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

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

ГОСТ 34853— 2022

МЕТОДЫ ИСПЫТАНИЙ ПО ВОЗДЕЙСТВИЮ ХИМИЧЕСКОЙ ПРОДУКЦИИ НА ОРГАНИЗМ ЧЕЛОВЕКА

Метод определения проницаемости флуоресцеина для идентификации веществ, вызывающих разъедание и серьезное раздражение глаз

(OECD 460:2017, Guidelines for the testing of chemicals — Fluorescein Leakage Test Method for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants, 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 стандарта, указанного в пункте 5

2 ВНЕСЕН Государственным комитетом по стандартизации Республики Беларусь

3 ПРИНЯТ Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации (протокол от 16 мая 2022 г. № 151-П)

За принятие проголосовали:

Краткое наименование страны по МК (ИСО 3166) 004—97	Код страны по МК (ИСО 3166) 004—97	Сокращенное наименование национального органа по стандартизации
Армения	AM	ЗАО «Национальный орган по стандартизации и метрологии» Республики Армения
Беларусь	BY	Госстандарт Республики Беларусь
Казахстан	KZ	Госстандарт Республики Казахстан
Киргизия	KG	Кыргызстандарт
Россия	RU	Росстандарт
Узбекистан	UZ	Узстандарт

4 Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 16 ноября 2023 г. № 1409-ст межгосударственный стандарт ГОСТ 34853—2022 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 460:2017 «Руководство по тестированию химической продукции. Метод определения проницаемости флуоресцеина для идентификации веществ, вызывающих разъедание и серьезное раздражение глаз» («Guidelines for the testing of chemicals — Fluorescein Leakage Test Method for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants», MOD) путем изменения его структуры для приведения в соответствие с правилами, установленными в ГОСТ 1.5—2001 (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.

В тексте стандарта библиографические ссылки приведены не в порядке возрастания из-за особенностей построения примененного международного документа.

Приложения в настоящем стандарте обозначены согласно требованиям ГОСТ 1.5, так как их обозначение в примененном международном документе противоречит практике межгосударственной стандартизации.

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 и определения 1
3 Исходные положения и ограничения 4
4 Сущность метода испытаний 5
5 Методика испытаний 6
6 Данные и отчеты об испытаниях 9
Приложение А (обязательное) Схема выращивания клеток MDCK на пористой мембранной вставке для проведения исследований по методу FL 11
Приложение В (обязательное) Химическая продукция для проверки квалификации при проведении исследований по методу FL 12
Приложение ДА (справочное) Сопоставление структуры настоящего стандарта со структурой международного документа 14
Библиография 17

Введение

1. Метод определения проницаемости флуоресцеина (Fluorescein Leakage — FL) — это метод исследования *in vitro*, который в определенных условиях и с соблюдением некоторых ограничений может применяться для проведения классификации химической продукции (веществ и смесей) по ее способности вызывать разъедание или серьезное раздражение глаз в соответствии с требованиями Согласованной на глобальном уровне системы классификации и маркировки химической продукции (СГС) Организации Объединенных Наций (ООН) (класс опасности 1), Регламента Европейского союза (ЕС) по классификации, маркировке и упаковке химических веществ и смесей (European Union Regulation on Classification, Labelling and Packaging of Substances and Mixtures — EU CLP) (класс опасности 1) и Управления по охране окружающей среды США (U. S. Environmental Protection Agency — U. S. EPA) (класс опасности I) [1], [2], [3]. Для целей настоящего стандарта химической продукцией, вызывающей серьезное раздражение, является продукция, которая способна при воздействии на образец глаза в процессе исследования вызывать повреждения глазных тканей, которые не могут быть полностью обратимы по истечении 21 дня с момента такого воздействия, либо провоцировать обусловленное физическими причинами существенное ухудшение зрения в отличие от химической продукции с разъедающим действием, под которой понимают продукцию, способную вызывать полностью необратимые повреждения тканей глаз. Подобной химической продукции должен присваиваться класс опасности 1 согласно СГС ООН, класс опасности 1 согласно EU CLP либо класс опасности I согласно U. S. EPA.

2. Метод FL не может рассматриваться в качестве полноценной замены тестам *in vivo* на глазу кролика, но он может быть рекомендован к применению в рамках многоуровневой стратегии исследования для целей законодательно регулируемой классификации и маркировки химической продукции. Таким образом, его целесообразно применять на ранних этапах реализации стратегии исследования с применением нисходящего подхода для определения химической продукции, вызывающей разъедание/серьезное раздражение глаз, а именно для некоторой химической продукции (например, для водорастворимых веществ и смесей) [4], [5]. Выбор наиболее подходящего метода исследований, а также применение положений настоящего стандарта должны осуществляться с учетом требований [10].

3. Согласно общепринятому мнению в обозримом будущем появления одного метода *in vitro* для исследования раздражения глаз, позволяющего спрогнозировать весь спектр реакций, вызываемых химической продукцией различных классов, который мог бы заменить применяемый в настоящее время тест *in vivo* [6], ожидать не приходится. Тем не менее выверенное сочетание нескольких альтернативных методов исследований, реализуемых в рамках многоуровневой стратегии исследования, вполне может заменить собой вышеупомянутый тест, проводимый *in vivo* [5]. Применение нисходящего подхода [5] уместно для случаев, когда, исходя из уже имеющейся информации, исследуемая химическая продукция, предположительно, должна обладать высокой раздражающей способностью.

4. Исходя из модели построения прогнозов согласно 5.4.4, метод FL может применяться для определения веществ, способных вызывать разъедание/серьезное раздражение глаз в ограниченной области (класс опасности 1 согласно СГС ООН, класс опасности 1 согласно EU CLP, класс опасности I согласно U. S. EPA), без необходимости проведения дальнейших исследований. Такой подход допускается для смесей веществ, хотя смеси не использовались в процессе валидации метода. Отсюда следует, что метод FL может применяться для определения химической продукции, обладающей раздражающей/разъедающей способностью при соблюдении последовательной стратегии исследований, описанной в [6]. Если в то же время при применении метода FL не удается достоверно определить способность химической продукции вызывать разъедание или серьезное раздражение глаз, должны быть применены один или несколько дополнительных методов исследований (*in vitro* и/или *in vivo*), позволяющих достоверно определять: i) химическую продукцию, которая вызывает разъедание/серьезное раздражение глаз и для которой получены ложноотрицательные заключения при проведении исследований по методу FL (класс опасности 1 согласно СГС ООН, класс опасности 1 согласно EU CLP, класс опасности I согласно U. S. EPA); ii) химическую продукцию, которая не подлежит классификации как вызывающая разъедание/раздражение глаз (класс опасности отсутствует согласно СГС ООН и EU CLP, класс опасности IV согласно U. S. EPA); и/или iii) химическую продукцию, которая вызывает умеренное/слабое раздражение глаз (подклассы опасности 2A и 2B согласно СГС ООН, класс опасности 2 согласно EU CLP, классы опасности II и III согласно U. S. EPA).

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

МЕТОДЫ ИСПЫТАНИЙ ПО ВОЗДЕЙСТВИЮ ХИМИЧЕСКОЙ ПРОДУКЦИИ НА ОРГАНИЗМ ЧЕЛОВЕКА

Метод определения проницаемости флуоресцеина для идентификации веществ, вызывающих разъедание и серьезное раздражение глаз

Methods for studying the effects of chemicals on the human body.
Fluorescein Leakage Test Method for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants

Дата введения — 2024—05—01

1 Область применения

1.1 Настоящий стандарт устанавливает метод оценки потенциальной опасности исследуемых химических веществ оказывать разъедающее или сильно раздражающее действие на глаза, которая определяется по их способности вызывать повреждения изолирующего конфлюэнтного (слитного) монослоя эпителиальных клеток. Поддержание приемлемого уровня трансэпителиальной проницаемости представляет собой одну из главных функций эпителия в организме, что в полной мере применимо к эпителию конъюнктивы и роговицы глаз. Этот уровень обеспечивается плотным межклеточным соединением. Увеличение проницаемости эпителия роговицы при наблюдениях *in vivo*, как было доказано, коррелирует со степенью воспалительного процесса и повреждения поверхности, которые проявляются по мере развития раздражения глаза.

1.2 В соответствии с методом настоящего стандарта токсическое воздействие после кратковременной экспозиции исследуемого вещества определяют по увеличению проницаемости флуоресцеина натрия через эпителиальный монослой культуры клеток Мадин-Дарби из почек собак (Madin-Darby Canine Kidney — MDCK), выращенных на пористых вставках. Величина наблюдаемой проницаемости флуоресцеина является прямо пропорциональной химическому поражению плотных межклеточных контактов, десмосом и клеточных мембран и может использоваться для оценки способности исследуемого вещества оказывать токсическое воздействие на глаза. В приложении А приведено графическое изображение выращивания клеток MDCK на пористой мембранной вставке.

2 Термины и определения

В настоящем стандарте применены следующие термины с соответствующими определениями:

2.1 **альтернативные испытания** (replacement test): Испытания, проводимые в соответствии с методами, которые были разработаны, чтобы служить заменой регулярно применяемым методам испытаний, допущены к применению для целей выявления опасностей и/или оценки рисков и в случае такого применения обеспечивают доказанный аналогичный или более высокий уровень защиты здоровья человека, животных или охраны окружающей среды по сравнению с утвержденными методами независимо от условий проведения испытаний и выбора исследуемых химических веществ.

2.2 **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 [9].

2.3 **вещество** (substance): Химические элементы и их соединения, представленные в естественном состоянии или полученные при выполнении производственного процесса, включая любые добавки,

Издание официальное

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 его составе.

2.4 **вещество, вызывающее раздражение глаз** (ocular irritant): (a) химическое вещество, воздействие которого на поверхность глаза приводит к обратимым изменениям в глазных тканях; (b) любое вещество, которому был присвоен подкласс опасности 2A или 2B согласно СГС ООН, класс опасности 2 согласно EU CLP либо класс опасности II или III согласно U. S. EPA [2], [3], [4].

2.5 **вещество, вызывающее разъедание глаз** (ocular corrosive): (a) химическое вещество, воздействие которого приводит к необратимым повреждениям глазных тканей; (b) любое вещество, которому был присвоен класс опасности 1 согласно СГС ООН, класс опасности 1 согласно EU CLP либо класс опасности I согласно U. S. EPA [2], [3], [4].

2.6 **вещество, вызывающее серьезное раздражение глаз** (ocular severe irritant): (a) химическое вещество, воздействие которого на поверхность глаза приводит к повреждениям глазных тканей, которые не являются полностью обратимыми по истечении 21 дн с момента такого воздействия, либо к обусловленному физическими причинами существенному ухудшению зрения; (b) любое вещество, которому был присвоен класс опасности 1 согласно СГС ООН, класс опасности 1 согласно EU CLP либо класс опасности I согласно U. S. EPA [2], [3], [4].

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

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

2.9 **класс опасности 1 согласно СГС ООН** (GHS Category 1): Химическая продукция, вызывающая развитие повреждений глазных тканей либо обусловленное физическими причинами существенное ухудшение зрения после воздействия на поверхность глаза, которые не являются полностью обратимыми по истечении 21 дн с момента такого воздействия.

2.10 **класс опасности I согласно U. S. EPA** (U. S. EPA Category I): Химическая продукция, оказывающая разъедающее воздействие (необратимое разрушение глазных тканей), приводящая к поражению роговицы либо вызывающая сохраняющуюся болезненную чувствительность глаз в течение 21 дн и более [4].

2.11 **класс опасности отсутствует** (Not-classified): Химическая продукция, не удовлетворяющая критериям классификации для химической продукции, относящейся к классу опасности 1, подклассу опасности 2A или 2B согласно СГС ООН, классу опасности 1 или 2 согласно EU CLP либо классам безопасности I, II или III согласно U. S. EPA [2], [3], [4].

2.12 **контрольная проба растворителя/вещества-носителя** (solvent/vehicle control): Ничем не обработанная проба, включающая в себя все составляющие испытательной системы, содержащая растворитель или вещество-носитель и используемая наряду с пробами, содержащими исследуемое вещество, и другими контрольными пробами для определения базовой реакции для образцов, обработанных исследуемым веществом, разведенным в том же растворителе или веществе-носителе. При параллельном использовании с отрицательной контрольной пробой также позволяет выяснить, взаимодействует ли растворитель или вещество-носитель с испытательной системой.

2.13 **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. Если способность химической продукции вызывать раздражение не может быть подтверждена на основе существующей информации, исследование продолжается в виде поэтапно выполняемой серии испытаний на животных до тех пор, пока исследуемая химическая продукция не будет однозначно классифицирована.

2.14 **надежность** (reliability): Показатель того, что метод испытаний может быть реализован с получением воспроизводимых результатов в рамках одной или различных лабораторий в течение продол-

жительного времени при применении одного и того же протокола. Он оценивается путем вычисления внутри- и межлабораторной воспроизводимости и внутрилабораторной повторяемости.

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

2.16 **отрицательная контрольная проба** (negative control): Ничем не обработанная, используемая параллельно проба, включающая в себя все составляющие испытательной системы. Используется наряду с пробами, обработанными исследуемой химической продукцией и другими контрольными пробами для выяснения, взаимодействует ли используемый растворитель с испытательной системой.

2.17 **оценка 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.

2.18 **положительная контрольная проба** (positive control): Используемая параллельно проба, содержащая все компоненты испытательной системы и обрабатываемая с использованием вещества, заведомо дающего положительный результат. Чтобы обеспечить возможность учитывать изменчивость во времени результата, получаемого для данной пробы, этот положительный результат не должен быть слишком завышенным.

2.19 **проницаемость флуоресцеина** (fluorescein leakage): Количество проходящего через слой клеток флуоресцеина, измеряемое посредством флуоресцентной спектроскопии.

2.20 **Регламент Европейского союза по классификации, маркировке и упаковке химических веществ и смесей;** EU CLP (European Commission Regulation on the Classification, Labelling and Packaging of Substances and Mixtures — EU CLP): Документ, имплементирующий в Европейском союзе (ЕС) систему классификации химической продукции (веществ и их смесей) СГС ООН [3].

2.21 **релевантность** (relevance): Показатель соответствия метода испытаний результату, полученному при испытаниях, а также его обоснованности и пригодности для определенных целей применения. Он указывает пределы, в которых метод позволяет правильно измерить или спрогнозировать исследуемый биологический эффект. Оценка релевантности включает в себя оценку точности (согласованности) метода исследования [9].

2.22 **Согласованная на глобальном уровне система классификации и маркировки химической продукции (ООН);** СГС (Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals by Nation (UN); GHS): 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 предпринимателей, работников, перевозчиков, потребителей и представителей аварийных служб) и окружающей среды [2].

2.23 **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.

2.24 **смесь** (mixture): В контексте применения СГС ООН [2] смесь или раствор, состоящие из двух или более веществ, в которых они не вступают в реакцию друг с другом.

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

2.26 **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 с термином «согласованность» для указания доли корректных результатов, полученных с применением соответствующего метода испытаний.

2.27 **химическая продукция для проверки квалификации** (proficiency chemicals): Совокупность химических веществ из перечня эталонной химической продукции, которые могут быть использованы

лабораторией, не имеющей опыта проведения соответствующих испытаний, с целью подтверждения ее достаточной компетентности для применения валидированного референтного метода испытаний.

2.28 **чувствительность** (sensitivity): Доля всех дающих положительный результат/активных химических веществ, которые были правильно классифицированы с применением соответствующего метода испытаний. Этот показатель является мерой точности для методов испытаний, позволяющих получать однозначные результаты, и служит важной отправной точкой при оценке релевантности таких методов [9].

2.29 **FL_{20}:** Значение, которое может быть установлено путем определения концентрации, при которой воздействие исследуемой химической продукции является причиной просачивания флуоресцеина в количестве 20 % через слой клеток.

3 Исходные положения и ограничения

3.1 В основу метода настоящего стандарта положен протокол INVITTOX № 71 (7), оценка которого была проведена в рамках международного валидационного исследования, организованного совместно с Европейским центром по валидации альтернативных методов (European Centre for the Validation of Alternative Methods — ECVAM) [8], Американским межведомственным координационным комитетом по валидации альтернативных методов (US Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods — ICCVAM) и Японским центром по валидации альтернативных методов (Japanese Center for the Validation of Alternative Methods — JaCVAM).

3.2 Как показали валидационные исследования [4], [8], метод FL не рекомендуется применять для определения химической продукции, которая должна быть классифицирована как вызывающая слабое/умеренное раздражение глаз, или химической продукции, которая не должна классифицироваться как вызывающая раздражение глаз (вещества и смеси) (т. е. подклассы опасности 2A/2B или класс опасности отсутствует согласно СГС ООН, класс опасности 2 или класс опасности отсутствует согласно EU CLP, класс опасности II/III/IV согласно U. S. EPA).

3.3 Метод настоящего стандарта может применяться только для растворимой в воде химической продукции (веществ и смесей). Как правило, достаточно точное прогнозное заключение о способности вызывать серьезное раздражение глаз по методу FL может быть дано для такой химической продукции, которая хорошо растворяется в воде и/или характер токсического воздействия которой не изменяется при разбавлении [8]. Растворимой в воде для целей эксперимента считается химическая продукция, которая должна растворяться в стерильном кальцийсодержащем (в концентрации 1,0—1,8 мМ) сбалансированном солевом растворе Хэнкса (Hanks' Balanced Salt Solution — HBSS), не содержащем феноловый красный, в концентрации ≥250 мг/мл (одна доза сверх порогового значения 100 мг/мл). Если в то же время исследуемое вещество растворимо при концентрации менее 100 мг/мл, при которой уже наблюдается проницаемость флуоресцеина на уровне 20 % (т. е. FL_{20} < 100 мг/мл), то это не исключает возможности его отнесения к классу опасности 1 согласно СГС ООН или классу опасности I согласно U. S. EPA.

3.4 Известные на сегодняшний день ограничения исключают из области применения метода настоящего стандарта сильные кислоты и щелочи, фиксаторы клеточных материалов, а также химическую продукцию с высокой летучестью. Для данной химической продукции характерны механизмы, которые не позволяют применять метод FL, например обширная коагуляция, сапонификация или специфические химические реакции. Другие выявленные ограничения для данного метода основаны на результатах прогнозирования в отношении окрашенных и вязких исследуемых веществ [8]. Предполагается, что химическая продукция обоих видов может с трудом удаляться с поверхности монослоя по окончании короткого периода экспозициии и прогностичность метода может повышаться, если многократно повторяются этапы. Кроме того, твердая химическая продукция, образующая взвесь в жидкости, склонна к постепенному осаждению, поэтому определение концентрации, в которой она взаимодействует с клетками, может представляться затруднительным. Если исключить из базы данных вещества с указанными химическими и физическими свойствами, точность определений по методу FL в рамках применения систем классификации EU CLP, U. S. EPA и СГС ООН существенно возрастает [8].

3.5 Согласно назначению метода (а именно для определения веществ, воздействие которых способно приводить к разъеданию/серьезному раздражению глаз) величина доли ложноотрицательных заключений (см. 3.6) не является критической, так как вещества, для которых были получены такие заключения, должны подвергаться дальнейшим исследованиям с применением других надлежащим образом валидированных методов *in vitro* либо на подопытных кроликах в зависимости от действующих

нормативных требований и с использованием последовательной стратегии исследований на основе оценки по совокупности имеющихся свидетельств [6] (см. также введение).

3.6 Другие выявленные ограничения применения метода FL связаны с соотношением ложноотрицательных и ложноположительных заключений. На ранних этапах исследований с применением нисходящего подхода для определения растворимых в воде веществ и смесей, вызывающих разъедание/серьезное раздражение глаз (класс опасности 1 согласно СГС ООН, класс опасности 1 согласно EU CLP, класс опасности I согласно U. S. EPA), доля ложноположительных заключений для метода исследования FL варьировалась в интервале от 7 % (7/103 согласно СГС ООН и EU CLP) до 9 % (9/99 согласно U. S. EPA), а ложноотрицательных заключений — в интервале от 54 % (15/28 согласно U. S. EPA) до 56 % (27/48 согласно СГС ООН и EU CLP) при сравнении с результатами, получаемыми *in vivo*. Группы химической продукции, показывающие ложноположительные и/или ложноотрицательные результаты при применении метода FL, в настоящем стандарте не описываются.

3.7 С технической стороны ограничения объясняются особенностями клеточной культуры MDCK. Плотное межклеточное соединение, блокирующее прохождение флуоресцеина натрия через клеточный монослой, увеличивается по мере увеличения числа пассажей клеточной культуры. Не сформированное полностью плотное межклеточное соединение приводит к увеличению проницаемости флуоресцеина при наблюдении за необработанными контрольными образцами. Соответственно, особое значение приобретает соблюдение заданного максимально допустимого уровня проницаемости в необработанных образцах (см. 0%-ный уровень проницаемости в 5.5.1). Как и в случае любых других биологических испытаний *in vitro*, нельзя исключать вероятность трансформации клеток с течением времени, поэтому критически важно определить количество клеточных пассажей для подобных экспериментов.

3.8 При определенных условиях область применения метода в некоторых случаях может быть расширена, но только по итогам анализа всей совокупности дополнительных данных о характеристиках исследуемых веществ, которые преимущественно должны быть собраны в процессе испытаний [4]. Настоящий стандарт подлежит актуализации по мере необходимости с целью включения в него новой информации и данных.

3.9 Все лаборатории, впервые внедряющие у себя метод настоящего стандарта, должны использовать установленный перечень химической продукции для проверки квалификации, приведенный в приложении В. Исследуя данную химическую продукцию, каждая такая лаборатория должна подтвердить свою техническую компетентность для выполнения испытаний по методу FL, прежде чем начать представлять данные, полученные при применении этого метода, для целей официальной классификации химической продукции по степени ее опасности.

4 Сущность метода испытаний

4.1 В основу метода FL положен анализ цитотоксичности и функций клеток *in vitro*, который выполняется на конфлюэнтном монослое клеток канальцевого эпителия MDCK CB997, культивируемом на полупроницаемых пористых вставках и представляющем собой модель эпителия роговицы глаза в непролиферирующем состоянии *in vivo*. Характеристики клеток линии MDCK хорошо изучены. Клетки образуют плотные контакты и десмосомальные соединения, аналогичные тем, которые присутствуют в апикальной части роговицы и конъюнктивы. В условиях *in vivo* плотные контакты и десмосомальные соединения препятствуют проникновению растворенных веществ и чужеродных материалов в эпителий роговицы. Снижение трансэпителиальной непроницаемости вследствие поражения плотных контактов и межклеточных соединений — это один из начальных признаков развития раздражения глаз, вызванного контактом с химической продукцией.

4.2 Исследуемое вещество наносят на конфлюэнтный слой клеток, сформировавшийся на апикальном участке вставки. Как правило, используют кратковременную экспозицию продолжительностью 1 мин, что соответствует нормальному периоду естественного очищения поверхности роговицы у человека. Преимущество кратковременной экспозиции заключается в том, что водные растворы веществ и смесей могут исследоваться без дополнительного разбавления, если по окончании экспозиции они могут быть легко и быстро удалены с поверхности образца. Это расширяет возможности непосредственного сравнения результатов воздействия различного вида химической продукции на человека. После удаления исследуемого вещества на поверхность апикальной части монослоя на 30 мин помещают некоторое количество нетоксичного красителя флуоресцеина натрия, обладающего сильно выраженными флуоресцентными свойствами. Степень поражений, вызываемых воздействием исследуемого

вещества на плотные межклеточные соединения, определяют, исходя из количества флуоресцеина, способного проникнуть через слои клеток до окончания заданного периода времени.

4.3 Количество красителя флуоресцеина натрия, проникающего через монослой и мембрану вставки в фиксированный объем раствора, содержащегося в лунке (куда и просачивается краситель), определяют путем флуоресцентных спектроскопических измерений концентрации флуоресцеина в этом растворе. Количество просачивающегося флуоресцеина (FL) вычисляют с учетом интенсивности флуоресценции (FI) для двух контрольных проб: холостой пробы и контрольной пробы с максимально возможной проницаемостью. Количество просочившегося вещества, а соответственно, и степень поражения плотных межклеточных соединений определяются относительно этих двух контрольных проб для каждой из установленных концентраций исследуемого вещества. Затем вычисляют FL_{20} (т. е. концентрацию, при которой наблюдается 20%-ное просачивание флуоресцеина относительно значений, зафиксированных для необработанного конфлюэнтного монослоя и вставок, не содержащих клеток). Значение FL_{20} (мг/мл) согласно применяемой модели построения прогнозов используют для определения веществ, способных вызывать разъедание или серьезное раздражение глаз (см. 5.4.4).

4.4 Одна из важных составляющих описания профиля токсичности исследуемого вещества — это скорость последующего восстановления тканей, оценить которую позволяют тесты на раздражение глаз *in vivo*. Результаты предварительного анализа показывают, что наличие сведений о ходе восстановления (за период вплоть до 72 ч после химического воздействия) потенциально может повысить достоверность прогнозирования при проведении исследований в соответствии с протоколом INVITTOX № 71, однако для подготовки окончательных выводов по данному вопросу требуется выполнение последующей оценки на основе дополнительной информации, преимущественно полученной путем дальнейших испытаний [7].

5 Методика испытаний

5.1 Приготовление клеточного монослоя

5.1.1 Монослой MDCK CB997 приготавливают на основе субконфлюэнтных клеток, выращиваемых в культуральных колбах с добавлением модифицированной по способу Дульбекко среды Игла (Dulbecco's Modified Eagle Medium — DMEM)/питательной смеси F12 (концентрат 1х с L-глютамином, 15 мМ HEPES (4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота), кальций (в концентрации 1,0—1,8 мМ) и 10 % инактивированной нагреванием фетальной телячьей сыворотки (Fetal Calf Serum — FCS)/фетальной бычьей сыворотки (Fetal Bovine Serum — FBS). Важно, чтобы все среды/растворы, используемые при проведении испытаний по методу FL, содержали кальций в концентрации от 1,8 (200 мг/л) до 1,0 мМ (111 мг/л) для обеспечения формирования плотных межклеточных соединений и структурной целостности. Число пассажей клеток должно контролироваться, для того чтобы формирование плотных межклеточных соединений было равномерным и воспроизводимым. Предпочтительным является диапазон значений числа пассажей 3—30 с момента размораживания клеточного материала, поскольку клетки из указанных пассажей обладают аналогичными функциональными свойствами, что существенно повышает воспроизводимость результатов испытаний.

5.1.2 Перед началом испытаний по методу FL клетки переносят из культуральной колбы путем трипсинизации и центрифугируют, а затем высевают соответствующее количество клеток на вставки, установленные в 24-луночных планшетах (см. приложение А). Для посева клеток следует использовать вставки диаметром 12 мм, имеющие мембрану из смеси сложных эфиров целлюлозы, толщиной 80—150 мкм и размером пор 0,45 мкм. Так, в процессе валидационного исследования использовались вставки Millicell-HA диаметром 12 мм. Соблюдение требований к параметрам вставки и типу мембраны имеет существенное значение, так как от них могут зависеть условия роста клеток и образования химических связей. Следует также иметь в виду, что некоторые виды химической продукции способны связываться с материалом мембраны Millicell-HA, что может оказывать влияние на последующую интерпретацию результатов. Если планируется использовать другие мембраны, эквивалентность результатов должна быть подтверждена путем испытаний химической продукции, включенной в перечень для проверки квалификации (см. приложение В).

5.1.3 Образование химических связей с материалом мембраны чаще всего наблюдается у катионоактивной химической продукции, например бензалкония хлорида, которая притягивается к положительно заряженной мембране [8]. Такое связывание с мембраной вставки может увеличивать фактическое время экспозиции, что приводит к завышенной оценке токсического воздействия исследуемой

химической продукции, но также физически может ограничивать проницаемость флуоресцеина через мембрану вставки, если краситель соединяется с катионоактивной химической продукцией, в свою очередь связанной с материалом мембраны, — в этом случае оценка токсического воздействия оказывается заниженной. Выявить такую ситуацию позволяет обработка мембраны без клеток исследуемым веществом в максимальной концентрации и последующее нанесение на нее красителя флуоресцеина натрия в соответствующей норме концентрации с соблюдением стандартного временного интервала (без контроля состояния клеток). Если связывание красителя действительно имело место, мембрана вставки после смывания исследуемой химической продукции должна иметь желтоватый цвет. Соответственно, для достоверной интерпретации воздействия химической продукции на клетки важно заранее располагать сведениями о способности к связыванию данной продукции.

5.1.4 Клетки, высеваемые на вставки, к моменту экспозиции химической продукции должны успеть образовать на ней конфлюэнтный монослой. На каждую вставку помещают $1,6 \times 10^5$ клеток (400 мкл клеточной суспензии с плотностью 4×10^5 клеток/мл). При соблюдении этих условий конфлюэнтный монослой культуры, как правило, образуется не позднее 96 ч после посева. Перед посевом вставки следует подвергнуть тщательному наружному осмотру, чтобы выявить повреждения, которые могли бы способствовать неправильной интерпретации на следующем этапе испытаний (см. 5.3.1).

5.1.5 Клеточные культуры MDCK должны сохраняться в инкубаторах во влажной атмосфере, содержащей 5 % ± 1 % CO_2 и имеющей температуру (37 ± 1) °С. Клетки не должны быть контаминированы бактериями, вирусами, микоплазмой или грибами.

5.2 Нанесение исследуемой и контрольной химической продукции

5.2.1 Каждый раз перед проведением новой серии испытаний следует приготавливать свежий исходный раствор исследуемого вещества, который должен быть использован не позднее 30 мин после его приготовления. Во избежание связывания белков сыворотки исследуемые вещества разводят в кальцийсодержащем (в концентрации 1,0—1,8 мМ) растворе HBSS без добавления фенолового красного. До начала испытаний изучают способность исследуемой химической продукции растворяться в HBSS в концентрации 250 мг/мл. Если при такой концентрации химическая продукция образует устойчивую суспензию или эмульсию (т. е. распределяется в толще жидкости равномерно, без оседания или разделения на две или более фазы) в течение 30 мин, дальнейшее использование HBSS в качестве растворителя считается допустимым. Если химическая продукция проявляет себя нерастворимой в HBSS при указанной концентрации, следует рассмотреть возможность применения взамен метода FL иного метода испытаний. Использовать в качестве растворителя легкое минеральное масло в случаях, когда химическая продукция была признана нерастворимой в HBSS, следует с осторожностью ввиду отсутствия достаточного количества данных, которые позволяли бы объективно оценить рабочие характеристики метода FL, реализуемого в подобных условиях.

5.2.2 Растворы всей химической продукции для испытаний приготавливают из исходного раствора путем добавления стерильного кальцийсодержащего (в концентрации 1,0—1,8 мМ) раствора HBSS без фенолового красного в пяти различных концентрациях, заданных как отношение массы к объему: 1, 25, 100, 250 мг/мл, а также используют неразбавленный или насыщенный раствор. При испытаниях твердой химической продукции следует включать раствор с высокой концентрацией — 750 мг/мл. Наносить химическую продукцию в такой концентрации на клетки можно с помощью пипетки с прямым вытеснением. Если в диапазоне значений концентрации от 25 до 100 мг/мл отмечается токсическое поражение клеток, дальнейшие испытания повторяют дважды с дополнительной градацией значений: 1, 25, 50, 75, 100 мг/мл. Соответственно, значение FL_{20} вычисляют, исходя из данных, полученных для этих значений концентрации, при условии соблюдения установленных критериев приемлемости.

5.2.3 Исследуемые вещества наносят на конфлюэнтный монослой клеток после удаления питательной среды и двукратного промывания образцов стерильным, подогретым (до 37 °С) кальцийсодержащим (в концентрации 1,0—1,8 мМ) раствором HBSS без добавления фенолового красного. Предварительно мембранные фильтры должны быть визуально проверены на наличие уже существующих повреждений, которые впоследствии могли бы быть ошибочно объяснены несовместимостью с исследуемой химической продукцией. В каждой серии испытаний для каждого значения концентрации исследуемого химического вещества, а также для контрольных проб используют не менее трех параллельно обрабатываемых образцов клеток. После экспозиции в течение 1 мин при комнатной температуре исследуемое вещество тщательно удаляют с поверхности образца методом аспирации, дважды промывают клеточный монослой стерильным, подогретым (37 °С) кальцийсодержащим (в концентра-

ции 1,0—1,8 мМ) раствором HBSS без добавления фенолового красного, а затем сразу измеряют проницаемость флуоресцеина.

5.2.4 Отрицательные (ОК) и положительные (ПК) контрольные пробы должны параллельно использоваться в каждой серии испытаний для подтверждения того, что целостность монослоя (по данным, полученным с помощью ОК) и чувствительность клеток (по данным, полученным с помощью ПК) находятся в пределах установленного по результатам предыдущих наблюдений диапазона приемлемых значений. Рекомендуемой химической продукцией для использования в качестве ПК является эфир Brij 35 (CAS № 9002-92-0), наносимый в концентрации 100 мг/мл. Такое значение концентрации должно обеспечивать проницаемость флуоресцеина приблизительно на уровне 30 % (приемлемый диапазон 20 %—40 %, что свидетельствует о поражении слоя клеток). Химическая продукция, предлагаемая для использования в качестве ОК, — кальцийсодержащий (в концентрации 1,0—1,8 мМ) раствор HBSS без добавления фенолового красного (холостая, необработанная проба). Кроме того, в каждую серию испытаний должна быть включена отдельная проба для контроля максимально возможной проницаемости, обеспечивающая вычисление значений FL_{20}. Максимальную проницаемость определяют, используя вставку без клеточного слоя.

5.3 Определение проницаемости флуоресцеина

5.3.1 Сразу после удаления исследуемого и контрольного веществ на поверхность каждой вставки Millicell-HA наносят по 400 мкл раствора флуоресцеина натрия в концентрации 0,1 мг/мл (0,01 % (масса/объем) на основе кальцийсодержащего (в концентрации 1,0—1,8 мМ) раствора без добавления фенолового красного красителя, HBSS). Обработанные клетки выдерживают в течение 30 мин при комнатной температуре. По окончании инкубирования с флуоресцеином вставки осторожно извлекают из лунок. Визуально контролируют каждый мембранный фильтр и фиксируют сведения о любых повреждениях, которые могли иметь место в ходе обработки образцов.

5.3.2 Количество флуоресцеина, прошедшего через клеточный монослой и материал вставки, определяют по его содержанию в растворе, остающемся в лунках после извлечения вставок. Измерения выполняют с помощью спектрофлуориметра с выбранными значениями длины волны возбуждения и эмиссии 485 и 530 нм соответственно. Чувствительность используемого спектрофлуориметра следует настроить таким образом, чтобы добиться как можно большего численного расхождения между максимальным (на вставке без слоя клеток) и минимальным значением FL (на вставке с конфлюэнтным монослоем, обработанным ОК). С учетом разнящихся характеристик, доступных для использования спектрофлуориметров, рекомендуется настраивать их чувствительность, ориентируясь на получение значения интенсивности флуоресценции >4 000 при измерениях контрольной пробы с максимальной проницаемостью флуоресцеина. Максимальное значение FL не должно превышать 9 999. Максимальная интенсивность флуоресценции при просачивании флуоресцеина должна находиться в пределах линейного диапазона измерения используемого спектрофлуориметра.

5.4 Интерпретация результатов и модель построения прогнозов

5.4.1 Величина FL является пропорциональной степени химического поражения плотных межклеточных соединений. Значение FL в процентах для каждой концентрации исследуемой химической продукции вычисляют, исходя из значений FL, полученных для исследуемого вещества, и значений FL, полученных для ОК (значений для конфлюэнтного монослоя клеток после его обработки ОК), и контрольной пробы с максимально возможной проницаемостью (значений количества FL, проходящего через вставку без слоя клеток).

Среднее значение интенсивности флуоресценции при максимальной возможной проницаемости = *x*.

Среднее значение интенсивности флуоресценции при 0 %-ном уровне проницаемости (ОК) = *y*.

Среднее значение при 100 %-ном уровне проницаемости получают путем вычитания среднего значения при 0 %-ном уровне проницаемости из среднего значения при максимально возможной проницаемости, т. е.

$$x - y = z. \quad (1)$$

5.4.2 Значение проницаемости для каждой фиксированной дозы получают путем вычитания значения при 0 %-ном уровне проницаемости из среднего значения интенсивности флуоресценции, полученного для трех параллельно исследованных образцов (*m*), и деления результата на значение интенсивности при 100 %-ном уровне проницаемости, т. е.

$$\% FL = [(m - y)/z] \times 100\ \%, \quad (2)$$

где m — среднее значение интенсивности флуоресценции трех результатов измерений при соответствующей концентрации;

$\% FL$ — процентная доля флуоресцеина, прошедшего через слой клеток.

5.4.3 Для вычисления значения концентрации химической продукции, при которой проницаемость флуоресцеина составляет 20 %, используют следующую формулу:

$$FL_D = [(A - B)/(C - B)] \times (M_C - M_B) + M_B, \quad (3)$$

где D — % ингибирования;

A — % поражения (20 %-ная проницаемость флуоресцеина);

B — % проницаемости флуоресцеина $<A$;

C — % проницаемости флуоресцеина $>A$;

M_C — концентрация для С, мг/мл;

M_B — концентрация для В, мг/мл.

5.4.4 Пороговое значение FL_{20} для прогнозирования способности химической продукции вызывать разъедание/серьезное раздражение глаз приведено в таблице:

FL_{20} (мг/мл)	СГС ООН C&L	EU CLP C&L	U. S. EPA C&L
≤100	Класс опасности 1	Класс опасности 1	Класс опасности I
C&L — классификация и маркировка.			

5.4.5 Метод FL рекомендуется только для идентификации водорастворимых веществ, способных вызывать разъедание и серьезное раздражение глаз (класс опасности 1 согласно СГС ООН, класс опасности 1 согласно EU CLP, класс опасности I согласно U. S. EPA I) (см. введение и 3.3).

5.4.6 Водорастворимая химическая продукция (вещества и смеси) [4], [7], [8] идентифицируется как способная вызывать серьезное повреждение глаз (класс опасности 1 согласно СГС ООН, EU CLP) или разъедание или серьезное раздражение глаз (класс опасности I согласно U. S. EPA) при полученном значении $FL_{20} \leq 100$ мг/мл.

5.5 Критерии приемлемости результатов

5.5.1 Среднее значение при максимальной проницаемости флуоресцеина (x) должно составлять более 4 000 (см. 5.3.2), среднее значение при 0 %-ной проницаемости (y) не должно превышать 300, а среднее значение при 100 %-ной проницаемости (z) должно находиться в диапазоне от 3 700 до 6 000.

5.5.2 Результаты испытания считают достоверными, если воздействие ПК приводит к поражению слоя клеток в пределах от 20 % до 40 % (показатель проницаемости (%) флуоресцеина).

6 Данные и отчеты об испытаниях

6.1 Данные

Для каждой серии испытаний необходимые данные (например, значения интенсивности флуоресценции, а также вычисленные процентные значения FL для каждого исследуемого вещества и сведения о его классификации) следует указывать для отдельно взятых, параллельно обрабатываемых лунок, представляя их в табличной форме. В отчет также должны включаться средние значения ± стандартное отклонение для результатов измерений, полученных для соответствующих параллельно обрабатываемых лунок в каждой серии испытаний.

6.2 Отчет об испытаниях

Отчет об испытаниях должен включать в себя следующую информацию:

Исследуемые и контрольные вещества:

- химическое наименование (наименования) согласно используемому Реферативной службой по химии (Chemical Abstracts Service — CAS), за которым перечисляются его другие наименования, если таковые известны;

- регистрационный номер CAS, если известен;
- все доступные сведения о степени чистоты и составе вещества или смеси (в процентах по массе);
- сведения о физико-химических характеристиках (например, агрегатное состояние, летучесть, показатель pH, стабильность, растворимость в воде, класс химических веществ), важных для целей исследования;
- способ обработки исследуемого/контрольного вещества перед началом испытаний, если такая обработка проводилась (например, подогрев, измельчение);
- условия хранения.

Обоснование выбора метода исследований и использованного протокола:

- желательно привести разъяснения в части области применения метода, а также условий, ограничивающих его применение.

Условия испытаний:

- описание использованной клеточной системы вместе с сертификатом, подтверждающим подлинность, и данными в отношении контаминации клеточной линии микоплазмами;
- подробное описание применяемой методики испытаний;
- использованное(ые) значение(я) концентрации исследуемого вещества;
- продолжительность экспозиции исследуемого вещества;
- продолжительность инкубирования с флуоресцеином;
- описание любых изменений, внесенных в методику испытаний;
- описание применявшихся критериев оценки;
- ссылки на данные прошлых наблюдений за характеристиками клеточной модели (например, результаты для ОК и ПК, эталонных веществ, если имеются);
- информация о подтверждении лабораторией своей технической компетентности.

Результаты:

- представление данных в табличной форме для отдельных исследуемых веществ и контрольных проб для каждой серии испытаний и каждого параллельно выполняемого измерения (включая непосредственные результаты, средние значения и значения стандартного отклонения);
- результаты классификации в одной или нескольких системах со ссылкой на применявшуюся модель построения прогнозов и/или критерии принятия решений;
- описание прочих явлений, наблюдавшихся в ходе испытаний.

Анализ результатов:

- желательно привести разъяснения в части получения результатов, не позволяющих сделать однозначное заключение (см. FL_{20} > 100 мг/мл в 5.4.4), и проведения дальнейших испытаний.

Выводы.

Приложение А
(обязательное)

Схема выращивания клеток MDCK на пористой мембранной вставке для проведения исследований по методу FL

Конфлюэнтный слой клеток MDCK выращивают на полупроницаемых пористых мембранах вставок. Предназначенные для этого вставки размещают в лунках 24-луночного планшета.

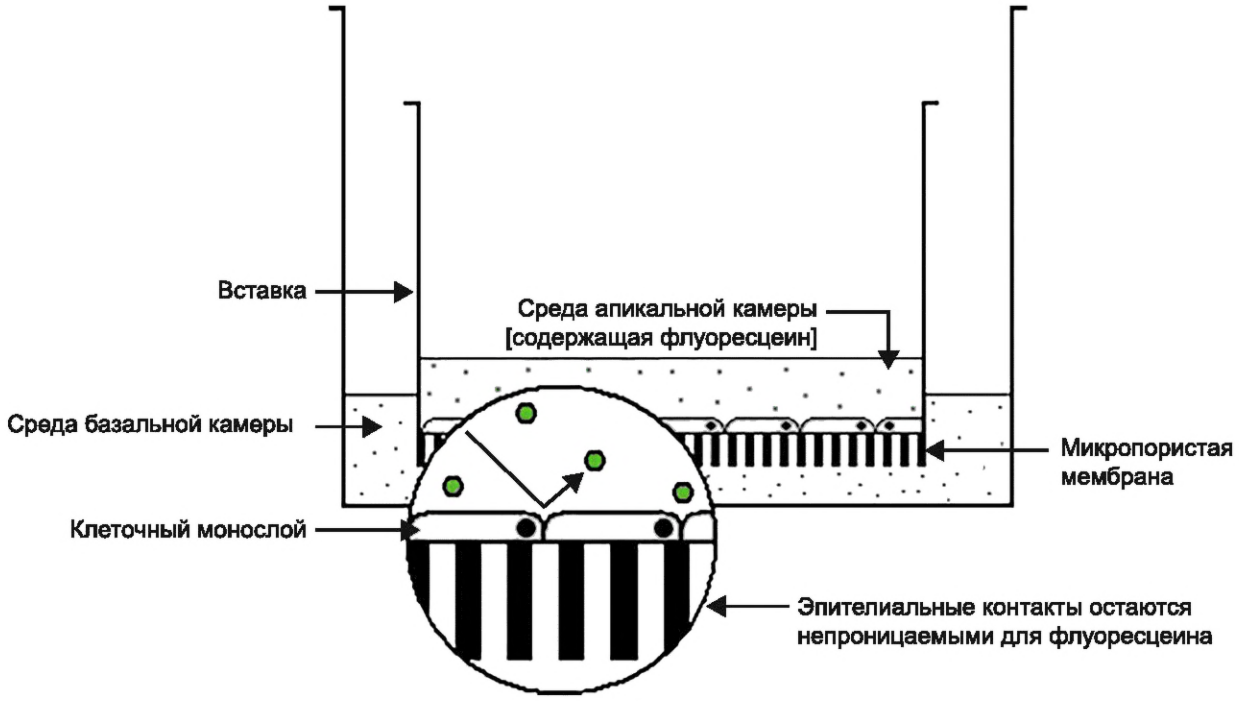

Иллюстрация взята из Wilkinson, P.J. (2006), Development of an *in vitro* model to investigate repeat ocular exposure, Ph.D. Thesis, University of Nottingham, UK (Разработка модели для исследования повторяющихся воздействий на глазные ткани в условиях *in vitro*).

Приложение В
(обязательное)

Химическая продукция для проверки квалификации при проведении исследований по методу FL

До того как приступить к регулярному применению метода в соответствии с настоящим стандартом, лаборатории должны подтвердить свою техническую компетентность, правильно классифицировав 8 химических веществ, перечисленных в таблице 1. Данные химические вещества были выбраны таким образом, чтобы они представляли весь спектр степеней опасности вызывать локальное раздражение/разъедание глаз, определяемых на основе результатов испытаний *in vivo* на глазу кролика [6] (класс опасности 1, подкласс опасности 2А, 2В или класс опасности отсутствует в соответствии с требованиями СГС ООН и EU CLP) [1], [2], [6]. Тем не менее с учетом целей валидации метода FL (а именно только для определения продукции, вызывающей разъедание/серьезное раздражение глаз) только два заключения для классификации (исследуемая химическая продукция способна вызывать разъедание/серьезное раздражение глаз или исследуемая химическая продукция не способна вызывать разъедание/серьезное раздражение глаз) могут использоваться для подтверждения квалификации. Дополнительными критериями, которые учитывались при выборе, являются доступность соответствующей химической продукции для коммерческого приобретения, а также наличие для нее как достоверных справочных данных, полученных *in vivo*, так и достоверных данных, полученных *in vitro*, с применением метода FL. В этой связи перечень химической продукции для проверки квалификации был сформирован на основе данных Справочного обзорного документа по применению метода определения проницаемости флуоресцеина в качестве альтернативного метода при проведении испытаний на раздражение глаз [8], который был использован в ходе ретроспективной валидации метода FL.

Таблица В.1 — Перечень рекомендуемой химической продукции для проверки технической компетентности при исследовании по методу FL

Химическое вещество	Номер CAS	Класс химических веществ[1)]	Агрегатное состояние	Результат классификации по итогам исследований *in vivo*[2)]	Результат классификации по итогам исследований *in vitro*[3)]
Бензалкония хлорид (5 %)	8001-54-5	Ониевые соединения	Жидкое	Класс опасности 1	Вещество, вызывающее разъедание/серьезное раздражение
Прометазина гидрохлорид	58-33-3	Амины, амидины, гетеро-циклические соединения, органические соединения серы	Твердое	Класс опасности 1	Вещество, вызывающее разъедание/серьезное раздражение
Натрия гидроксид (10 %)	1310-73-2	Щелочи	Жидкое	Класс опасности 1	Вещество, вызывающее разъедание/серьезное раздражение
Натрия лаурилсульфат (15 %)	151-21-3	Карбоновые кислоты (соли)	Жидкое	Класс опасности 1	Вещество, вызывающее разъедание/серьезное раздражение
4-карбокси-бензальдегид	619-66-9	Карбоновые кислоты, альдегиды	Твердое	Подкласс опасности 2(А)	Вещество, не вызывающее разъедания/серьезного раздражения глаз
Аммония нитрат	6484-52-2	Неорганические соли	Твердое	Подкласс опасности 2(А)	Вещество, не вызывающее разъедания/серьезного раздражения глаз
Этил-2-метил-ацетоацетат	609-14-3	Кетоны, эфиры	Жидкое	Подкласс опасности 2(В)	Вещество, не вызывающее разъедания/серьезного раздражения глаз

Окончание таблицы В.1

Химическое вещество	Номер CAS	Класс химических веществ[1)]	Агрегатное состояние	Результат классификации по итогам исследований *in vivo*[2)]	Результат классификации по итогам исследований *in vitro*[3)]
Глицерин	56-81-5	Спирты	Жидкое	Класс опасности отсутствует	Вещество, не вызывающее разъедания/ серьезного раздражения глаз

Сокращения: CAS — Реферативная служба по химии (Chemical Abstracts Service).

[1)] Класс присвоен каждому исследуемому химическому веществу на основе стандартной схемы классификации, которая реализована в системе классификации Национальной медицинской библиотеки США, принятой для медицинских предметных заголовков (Medicine Medical Subject Headings — MeSH) (доступна по адресу: http//gost.e-ecolog.ru).

[2)] На основе результатов испытаний на глазу кролика *in vivo* [6], [2], [18] с учетом СГС ООН и EU CLP [1].

[3)] На основе результатов, полученных с применением метода FL (протокол INVITTOX № 71).

Приложение ДА
(справочное)

Сопоставление структуры настоящего стандарта со структурой международного документа

Таблица ДА.1

Структура настоящего стандарта			Структура международного документа	
Разделы	Подразделы	Перечисления	Разделы	Перечисления
Введение			1—4	—
1	—	—	5, 6	—
2	—	—	7	—
	2.1	—	Приложение 2	—
	2.2	—	Приложение 2	—
	2.3	—	Приложение 2	—
	2.4	—	Приложение 2	—
	2.5	—	Приложение 2	—
	2.6	—	Приложение 2	—
	2.7	—	Приложение 2	—
	2.8	—	Приложение 2	—
	2.9	—	Приложение 2	—
	2.10	—	Приложение 2	—
	2.11	—	Приложение 2	—
	2.12	—	Приложение 2	—
	2.13	—	Приложение 2	—
	2.14	—	Приложение 2	—
	2.15	—	Приложение 2	—
	2.16	—	Приложение 2	—
	2.17	—	Приложение 2	—
	2.18	—	Приложение 2	—
	2.19	—	Приложение 2	—
	2.20	—	Приложение 2	—
	2.21	—	Приложение 2	—
	2.22	—	Приложение 2	—
	2.23	—	Приложение 2	—
	2.24	—	Приложение 2	—
	2.25	—	Приложение 2	—
	2.26	—	Приложение 2	—
	2.27	—	Приложение 2	—
	2.28	—	Приложение 2	—

Продолжение таблицы ДА.1

Структура настоящего стандарта			Структура международного документа	
Разделы	Подразделы	Перечисления	Разделы	Перечисления
2	2.29	—	Приложение 2	—
	2.30	—	Приложение 2	—
	2.31	—	Приложение 2	—
	2.32	—	Приложение 2	—
	2.33	—	Приложение 2	—
	2.34	—	Приложение 2	—
	2.35	—	Приложение 2	—
	2.36	—	Приложение 2	—
3	3.1	—	8	—
	3.2	—	9	—
	3.3	—	10	—
	3.4	—	11	—
	3.5	—	12	—
	3.6	—	13	—
	3.7	—	14	—
	3.8	—	15	—
	3.9	—	16	—
4	4.1	—	17	—
	4.2	—	18	—
	4.3	—	19	—
	4.4	—	20	—
5	5.1.1	—	21	—
	5.1.2	—	22	—
	5.1.3	—	23	—
	5.1.4	—	24	—
	5.1.5	—	25	—
	5.2.1	—	26	—
	5.2.2	—	27	—
	5.2.3	—	28	—
	5.2.4	—	29	—
	5.3.1	—	30	—
	5.3.2	—	31	—
	5.4.1	—	32	—
	5.4.2	—	33	—

Окончание таблицы ДА.1

Структура настоящего стандарта			Структура международного документа	
Разделы	Подразделы	Перечисления	Разделы	Перечисления
5	5.4.3	—	34	—
	5.4.4	—	35	—
	5.4.5	—	36	—
	5.4.6	—	37	—
	5.5.1	—	38	—
	5.5.2	—	39	—
6	6.1	—	40	—
	6.2	—	41	—
	Приложение А	—	Приложение 1	—
	Приложение В	—	Приложение 3	—
Библиография			Литература	

Библиография

[1] UN (2009), United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Third revised edition, New York & Geneva: United Nations Publications. ISBN: 978-92-1-117006-1. Available at: [http://gost.e-ecolog.ru] (Согласованная на глобальном уровне система классификации и маркировки химических веществ (СГС) Организации Объединенных Наций. — 3-е изд., пересмотр.)

[2] EC (2008), Regulation (EC) No 1272/2008 of the European Parliament and of the Council of 16 December 2008 on classification, labelling and packaging of substances and mixtures, amending and repealing Directives 67/548/EEC and 1999/45/EC, and amending Regulation (EC) No 1907/2006, Official Journal of the European Union L353, 1-1355 (Регламент (ЕС) № 1272/2008 Европейского парламента и Совета от 16 декабря 2008 г. по классификации, маркировке и упаковке веществ и смесей, вносящий изменения, отменяющий Директивы 67/548/ЕЕС и 1999/45/ЕС и вносящий изменения в Регламент (ЕС) № 1907/2006)

[3] U. S. EPA (1996), Label Review Manual: 2nd Edition, EPA737-B-96-001, Washington DC: U.S. Environmental Protection Agency (Аналитическое руководство по маркировке. — 2-е изд.)

[4] EC-ECVAM (2009), Statement on the scientific validity of cytotoxicity/cell-function based *in vitro* assays for eye irritation testing. Available under *Publications* at: [gost.e-ecolog.ru] (Заключение о научной обоснованности применения цитотоксических и функционально-клеточных методов исследования *in vitro* для проведения испытаний на раздражение глаз)

[5] Scott, L. et al. (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 программа проведения испытаний на раздражение глаз, позволяющая ограничить или исключить необходимость проведения исследований *in vivo* и предусматривающая реализацию восходящего и нисходящего подходов)

[6] OECD (2002), *Test No. 405: Acute Eye Irritation/Corrosion*, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing. doi: 10.1787/9789264070646-en (Острое раздражение/разъедание глаз. Руководство ОЭСР по проведению испытаний химических веществ)

[7] EC-ECVAM (1999), INVITOX Protocol 71: Fluorescein Leakage Test, Ispra, Italy: European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM). Available at: [gost.e-ecolog.ru] (Протокол INVITOX № 71. Метод определения проницаемости флуоресцеина)

[8] EC-ECVAM (2008), Fluorescein Leakage Assay Background Review Document as an Alternative Method for Eye Irritation Testing. Available under *Validation Study Documents*, Section *Eye Irritation* at: [gost.e-ecolog.ru htm] (Справочный обзорный документ по применению метода определения проницаемости флуоресцеина в качестве альтернативного метода при проведении испытаний на раздражение глаз)

[9] OECD (2005), *Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment*, OECD Series on Testing and Assessment No. 34. OECD, Paris. Available at: [http://gost.e-ecolog.ru] (Руководящий документ по валидации и международному признанию новых или актуализированных методов испытаний для оценки опасностей. Публикации по охране труда, окружающей среды и технике безопасности. Серия по испытаниям и оценке № 34)

[10] OECD (2017). Guidance Document on an Integrated Approaches 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 испытаниям и оценке серьезного повреждения и раздражения глаз. Серия по испытаниям и оценке № 263)

УДК 661:615.099:006.354 МКС 71.040.10; 13.020.01 MOD

Ключевые слова: химическая продукция, разъедание и раздражение глаз, токсическое воздействие на роговицу, раздражающая способность in vitro, проницаемость флуоресцеина

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

Сдано в набор 17.11.2023. Подписано в печать 04.12.2023. Формат 60×84⅛. Гарнитура Ариал.
Усл. печ. л. 2,79. Уч.-изд. л. 2,37.

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

gost.e-ecolog.ru