователей метода испытаний)

Метод испытаний	Нижний допустимый предел	Верхний допустимый предел
EpiOcular™EIT(OCL-200)-VRM1 (для протоколов, применяемых как для жидкостей, так и для твердой продукции)	>0,8[1)]	<2,8
SkinEthic™HCE EIT(HCE/S)-VRM2 (для протоколов, применяемых как для жидкостей, так и для твердой продукции)	>1,0	≤2,5
LabCyteCORNEA-MODEL24EIT (для протоколов, применяемых как для жидкостей, так и для твердой продукции)	≥0,5	≤1,6
MCTT HCE™EIT (для протоколов, применяемых как для жидкостей, так и для твердой продукции)	≥1,6	≤3,0
[1)] Указанный предел допускает возможность длительных сроков транспортирования/хранения (например, >4 дн), поскольку было доказано, что данные обстоятельства не оказывают влияния на результативность методов исследования [44].		

7.2.2 Барьерные функции

Модель ткани RhCE должна иметь достаточную толщину и прочность, для того чтобы препятствовать быстрому проникновению эталонных цитотоксических веществ, по оценке, например, ET_{50} (тритон X-100) или IC_{50} (НДС) (см. таблицу 3). Барьерные функции каждой партии модели ткани RhCE должны быть подтверждены разработчиком/поставщиком соответствующей модели ткани после доставки тканей конечному пользователю (см. 7.2.5).

7.2.3 Морфология

При гистологическом исследовании любой модели ткани RhCE должно подтверждаться наличие в ней структуры, аналогичной структуре эпителия роговицы человеческого глаза (в том числе не менее трех слоев жизнеспособных эпителиальных клеток и некератинизированного эпителия). Для трех методов испытаний наличие у моделей тканей соответствующей морфологии подтверждается непосредственно разработчиком/поставщиком, следовательно, у пользователя, применяющего эти методы, отсутствует необходимость в самостоятельном подтверждении ее соответствия для каждой новой партии.

7.2.4 Воспроизводимость

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

7.2.5 Контроль качества (КК)

Модель ткани RhCE следует использовать только при условии подтверждения разработчиком/поставщиком соответствия каждой партии модели критериям приемки, в первую очередь требованиям, предъявляемым к жизнеспособности (см. 3.11), барьерным функциям (см. 2.1). Диапазон приемлемости (верхний и нижний пределы) для барьерных функций, оцениваемых по ET_{50} и IC_{50} (см. 7.1 и 7.2.2), должен устанавливаться разработчиком/поставщиком модели RhCE. Диапазоны приемлемости ET_{50} и IC_{50}, которые используются разработчиком/поставщиком моделей ткани RhCE, применяемых в методах настоящего стандарта в качестве критерия приемки партии при контроле качества, приведены в таблице 3. Разработчиком/поставщиком каждой модели ткани RhCE должен предоставлять пользователям метода данные, подтверждающие ее соответствие критериям приемки продукции, для включения этой информации в свои отчеты об испытаниях. Только результаты, полученные с использованием образцов моделей тканей, полностью отвечающих этим критериям приемки, могут использоваться для достоверного прогнозирования принадлежности к химической продукции, не требующей классификации и маркировки как вызывающей раздражение или серьезное повреждение глаз согласно СГС ООН.

Таблица 3 — Контроль качества. Критерии приемки партий

Метод испытаний	Нижний допустимый предел	Верхний допустимый предел
EpiOcular™EIT(OCL-200)-VRM1 (100 мкл 0,3 %-ного (по объему) тритона X-100)	ET_{50} = 12,2 мин	ET_{50} = 37,5 мин

Окончание таблицы 3

Метод испытаний	Нижний допустимый предел	Верхний допустимый предел
SkinEthic™ HCE EIT (HCE/S)-VRM2 (обработка 50 мкл НДС в течение 30 мин)	IC_{50} = 1,0 мг/мл	IC_{50} = 3,2 мг/мл
LabCyte CORNEA-MODEL24 EIT (обработка 25 мкл НДС в течение 60 мин)	IC_{50} = 1,0 мг/мл	IC_{50} = 4,0 мг/мл
MCTT HCE™ EIT (50 мкл 0,3%-ного (по объему) тритона X-100)	ET_{50} = 17,6 мин	ET_{50} = 41,0 мин

7.2.6 Нанесение исследуемой химической продукции и контрольных веществ

7.2.6.1 В каждой серии испытаний для каждой исследуемой химической продукции и каждого контрольного вещества используют не менее двух параллельно обрабатываемых образцов ткани. Применяют два различных протокола обработки: один для жидкой исследуемой продукции и один для твердой исследуемой продукции [44]—[47]. В случае применения какого-либо из двух VRM, а также MCTT HCE™ EIT поверхность ткани перед нанесением исследуемой химической продукции смачивают фосфатным буферным солевым раствором Дульбекко (ДФБС без Ca^{2+}/Mg^{2+}), имитирующим слой влаги, который в естественных условиях покрывает человеческий глаз. На первом этапе обработки ткани подвергаются воздействию соответствующей исследуемой химической продукции и контрольных веществ. В соответствии с протоколами обработки, принятыми для обоих VRM и MCTT HCE™ EIT, доза наносимой исследуемой химической продукции или контрольного вещества должна быть достаточной для их равномерного распределения по поверхности эпителия, не являясь при этом избыточной (см. 7.2.6.2 и 7.2.6.3, приложение А).

7.2.6.2 Исследуемая химическая продукция, нанесение которой при значениях температуры, не превышающих 37 °С, возможно при помощи пипетки (при необходимости может быть использована конструкция пипетки с прямым вытеснением), во всех четырех методах испытаний рассматривается как жидкая продукция; всю прочую продукцию следует считать твердой (см. 7.2.6.3). В соответствии с требованиями методов жидкая исследуемая химическая продукция равномерно распределяется по поверхности образца ткани (из расчета не менее 60 мкл/см^2) (см. приложение А, [44]—[47]). Следует всеми доступными способами избегать проявления капиллярных эффектов (эффектов поверхностного натяжения), которыми может сопровождаться нанесение на вставку (на поверхность ткани) малых объемов продукции, чтобы обеспечивать правильную дозу по отношению к ткани. Время инкубирования тканей, обработанных жидкой исследуемой продукции, должно составлять 1 мин (метод LabCyte CORNEA-MODEL24 EIT), 10 мин (метод MCTT HCE™ EIT) или 30 мин (VRM1 и VRM2) в стандартных условиях, предусмотренных каждым методом. По окончании заданного периода воздействия жидкую исследуемую химическую продукцию и контрольные вещества тщательно удаляют с поверхности образца ткани, обильно промывая ее ДФБС без Ca^{2+}/Mg^{2+} при комнатной температуре. В случае применения VRM после промывки следует дополнительное ополаскивание погружением при комнатной температуре в свежую среду (для окончательного удаления остатков исследуемой продукции, абсорбированной тканью) на заданный промежуток времени, продолжительность которого варьируется в зависимости от конкретного выбранного VRM. Для VRM1, методов LabCyte CORNEA-MODEL24 EIT и MCTT HCE™ EIT после воздействия исследуемой химической продукцией предусматривается дальнейшее инкубирование в свежей питательной среде в стандартных условиях культивирования перед проведением испытания с использованием ТК (см. приложение А, [44]—[47]).

7.2.6.3 Исследуемая химическая продукция, нанесение которой при значениях температуры, не превышающих 37 °С, при помощи пипетки не представляется возможным, во всех четырех методах рассматривается как твердая продукция. Количество наносимой химической продукции должно быть достаточным для сплошного покрытия всей поверхности ткани, т. е. должно использоваться не менее чем 33 мг/см^2 (приложение А). По возможности исследуемая твердая продукция должна испытываться в мелко измельченном состоянии. Ткани, обработанные твердой исследуемой химической продукцией, инкубируют в течение заданного промежутка времени (в зависимости от используемого метода) в стандартных условиях культивирования (см. приложение А, [44]—[47]). По окончании периода воздействия твердую исследуемую химическую продукцию и контрольные вещества тщательно удаляют с поверхности ткани, обильно промывая ее ДФБС без Ca^{2+}/Mg^{2+} при комнатной температуре. В случае применения VRM за данным этапом промывки следует ополаскивание погружением при комнатной

температуре в свежую среду (для окончательного удаления остатков исследуемой химической продукции, абсорбированной тканью) на заданный промежуток времени, продолжительность которого варьируется в зависимости от конкретного выбранного VRM, и дальнейшее инкубирование в свежей среде в стандартных условиях культивирования перед проведением испытания с использованием ТК (см. приложение А, [44]—[47]).

7.2.6.4 В каждую серию испытаний должны включаться отрицательная и положительная контрольные пробы для подтверждения того, что показатели жизнеспособности (оцениваемые относительно результатов, полученных для отрицательной контрольной пробой) и чувствительности (оцениваемые относительно результатов, полученных для положительной контрольной пробы) тканей находятся в пределах диапазонов приемлемости, основанных на данных прошлых наблюдений. Параллельно используемая отрицательная контрольная проба обеспечивает исходный уровень (100 %-ная жизнеспособность ткани) для вычисления относительной жизнеспособности тканей, обработанных исследуемой химической продукцией, которая выражается в процентах (% Жизнеспособность$_{тест}$). В качестве положительной контрольной пробы для VRM, а также метода MCTT HCE™ EIT рекомендуется использовать чистый метилацетат (CAS № 79-20-9, жидкость, доступен для приобретения, например, у компании Sigma-Aldrich, кат. № 45997) для испытаний по протоколам как жидкой, так и твердой химической продукции. Для метода LabCyte CORNEA-MODEL24 EIT в качестве положительной контрольной пробы рекомендуется использовать этанол (CAS № 64-17-5) при испытаниях жидкой продукции и лауриновую кислоту (CAS № 143-07-7) при испытаниях твердой химической продукции соответственно. Для VRM1 в качестве отрицательной контрольной пробы рекомендуется использовать ультрачистую H_2O при испытаниях как жидкой, так и твердой химической продукции. Для VRM2 и метода MCTT HCE™ EIT в качестве отрицательной контрольной пробы рекомендуется использовать ДФБС без Ca^{2+}/Mg^{2+} при испытаниях как жидкой, так и твердой химической продукции. Для метода LabCyte CORNEA-MODEL24 EIT в качестве отрицательной контрольной пробы рекомендуется использовать ДФБС без Ca^{2+}/Mg^{2+} (CAS № 64-17-5) при испытаниях жидкой химической продукции и не включать отрицательную контрольную пробу при испытаниях твердой химической продукции. Все вещества, перечисленные выше, ранее использовались в процессе валидации обоих VRM, и для них имеются многочисленные данные предыдущих исследований. Использование других веществ в качестве положительной или отрицательной контрольной пробы должно быть научно и надлежащим образом обосновано. Испытания отрицательных и положительных контрольных проб должны проводиться с соблюдением того же протокола(ов), что и для химической продукции, включенной в серию испытаний (т. е. для жидкой и/или твердой химической продукции). После нанесения контрольной пробы обработка должна включать воздействие, промывку, а также дополнительное ополаскивание погружением в свежую среду и, если требуется, инкубацию для контрольных проб, которые испытываются параллельно с жидкой (см. 7.2.6.2) или с твердой исследуемой химической продукцией (см. 7.2.6.3) перед проведением испытания с использованием ТК (см. 7.2.7, [44]—[47]). Одной отрицательной и одной положительной контрольной пробы достаточно для всей исследуемой химической продукции в таком же агрегатном состоянии (жидкой или твердой химической продукции), включенной в ту же серию испытаний.

7.2.7 Определение жизнеспособности тканей

7.2.7.1 В настоящем стандарте в качестве стандартизованного количественного метода [20]—[22] определения жизнеспособности тканей должен применяться метод с использованием ТК. Данный метод совместим с использованием трехмерных, объемных моделей тканей. Испытание с использованием ТК проводят сразу же по завершении всех процедур, выполнение которых предусмотрено после воздействия исследуемой химической продукцией. VRM предусматривают проведение испытаний с использованием MTT. В соответствии с требованиями VRM образец модели ткани RhCE помещают в 0,3 мл раствора с концентрацией MTT 1 мг/мл и выдерживают в течение (180 ± 15) мин при стандартных условиях культивирования. Жизнеспособные клетки модели ткани RhCE восстанавливают витальный краситель MTT до синеокрашенного MTT-формазан преципитата. Полученный синеокрашенный MTT-формазан преципитат экстрагируют из этой ткани при помощи соответствующего количества изопропанола (или аналогичного растворителя) [44], [45]. Образцы тканей, подвергнутые воздействию жидкой исследуемой химической продукции, подлежат экстрагированию как из нижней, так и из верхней их части, в то время как экстрагирование образцов тканей после нанесения на них твердой и окрашенной жидкой исследуемой химической продукции производят только из нижней части образца (чтобы снизить вероятность загрязнения изопропанола, используемого для экстрагирования, остаточными количествами исследуемой химической продукции, которая может все еще присутствовать на поверхности ткани). Если жидкая продукция, нанесенная на образцы ткани, трудно поддается смыванию, экстрагирование также

производится только из нижней части образцов. Метод LabCyte CORNEA-MODEL24 EIT предусматривает использование WST-8. Согласно методу LabCyte CORNEA-MODEL24 EIT образец модели ткани RhCE помещают в 0,3 мл разбавленного раствора WST-8, приготовленного с соблюдением стандартных операционных процедур [46], и выдерживают в нем в течение 240 мин при стандартных условиях культивирования, пока жизнеспособные клетки модели ткани RhCE не восстановят витальный краситель WST-8 до желтоокрашенного WST-8-формазана, который растворяется в разбавленном растворе WST-8 [46]. В методе MCTT HCE™ EIT используют WST-1. Согласно требованиям метода образец модели ткани RhCE помещают в 0,3 мл разбавленного раствора WST-1, приготовленного с соблюдением стандартных операционных процедур [47], и выдерживают в нем в течение 180 мин при стандартных условиях культивирования, пока жизнеспособные клетки модели ткани RhCE не восстановят витальный краситель WST-1 до желтоокрашенного WST-1-формазана, который растворяется в разбавленном растворе WST-1 [47]. Параллельно испытываемые отрицательная и положительная контрольные пробы должны подвергаться процедурам обработки, аналогичным для исследуемой химической продукции. В соответствии с требованиями VRM1 и VRM2 оценка количества экстрагированного MTT-формазана может быть получена либо путем измерений поглощения (ОП) на длине волны 570 нм с использованием фильтра, имеющего полосу пропускания не более ±30 нм, либо посредством ВЭЖХ/УВЭЖХ-спектрофотометрии (см. 7.2.7.8) [10], [48]. Согласно методам LabCyte CORNEA-MODEL24 EIT и MCTT HCE™ EIT количество экстрагированного WST-8/WST-1-формазана может быть непосредственно определенно без необходимости проведения экстрагирования либо путем измерений поглощения (ОП) на длине волны 450 нм с использованием фильтра, имеющего полосу пропускания не более ±30 нм, либо посредством ВЭЖХ/УВЭЖХ-спектрофотометрии (см. 7.2.7.8).

7.2.7.2 Оптические свойства исследуемой химической продукции или ее химическая активность по отношению к соответствующему ТК (MTT для VRM1 и VRM2, WST-8 для метода LabCyte CORNEA-MODEL24 EIT или WST-1 для метода MCTT HCE™ EIT) могут стать причиной искажения результатов количественных измерений ФК, что приведет к неверной оценке жизнеспособности тканей, а следовательно, к заниженной оценке ее способности вызывать разражение глаз. Исследуемая химическая продукция может затруднять количественные измерения ФК, создавая помехи за счет непосредственного восстановления ею ТК до окрашенного ФК (синеокрашенного MTT-формазана или желтоокрашенного WST-8/WST-1-формазана) и/или за счет своей мешающей окраски, если полоса оптического поглощения этой химической продукции в естественном состоянии или вследствие проведенной обработки находится в том же диапазоне ОП, что и у ФК (т. е. около 570 нм для MTT-формазана; около 450 нм для WST-8/WST-1-формазана). Потенциальную способность химической продукции непосредственно восстанавливать ТК и/или изменять окраску (только в случае окрашенной химической продукции) следует проверять либо перед проведением испытаний (для VRM1, VRM2 и метода LabCyte CORNEA-MODEL24 EIT), либо при получении заключений об отсутствии раздражающей способности (для метода MCTT HCE™ EIT). Если мешающая окраска имеет место, необходимо предусмотреть использование дополнительных контрольных проб для выявления потенциальных помех, вызываемых соответствующей исследуемой химической продукцией (см. 7.2.7.3—7.2.7.7 и приложения B—D). Это особенно важно в тех случаях, когда какую-либо исследуемую химическую продукцию не удается полностью удалить с поверхности образца ткани RhCE при промывании или когда она проникает в роговицеподобный эпителий и, следовательно, находится в модели ткани при проведении испытаний на жизнеспособность с использованием ТК. Для исследуемой химической продукции, область поглощения света у которой находится в том же диапазоне, что и у ФК (в естественном состоянии или после обработки), для которой не пригодны измерения поглощения (ОП) ФК в связи с выраженной мешающей окраской, т. е. высоким уровнем поглощения на длине волны (570 ± 30) нм (при работе с MTT-формазаном) или (450 ± 30) нм (при работе с WST-8/WST-1-формазаном), для количественных определений ФК могут применяться методы ВЭЖХ/УВЭЖХ-спектрофотометрии (см. 7.2.7.7 и 7.2.7.8) [10], [48]. Подробное описание, как обнаружить и скорректировать непосредственное восстановление ТК, и помехи, создаваемые окрашенной продукцией, содержится в СОП для соответствующих методов исследования [44]—[47]. В дополнение к этому блок-схемы, наглядно поясняющие порядок выявления продукции, которая способна непосредственно восстанавливать ТК и/или обладает мешающей окраской, и содержащие указания для VRM1, VRM2, методов LabCyte CORNEA-MODEL24 EIT, приведены в приложениях B—D соответственно.

7.2.7.3 Для выявления потенциальных помех, связанных с поглощением исследуемой химической продукцией света в том же волновом диапазоне, что и у ФК (в естественном состоянии или после обработки), и принятия решения о необходимости проведения дополнительного контроля исследуемую химическую продукцию добавляют в воду и/или изопропанол и оставляют для инкубирования при комнат-

ной температуре на достаточный промежуток времени (см. приложение А, [44]—[47]). Если исследуемая химическая продукция в смеси с водой и/или изопропанолом существенно поглощает свет в диапазоне (570 ± 20) нм в случае применения VRM1 (см. приложение В) или если при смешивании исследуемой химической продукции с водой был получен окрашенный раствор в случае применения VRM2 (см. приложение С), метода LabCyte CORNEA-MODEL24 EIT (см. приложение D), то эта химическая продукция, предположительно, может вызывать затруднения при выполнении измерений поглощения (ОП) ФК, поэтому для нее должны в дальнейшем выполняться проверки для оценки влияния окрашивания либо применяться альтернативные методы ВЭЖХ/УВЭЖХ-спектрофотометрии, позволяющие обойтись без таких дополнительных проверок (см. 7.2.7.7 и 7.2.7.8 и приложения В-Е) [44]—[47]. Если выполняются измерения поглощения (ОП), каждая создающая помехи исследуемая химическая продукция должна наноситься параллельно не менее чем на два жизнеспособных образца ткани, полностью воспроизводя на них процесс испытаний, с тем исключением, что на этапе, предусматривающем их обработку ТК, вместо раствора ТК следует использовать неактивную среду, обеспечивая таким образом контроль неспецифического окрашивания в жизнеспособных тканях ($НСО_{жизнеспособных}$) [44]—[47]. Контроль $НСО_{жизнеспособных}$ должен проводиться параллельно с испытаниями окрашенной исследуемой химической продукции, а в случае многократных испытаний, независимый контроль $НСО_{жизнеспособных}$ необходимо включать в каждое отдельное испытание (серию испытаний) в связи с необходимостью учитывать изменчивость биологических характеристик, свойственную жизнеспособным тканям. Фактическое значение показателя жизнеспособности ткани определяют как разность значения жизнеспособности (в процентах), полученного на жизнеспособных тканях, которые подвергались воздействию создающей помехи химической продукции и выдерживались в растворе МТТ или WST-8/WST-1 (% $Жизнеспособность_{тест}$), и значения показателя неспецифического окрашивания (в процентах), полученного на жизнеспособных тканях, которые подвергались воздействию создающего помехи вещества, но выдерживались в неактивной среде, не содержащей МТТ или WST-8/WST-1, в серии испытаний параллельно с испытаниями, результаты которых предполагается скорректировать (% $НСО_{жизнеспособных}$). Таким образом, фактическая жизнеспособность ткани = [% $Жизнеспособность_{тест}$] − [% $НСО_{жизнеспособных}$].

7.2.7.4 Для выявления исследуемой химической продукции, непосредственно восстанавливающей МТТ или WST-8/WST-1, каждую исследуемую химическую продукцию помещают в свежеприготовленный раствор ТК. После добавления соответствующего количества исследуемой химической продукции в раствор ТК полученную смесь инкубируют в течение приблизительно 3 или 4 ч при стандартных условиях культивирования (см. приложения В—D, [44]—[47]). Если раствор, содержащий ТК и исследуемую химическую продукцию (или суспензия нерастворимой исследуемой химической продукции), приобретает синюю/пурпурную (в случае с раствором МТТ) или желтую/оранжевую (в случае с раствором WST-8/WST-1) окраску, исследуемую химическую продукцию признают способной непосредственно восстанавливать МТТ и переходят к следующей функциональной проверке, которая проводится на нежизнеспособных тканях модели RhCE и выполняется независимо от того, какой метод в дальнейшем планируется применять: измерения поглощения (ОП) или ВЭЖХ/УВЭЖХ-спектрофотометрию. Эта дополнительная функциональная проверка предусматривает использование нежизнеспособных тканей, в которых имеет место лишь остаточный метаболизм, но которые при этом могут поглощать и удерживать исследуемую химическую продукцию таким же образом, как и жизнеспособные ткани. Нежизнеспособные ткани для VRM1 и МСТТ HCE™ EIT получают, подвергая образцы воздействию низких температур («замораживание»). Нежизнеспособные ткани для VRM2 получают путем продолжительного инкубирования образцов (например, в течение не менее чем (24 ± 1 ч)) в воде («воздействие воды»). Нежизнеспособные ткани для метода LabCyte CORNEA-MODEL24 EIT получают, подвергая образцы воздействию температур на уровне минус 80 °С или ниже в течение двух периодов времени длительностью по 30 мин каждый («замораживание»). Каждую способную восстанавливать ТК исследуемую химическую продукцию параллельно наносят не меньше чем на два образца нежизнеспособной ткани и полностью воспроизводят на них процесс испытаний для контроля неспецифического восстановления ТК (НСМТТ или НСWST) [44]—[47]. Для каждой исследуемой химической продукции должно быть достаточно только одного контроля НСМТТ или НСWST, независимо от общего числа независимых испытаний/серий. Фактическое значение показателя жизнеспособности ткани определяют как разность значения жизнеспособности, полученного на жизнеспособных тканях, которые подвергались воздействию исследуемой химической продукции, способной восстанавливать ТК (% $Жизнеспособность_{тест}$), и значения показателя неспецифического восстановления ТК (в процентах), полученного на нежизнеспособных тканях, которые подвергались воздействию этой же восстанавливающей ТК химической продукции, вычисленных относительно результата испытаний отрицательной контрольной пробы, проводившихся

в серии испытаний параллельно с испытаниями, результаты которых предполагается скорректировать (% НСМТТ или % HCWST). Таким образом, фактическая жизнеспособность ткани = [% Жизнеспособность$_{тест}$] − [% НСМТТ или % HCWST].

7.2.7.5 В случае исследуемой химической продукции, способной создавать помехи определению жизнеспособности по причине свойственной ей окраски (см. 7.2.7.3) и одновременно непосредственно восстанавливать ТК (см. 7.2.7.4), при измерениях поглощения (ОП) в дополнение к контролю НСМТТ или HCWST и НСО$_{жизнеспособных}$, рассмотренной выше, требуется проведение контрольных испытаний третьего вида. Такая необходимость обычно возникает при испытаниях темноокрашенной химической продукции, поглощающей свет в диапазоне (570 ± 30) нм (например, сине-, пурпурно- и черноокрашенной), что затрудняет работу с МТТ-формазаном, или светлоокрашенной исследуемой химической продукции, поглощающей свет в диапазоне (450 ± 30) нм (например, желто- и оранжевоокрашенной), что затрудняет работу с WST-8/WST-1-формазаном, поскольку свойственная ей окраска затрудняет оценку способности непосредственно восстанавливать МТТ или WST-8/ WST-1, как указано в 7.2.7.4. В связи с этим проведение контроля НСМТТ или HCWST согласно общему правилу требуется наряду с контролем НСО$_{жизнеспособных}$. Химическая продукция, при испытании которой одновременно проводится контроль НСМТТ или HCWST и НСО$_{жизнеспособных}$, может поглощаться и удерживаться как живыми, так и нежизнеспособными тканями. Соответственно, в данном случае контроль НСМТТ или HCWST может не только давать поправку на потенциальное непосредственное восстановление ТК исследуемой химической продукцией, но и на помехи от неспецифического окрашивания, вызванного поглощением и удержанием этой исследуемой химической продукции нежизнеспособными тканями. Это может привести к удвоению поправки на неспецифическое окрашивание, поскольку контроль НСО$_{жизнеспособных}$ уже предполагает получение отдельной поправки на окрашивание вследствие поглощения и удержания исследуемой химической продукции жизнеспособными тканями. Для исключения вероятного применения двойной поправки на неспецифическое окрашивание должна применяться третья разновидность контроля, позволяющего проследить за окрашиванием нежизнеспособных тканей (НСО$_{нежизнеспособных}$)(см. приложения B—D) [44]—[47]. Согласно этой дополнительной процедуре контроля исследуемую химическую продукцию параллельно наносят не менее чем на два образца нежизнеспособной ткани и полностью воспроизводят на них процесс испытаний, с тем исключением, что на этапе, предусматривающем их обработку ТК, вместо раствора ТК используют неактивную среду. Для каждой исследуемой химической продукции достаточно только одного контроля НСО$_{нежизнеспособных}$, независимо от числа независимых испытаний/серий, однако его следует проводить параллельно с контролем НСМТТ или HCWST и на образцах ткани из одной и той же партии. Фактическое значение показателя жизнеспособности ткани определяют как разность значения жизнеспособности (в процентах), полученного на жизнеспособных тканях, которые подвергались воздействию исследуемой продукции (% Жизнеспособность$_{тест}$), и % НСМТТ или % HCWST, а также % НСО$_{жизнеспособных}$, суммируемую со значением показателя неспецифического окрашивания (в процентах), полученным на нежизнеспособных тканях, которые подвергались воздействию создающей помехи химической продукции, но выдерживались в среде, не содержащей ТК, вычисленное относительно результата испытаний отрицательной контрольной пробы, проводившихся в серии испытаний параллельно с испытаниями, результаты которых предполагается скорректировать (% НСО$_{нежизнеспособных}$). Таким образом, фактическая жизнеспособность ткани = [% Жизнеспособность$_{test}$] − [% НСМТТ или % HCWST] − [% НСО$_{жизнеспособных}$] + + [% НСО$_{нежизнеспособных}$].

7.2.7.6 Важно иметь в виду, что помехи, обусловленные неспецифическим восстановлением ТК и неспецифическим окрашиванием, могут приводить к повышению значений ОП пробы (при измерениях поглощения), а помехи, обусловленные неспецифическим восстановлением ТК, — к увеличению площади пика ФК пробы (при применении методов ВЭЖХ/УВЭЖХ-спектрофотометрии) до уровней, выходящих за пределы линейного диапазона спектрофотометрического оборудования. По этой причине при использовании моделей RhCE для каждой лаборатории важной задачей является определение линейного диапазона ОП/площади пика применяемого для испытаний спектрофотометрического оборудования с помощью МТТ-формазана (CAS № 57360-69-7), доступного для приобретения, например, у компании Sigma-Aldrich (кат.№ M2003), WST-8-формазана (CAS № 193149-76-7), доступного для приобретения, например, у компании Dojindo Molecular Technologies, или WST-1-формазана (CAS № 150849-53-9), доступного для приобретения, например, у компании Toronto Research Chemicals (кат. № 1718750).

7.2.7.7 Результаты измерений поглощения (ОП), выполняемых при помощи спектрофотометра, являются пригодными для оценки исследуемой химической продукции, способной непосредственно восстанавливать ТК и/или обладающей мешающей окраской, только в том случае, если наблюдаемая интерференция при определении ФК не характеризуется высокими значениями (т. е. значения ОП проб после воздействия на них исследуемой химической продукцией без внесения поправок на непосредственное восстановление ТК и/или неспецифическое окрашивание не выходят за пределы линейного диапазона спектрофотометра). Вместе с тем результаты испытаний химической продукции, для которой получены значения % HCMTT или % HCWST и/или % $HCO_{жизнеспособных}$ ≥60 % (VRM1 и VRM2 при испытаниях жидкой продукции и метод MCTT HCE™ EIT при испытании твердой продукции), ≥50 % (VRM2 при испытании твердой продукции), ≥40 % (метод LabCyte CORNEA-MODEL24 EIT) или ≥35 % (метод MCTT HCE™ EIT при испытании жидкой продукции) относительно результата, полученного для отрицательной контрольной пробы, следует использовать с осторожностью, поскольку с точки зрения обоих VRM данные значения являются пороговыми для различения классифицируемой и неклассифицируемой химической продукции (см. 7.2.9.1). С другой стороны, поглощение (ОП) не может быть измерено, если интерференция при определении ФК характеризуется высокими значениями (т. е. нескорректированные значения ОП для испытуемых проб выходят за пределы линейного диапазона спектрофотометра). Окрашенная химическая продукция или продукция, приобретающая окраску при контакте с водой или изопропанолом, которая создает существенные помехи при измерениях поглощения (ОП) в процессе определения ФК, может оцениваться посредством ВЭЖХ/УВЭЖХ-спектрофотометрии (см. приложения В—Е), поскольку ВЭЖХ/УВЭЖХ обеспечивают разделение исследуемой продукции и ФК перед количественным определением последнего. Это означает, что в случае применения ВЭЖХ-УВЭЖХ-спектрофотометрии необходимость контроля $HCO_{жизнеспособных}$ или $HCO_{нежизнеспособных}$ отсутствует независимо от того, какая именно химическая продукция испытывается. Необходимость контроля HCMTT или HCWST напротив сохраняется, если исследуемая химическая продукция предположительно способна непосредственно восстанавливать ТК (как описано в 7.2.7.4). Проведение контроля HCMTT или HCWST также требуется, если химическая продукция имеет окраску (собственную или проявляющуюся при контакте с водой), которая затрудняет оценку ее способности непосредственно восстанавливать ТК в соответствии с 7.2.7.4. Если для количественного определения ФК применяются методы ВЭЖХ/УВЭЖХ-спектрофотометрии, значение жизнеспособности тканей (в процентах) вычисляют как отношение площади пика ФК, полученного на жизнеспособных тканях после воздействия на них исследуемой химической продукцией, к площади пика ФК, полученного для параллельно испытываемой отрицательной контрольной пробы (в процентах). Для исследуемой химической продукции, способной непосредственно восстанавливать ТК, фактическое значение показателя жизнеспособности определяют как разность % $Жизнеспособность_{тест}$ и % HCMTT или % HCWST в соответствии с заключительным положением 7.2.7.3. Следует также иметь в виду, что если химическая продукция, которая способна непосредственно восстанавливать ТК и помимо этого обладает мешающей проведению анализа окраской, задерживается в тканях после обработки и восстанавливает ТК настолько интенсивно, что уровень ОП (при измерениях ОП) или площади пиков (при применении метода УВЭЖХ/ВЭЖХ-спектрофотометрии) для испытуемых проб выходят за пределы линейного диапазона используемого спектрофотометра, подготовить достоверную оценку степени ее опасности при применении методов с использованием RhCE не представляется возможным, хотя вероятность наличия подобной продукции на практике чрезвычайно мала.

7.2.7.8 Методы ВЭЖХ/УВЭЖХ могут использоваться для количественного определения ФК при испытаниях любых видов химической продукции (окрашенной, неокрашенной, восстанавливающей и не восстанавливающей ТК) [10], [48]. Существует большое разнообразие ВЭЖХ/УВЭЖХ спектрофотометрических систем, в связи с чем аналитические условия, обеспечиваемые системами, которые находятся в распоряжении у конкретных пользователей, едва ли могут быть во всех случаях полностью идентичными. С учетом данного обстоятельства до начала использования выбранной системы для целей количественного определения ТК в пробах необходимо убедиться в ее соответствии критериям приемлемости, установленным для стандартного набора квалификационных параметров, основанным на положениях руководства по валидации биоаналитических методов в промышленности, которое было разработано американским Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов [48], [49]. Данные ключевые параметры и действующие для них критерии приемлемости приведены в приложении Е. Если спектрофотометрическая система ВЭЖХ/УВЭЖХ обеспечивает соблюдение критериев согласно приложению Е, она признается пригодной для выполнения количественных определений ФК в аналитических условиях, предусмотренных настоящим стандартом.

7.2.8 Критерии приемлемости

В каждой серии испытаний с использованием тканей RhCE из партий, успешно прошедших контроль качества (см. 7.2.5), образцы тканей, обработанные отрицательной контрольной пробой, должны демонстрировать значения ОП, отражающие фактическое состояние этих тканей после их транспортирования и получения, а также прохождения всех этапов, предусмотренных протоколом испытаний, и не выходящие за установленные пределы, известные по предыдущим наблюдениям, указанные в таблице 2 (см. 7.2.1). Ткани, обработанные положительной контрольной пробой, т. е. метилацетатом (для VRM1, VRM2 и метода MCTT HCE™ EIT), этанолом (для метода LabCyte CORNEA- MODEL24 EIT при испытаниях жидкой продукции) или лауриновой кислотой (для метода LabCyte CORNEA-MODEL24 EIT при испытаниях твердой продукции), должны характеризоваться средним показателем жизнеспособности <50 % по отношению к тканям, обработанным отрицательной контрольной пробой, при применении VRM1 для жидкой или твердой химической продукции, ≤30 % (для жидкой продукции) или ≤20 % (для твердой продукции) — в случае применения VRM2, ≤35 % — в случае применения метода MCTT HCE™ EIT и ≤40 % — в случае применения метода LabCyte CORNEA-MODEL24 EIT, что отражает способность этих тканей предсказуемым образом реагировать на воздействие раздражающей химической продукции в условиях, предусмотренных соответствующим методом испытаний [44]—[47]. Вариабельность образцов тканей, параллельно обрабатываемых исследуемой химической продукцией и контрольными веществами, должна находиться в допустимых пределах (т. е. разность значений жизнеспособности двух параллельно обрабатываемых образцов ткани должна составлять менее 20 % либо стандартное отклонение (СО) трех параллельно обрабатываемых образцов ткани не должно превышать 18 %). Если результаты испытаний отрицательной или положительной контрольных проб, включенных в серию испытаний, выходят за пределы диапазона приемлемости, такую серию рассматривают как несоответствующую установленным требованиям и испытания проводят повторно. Если вариабельность параллельно обрабатываемых исследуемой химической продукцией образцов тканей выходит за указанные пределы, испытание должно рассматриваться как несоответствующее установленным требованиям и исследуемая химическая продукция должна испытываться заново.

7.2.9 Интерпретация результатов и модель построения прогнозов

7.2.9.1 Значения ОП/площади пиков, полученные для параллельно обрабатываемых образцов тканей каждой исследуемой химической продукцией, должны использоваться для вычисления среднего арифметического значения жизнеспособности в процентах (среднего арифметического для испытуемых образцов тканей) по отношению к результату, полученному для отрицательной контрольной пробы и принятому равным 100 %. Предельные значения жизнеспособности тканей (в процентах) для идентификации химической продукции, не требующей классификации как вызывающей раздражение или серьезное повреждение глаз (класс опасности согласно СГС ООН отсутствует), приведены в таблице 4. Интерпретацию полученных результатов следует осуществлять следующим образом:

- исследуемую химическую продукцию признают не требующей классификации и маркировки в рамках СГС ООН (класс опасности отсутствует), если среднее арифметическое значение жизнеспособности тканей (в процентах) после воздействия и последующего инкубирования больше (>) установленного предельного значения жизнеспособности (в процентах), приведенного в таблице 4. В этом случае проведение дальнейших испытаний с применением других методов не требуется;

- если среднее арифметическое значение жизнеспособности тканей (в процентах) после воздействия на них исследуемой химической продукцией и последующего инкубирования меньше или равно (≤) установленному предельному значению жизнеспособности (в процентах), прогнозирование не представляется возможным, исходя из отдельно взятого результата, как указано в таблице 4. Это связано с тем, что в случае, если результат признается положительным, применяемые методы не позволяют принять окончательное решение об отнесении химической продукции к классу опасности 1 или классу опасности 2 согласно СГС ООН (см. 3.11). Кроме того, для методов испытаний с использованием RhCE отмечена довольно высокая доля (в процентах) ложноположительных результатов (см. 3.6—3.9). В любом случае для целей дальнейшей классификации исследуемой химической продукции необходимо располагать дополнительной информацией, как предусмотрено соответствующим руководящим документом IATA [3].

Таблица 4 — Модели построения прогнозов в соответствии с классификацией СГС ООН

Метод испытания	Класс опасности отсутствует	Прогнозирование не представляется возможным
EpiOcular™EIT (для жидкой и твердой продукции)	Среднее арифметическое значение жизнеспособности ткани >60 %	Среднее арифметическое значение жизнеспособности ткани ≤60 %
SkinEthic™HCE EIT (для жидкой продукции)	Среднее арифметическое значение жизнеспособности ткани >60 %	Среднее арифметическое значение жизнеспособности ткани ≤60 %
SkinEthic™HCE EIT (для твердой продукции)	Среднее арифметическое значение жизнеспособности ткани >50 %	Среднее арифметическое значение жизнеспособности ткани ≤50 %
LabCyteCORNEA-MODEL24EIT (для жидкой и твердой продукции)	Среднее арифметическое значение жизнеспособности ткани >40 %	Среднее арифметическое значение жизнеспособности ткани ≤40 %
MCTT HCE™EIT (для жидкой продукции)	Среднее арифметическое значение жизнеспособности ткани >35 %	Среднее арифметическое значение жизнеспособности ткани ≤35 %
MCTT HCE™EIT (для твердой продукции)	Среднее арифметическое значение жизнеспособности ткани >60 %	Среднее арифметическое значение жизнеспособности ткани ≤60 %

7.2.9.2 Одного испытания, в котором параллельно было использовано не менее двух образцов ткани, должно быть достаточно для исследуемой химической продукции, если получен однозначный результат. Тем не менее, если полученные результаты носят пограничный характер, в том числе когда результаты определений не согласуются и/или среднее арифметическое значение жизнеспособности тканей (в процентах) соответствует (60 ± 5) % (VRM1 и VRM2 для жидкой продукции и метод MCTT HCE™ EIT для твердой продукции), (50 ± 5) % (VRM2 для твердой продукции), (40 ± 5) % (метод LabCyte CORNEA-MODEL24 EIT) или (35 ± 5) % (метод MCTT HCE™ EIT для жидкой продукции), целесообразно принять решение о проведении второго испытания, а также третьего — в случае расхождения результатов первых двух испытаний.

Эталонная химическая продукция может быть использована для оценивания потенциальной способности неизвестной исследуемой химической продукции вызывать серьезное повреждение/ раздражение глаз или для оценивания относительной офтальмологической токсичности классифицируемой химической продукции в пределах заданного диапазона положительного отклика.

8 Данные и отчеты об испытаниях

8.1 Данные

Информацию об отдельных результатах испытаний параллельно используемых образцов ткани в серии испытаний (например, значения ОП площади пиков для ФК и вычисленные значения жизнеспособности тканей (в процентах) для исследуемой химической продукции и контрольных проб, а также итоговое прогнозное заключение, подготовленное после применения метода с использованием RhCE) представляют в табличной форме для каждой исследуемой химической продукции и при необходимости включают в нее данные, полученные при проведении повторных испытаний. Кроме того, следует приводить среднее арифметическое значение жизнеспособности тканей (в процентах) и разность значений жизнеспособности тканей двух параллельно обрабатываемых образцов (если количество обрабатываемых образцов $n = 2$) или СО (если количество обрабатываемых образцов $n \geq 3$) для каждой исследуемой химической продукции и контрольной пробы. Любые помехи, наблюдаемые при количественном определении ФК и обусловленные исследуемой химической продукцией, т. е. способность непосредственно восстанавливать ТК и/или наличие мешающей окраски, должны быть отражены в отчете об испытаниях для каждой исследуемой химической продукции.

8.2 Отчет об испытаниях

Отчет об испытаниях должен включать в себя следующую информацию:
Исследуемая химическая продукция.
Однокомпонентное вещество:

- идентификационные данные химической продукции, а именно название (ня) по IUPAC или CAS, регистрационный номер (номера) CAS, коды SMILES или InChI, структурную формулу и/или другие отличительные признаки;

- сведения об агрегатном состоянии, летучести, показателе pH, значении LogP, молекулярной массе, классе химических веществ, а также по возможности других значимых физико-химических характеристиках;

- сведения о степени чистоты, характеристика примесей, если подготовка такой характеристики возможна и практически целесообразна, и т. п.;

- способ обработки перед началом испытаний, если такая обработка проводилась (например, подогрев, измельчение);

- сведения об условиях хранения и стабильности вещества, если таковые имеются.

Многокомпонентное вещество, UVCB и смеси:

- как можно более полное описание вещества, например все доступные сведения о химических обозначениях (см. выше), степени чистоты, о количественных долях и соответствующих физико-химических характеристиках (см. выше) его составляющих;

- сведения об агрегатном состоянии, а также по возможности других значимых физико-химических характеристиках;

- сведения о степени чистоты, характеристика примесей, если подготовка такой характеристики возможна и практически целесообразна, и т. п.;

- способ обработки перед началом испытаний, если такая обработка проводилась (например, подогрев, измельчение);

- сведения об условиях хранения и стабильности, если таковые имеются.

Вещества для положительной и отрицательной контрольных проб:

- идентификационные данные, а именно название (я) по IUPAC или CAS, регистрационный номер (номера) CAS, коды SMILES или InChI, структурную формулу и/или другие отличительные признаки;

- сведения об агрегатном состоянии, летучести, молекулярной массе, классе химических веществ, а также по возможности других значимых физико-химических характеристиках;

- сведения о степени чистоты, характеристика примесей, если подготовка такой характеристики возможна и практически целесообразна, и т. п.;

- способ обработки перед началом испытаний, если такая обработка проводилась (например, подогрев, измельчение);

- сведения об условиях хранения и стабильности вещества, если таковые имеются;

- обоснование выбора вещества отрицательной контрольной пробы, отличного от рекомендованных в приложении А, при необходимости;

- обоснование выбора вещества положительной контрольной пробы, отличного от рекомендованных в приложении А, при необходимости;

- ссылки на результаты прошлых испытаний отрицательных и положительных контрольных проб, подтверждающие пригодность критериев приемлемости, использованных для серий испытаний.

Информация о лице/организации, осуществлявших финансирование, и лаборатории, проводившей испытания:

- наименование/имя и адрес организации/лица, осуществлявших финансирование, лаборатории, где проводились испытания, а также имя руководителя исследования.

Использованная модель ткани RhCE и применявшийся протокол исследования (с соответствующим обоснованием выбора, при необходимости).

Условия испытаний в соответствии с применяемым методом:

- сведения об использованной модели ткани RhCE, включая номер партии;

- сведения о длине волны и полосе пропускания (при необходимости), использованных для количественного определения ФК, и линейном диапазоне средства измерений (например, спектрофотометра);

- описание метода, используемого для количественного определения ФК;

- описание спектрофотометрической системы ВЭЖХ/УВЭЖХ, если такая система использовалась.

Полный объем сопроводительной информации о конкретной используемой модели тканей RhCE, включая сведения о ее характеристиках. Эта информация, в частности, должна включать данные, касающиеся:

- контроля качества с точки зрения жизнеспособности (поставщиком);

- контроля жизнеспособности в условиях, предусмотренных методом испытаний (пользователем);

- контроля качества с точки зрения эффективности барьерных функций ткани (для положительных и отрицательных контрольных проб);

- морфологии ткани (если таковые имеются);

- других видов контроля качества (КК) модели ткани RhCE (если таковые имеются);

- ссылки на данные прошлых наблюдений за характеристиками модели ткани RhCE. Эта информация должна включать, но не ограничиваться сведениями, касающимися приемлемости результатов КК со ссылкой на накопленные данные соответствующей партии ткани;

- сведения о наличии у испытательной лаборатории достаточной квалификации до начала регулярного применения соответствующего метода испытаний, подтвержденной с использованием химических веществ согласно рекомендованному списку для проверки квалификации.

Критерии приемлемости результатов испытаний:

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

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

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

Порядок испытаний:

- подробное описание применяемой методики испытаний;

- используемая дозу исследуемой химической продукции и контрольных веществ;

- длительность и температура воздействия химической продукцией, ополаскивания погружением и периодов инкубирования образцов (при необходимости);

- описание любых изменений методики испытаний;

- результаты контроля для исследуемой химической продукции, способной непосредственно восстанавливать ТК и/или имеющей мешающую окраску (при необходимости);

- количество образцов ткани, параллельно использованных для испытаний каждой исследуемой химической продукции и контрольных веществ (положительной контрольной пробы, отрицательной контрольной пробы), а также контроля HCMTT, HCWST, $HCO_{жизнеспособных}$ и $HCO_{нежизнеспособных}$ (при необходимости).

Результаты:

- представление в табличной форме данных для каждой исследуемой химической продукции и контрольных веществ в каждой серии испытаний (в том числе для повторных испытаний, если проводились) и для всех параллельно испытанных образцов, включая значения ОП или площади пиков ФК, значения жизнеспособности ткани (в процентах), среднее арифметическое значение жизнеспособности ткани (в процентах), разность значений жизнеспособности параллельно обрабатываемых образцов ткани или СО, а также окончательное прогнозное заключение;

- в случае необходимости также — результаты контроля химической продукции, способной непосредственно восстанавливать ТК и/или имеющей мешающую окраску, включая значения ОП или площади пика ФК, % HCMTT или % HCWST, % $HCO_{жизнеспособных}$, % $HCO_{нежизнеспособных}$, разность значений жизнеспособности параллельно обрабатываемых образцов ткани или СО, окончательно скорректированное значение жизнеспособности ткани (в процентах), а также окончательное прогнозное заключение;

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

- описание прочих явлений, наблюдавшихся в ходе испытаний, например, окрашивание тканей при испытаниях химической продукции, имеющей собственную окраску.

Рассмотрение результатов.

Выводы.

Приложение А
(обязательное)

Основные параметры методов испытаний с использованием RhCE, валидированных для определения химической продукции, не требующей классификации и маркировки как вызывающей раздражение или серьезное повреждение глаз

Таблица А.1 — Основные параметры валидированных методов испытаний с использованием RhCE

№	1		2		3		4	
Составляющие метода испытаний	EpiOcular™ EIT (VRM 1)		SkinEthic™ HCE EIT (VRM 2)		LabCyte CORNEA- MODEL24 EIT		MCTT HCE™ EIT	
Протокол[1)]	Жидкая продукция (может наноситься пипеткой при температуре (37 ± 1) °С или более низкой)	Твердая продукция (не может наноситься пипеткой)	Жидкая и вязкая продукция (может наноситься пипеткой)	Твердая продукция (не может наноситься пипеткой)	Жидкая продукция (может наноситься пипеткой)	Твердая продукция (не может наноситься пипеткой)	Жидкая продукция (может наноситься пипеткой)	Твердая продукция (не может наноситься пипеткой)
Площадь поверхности модели ткани	0,6 $см^2$	0,6 $см^2$	0,5 $см^2$	0,5 $см^2$	0,3 $см^2$	0,3 $см^2$	0,6 $см^2$	0,6 $см^2$
Количество образцов ткани	Не менее 2	Не менее 2	Не менее 2	Не менее 2	3	3	Не менее 2	Не менее 2
Предварительная или последующая проверка на наличие мешающего окрашивания	50 мкл + 1 мл H_2O на 60 мин при (37 ± 2) °С, (5 ± 1) % CO_2, отн. вл. ≥95 % (для неокрашенной исследуемой химической продукции) или 50 мкл + 2 мл изопропанола с перемешиванием, на 2—3 ч при КТ	50 мг + 1 мл H_2O на 60 мин при (37 ± 2) °С, (5 ± 1) % CO_2, отн. вл. ≥95 % (для неокрашенной исследуемой химической продукции) или 50 мг + 2 мл изопропанола с перемешиванием на 2—3 ч при КТ	(10 + 90) мкл H_2O с перемешиванием, на (30 ± 2) мин при комнатной температуре (КТ, от 18 °С до 28 °С). Если исследуемая химическая продукция приобретает окраску, проводят испытания на пригодных	10 мг + 90 мкл H_2O с перемешиванием, на (30 ± 2) мин при КТ. Если исследуемая химическая продукция приобретает окраску, проводят испытания на пригодных жизнеспособных тканях	50 мкл + 0,5 мл H_2O, с перемешиванием, на 15 мин при (37 ± 2) °С, (5 ± 1) % CO_2, отн. вл. ≥95 %. Если исследуемая химическая продукция приобретает окраску, проводят испытания на пригодных	10 мг + 0,5 мл H_2O, с перемешиванием, на 15 мин при (37 ± 2) °С, (5 ± 1) % CO_2, отн. вл. ≥95 %. Если исследуемая химическая продукция приобретает окраску, проводят испытания на пригодных	40 мкл + 1 мл H_2O, с перемешиванием, на 60 мин при (37 ± 2) °С, (5 ± 1) % CO_2, отн. вл. ≥95 %. Если значение ОП исследуемой химической продукции на длине волны (450 ± 20) нм после	40 мг + 1 мл H_2O, с перемешиванием, на 60 мин при (37 ± 2) °С, 5 ± 1 % CO_2, отн. вл. ≥95 %. Если значение ОП исследуемой химической продукции на длине волны (450 ± 20) нм после

[1)] Подробная информация о содержании протокола приведена в СОП для соответствующего метода испытаний, которые указаны в библиографии.

Продолжение таблицы А.1

№	1		2		3		4	
Составляющие метода испытаний	EpiOcular™ EIT (VRM 1)		SkinEthic™ HCE EIT (VRM 2)		LabCyte CORNEA- MODEL24 EIT		MCTT HCE™ EIT	
	(для окрашенной исследуемой химической продукции). Если значение ОП исследуемой химической продукции на длине волны (570 ± 20) нм после вычитания значения ОП воды или изопропанола составляет >0,08 (что соответствует 5 % среднего значения ОП отрицательной контрольной пробы), проводят испытания на пригодных жизнеспособных тканях	(для окрашенной и неокрашенной исследуемой химической продукции). Если значение ОП исследуемой химической продукции на длине волны (570 ± 20) нм после вычитания известного значения ОП воды или изопропанола составляет >0,08 (что соответствует 5 % среднего значения ОП отрицательной контрольной пробы), проводят испытания на пригодных жизнеспособных тканях	жизнеспособных тканях		жизнеспособных тканях	жизнеспособных тканях	вычитания значения ОП воды составляет >0,1 (что соответствует 5 % среднего значения ОП отрицательной контрольной пробы), проводят испытания на пригодных жизнеспособных тканях	вычитания значения ОП воды составляет >0,1 (что соответствует 5 % среднего значения ОП отрицательной контрольной пробы), проводят испытания на пригодных жизнеспособных тканях

Продолжение таблицы А.1

№	1		2		3		4	
Составляющие метода испытаний	EpiOcular™ EIT (VRM 1)		SkinEthic™ HCE EIT (VRM 2)		LabCyte CORNEA- MODEL24 EIT		MCTT HCE^{TM} EIT	
Предварительная или последующая проверка на способность непосредственно восстанавливать тетразолий (последующую проверку проводят только для MCTTHCE^{TM} EIT)	50 мкл + 1 мл MTT (раствор концентрацией 1 мг/мл) на (180 ± 5) мин при 37 °С, 5 % CO_2, отн. вл. ≥95 %. Если раствор приобретает синюю/пурпурную окраску, проводят испытания на нежизнеспособных (после замораживания) тканях (50 мкл стерильной деионизированной воды используют в качестве отрицательной контрольной пробы для раствора MTT)	50 мг + 1 мл MTT (раствор концентрацией 1 мг/мл) на (180 ± 5) мин при 37 °С, 5 % CO_2, отн. вл. ≥95 %. Если раствор приобретает синюю/пурпурную окраску проводят испытания на нежизнеспособных (после замораживания) тканях (50 мкл стерильной деионизированной воды используют в качестве отрицательной контрольной пробы для раствора MTT)	(30 + 300) мкл MTT (раствор концентрацией 1 мг/мл) на (180 ± 5) мин при (7 ± 2) °С, (5 ± 1) % CO_2, отн. вл. ≥95 %. Если раствор приобретает синюю/пурпурную окраску, проводят испытания на нежизнеспособных (после воздействия водой) тканях (30 мкл стерильной деионизированной воды используют в качестве отрицательной контрольной пробы для раствора MTT)	(30 + 300) мкл MTT (раствор концентрацией 1 мг/мл) на (180 ± 5) мин при (7 ± 2) °С, (5 ± 1) % CO_2, отн. вл. ≥95 %. Если раствор приобретает синюю/пурпурную окраску, проводят испытания на нежизнеспособных (после воздействия водой) тканях (30 мкл стерильной деионизированной воды используют в качестве отрицательной контрольной пробы для раствора MTT)	(50 + 300) мкл разбавленного раствора WST-8 на (240 ± 20) мин при (37 ± 2) °С, (5 ± 1) % CO_2, отн. вл. ≥95 %. Если раствор приобретает желтую окраску, проводят испытания на нежизнеспособных (после замораживания) тканях	10 мг + 300 мкл разбавленного раствора WST-8 на (240 ± 20) мин при (37 ± 2) °С, (5 ± 1) % CO_2, отн. вл. ≥95 %. Если раствор приобретает желтую окраску, проводят испытания на нежизнеспособных (после замораживания) тканях	40 мкл + 1 мл разбавленного раствора WST-1 на (180 ± 10) мин при (37 ± 2) °С, (5 ± 1) % CO_2, отн. вл. ≥95 %. Если раствор приобретает желтую окраску, проводят испытания на нежизнеспособных (после замораживания) тканях	40 мг + 1 мл разбавленного раствора WST-1 на (180 ± 10) мин при (37 ± 2) °С, (5 ± 1) % CO_2, отн. вл. ≥95 %. Если раствор приобретает желтую окраску, проводят испытания на нежизнеспособных (после замораживания) тканях
Предварительная обработка	20 мкл ДФБС без Ca^{2+}/Mg^{2+} на (30 ± 2) мин при (37 ± 2) °С, (5 ± 1) % CO_2, отн.вл. ≥95 %, в защищенном от света месте	20 мкл ДФБС без Ca^{2+}/Mg^{2+} на (30 ± 2) мин при (37 ± 2) °С, (5 ± 1) % CO_2, отн.вл. ≥95 %, в защищенном от света месте						

Продолжение таблицы А.1

№	1		2		3		4	
Составляющие метода испытаний	EpiOcular™ EIT (VRM 1)		SkinEthic™ HCE EIT (VRM 2)		LabCyte CORNEA- MODEL24 EIT		MCTT HCE™ EIT	
Доза и нанесение при обработке	50 мкл (83,3 мкл/см^2)	50 мг (83,3 мг/см^2) с использованием приспособления (например, ложки, для которой установлено, что она вмещает 50 мг хлорида натрия, без верха)	10 мкл ДФБС без Ca^{2+}/Mg^{2+} + + (30 ± 2) мкл (60 мкл/см^2). Для нанесения вязких веществ используют нейлоновую сетку	30 мкл ДФБС без Ca^{2+}/Mg^{2+} + + (30 ± 2) мг (60 мг/см^2)	50 мкл (167 мкл/см^2)	10 мг (33 мг/см^2)	40 мкл (67 мкл/см^2)	40 мкл ДФБС без Ca^{2+}/Mg^{2+} + + (40 ± 1) мг (67 мкл/см^2)
Время воздействия и значение температуры	(30 ± 2) мин в среде для культивирования при (37 ± 2) °С, (5 ± 1) % CO_2, отн. вл. ≥95 %	(6 ± 0,25) ч в среде для культивирования при (37 ± 2) °С, (5 ± 1) % CO_2, отн. вл. ≥95 %	(30 ± 2) мин в среде для культивирования при (37 ± 2) °С, (5 ± 1) % CO_2, отн. вл. ≥95 %	4 ч (±0,1 ч) в среде для культивирования при (37 ± 2) °С, (5 ± 1) % CO_2, отн. вл. ≥95 %	1 мин (± 5 с) в среде для культивирования при КТ	(24 ± 1) ч в среде для культивирования при (37 ± 2) °С, (5 ± 1) % CO_2, отн. вл. ≥95 %	(10 ± 1) мин в среде для культивирования при (37 ± 2) °С, (5 ± 1) % CO_2, отн. вл. ≥95 %	3 ч ± 5 мин в среде для культивирования при (37 ± 2) °С, (5 ± 1) % CO_2, отн. вл. ≥95 %
Промывка при комнатной температуре	3 раза в 100 мл ДФБС без Ca^{2+}/Mg^{2+}	3 раза в 100 мл ДФБС без Ca^{2+}/Mg^{2+}	В 20 мл ДФБС без Ca^{2+}/Mg^{2+}	В 25 мл ДФБС без Ca^{2+}/Mg^{2+}	10 раз или более под струей ДФБС без Ca^{2+}/Mg^{2+}	10 раз или более под струей ДФБС без Ca^{2+}/Mg^{2+}	4 раза в ФБС	4 раза в 10 мл ФБС, затем, встряхивая, в 30 мл ФБС в мензурке
Последующее погружение в свежую среду	(12 ± 2) мин при КТ в среде для культивирования	(25 ± 2) мин при КТ в среде для культивирования	(30 ± 2) мин при 37 °С, 5 % CO_2, отн. вл. 95 % в среде для культивирования	(30 ± 2) мин при КТ в среде для культивирования	—	—	—	—
Последующее инкубирование	(120 ± 15) мин в среде для культивирования при (37 ± 2) °С, (5 ± 1) % CO_2, отн. вл. ≥95 %	(18 ± 0,25) ч в среде для культивирования при (37 ± 2) °С, (5 ± 1) % CO_2, отн. вл. ≥95 %	Не требуется	(18 ± 0,5) ч в среде для культивирования при (37 ± 2) °С, (5 ± 1) % CO_2, отн. вл. ≥95 %	(24 ± 1) ч в среде для культивирования при (37 ± 2) °С, (5 ± 1) % CO_2, отн. вл. ≥95 %	Не требуется	(16 ± 1) ч в среде для культивирования при (37 ± 2) °С, (5 ± 1) % CO_2, отн. вл. ≥95 %	(16 ± 1) ч в среде для культивирования при (37 ± 2) °С, (5 ± 1) % CO_2, отн. вл. ≥95 %

Продолжение таблицы А.1

№	1		2		3		4	
Составляющие метода испытаний	EpiOcular™ EIT (VRM 1)		SkinEthic™ HCE EIT (VRM 2)		LabCyte CORNEA- MODEL24 EIT		MCTT HCE™ EIT	
Отрицательная контрольная проба	50 мкл H2O. Испытывается параллельно	50 мкл H_2O. Испытывается параллельно	(30 ± 2) мкл ДФБС без Ca^{2+}/Mg^{2+}. Испытывается параллельно	(30 ± 2) мкл ДФБС без Ca^{2+}/Mg^{2+}. Испытывается параллельно	50 мкл ДФБС без Ca^{2+}/Mg^{2+}. Испытывается параллельно	Без обработки. Испытывается параллельно	40 мкл ДФБС без Ca^{2+}/Mg^{2+}. Испытывается параллельно	40 мкл ДФБС без Ca^{2+}/Mg^{2+}. Испытывается параллельно
Положительная контрольная проба	50 мкл метилацетата. Испытывается параллельно	50 мкл метилацетата. Испытывается параллельно	(30 ± 2) мкл метилацетата Испытывается параллельно	(30 ± 2) мкл метилацетата Испытывается параллельно	50 мкл этанола. Испытывается параллельно	10 мг лауриновой кислоты. Испытывается параллельно	40 мкл метилацетата или 2 % НДС. Испытывается параллельно	40 мкл метилацетата или 2 % НДС. Испытывается параллельно
Раствор соли тетразолия	300 мкл раствора с концентрацией 1 мг/мл	300 мкл раствора с концентрацией 1 мг/мл	300 мкл раствора с концентрацией 1 мг/мл	300 мкл раствора с с концентрацией 1 мг/мл	300 мкл разбавленного раствора WST-8 (10-кратное разбавление WST-8)	300 мкл разбавленного раствора WST-8 (10-кратное разбавление WST-8)	300 мкл разбавленного раствора WST-1 (25-кратное разбавление WST-1)	300 мкл разбавленного раствора WST-1 (25-кратное разбавление WST-1)
Температура и время инкубирования с солью тетразолия	(180 ± 15) мин при (37 ± 2) °С, (5 ± 1) % CO_2, отн. вл. ≥95 %	(180 ± 15) мин при (37 ± 2) °С, (5 ± 1) % CO_2, отн. вл. ≥95 %	(180 ± 15) мин при (37 ± 2) °С, (5 ± 1) % CO_2, отн. вл. ≥95 %	(180 ± 15) мин при (37 ± 2) °С, (5 ± 1) % CO_2, отн. вл. ≥ 95 %	(240 ± 15) мин при (37 ± 2) °С, ±1 % CO_2, отн. вл. ≥95 %	(240 ± 15) мин при (37 ± 2) °С, (5 ± 1) % CO_2, отн. вл.≥95 %	(180 ± 5) мин при (37 ± 2) °С, (5 ± 1) % CO_2, отн. вл. ≥95 %	(180 ± 5) мин при (37 ± 2) °С, (5 ± 1) % CO_2, отн. вл. ≥95 %
Растворитель-экстрагент	2 мл изопропанола (экстрагирование из верхней и нижней частей вставки путем прокалывания ткани)	2 мл изопропанола (экстрагирование из верхней и нижней частей вставки путем прокалывания ткани)	1,5 мл изопропанола (экстрагирование из верхней и нижней частей вставки)	1,5 мл изопропанола (экстрагирование из верхней и нижней частей вставки)	Не требуется	Не требуется	Не требуется	Не требуется

Продолжение таблицы А.1

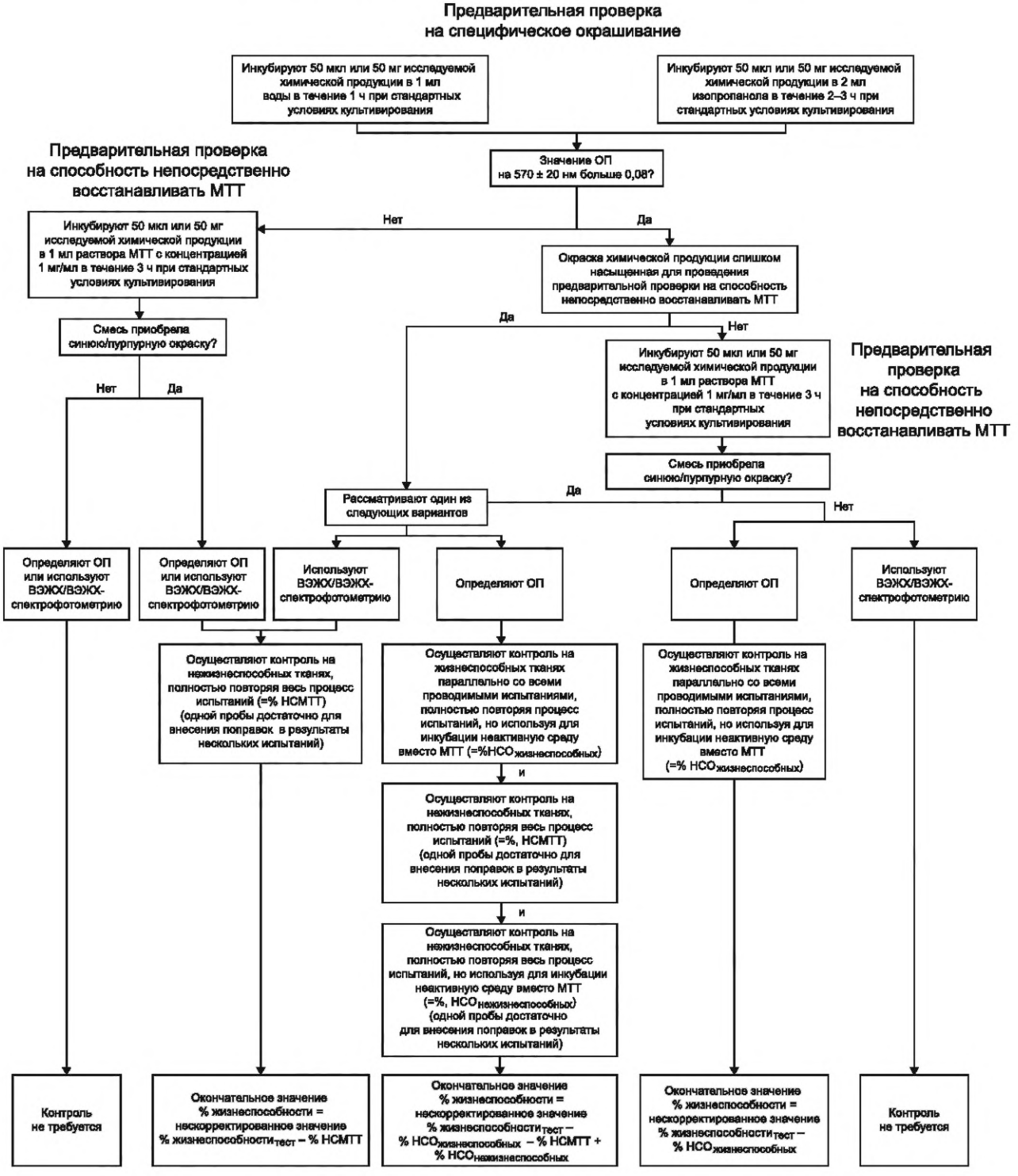
№	1		2		3		4	
Составляющие метода испытаний	EpiOcular™ EIT (VRM 1)		SkinEthic™ HCE EIT (VRM 2)		LabCyte CORNEA- MODEL24 EIT		MCTT HCE™ EIT	
Время и температура экстрагирования	2—3 ч со встряхиванием (~120 об/мин) при КТ или оставляют на ночь при температуре от 4 °С до 10 °С	2—3 ч со встряхиванием (~120 об/мин) при КТ или оставляют на ночь температуре от 4 °С до 10 °С	4 ч со встряхиванием (~120 об/мин) при КТ или оставляют не менее чем на ночь без встряхивания при температуре от 4 °С до 10 °С	Не менее 2 ч со встряхиванием (~120 об/мин) при КТ	Не требуется	Не требуется	Не требуется	Не требуется
Определение значений ОП	570 нм (от 550 до 590 нм) без фильтра сравнения	570 нм (от 550 до 590 нм) без фильтра сравнения	570 нм (от 540 до 600 нм) без фильтра сравнения	570 нм (от 540 до 600 нм) без фильтра сравнения	450 нм с фильтром сравнения (650 нм)	450 нм с фильтром сравнения (650 нм)	450 нм с фильтром сравнения (650 нм)	450 нм с фильтром сравнения (650 нм)
Контроль качества образцов ткани	Обрабатывают 100 мкл раствора тритона Х-100 концентрацией 0,3 % (по объему) 12,2 мин ≤ ≤ ET_{50} ≤ ≤ 37,5 мин	Обрабатывают 100 мкл раствора тритона Х-100 концентрацией 0,3 % (по объему) 12,2 мин ≤ ≤ ET_{50} ≤ ≤ 37,5 мин	Обрабатывают в течение 30 мин НДС (50 мкл) 1,0 мг/мл ≤ IC_{50} ≤ ≤ 3,5 мг/мл	Обрабатывают в течение 30 мин НДС (50 мкл) 1,0 мг/мл ≤ IC_{50} ≤ ≤ 3,5 мг/мл	Обрабатывают в течение 60 мин НДС (25 мкл) 1,0 мг/мл ≤ IC_{50} ≤ ≤ 4,0 мг/мл	Обрабатывают в течение 60 мин НДС (25 мкл) 1,0 мг/мл ≤ IC_{50} ≤ ≤ 4,0 мг/мл	Обрабатывают 50 мкл раствора тритона Х-100 концентрацией 0,3 % (по объему) 17,6 мин ≤ ≤ ET_{50} ≤ ≤ 41,0 мин	Обрабатывают 50 мкл раствора тритона Х-100 концентрацией 0,3 % (по объему) 17,6 мин ≤ ≤ ET_{50} ≤ ≤ 41,0 мин

Окончание таблицы А.1

№	1		2		3		4	
Составляющие метода испытаний	EpiOcular™ EIT (VRM 1)		SkinEthic™ HCE EIT (VRM 2)		LabCyte CORNEA- MODEL24 EIT		MCTT HCE™ EIT	
Критерии приемлемости	1 Среднее арифметическое значение ОП образцов ткани, обработанных отрицательной контрольной пробой, должно составлять >0,8 и <2,8. 2 Среднее арифметическое значение жизнеспособности образцов ткани, параллельно подвергшихся воздействию положительной контрольной пробы в течение 30 мин, должно составлять <50 % от результата для отрицательной контрольной пробы. 3 Разность значений жизнеспособности для двух параллельно обработанных образцов ткани должна быть менее 20 %	1 Среднее арифметическое значение ОП образцов ткани, обработанных отрицательной контрольной пробой, должно составлять >0,8 и <2,8. 2 Среднее арифметическое значение жизнеспособности образцов ткани, параллельно подвергшихся воздействию положительной контрольной пробы в течение 30 мин, должно составлять <50 % от результата для отрицательной контрольной пробы. 3 Разность значений жизнеспособности для двух параллельно обработанных образцов ткани должна быть менее 20 %	1 Среднее арифметическое значение ОП образцов ткани, обработанных отрицательной контрольной пробой, должно составлять >1,0 и ≤2,5. Среднее арифметическое значение жизнеспособности образцов ткани, параллельно подвергшихся воздействию положительной контрольной пробы в течение 30 мин, должно составлять ≤30 % от результата для отрицательной контрольной пробы 3 Разность значений жизнеспособности для двух параллельно обработанных образцов ткани должна быть менее 20 %	1 Среднее арифметическое значение ОП образцов ткани, обработанных отрицательной контрольной пробой, должно составлять >1,0 и ≤2,5. 2 Среднее арифметическое значение жизнеспособности образцов ткани, параллельно подвергшихся воздействию положительной контрольной пробы в течение 4 ч, должно составлять ≤20 % от результата для отрицательной контрольной пробы. 3 Разность значений жизнеспособности для двух параллельно обработанных образцов ткани должна быть менее 20 %	1 Среднее арифметическое значение ОП образцов ткани, обработанных отрицательной контрольной пробой, должно составлять ≥0,5 и ≤1,3. 2 Среднее арифметическое значение жизнеспособности образцов ткани, параллельно обработанных положительной контрольной пробой, должно составлять ≤40 %. 3 СО значений жизнеспособности для трех образцов ткани не должно превышать 18 %	1 Среднее арифметическое значение ОП образцов ткани, обработанных отрицательной контрольной пробой, должно составлять ≥0,5 и ≤1,3. 2 Среднее арифметическое значение жизнеспособности образцов ткани, обработанных положительной контрольной пробой, должно составлять ≤40 %. 3 СО значений жизнеспособности для трех образцов ткани не должно превышать 18 %	1 Среднее арифметическое значение ОП образцов ткани, обработанных отрицательной контрольной пробой, должно составлять ≥1,6 и ≤3,0 2 Среднее арифметическое значение жизнеспособности образцов ткани, обработанных положительной контрольной пробой, должно составлять ≤35 %. 3 Разность значений жизнеспособности для двух параллельно обработанных образцов ткани должна быть менее 20 %	1 Среднее арифметическое значение ОП образцов ткани, обработанных отрицательной контрольной пробой, должно составлять ≥1,6 и ≤3,0. 2 Среднее арифметическое значение жизнеспособности образцов ткани, обработанных положительной контрольной пробой, должно составлять ≤35 %. 3 Разность значений жизнеспособности для двух параллельно обработанных образцов ткани должна быть менее 20 %

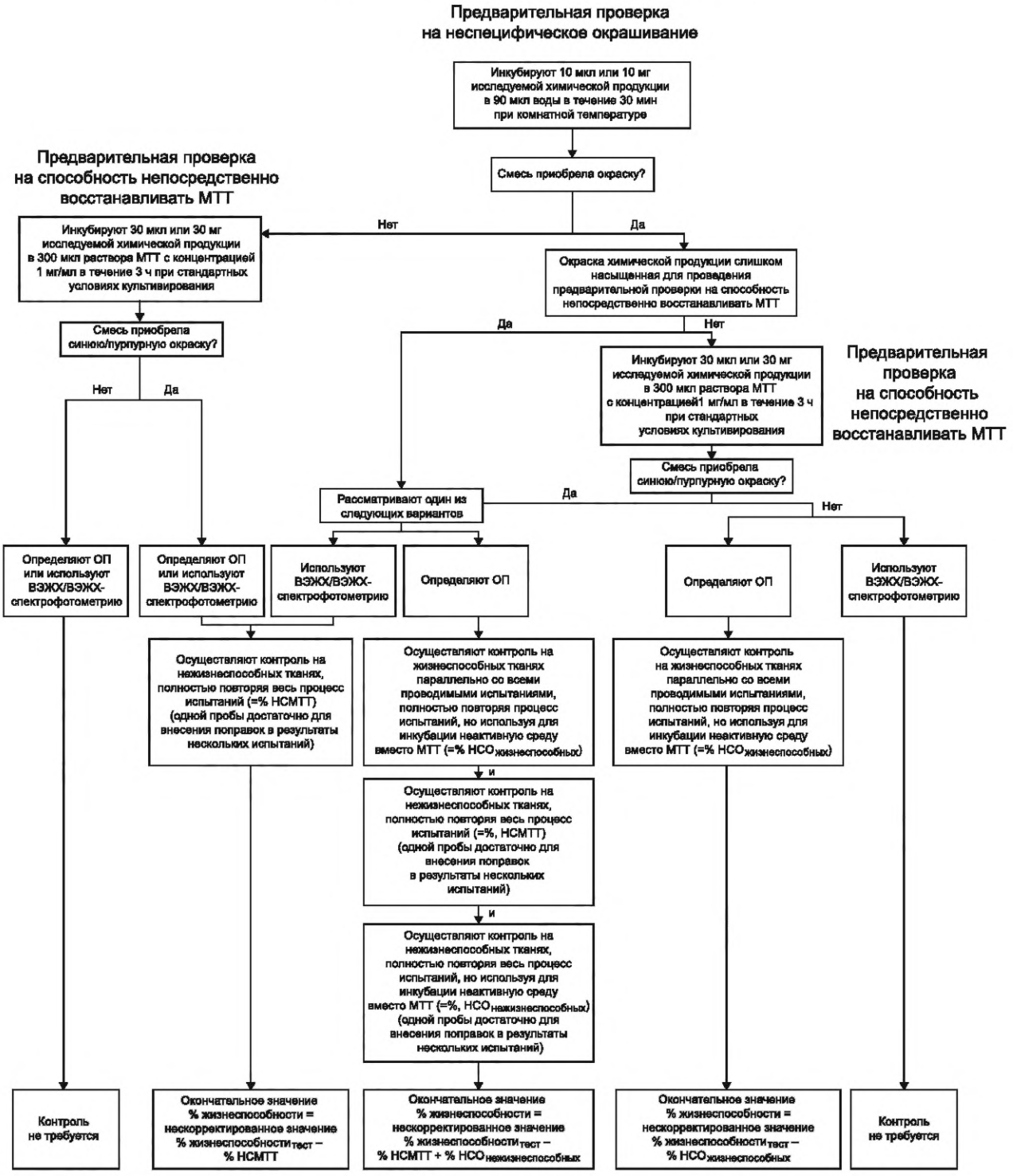
Приложение В
(обязательное)

Блок-схема для наглядного представления процесса выявления веществ, способных непосредственно восстанавливать МТТ и/или обладающих мешающей окраской, и дальнейших операций с ними согласно СОП для VRM1



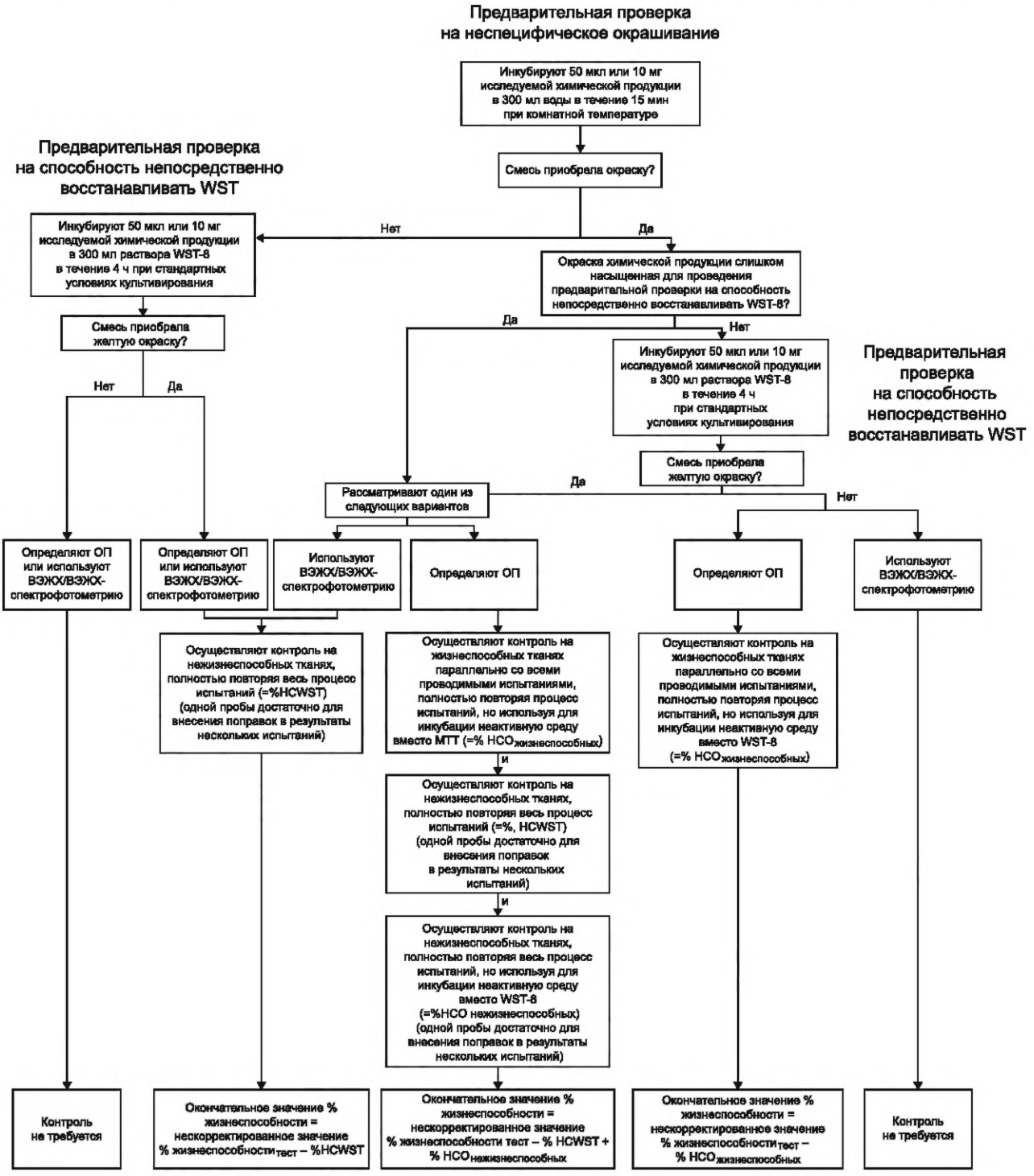
Приложение С
(обязательное)

Блок-схема для наглядного представления процесса выявления веществ, способных непосредственно восстанавливать МТТ и/или обладающих мешающей окраской, и дальнейших операций согласно СОП для VRM2



Приложение D
(обязательное)

Блок-схема для наглядного представления процесса выявления веществ, способных непосредственно восстанавливать WST и/или обладающих мешающей окраской, и дальнейших операций с ними согласно СОП для LABCYTE CORNEA-MODEL24 EIT



Приложение Е
(обязательное)

Ключевые параметры и критерии приемлемости для признания спектрофотометрической системы ВЭЖХ/УВЭЖХ пригодной для количественного определения МТТ-формазана, экстрагируемого из моделей тканей RhCE

Таблица Е.1 — Параметры и критерии приемлемости для признания спектрофотометрической системы ВЭЖХ/УВЭЖХ пригодной для количественного определения МТТ-формазана

Параметр	Протокол выполнения измерений согласно руководству FDA [43], [45]	Критерии приемлемости
Избирательность	Исследование изопропанола, холостой пробы на основе жизнеспособных тканей (изопропанолового экстракта из жизнеспособных тканей RhCE, не подвергавшихся какой-либо обработке), холостой пробы на основе нежизнеспособных тканей (изопропанолового экстракта нежизнеспособных тканей RhCE, не подвергавшихся какой-либо обработке) и красителя (например, метиленового синего)	$Площадь_{помехи}$ ≤ 20 % от $Площади_{LLOQ}$ [1)]
Прецизионность	Контроль качества (т. е. растворы МТТ-формазана концентрацией 1,6; 16 и 160 мкг/мл) в изопропаноле (n = 5)	CV ≤ 15 % или ≤ 20 % для LLOQ
Точность	Контроль качества с использованием изопропанола (n = 5)	% Dev ≤ 15 % или ≤ 20 % для LLOQ
Влияние матрицы	Контроль качества с холостой пробой на основе жизнеспособных тканей (n = 5)	85 % ≤ %Влияние матрицы ≤ 115 %
Перенос (следы предыдущей пробы)	Анализ изопропанола после анализа стандартного раствора для ULOQ[2)]	$Площадь_{помехи}$ ≤ 20 % от $Площади_{LLOQ}$
Воспроизводимость (в течение дня)	3 отдельные кривые градуировки (для 6 последовательно разбавленных 1 : 3 растворов МТТ-формазана в изопропаноле, начиная с ULOQ, т. е. 200 мкг/мл). Контроль качества с использованием изопропанола (n = 5)	Градуировочные кривые: % Dev ≤ 15 % или ≤ 20 % для LLOQ. Контроль качества: % Dev ≤ 15 % и CV ≤ 15 %
Воспроизводимость (в разные дни)	День 1: 1 калибровочная кривая и контроль качества с использованием изопропанола (n = 3). День 2: 1 калибровочная кривая и контроль качества с использованием изопропанола (n = 3). День 3: 1 калибровочная кривая и контроль качества с использованием изопропанола (n = 3)	
Краткосрочная стабильность МТТ-формазана в экстракте тканей RhCE	Холостые пробы для контроля качества на основе жизнеспособных тканей (n = 3) анализируют в день приготовления и спустя 24 ч хранения при комнатной температуре	% Dev ≤ 15 %
Долгосрочная стабильность МТТ-формазана в экстракте ткани RhCE (при необходимости)	Холостые пробы для контроля качества на основе жизнеспособных тканей (n = 3) анализируют в день приготовления и спустя несколько дней хранения при температуре 20 °С	% Dev ≤ 15 %

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

[2)] ULOQ (Upper Limit of Quantification) — верхний предел количественного определения, который должен соответствовать не менее чем двухкратному значению максимальной предполагаемой концентрации МТТ-формазана в изопропаноловых экстрактах для отрицательных контрольных проб (~70 мкг/мл для VRM), т. е. 200 мкг/мл.

Приложение ДА
(справочное)

Сопоставление структуры настоящего стандарта со структурой международного документа

Таблица ДА.1

Структура настоящего стандарта			Структура международного документа	
Разделы	Пункты	Перечисления	Пункты	Перечисления
Введение			1, 2, 5, 6, 7	—
1	1.1	—	3	—
	1.2	—	4	—
2	—	—	8	—
	2.1	—	Приложение 1	—
	2.2	—	Приложение 1	—
	2.3	—	Приложение 1	—
	2.4	—	Приложение 1	—
	2.5	—	Приложение 1	—
	2.6	—	Приложение 1	—
	2.7	—	Приложение 1	—
	2.8	—	Приложение 1	—
	2.9	—	Приложение 1	—
	2.10	—	Приложение 1	—
	2.11	—	Приложение 1	—
	2.12	—	Приложение 1	—
	2.13	—	Приложение 1	—
	2.14	—	Приложение 1	—
	2.15	—	Приложение 1	—
	2.16	—	Приложение 1	—
	2.17	—	Приложение 1	—
	2.18	—	Приложение 1	—
	2.19	—	Приложение 1	—
	2.20	—	Приложение 1	—
	2.21	—	Приложение 1	—
	2.22	—	Приложение 1	—
	2.23	—	Приложение 1	—
	2.24	—	Приложение 1	—
	2.25	—	Приложение 1	—
	2.26	—	Приложение 1	—
	2.27	—	Приложение 1	—
	2.28	—	Приложение 1	—
	2.29	—	Приложение 1	—
	2.30	—	Приложение 1	—
	2.31	—	Приложение 1	—
	2.32	—	Приложение 1	—
	2.33	—	Приложение 1	—
	2.34	—	Приложение 1	—

Продолжение таблицы ДА.1

Структура настоящего стандарта			Структура международного документа	
Разделы	Пункты	Перечисления	Пункты	Перечисления
	2.35	—	Приложение 1	—
	2.36	—	Приложение 1	—
	2.37	—	Приложение 1	—
	2.38	—	Приложение 1	—
	2.39	—	Приложение 1	—
	2.40	—	Приложение 1	—
	2.41	—	Приложение 1	—
	2.42	—	Приложение 1	—
	2.43	—	Приложение 1	—
	2.44	—	Приложение 1	—
	2.45	—	Приложение 1	—
	2.46	—	Приложение 1	—
	2.47	—	Приложение 1	—
	2.48	—	Приложение 1	—
	2.49	—	Приложение 1	—
	2.50	—	Приложение 1	—
	2.51	—	Приложение 1	—
	2.52	—	Приложение 1	—
	2.53	—	Приложение 1	—
	2.54	—	Приложение 1	—
	2.55	—	Приложение 1	—
	2.56	—	Приложение 1	—
	2.57	—	Приложение 1	—
	2.58	—	Приложение 1	—
	2.59	—	Приложение 1	—
	2.60	—	Приложение 1	—
	2.61	—	Приложение 1	—
	2.62	—	Приложение 1	—
	2.63	—	Приложение 1	—
	2.64	—	Приложение 1	—
	2.65	—	Приложение 1	—
	2.66	—	Приложение 1	—
	2.67	—	Приложение 1	—
	2.68	—	Приложение 1	-
	2.69	—	Приложение 1	—
	2.70	—	Приложение 1	—
3	3.1	—	9	—
	3.2	—	10	—
	3.3	—	11	—
	3.4	—	12	—
	3.5	—	13	—
	3.6	—	14	—
	3.7	—	15	—

Окончание таблицы ДА.1

Структура настоящего стандарта			Структура международного документа	
Разделы	Пункты	Перечисления	Пункты	Перечисления
	3.8	—	16	—
	3.9	—	17	—
	3.10	—	18	—
	3.11	—	19	—
	3.12	—	20	—
4	4.1	—	21	—
	4.2	—	22	—
	4.3	—	23	—
5	5.1	—	24	—
	5.2	—	25	—
6	—	—	26	—
7	7.1	—	27	—
	7.2.1	—	28	—
	7.2.2	—	29	—
	7.2.3	—	30	—
	7.2.4	—	31	—
	7.2.5	—	32	—
	7.2.6.1	—	33	—
	7.2.6.2	—	34	—
	7.2.6.3	—	35	—
	7.2.6.4	—	36	—
	7.2.7.1	—	37	—
	7.2.7.2	—	38	—
	7.2.7.3	—	39	—
	7.2.7.4	—	40	—
	7.2.7.5	—	41	—
	7.2.7.6	—	42	—
	7.2.7.7	—	43	—
	7.2.7.8	—	44	—
	7.2.8	—	45	—
	7.2.9.1	—	46	—
	7.2.9.2	—	47	—
8	8.1	—	48	—
	8.2	—	49	—
Приложение A		—	Приложение 2	—
Приложение B		—	Приложение 3	—
Приложение C		—	Приложение 4	—
Приложение D		—	Приложение 5	—
Приложение E		—	Приложение 6	—
Библиография			Литература	

Библиография

[1] UN (2017). United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). ST/SG/AC.10/30/Rev.7, Seventh Revised Edition, New York and Geneva: United Nations. Available at: [http://gost.e-ecolog.ru Rev7e.pdf] (Согласованная на Глобальном уровне Система классификации и маркировки химической продукции (СГС). Седьмое пересмотренное издание)

[2] OECD (2012). Guideline for Testing of Chemicals No. 405: Acute Eye Irritation/Corrosion. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: [gost.e-ecolog.ru] (Руководство по проведению испытаний химической продукции № 405. Острое раздражение/разъедание глаз)

[3] OECD (2018). Guidance Document on an Integrated Approach on Testing and Assessment for Serious Eye Damage and Eye irritation. Series on Testing and Assessment No.263. ENV Publications, Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris (Руководящий документ по интегрированным подходам к исследованиям и оценке серьезного повреждения и раздражения глаз. Серия по испытаниям и оценке № 263)

[4] OECD (2013). Guideline for Testing of Chemicals No. 437: Bovine Corneal Opacity and Permeability Test Method for Identifying i) Chemicals Inducing Serious Eye Damage and ii) Chemicals Not Requiring Classification for Eye Irritation or Serious Eye Damage. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: [gost.e-ecolog.ru] (Руководство по проведению испытаний химической продукции № 437. Метод исследования помутнения и проницаемости роговицы крупного рогатого скота для определения i) химической продукции, вызывающей серьезное повреждение глаз, и ii) химической продукции, не требующей классификации как вызывающей раздражение или серьезное повреждение глаз)

[5] OECD (2013). Guideline for Testing of Chemicals No. 438: Isolated Chicken Eye Test Method for Identifying i) Chemicals Inducing Serious Eye Damage and ii) Chemicals Not Requiring Classification. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: [gost.e-ecolog.ru] (Руководство по проведению испытаний химической продукции № 438. Метод исследования с использованием извлеченного глаза курицы для определения i) химической продукции, вызывающей серьезное повреждение глаз, и ii) химической продукции, не требующей классификации)

[6] OECD (2012). Guideline for Testing of Chemicals No. 460: Fluorescein Leakage Test Method for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris. Available at: [gost.e-ecolog.ru] (Руководство по проведению испытаний химической продукции № 460. Метод исследования на проницаемость флуоресцеина для определения разъедания и серьезного раздражения глаз)

[7] OECD (2015). Guideline for Testing of Chemicals No. 491: Short Time Exposure In Vitro Test Method for Identifying i) Chemicals Inducing Serious Eye Damage and ii) Chemicals Not Requiring Classification for Eye Irritation or Serious Eye Damage. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris. Available at: [gost.e-ecolog.ru oecd.org/env/testguidelines] (Руководство по проведению испытаний химической продукции № 491. Метод исследования с применением краткосрочной экспозиции для определения i) химической продукции, вызывающей серьезное повреждение глаз, и ii) химической продукции, не требующей классификации как вызывающей раздражение или серьезное повреждение глаз)

[8] Freeman, S.J., Alépée N., Barroso, J., Cole, T., Compagnoni, A., Rubingh, C., Eskes, C., Lammers, J., McNamee, P., Pfannenbecker, U., Zuang, V. (2010). Prospective Validation Study of Reconstructed Human Tissue Models for Eye Irritation Testing. ALTEX 27, Special Issue 2010, 261-266 (Перспективные валидационные исследования реконструированных моделей человеческих тканей для проведения испытаний на раздражение глаз)

[9] EC EURL ECVAM. (2014). The EURL ECVAM — Cosmetics Europe prospective validation study of Reconstructed human Cornea-like Epithelium (RhCE)-based test methods for identifying chemicals not requiring classification and labelling for serious eye damage/eye irritation: Validation Study Report. EUR 28125 EN; doi:10.2787/41680. Available at: [gost.e-ecolog.ru] (Перспективное исследование Cosmetics Europe с целью валидации метода, основанного на использовании реконструированной модели эпителия роговицы человеческого глаза (RhCE), для определения химической продукции, не требующей классификации и маркировки как вызывающей раздражение или серьезное повреждение глаз)

[10] EURL ECVAM Science Advisory Committee. (2014). ESAC Opinion on the EURL ECVAM Eye Irritation Validation Study (EIVS) on EpiOcularTM EIT and SkinEthicTM HCE and a related Cosmetics Europe study on HPLC/UPLC-spectrophotometry as an alternative endpoint detection system for MTT-formazan. ESAC opinion No. 2014-03 of 17 November 2014; EUR 28173 EN; doi: 10.2787/043697. Available at: [gost.e-ecolog.ru repository/handle/JRC103702] (Заключение ESAC по итогам исследований с целью валидации методов определения раздражающего воздействия на глаза (EURL ECVAM Eye Irritation Validation Study — EIVS) EpiOcularTM EIT и SkinEthicTM HCE и сопутствующего исследования Cosmetics Europe, посвященного использованию средств ВЭЖХ/УВЭЖХ-спектрофотометрии как альтернативной системы детектирования для определения показателей содержания МТТ-формазана)

[11] Alépée, N., Leblanc, V., Adriaens, E., Grandidier, M.H., Lelièvre, D, Meloni, M., Nardelli, L., Roper, C.S, Santirocco, E., Toner, F., Van Rompay, A., Vinall, J., Cotovio, J. (2016). Multi-laboratory validation of SkinEthic HCE test method for testing serious eye damage/eye irritation using liquid chemicals. Toxicol. In Vitro 31, 43-53 (Межлабораторная валидация метода исследования SkinEthic HCE для определения серьезного повреждения/раздражения глаз при воздействии жидкой химической продукцией)

[12] Alépée, N., Adriaens, E., Grandidier, M.H., Meloni, M., Nardelli, L., Vinall, C.J., Toner, F., Roper, C.S, Van Rompay, A.R., Leblanc, V., Cotovio, J. (2016). Multi- laboratory evaluation of SkinEthic HCE test method for testing serious eye damage/eye irritation using solid chemicals and overall performance of the test method with regard to solid and liquid chemicals testing. Toxicol. In Vitro 34, 55-70 (Межлабораторная валидация метода исследования SkinEthic HCE для определения серьезного повреждения/раздражения глаз при воздействии твердой и жидкой химической продукцией)

[13] EURL ECVAM Science Advisory Committee. (2016). ESAC Opinion on the SkinEthic™ Human Corneal Epithelium (HCE) Eye Irritation Test (EIT). ESAC Opinion No. 2016-02 of 24 June 2016; EUR 28175 EN; doi: 10.2787/390390. Available at: [gost.e-ecolog.ru] (Заключение ESAC о методе исследования SkinEthic™ HCE EIT для определения раздражающего воздействия на глаза)

[14] Me-too validation report — Validation study for LabCyte CORENA-MODEL24 EYE IRRITATION TEST, February 2017, available at: gost.e-ecolog.ru (Отчет о параллельной валидации. Исследование с целью валидации метода испытаний LabCyte CORENA-MODEL24 EYE для определения раздражающего воздействия на глаза)

[15] Lim, S.E., Ha, S.J., Jang, W.H., Jung, K.M., Jung, M.S., Yeo, K.W., Kim, J.S., Jeong, T.C., Kang, M.J., Lee, S.H., Ko, K.Y., Kim, T.S., Park, K.S., Bae, S. and Lim, K.M. Me-Too validation study for in vitro eye irritation test with 3D-reconstructed human cornea epithelium, MCTT HCE™. Toxicol. In Vitro 55, 173-184. OECD (2018) (Параллельное исследование с целью валидации метода испытаний in vitro MCTT HCE™ для определения раздражающего воздействия на глаза с использованием реконструированной 3D-модели эпителия роговицы человеческого глаза)

[16] OECD (2018). Peer Review Report on Validation status of the LabCyte CORNEA-MODEL24 EYE IRRITATION TEST, OECD Series on Testing and Assessment No.282. ENV Publications, Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris (Отчет о внешней оценке состояния валидации метода испытаний LabCyte CORNEA-MODEL24 для определения раздражающего действия на глаза)

[17] Peer Review Report on Validation status of the MCTT HCE™ EYE IRRITATION TEST, unpublished (Отчет о внешней оценке состояния валидации метода испытаний MCTT HCE™ для определения раздражающего действия на глаза, не опубликован)

[18] Draize, J.H., Woodard, G., Calvery, H.O. (1944). Methods for the Study of Irritation and Toxicity of Substances Applied Topically to the Skin and Mucous Membranes. Journal of Pharmacol. and Exp. Therapeutics 82, 377-390 (Методы изучения раздражающего и токсического действия веществ, наносимых на кожу и слизистые оболочки)

[19] Scott, L., Eskes, C., Hoffmann, S., Adriaens, E., Alépée, N., Bufo, M., Clothier, R., Facchini, D., Faller, C., Guest, R., Harbell, J., Hartung, T., Kamp, H., Le Varlet, B., Meloni, M., McNamee, P., Osborne, R., Pape, W., Pfannenbecker, U., Prinsen, M., Seaman, C., Spielman, H., Stokes, W., Trouba, K., Van den Berghe, C., Van Goethem, F., Vassallo, M., Vinardell, P., Zuang, V. (2010). A Proposed Eye Irritation Testing Strategy to Reduce and Replace In Vivo Studies Using Bottom-Up and Top-Down Approaches.Toxicol. In Vitro 24, 1-9 (Предлагаемая стратегия проведения испытаний на раздражение глаз, позволяющая ограничить или исключить необходимость исследований in vivo и предусматривающая реализацию восходящего и нисходящего подходов)

[20] Mosmann T. (1983). Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to 7 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).

[21] Tominaga, H., Ishiyama, M., Ohseto. F., Sasamoto, K., Hamamoto, T., Suzuki, K., Watanabe, M., (1999). A water-soluble tetrazolium salt useful for colorimetric cell viability assay. Anal. Commun. 36, 47—50 (Водорастворимая соль тетразолия, пригодная для выполнения колориметрического анализа жизнеспособности)

[22] Ishiyama, M., Shiga, M., Sasamoto, K., Mizoguchi, M., & He, P. G. (1993). A new sulfonated tetrazolium salt that produces a highly water-soluble formazan dye. Chem. Pharm. Bull. (Tokyo), 41(6), 1118-1122 (Новая сульфированная соль тетразолия, позволяющая получить высокорастворимый в воде формазановый краситель)

[23] OECD (2016). Series on Testing and Assessment No. 216: Performance Standards for the Assessment of Proposed Similar or Modified In Vitro Reconstructed Human Cornea-Like Epithelium (RhCE) Test Methods for Identifying Chemicals not Requiring Classification and Labelling for Eye Irritation or Serious Eye Damage, Based on the Validated Reference Methods EpiOcular™ EIT and SkinEthic™ HCE EIT described in TG 492. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: [gost.e-ecolog.ru] (Серия по испытаниям и оценке № 216. Стандарты результативности для оценивания предлагаемых идентичных или модифицированных методов исследования in vitro на реконструированном эпителии роговицы человеческого глаза (RhCE) для определения химической продукции, не требующей классификации и маркировки как вызывающей раздражение и серьезное повреждение глаз. На основе валидированных референтных методов EpiOcular™ EIT и SkinEthic™ HCE EIT, описанных в TG 492)

[24] OECD (2005). Series on Testing and Assessment No. 34: Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: [gost.e-ecolog.ru] (Серия по испытаниям и оценке № 34. Руководящий документ по валидации и международному признанию новых или актуализированных методов испытаний для оценивания опасностей)

[25] Kaluzhny, Y., Kandárová, H., Hayden, P., Kubilus, J., d'Argembeau-Thornton, L., Klausner, M. (2011). Development of the EpiOcular™ Eye Irritation Test for Hazard Identification and Labelling of Eye Irritating Chemicals in Response to the Requirements of the EU Cosmetics Directive and REACH Legislation. Altern. Lab. Anim. 39, 339-364 (Разработка теста на раздражение глаз EpiOcular™ для определения и маркировки по степени опасности химической продукции, оказывающей раздражающее действие на глаза, в соответствии с требованиями Директивы ЕС по косметике и регламента REACH)

[26] Nguyen, D.H., Beuerman, R.W., De Wever, B., Rosdy, M. (2003). Three-dimensional construct of the human corneal epithelium for in vitro toxicology. In: Salem, H., Katz, S.A. (Eds), Alternative Toxicological Methods, CRC Press, pp. 147-159 (Трехмерная модель эпителия роговицы человеческого глаза для использования в области токсикологии in vitro)

[27] Katoh, M., Uemura, N., Hamajima, F., Ogasawar,a T., Hata, K. (2012). Morphological characterization of a reconstructed human corneal epithelial model (LabCyte CORNEA-MODEL) as an alternative to the draize eye test for the assessment of eye irritation. AATEX. 17, 22-28 (Морфологическая характеристика модели реконструированного эпителия роговицы человеческого глаза (LabCyte CORNEA-MODEL) как альтернатива тесту Дрейза при оценивании степени раздражения глаз)

[28] Jung, K. M., Lee, S. H., Ryu, Y. H., Jang, W. H., Jung, H. S., Han, J. H., Seok, S. H., Park, J. H., Son, Y., Park, Y. H. and Lim, K. M. (2011). A new 3D reconstituted human corneal epithelium model as an alternative method for the eye irritation test. Toxicol In Vitro 25, 403-410. (Использование новой 3D-модели реконструированного эпителия роговицы человеческого глаза как альтернативный метод проведения испытаний на раздражение глаз)

[29] Pfannenbecker, U., Bessou-Touya, S., Faller, C., Harbell, J., Jacob, T., Raabe, H., Tailhardat, M., Alépée, N., De Smedt, A., De Wever, B., Jones, P., Kaluzhny, Y., Le Varlet, B., McNamee, P., Marrec-Fairley, M., Van Goethem, F. (2013). Cosmetics Europe multi-laboratory pre-validation of the EpiOcular™ reconstituted Human Tissue Test Method for the Prediction of Eye Irritation. Toxicol. In Vitro 27, 619-626 (Межлабораторное исследование Cosmetics Europe с целью предварительной валидации метода исследования на реконструированных человеческих тканях EpiOcular™, предназначенного для определения раздражающего воздействия на глаза)

[30] Alépée, N., Bessou-Touya, S., Cotovio, J., de Smedt, A., de Wever, B., Faller, C., Jones, P., Le Varlet, B., Marrec-Fairley, M., Pfannenbecker, U., Tailhardat, M., van Goethem, F., McNamee, P. (2013). Cosmetics Europe Multi-Laboratory Pre-Validation of the SkinEthic™ Reconstituted Human Corneal Epithelium Test Method for the Prediction of Eye Irritation Toxicol. In Vitro 27, 1476-1488 (Межлабораторное исследование Cosmetics Europe с целью предварительной валидации метода исследования на реконструированном эпителии роговицы человеческого глаза SkinEthic™, предназначенного для определения раздражающего воздействия на глаза)

[31] Katoh, M., Hamajima, F., Ogasawar,a T., Hata, K.. (2013). Establishment of a new in vitro test method for evaluation of eye irritancy using a reconstructed human corneal epithelial model, LabCyte CORNEA-MODEL. Toxicol. In Vitro. 27, 2184-2192 (Разработка нового метода исследования in vitro LabCyte CORNEA-MODEL, предназначенного для оценивания раздражения глаз с использованием модели реконструированного эпителия роговицы человеческого глаза)

[32] Yang, H., Kim, D. E., Jang, W. H., An, S., Cho, S. A., Jung, M. S., Lee, J. E., Yeo, K. W., Koh, S. B., Jeong, T. C., Kang, M. J., Chun, Y. J., Lee, S. H., Lim, K. M. and Bae, S. (2017). Prevalidation trial for a novel in vitro eye irritation test using the reconstructed human cornea-like epithelial model, MCTT HCE. Toxicol. In Vitro 39, 58-67 (Испытания, предшествующие валидации нового метода исследования MCTT HCE для определения раздражения глаз in vitro с использованием реконструированного эпителия роговицы человеческого глаза)

[33] Kolle, S.N., Moreno, M.C.R., Mayer, W., van Cott, A., van Ravenzwaay, B., Landsiedel, R. (2015). The EpiOcular™ Eye Irritation Test is the Method of Choice for In Vitro Eye Irritation Testing of Agrochemical Formulations: Correlation Analysis of EpiOcular™ Eye Irritation Test and BCOP Test Data to UN GHS, US EPA and Brazil ANIVSA Classifications. Altern. Lab. Anim. 43, 1-18 (Метод EpiOcular™ как предпочтительный метод исследования агрохимической продукции на способность оказывать раздражающее действие на глаза. Корреляционный анализ данных, полученных с применением метода EpiOcular™ и метода BCOP, при проведении классификации в соответствии с требованиями СГС ООН, US EPA и Brazil ANIVSA)

[34] Adriaens, E., Barroso, J., Eskes, C., Hoffmann, S., McNamee, P., Alépée, N., Bessou-Touya, S., De Smedt, A., De Wever, B., Pfannenbecker, U., Tailhardat, M., Zuang, V. (2014). Retrospective Analysis of the Draize Test for Serious Eye Damage/Eye Irritation: Importance of Understanding the in vivo Endpoints Under UN GHS/EU CLP for the Development and Evaluation of In Vitro Test Methods. Arch. Toxicol. 88, 701-723 (Ретроспективный анализ теста Дрейза для определения серьезного повреждения/раздражения глаз. Важность понимания показателей, измеряемых in vivo в рамках СГС ООН/EU CLP, для разработки и оценивания методов исследования in vitro)

[35] Meloni, M., De Servi, B., Marasco, D., Del Prete, S. (2011). Molecular mechanism of ocular surface damage: Application to an in vitro dry eye model on human corneal epithelium. Molecular Vision 17, 113-126 (Молекулярный механизм повреждения глазной поверхности. Применение in vitro к модели сухого эпителия роговицы человеческого глаза)

[36] Hackett, R.B., McDonald, T.O. (1991). Eye Irritation. In Advances in Modern Toxicology: Dermatoxicology Marzulli F.N.and Maibach H.I. (Eds.), 4th Edition, pp. 749—815. Washington, DC, USA: Hemisphere Publishing Corporation (Раздражение глаз)

[37] Fox, D.A., Boyes, W.K. (2008). Toxic Responses of the Ocular and Visual System. In Cassaret and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons Klaassen C.D.(Ed.), 7th Edition, pp. 665—697. Withby, ON, Canada: McGraw-Hill Ryerson (Токсический отклик глазной и зрительной системы)

[38] Jester, J.V., Li, H.F., Petroll, W.M., Parker, R.D., Cavanagh, H.D., Carr, G.J., Smith, B., Maurer, J.K. (1998). Area and Depth of Surfactant Induced Corneal Injury Correlates with Cell Death. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 39, 922—936 (Площадь и глубина повреждений роговицы, вызываемых воздействием поверхностно-активных веществ, коррелируемых с масштабами некроза клеток)

[39] J.K. (1998). Area and Depth of Surfactant Induced Corneal Injury Correlates with Cell Death. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 39, 922—936. (Площадь и глубина поверхностного индуцирования, вызванного повреждением роговицы, коррелируемая с гибелью клеток)

[40] Maurer, J.K., Parker, R.D., Jester, J.V. (2002). Extent of Corneal Injury as the Mechanistic Basis for Ocular Irritation: Key Findings and Recommendations for the Development of Alternative Assays. Reg. Tox. Pharmacol. 36, 106-117(Степень повреждения роговицы как механистическая основа раздражения глаз. Ключевые наблюдения и рекомендации для разработки альтернативных методов оценки)

[41] Jester, J.V., Li, L., Molai, A., Maurer, J.K. (2001). Extent of Corneal Injury as a Mechanistic Basis for Alternative Eye Irritation Tests. Toxicol. In Vitro 15, 115—130 (Степень повреждения роговицы как механистическая основа для альтернативных методов оценки раздражения глаз)

[42] Jester, J.V., Petroll, W.M., Bean, J., Parker, R.D., Carr, G.J., Cavanagh, H.D., Maurer, J.K. (1998). Area and Depth of Surfactant-Induced Corneal Injury Predicts Extent of Subsequent Ocular Responses. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 39, 2610—2625 (Площадь и глубина повреждений при воздействии поверхностно-активных веществ для прогнозирования последующего отклика глазной системы)

[43] Jester, J.V. (2006). Extent of Corneal Injury as a Biomarker for Hazard Assessment and the Development of Alternative Models to the Draize Rabbit Eye Test. Cutan. Ocul. Toxicol. 25, 41—54 (Масштабы повреждения роговицы как биомаркер для оценивания опасностей и разработки альтернативных моделей взамен теста Дрейза, проводимого на глазу кролика)

[44] Barroso, J., Pfannenbecker, U., Adriaens, E., Alépée, N., Cluzel, M., De Smedt, A., Hibatallah, J., Klaric, M., Mewes, K.R., Millet, M., Templier, M., McNamee, P. (2017). Cosmetics Europe compilation of historical serious eye damage/eye irritation in vivo data analysed by drivers of classification to support the selection of chemicals for development and evaluation of alternative methods/strategies: the Draize eye test Reference Database (DRD). Arch. Toxicol. 91, 521-547 (Подборка данных Cosmetics Europe за истекший период, посвященная серьезному повреждению/раздражению глаз in vivo и подготовленная по итогам анализа, проведенного с учетом критериев системы классификации химической продукции с целью облегчить выбор таких веществ, используемых при создании и оценивании альтернативных методов/стратегий. Эталонная база данных для глазного теста Дрейза (DRD))

[45] EpiOcular™ EIT SOP, Version 8. (March 05, 2013). EpiOcular™ EIT for the Prediction of Acute Ocular Irritation of Chemicals. Available at: [gost.e-ecolog.ru] (Применение EpiOcular™ EIT для прогнозирования способности химической продукции вызывать острое раздражение глаз)

[46] SkinEthic™ HCE EIT SOP, Version 1. (July 20, 2015). SkinEthic™ HCE Eye Irritation Test (EITL for Liquids, EITS for Solids) for the Prediction of Acute Ocular Irritation of Chemicals. Available at: [gost.e-ecolog.ru balm.jrc.ec.europa.eu/] (Метод испытаний SkinEthic™ HCE на раздражение глаз (EITL для жидкой, EITS для твердой продукции) для прогнозирования способности химической продукции вызывать острое раздражение глаз)

[47] LabCyte CORNEA-MODEL24 EIT SOP, Version 2.5.6. (February, 2017). LabCyte CORNEA- MODEL24 eye irritation test operation protocol. Available at: [gost.e-ecolog.ru] (Рабочий протокол для метода испытаний на раздражение глаз LabCyte CORNEA- MODEL24)

[48] MCTT HCE™ EIT SOP, Version 1.7. (August, 2018). MCTT HCE™ eye irritation test operation protocol. Available at: gost.e-ecolog.ru] (Рабочий протокол для метода испытаний на раздражение глаз MCTT HCE™)

[49] 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., McNamee, P. (2015). Use of HPLC/UPLC- Spectrophotometry for Detection of Formazan in In Vitro Reconstructed Human Tissue (RhT)-Based Test Methods Employing the MTT-Reduction Assay to Expand their Applicability to Strongly Coloured Test Chemicals. Toxicol. In Vitro 29, 741-761 (Применение средств ВЭЖХ/УВЭЖХ-спектрофотометрии с целью обнаружения формазана при реализации методов испытаний in vitro на реконструированных человеческих тканях (RhT), обеспечивающих возможность использования МТТ-теста для исследуемой химической продукции с интенсивной окраской)

[50] 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: [gost.e-ecolog.ru gost.e-ecolog.ru (Руководство для промышленности. Валидация биоаналитических методов)

УДК 661:615.099:006.354 МКС 71.040.10 13.020.01 MOD

Ключевые слова: химическая продукция, воздействие на роговицу, раздражающая способность *in vitro*, реконструированный человеческий роговой эпителий человека (RhCE), раздражение или серьезное повреждение глаз

Редактор *Г.Н. Симонова*
Технический редактор *И.Е. Черепкова*
Корректор *Р.А. Ментова*
Компьютерная верстка *М.В. Малеевой*

Сдано в набор 17.11.2023. Подписано в печать 28.11.2023. Формат 60×84⅛. Гарнитура Ариал.
Усл. печ. л. 5,58. Уч.-изд. л. 4,74.

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 34735—2021 Методы испытаний по воздействию химической продукции на организм человека. Методы испытаний с применением реконструированного рогового эпителия человека (RhCE) для определения химической продукции, не требующей классификации опасности как вызывающей раздражение или серьезное повреждение глаз

В каком месте	Напечатано	Должно быть		
Предисловие. Таблица согласования	—	Казахстан	KZ	Госстандарт Республики Казахстан

(ИУС № 5 2025 г.)

gost.e-ecolog.ru