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

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

ГОСТ 34726— 2021

МЕТОДЫ ИСПЫТАНИЙ ПО ВОЗДЕЙСТВИЮ ХИМИЧЕСКОЙ ПРОДУКЦИИ НА ОРГАНИЗМ ЧЕЛОВЕКА

Метод исследований *in vitro* с применением кратковременной экспозиции для определения химической продукции, вызывающей серьезное повреждение глаз, и химической продукции, не требующей классификации опасности как вызывающей раздражение или серьезное повреждение глаз

(OECD 491:2020, Guidelines for the testing of chemicals. 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, 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 апреля 2021 г. № 139-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
Беларусь	BY	Госстандарт Республики Беларусь
Киргизия	KG	Кыргызстандарт
Россия	RU	Росстандарт
Таджикистан	TJ	Таджикстандарт
Узбекистан	UZ	Узстандарт

4 Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 16 ноября 2023 г. № 1412-ст межгосударственный стандарт ГОСТ 34726—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 491:2020 «Руководство по тестированию химической продукции. Метод исследований *in vitro* с применением кратковременной экспозиции для определения: 1) химической продукции, вызывающей серьезное повреждение глаз, и 2) химической продукции, не требующей классификации как вызывающей раздражение или серьезное повреждение глаз» («OECD Guidelines for the testing of chemicals. 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», MOD) путем изменения его структуры для приведения в соответствие с правилами, установленными в ГОСТ 1.5 (подразделы 4.2 и 4.3).

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

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 (Organisation for Economic Cooperation and Development)

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 4
4 Сущность метода испытаний 5
5 Подтверждение квалификации 6
6 Методика испытаний 7
6.1 Приготовление клеточного монослоя 7
6.2 Нанесение исследуемой химической продукции и контрольных веществ 8
6.3 Измерение жизнеспособности клеток 9
6.4 Интерпретация результатов и модель построения прогнозов 9
6.5 Критерии приемлемости 10
7 Данные и отчеты об испытаниях 11
7.1 Данные 11
7.2 Отчет об испытаниях 11
Приложение ДА (справочное) Сопоставление структуры настоящего стандарта со структурой примененного международного документа 13
Библиография 15

Введение

1 Метод кратковременной экспозиции (Short Time Exposure — STE) — это метод исследований *in vitro*, который при определенных условиях и с определенными ограничениями может быть применен для классификации химической продукции (чистых веществ и смесей), способной вызывать серьезное повреждение глаз, а также не требующей классификации опасности как вызывающей раздражение или серьезное повреждение глаз и ее маркировки в рамках Согласованной на глобальном уровне системы классификации и маркировки химической продукции (СГС) Организации Объединенных Наций [1].

2 На протяжении многих лет оценка потенциальной опасности химической продукции проводилась главным образом по результатам испытаний *in vivo*, проводимых на глазу кролика [8]. Общепризнано, что в обозримом будущем не следует ожидать появления одного-единственного альтернативного метода *in vitro,* который бы мог полностью заменить метод испытаний *in vitro* на глазу кролика, позволяющий прогнозировать весь диапазон серьезного повреждения/раздражения глаз, вызываемого химической продукцией различных классов. Тем не менее выверенное сочетание нескольких альтернативных методов испытаний, реализуемое в рамках единой (многоуровневой) стратегии исследования, вполне может оказаться способным полностью заменить собой метод испытаний на глазу кролика [2]. Предполагается, что применение нисходящего подхода уместно для случаев, когда из уже имеющейся информации химическая продукция, предположительно, должна обладать высокой раздражающей способностью или вызывать серьезные повреждения глаз. Восходящий подход, напротив, оправдан в ситуациях, когда способность этой химической продукции вызывать раздражение глаз согласно имеющейся информации в недостаточной степени выражена для присвоения ей конкретного класса опасности. При том что метод STE не следует рассматривать в качестве полной замены теста на глазу кролика, он может быть пригоден для применения в рамках многоуровневой стратегии исследования, основанной на нисходящем/восходящем подходе, в целях официальной классификации и маркировки химической продукции для определения без необходимости проведения дальнейших исследований: (1) химической продукции, вызывающей серьезное повреждение глаз (класс опасности 1 согласно СГС ООН), и (2) химической продукции (исключая всю твердую продукцию, кроме сурфактантов), не требующей классификации как вызывающей раздражение или серьезное повреждение глаз (класс опасности согласно СГС ООН отсутствует) [1], [2]. В то же время химическая продукция, для которой при применении метода STE не представляется возможным спрогнозировать ее принадлежность либо к продукции, вызывающей серьезное повреждение глаз (класс опасности 1 согласно СГС ООН), либо к продукции, для которой класс опасности согласно СГС ООН отсутствует (не вызывающей ни серьезного повреждения, ни раздражения глаз), подлежит обязательным дальнейшим исследованиям с целью окончательной и однозначной классификации.

Кроме того, применение метода STE в соответствии с восходящим подходом в рамках схем классификации, отличных от СГС ООН, должно быть согласовано с соответствующими регулирующими органами. Выбор наиболее подходящего метода испытаний, а также реализация положений метода настоящего стандарта должны осуществляться с учетом требований Руководящего документа по интегрированным подходам к исследованиям и оценке серьезного повреждения глаз и раздражения глаз [14].

Поправка к ГОСТ 34726—2021 Методы испытаний по воздействию химической продукции на организм человека. Метод исследований *in vitro* с применением кратковременной экспозиции для определения химической продукции, вызывающей серьезное повреждение глаз, и 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 № 6 2024 г.)

Поправка к ГОСТ 34726—2021 Методы испытаний по воздействию химической продукции на организм человека. Метод исследований *in vitro* с применением кратковременной экспозиции для определения химической продукции, вызывающей серьезное повреждение глаз, и химической продукции, не требующей классификации опасности как вызывающей раздражение или серьезное повреждение глаз

В каком месте	Напечатано	Должно быть		
Предисловие. Таблица согласования	—	Армения	AM	ЗАО «Национальный орган по стандартизации и метрологии» Республики Армения

(ИУС № 7 2024 г.)

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

МЕТОДЫ ИСПЫТАНИЙ ПО ВОЗДЕЙСТВИЮ ХИМИЧЕСКОЙ ПРОДУКЦИИ НА ОРГАНИЗМ ЧЕЛОВЕКА

Метод исследований *in vitro* с применением кратковременной экспозиции для определения химической продукции, вызывающей серьезное повреждение глаз, и химической продукции, не требующей классификации опасности как вызывающей раздражение или серьезное повреждение глаз

Methods for studying the effects of chemicals on the human body. Short time exposure in vitro test method for identifying chemicals inducing serious eye damage and chemicals not requiring hazard classification for eye irritation or serious eye damage

Дата введения — 2024—05—01

1 Область применения

1.1 Настоящий стандарт устанавливает метод для оценивания потенциальной опасности для глаз химической продукции исходя из ее способности вызывать цитотоксические последствия при кратковременной экспозиции (STE). Цитотоксическое воздействие химической продукции на эпителиальные клетки роговицы представляет собой важный механизм действия, приводящий к повреждению эпителия роговицы и развитию раздражения глаз. Жизнеспособность клеток по методу STE оценивают путем выполнения количественных определений экстрагируемой из клеток соли голубого формазана, которая продуцируется жизнеспособными клетками в процессе ферментативного преобразования витального красителя МТТ (3-(4,5-диметилтиазола-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия бромида), также известного как тиазолил синий тетразолия бромид [3]. Данные о жизнеспособности клеток, полученные после экспозиции в течение 5 мин, сравнивают с результатами, полученными для контрольной пробы растворителя (относительная жизнеспособность), для подготовки заключения о степени потенциальной опасности для глаз исследуемой химической продукции. Исследуемой химической продукции, наносимой в концентрациях 5 % и 0,05 %, присваивают класс опасности 1 согласно СГС ООН, если жизнеспособность клеток после контакта с ней в обоих случаях не превышает (≤)70 %. Если жизнеспособность клеток после воздействия химической продукцией в концентрации 5 % и 0,05 % превышает (>)70 %, при подготовке прогнозного заключения считают, что для такой продукции класс опасности согласно СГС ООН отсутствует.

1.2 Термин «исследуемая химическая продукция» в настоящем стандарте применяется для обозначения объекта исследований; использование данного термина не связано с возможностью применения метода STE для исследований тех или иных веществ и/или их смесей.

2 Термины, определения и сокращения

2.1 **вещество** (substance): Химические элементы и их соединения, представленные в естественном состоянии или полученные при выполнении производственного процесса, включая любые добавки, необходимые для сохранения стабильности продукта, а также любые примеси, наличие которых обусловлено применяемым процессом, но исключая любые растворители, удаление которых не сказывается на стабильности вещества или на его составе [1].

2.2 **восходящий подход** (Bottom-Up Approach): Поэтапный подход, применяемый при исследовании химической продукции, предположительно не требующей классификации как вызывающей раз-

Издание официальное

дражение 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).

2.3 **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.

2.4 **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.

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

2.6 **класс опасности 1 согласно СГС ООН** (UN GHS Category 1): См. термин «серьезные повреждения глаз».

2.7 **класс опасности 2 согласно СГС ООН** (UN GHS Category 2): См. термин «раздражение глаз».

2.8 **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».

2.9 **контрольная проба питательной среды** (medium control): Ничем не обработанная, используемая параллельно проба, включающая в себя все компоненты испытательной системы. Используется наряду с пробами, содержащими исследуемую химическую продукцию, а также другими контрольными пробами, служащими для выяснения того, взаимодействует ли используемый растворитель с испытательной системой.

2.10 **контрольная проба растворителя/вещества-носителя** (solvent/vehicle control): Ничем не обработанная проба, содержащая все компоненты испытательной системы, включая растворитель или вещество-носитель, и используемая наряду с пробами, содержащими исследуемую химическую продукцию, и другими контрольными пробами для определения базового отклика для образцов, обработанных исследуемой химической продукцией, разведенной в том же растворителе или веществе-носителе. При параллельном использовании с контрольной пробой питательной среды также позволяет выяснить, взаимодействует ли растворитель или вещество-носитель с испытательной системой.

2.11 **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.

2.12 **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 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.

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

2.14 **надежность** (reliability): Показатель того, что метод испытаний может быть реализован с получением воспроизводимых результатов в рамках одной или различных лабораторий в течение продолжительного времени при применении одного и того же протокола. Он оценивается путем вычисления внутри- и межлабораторной воспроизводимости и внутрилабораторной повторяемости [13].

2.15 **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).

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

2.17 **оптическая плотность; ОП** (optical density; OD).

2.18 **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.

2.19 **положительная контрольная проба** (positive control): Используемая параллельно проба, содержащая все компоненты испытательной 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.

2.20 **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].

2.21 **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 [10].

2.22 **Согласованная на глобальном уровне система классификации и маркировки химической продукции (ООН); СГС** (Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (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 сотрудников, работников, перевозчиков, потребителей и представителей аварийных служб) и окружающей среды [1].

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

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

2.25 **сурфактант** (surfactant): Известен также как поверхностно-активное вещество, представляет собой вещество, например моющее средство, способное уменьшать поверхностное натяжение жидкости, позволяя ей пениться или проникать в твердые частицы; также может называться смачивающим агентом.

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» (concordance) для указания доли корректных результатов, полученных с применением соответствующего метода испытаний [13].

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

2.28 **эталонное вещество** (benchmark substance): Химическая продукция, используемая как эталон для сравнения с исследуемой химической продукцией. Эталонное вещество должно (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.

2.29 **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.

3 Исходные положения

3.1 Требования настоящего стандарта базируются на пунктах протокола, разработанного компанией Kao Corporation [4], который был объектом двух отдельных валидационных исследований: одно из них было организовано Комитетом по валидации Японского общества по альтернативным решениям взамен тестирования на животных (Japanese Society for Alternative to Animal Experiments — JSAAE) [5], а другое — Японским центром по валидации альтернативных методов (Japanese Center for the Validation of Alternative Methods — JaCVAM) [6]. Соответствующая экспертная оценка метода STE была дана NICEATM/ICCVAM на основе полученных отчетов о проведении валидационных исследований и справочных обзорных документов о методе испытаний [7].

3.2 При определении химической продукции (веществ и смесей), вызывающей серьезное повреждение глаз (класс опасности 1 согласно СГС ООН [1]), данные, полученные при применении метода STE для 125 наименований химической продукции (включающей как вещества, так и смеси), подтвердили общую точность прогнозирования на уровне 83 % (104/125), долю ложноположительных заключений на уровне 1 % (1/86) и долю ложноотрицательных заключений на уровне 51 % (20/39) относительно результатов теста на глазу кролика *in vivo* [7]. Доля ложноотрицательных заключений в данном случае не имеет решающего значения, так как вся исследуемая химическая продукция, воздействие которой приводит к снижению жизнеспособности клеток ≤70 % при 5 %-ной концентрации и >70 % при 0,05 %-ной концентрации (см. таблицу 2), должна подвергаться дальнейшим исследованиям с применением других, надлежащим образом валидированных методов *in vitro* либо, при отсутствии иного выбора, испытаниям на глазу кролика *in vivo*, в зависимости от конкретных действующих нормативных требований и в соответствии с последовательной исследовательской стратегией, а также рекомендованными в настоящее время подходами, ориентированными на оценку по совокупности полученных свидетельств [1], [8]. Испытаниям в основном подвергались однокомпонентные вещества; что касается испытаний смесей веществ, то для них было получено лишь ограниченное количество необходимых данных. Тем не менее с технической точки зрения данный метод можно считать пригодным для испытаний многокомпонентных веществ и смесей. При рассмотрении результатов испытаний 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 таком случае следует уточнять, в какой мере данные результаты могут быть научно обоснованными. В остальном применение метода STE не характеризуется какими-либо специфическими сложностями при определении химической продукции класса опасности 1 согласно СГС ООН. Исследователи могут считать, применяя данный метод для исследуемой химической продукции, что снижение жизнеспособности клеток до уровня ≤70 % при значениях ее концентрации 5 % и 0,05 % должно признаваться убедительным свидетельством способности исследуемой химической продукции вызывать серьезные повреждения глаз и отнесения ее к классу опасности 1 согласно СГС ООН без необходимости проведения дальнейших испытаний.

3.3 При определении химической продукции (веществ и смесей), не требующей классификации как вызывающей раздражение или серьезное повреждение глаз (т. е. класс опасности согласно СГС ООН отсутствует), данные, полученные с применением метода STE для 130 наименований химической продукции (включающей как вещества, так и смеси), подтвердили общую точность прогнозирования на уровне 85 % (110/130), долю ложноотрицательных заключений на уровне 12 % (9/73) и долю ложноположительных заключений на уровне 19 % (11/57) относительно результатов тестирования на глазу кролика *in vivo* [7]. Если из данных исключить результаты, полученные для веществ с высокой летучестью (т. е. со значением давления насыщенных паров >6 кПа) и твердых веществ, не являющихся сурфактантами, то общая точность прогнозирования возрастает до 90 % (92/102), доля ложноотрицательных заключений уменьшается до 2 % (1/54), а доля ложноположительных составляет все те же 19 % (9/48) [7]. Как показали дальнейшие исследования, корректные результаты при испытаниях веществ с высокой летучестью могут быть получены при условии использования минерального масла вместо физиологического раствора в качестве растворителя [15]. В этом случае точность прогнозирования при применении метода STE для веществ с высокой летучестью (со значением давления насыщенных паров >6 кПа) находится на уровне 95 % (19/20), доля ложноотрицательных заключений

составляет 0 % (0/7), а доля ложноположительных заключений — 8 % (1/13). Таким образом, потенциальным недостатком метода STE при его применении для определения химической продукции, не требующей классификации как вызывающей раздражение и серьезное повреждение глаз (класс опасности согласно СГС ООН отсутствует), может считаться высокая доля отрицательных заключений для твердой продукции (веществ и смесей), не являющейся сурфактантом, или смесей, состоящих только из сурфактантов. Такая химическая продукция должна быть исключена из области применения метода STE [7]. Соответственно, исследуемая химическая продукция, чувствительная к гидролизу, по возможности должна испытываться с соблюдением условий, снижающих вероятность их гидролиза, для исключения получения ложноотрицательных результатов.

3.4 Помимо сведений о химической продукции, упомянутых в 3.2 и 3.3, данные, собранные при применении метода STE, включали также внутрилабораторные данные для 40 смесей, полученные относительно результатов при выполнении теста Дрейза на раздражение глаз *in vivo,* которые подтвердили общую точность прогнозирования на уровне 88 % (35/40), долю ложноположительных заключений на уровне 50 % (5/10) и долю ложноотрицательных заключений на уровне 0 % (0/30) для смесей, не требующих классификации опасности в рамках СГС ООН [9]. Применение метода STE вследствие этого является допустимым для определения смесей, не требующих классификации опасности согласно СГС ООН, в соответствии с восходящим походом, за исключением твердых смесей, которые состоят только из сурфактантов, что расширяет его ограничения в отношении твердых веществ. Кроме того, в область применения метода настоящего стандарта в настоящее время не включены смеси, содержащие летучие вещества, давление насыщенных паров которых превышает 6 кПа, а также смеси, не способные растворяться в минеральном масле или образовывать в нем суспензию, устойчивую не менее 5 мин, поскольку для них могут быть получены ложноотрицательные заключения.

3.5 Метод STE не должен применяться для присвоения исследуемой химической продукции класса опасности 2, подкласса опасности 2A (раздражение глаз) или подкласса опасности 2B (слабое раздражение глаз) согласно СГС ООН ввиду значительного количества химической продукции класса опасности 1 согласно СГС ООН, неверно отнесенной к более низкому классу опасности 2 (подклассу опасности 2A или 2B), а также продукции, класс опасности для которой согласно СГС ООН отсутствует, но которая неверно отнесена к более высокому классу опасности 2 (подклассу опасности 2A или 2B) согласно СГС ООН [7]. В данном случае может быть оправданным проведение дальнейших исследований с применением другого подходящего метода.

3.6 Метод STE пригоден для исследований химической продукции, которая растворяется или образует однородную суспензию, сохраняющуюся в течение не менее 5 мин в физиологическом растворе, в физиологическом растворе с добавлением 5 % диметилсульфоксида (ДМСО) либо в минеральном масле (подробнее о выборе растворителя см. 6.2.1). Метод STE не пригоден для исследований нерастворимой химической продукции, продукции, не способной образовывать однородную суспензию, сохраняющуюся в течение не менее 5 мин в физиологическом растворе, в физиологическом растворе с добавлением 5 % диметилсульфоксида (ДМСО) либо в минеральном масле. Использование минерального масла в методе настоящего стандарта считается возможным в силу короткого времени экспозиции. Таким образом, метод STE позволяет прогнозировать потенциальную степень опасности для глаз нерастворимой в воде химической продукции (например, длинноцепочечных жирных спиртов или кетонов) при условии, что она может смешиваться с каким-либо из трех упомянутых выше растворителей [4].

4 Сущность метода испытаний

4.1 Метод STE представляет собой основанный на оценке цитотоксичности метод *in vitro*, который осуществляется на конфлюэнтном (слитном) монослое клеточной линии роговицы кролика, выведенной Институтом сывороток Статенса (Statens Seruminstitut Rabbit Cornea — SIRC) и культивируемой на поликарбонатных 96-луночных микротитровальных планшетах [4]. После пятиминутной экспозиции исследуемой химической продукцией в концентрации 5 % и 0,05 % цитотоксичность определяют как относительное значение жизнеспособности клеток SIRC путем испытаний с использованием МТТ [4]. Сведения о снижении жизнеспособности клеток затем используют при построении прогноза о потенциальных негативных последствиях, приводящих к повреждению глаз.

4.2 Установлено, что 80 % раствора, закапываемого в глаз кролика, выводится из конъюнктивального мешка в течение от трех до четырех минут, тогда как в аналогичной ситуации с человеческим глазом время выведения более чем 80 % раствора составляет от одной до двух минут [10]. Метод STE

представляет собой попытку приблизить эти временные промежутки экспозиции и использует цитотоксичность в качестве конечной точки для оценки степени повреждения клеток SIRC после пятиминутной экспозиции исследуемой химической продукцией.

5 Подтверждение квалификации

До того как приступить к регулярному применению метода STE, лаборатории должны подтвердить свою техническую компетентность, правильно определив принадлежность одиннадцати специально отобранных веществ, перечисленных в таблице 1. Эти вещества были отобраны таким образом, чтобы они представляли весь спектр степеней опасности серьезного повреждения глаз или раздражающего воздействия на глаза, определенных на основе результатов испытаний *in vivo* на глазу кролика [8] и отраженных в градации классов опасности согласно СГС ООН [1]. Дополнительными критериями, которые учитывались при отборе, были их доступность для коммерческого приобретения, а также наличие для них как достоверных справочных данных, полученных *in vivo*, так и достоверных данных, полученных *in vitro*, с применением метода STE [3]. В случаях, когда лаборатория не располагает веществом, приведенным в перечне, а также при наличии иных уважительных причин вместо него допускается использовать другое вещество, для которого имеются соответствующие справочные данные по испытаниям *in vivo* и *in vitro*, при условии, что при его выборе применялись критерии, описанные выше.

Таблица 1 — Перечень веществ для проверки квалификации

Вещество	Регистрационный номер CAS*	Класс химических веществ[1)]	Агрегатное состояние	Класс опасности согласно СГС ООН по итогам исследований *in vivo*[2)]	Растворитель, применяемый в методе STE	Класс опасности согласно СГС ООН при применении метода STE
Бензалкония хлорид (10 %-ный водный раствор)	8001-54-5	Ониевые соединения	Жидкое	Класс опасности 1	Физиологический раствор	Класс опасности 1
Тритон X-100 (100 %)	9002-93-1	Эфиры	Жидкое	Класс опасности 1	Физиологический раствор	Класс опасности 1
Кислотный красный 92	18472-87-2	Гетероциклические соединения; соединения брома; соединения хлора	Твердое	Класс опасности 1	Физиологический раствор	Класс опасности 1
Натрия гидроксид	1310-73-2	Щелочи; неорганические химические вещества	Твердое	Класс опасности 1[3)]	Физиологический раствор	Класс опасности 1
Бутиролактон	96-48-0	Лактоны; гетероциклические соединения	Жидкое	Подкласс опасности 2A	Физиологический раствор	Прогнозирование на основании имеющихся данных не представляется возможным
1-октанол	111-87-5	Спирты	Жидкое	Подкласс опасности 2A/2B[4)]	Минеральное масло	Прогнозирование на основании имеющихся данных не представляется возможным
Циклопентанол	96-41-3	Спирты; углеводороды циклические	Жидкое	Подкласс опасности 2A/2B[5)]	Физиологический раствор	Прогнозирование на основании имеющихся данных не представляется возможным

Окончание таблицы 1

Вещество	Регистрационный номер CAS*	Класс химических веществ[1)]	Агрегатное состояние	Класс опасности согласно СГС ООН по итогам исследований *in vivo*[2)]	Растворитель, применяемый в методе STE	Класс опасности согласно СГС ООН при применении метода STE
2-этокси-этилацетат	111-15-9	Спирты; эфиры	Жидкое	Класс опасности отсутствует	Физиологический раствор	Класс опасности отсутствует
Додекан	112-40-3	Углеводороды ациклические	Жидкое	Класс опасности отсутствует	Минеральное масло	Класс опасности отсутствует
Метилизобутилкетон	108-10-1	Кетон	Жидкое	Класс опасности отсутствует	Минеральное масло	Класс опасности отсутствует
Глицерин	56-81-5	Спирт	Жидкое	Класс опасности отсутствует	Физиологический раствор	Класс опасности отсутствует

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

[1)] Классы химическим веществам присвоены на основе информации, взятой из предшествующих публикаций NICEATM, а при ее отсутствии — на основе схемы классификации Национальной медицинской библиотеки США, принятой для медицинских предметных заголовков (Medicine Medical Subject Headings — MeSH®) (с использованием инструмента ChemIDplus® [Национальная медицинская библиотека], доступного по адресу http://chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/) и структурных определений, подготовленных NICEATM.

[2)] На основе результатов испытаний на глазу кролика *in vivo* [8] с учетом СГС ООН [1].

[3)] Класс опасности 1 присвоен на основе имеющихся данных о разъедающей способности при воздействии на кожу 100 %-ного гидроксида натрия (вещества, вызывающего разъедание кожи согласно перечню веществ для проверки квалификации, приведенному в [16]) и критериев определения класса опасности 1 в рамках системы СГС ООН [1].

[4)] Присвоение подклассов опасности 2А или 2В зависит от интерпретации критериев согласно СГС ООН для различения 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 2 из 6 или у 4 из 6 подопытных животных. Данные, полученные *in vivo*, включают в себя результаты 2 исследований, в каждом из которых было задействовано по 3 животных. Если в первом случае последствия на 7-й день по-прежнему наблюдались у двух из трех животных, что является основанием для присвоения веществу подкласса опасности 2А [11], в другом — все показатели у всех трех животных к 7-му дню успели вернуться к норме, что является основанием для присвоения ему подкласса опасности 2В [12].

[5)] Присвоение подкласса опасности 2А или 2В зависит от интерпретации критериев согласно СГС ООН для различения 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 1 из 3 или у 2 из 3 подопытных животных. Исследованиям *in vivo* подвергались 3 животных. Все показатели помимо помутнения роговицы и покраснения конъюнктивы у одного из животных вернулись к норме на 7-й день или ранее. Единственному животному, которое не смогло полностью восстановиться за 7 дней, был присвоен 1 балл по помутнению роговицы и 1 балл по покраснению конъюнктивы (на 7-й день), которые окончательно исчезли на 14-й день [11].

6 Методика испытаний

6.1 Приготовление клеточного монослоя

6.1.1 Для проведения исследований по методу STE должна использоваться культивированная линия клеток роговицы глаз кролика SIRC. Рекомендуется, чтобы источником клеток SIRC был проверенный банк клеток, такой как, например, Американская коллекция типовых культур CCL60.

6.1.2 Клетки SIRC культивируют при температуре 37 °С в увлажненной газообразной среде с 5 % CO_2 во флаконе для культивирования с питательной средой, содержащей в своем составе минимальную эссенциальную среду Игла (MEM), обогащенную 10 % фетальной бычьей сыворотки (FBS), 2 ммоль L-глютамина, 50—100 ед./мл пенициллина и 50—100 мкг/мл стрептомицина. Конфлюэнтные

клетки в культуральной колбе следует отделять с использованием раствора трипсин-этилендиаминтетрауксусной кислоты, при помощи клеточного скребка или без него. Перед использованием для целей рутинных исследований имеющиеся клетки предварительно размножают (например, выполняют от 2 до 3 пересевов) во флаконе для культивирования, общее количество пересевов после оттаивания исходного клеточного материала при этом не должно превышать 25.

6.1.3 Клетки, готовые для применения в методе STE, затем приготавливают с соответствующей плотностью распределения и высевают в 96-луночные планшеты. Рекомендуемая плотность посева клеток при объеме клеточной культуры 200 мкл составляет $6,0 \times 10^3$ на лунку, если их планируется использовать спустя четыре дня после посева, либо $3,0 \times 10^3$ на лунку, если их планируется использовать спустя пять дней после посева. Клетки, используемые в методе STE, посеянные с соответствующей плотностью в культуральную среду, достигают более 80 % слияния во время исследования, т. е. через четыре или пять дней после посева.

6.2 Нанесение исследуемой химической продукции и контрольных веществ

6.2.1 Растворителем, который в первую очередь следует выбирать для приготовления растворов или суспензий исследуемой химической продукции, является физиологический раствор.

Если известно, что исследуемая химическая продукция обладает низкой растворимостью, либо при использовании физиологического раствора не может быть получен ее раствор или однородная суспензия, устойчивость которой сохраняется не менее 5 мин, в качестве второго альтернативного растворителя для их приготовления необходимо рассматривать 5%-ный раствор ДМСО (CAS № 67-68-5) в физиологическом растворе. Если раствор или однородная суспензия, сохраняющаяся в течение не менее 5 мин, для исследуемой химической продукции не могут быть приготовлены при помощи 5 %-ного раствора ДМСО (CAS № 67-68-5) в физиологическом растворе, третьим альтернативным растворителем является минеральное масло. Для высоколетучей исследуемой химической продукции (т. е. со значением давления насыщенных паров свыше 6 кПа) в качестве растворителя следует использовать минеральное масло, при условии что данная продукция способна растворяться в нем или образовывать устойчивую суспензию, сохраняющуюся в течение не менее 5 мин.

6.2.2 В выбранном растворителе исследуемую химическую продукцию растворяют или приготавливают однородную суспензию с концентрацией 5 % (по массе), после чего путем последовательного 10-кратного разбавления доводят концентрацию до 0,5 % и 0,05 %. Каждую исследуемую химическую продукцию испытывают при концентрации раствора или суспензии 5 % и 0,05 %. Клетки, выращенные на 96-луночных планшетах, подвергают воздействию раствора (суспензии) исследуемой химической продукции с концентрацией 5 % или 0,05 % из расчета 200 мкл на ячейку в течение 5 мин при комнатной температуре. Исследуемую химическую продукцию (однокомпонентные вещества, многокомпонентные вещества или смеси) рассматривают как чистые вещества, приготавливают их растворы или суспензии, как указано выше, независимо от их чистоты.

6.2.3 Питательную среду, указанную в 6.1.2, используют в качестве соответствующей контрольной пробы для каждого планшета при каждом повторении. Помимо этого клетки на каждом планшете и при каждом повторении обрабатывают контрольными пробами выбранного растворителя. Отсутствие нежелательного влияния растворителей, перечисленных в 6.2.1, на жизнеспособность клеток SIRC подтверждено предшествующими испытаниями.

6.2.4 При проведении исследований по методу STE в качестве положительной контрольной пробы для каждого планшета при каждом повторении используют 0,01 %-ный раствор натрия лаурилсульфата (ЛСН) в физиологическом растворе. С целью вычисления жизнеспособности клеток после воздействия положительной контрольной пробой в каждый планшет при каждом повторении следует вливать контрольную пробу ее растворителя — физиологического раствора.

6.2.5 Холостой опыт необходим для оценки величины компенсирующей поправки на оптическую плотность, его следует выполнять на лунках с питательной средой или фосфатно-солевым буферным раствором (ФБС), не содержащим кальций и магний или клетки.

6.2.6 Каждую пробу (исследуемую химическую продукцию с концентрацией 5 % и 0,05 %, контрольную пробу питательной среды, контрольную пробу растворителя, а также положительную контрольную пробу) следует испытывать на трех образцах в каждом повторении, подвергая клетки воздействию соответствующей исследуемой или контрольной продукции в количестве 200 мкл в течение 5 мин при комнатной температуре.

6.2.7 Эталонные химические вещества целесообразно использовать для оценки раздражающей способности глаз неизвестной химической продукции, представляющей определенный класс химической продукции, или для оценки относительной раздражающей способности глаз в пределах определенного диапазона раздражающего воздействия.

6.3 Измерение жизнеспособности клеток

По окончании экспозиции клетки промывают дважды, используя 200 мкл ФБС, и добавляют 200 мкл раствора МТТ (0,5 мг МТТ/мл питательной среды). После двухчасовой реакции в инкубаторе (37 °С, 5 % CO_2) раствор МТТ удаляют и экстрагируют МТТ-формазан, добавляя 200 мкл раствора 0,04 н. соляной кислоты в изопропаноле и выдерживая его в течение 60 мин в темном месте при комнатной температуре, а затем измеряют поглощение света раствором МТТ-формазана при длине волны 570 нм с помощью планшетного ридера. Помехи при проведении испытаний с использованием МТТ, связанные с особенностями исследуемой химической продукции (обладающей окраской или способной непосредственно восстанавливать МТТ), возможны лишь в том случае, если после промывки, следующей за экспозицией, все еще остается значительное количество исследуемой продукции. Хотя это часто имеет место при проведении испытаний с использованием трехмерных структур реконструированной роговицы человеческого глаза или реконструированного эпидермиса человека, в случае с двухмерными структурами клеточных культур при применении метода STE возникновение таких помех маловероятно. Тем не менее, поскольку остаточные количества продукции, обладающей окраской или способной непосредственно восстанавливать МТТ, могут мешать измерениям оптической плотности, пользователи метода STE должны с осторожностью подходить к интерпретации полученных результатов. Если результаты испытаний позволяют спрогнозировать принадлежность химической продукции к классу опасности 1, никакие дальнейшие действия по оцениванию потенциального влияния помех не требуются. По возможности должны быть собраны данные, подтверждающие возможность появления помех в действительности (например, путем сопоставления результатов измерений ОП при проведении испытаний с использованием МТТ для лунок, обработанных исследуемой продукцией и содержащих клетки SIRC, и лунок, обработанных исследуемой продукцией, но не содержащих таких клеток). Если установлено, что помехи при проведении испытаний с использованием МТТ оказывают влияние на получаемые результаты, вместо него могут применяться другие альтернативные методы цитологического анализа (например, с использованием нейтрального красного красителя) при условии получения с их помощью результатов, аналогичных результатам при выполнении испытаний с использованием МТТ, например путем испытаний веществ для проверки квалификации согласно таблице 1 и при наличии данных прошлых наблюдений, соответствующих сопоставимым критериям приемлемости, полученным для серии испытаний (см. 6.5).

6.4 Интерпретация результатов и модель построения прогнозов

6.4.1 Значения оптической плотности (ОП), полученные для каждой исследуемой химической продукции, должны использоваться для вычисления жизнеспособности клеток относительно результата, полученного для контрольной пробы растворителя и принятого равным 100 %. Относительная жизнеспособность клеток выражается в процентах и вычисляется путем деления значения ОП для исследуемой химической продукции на значение ОП для контрольной пробы растворителя после вычитания из них значения ОП для холостой пробы по формуле 1.

$$\text{Жизнеспособность клеток (\%)} = \frac{(\text{ОП}_{570}\ \text{исследуемой химической продукции}) - (\text{ОП}_{570}\ \text{холостой пробы})}{(\text{ОП}_{570}\ \text{контрольной пробы растворителя}) - (\text{ОП}_{570}\ \text{холостой пробы})} \cdot 100. \quad (1)$$

Аналогично относительная жизнеспособность клеток для каждой контрольной пробы растворителя выражается в процентах и вычисляется путем деления значения ОП для каждой контрольной пробы растворителя на значение ОП для контрольной пробы питательной среды после вычитания из них значения ОП для холостой пробы.

6.4.2 Всего следует выполнить три независимых повторения, по три параллельно обрабатываемые лунки в каждом (таким образом, n = 9). Среднее арифметическое значение жизнеспособности клеток в трех лунках для каждой исследуемой химической продукции и контрольной пробы растворителя в каждом независимом повторении используют для вычисления среднего арифметического значения относительной жизнеспособности клеток. Окончательное арифметическое среднее значение жизнеспособности клеток вычисляют по данным трех независимых повторений.

6.4.3 Предельные значения жизнеспособности клеток для идентификации исследуемой химической продукции, вызывающей серьезное повреждение глаз (класс опасности 1 согласно СГС ООН), и химической продукции, не требующей классификации как вызывающей раздражение или серьезное повреждение глаз (класс опасности согласно СГС ООН отсутствует), приведены в таблице 2.

Таблица 2 — Модель построения прогнозов для метода исследования STE

Жизнеспособность клеток		Класс опасности согласно СГС ООН	Применимость
При 5 %-ной концентрации	При 0,05 %-ной концентрации		
>70 %	>70 %	Класс опасности отсутствует	Вещества и смеси[1)], за исключением твердой продукции (веществ и смесей), не являющейся сурфактантом, и смеси, состоящей только из сурфактантов
≤70 %	>70 %	Прогнозирование на основании имеющихся данных не представляется возможным[2)]	Не применимо
≤70 %	≤70 %	Класс опасности 1	Вещества и смеси[3)]

[1)] Смеси, содержащие химическую продукцию, давление насыщенных паров которой превышает 6 кПа, а также продукцию, нерастворимую в минеральном масле или способную образовывать устойчивую суспензию, в настоящее время не входят в область применения метода настоящего стандарта с учетом вероятного получения заниженной оценки их опасности.

[2)] На основе этого результата невозможно сделать самостоятельный прогноз. Результат, полученный при применении метода STE для целей классификации, следует рассматривать в контексте IATA [14].

[3)] На основе результатов, полученных в основном для однокомпонентных веществ; для смесей было собрано лишь ограниченное количество необходимых данных. Тем не менее с технической точки зрения данный метод является пригодным для исследования многокомпонентных веществ и смесей. Перед использованием метода настоящего стандарта для исследований смесей с целью получения данных, применяемых в сфере технического регулирования, следует изучить вопрос, может ли (а если может, то почему) его применение обеспечить достижение приемлемых с точки зрения поставленной цели результатов. Изучение данного вопроса не требуется, если необходимость испытаний соответствующей смеси установлена действующими требованиями.

6.5 Критерии приемлемости

Результаты испытаний считают приемлемыми при соблюдении следующих критериев:

a) Оптическая плотность для контрольной пробы питательной среды (находящейся в условиях воздействия питательной среды) должна составлять 0,3 или более после вычитания значения оптической плотности для холостой пробы.

b) Значение жизнеспособности клеток после обработки контрольной пробой растворителя должно составлять 80 % или более относительно полученного значения для контрольной пробы питательной среды. Если в каждом повторении используется несколько контрольных проб растворителей, значение жизнеспособности клеток, которое получают при использовании такой контрольной пробы, должно превышать 80 % для признания удовлетворяющими требованиям результатов испытаний химической продукции, с которой использовались эти растворители.

c) Значение жизнеспособности клеток, полученное после обработки положительной контрольной пробой (0,01 % SLS), должно находиться в пределах удвоенного стандартного отклонения среднего значения по данным предшествующих наблюдений. Верхнее и нижнее значения границ приемлемости для положительной контрольной пробы следует часто обновлять, желательно через каждые три месяца либо каждый раз при приемлемом проведении испытания, если испытания в лаборатории проводятся не регулярно (т. е. реже одного раза в месяц). Если лаборатория не проводит достаточное количество испытаний для обеспечения статистически робастного распределения результатов испытаний положительной контрольной пробы, допускается использовать значения верхней и нижней границ приемлемости, установленные разработчиком метода, а именно 21,1 % и 62,3 % согласно данным наблюдений в его собственной лаборатории, с установлением в дальнейшем распределения для внутреннего использования после проведения регулярных испытаний.

Если любой из приведенных выше критериев, a), b) или c), не соблюдается, то в этом случае следует предусмотреть выполнение дополнительного повторения.

d) Стандартное отклонение (СО) окончательного значения жизнеспособности клеток относительно значений, полученных для трех независимых повторений, должно быть менее 15 % как для 5 %-ной, так и для 0,05 %-ной концентрации исследуемой химической продукции. Если значение СО составляет 15 % или более, то использоваться такие результаты испытаний не должны, и следует выполнить еще три повторения.

7 Данные и отчеты об испытаниях

7.1 Данные

В качестве результатов испытаний приводят данные по каждой отдельной ячейке (т. е. значения жизнеспособности клеток) в каждом повторении, окончательное среднее арифметическое значение жизнеспособности клеток, значение стандартного отклонения (СО), а также сведения о классификации.

7.2 Отчет об испытаниях

Отчет об испытаниях должен включать в себя следующую информацию:

- Исследуемая химическая продукция:

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

- многокомпонентное вещество, вещество с неопределенным или переменным составом (UVCB) или смесь: как можно более полное описание веществ, например, все доступные идентификационные данные (см. выше), сведения о степени чистоты, о количественных долях и соответствующих физико-химических характеристиках его составляющих;

- агрегатное состояние, летучесть, показатель pH, значение LogP, молекулярная масса, класс химических веществ, а также по возможности другие значимые физико-химические характеристики;

- 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;

- сведения о растворимости или способности образовывать устойчивую суспензию, сохраняющуюся в течение не менее 5 мин в выбранном растворителе.

- Условия и процедуры метода испытаний:

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

- описание применявшегося метода;

- сведения об использованной линии клеток, источнике ее получения, конфлюэнтности клеток, задействованных в испытаниях;

- подробное описание применяемой методики испытаний;

- сведения о количестве повторений и числе параллельно обрабатывавшихся образцов;

- использованные значения концентрации исследуемой химической продукции (если отличаются от рекомендованных);

- обоснование выбора растворителя для каждой исследуемой химической продукции;

- продолжительность экспозиции исследуемой химической продукцией (если отличается от рекомендованной);

- описание любых изменений, внесенных в методику испытаний;

- описание применявшихся критериев оценки и принятия решений;

- сведения о среднем арифметическом значении для положительной контрольной пробы и СО по данным предшествующих наблюдений;

- подтверждение достаточной компетентности лаборатории для выполнения метода исследований перед началом его регулярного применения (например, путем проведения испытаний специально отобранных для этого химических веществ) или подтверждение воспроизводимости результатов испытаний за известный период времени.

- Результаты:

- для каждой исследуемой химической продукции и каждой ее концентрации, а также каждого контрольного вещества представление в табличном виде индивидуальных значений ОП для параллельно используемых лунок, средних арифметических значений ОП по каждому независимому повторению, значений жизнеспособности клеток (в процентах) по каждому независимому повторению, а также окончательное среднее арифметическое значение жизнеспособности клеток (в процентах) и СО по данным трех повторений;

- результаты для питательной среды, растворителя и положительной контрольной пробы, подтверждающие соответствие критериям приемлемости;

- описание прочих явлений, наблюдавшихся в ходе испытаний, включая неполное удаление видимых остатков окрашенной и/или способной непосредственно восстанавливать МТТ исследуемой химической продукции после промывки, следующей за экспозицией;

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

Рассмотрение результатов.

Выводы.

Приложение ДА
(справочное)

Сопоставление структуры настоящего стандарта со структурой примененного международного документа

Таблица ДА.1

Структура настоящего стандарта			Структура международного документа	
Разделы	Пункты	Перечисления	Пункты	Перечисления
Введение			1, 2	—
1	1.1	—	3	—
	1.2	—	4, 11	—
2	—	—		—
	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	—

Окончание таблицы ДА.1

Структура настоящего стандарта			Структура международного документа	
Разделы	Пункты	Перечисления	Пункты	Перечисления
	2.27	—	Приложение 1	—
	2.28	—	Приложение 1	—
	2.29	—	Приложение 1	—
3	3.1	—	5	—
	3.2	—	6	—
	3.3	—	7	—
	3.4	—	8	—
	3.5	—	9	—
	3.6	—	10	—
4	4.1	—	11	—
	4.2	—	12	—
5		—	13	—
6	6.1.1	—	14	—
	6.1.2	—	15	—
	6.1.3	—	16	—
	6.2.1	—	17	—
	6.2.2	—	18	—
	6.2.3	—	19	—
	6.2.4	—	20	—
	6.2.5	—	21	—
	6.2.6	—	22	—
	6.2.7	—	23	—
	6.3	—	24	—
	6.4.1	—	25	—
	6.4.2	—	26	—
	6.4.3	—	27	—
	6.5	—	28	—
7	7.1	—	29	—
	7.2	—	30	—
Библиография			Литература	

Библиография

[1] United Nations UN (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Fifth revised edition. New York & Geneva: United Nations Publications. ISBN: 978-92-1-117006-1. Available at: [gost.e-ecolog.ru] (Согласованная на Глобальном уровне Система классификации и маркировки химической продукции (СГС) Организации Объединенных Наций. Пятое, пересмотренное издание)

[2] 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 стратегия проведения испытаний на раздражение глаз, позволяющая ограничить или исключить необходимость проведения исследований in vivo и предусматривающая реализацию восходящего и нисходящего подходов)

[3] 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 7 видов анализа пролиферации и анализа на цитотоксичность)

[4] Takahashi Y, et al. (2008). Development of the Short Time Exposure (STE) Test: an In Vitro Eye Irritation Test Using SIRC Cells. Toxicol. In Vitro 22,760—770 (Разработка метода исследований с применением кратковременной экспозиции (STE). Испытания на раздражение глаз in vitro с использованием клеток SIRC)

[5] Sakaguchi H, et al. (2011). Validation Study of the Short Time Exposure (STE) Test to Assess the Eye Irritation Potential of Chemicals. Toxicol. In Vitro 25,796—809 (Валидационные исследования метода кратковременной экспозиции (STE) для оценивания потенциальной способности химической продукции вызывать раздражение глаз)

[6] Kojima H, et al. (2013). Second-Phase Validation of Short Time Exposure Tests for Assessment of Eye Irritation Potency of Chemicals. Toxicol. In Vitro 27, pp. 1855—1869 (Второй этап валидации метода кратковременной экспозиции для оценивания потенциальной способности химической продукции вызывать раздражение глаз)

[7] ICCVAM (2013). Short Time Exposure (STE) Test Method Summary Review Document, NIH. Available at: [http://gost.e-ecolog.ru] (Метод исследования с применением кратковременной экспозиции (STE). Итоговый обзорный документ)

[8] OECD (2012). Test Guideline for Testing of Chemicals (No.405): Acute Eye Irritation/Corrosion. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris (Руководство по проведению испытаний химической продукции. (№ 405). Острое раздражение/разъедание глаз)

[9] Saito K, et al. (2015). Predictive Performance of the Short Time Exposure Test for Identifying Eye Irritation Potential of Chemical Mixtures (Прогнозная результативность метода кратковременной экспозиции для определения потенциальной способности смесей химических веществ вызывать раздражение глаз)

[10] Mikkelson TJ, Chrai SS and Robinson JR. (1973). Altered Bioavailability of Drugs in the Eye Due to Drug-Protein Interaction. J. Pharm. Sci. 1648—1653 (Подвергнутая изменениям биодоступность лекарственных средств при попадании в глаза с учетом взаимодействия лекарственных средств с белками)

[11] ECETOC. (1998). Eye Irritation Reference Chemicals Data Bank. Technical Report (No. 48. (2)), Brussels, Belgium (Банк данных эталонной химической продукции, вызывающей раздражение глаз)

[12] Gautheron P, et al. (1992). Bovine Corneal Opacity and Permeability Test: an In Vitro Assay of Ocular Irritancy. Fundam Appl Toxicol. 18, 442—449 (Исследование помутнения и проницаемости роговицы глаз крупного рогатого скота: анализ in vitro способности вызывать раздражение глаз)

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

[14] OECD (2018). 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, Organization for Economic Cooperation and Development, Paris (Руководство по интегрированным подходам к испытаниям и оценке серьезного повреждения глаз и раздражения глаз. Серия по испытаниям и оценке № 263)

[15] Abo T, et al. (2018). Expansion of the applicability domain for highly volatile substances on the Short Time Exposure test method and the predictive performance in assessing eye irritation potential. J. Toxicol. Sci., 43, 407—422 (Расширение области применения метода кратковременной экспозиции для высоколетучих веществ и прогнозная результативность оценки потенциальной способности вызывать раздражение глаз)

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

УДК 661:615,099:006.354 МКС 71.040.10, 13.020.01 MOD

Ключевые слова: химическая продукция, роговица глаза кролика, токсическое воздействие на роговицу, раздражающая способность *in vitro*

Редактор *Г.Н. Симонова*
Технический редактор *В.Н. Прусакова*
Корректор *Л.С. Лысенко*
Компьютерная верстка *Л.А. Круговой*

Сдано в набор 17.11.2023. Подписано в печать 08.12.2023. Формат 60×84⅛. Гарнитура Ариал.
Усл. печ. л. 2,79. Уч.-изд. л. 2,24.

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 34726—2021 Методы испытаний по воздействию химической продукции на организм человека. Метод исследований *in vitro* с применением кратковременной экспозиции для определения химической продукции, вызывающей серьезное повреждение глаз, и химической продукции, не требующей классификации опасности как вызывающей раздражение или серьезное повреждение глаз

В каком месте	Напечатано	Должно быть		
Предисловие. Таблица согласования	—	Армения	AM	ЗАО «Национальный орган по стандартизации и метрологии» Республики Армения

(ИУС № 7 2024 г.)

Поправка к ГОСТ 34726—2021 Методы испытаний по воздействию химической продукции на организм человека. Метод исследований *in vitro* с применением кратковременной экспозиции для определения химической продукции, вызывающей серьезное повреждение глаз, и 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 № 6 2024 г.)

gost.e-ecolog.ru