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

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

ГОСТ ISO/TR 10993-33— 2018

ИЗДЕЛИЯ МЕДИЦИНСКИЕ. ОЦЕНКА БИОЛОГИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ МЕДИЦИНСКИХ ИЗДЕЛИЙ

Часть 33

Руководство по испытаниям на генотоксичность. Дополнение к ISO 10993-3

(ISO/TR 10993-33:2015,
Biological evaluation of medical devices — Part 33: Guidance on tests to evaluate genotoxicity — Supplement to ISO 10993-3,
IDT)

Издание официальное

Москва
Стандартинформ
2018

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

Цели, основные принципы и основной порядок проведения работ по межгосударственной стандартизации установлены в ГОСТ 1.0—2015 «Межгосударственная система стандартизации. Основные положения» и ГОСТ 1.2—2015 «Межгосударственная система стандартизации. Стандарты межгосударственные, правила и рекомендации по межгосударственной стандартизации. Правила разработки, принятия, обновления и отмены»

Сведения о стандарте

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

2 ВНЕСЕН Федеральным агентством по техническому регулированию и метрологии

3 ПРИНЯТ Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации (протокол от 30 августа 2018 г. № 111-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	Минэкономики Республики Армения
Беларусь	BY	Госстандарт Республики Беларусь
Киргизия	KG	Кыргызстандарт
Россия	RU	Росстандарт
Узбекистан	UZ	Узстандарт

4 Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 3 октября 2018 г. № 699-ст межгосударственный стандарт ГОСТ ISO/TR 10993-33—2018 введен в действие в качестве национального стандарта Российской Федерации с 1 июня 2019 г.

5 Настоящий стандарт идентичен международному документу ISO/TR 10993-33:2015 «Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 33. Руководство по исследованиям оценки генотоксичности. Дополнение к ISO 10993-3» («Biological evaluation of medical devices — Part 33: Guidance on tests to evaluate genotoxicity — Supplement to ISO10993-3», IDT).

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

6 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

*Информация об изменениях к настоящему стандарту публикуется в ежегодном информационном указателе «Национальные стандарты», а текст изменений и поправок — в ежемесячном информационном указателе «Национальные стандарты». В случае пересмотра (замены) или отмены настоящего стандарта соответствующее уведомление будет опубликовано в ежемесячном информационном указателе «Национальные стандарты». Соответствующая информация, уведомление и тексты размещаются также в информационной системе общего пользования — на официальном сайте Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии в сети Интернет (*gost.e-ecolog.ru

© ISO, 2015 — Все права сохраняются
© Стандартинформ, оформление, 2018

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 Выбор методов исследований . . . 1
3 Рекомендуемые методы исследования . . . 1
4 Методы *in vitro* для оценки генотоксичности . . . 2
5 Методы *in vivo* для оценки генотоксичности . . . 2
6 Метод оценки обратных мутаций на бактериях . . . 3
6.1 Общие положения . . . 3
6.2 Препараты . . . 3
6.2.1 Бактерии . . . 3
6.2.2 Среда . . . 3
6.2.3 Метаболическая активация . . . 4
6.2.4 Подготовка тестируемого образца . . . 4
6.3 Условия исследования . . . 4
6.3.1 Растворители . . . 4
6.3.2 Исследуемые концентрации . . . 4
6.3.3 Контроли . . . 5
6.4 Проведение исследования . . . 6
6.4.1 Обработка тестируемым образцом . . . 6
6.4.2 Инкубация . . . 7
6.4.3 Сбор данных . . . 7
6.5 Данные и отчетность . . . 7
6.5.1 Обработка результатов . . . 7
6.5.2 Оценка и интерпретация результатов . . . 7
6.5.3 Критерии обоснованного исследования . . . 8
6.5.4 Отчет об исследовании . . . 9
7 Метод оценки *in vitro* хромосомных аберраций на клетках млекопитающих . . . 10
7.1 Общие положения . . . 10
7.2 Препараты . . . 10
7.2.1 Клетки . . . 10
7.2.2 Среды и условия культивирования . . . 10
7.2.3 Приготовление культур . . . 10
7.2.4 Метаболическая активация . . . 10
7.2.5 Подготовка тестируемого образца . . . 10
7.3 Условия исследования . . . 11
7.3.1 Растворители . . . 11
7.3.2 Исследуемые концентрации . . . 11
7.3.3 Контроли . . . 12
7.4 Проведение исследования . . . 12
7.4.1 Инкубация с тестируемым образцом или экстрактом и период наблюдения . . . 12
7.4.2 Приготовление препаратов хромосом . . . 13
7.4.3 Анализ . . . 13
7.5 Данные и отчетность . . . 13
7.5.1 Обработка результатов . . . 13
7.5.2 Оценка и интерпретация результатов . . . 14
7.5.3 Отчет об исследовании . . . 14

8 Микроядерный тест *in vitro* на клетках млекопитающих 15
8.1 Общие положения 15
8.2 Препараты 16
8.2.1 Клетки 16
8.2.2 Среды и условия культивирования 16
8.2.3 Приготовление культур 16
8.2.4 Метаболическая активация 16
8.2.5 Применение цитохалазина В в качестве блокатора цитокинеза 16
8.2.6 Подготовка тестируемого образца 16
8.3 Условия исследования 17
8.3.1 Растворители 17
8.3.2 Исследуемые концентрации 17
8.3.3 Контроли 18
8.4 Проведение исследования 18
8.4.1 Инкубация с исследуемым образцом или экстрактом и период наблюдения 18
8.4.2 Сбор клеток и приготовление препаратов 19
8.4.3 Анализ 19
8.5 Данные и отчетность 20
8.5.1 Обработка результатов 20
8.5.2 Оценка и интерпретация результатов 20
8.5.3 Отчет об исследовании 20
9 Метод оценки *in vitro* генных мутаций на клетках млекопитающих с использованием клеток лимфомы (L5178Y) мышей 22
9.1 Общие положения 22
9.2 Препараты 22
9.2.1 Клетки 22
9.2.2 Среды и условия культивирования 22
9.2.3 Приготовление культур 22
9.2.4 Метаболическая активация 22
9.2.5 Подготовка исследуемого образца 23
9.3 Условия исследования 23
9.3.1 Растворитель/несущая среда 23
9.3.2 Исследуемые концентрации 23
9.3.3 Контроли 24
9.4 Проведение исследования 24
9.4.1 Общие положения 24
9.4.2 Обработка исследуемым образцом 26
9.4.3 Определение выживаемости, жизнеспособности и частоты мутаций 26
9.5 Данные и отчетность 26
9.5.1 Обработка результатов 26
9.5.2 Оценка и интерпретация результатов 27
10 Микроядерный тест *in vivo* на эритроцитах млекопитающих 29
10.1 Общие положения 29
10.2 Препараты 29
10.2.1 Выбор вида животных 29
10.2.2 Условия размещения и питания 29

10.2.3 Подготовка животных . . . 29
10.2.4 Подготовка исследуемого образца . . . 29
10.3 Условия исследования . . . 30
10.3.1 Растворитель/разбавитель . . . 30
10.3.2 Контроли . . . 30
10.4 Проведение исследования . . . 30
10.4.1 Количество и пол животных . . . 30
10.4.2 Дизайн эксперимента . . . 30
10.4.3 Исследование предельных значений . . . 31
10.4.4 Уровни доз . . . 31
10.4.5 Пути введения и уровни доз . . . 31
10.4.6 Препараты костного мозга/крови . . . 32
10.4.7 Анализ . . . 32
10.5 Данные и отчетность . . . 32
10.5.1 Оценка результатов . . . 32
10.5.2 Оценка и интерпретация результатов . . . 33
10.5.3 Отчет об исследовании . . . 33
11 Метод оценки хромосомных аберраций *in vivo* . . . 34
11.1 Общие положения . . . 34
11.2 Препараты . . . 34
11.2.1 Выбор вида животных . . . 34
11.2.2 Условия размещения и питания . . . 34
11.2.3 Подготовка животных . . . 34
11.2.4 Подготовка исследуемого образца . . . 34
11.3 Условия исследования . . . 35
11.3.1 Растворитель/разбавитель . . . 35
11.3.2 Контроли . . . 35
11.4 Проведение исследования . . . 35
11.4.1 Количество и пол животных . . . 35
11.4.2 Дизайн эксперимента . . . 35
11.4.3 Уровни доз . . . 36
11.4.4 Исследование предельных значений . . . 36
11.4.5 Уровни доз и способы их введения . . . 36
11.4.6 Забор костного мозга и приготовление гистологических препаратов . . . 36
11.4.7 Метафазный анализ . . . 37
11.5 Данные и отчетность . . . 37
11.5.1 Обработка результатов . . . 37
11.5.2 Оценка и интерпретация результатов . . . 37
11.5.3 Отчет об исследовании . . . 38
Библиография . . . 40

Введение

ISO (Международная организация по стандартизации) является Всемирной федерацией национальных органов по стандартизации (органов — членов ISO). Работу по подготовке международных стандартов проводят через ISO технические комитеты. Каждый комитет-член, заинтересованный в деятельности, для которой создан технический комитет, имеет право быть представленным в этом комитете. Международные организации, правительственные и неправительственные, имеющие связи с ISO, также принимают участие в работе. ISO тесно сотрудничает с Международной электротехнической комиссией (IEC) по всем вопросам электротехнической стандартизации.

Процедуры, примененные при разработке стандарта, а также процедуры, предназначенные для его дальнейшей поддержки, описаны в части 1 Директив ISO/IEC. В частности, нужно отметить необходимость различных критериев утверждения для различных типов документов ISO. Настоящий стандарт составлен в соответствии с редакционными правилами части 2 Директив ISO/IEC (gost.e-ecolog.ru directives). Необходимо обратить внимание на возможность того, что некоторые из элементов настоящего стандарта могут быть объектом патентных прав.

ISO не несет ответственности за идентификацию определенного или всех патентных прав. Подробности, касающиеся патентных прав и отмеченные при разработке настоящего стандарта, будут включены в предисловие и/или в список ISO полученных патентных заявлений (gost.e-ecolog.ru). Любая торговая марка, упомянутая в настоящем стандарте, является информацией, приведенной для удобства пользователей, и не носит рекламный характер. Разъяснение значений конкретных терминов ISO и выражений, связанных с оценкой соответствия, а также информация о приверженности ISO принципам ВТО по техническим барьерам в торговле (ТВТ) представлены в URL: gost.e-ecolog.ru org/foreword-supplementary-information.html. Настоящий стандарт подготовлен техническим комитетом ISO/TC 194.

В серию ISO 10993 входят следующие части под общим названием «Оценка биологического действия медицинских изделий»:

- часть 1 «Оценка и испытания в рамках процесса менеджмента риска»;
- часть 2 «Требования к охране здоровья животных»;
- часть 3 «Испытания на генотоксичность, канцерогенность и токсичность, влияющие на репродуктивность»;
- часть 4 «Выбор испытаний, относящихся к взаимодействию с кровью»;
- часть 5 «Испытания на цитотоксичность *in vitro*»;
- часть 6 «Испытания для определения локальных эффектов после имплантации»;
- часть 7 «Остатки при стерилизации этиленоксидом»;
- часть 9 «Структура идентификации и квантификации потенциальных продуктов разложения»;
- часть 10 «Пробы на раздражение и аллергическую реакцию кожи»;
- часть 11 «Исследования общетоксического действия»;
- часть 12 «Приготовление проб и стандартные образцы»;
- часть 13 «Идентификация и количественная оценка продуктов разложения в полимерных медицинских устройствах»;
- часть 14 «Идентификация и количественная оценка продуктов разложения керамики»;
- часть 15 «Идентификация и количественная оценка продуктов разложения металлов и сплавов»;
- часть 16 «Концепция токсикокинетических исследований продуктов разложения и выщелачиваемых веществ»;
- часть 17 «Установление допустимых пределов выщелачиваемых веществ»;
- часть 18 «Определение химических характеристик материалов»;
- часть 19 «Физико-химическая, морфологическая и топографическая характеристики материалов (технические требования)»;
- часть 20 «Принципы и методы иммунотоксикологических испытаний медицинских изделий (технические требования)»;
- часть 33 «Руководство по испытаниям на генотоксичность. Дополнение к ISO 10993-3» (Технический отчет — ТО).

Тесты по оценке генотоксичности предназначены для обнаружения соединений, которые индуцируют прямые или косвенные генетические повреждения путем различных механизмов. Эти тесты должны способствовать определению опасности появления генетических повреждений. Экспрессия генных мутаций, значительные повреждения хромосом, рекомбинация и изменения количества хромосом счи-

таются основными для наследственных эффектов и многостадийного канцерогенеза. Положительный результат оценки генотоксичности указывает на возможность выявления канцерогенного потенциала соединения. Так как связь между воздействием конкретных химических веществ и канцерогенезом для человека установлена, а для наследственных заболеваний сходную связь доказать сложно, исследования генотоксичности в основном использовали для прогнозирования канцерогенности. Тем не менее, так как мутации клеток зародышевой линии четко связаны с заболеваниями человека, подозрение, что соединение может индуцировать наследственные эффекты, считается таким же серьезным, как и подозрение, что соединение может индуцировать рак. Кроме того, результаты, полученные такими методами, могут быть полезны для интерпретации исследований канцерогенности.

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

ИЗДЕЛИЯ МЕДИЦИНСКИЕ. ОЦЕНКА БИОЛОГИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ МЕДИЦИНСКИХ ИЗДЕЛИЙ

Часть 33

Руководство по испытаниям на генотоксичность. Дополнение к ISO 10993-3

Medical devices. Biological evaluation of medical devices. Part 33. Guidance on tests to evaluate genotoxicity. Supplement to ISO 10993-3

Дата введения — 2019—06—01

1 Область применения

Настоящий стандарт (технический отчет — ТО) предназначен для предоставления информации, служащей основой при выборе тестов и руководства по проведению исследований ввиду явного различия во мнениях авторитетных органов на исследования генотоксичности.

2 Выбор методов исследований

Так как химические вещества могут индуцировать генетические повреждения различными механизмами, использование батареи тестов, выявляющих различные типы генетических повреждений, считается лучшей гарантией обнаружения генотоксической опасности. Выбранные методы обычно включают тесты для выявления точковых (генных) мутаций и хромосомных аберраций. Как бактериальные клетки, так и культивированные клетки млекопитающих используют для обнаружения генотоксических агентов. Иногда в систему тестов включают тесты *in vivo*. Эти тесты в некоторых случаях включают в первичную систему тестов или используют для уточнения результатов тестов *in vitro* (см. [13]).

3 Рекомендуемые методы исследования

Несмотря на некоторые различия в деталях, большинство регулирующих органов обычно рекомендуют одинаковые тесты оценки генотоксичности. Рекомендуемыми тестами являются следующие:

- тест обратных мутаций на бактериях (см. OECD 471 [1] и раздел 6);
- тест хромосомных аберраций *in vitro* на клетках млекопитающих (см. OECD 473 [2] и раздел 7);
- микроядерный тест *in vitro* на клетках млекопитающих (см. OECD 487 [6] и раздел 8);
- тест генных мутаций *in vitro* на клетках млекопитающих с использованием клеток лимфомы мышей (L5178Y) (см. OECD 475 [4] и раздел 9);
- микроядерный тест *in vivo* на эритроцитах млекопитающих (см. OECD 474 [3] и раздел 10);
- метод оценки хромосомных аберраций *in vivo* (см. OECD 475 [4] и раздел 11).

Для медицинских изделий при оценке генотоксичности, как правило, используют систему тестов. Согласно стратегии, изложенной в ISO 10993-3, она включает в себя следующие методы:

a) метод оценки генных мутаций на бактериях: метод оценки обратных мутаций на бактериях, OECD 471 [1], модифицированный для медицинских изделий, что позволяет, например, проводить исследование экстрактов из изделий (см. раздел 6); и/или

b) метод *in vitro* с цитогенетической оценкой хромосомных повреждений в клетках млекопитающих: метод оценки хромосомных аберраций в клетках млекопитающих *in vitro*, OECD 473 [2], модифицированный для медицинских изделий (см. раздел 7); или

Издание официальное

c) тест tk (thymidine kinase assay) *in vitro* с использованием клеток лимфомы мышей, OECD 476 [5], модифицированный для медицинских изделий (см. раздел 8), включая обнаружение малых (медленно растущих) и крупных колоний; или

d) микроядерный тест на клетках млекопитающих *in vitro* для оценки хромосомных повреждений и анеугенности, OECD 487, модифицированный для медицинских изделий (см. раздел 8).

Международная конференция по гармонизации технических требований для регистрации фармацевтических изделий для использования человеком (ICH) рекомендует систему из трех тестов, описанную в «ICH S2 (R1) Genotoxicity», которая по требованию отдельных регулирующих органов может быть обязательной для медицинских изделий.

4 Методы *in vitro* для оценки генотоксичности

Методы *in vitro* часто используют для определения потенциала химических веществ индуцировать генотоксичность. Применяют несколько методов, так как один выбранный метод не может обнаружить все известные генотоксиканты. Генотоксиканты часто приводят к различным эффектам (например, к крупным хромосомным перестройкам по сравнению с небольшими повреждениями, или к точковым мутациям, или к различию в специфической последовательности ДНК). Кроме того, индуцированные генетические повреждения отличаются различной репарацией ДНК. Батарея тестов ICH разработана для расширения возможностей обнаружения генотоксикантов. Несмотря на то что методы исследования генотоксичности *in vitro* могут быть признаны чрезмерно чувствительными, их используют для обнаружения большинства генотоксичных канцерогенов грызунов. Сравнения «оценочных листов» исследования генотоксичности с исследованием канцерогенности веществ для грызунов показали наличие нескольких «ложноположительных» результатов (то есть обнаружение агентов, не являющихся канцерогенами грызунов). Тем не менее неясно, является ли исследование канцерогенности на грызунах более надежным методом, чем оценка непосредственно генотоксичности.

Недавние работы определили два новых класса лекарственных средств, вызывающих повреждение ДНК путем взаимодействия с топоизомеразами. Они приводят к значительному количеству ложноположительных результатов *in vitro* (см. [29]). В последующих работах представлена гораздо более низкая процентная доля необъяснимых положительных результатов *in vitro* относительно лекарственных средств (см. [16]). Вся информация, подтверждающая возможность на основе оценки генотоксичности прогнозировать канцерогенность и мутагенность половых клеток, получена в результате анализа промышленно выпускаемых химических веществ и лекарственных средств. Исследование медицинских изделий, как правило, включает применение экстрактов, которые часто содержат сложные смеси химических веществ. В настоящее время на экстрактах из изделий, содержащих неизвестные на данный момент вещества, получено небольшое количество положительных результатов.

5 Методы *in vivo* для оценки генотоксичности

Методы исследования генотоксичности *in vivo* являются неотъемлемой частью системы тестов ICH и применяются для повышения весомости доказательства при оценке лекарственных средств. Эти методы необходимы для доказательства того, что химическое вещество или его метаболит достигли органа-мишени. В отношении медицинских изделий выполнение последнего требования представляется достаточно сложным ввиду того, что обычно исследуют сложные смеси, а доза агента или агентов в экстрактах может быть ниже уровня чувствительности системы методов.

Метод оценки хромосомных повреждений *in vivo* с использованием гемопоэтических клеток грызунов включен в батарею тестов для обеспечения дополнительных факторов (абсорбции, распределения, метаболизма, выделения), которые могут повлиять на генетическую активность химических веществ (см. [14]). Существует также небольшое количество генотоксичных канцерогенов, которые достоверно обнаруживаются при использовании тестов оценки хромосомных повреждений в клетках костного мозга *in vivo*, представляющих отрицательные/слабые/противоречивые результаты в исследованиях двумя независимыми методами *in vitro*, полученные в различных вариантах стандартной системы тестов (например, в тесте оценки обратных мутаций на бактериях и в одном из методов цитогенетической оценки хромосомных повреждений или в тесте оценки мутаций у бактерий плюс тест tk на клетках лимфомы мышей). Некоторые промышленные химические канцерогены, такие как уретан и бензол, относятся к этой категории (см. [31]). Ценность включения методов *in vivo* в первичную оценку генотоксичности

признают спорной. Ограниченная чувствительность исследований *in vivo* к выявлению значительного числа канцерогенов (см. [10] и [27]) может служить аргументом против их применения. Тем не менее тот факт, что небольшая группа биологически активных соединений, являющихся известными или потенциальными канцерогенами человека, не может быть легко обнаружена методами *in vitro* (см. [26]), свидетельствует о необходимости использования методов *in vivo* в тех случаях, когда степень воздействия биологически активных составляющих медицинского изделия указывает на необходимость получения более надежной гарантии.

6 Метод оценки обратных мутаций на бактериях

6.1 Общие положения

Метод оценки обратных мутаций на бактериях адаптирован для медицинских изделий путем использования OECD 471 [1]. Для оценки генотоксического потенциала медицинских изделий в тест-системах могут быть применены материалы, входящие в состав медицинских изделий, экстракты или экстрагированные и выпаренные осадки.

При использовании двух экстрактов генотоксический потенциал каждого экстракта должен быть оценен в соответствии с данным разделом.

Суспензии бактериальных клеток инкубируют с исследуемым образцом в присутствии и в отсутствие экзогенной системы метаболической активации. При стандартном методе внесения образца в чашку Петри (In the plate incorporation method) полученную суспензию смешивают с верхним слоем агара и немедленно выливают на чашку с минимальной средой. При предынкубационном варианте метода исследуемую смесь предварительно инкубируют с суспензией бактерий, затем смешивают с верхним слоем агара и выливают в минимальную среду. При обоих вариантах метода после 48 или 72 ч инкубации подсчитывают колонии ревертантов и сравнивают с количеством спонтанных колоний ревертантов в контрольных чашках с растворителем.

6.2 Препараты

6.2.1 Бактерии

Необходимо использовать культуры бактерий позднего экспоненциального роста или ранней стабильной фазы роста (примерно 10^9 клеток/мл). Рекомендуемая температура при культивировании составляет 37 °С.

Рекомендуемой комбинацией штаммов является

- *S. typhimurium* TA1535, и
- *S. typhimurium* TA1537, или TA97, или TA97a, и
- *S. typhimurium* TA98, и
- *S. typhimurium* TA100, и
- *E. coli WP2 uvrA,* или *E. coli WP2 uvrA* (pKM101), или *S. typhimurium* TA102.

Необходимо использовать стандартные процедуры для приготовления, хранения и проверки генотипов исходных штаммов.

Потребность в аминокислоте для роста следует проверять при каждом приготовлении замороженной исходной культуры (гистидин для штаммов *S. Typhimurium* и триптофан для штаммов *E. coli*).

Должны быть проверены следующие фенотипические характеристики:

a) наличие или отсутствие плазмид R-фактора, где необходима устойчивость:
   1) к ампициллину для штаммов TA98, TA100 и TA97a или TA97 и WP2 *uvrA* (pKM101),
   2) к ампициллину + тетрациклину для штамма TA102;

b) наличие характерных мутаций:
   1) мутация rfa в *S. typhimurium* по чувствительности к кристаллическому фиолетовому,
   2) мутация *uvrA* в *E. coli* или мутация *uvr B* в *S. typhimurium* по чувствительности к ультрафиолетовому свету.

Также для каждого штамма необходимо определить количество спонтанных колоний ревертантов на чашку; он должен быть в пределах колебаний показателя, ожидаемого по имеющейся базе контрольных данных лаборатории, и желательно в пределах колебания показателя по данным литературы.

6.2.2 Среда

Используют подходящий минимальный агар (т. е. содержащий Фогеля-Боннера минимальную среду Е и глюкозу) с поверхностным слоем, содержащим гистидин и биотинил или триптофан, обеспечивающие небольшое число клеточных делений.

6.2.3 Метаболическая активация

Исследуемый образец должен воздействовать на бактерии как в присутствии, так и в отсутствие системы метаболической активации. Наиболее часто используемой системой является дополненная кофактором постмитохондриальная фракция S9, приготовленная из печени грызунов, обработанных фермент-индуцирующими агентами, такими как Ароклор 1254 или комбинация фенобарбитона и ß-нафтофлавона. Постмитохондриальную фракцию обычно используют при концентрациях в диапазоне от 5 % до 10 % объемной доли в смеси S9.

Поставщики и информация о контроле качества S9 (т. е. метод приготовления, линия грызунов, концентрация индуктора Р450 и т. д.) должны быть отражены документально. Если S9 получен непосредственно в лаборатории, то источник и метод подготовки должны быть отражены документально. Таким образом, активность S9 должна быть проверена при использовании двух эталонных промутагенов для определенного штамма (например, *S. typhimurium* TA100) и сравнена с историческим контролем.

Концентрация гомогената S9 должна быть выражена в единицах активности на чашку, так как разные поставщики могут изготовлять S9 по-разному, например: использовать разные кофакторы в смеси S9, разное соотношение ткани и гомогенизирующей жидкости во время приготовления S9.

Должны быть выбраны буфер и концентрации компонентов.

Простое исключение компонента смеси S9 в верхнем слое агара не рекомендуется в отсутствие системы метаболической активации, так как различающиеся объемы поверхностного агара изменят воспринимаемую дозу соединения (по крайней мере, изначально, в зависимости от растворимости и/или диффузии в базальный агар). Смесь S9 должна быть заменена подходящим буфером.

6.2.4 Подготовка тестируемого образца

Выбор процедуры подготовки образца любого медицинского изделия должен учитывать химический состав и физико-химические свойства материала или материалов, используемых в медицинском изделии. При приготовлении образца необходимо руководствоваться ISO 10993-12. Дополнительная информация приведена в приложении A ISO 10993-3:

- медицинские изделия или материалы, которые могут быть растворены или суспендированы в растворителе, могут быть дозированы напрямую для анализа (см. приложение A, метод A ISO 10993-3);
- медицинские изделия или материалы, которые не растворимы в растворителе, могут быть испытаны с использованием экстрактов в качестве тестируемого образца. Выбор методов экстракции зависит от процентной доли экстрагируемых веществ, полученных из исследуемого образца (см. приложение A, методы B и C ISO 10993-3).

Исследуемые экстракты должны быть использованы в течение 24 ч после приготовления. Экстракты должны быть использованы по возможности незамедлительно после их приготовления для предотвращения адсорбции на стенки емкости для экстракции или других изменений в составе. Если экстракт хранится более 24 ч, необходимо подтвердить стабильность и гомогенность экстракта при условиях хранения.

6.3 Условия исследования

6.3.1 Растворители

Растворитель для исследования должен быть выбран в соответствии с ISO 10993-12 или приложением A ISO 10993-3 и быть совместимым, т. е. не должен влиять на выживаемость бактерий и активность S9. Обоснование выбора растворителя должно быть отражено документально. Если выбранный растворитель широко не применяют, необходимо представить доказательства/данные, демонстрирующие совместимость. Если используют малоизвестные растворители, их включение должно сопровождаться данными, указывающими на их совместимость.

6.3.2 Исследуемые концентрации

Значения максимальных исследуемых концентраций будут зависеть от растворимости и цитотоксичности исследуемого соединения или цитотоксичности экстракта исследуемого образца.

Выбор диапазона доз

Выбор диапазона доз может быть сделан до проведения основного исследования, если ожидается значительная цитотоксичность исследуемого образца, например цитотоксичность или подавление роста выше 50 %. Цитотоксичность может проявляться сокращением количества колоний ревертантов, подавлением или уменьшением роста клеток или снижением жизнеспособности культур. Цитотоксичность исследуемого образца может быть изменена в присутствии систем метаболической активации. Нерастворимость должна быть оценена как преципитация в конечной смеси при реальных условиях исследования и очевидна невооруженному глазу.

Исследование предельных доз

Для растворимых нецитотоксичных тестируемых компонентов (определенных в исследовании DRF) приемлемо единственное измерение при одной дозе, составляющей по меньшей мере 5 мг/чашка, или 5 мкл/чашка (см. приложение А, метод А или, если выполнимо, метод В ISO 10993-3), или 0,1 мл 100 %-ного (чистого) экстракта исследуемого образца (см. приложение А, метод С ISO 10993-3). Для исследуемых образцов, приготовленных следуя руководству, предоставленному в ISO 10993-12, в большинстве ситуаций исследование наивысшей дозы с использованием 100 %-ного экстракта исследуемого образца является приемлемым и исследование других доз необязательным.

Исследование основной дозы

Если исследуемый образец демонстрирует видимые признаки преципитации или уже является цитотоксичным ниже уровня дозы 5 мг/чашка или 5 мкл/чашка, или 100 %-ного экстракта исследуемого образца, необходимо проводить полное исследование по меньшей мере с пятью разными концентрациями исследуемого образца. Для цитотоксичных соединений/экстрактов исследуемого образца уровни доз для ревертантной частоты должны покрывать диапазон от максимальной до небольшой цитотоксичности или ее отсутствия. Для нецитотоксичных веществ, которые не растворимы при 5 мг/чашка или 5 мкл/чашка, одна или более из исследуемых концентраций должны быть нерастворимыми при окончательном тестировании. Преципитат не должен мешать подсчету.

При определении наибольшего количества исследуемого образца следует учитывать такие критерии, как цитотоксичность и растворимость смеси на завершающей стадии обработки. Полезно определить токсичность и нерастворимость в предварительном исследовании. Цитотоксичность может проявляться сокращением количества колоний ревертантов, подавлением или уменьшением фонового роста клеток или снижением жизнеспособности культур. Цитотоксичность исследуемого образца может быть изменена в присутствии системы метаболической активации. Нерастворимость должна быть оценена как преципитация конечной смеси при реальных условиях исследования и очевидна невооруженному глазу. Рекомендуемая максимальная исследуемая концентрация будет зависеть от выбранного метода приготовления исследуемого образца:

a) для растворимых нецитотоксичных исследуемых образцов (см. приложение А, метод А, ISO 10993-3) рекомендуемая максимальная исследуемая концентрация составляет 5 мг/чашка или 5 мкл/чашка. Для нецитотоксичных исследуемых образцов, которые не растворимы при 5 мг/чашка или 5 мкл/чашка (в случае жидких химических веществ), одна или более из исследуемых концентраций окончательного образца должны быть нерастворимыми. Исследуемые образцы, являющиеся цитотоксичными в дозах менее 5 мг/чашку или 5 мкл/чашку (в случае жидких химических веществ), следует тестировать в концентрациях ниже цитотоксичной. Преципитат не должен мешать подсчету;

b) для тестируемых образцов в соответствии с приложением А, метод В, ISO 10993-3 рекомендуемая максимальная исследуемая концентрация составляет 5 мг/чашка, если это выполнимо. Для нецитотоксичных тестируемых образцов, которые не растворимы при концентрации 5 мг/чашка, одна или более из исследуемых концентраций должны быть нерастворимыми в окончательном образце. Преципитат не должен мешать подсчету. Тестируемые образцы, являющиеся цитотоксичными ниже уровня дозы 5 мг/чашка, должны исследоваться в концентрациях ниже цитотоксичной;

c) для тестируемых образцов в соответствии с приложением А, метод С, ISO 10993-3 рекомендуемой максимальной исследуемой концентрацией является 100 %-ный экстракт исследуемого образца.

Если наблюдается преципитат или исследуемый образец цитотоксичен, необходимо использовать по меньшей мере пять разных анализируемых концентраций тестируемого образца. Для предварительных исследований могут быть полезны исследуемые концентрации с использованием интервалов, для которых логарифм отношения соседних значений равен 0,5. Меньшие интервалы могут быть приемлемы при проведении последующих исследований. Если тестируемый образец растворим и не цитотоксичен, приемлема единственная максимальная концентрация.

6.3.3 Контроли

Соответствующие положительные и отрицательные (растворитель/среда) контроли (с метаболической активацией и без нее) должны быть включены для каждого штамма. Кроме групп воздействия тестируемого образца должны быть группы положительного и отрицательного контроля, идентичные основным группам. Подсчет жизнеспособных колоний бактерий в исходной культуре должен быть продемонстрирован и отражен документально как часть исследования каждой пробы. Индуцированные уровни мутаций с эталонным мутагеном должны быть в диапазоне значений, описанном в научной литературе. При анализах с использованием системы метаболической активации эталонное(ые) вещество(а) положительного контроля должно(ы) быть выбрано(ы) с учетом используемого штамма

бактерий. Следующие химические вещества служат примерами подходящих положительных контролей для проб с метаболической активацией:

- 9,10-диметилантрацен [номер CAS781-43-1];
- 7,12-диметилбензантрацен [номер CAS 57-97-6];
- Конго красный [номер CAS 573-58-0] (для метода редуктивной метаболической активации);
- бензо(а)пирен [номер CAS50-32-8];
- циклофосфамид (моногидрат) [номер CAS 50-18-0 (номер CAS 6055-19-2)];
- 2-аминоантрацен [номер CAS613-13-8].

2-аминоантрацен не должен быть использован как единственный индикатор эффективности смеси S9. Если используется 2-аминоантрацен, каждая партия S9 должна также быть охарактеризована мутагеном, требующим метаболической активации микросомальными ферментами, например бензо(а)пиреном, диметилбензантраценом.

Для проб, проведенных без системы метаболической активации, примеры положительных контролей, специфичных для конкретных штаммов, приведены в таблице 1.

Таблица 1 — Примеры положительных контролей для конкретных штаммов

Химическое вещество	Номер CAS	Штамм
Азид натрия	26628-22-8	TA1535 и TA100
2-нитрофлуорен	607-57-8	TA98
9-аминоакридин или ICR191	17070-45-0 90-45-9	TA1537, TA97 и TA97a
Гидропероксид кумена или метилметансульфонат	80-15-9 66-27-3	TA102
Митомицин С	50-07-7	WP2 *uvrA* и TA102
N-этил-*N*'-нитро-*N*-нитрозогуанидин или 4-нитрохинолин 1-оксид или *N*-метил-*N*-нитро-*N*-нитрозогуанидин	4245-77-6 56-57-5 70-25-7	WP2, WP2 *uvrA* и WP2 *uvrA* (pKM101)
Фурилфурамид (AF-2)	3688-53-7	WP2 *uvrA* плазмид-содержащие штаммы
Примечание — Могут быть использованы другие подходящие эталонные вещества положительного контроля.		

6.4 Проведение исследования

6.4.1 Обработка тестируемым образцом

При методе внесения образца на чашку в варианте без системы метаболической активации смешивают 0,1 мл тестируемого образца, 0,1 мл свежей бактериальной культуры (содержащей по меньшей мере 10^8 жизнеспособных клеток) и 0,5 мл стерильного буфера с 2,0 мл агара. При анализе с системой метаболической активации смешивают 0,5 мл смеси с системой метаболической активации, содержащей адекватное количество постмитохондриальной фракции (в диапазоне от 5 % до 10 % объемного содержания в смеси метаболической активации) с агаром (2,0 мл) вместе с бактериями и исследуемым образцом/раствором. Содержимое каждой пробирки смешивают и выливают на поверхность чашки с минимальным агаром. Поверхность агара должна затвердеть перед инкубацией.

Для метода преинкубации тестируемый образец/раствор предварительно инкубируют с исследуемым штаммом (содержащим по меньшей мере 10^8 жизнеспособных клеток) и стерильным буфером или с системой метаболической активации (0,5 мл) в течение 20 мин или более при температуре 37 °С до смешивания с агаром и выливают на поверхность чашки с минимальным агаром. Как правило, 0,1 мл тестируемого образца или экстракта, 0,1 мл бактерий и 0,5 мл смеси S9 или стерильного раствора буфера смешивают с 2,0 мл агара. Пробирки должны быть аэрированы во время предварительной инкубации с помощью аппарата для встряхивания. Для адекватной оценки вариации следует использовать для каждого уровня доз по три чашки. Применение двух чашек приемлемо при соответствующем научном обосновании. Случайная потеря чашки не обязательно делает опыт недействительным.

Газообразные или летучие вещества должны быть исследованы подходящими методами, например с использованием герметичных емкостей.

При необходимости проведения количественных сравнений между экспериментами при наличии и отсутствии смеси S9 исследования должны проводить в течение одного дня.

Для исследований *in vitro* с наличием дополнительных подтверждающих этапов, таких как многократное повторение длительного эксперимента или исследования с использованием экзогенной системы метаболической активации и без нее, дальнейшее подтверждающее исследование не проводят при получении четко положительных или отрицательных результатов. Неоднозначные результаты могут потребовать повторных экспериментов, возможно, с модифицированным протоколом, таким как подходящий выбор исследуемых концентраций.

6.4.2 Инкубация

Все чашки в каждом эксперименте должны быть инкубированы при температуре 37 °С в течение от 48 до 72 ч. После инкубационного периода подсчитывают количество колоний ревертантов на чашку.

6.4.3 Сбор данных

Автоматизированные счетчики колоний должны быть откалиброваны путем сравнения с подсчетом колоний на тех же чашках вручную при диапазоне мутантных колоний от очень низкого до очень высокого и колоний различных размеров. Состояние бактериального фона оценивают на предмет токсичности экстракта исследуемого образца посредством лупы или темнопольного счетчика. Преципитат должен оцениваться визуальным осмотром без увеличения. Токсичность и степень преципитации должны подсчитываться относительно соответствующего бланка экстракции с использованием стандартизованного метода (например, таблица в конце документа).

6.5 Данные и отчетность

6.5.1 Обработка результатов

Результаты должны быть представлены как количество колоний ревертантов на чашку. Необходимо также определить количество колоний ревертантов на чашку в вариантах как с отрицательным контролем (контроль с растворителем и, если использован, необработанный контроль), так и с положительным контролем.

Количество колоний ревертантов на каждую чашку, среднее количество колоний ревертантов на чашку (из трех повторов) и стандартное отклонение должны быть указаны для каждой дозы тестируемого образца, положительного и отрицательного (необработанный и/или растворитель) контролей.

Для проб *in vitro* с дополнительными подтверждающими этапами, такими как многократное повторение длительного эксперимента или исследования с системой метаболической активации и без нее, дальнейший подтверждающий эксперимент не проводят при получении четко положительных или отрицательных результатов. Неоднозначные результаты могут потребовать повторных исследований, возможно, с модифицированным протоколом, таким как подходящий выбор исследуемых концентраций.

Для методов А и В приложения А ISO 10993-3 доза исследуемого вещества должна быть выражена как масса (на чашку или на миллилитр), а не объем.

6.5.2 Оценка и интерпретация результатов

Существуют различные критерии для определения положительного результата, такие как зависимое от концентрации увеличение эффекта в исследуемом диапазоне концентраций и/или воспроизводимое увеличение количества колоний ревертантов на чашку при одной или более концентрациях по меньшей мере на одном штамме с системой метаболической активации или без нее. Биологическая значимость результатов должна быть рассмотрена в первую очередь. Статистические методы могут быть использованы как вспомогательные при оценке результатов испытания. Исследуемое вещество, результаты для которого не соответствуют вышеупомянутым критериям, считается немутагенным в условиях проведения данного метода.

Хотя в большинстве экспериментов получают четко положительные или отрицательные результаты, в редких случаях совокупность данных не дает определенного заключения о мутагенной активности исследуемого образца. Результаты могут оставаться неоднозначными или сомнительными независимо от количества повторов эксперимента. Неоднозначным ответом является увеличение количества ревертантов, которое частично отвечает критерию положительной оценки. Это может быть увеличение, которое не отвечает указанному порогу. Ответ будет оценен как отрицательный, если он не является ни положительным, ни неоднозначным.

Положительные результаты в методе оценки обратных мутаций бактерий означают, что вещество индуцирует точковые мутации путем замены пар оснований или сдвига рамки считывания в геноме *Salmonella typhimurium* и/или *Escherichia coli*. Отрицательные результаты означают, что в условиях проведения данного метода исследуемый образец не является мутагенным для данных бактерий.

6.5.3 Критерии обоснованного исследования

Для того чтобы оценка мутагенности каждого исследуемого образца была признана валидизированной, необходимо соответствовать следующему критерию: все культуры стандартных штаммов *Salmonella*, рекомендуемые выше, должны продемонстрировать наличие специфических мутаций (rfa) и делеций в гене *uvrB*. Культуры стандартных штаммов TA98 и TA100 должны продемонстрировать наличие плазмидного R-фактора pKM101. Все культуры WP2 *uvrA* должны продемонстрировать чувствительность к ультрафиолету, вызванную мутацией *uvrA*. Все культуры должны продемонстрировать характерное среднее количество спонтанных ревертантов в бланках экстракции, например: TA98 от 10 до 50; TA100 от 80 до 240; TA1535 от 5 до 45; TA1537 от 3 до 21; WP2 *uvrA* от 10 до 60. Для того чтобы убедиться, что высеяно надлежащее количество бактерий, титры культуры стандартных штаммов должны быть выше или равняться $0,3 \cdot 10^9$ клеток/мл. Среднее значение количества ревертантов в каждом положительном контроле должно показывать значительное увеличение по сравнению со значением в соответствующем контроле растворителя и в диапазоне контроля, имеющимся в архиве данных лаборатории.

О токсичности судят по одному или двум критериям:

- снижение более 50 % с дозовой зависимостью среднего количества ревертантов на чашку по сравнению со средним соответствующим контролем;
- по крайней мере, умеренное сокращение спонтанного фона (см. код 3, 4 или 5 в таблице 2).

Таблица 2 — Спонтанный фон для метода бактериальных мутаций

Код	Описание	Характеристики
1	Нормальный	Отличается здоровым газоном микроколоний
2	Слегка сокращенный	Отличается заметным прореживанием газона микроколоний и, возможно, небольшим повышением размера микроколоний по сравнению с бланком экстракции
3	Умеренно сокращенный	Отличается отчетливым прореживанием газона микроколоний, приводящим к выраженному повышению размера микроколоний по сравнению с бланком экстракции
4	Чрезвычайно сокращенный	Отличается сильным прореживанием газона микроколоний, приводящим к повышению размера микроколоний по сравнению с бланком экстракции, так что газон микроколоний виден невооруженным глазом как изолированные колонии
5	Отсутствующий	Отличается полным отсутствием газона микроколоний в 90 % или более чашки
6[a)]	Затенен частицами	Фоновый газон бактерий не может быть точно оценен из-за микроскопических частиц исследуемого образца
7[a)]	Непрепятствующий преципитат	Отличается преципитатом в чашке, видным невооруженным глазом, но частицы преципитата, обнаруженные автоматизированным счетчиком колоний, составляют 10 % или менее от количества ревертантных колоний (например, три или менее частиц в чашке с 30 ревертантами)
8	Препятствующий преципитат	Отличается преципитатом в чашке, видимым невооруженным глазом, но частицы преципитата, обнаруженные автоматизированным счетчиком колоний, составляют более 10 % колоний ревертантов (например, более чем три частицы в чашке с 30 ревертантами)
[a)] Наноматериал или наночастицы не включены в определение преципитатов и частиц.		

6.5.4 Отчет об исследовании

Отчет об исследовании должен включать следующую информацию:

a) исследуемый образец:

1) исследуемые медицинское изделие, компоненты или материалы,

2) идентификационные данные и номер CAS, если известен,

3) физическая природа и чистота исследуемых материалов, если известны,

4) физико-химические свойства, релевантные к проведению исследования,

5) стабильность исследуемого образца, если известна,

6) данные о стерильности,

7) описание приготовления исследуемого образца, включая обоснование выбора метода, растворителя и условий приготовления образца,

8) описание физических характеристик исследуемого образца (например, прозрачность, цвет и наличие частиц),

9) информация по длительности измеренной экстракции и времени, прошедшего между приготовлением образца и использованием в исследовании,

10) метод приготовления исследуемого образца с обоснованием выбора используемого метода. При проведении метода B ISO 10993-3 необходимо включить процент осадка, определенный в предварительном эксперименте;

b) растворитель/разбавитель:

1) обоснование выбора растворителя/разбавителя,

2) растворимость и стабильность исследуемого образца в растворителе/разбавителе, если известны;

c) штаммы:

1) используемые штаммы,

2) количество клеток на культуру,

3) характеристики штамма;

d) условия исследования:

1) количество исследуемого образца на чашку (мг/чашку или мкл/чашку) с обоснованием выбора дозы и количества чашек на концентрацию,

2) используемая среда,

3) метод приготовления исследуемого образца с обоснованием выбора используемого метода. При проведении метода B ISO 10993-3 необходимо включить процент осадка, определенный в пилотном исследовании экстракции,

4) тип и состав системы метаболической активации, включая критерий приемлемости,

5) процедуры обработки;

e) результаты:

1) признаки токсичности,

2) признаки преципитата,

3) подсчеты по индивидуальным чашкам,

4) среднее число колоний ревертантов на чашку и стандартное отклонение,

5) данные «доза—ответ», если определяли,

6) статистический анализ, при наличии,

7) исторический отрицательный (растворитель/разбавитель) и положительный контроль с указанием диапазонов, средних значений и стандартных отклонений;

f) документально представленная информация о поставщике и о контроле качества S9 (например, метод приготовления, линия грызунов, концентрация индуктора P450 и т. д.). Если S9 получен в собственной лаборатории, то источник и метод приготовления должны быть отражены документально;

g) используемая в тесте концентрация S9;

h) документально зафиксированные результаты титров используемых штаммов;

i) внесение в протокол значения среднеквадратичных отклонений и обсуждение того, как они влияют на достоверность результатов исследования. Фиксирование отсутствия среднеквадратичных отклонений;

j) обсуждение результатов;

k) заключение.

7 Метод оценки *in vitro* хромосомных аберраций на клетках млекопитающих

7.1 Общие положения

Метод оценки хромосомных аберраций на клетках млекопитающих *in vitro* адаптирован для медицинских изделий путем использования OECD 473 [2]. В тест-системе для оценки генотоксичного потенциала медицинских изделий объектами тестирования могут быть материал медицинских изделий, экстракты или экстрагированные и выпаренные осадки.

При использовании двух экстрактов генотоксичный потенциал каждого экстракта должен быть оценен в соответствии с данным разделом.

Исследуют воздействие образца на клеточные культуры с использованием системы метаболической активации или без нее. Через заранее определенные интервалы времени (см. 7.4.1) после экспозиции клеточных культур с исследуемым образцом в культуру вносят вещество, блокирующее клеточный цикл на стадии метафазы (например, Colcemid® или колхицин). Затем клетки фиксируют, красят и анализируют под микроскопом для обнаружения хромосомных аберраций.

7.2 Препараты

7.2.1 Клетки

Могут быть использованы разнообразные клеточные линии, штаммы или первичные клеточные культуры, включая клетки человека (например, клеточные линии CHO, V79 и CHL китайского хомячка, лимфоциты периферической крови человека или других млекопитающих).

7.2.2 Среды и условия культивирования

В перевиваемых культурах необходимо использовать соответствующие культуральные среды и условия инкубации (посуда для культивирования, концентрация CO_2, температура и влажность). Выбранные клеточные линии и штаммы должны регулярно проверять на предмет стабильности модального числа хромосом и отсутствия контаминации микоплазмой. При изменении числа хромосом и наличии контаминации их нельзя использовать. Для клеток и условий их культивирования должна быть известна нормальная продолжительность клеточного цикла.

7.2.3 Приготовление культур

Установленные клеточные линии и штаммы

Клетки, полученные из исходных культур, высевают в культуральную среду до плотности, при которой культуры не достигают конфлюентности до времени сбора, и инкубируют при температуре 37 °С.

Лимфоциты

Цельную кровь, содержащую антикоагулянт (например, гепарин) или выделенные лимфоциты, полученные от здоровых доноров, добавляют к культуральной среде, содержащей митоген (например, фитогемагглютинин) и инкубируют при температуре 37 °С.

7.2.4 Метаболическая активация

Тестируемый образец должен воздействовать на клетки как в присутствии, так и в отсутствие соответствующей экзогенной системы метаболической активации. Наиболее часто используемой системой является дополненная кофактором постмитохондриальная фракция S9, приготовленная из печени грызунов, обработанных фермент-индуцирующими агентами, такими как Ароклор 1254 или комбинация фенобарбитона и ß-нафтофлавона. Постмитохондриальную фракцию используют при концентрациях в диапазоне от 1 % до 10 % объемной доли в конечной исследуемой среде. Состояние системы метаболической активации может зависеть от класса исследуемого химического вещества. В некоторых случаях может понадобиться использовать более чем одну концентрацию постмитохондриальной фракции.

Информация о поставщике и контроле качества S9 (т. е. метод приготовления, линия грызунов, концентрация индуктора P450, метаболическая активность и т. д.) должна быть отражена документально. Если S9 получен в собственной лаборатории, то источник и метод приготовления должны быть отражены документально, так как используются буфер и концентрация компонентов.

Простое исключение компонента S9 не рекомендуется, так как различающиеся объемы изменят исследуемую дозу соединения. Смесь S9 должна быть заменена на подходящий буфер.

7.2.5 Подготовка тестируемого образца

При выборе способа подготовки образца любого медицинского изделия следует учитывать химический состав и физико-химические свойства материала или материалов, используемых в меди-

цинском изделии. Руководство по приготовлению образца приведено в ISO 10993-12. Дополнительная информация содержится в приложении А ISO 10993-3:

- медицинские изделия или материалы, которые могут быть растворены или суспензированы в соответствующих растворителях, используются непосредственно в качестве тестируемых образцов (см. приложение А, метод А, ISO 10993-3);

- медицинские изделия или материалы, которые не растворимы в растворителях, могут быть испытаны с использованием экстрактов в качестве исследуемых образцов. Выбор методов экстракции зависит от процентной доли экстрагируемых веществ, полученных из исследуемого образца (см. приложение А, методы В и С, ISO 10993-3).

Исследуемые экстракты должны быть использованы в течение 24 ч после приготовления. Если экстракт хранится более 24 ч, необходимо подтвердить стабильность и гомогенность экстракта при данных условиях хранения.

7.3 Условия исследования

7.3.1 Растворители

Растворители для исследования должны быть выбраны в соответствии с ISO 10993-12 или приложением А ISO 10993-3 и не должны влиять на жизнеспособность клеток и активность S9, т. е. быть совместимыми. Если использованы малоизвестные растворители, их включение должно сопровождаться данными, указывающими на их совместимость.

7.3.2 Исследуемые концентрации

Учитываемыми критериями при определении максимальной концентрации являются цитотоксичность, растворимость в системе исследования и изменения в pH или осмолярность.

Рекомендуемая максимальная исследуемая концентрация будет зависеть от избранного метода приготовления тестируемого образца. Согласно ISO 10993-12 достаточно использования 100 %-ного экстракта тестируемого образца, и исследование других доз не является необходимым. В соответствии с приложением А ISO 10993-3 необходимо учитывать следующее:

a) для растворимых нецитотоксичных тестируемых образцов (см. приложение А, метод А, ISO 10993-3) рекомендуемая максимальная исследуемая концентрация составляет 5 мг/мл или 5 мкл/мл. Для нецитотоксичных тестируемых образцов, которые не растворимы при концентрации 5 мг/мл или 5 мкл/мл, одна или более из исследуемых концентраций должны быть нерастворимыми в окончательном образце. Тестируемые образцы, уже являющиеся цитотоксичными в дозах менее 5 мг/мл или 5 мкл/мл, должны быть исследованы в концентрациях менее цитотоксичной. Преципитат не должен мешать подсчету;

b) для тестируемых образцов в соответствии с приложением А, метод В, ISO 10993-3 рекомендуемая максимальная исследуемая концентрация составляет 5 мг/мл, если это выполнимо. Для нецитотоксичных исследуемых образцов, которые не растворимы в концентрации 5 мг/мл, одна или более из исследуемых концентраций должны быть нерастворимыми в окончательном образце. Исследуемые образцы, уже являющиеся цитотоксичными в концентрации менее 5 мг/мл, должны быть исследованы в концентрациях менее цитотоксичной. Преципитат не должен мешать подсчету;

c) для тестируемых образцов в соответствии с приложением А, метод С, ISO 10993-3 рекомендуемой максимальной исследуемой концентрацией является 100 %-ный экстракт образца. Для нецитотоксичных тестируемых образцов, которые не растворимы при 100 %, одна или более из исследуемых концентраций должны быть нерастворимыми в окончательном образце. Исследуемые образцы, уже являющиеся цитотоксичными в концентрациях менее чем 100 %, должны быть исследованы в концентрациях менее цитотоксичной.

Предпочтительна замена среды на свежую среду с экстрактом во избежание истощения питательных веществ.

Цитотоксичность следует определять в основном эксперименте как в присутствии метаболической активации, так и без нее, используя достоверные признаки целостности и роста клеток, такие как относительное повышение количества клеток (RICC) или относительное удвоение популяции (RPD), степень конфлюентности, количество жизнеспособных клеток или митотический индекс. Может быть полезным определение цитотоксичности и растворимости в предварительном эксперименте. При наличии цитотоксичности необходимо использовать по меньшей мере три анализируемые концентрации. Эти концентрации должны покрывать диапазон от максимальной до небольшой цитотоксичности или до ее отсутствия. Это означает, что интервал концентраций должен быть в промежутке между 2 и корнем квадратным из 10. На момент фиксации при максимальной концентрации должно быть значи-

тельное снижение удвоения популяции, количества клеток или митотического индекса (более чем на 50 % по отношению к отрицательному контролю/растворителю). Митотический индекс является только косвенным измерением цитотоксичных/цитостатических эффектов и зависит от времени после введения вещества в культуру. Однако митотический индекс приемлем для суспензионных культур, в которых другие измерения цитотоксичности могут быть затруднены и трудно определимы. Для относительно нецитотоксичных экстрактов чистые экстракты должны быть исследованы в концентрации 10 % (водные растворы) или 1,0 % (безводные/растворители) от объема культуры. Если культуральная среда используется в качестве среды экстракции, рекомендуемая максимальная исследуемая концентрация составляет 100 % экстракта тестируемого образца. Если культуральную среду без сыворотки используют в качестве полярного растворителя для экстракции, исследуемый экстракт исследуют в чистом виде после дополнения сывороткой перед введением клеток. Исследуемый экстракт в клеточной культуральной среде с сывороткой (как неполярный растворитель) исследуют как чистый экстракт. Тестируемые образцы, уже являющиеся цитотоксичными в концентрациях менее 100 %, должны быть исследованы в концентрации, индуцирующей цитотоксичность, требуемую для исследования.

Для относительно нецитотоксичных тестируемых образцов максимальная концентрация должна составлять 5 мкл/мл (в случае чистых жидких химических веществ), 5 мг/мл или 0,01 М в зависимости от того, что соответствует самой низкой концентрации. В таких случаях приемлема единственная максимальная концентрация.

Для относительно нерастворимых тестируемых образцов, которые нетоксичны при концентрациях менее чем нерастворимая концентрация, максимально используемой должна быть концентрация выше предела растворимости в конечной культуральной среде в окончательном образце. В отдельных случаях (например, когда токсичность наблюдается только при более высокой концентрации, чем минимальная нерастворимая концентрация), предпочтительно исследовать более чем одну концентрацию с видимым преципитатом. Полезно оценить растворимость в начале и в конце обработки, так как растворимость может меняться в течение воздействия в тест-системе из-за наличия клеток, S9, сыворотки и т. д. Нерастворимость может быть обнаружена невооруженным глазом. Преципитат не должен мешать анализу.

7.3.3 Контроли

Соответствующие положительные и отрицательные (растворитель или разбавитель) контроли как с метаболической активацией, так и без нее должны быть включены в каждый эксперимент. В варианте с метаболической активацией вещество положительного контроля должно проявлять мутагенный эффект. В качестве положительного следует применять кластоген в концентрации, при которой имеется воспроизводимое и значимое повышение эффекта над контролем, чтобы охарактеризовать чувствительность тест-системы. Концентрации положительного контроля следует подбирать таким образом, чтобы был четкий эффект, но в то же время чтобы его уровень не позволял исследователю определить зашифрованный препарат.

Примеры веществ положительного контроля включают следующие:

a) отсутствие экзогенной метаболической активации:
   1) метилметансульфонат [номер CAS 66-27-3],
   2) этилметансульфонат [номер CAS 62-50-0],
   3) митомицин С [номер CAS 50-07-7],
   4) 4-нитрохинолин-*N*-оксид [номер CAS 56-57-5];

b) наличие экзогенной метаболической активации:
   1) бензо(а)пирен [номер CAS 50-32-8],
   2) циклофосфамид (моногидрат) [номер CAS 50-18-0 (номер CAS 6055-19-2)].

Могут применяться другие подходящие вещества положительного контроля. Если возможно, можно рассмотреть применение химических веществ положительного контроля того же химического класса. Отрицательные контроли, состоящие из растворителя/разбавителя в культуральной среде и применяющиеся для обработки клеток в том же режиме, что и в вариантах с тестируемым образцом, должны быть использованы в каждом эксперименте. Дополнительно необходимо ставить контроли без обработки, кроме тех случаев, когда в лаборатории существует исторический контроль, демонстрирующий, что выбранный растворитель не индуцирует вредный или кластогенный эффект.

7.4 Проведение исследования

7.4.1 Инкубация с тестируемым образцом или экстрактом и период наблюдения

В первом эксперименте тестируемый образец инкубируют с клетками как с системой метаболической активации, так и без нее от 3 до 6 ч с приготовлением препаратов после начала инкубации

через период, соответствующий примерно 1,5 нормальным клеточным циклам. Если эксперимент дает отрицательные результаты как с метаболической активацией, так и без нее, необходимо производить дополнительное исследование без активации с непрерывной инкубацией до забора пробы в течение времени, равного примерно 1,5 клеточным циклам. Некоторые химические вещества могут быть быстрее обнаружены после инкубации/времени приготовления препаратов более чем 1,5 клеточных цикла. Отрицательные результаты с системой метаболической активации необходимо подтверждать в каждом конкретном случае. При исследовании как полярных, так и неполярных экстрактов отрицательные результаты с обоими экстрактами считаются подтвержденными. Когда подтверждение отрицательных результатов не требуется, нужно предоставить обоснование. Пролиферирующие клетки инкубируют с тестируемым образцом в присутствии и в отсутствие системы метаболической активации. Обработку лимфоцитов следует проводить примерно через 48 ч после митогенной стимуляции.

При каждой концентрации необходимо использовать дублирующие культуры, что также настоятельно рекомендуется для культур отрицательного контроля/контроля с растворителем. Газообразные или летучие вещества должны быть исследованы соответствующими методами, например в закрытых культуральных сосудах.

7.4.2 Приготовление препаратов хромосом

Клеточные культуры обрабатывают Colcemid®[1)] или колхицином, как правило, за 1—3 ч до приготовления препаратов. Каждую клеточную культуру обрабатывают отдельно. Приготовление препаратов хромосом включает гипотоническую обработку клеток, фиксацию и окрашивание.

7.4.3 Анализ

При подсчете митотического индекса необходимо оценить как минимум 1000 клеток на культуру.

Все гистологические препараты, включая препараты положительного и отрицательного контроля, должны быть независимо зашифрованы и рандомизированы перед микроскопическим анализом.

Так как процедура фиксации часто приводит к появлению метафаз с потерей хромосом, подсчитываемые клетки должны содержать количество центромер, равное модальному числу ± 2 для всех типов клеток. По меньшей мере 200 хорошо распределенных метафаз должны быть подсчитаны на каждую концентрацию и контроль. Если ставятся повторы, то это количество следует разделить поровну. Это количество может быть уменьшено, если наблюдается большое количество аберраций. Несмотря на то что цель исследования — выявление структурных хромосомных аберраций, важно учитывать также полиплоиды и эндоредупликацию, при их наличии.

7.5 Данные и отчетность

7.5.1 Обработка результатов

Исследуемой единицей является клетка, и, следовательно, нужно оценить процентное содержание клеток со структурными хромосомными аберрациями (или аберрацией). Различные типы структурных хромосомных аберраций должны быть приведены в виде перечня с их количеством и частотой для исследуемой и контрольной культур. Пробелы отмечают отдельно и отражают документально, но, как правило, не включают в общую частоту аберраций. Одновременные измерения цитотоксичности для всех обработанных культур и культур отрицательного контроля в основном исследовании или исследованиях аберрации должны быть также отражены документально.

Необходимо предоставить данные по индивидуальным культурам. Дополнительно все данные должны быть суммированы в форме таблицы.

Не существует требования для подтверждения четкого положительного ответа. Неоднозначные результаты следует проверять в дальнейших исследованиях, предпочтительно используя модификацию условий эксперимента. Необходимость подтверждения отрицательных результатов обязательна. В последующих исследованиях следует модифицировать параметры исследования для расширения диапазона оцениваемых условий. Параметры исследования, которые могут быть модифицированы, включают расширение диапазона концентраций и условия метаболической активации.

В подсчет не должны быть включены клетки, выбранные на малом увеличении, качество которых при большом увеличении непригодно для точного подсчета хромосомных аберраций (например, чрезмерно «смазанная» картина или накладывающиеся хромосомы). Первоначально по меньшей мере

[1)] Colcemid является торговой маркой продукта, поставляемого компанией Ciba-Geigy Company, Базель, Швейцария. Эта информация приведена для удобства пользователей настоящего стандарта и не является рекламой ISO означенного продукта. Можно использовать эквивалентные продукты, если продемонстрировано, что они приводят к аналогичным результатам.

200 клеток должны подсчитывать из каждой группы, по 100 метафаз от каждого из двух повторов. Если получены сомнительные результаты, можно проводить дальнейший «слепой» подсчет тех же образцов, включая дополнительные повторы отрицательного контроля или контроля с растворителем.

7.5.2 Оценка и интерпретация результатов

Существует несколько критериев для определения положительного результата, таких как воспроизводимое увеличение количества клеток с хромосомными аберрациями. В первую очередь необходимо учитывать биологическую значимость результатов. Для помощи в оценке результатов исследования можно использовать статистические методы. Статистическая значимость не должна быть единственным определяющим фактором положительного ответа.

Увеличение числа полиплоидных клеток может означать, что исследуемый образец может ингибировать митотические процессы и индуцировать численные хромосомные аберрации. Повышение количества клеток с эндоредуплицированными хромосомами может означать, что исследуемый образец имеет потенциал ингибирования прогрессии клеточного цикла (см. [7] и [8]).

Тестируемое вещество, или экстракт, результаты для которого не отвечают вышеуказанному критерию, считается не мутагенным по результатам данной тест-системы. Хотя в большинстве экспериментов получаются четко положительные или отрицательные результаты, в редких случаях полученные данные не позволяют сделать однозначное заключение об активности исследуемого вещества. Результаты могут оставаться противоречивыми или сомнительными независимо от числа проведенных повторов. Положительные результаты исследования хромосомных аберраций *in vitro* означают, что тестируемый образец индуцирует структурные хромосомные аберрации в культивированных соматических клетках млекопитающих. Отрицательные результаты означают, что при данных условиях эксперимента тестируемый образец не индуцирует хромосомные аберрации в культивированных соматических клетках млекопитающих.

7.5.3 Отчет об исследовании

Отчет об исследовании должен включать следующую информацию:

a) исследуемый образец:

1) исследуемые медицинское изделие, компоненты или материалы,
2) идентификационные данные и номер CAS, если известен,
3) физическая природа и чистота исследуемых материалов, если известны,
4) физико-химические свойства, релевантные к проведению исследования,
5) стабильность тестируемого образца, если известна,
6) данные о стерильности,
7) описание подготовки тестируемого образца, включая обоснование выбора метода, растворителя и условий подготовки образца,
8) описание физических характеристик тестируемого образца (например, прозрачность, цвет и наличие частиц),
9) информация по длительности измеренной экстракции и времени, прошедшего между приготовлением образца и использованием в исследовании,
10) способ подготовки исследуемого образца с обоснованием выбора используемого метода. Согласно методу B ISO 10993-3 необходимо включать процент осадка, определенный в пилотном исследовании экстракции,

b) растворитель/разбавитель:

1) обоснование выбора растворителя/разбавителя,
2) растворимость и стабильность тестируемого образца в растворителе/разбавителе, если известны;

c) клетки:

1) тип и источник клеток,
2) особенности кариотипа и пригодность используемого типа клеток,
3) отсутствие микоплазмы, если определяли,
4) информация о длительности клеточного цикла,
5) пол доноров крови, используемые цельная кровь или отделенные лимфоциты, митоген,
6) число пассажей, если использовали,
7) методы поддержания клеточных культур, если применимо,
8) модальное число хромосом;

d) условия исследования:

1) препарат, использованный для метафазного блока, его концентрация и длительность воздействия на клетки,

2) способ подготовки тестируемого образца с обоснованием выбора метода,

3) обоснование выбора концентраций и количества клеточных культур, включая, например, данные по цитотоксичности и ограничения растворимости, при наличии,

4) состав среды, концентрация CO_2, если определяли,

5) концентрация тестируемого образца или экстракта,

6) объем разбавителя и добавленного тестируемого образца или экстракта,

7) температура инкубации,

8) время инкубации,

9) длительность обработки культуры,

10) плотность клеток при высевании, если оценивали,

11) информация о поставщике и контроле качества S9 (т. е. метод приготовления, линия грызунов, концентрация индуктора Р450 и т. д.) должна быть отражена документально. Если S9 получен в собственной лаборатории, то источник и метод приготовления должны быть отражены документально,

12) тип и состав системы метаболической активации, включая критерий приемлемости,

13) положительный и отрицательный контроли,

14) методы приготовления препаратов,

15) критерий подсчета аберраций,

16) количество анализированных метафаз,

17) методы измерения токсичности,

18) критерий рассмотрения исследований как положительные, отрицательные или неоднозначные;

e) результаты:

1) признаки токсичности, например удвоение клеточной популяции, данные клеточного цикла, количество клеток, митотический индекс,

2) признаки преципитата,

3) данные по pH и осмолярности среды обработки, если определяли,

4) определение аберраций, включая пробелы,

5) количество клеток с хромосомными аберрациями и типы хромосомных аберраций, приведенные отдельно для каждой обработанной культуры и контроля,

6) изменения в полиплоидии, если наблюдаются,

7) взаимосвязь «доза—ответ», если определяли,

8) статистический анализ, при наличии,

9) данные отрицательного (растворитель/разбавитель) и положительного контроля в проведенном эксперименте,

10) исторический отрицательный (растворитель/разбавитель) и положительный контроли лаборатории с указанием диапазонов, средних значений и стандартных отклонений;

f) обсуждение результатов;

g) заключение.

8 Микроядерный тест *in vitro* на клетках млекопитающих

8.1 Общие положения

Микроядерный тест *in vitro* на клетках млекопитающих адаптирован для медицинских изделий путем использования OECD 487 [6]. В тест-системе для оценки генотоксичного потенциала медицинских изделий могут быть использованы медицинское(ий) изделие/материал или экстракты из медицинского изделия/материала или экстрагированные и выпаренные осадки из медицинского изделия/материала или химические вещества.

При использовании двух экстрактов генотоксический потенциал каждого экстракта должен быть оценен в соответствии с данным разделом.

Исследуемый образец воздействует на клеточные культуры с использованием системы метаболической активации и без нее. Через заранее определенные интервалы времени после инкубации исследуемого образца с клеточными культурами клетки собирают, окрашивают и анализируют микроскопически на предмет наличия микроядер.

8.2 Препараты

8.2.1 Клетки

Могут быть использованы разнообразные клеточные линии, штаммы или первичные клеточные культуры, включая клетки человека (например, фибробласты китайского хомячка, лимфоциты периферической крови человека или других млекопитающих).

8.2.2 Среды и условия культивирования

Для поддержания жизнеспособности культур необходимо использовать соответствующие культуральные среды и условия инкубации (культуральная посуда, концентрация CO_2, температура и влажность). Установленные клеточные линии и штаммы должны регулярно проверять на предмет стабильности относительно модального числа хромосом и отсутствия контаминации микоплазмой и не применять в случае контаминации. Должно быть известно время нормального клеточного цикла для используемых клеток и условий культивации.

8.2.3 Приготовление культур

Используемые клеточные линии и штаммы

Клетки, полученные из исходных культур, высевают в культуральную среду при такой плотности, при которой культуры не достигали конфлюентности до времени сбора, и инкубируют при температуре 37 °С.

Лимфоциты

Цельную кровь, содержащую антикоагулянт (например, гепарин) или отделенные лимфоциты, полученные от здоровых доноров, добавляют к культуральной среде, содержащей митоген (например, фитогемагглютинин) и инкубируют при температуре 37 °С.

8.2.4 Метаболическая активация

Исследуемый образец должен быть инкубирован с клетками как с соответствующей системой метаболической активации, так и без нее. Наиболее часто используемой системой является дополненная кофактором постмитохондриальная фракция S9, приготовленная из печени грызунов, обработанных фермент-индуцирующими агентами, такими как арохлор 1254 или комбинация фенобарбитона и ß-нафтофлавона. Постмитохондриальная фракция обычно используется в концентрациях в диапазоне от 1 % до 10 % объемных концентраций по отношению к конечной исследуемой среде. Состояние системы метаболической активации может зависеть от класса исследуемого химического вещества. В определенных случаях может понадобиться использовать более чем одну концентрацию постмитохондриальной фракции. Некоторые разработки, включая создание генно-инженерных клеточных линий, экспрессирующих конкретные активирующие ферменты, могут быть потенциально возможными для эндогенной активации. Выбор используемых клеточных линий должен быть научно обоснован (например, по отношению к изоферменту цитохрома Р450 для метаболизма исследуемого образца).

Информация о поставщике и контроле качества S9 (т. е. метод приготовления, линия грызунов, концентрация индуктора Р450 и т. д.) должна быть отражена документально. Если S9 получен в собственной лаборатории, то источник и метод приготовления должны быть отражены документально.

Буфер и концентрации компонентов должны быть отражены документально. Простое исключение компонента смеси S9 не рекомендуется, так как различающиеся объемы изменят исследуемую дозу соединения. Смесь S9 должна быть заменена соответствующим буфером.

8.2.5 Применение цитохалазина В в качестве блокатора цитокинеза

Одним из самых важных условий выполнения микроядерного теста *in vitro* является то, что подсчитываемые клетки завершили митоз во время периода обработки или после обработки клеток. Цитохалазин В (CytoB) — агент, который наиболее широко применяют для блокировки цитокинеза, так как он ингибирует формирование актина и таким образом предотвращает разделение дочерних клеток после митоза, ведя к формированию двухъядерных клеток. CytoB следует применять при использовании лимфоцитов человека, потому что время клеточного цикла будет отличаться в разных культурах и у разных доноров (животных). Для определения процесса деления клеток других клеточных линий используют другие методы.

8.2.6 Подготовка тестируемого образца

Выбор процедуры подготовки образца для любого медицинского изделия должен учитывать химический состав и физико-химические свойства материала или материалов, используемых в медицинском изделии. При приготовлении образца необходимо руководствоваться ISO 10993-12. Дополнительная информация приведена в приложении А ISO 10993-3:

- медицинские изделия или материалы, которые могут быть растворены или суспендированы в растворителе (см. приложение А, метод А, ISO 10993-3);

- медицинские изделия или материалы, которые не растворимы в растворителе, могут быть дозированы с использованием экстрактов в качестве исследуемого образца. Выбор методов экстракции зависит от процентной доли экстрагируемых веществ, полученных из исследуемого образца (см. приложение А, методы В и С, ISO 10993-3).

Исследуемые экстракты должны быть использованы в течение 24 ч после приготовления. Экстракты должны быть использованы, если это возможно, немедленно после приготовления для предотвращения адсорбции на поверхностях емкости для экстракции или других изменений в составе. Если экстракт хранится более 24 ч, необходимо подтвердить его стабильность и гомогенность при условиях хранения.

8.3 Условия исследования

8.3.1 Растворители

Растворители для исследования должны быть выбраны в соответствии с ISO 10993-12 или приложением А ISO 10993-3 и не влиять на жизнеспособность бактерий и активность S9, т. е. быть совместимыми. Если используют малоизвестные растворители, их включение должно сопровождаться данными, указывающими на их совместимость.

8.3.2 Исследуемые концентрации

Учитываемыми критериями при определении максимальной концентрации являются цитотоксичность, растворимость в системе исследования, изменения pH или осмолярность.

Рекомендуемая максимальная исследуемая концентрация будет зависеть от избранного метода приготовления тестируемого образца. Согласно ISO 10993-12 достаточно использования 100 %-ного экстракта тестируемого образца, и исследование других доз не является необходимым. В соответствии с приложением А ISO 10993-3 необходимо учитывать следующее:

a) для растворимых нецитотоксичных тестируемых образцов (см. приложение А, метод А, ISO 10993-3) рекомендуемая максимальная исследуемая концентрация составляет 5 мг/мл или 5 мкл/мл. Для нецитотоксичных тестируемых образцов, которые не растворимы в концентрации 5 мг/мл или 5 мкл/мл, одна или более из исследуемых концентраций должны быть нерастворимыми в окончательной тестируемой смеси. Тестируемые образцы, уже являющиеся цитотоксичными в концентрациях менее 5 мг/мл или 5 мкл/мл, должны быть исследованы в концентрациях менее цитотоксичной. Преципитат не должен мешать подсчету;

b) для тестируемых образцов, приготовленных в соответствии с приложением А, метод В, ISO 10993-3 рекомендуемая максимальная исследуемая концентрация составляет 5 мг/мл, если это выполнимо. Для нецитотоксичных исследуемых образцов, которые не растворимы при концентрации 5 мг/мл, одна или более из исследуемых концентраций должны быть нерастворимыми в окончательной тестируемой смеси. Тестируемые образцы, уже являющиеся цитотоксичными в концентрациях, менее 5 мг/мл, должны быть исследованы в концентрациях менее цитотоксичной. Преципитат не должен мешать подсчету;

c) для тестируемых образцов в соответствии с приложением А, метод С, ISO 10993-3 рекомендуемой максимальной исследуемой концентрацией является 100 %-ный экстракт образца. Для нецитотоксичных тестируемых образцов, которые не растворимы при 100 %-ной концентрации одна или более из исследуемых концентраций должны быть нерастворимыми в окончательной тестируемой смеси. Тестируемые образцы, уже являющиеся цитотоксичными в концентрациях менее чем 100 %, должны быть исследованы в концентрациях менее цитотоксичной.

При обработке клеток культуральная среда заменяется средой, содержащей исследуемый образец или исследуемый экстракт соответствующей концентрации. В основном исследовании цитотоксичность должна быть определена как с системой метаболической активации, так и без нее, используя соответствующие признаки целостности и роста клеток, относительное увеличение количества клеток (RICC) или относительное удвоение популяции (RPD), если не применен cytoB. При использовании cytoB цитотоксичность может быть определена посредством индекса репликации (RI). Обработка культур cytoB и измерение относительного количества одноядерных, двухъядерных и многоядерных клеток в культуре предоставляют точный метод определения влияния тестируемого образца на пролиферацию клеток и его цитотоксичную или цитостатичную активность и гарантируют, что подсчитываются только те клетки, которые поделились во время обработки клеток или после нее (индекс пролиферации при блоке цитокинеза, CBPI).

При наличии цитотоксичности необходимо использовать по меньшей мере три анализируемые концентрации. Эти концентрации должны входить в диапазон от максимальной до небольшой или при отсутствии цитотоксичности.

Это, как правило, означает, что интервал между концентрациями должен быть в пределах от 2 до корня квадратного из 10. На момент фиксации при максимальной концентрации должно быть значительное сокращение [более (55 ± 5) %] степени цитотоксичности по указанным выше параметрам по сравнению с отрицательным контролем/контролем с растворителем.

Для относительно нецитотоксичных экстрактов чистые экстракты должны применять в концентрации 10 % (водные растворы) или 1,0 % (безводные/растворители) от объема культуры. Для относительно нецитотоксичных тестируемых образцов максимальная концентрация должна составлять 5 мкл/мл (в случае чистых жидких химических веществ), 5 мг/мл или 0,01 М в зависимости от того, какая из них является самой низкой. В таких случаях приемлема единственная максимальная концентрация.

Для относительно нерастворимых исследуемых образцов, которые нетоксичны при концентрациях менее чем нерастворимая концентрация, максимальной используемой дозой должна быть концентрация более предела растворимости в конечной культуральной среде в конце периода обработки. В отдельных случаях (например, когда токсичность наблюдается только при более высокой концентрации, чем самая низкая нерастворимая концентрация) предпочтительно исследовать более чем одну концентрацию с видимым преципитатом. Полезно оценить растворимость в начале и в конце обработки, так как растворимость может меняться в течение воздействия в тест-системе из-за наличия клеток, S9, сыворотки и т. д. Нерастворимость может быть обнаружена невооруженным глазом. Преципитат не должен мешать подсчету.

8.3.3 Контроли

Соответствующие положительные и отрицательные (растворитель или разбавитель) контроли как с метаболической активацией, так и без нее должны быть включены в каждый эксперимент. В варианте с метаболической активацией вещество, используемое в качестве положительного контроля, должно дать мутагенный ответ при данной системе метаболической активации.

Положительные контроли нужны для демонстрации способности идентифицировать кластогены и анеугены на уровнях воздействия, ожидаемых для получения воспроизводимого и обнаруживаемого повышения относительно фона, которое демонстрирует чувствительность тест-системы, и для подтверждения метаболической способности смеси S9. Концентрации положительного контроля следует подбирать таким образом, чтобы был четкий эффект, но в то же время его уровень не позволял исследователю определить зашифрованный препарат.

Примеры веществ для положительного контроля включают следующие:

a) кластогены, активные без метаболической активации:
   1) цитозина арабинозид [номер CAS 147-94-4],
   2) митомицин С [номер CAS 50-07-7];

b) кластогены, требующие метаболической активации:
   1) бензо(а)пирен [номер CAS 50-32-8],
   2) циклофосфамид (моногидрат) [номер CAS 50-18-0 (номер CAS 6055-19-2)];

c) анеугены:
   1) колхицин [номер CAS 64-86-8],
   2) винбластин [номер CAS 143-67-9].

В качестве положительного контроля могут применять другие подходящие вещества. Предпочтительно рассматривать в качестве положительного контроля применение химических веществ того же химического класса.

Отрицательные контроли, инкубационная среда (среда обработки) которых состоит только из растворителя или разбавителя и исследованные в тех же условиях, что и клеточные культуры, должны использовать в каждом эксперименте. Дополнительно необходимо также применять исходные контроли, кроме тех случаев, когда в архиве данных лаборатории есть контроль, демонстрирующий, что выбранный растворитель не индуцирует определенный анеугенный или кластогенный эффект.

8.4 Проведение исследования

8.4.1 Инкубация с исследуемым образцом или экстрактом и период наблюдения

В первом эксперименте тестируемый образец инкубируют с клетками как с системой метаболической активации, так и без нее от 3 до 6 ч с последующим удалением образца и периодом наблюдения от 1,5 до 2 клеточных циклов. Клетки отбирают по времени, равному примерно от 1,5 до двукратной

длительности нормального (исходного) клеточного цикла от начала инкубации либо в конце инкубации. Время отбора или время инкубации может быть продлено, если известно или предполагается, что тестируемый образец влияет на время клеточного цикла. Если данный эксперимент дает отрицательные результаты как с метаболической активацией, так и без нее, необходимо проводить дополнительное исследование без активации с непрерывной инкубацией в течение времени с начала отбора клеток, равного примерно от 1,5 до 2-кратной длительности нормального клеточного цикла. Рекомендуемые графики обработки приведены в таблице 3.

Следует использовать дублирующие культуры при каждой концентрации, что также настоятельно рекомендуется для культур отрицательного контроля и контроля с растворителем.

Таблица 3 — Рекомендуемые графики обработки

Клетки	+S9	-S9 (короткое воздействие)	-S9 (длительное воздействие)	
Лимфоциты, первичные клетки и клеточные линии, обработанные cytoB	- Обработка от 3 до 6 ч в присутствии S9. - Удаление S9 и среды обработки. - Добавление свежей среды и cytoB. - Сбор после 1,5—2-кратного нормального клеточного цикла	- Обработка от 3 до 6 ч. - Удаление среды обработки. - Добавление свежей среды и cytoB. - Сбор после 1,5—2-кратного нормального клеточного цикла	Вариант А: - обработка в течение 1,5—2-кратного нормального клеточного цикла в присутствии cytoB; - сбор в конце периода воздействия	Вариант В: - обработка в течение 1,5—2-кратного нормального клеточного цикла; - удаление исследуемого образца; - добавление свежей среды и cytoB; - сбор после 1,5—2-кратного нормального клеточного цикла
Клеточные линии, обработанные без cytoB	- Обработка от 3 до 6 ч в присутствии S9. - Удаление S9 и среды обработки. - Добавление свежей среды. - Сбор после 1,5—2-кратного нормального клеточного цикла	- Обработка от 3 до 6 ч. - Удаление среды обработки. - Добавление свежей среды. - Сбор после 1,5—2-кратного нормального клеточного цикла	Вариант А: - обработка в течение 1,5—2-кратного нормального клеточного цикла; - сбор в конце периода воздействия	Вариант В: - обработка в течение 1,5—2-кратного нормального клеточного цикла; - удаление исследуемого образца; - добавление свежей среды; - сбор после 1,5—2-кратного нормального клеточного цикла

Газовые или летучие вещества должны исследовать надлежащими методами, такими как в закрытых культуральных сосудах.

8.4.2 Сбор клеток и приготовление препаратов

Подготовка клеток может включать гипотоническую обработку, но этот этап необязателен, если гарантировано адекватное распластывание клеток. Цитоплазма клеток должна быть сохранена для обнаружения микроядер и (в методе с блоком цитокинеза) надежной идентификации двухъядерных клеток.

Препараты могут быть окрашены различными методами, такими как Гимза, или флуоресцентными ДНК-специфичными красителями, когда артефакты, полученные при использовании красителя, не специфичного для ДНК, могут быть исключены. Антикинетохорные антитела, FISH с панцентромерными зондами ДНК или подготовленные *in situ* панцентромер-специфичные праймеры могут быть использованы для идентификации содержания (хромосома/хромосомный фрагмент) микроядер.

8.4.3 Анализ

Все препараты должны быть независимо зашифрованы перед микроскопическим анализом. В качестве альтернативы зашифрованные образцы можно анализировать, используя утвержденную автоматизированную проточно-цитометрическую систему или систему анализа изображений.

В культурах, обработанных cytoB, количество микроядер должны подсчитывать по меньшей мере на 2000 двухъядерных клеток на одну концентрацию (как минимум 1000 двухъядерных клеток на культуру, две культуры на концентрацию). При использовании одной культуры по меньшей мере 2000 двухъядерных клеток на концентрацию должны быть подсчитаны. Если для подсчета на каждую концентрацию в наличии значительно менее чем 1000 или 2000 двухъядерных клеток на культуру при ис-

пользовании одной культуры и если значительного увеличения количества микроядер не обнаружено, эксперимент следует повторить, используя по возможности большее количество клеток или меньшие концентрации токсичного агента. Необходимо проследить, чтобы подсчет не учитывал двухъядерные клетки с неправильными формами или с большой разницей в размере между двумя ядрами; также не следует путать двухъядерные клетки с плохо распластанными многоядерными клетками. Клетки, содержащие более двух основных ядер, не следует анализировать на предмет микроядер, так как исходная частота микроядер в этих клетках может быть выше. Подсчет одноядерных клеток приемлем, если продемонстрировано, что тестируемый образец препятствует активности cytoB.

В пробах клеточных линий без обработки cytoB микроядра должны быть подсчитаны по меньшей мере в 2000 двухъядерных клетках на концентрацию (как минимум 1000 двухъядерных клеток на культуру, две культуры на концентрацию). При использовании только одной культуры на концентрацию по меньшей мере 2000 двухъядерных клеток должны быть подсчитаны на эту культуру. При использовании cytoB необходимо определить CBPI или RI для оценки пролиферации клеток посредством как минимум 500 клеток/культуру.

8.5 Данные и отчетность

8.5.1 Обработка результатов

Если применяют метод блокирования цитокинеза, то при оценке индукции микроядер считают только относительное количество двухъядерных клеток с микроядрами. Подсчет количества клеток с одним, двумя или более микроядрами может быть полезен, но не обязателен.

Должны быть определены одновременные измерения цитотоксичности и/или цитостатичности для всех обработанных культур и контролей с растворителем/разбавителем. Необходимо вычислить CBPI (индекс пролиферации при блоке цитокинеза) или RI (индекс репликации) для всех обработанных и контрольных культур в качестве измерений задержки клеточного цикла при применении метода блокирования цитокинеза. При отсутствии cytoB следует использовать RPD (относительное удвоение популяции), или RICC (относительное повышение количества клеток), или PI (индекс пролиферации). Должны быть предоставлены данные по каждой культуре и все данные должны быть дополнительно суммированы в форме таблицы.

Не существует требования для подтверждения четкого положительного или отрицательного ответа. Неоднозначные результаты должны быть уточнены в дальнейших исследованиях, предпочтительно используя модификацию условий эксперимента. Необходимость подтверждения отрицательных результатов обсуждалась ранее. В последующих исследованиях следует учитывать модификацию параметров исследования для расширения диапазона оцениваемых условий. Параметры исследования, которые могут быть модифицированы, включают распределение концентраций и условия метаболической активации.

8.5.2 Оценка и интерпретация результатов

Не существует требования для подтверждения четкого положительного или отрицательного ответа. Неоднозначные результаты могут быть уточнены путем анализа другой 1000 клеток из всех культур. Если этот подход не проясняет результат, необходимо проводить дальнейшее исследование. В последующих экспериментах следует рассмотреть модификацию параметров исследования, по возможности в расширенном или суженном диапазоне условий.

Существует несколько критериев для определения положительного результата, таких как увеличение частоты клеток с микроядрами, связанное с концентрацией тестируемого образца, или статистически значимое увеличение количества клеток, содержащих микроядра. В первую очередь необходимо учитывать биологическую значимость результатов. Рассмотрение данных о том, находятся ли наблюдаемые показатели внутри или вне диапазона имеющегося исторического контроля лаборатории, может помочь при оценке биологической значимости ответа. Положительные результаты микроядерного теста *in vitro* означают, что тестируемый образец индуцирует хромосомные разрывы или потери в культивируемых клетках млекопитающих. Отрицательные результаты означают, что в условиях проведенного эксперимента тестируемый образец не индуцирует хромосомные разрывы или потери в культивируемых соматических клетках млекопитающих.

8.5.3 Отчет об исследовании

Отчет об исследовании должен включать следующую информацию:

а) исследуемый образец:

1) исследуемые медицинское изделие, компоненты или материалы,
2) идентификационные данные и номер CAS, если известен,

3) физическая природа и чистота исследуемых материалов, если известны,

4) физико-химические свойства, релевантные к проведению исследования,

5) стабильность исследуемого образца, если известна,

6) данные о стерильности,

7) описание подготовки исследуемого образца, включая обоснование выбора метода, растворителя и условий приготовления образца,

8) описание физических характеристик исследуемого образца, например прозрачность, цвет и наличие частиц,

9) информация о длительности измеренной экстракции и времени, прошедшего между приготовлением образца и использованием в исследовании;

b) растворитель/разбавитель:

1) обоснование выбора растворителя/разбавителя,

2) растворимость и стабильность исследуемого образца в растворителе/разбавителе, если известны;

c) клетки:

1) тип и источник клеток,

2) особенности кариотипа и пригодность используемого типа клеток,

3) отсутствие микоплазмы, если применимо,

4) информация о длительности клеточного цикла,

5) пол доноров крови, используемые цельная кровь или отделенные лимфоциты, митоген,

6) число пассажей в случае использования,

7) методы поддержания клеточных культур, если применимо,

8) модальное число хромосом;

d) условия исследования:

1) метод подготовки исследуемого образца с обоснованием выбора метода,

2) обоснование выбора концентраций и количества культур, включая, например, данные о цитотоксичности и ограничения растворимости, при наличии,

3) состав среды, концентрация CO_2, в случае определения,

4) концентрация тестируемого образца или экстракта,

5) объем разбавителя и добавленного тестируемого образца или экстракта,

6) температура инкубации,

7) время инкубации,

8) длительность обработки культуры,

9) плотность клеток при высевании, при оценке,

10) информация о поставщике и контроле качества S9 (т. е. метод приготовления, штамм грызунов, концентрация индуктора P450 и т. д.) должна быть отражена документально. Если S9 приготовлен из собственных источников, то источник и метод приготовления должны быть отражены документально,

11) тип и состав системы метаболической активации, включая критерий приемлемости,

12) положительный и отрицательный контроли,

13) методы приготовления препаратов,

14) критерий подсчета микроядер,

15) количество анализированных клеток,

16) методы измерения токсичности,

17) критерии рассмотрения исследований как положительные, отрицательные или неоднозначные;

e) результаты:

1) наличие токсичности, например CBPI, RI, RICC, RCC,

2) наличие преципитата,

3) данные по pH и осмолярности среды обработки, если определены,

4) количество клеток с микроядрами для каждой обработанной культуры и контроля,

5) данные «доза—ответ» в случае определения,

6) статистический анализ, при наличии,

7) данные отрицательного (растворитель/разбавитель) и положительного контроля проведенного эксперимента,

8) исторический лабораторный отрицательный (растворитель/разбавитель) и положительный контроль с указанием диапазонов, средних значений и стандартных отклонений;

f) обсуждение результатов;

g) заключение.

9 Метод оценки *in vitro* генных мутаций на клетках млекопитающих с использованием клеток лимфомы (L5178Y) мышей

9.1 Общие положения

Метод оценки *in vitro* генных мутаций на клетках млекопитающих с использованием клеток лимфомы (L5178Y) мышей (L5178Y — клетки тимидинкиназы $(TK)^{+/-}$) адаптирован для медицинских изделий, пути использования OECD 476 [5]. В тест-системе для оценки генотоксического потенциала медицинских изделий могут быть использованы медицинское(ий) изделие/материал, или экстракты из медицинского изделия/материала, или экстрагированные и выпаренные осадки из медицинского изделия/материала, или химические вещества.

При использовании двух экстрактов генотоксический потенциал каждого экстракта должен быть оценен в соответствии с данным разделом. Клетки, лишенные тимидинкиназы (TK) вследствие мутации $TK^{+/-} \rightarrow TK^{-/-}$ резистентны к цитотоксическим эффектам аналога пиримидина трифтротимидина (TFT). Клетки, имеющие тимидинкиназу, чувствительны к TFT, что вызывает ингибирование клеточного метаболизма и прекращает дальнейшее клеточное деление. Таким образом, мутантные клетки могут размножаться в присутствии TFT, в то время как нормальные клетки, содержащие тимидинкиназу, не могут.

9.2 Препараты

9.2.1 Клетки

В этом исследовании использованы субклоны клеток мышиной лимфомы — $L5178YTK^{+/-}$. Для обеспечения идентичности и адекватной производительности клеточных линий такими методами, как чувствительность к химическим мутагенам, высокая эффективность клонирования, стабильная спонтанная частота мутации или кариотипирование, должны быть приняты соответствующие меры контроля качества.

Клетки должны быть проверены на предмет контаминации микоплазмой и не использоваться при контаминации. Необходимо определить концентрацию S9, используемую при исследовании.

Эксперимент должен быть спланирован с заранее определенными чувствительностью и объемом. Количество используемых клеток, культур и концентраций исследуемого образца или экстракта должно соответствовать этим определенным параметрам. Минимальное количество жизнеспособных клеток, выживающих после обработки на каждой стадии теста, должно быть основано на спонтанной частоте мутации. Общей рекомендацией является использование того количества клеток, которое по меньшей мере в десять раз превышает частоту спонтанных мутаций.

9.2.2 Среды и условия культивирования

Как среда RPMI-1640, так и среда Фишера для лейкемических клеток мышей успешно использовались с MLA. Особенно важно, чтобы условия культивирования обеспечивали оптимальный рост клеток в период экспрессии и способность формировать колонии как мутантных, так и не мутантных клеток.

Осмолярность и pH среды должны быть в физиологическом диапазоне.

9.2.3 Приготовление культур

Клетки, отобранные из исходных культур, высевают в культуральную среду и инкубируют при температуре 37 °C. Процедуру очищения проводят в последующих два дня. Клетки сначала обрабатывают раствором THMG (тимидин, гипоксантин, метотрексат, глицин) еженедельно для очистки культуры от спонтанных мутантов $TK^{-/-}$, с использованием THG на следующий день.

9.2.4 Метаболическая активация

Тестируемый образец должен воздействовать на клетки как при наличии, так и в отсутствие соответствующей системы метаболической активации. Наиболее часто используемой системой является дополненная кофактором постмитохондриальная фракция S9, приготовленная из печени грызунов, обработанных фермент-индуцирующими агентами, такими как арохлор 1254 или комбинация фенобарбитона и ß-нафтофлавона. Постмитохондриальную фракцию, как правило, применяют при концентрациях в диапазоне от 1 % до 10 % объемной доли в конечной исследуемой среде. Выбор и состояние системы метаболической активации могут зависеть от класса исследуемого химического вещества. В некото-

рых случаях может понадобиться использовать более чем одну концентрацию постмитохондриальной фракции.

Информация о поставщике и контроле качества S9 (т. е. метод приготовления, линия грызунов, концентрация индуктора Р450 и т. д.) должна быть отражена документально. Если S9 готовят в собственной лаборатории, то источник и метод приготовления должны быть отражены документально.

Буфер и концентрации компонентов должны быть также отражены документально. Простое исключение компонента смеси S9 не рекомендуется при отсутствии системы метаболической активации, так как различающиеся объемы изменят исследуемую дозу соединения. Смесь S9 должна быть заменена подходящим буфером или культуральной средой.

9.2.5 Подготовка исследуемого образца

Выбор способа подготовки образца для любого медицинского изделия должен учитывать химический состав и физико-химические свойства материала или материалов, используемых в медицинском изделии. При приготовлении образца следует руководствоваться ISO 10993-12. Дополнительная информация приведена в приложении A ISO 10993-3:

- медицинские изделия или материалы, которые могут быть растворены или суспендированы в растворителе, используют непосредственно в качестве тестируемых образцов (см. приложение А, метод А, ISO 10993-3);

- медицинские изделия или материалы, которые не растворимы в растворителе, могут быть испытаны с использованием экстрактов в качестве тестируемого образца. Выбор методов экстракции зависит от процентной доли экстрагируемых веществ, полученных из исследуемого образца (см. приложение А, методы В и С, ISO 10993-3).

Исследуемые экстракты должны быть использованы в течение 24 ч после приготовления. Экстракты должны быть использованы, если возможно, незамедлительно после приготовления для предотвращения адсорбции на стенках емкости для экстракции или других изменений в составе. Если экстракт хранится более 24 ч, необходимо подтвердить стабильность и гомогенность экстракта при условиях хранения.

9.3 Условия исследования

9.3.1 Растворитель/несущая среда

Растворитель для исследования должен быть выбран в соответствии с ISO 10993-12 или приложением A ISO 10993-3 и быть совместимым, т. е. не должен влиять на выживаемость бактерий и активность S9. Если используют малоизвестные растворители, их включение должно быть подтверждено данными, указывающими на их совместимость.

9.3.2 Исследуемые концентрации

Учитываемыми критериями при определении максимальной концентрации являются цитотоксичность, растворимость в системе исследования, изменения *pH* или осмолярность. Цитотоксичность должна быть определена в основном исследовании как с системой метаболической активации, так и без нее при использовании надлежащих признаков целостности и роста клеток, таких как относительная эффективность клонирования (выживание) или относительный общий рост [11]. Может быть полезным определение цитотоксичности и растворимости в предварительном исследовании. Согласно ISO 10993-12 приемлемо исследование, в ходе которого используют 100 %-ный экстракт исследуемого образца, и дальнейшее дозовое исследование не является необходимым. В соответствии с приложением A ISO 10993-3 необходимо учитывать следующее.

Рекомендуемая максимальная исследуемая концентрация будет зависеть от избранного метода приготовления исследуемого образца:

a) для растворимых нецитотоксичных тестируемых образцов (см. приложение А, метод А, ISO 10993-3) рекомендуемая максимальная исследуемая концентрация составляет 5 мг/мл или 5 мкл/мл. Для нецитотоксичных тестируемых образцов, которые не растворимы при концентрации 5 мг/мл или 5 мкл/мл, одна или более из исследуемых концентраций должны быть нерастворимыми в конечной смеси обработки. Тестируемые образцы, уже являющиеся цитотоксичными в концентрациях менее 5 мг/мл или 5 мкл/мл, должны быть исследованы в концентрациях менее цитотоксичной. Преципитат не должен мешать подсчету;

b) для тестируемых образцов, приготовленных в соответствии с приложением А, метод В, ISO 10993-3 рекомендуемая максимальная исследуемая концентрация составляет 5 мг/мл, если это выполнимо. Для нецитотоксичных исследуемых образцов, которые не растворимы при концентрации 5 мг/мл, или 5 мкл/мл, или 0,01 М, одна или более из исследуемых концентраций должны быть нерас-

творимыми в конечной смеси обработки клеток. Тестируемые образцы, уже являющиеся цитотоксичными в концентрациях менее 5 мг/мл, 5 мкл/мл или 0,01 М, должны быть исследованы в концентрациях менее цитотоксичной. Преципитат не должен мешать подсчету;

c) для тестируемых образцов, в соответствии с приложением А, метод С ISO 10993-3, рекомендуемой максимальной исследуемой концентрацией является 100 %-ный экстракт образца. Для нецитотоксичных тестируемых образцов, которые не растворимы при 100 %, одна или более из исследуемых концентраций должна быть нерастворимой в конечной смеси обработки клеток. Тестируемые образцы, уже являющиеся цитотоксичными менее чем 100 %, должны быть исследованы в концентрациях менее цитотоксичной концентрации. Преципитат не должен препятствовать подсчету.

Единственная максимальная доза является адекватной для нецитотоксичных растворимых осадков. При наличии цитотоксичности необходимо использовать по меньшей мере четыре анализируемых концентрации. Данные концентрации должны входить в диапазон от максимальной до небольшой цитотоксичности или до ее отсутствия. Это обычно означает, что интервал диапазона концентраций должен быть в пределах от 2 до корня квадратного из 10. При максимальной концентрации для цитотоксичных осадков наблюдается примерно от 10 % до 20 % (но не менее чем 10 %) относительного выживания (относительной эффективности клонирования) или относительного общего роста. Для относительно нецитотоксичных тестируемых образцов максимальная концентрация должна составлять 5 мкл/мл, 5 мг/мл или 0,01 М в зависимости от того, какая из них является наименьшей. При таких обстоятельствах приемлема единственная максимальная концентрация.

Для относительно нерастворимых тестируемых образцов или экстрактов, которые нетоксичны при концентрациях менее чем нерастворимая концентрация, максимальной используемой дозой должна быть концентрация более предела растворимости в конечной культуральной среде в конце периода обработки. В отдельных случаях (например, когда токсичность наблюдается только при более высокой концентрации, чем наименьшая нерастворимая концентрация) предпочтительно исследовать более чем одну концентрацию с видимым преципитатом. Полезно оценить растворимость в начале и в конце обработки, так как растворимость может меняться в течение воздействия в системе исследования из-за наличия клеток, S9, сыворотки и т. д. Нерастворимость может быть обнаружена невооруженным глазом. Преципитат не должен мешать подсчету.

9.3.3 Контроли

Соответствующие положительные и отрицательные (растворитель или разбавитель) контроли как с метаболической активацией, так и без нее должны быть включены в каждый эксперимент. В варианте с метаболической активацией вещество, используемое в качестве положительного контроля, должно дать мутагенный ответ при данной системе метаболической активации.

Примеры веществ положительного контроля включают следующее:

a) отсутствие экзогенной метаболической активации:

1) метилметансульфонат [номер CAS 66-27-3];

b) наличие экзогенной метаболической активации:

1) циклофосфамид (моногидрат) [номер CAS 50-18-0 (номер CAS 6055-19-2)],
2) бензо(а)пирен [номер CAS 50-32-8] 3,
3) метилхолантрен [номер CAS 56-49-5].

Могут применяться другие подходящие вещества для положительного контроля. Предпочтительно рассмотреть в качестве положительного контроля применение химических веществ того же химического класса, при их наличии. Ответы положительного контроля с S9 и без нее должны использоваться для принятия мер контроля качества и для демонстрации адекватного обнаружения малых колоний мутантных клеток. Каждая лаборатория должна установить собственную базу архивных данных своих положительных и отрицательных контролей. Отрицательные контроли, инкубационная среда (среда обработки) которых состоит только из растворителя или разбавителя, и инкубированные так же, как и клеточные культуры, должны быть включены в каждом эксперименте. Дополнительно необходимо также использовать необработанные контроли, кроме тех случаев, когда существуют исторические контроли, демонстрирующие, что выбранный растворитель не индуцирует повреждающий или мутагенный эффект.

9.4 Проведение исследования

9.4.1 Общие положения

Цитотоксичность должна быть определена для каждого индивидуального исследования и контрольной культуры. Для версии мягкого агара MLA это, как правило, осуществляют путем оценки относительного общего роста количества клеток (RTG), который в оригинальной версии описан в [11].

Это измерение включает оценку относительного роста в суспензии в течение времени экспрессии и относительную эффективность клонирования во время выбора мутантов. Микролуночная версия метода разработана с использованием относительного выживания (RS) в качестве измерения цитотоксичности. Величина RS определена относительной эффективностью высевания каждой культуры незамедлительно после периода воздействия. RTG и RS являются разными способами оценки цитотоксичности, и, хотя не существует достаточного обоснования, что один способ лучше другого, важно, что один и тот же способ оценки цитотоксичности может быть использован для обеих версий теста. Так как RS чаще всего не измеряют в версии теста с мягким агаром, а RTG измеряют в обеих версиях, рекомендуется использовать RTG в качестве стандартного измерения цитотоксичности. Этот способ оценки цитотоксичности применяют как для определения диапазона концентраций, так и для установления наивысшей концентрации, используемой для определения положительного и отрицательного ответов.

Существуют дополнительные аспекты определения RTG для двух методов проведения MLA. В методе агара на клетки воздействуют исследуемыми химическими веществами; химическое вещество удаляют центрифугированием и ресуспензированием в свежей среде. Первый подсчет клеток происходит примерно через 24 ч после начала химического воздействия. В первый день после обработки плотность клеток в каждой культуре регулируют, как правило, не более $0,2 \cdot 10^6$ или $0,3 \cdot 10^6$ клеток/мл среды. Обработанные культуры с плотностями менее $0,2 \cdot 10^6$ или $0,3 \cdot 10^6$ клеток/мл среды не регулируют, так как это высокая цитотоксичность, не позволяющая проводить полный эксперимент для подсчета мутантов. Для каждой обрабатываемой культуры определяют относительный клеточный рост (по сравнению с контролем). На второй день после обработки плотность клеток в культуре вновь подсчитывают, регулируют и готовят к клонированию для подсчета мутантных клеток. Вычисляют общий двухдневный суспензионный рост каждой культуры и каждую обработанную культуру сравнивают с контролем. Этот показатель называют относительным суспензионным ростом (RSG). Культуры клонируют с селективной средой и без нее для подсчета мутаций и определения частоты мутаций (количество мутаций на 10^6 клонируемых клеток). Определяют относительную эффективность высевания для каждой культуры (относительно отрицательного контроля) и умножают на RSG для получения относительного общего роста (RTG).

При микролуночном методе во многих лабораториях подсчитывают клеточные культуры непосредственно после воздействия исследуемым химическим веществом и регулируют плотность культур. После окончания обработки и регулирования плотности клеток с клеточными культурами обращаются так же, как с культурами в методе агара. После двухдневного периода экспрессии культуры высевают в 96-луночные планшеты с селекцией TFT и без нее.

Как описано выше, обращение с клеточными культурами после обработки значительно отличается в двух методах. Это различие влияет на вычисление RSG и RTG. В методе агара RSG и RTG определяют с учетом всех отличий, которые могут происходить в клеточном росте между химически обработанными и контрольными культурами. Однако в микролуночном методе культуры обычно регулируют по плотности после обработки, а RS, RSG и RTG вычисляют, используя эффективность высевания и клеточный рост, который происходит после обработки. Другими словами, любые отличия в росте, которые существуют между отрицательными контролями и обрабатываемыми культурами в течение фазы обработки, не включены в вычисления. Для того чтобы сделать измерения цитотоксичности, полученные в двух методах, эквивалентными, пользователям микролуночного метода необходимо откорректировать свои значения RS, RSG и RTG и включить значения дифференцированного роста, который может происходить во время обработки. Эта поправка должна быть сделана путем сравнения клеточной плотности в каждой обработанной культуре с клеточной плотностью отрицательного контроля немедленно после обработки. Путем сравнения роста каждой обработанной культуры относительно контроля возможно вычисление фактора относительного роста в течение обработки, который затем может быть использован для корректировки RS, RSG и RTG. В качестве примера: если после периода обработки отрицательный контроль имел клеточную плотность, составляющую $0,6 \cdot 10^6$ клеток/мл, а обработанная культура имела плотность $0,3 \cdot 10^6$ клеток/мл, тогда относительный рост в течение обработки для этой обработанной культуры составляет 0,5 (или 50 %). Если RS для этой культуры определен как 0,4, тогда откорректированное RS будут вычислять как RS × относительный рост в течение обработки или $0,4 \cdot 0,5 = 0,20$ (или 20 %). RSG корректируется таким же способом. Корректированный RTG получают умножением корректированного RSG на относительную эффективность высевания во время выбора мутантов.

9.4.2 Обработка исследуемым образцом

Тестируемый образец должен воздействовать на пролиферирующие клетки как при наличии системы метаболической активации, так и без нее. Воздействие должно длиться в течение подходящего периода времени (наиболее эффективно — от 3 до 4 ч). Если заключение является отрицательным после обработки в течение от 3 до 4 ч, оценивают исследуемый образец (без метаболической активации), используя 24-часовой период обработки. 24-часовая обработка также может быть проведена параллельно с краткосрочным воздействием. Для каждой исследуемой концентрации можно применять дублирующие культуры или единственную культуру. При использовании единственных культур количество концентраций должно быть повышено для обеспечения адекватного количества культур для анализа (например, по меньшей мере восемь анализируемых концентраций). Необходимо использовать дублирующие культуры в отрицательном контроле (растворителе).

9.4.3 Определение выживаемости, жизнеспособности и частоты мутаций

В конце периода воздействия клетки отмывают и культивируют для определения выживания и осуществления экспрессии мутантного фенотипа. Оценку цитотоксичности путем определения относительной эффективности клонирования (выживание) или относительного общего роста культур, как правило, начинают после окончания периода обработки.

Клетки культивируют по меньшей мере в течение двух дополнительных дней для обеспечения почти оптимальной фенотипической экспрессии индуцированных мутантов к тимидинкиназе. Клетки затем выращивают в среде с селективным(и) агентом(ами) и при его(их) отсутствии для определения количества мутантных клеток и эффективности клонирования соответственно. Измерение жизнеспособности (используемое для вычисления частоты мутантов) начинают в конце периода экспрессии путем высевания в неселективную среду. Селекция мутантов может быть проведена с использованием TFT (см. [22]), либо методом мягкого агара, либо методом микролуночного клонирования (см. [23]).

В методе мягкого агара частоту мутаций (MF) определяют путем подсчета количества TFT-резистентных колоний и корректировки количества клеток, высеянных для селекции, на эффективность высевания (PE), то есть MF = (количество мутантных клеток/количество высеянных клеток) × PE. При микролуночном методе эффективность высевания (PE) и частоту мутаций (MF) вычисляют, используя распределение Пуассона. Эффективность высевания (PE) как в чашках селекции мутантных клеток, так и в чашках оценки жизнеспособности вычисляют следующим образом: учитывая нулевое значение распределения Пуассона вероятное количество клонов/лунку (P) равно –ln (EW/TW), где EW — пустые лунки, а TW — общее количество лунок. PE = P/количество высеянных клеток на лунку. Затем вычисляют частоту мутаций: MF = [PE(мутантные клетки)/PE(жизнеспособные)] · 10^6.

Если эффект исследуемого вещества является отрицательным, должно быть проведено определение размера колоний мутантов в отрицательном и положительном контролях. Определение размера колоний в отрицательном контроле необходимо для демонстрации адекватного роста крупных колоний. Эффект исследуемого химического вещества не может быть определен как отрицательный, если в положительном контроле отсутствует надлежащий уровень малых колоний мутантных клеток.

9.5 Данные и отчетность

9.5.1 Обработка результатов

Данные должны включать определения цитотоксичности и жизнеспособности, количество колоний и частоту мутаций для обработанных культур и культур контроля. В случае положительного ответа в исследовании L5178YTK+/- колонии подсчитывают, используя критерий малых и крупных колоний по меньшей мере на одной концентрации исследуемого образца (максимальная положительная концентрация) и в отрицательном и положительном контролях. Молекулярная и цитогенетическая природа как крупных, так и малых колоний мутантных клеток детально изучена. В исследовании TK+/- колонии подсчитывают, используя критерий нормального роста (для крупных) и медленного роста (для малых) колоний. Мутантные клетки, которые имеют наибольший генетический ущерб, имеют продленное время удвоения и, таким образом, формируют малые колонии. Этот ущерб обычно колеблется от потерь целого гена до выявляемых кариотипически хромосомных аберраций. Индукция мелких колоний мутантов связана с химическими веществами, которые индуцируют крупные хромосомные аберрации. Менее серьезно затронутые мутантные клетки растут в темпе, сходном с родительскими клетками, и формируют крупные колонии. Необходимо приводить данные о выживании (относительные эффективности клонирования) и относительном общем росте. Частота мутаций должна быть выражена как количество мутантных клеток на количество выживших клеток.

Должны быть предоставлены данные по индивидуальным культурам. Дополнительно все данные должны быть обобщены в форме таблицы.

Требования для подтверждения четкого положительного или отрицательного ответа отсутствуют. Неоднозначные результаты должны быть прояснены дальнейшим исследованием, предпочтительно с использованием модификации условий исследования. Отрицательные результаты необходимо подтверждать в каждом конкретном случае. Когда подтверждать отрицательные результаты не считают необходимым, должно быть предоставлено обоснование. В последующих исследованиях при неоднозначных либо отрицательных результатах следует учитывать модификацию параметров исследования для расширения диапазона оцениваемых условий. Параметры исследования, которые могут быть модифицированы, включают расширение диапазона концентраций и условия метаболической активации.

9.5.2 Оценка и интерпретация результатов

9.5.2.1 Общие положения

Существует несколько критериев для определения положительного результата, таких как повышение эффекта в зависимости от концентрации или воспроизводимое увеличение частоты мутаций. В первую очередь необходимо учитывать биологическую значимость результатов. Для помощи в оценке результатов исследования можно использовать статистические методы. Статистическая значимость не должна быть единственным определяющим фактором положительного ответа. Исследуемое вещество или экстракт, результаты для которого не отвечают вышеуказанным критериям, считается не мутагенным в данной системе. Хотя в большинстве исследований приведены четко положительные или отрицательные результаты, в редких случаях это не позволяет сделать определенное заключение об активности исследуемого образца. Результаты могут оставаться неоднозначными или сомнительными вне зависимости от количества повторов исследования.

Положительные результаты исследования генных мутаций клеток млекопитающих *in vitro* означают, что исследуемый образец индуцирует генные мутации в используемых культивированных клетках млекопитающих. Положительный воспроизводимый ответ зависимости эффекта от концентрации является наиболее значимым. Отрицательные результаты означают, что в условиях исследования исследуемый образец не индуцирует мутации гена в используемых культивированных клетках млекопитающих.

9.5.2.2 Критерии для определения валидности исследования

Для того чтобы тест на мутагенность считался валидным, необходимо его соответствие следующим критериям.

Отрицательные контроли: средняя частота спонтанных мутаций контрольных сред растворителя (или разбавителя) должна быть в пределах от 35 до 140 TFT-резистентных мутантных клеток на 10^6 выживших клеток. Низкие частоты спонтанных мутаций, т. е. от 20 до 34 мутаций на 10^6 выживших клеток, считают приемлемыми, если происходит восстановление малых колоний (см. [19]). Средняя эффективность клонирования контролей растворителя (или несущей среды) должна быть между 60 % и 120 %, а общий суспензионный рост — между 8 и 32 при 4-часовом воздействии (см. [20] и [21]).

Положительные контроли: частота мутаций по меньшей мере для одной дозы положительного контроля должна отвечать критериям положительного ответа и индуцировать увеличение малых мутантных колоний в соответствии со следующими критериями:

- 4 ч: ≥100 мутантов по сравнению с отрицательным контролем; или
- 24 ч — как определено положительным контролем индуцированной частоты мутаций, (IMF) ≥ $300 \cdot 10^{-6}$ мутантов с 40 % малых колоний; или
- IMF малых колоний для положительного контроля ≥$150 \cdot 10^{-6}$ (см. [20] и [21]).

9.5.2.3 Отчет об исследовании

Отчет об исследовании должен включать следующую информацию:

а) исследуемый образец или экстракт:

1) исследуемые медицинское изделие, компоненты или материалы,
2) идентификационные данные и номер CAS, если известен,
3) физическая природа и чистота исследуемых материалов, если известны,
4) физико-химические свойства, релевантные к проведению исследования,
5) стабильность исследуемого образца, если известна,
6) данные о стерильности,
7) описание подготовки исследуемого образца, включая обоснование выбора метода, растворителя и условий подготовки образца,
8) описание физических характеристик исследуемого образца, например, прозрачность, цвет и наличие частиц,

9) информация о длительности измеренной экстракции и времени, прошедшим между приготовлением образца и использованием в исследовании,

10) метод приготовления тестируемого образца с обоснованием выбора используемого метода. Согласно методу B ISO 10993-3 необходимо включить процент осадка, определенный в предварительном исследовании экстракции;

b) растворитель/разбавитель:

1) обоснование выбора растворителя/разбавителя,

2) растворимость и стабильность тестируемого образца в растворителе/разбавителе, если известны;

c) клетки:

1) тип и источник клеток,

2) количество клеточных культур,

3) число клеточных пассажей, в случае использования,

4) методы поддержания клеточных культур, если применимо,

5) отсутствие микоплазмы;

d) условия исследования:

1) обоснование выбора концентраций и количества культур, включая, например, данные цитотоксичности и ограничения растворимости, при их наличии,

2) метод приготовления тестируемого образца с обоснованием выбора метода,

3) состав среды, концентрация CO_2,

4) концентрация тестируемого образца или экстракта,

5) объем разбавителя и добавленного тестируемого образца или экстракта,

6) температура инкубации,

7) время инкубации,

8) длительность обработки,

9) плотность клеток при высевании,

10) информация о поставщике и контроле качества S9 (т. е. метод приготовления, линия грызунов, концентрация индуктора P450 и т. д.) должна быть отражена документально. Если S9 получен в собственной лаборатории, то источник и метод приготовления должны быть отражены документально. Необходимо записать концентрацию S9, используемую при исследовании,

11) тип и состав системы метаболической активации, включая критерий приемлемости,

12) положительный и отрицательный контроли,

13) длительность периода экспрессии (включая количество высеянных клеток, а также субкультуры и графики смены культуральной среды, в случае проведения),

14) селективный(ые) агент(ы),

15) критерии рассмотрения исследований как положительные, отрицательные или неоднозначные,

16) методы, используемые для подсчета количества жизнеспособных и мутантных клеток,

17) определение колоний, размер и тип которых учитывают (включая критерии для «малых» и «крупных» колоний, по применимости);

e) результаты:

1) признаки токсичности,

2) признаки преципитата,

3) данные по pH и осмолярности во время воздействия исследуемого образца, если определены,

4) размер колоний, если подсчитан, по меньшей мере для отрицательного и положительного контролей,

5) способность лаборатории определять малые мутантные колонии при помощи системы L5178YTK$^+$, где применимо,

6) данные «доза—ответ», в случае определения,

7) статистический анализ, при наличии,

8) данные отрицательного (раствор/растворитель) и положительного контроля проведенного эксперимента,

9) исторический отрицательный (раствор/растворитель) и положительный контроли лаборатории с диапазонами, средними показателями и стандартными отклонениями,

10) частота мутаций;

f) обсуждение результатов;

g) заключение.

10 Микроядерный тест *in vivo* на эритроцитах млекопитающих

10.1 Общие положения

Микроядерный тест *in vivo* на эритроцитах млекопитающих адаптирован для медицинских изделий путем использования OECD 474 [3]. В тест-системе для оценки генотоксичного потенциала медицинских изделий могут быть использованы медицинское(ий) изделие/материал, или экстракты из медицинского изделия/материала, или экстрагированные и выпаренные осадки из медицинского изделия/материала, или химические вещества.

При использовании двух экстрактов генотоксический потенциал каждого экстракта должен быть оценен в соответствии с данным разделом.

Экспозицию животных к тестируемому образцу осуществляют соответствующим способом. При использовании костного мозга животных умерщвляют в определенное время после обработки, извлекают костный мозг, готовят и окрашивают препараты. При работе с периферической кровью ее забирают через определенный интервал времени после воздействия, готовят мазки и окрашивают.

При исследованиях периферической крови промежуток времени между последним воздействием и забором клеток должен быть минимальным. Препараты анализируют на предмет наличия микроядер.

10.2 Препараты

10.2.1 Выбор вида животных

При анализе костного мозга рекомендуется использовать мышей или крыс, хотя также подходит другой подходящий вид млекопитающих. При анализе клеток периферической крови рекомендуется использовать мышей.

Тем не менее можно использовать любой другой вид млекопитающих, у которого селезенка не удаляет полихроматические эритроциты с микроядрами, или вид, который показал адекватную чувствительность к обнаружению агентов, вызывающих структурные или численные хромосомные аберрации или индуцирующие повреждения хромосом или митотического аппарата полихроматических эритроцитов. Как правило, выбирают молодых здоровых животных (от 6 до 12 нед) лабораторных линий во избежание жировых отложений в костном мозге, которые могут снижать четкость окрашенных препаратов. В начале исследования вариация веса животных должна быть минимальной и не превышать ±20 % среднего веса для особей каждого пола.

10.2.2 Условия размещения и питания

Температура в помещении исследуемых животных должна составлять (22 ± 3) °С. Животные могут быть размещены индивидуально или в клетках малыми группами (не более шести) одного пола. Хотя относительная влажность должна быть по меньшей мере 30 % и предпочтительно не превышать 70 %, значения данного показателя должны быть от 50 % до 60 %, кроме времени уборки помещения. Освещение должно быть искусственным, с чередованием 12 ч света и 12 ч темноты. Для кормления можно использовать стандартные лабораторные диеты с неограниченным доступом к питьевой воде. На выбор диеты может повлиять необходимость приготовления особой смеси корма при введении тестируемого образца или экстракта с кормом.

10.2.3 Подготовка животных

Здоровые молодые взрослые животные рандомизированно распределяют в группы контроля и обработки. Каждое животное имеет свой идентификационный номер. Животных акклиматизируют к условиям лаборатории в течение по меньшей мере пяти дней. Клетки должны быть размещены таким образом, чтобы минимизировать возможные эффекты, вызванные расположением клеток.

10.2.4 Подготовка исследуемого образца

Выбор способа подготовки образца для любого медицинского изделия должен учитывать химический состав и физико-химические свойства материала(ов), используемого(ых) в медицинском изделии. При приготовлении образца необходимо руководствоваться ISO 10993-12. Дополнительная информация приведена в приложении A ISO 10993-3:

- медицинские изделия или материалы, которые могут быть растворены или суспендированы в растворителе, используют непосредственно в качестве тестируемых образцов (см. приложение A, метод A ISO 10993-3);

- медицинские изделия или материалы, которые нерастворимы в растворителе, могут быть дозированы с использованием экстрактов в качестве исследуемого образца. Выбор методов экстракции зависит от процентной доли экстрагируемых веществ, полученных из исследуемого образца (см. приложение A, методы B и C ISO 10993-3), или результатов исследований *in vitro*.

Исследуемые экстракты должны быть использованы в течение 24 ч после приготовления. Если экстракт хранят более 24 ч, необходимо подтвердить стабильность и гомогенность экстракта при условиях хранения.

10.3 Условия исследования

10.3.1 Растворитель/разбавитель

Раствор/растворитель не должен вызывать токсических эффектов в применяемых дозах и вступать в химические реакции с тестируемым образцом. Если используют малоизвестные растворители, то их применение должно быть сопровождено данными, указывающими на их биосовместимость.

Тестируемые образцы должны быть приготовлены в соответствии с ISO 10993-12 или приложением A ISO 10993-3.

10.3.2 Контроли

В эксперименте должны быть соответствующие положительные и отрицательные контроли для особей каждого пола. Кроме обработки тестируемым образцом в экспериментальных группах животных, с животными в контрольных группах следует обращаться так же, как и с животными в экспериментальных группах. Положительные контроли должны вызывать значимое увеличение частоты микроядер *in vivo* по сравнению с фоновым уровнем. Дозы положительного контроля должны быть выбраны таким образом, чтобы эффекты были четкими, но при этом отсутствовало немедленное распознавание исследователем зашифрованных препаратов. Введение положительного контроля путем, отличающимся от пути введения тестируемого образца, и взятие только одной временной пробы являются допустимыми. Примеры веществ для положительного контроля включают следующие:

- этилметансульфонат [номер CAS 62-50-0],
- этилнитрозомочевина [номер CAS 759-73-9],
- митомицин С [номер CAS 50-07-7],
- циклофосфамид (моногидрат) [номер CAS 50-18-0 (номер CAS 6055-19-2)],
- триэтиленмеламин [номер CAS 51-18-3],
- MMS.

Дополнительно можно рассмотреть применение других подходящих химических веществ того же химического класса в качестве положительного контроля.

Животным отрицательного контроля вводят только растворители или разбавители, но в остальном с ними обращаются так же, как с животными в экспериментальных группах. Если имеется приемлемая межиндивидуальная вариативность и частота клеток с микроядрами соответствует историческому контролю, то при первом испытании образца может понадобиться только одна группа отрицательного контроля.

При заборе периферической крови в качестве одновременного отрицательного контроля может быть использована кровь до воздействия, но это касается только краткосрочных исследований (например, от одной до трех обработок), и с условием, что получаемые данные находятся в диапазоне исторического контроля лаборатории.

10.4 Проведение исследования

10.4.1 Количество и пол животных

Каждая экспериментальная и контрольная группы должны включать по меньшей мере пять подопытных животных каждого пола. Если на момент проведения эксперимента существуют аналогичные исследования, которые демонстрируют, что между полами не существует значительной разницы в токсичности, то животных одного пола будет достаточно. Если воздействие химических веществ на человека зависит от полового признака, как, например, в случае отдельных фармацевтических агентов, то исследование следует проводить с животными соответствующего пола.

10.4.2 Дизайн эксперимента

Исследование можно проводить на мышах или крысах одним из трех способов, описанных ниже.

а) Животным однократно вводят тестируемое вещество, либо исследуемые вещества могут быть введены дробно. Образцы костного мозга забирают по меньшей мере дважды, начиная не ранее чем через 24 ч, но не более 48 ч после воздействия с определенным(и) интервалом(ами) между пробами, кроме тех случаев, когда известно, что тестируемое вещество имеет исключительно длительный период полураспада. Время отбора проб ранее чем 24 ч после введения исследуемого вещества должно быть обосновано. Пробы периферической крови забирают по меньшей мере дважды, начиная не ранее чем

через 36 ч после обработки, с выбранными интервалами после первой пробы, но не более 72 ч. При обнаружении положительного ответа первой пробы дополнительные отборы крови не требуются, кроме тех случаев, когда необходима количественная информация по характеру «доза—ответ».

b) Если проводят два ежесуточных воздействия (например, два введения тестируемого вещества с интервалами в 24 ч), образцы костного мозга должны быть собраны однократно после последней обработки между 18 и 24 ч, а кровь — между 24 и 48 ч.

c) В варианте трех или более ежесуточных обработок (например, три или более введения с интервалами в 24 ч) пробы костного мозга следует забирать не позднее чем через 24 ч после последней обработки. Периферическую кровь следует забирать не позднее чем через 40 ч после последней обработки, однако наиболее приемлемым является отбор проб крови примерно через 24 ч после последней обработки.

Другие временные интервалы могут быть использованы при необходимости, и они должны быть научно обоснованы.

Исследования более высоких доз могут быть предпочтительными при наличии проблем с составом тестируемого химического вещества. В этих случаях используют две обработки в тот же день, разделенные по времени не более чем на несколько часов, для облегчения введения большого объема материала. Таким образом, можно вводить более высокую общую дозу. Выбор процедуры должен быть основан на данных о токсичности при их наличии.

Вариант длительного ежесуточного введения (например, в течение 28 сут) возможен, если для данного исследования продемонстрирован положительный эффект, или в случае отрицательного эффекта выявлена токсичность в эритропоэтической системе, или при введении предельной дозы введение продолжалось до времени отбора пробы.

10.4.3 Исследование предельных значений

Для исследований, основанных на дозах при конкретных массах тела, мг/кг, полное исследование, использующее три дозовых уровня, может не понадобиться, если:

- результаты по подбору доз или существующие данные по близким линиям животных указывают на то, что режим обработки, по меньшей мере, предельной дозы (описано ниже) не вызывает видимых токсических эффектов (включая отсутствие снижения пролиферации костного мозга); и
- генотоксичности не ожидается согласно данным исследованиям генотоксичности *in vitro* или данных по структурно схожим веществам.

В таких случаях введение однократной предельной дозы может быть достаточно. При введении в течение 14 сут или более предельной дозой является 1000 мг/кг массы тела/сут. Для периода введения менее чем 14 сут, предельной дозой является 2000 мг/кг массы тела/сут.

В случае введения экстрактов (см. ISO 10993-12) использование 100 %-ного экстракта тестируемого образца приемлемо и дальнейшее исследование доз не понадобится. При предполагаемом отрицательном воздействии тестируемого образца на человека необходимо использовать более высокий уровень доз при исследовании предельных значений.

10.4.4 Уровни доз

При предположении наличия токсичности необходимо проводить предварительный эксперимент по подбору дозировки (DRF). Это исследование может быть проведено перед основным экспериментом для определения токсичности тестируемого образца и установления уровней доз для основного исследования. В основном исследовании уровни доз для анализа образцов костного мозга/крови не должны быть летальными дозами, но должны охватывать диапазон от максимальной до небольшой токсичности или до ее отсутствия. Максимальная доза определена как доза, вызывающая такие признаки токсичности, что более высокие дозы в том же режиме дозирования приведут к летальному исходу.

Исследование должны проводить в той же лаборатории с использованием того же вида, линии и пола животных, а также схемы обработки, которые будут применяться в основном исследовании. Вещества с конкретной биологической активностью при низких нетоксичных дозах (такие как гормоны и митогены) могут быть исключениями для критериев определения уровня доз, поэтому дозы необходимо подбирать в каждом конкретном случае. Максимальная доза может также быть определена как доза, вызывающая определенный признак токсичности костного мозга (например, снижение доли незрелых эритроцитов от общего числа эритроцитов в костном мозге или периферической крови).

10.4.5 Пути введения и уровни доз

Физиологические растворы могут быть введены внутривенно не более 20 мл/кг для мышей и не более 10 мл/кг для крыс; органические растворители или экстракты могут быть инъецированы интраперитонеально при 20 мл/кг для мышей и 10 мл/кг для крыс. Другие пути воздействия могут быть при-

емлемы при достаточном обосновании, а также в том случае, если показано, что экстракт усваивается таким путем. Максимальный объем жидкости, который можно вводить за один прием посредством зонда или инъекции, зависит от размера исследуемого животного. Кроме раздражающих или разъедающих веществ, которые обычно индуцируют повышенные раздражающие эффекты при высоких концентрациях, вариации вводимых объемов должны быть минимизированы путем приготовления концентраций растворов, позволяющих вводить постоянный объем для всех уровней доз. Использование объемов, отличающихся от описанных выше, должно быть обосновано.

10.4.6 Препараты костного мозга/крови

Клетки костного мозга обычно выделяют из бедренных или больше берцовых костей немедленно после умерщвления животных. Клетки получают из бедренной, большеберцовой или плечевой кости, готовят препараты и окрашивают, используя стандартные методы. Периферическую кровь забирают из хвостовой вены или другого подходящего кровеносного сосуда. Клетки крови окрашивают суправитально или готовят мазки и затем окрашивают. В качестве альтернативы для проб, анализируемых с применением проточной цитометрии, готовят препараты образцов посредством валидизированных методов. Использование ДНК-специфичных красителей (например, акридинового оранжевого или Hoechst 33258[2)] плюс пиронин-Y) может убирать некоторые артефакты, связанные с использованием красителя, не специфичного к ДНК. Это преимущество не исключает применения традиционных красителей (например, Гимза). Дополнительные методы (например, колонки с целлюлозой для удаления клеток, содержащих ядра) могут также применять, если эти методы адекватно работают в лаборатории при подсчете клеток с микроядрами.

10.4.7 Анализ

Микроскопический анализ клеток костного мозга или периферической крови является общепринятым, тем не менее системы автоматизированного анализа (анализ изображений или проточная цитометрия клеточных суспензий) — приемлемая альтернатива оценке вручную, если они надлежащим образом обоснованы и валидизированы. Для снижения субъективности микроскописта все препараты, включая препараты положительного и отрицательного контроля, должны быть рандомизированы и кодированы (для снижения вероятности идентификации образца) перед микроскопическим анализом. Необходимо определить критерии определения микроядер перед подсчетом. Для костного мозга и периферической крови, используя микроскопический анализ, подсчитывают по меньшей мере 2000 полихроматических эритроцитов (PCE)/ретикулоцитов (RET) на животное при определении полихроматофильных эритроцитов с микроядрами (MN-PCE)/ретикулоцитов с микроядрами (MN-RET).

Для периферической крови, используя цитометрический метод, подсчитывают примерно 20000 ретикулоцитов (молодых эритроцитов) на животное. Дополнительная информация может быть получена путем подсчета нормохромных эритроцитов (NCE) с микроядрами (MN-NCE).

Для определения токсического воздействия экстрактов тестируемых соединений/вещества на эритропоэз определяют отношение доли полихроматофильных эритроцитов к общему числу эритроцитов (соотношение PCE/EC, где EC = PCE + MN-PCE + NCE + MN-NCE) при подсчете по меньшей мере 200 эритроцитов на каждое животное. Доля полихроматофильных эритроцитов от общего числа эритроцитов у животных, обработанных экстрактом тестируемых соединения/вещества, не должна быть ниже 80 % от показателя отрицательного контроля.

Процент ретикулоцитов в периферической крови определяют исходя из общего количества эритроцитов, подсчитанных для каждого животного и в среднем для группы воздействия. Процент ретикулоцитов в группах воздействия экстракта тестируемых соединения/вещества должен быть сопоставим с аналогичным в группах отрицательного контроля, в ином случае процентное соотношение будет указывать на токсичность.

10.5 Данные и отчетность

10.5.1 Оценка результатов

Данные по каждому животному следует представлять в табличной форме. Экспериментальной единицей является животное. Для каждого самца и самки необходимо документально отразить следующие данные: количество полихроматофильных эритроцитов, количество нормохромных эритроцитов и количество полихроматофильных и нормохромных эритроцитов с микроядрами. Доля полихромато-

[2)] Hoechst 33258 может быть получен от Hoechst ГмбХ, D-65926 Франкфурт-на-Майне. Эта информация приведена для удобства пользователей настоящим стандартом и не является рекламой ISO означенного продукта. Можно использовать эквивалентные продукты, если продемонстрировано, что они приводят к таким же результатам.

фильных эритроцитов к общему числу эритроцитов (соотношение PCE/EC) должна быть определена для каждого животного. Итоговые таблицы должны включать данные по каждому животному, средние значения частоты полихроматофильных эритроцитов с микроядрами и долю полихроматофильных эритроцитов от общего числа эритроцитов на каждую группу. В случае повышения доли полихроматофильных эритроцитов с микроядрами при действии исследуемого образца в качестве контроля могут быть подсчитаны нормохромные эритроциты с микроядрами, так как артефакты в любом анализируемом препарате вызовут повышение как нормохромных, так и полихроматофильных эритроцитов с микроядрами. Средние значения нормохромных эритроцитов с микроядрами также могут быть оформлены в виде таблицы. Если отсутствуют различия в показателях животных разного пола, для статистического анализа данные можно объединить. Могут быть применимы другие альтернативы в представлении результатов.

10.5.2 Оценка и интерпретация результатов

В большинстве экспериментов получают четко положительные или отрицательные результаты, основываясь на статистическом анализе. Тем не менее результаты статистического анализа могут быть не единственным критерием при оценке положительного ответа для тестируемого образца. При интерпретации данных необходимо учитывать следующее: в редких случаях полученные данные не дают определенного суждения об активности тестируемого образца. Результаты могут оставаться неоднозначными или сомнительными вне зависимости от количества проведенных повторов.

Отрицательные результаты означают, что в условиях эксперимента тестируемый образец не индуцирует полихроматофильные эритроциты с микроядрами у животных исследуемого вида.

Следует учитывать возможность того, что тестируемый образец, экстракт или его метаболиты могут достигнуть системы общего кровообращения или конкретной ткани-мишени (например, приведут к системной токсичности). Среднее количество полихроматофильных эритроцитов с микроядрами в контрольной группе (отрицательный контроль) не должно превышать 4 PCE на 1000 клеток.

Если результаты не отвечают критериям положительного или отрицательного генотоксического эффекта, результаты могут быть признаны неоднозначными или недостаточными; необходимо проведение дальнейшего исследования предпочтительно с модификацией условий эксперимента. Для подтверждения результата могут быть подсчитаны дополнительно 2000 PCE для каждого экспериментального и контрольного животного. Если ответ является подлинным и не вызван ошибкой исследования, статистическая значимость повысится вместе с возрастанием количества исследуемых клеток.

10.5.3 Отчет об исследовании

Отчет об исследовании должен включать следующую информацию:

a) исследуемый образец или экстракт:

1) исследуемые медицинское изделие, компоненты или материалы,
2) идентификационные данные и номер CAS, если известен,
3) физическая природа и чистота исследуемых материалов, если известны,
4) физико-химические свойства, релевантные к проведению исследования,
5) стабильность исследуемого образца, если известна,
6) данные о стерильности,
7) описание подготовки тестируемого образца, включая обоснование выбора метода, растворителя и условий приготовления образца,
8) описание физических характеристик тестируемого образца, например прозрачность, цвет и наличие частиц,
9) информация о длительности процесса экстракции и времени, прошедшем между приготовлением образца и использованием в исследовании,
10) метод приготовления тестируемого образца с обоснованием выбора используемого метода. Согласно методу B ISO 10993-3 необходимо включить процент осадка, определенный в предварительном исследовании экстракции;

b) растворитель/разбавитель:

1) обоснование выбора растворителя/разбавителя,
2) растворимость и стабильность тестируемого образца в растворителе/разбавителе, если известны;

c) исследуемые животные:

1) используемые вид/линия,
2) количество, возраст и пол животных,
3) источник, условия размещения, диета и т. д.;

d) результаты:

1) признаки токсичности,

2) время забора проб для каждой группы обработки,

3) доля незрелых эритроцитов среди общего числа эритроцитов,

4) количество незрелых эритроцитов с микроядрами, приведенное отдельно для каждого животного,

5) среднее стандартное отклонение для незрелых эритроцитов с микроядрами на группу,

6) данные «доза—ответ», при условии определения,

7) использованный статистический анализ и метод А,

8) отрицательный контроль в проведенном эксперименте и исторический отрицательный контроль лаборатории,

9) положительный контроль проведенного эксперимента и исторический положительный контроль лаборатории,

10) масса тела каждого животного и средний вес по группам (по полу),

11) клинические наблюдения для каждого животного;

e) обсуждение результатов;

f) заключение.

11 Метод оценки хромосомных аберраций *in vivo*

11.1 Общие положения

Метод оценки хромосомных аберраций *in vivo* адаптирован для медицинских изделий путем использования OECD 475 [4]. В тест-системах для оценки генотоксического потенциала медицинских изделий могут быть использованы медицинское(ий) изделие/материал, или экстракты из медицинского изделия/материала, или экстрагированные и выпаренные осадки из медицинского изделия/материала или химические вещества. При использовании двух экстрактов генотоксический потенциал каждого экстракта должен быть оценен в соответствии с данным разделом.

Животные должны быть экспонированы с использованием подходящего пути воздействия тестируемого образца. Животных умерщвляют в определенное время после обработки, извлекают костный мозг, готовят и окрашивают препараты. Препараты анализируют и метафазные клетки оценивают на предмет наличия структурных хромосомных аберраций.

11.2 Препараты

11.2.1 Выбор вида животных

Рекомендуется использовать мышей в возрасте от 6 до 12 нед или крыс в возрасте от 8 до 12 нед, хотя также может быть использован любой другой подходящий вид млекопитающих. Следует выбирать молодых здоровых животных широко применяемых лабораторных линий. В начале исследования изменение веса животных должно быть минимальным и не превышать ±20 % среднего веса для каждого пола.

11.2.2 Условия размещения и питания

Температура в помещении, где содержатся исследуемые животные, должна составлять от 18 °С до 26 °С. Хотя относительная влажность должна быть не менее 30 % и предпочтительно не превышать 70 %, кроме времени уборки помещения рекомендуются значения данного показателя от 50 % до 60 %. Освещение должно быть искусственным, с чередованием 12 ч света и 12 ч темноты. Для кормления можно использовать стандартные лабораторные диеты с неограниченным доступом к питьевой воде. На выбор диеты может повлиять необходимость приготовления особой смеси корма при введении тестируемого образца или экстракта с кормом. Животные могут быть размещены индивидуально или малыми группами одного пола в одной клетке.

11.2.3 Подготовка животных

Здоровые молодые взрослые животные рандомизированно распределяют в группы контроля и воздействия. Каждое животное имеет свой идентификационный номер. Животных акклиматизируют к условиям лаборатории в течение по меньшей мере пяти дней. Клетки должны быть размещены таким образом, чтобы минимизировать возможные эффекты, вызванные расположением клеток.

11.2.4 Подготовка исследуемого образца

Выбор способа подготовки образца для медицинского изделия должен учитывать химический состав и физико-химические свойства материала или материалов, используемых в медицинском изде-

лии. При подготовке образца необходимо руководствоваться ISO 10993-12. Дополнительная информация приведена в приложении A ISO 10993-3:

- медицинские изделия или материалы, которые могут быть растворены или суспендированы в растворителе, используют непосредственно в качестве тестируемых образцов (см. приложение A, метод A ISO 10993-3);
- медицинские изделия или материалы, которые нерастворимы в растворителе, могут быть дозированы с использованием экстрактов в качестве тестируемого образца. Выбор методов экстракции зависит от процентной доли экстрагируемых веществ, полученных из исследуемого образца (см. приложение A, методы B и C ISO 10993-3) или результатов исследований *in vitro*.

Исследуемые экстракты должны быть использованы в течение 24 ч после приготовления. Если экстракт хранят более 24 ч, необходимо сообщить об условиях хранения.

11.3 Условия исследования

11.3.1 Растворитель/разбавитель

Растворитель/разбавитель должны быть выбраны в соответствии с ISO 10993-12 или приложением A ISO 10993-3 и не вызывать токсические эффекты при применяемых уровнях доз. Если используют малоизвестные растворители, их включение должно быть сопровождено данными, указывающими на их биосовместимость.

11.3.2 Контроли

Соответствующие положительные и отрицательные (растворитель/разбавитель) контроли должны быть включены для каждого пола. Кроме обработки тестируемым образцом в экспериментальных группах животных, с животными в контрольных группах следует обращаться так же, как и с животными в экспериментальных группах.

Положительные контроли должны индуцировать значимое повышение частоты метафаз со структурными хромосомными аберрациями *in vivo* по сравнению с фоновым уровнем. Дозы положительного контроля должны быть выбраны так, чтобы эффекты были четкими, но не допускали немедленного распознавания зашифрованных препаратов исследователем. Введение положительного контроля путем, отличающимся от пути введения тестируемого образца, и взятие только одной временной пробы является приемлемым.

Примеры веществ положительного контроля включают следующие:

- этилметансульфонат [номер CAS 62-50-0],
- этилнитрозомочевина [номер CAS 759-73-9],
- митомицин C [номер CAS 50-07-7],
- циклофосфамид (моногидрат) [номер CAS 50-18-0 (номер CAS 6055-19-2)],
- триэтиленмеламин [номер CAS 51-18-3].

Животные отрицательного контроля, которым введены только растворители или разбавители, а в остальном с ними обращаются так же, как с животными в экспериментальных группах, включены в каждый временной интервал исследования, кроме когда имеющиеся данные контроля демонстрируют приемлемый разброс показателей между животными и частоту клеток со структурными хромосомными аберрациями, соответствующую историческому контролю. Если для отрицательных контролей применяют единственный временной интервал, то наиболее подходящим временем является первый отбор.

11.4 Проведение исследования

11.4.1 Количество и пол животных

Каждая экспериментальная и контрольная группа включает по меньшей мере пять подопытных животных особей каждого пола. Если на момент проведения эксперимента существуют аналогичные исследования, которые демонстрируют, что между полами не существует значительной разницы в токсичности, то животных одного пола будет достаточно. Если воздействие химических веществ на человека зависит от пола, как, например, в случае отдельных фармацевтических агентов, то исследование проводят с животными соответствующего пола.

11.4.2 Дизайн эксперимента

Не менее чем за 18 ч до введения тестируемого образца животных не кормят, они получают воду в неограниченном количестве. В начале эксперимента животных взвешивают для индивидуальной коррекции вводимого количества образца в зависимости от массы тела животного. Тестируемый образец вводят однократно. Для каждой дозы вводимого образца экспериментальная группа состоит из двенад-

цати животных (шесть самцов и шесть самок). Животных осматривают на предмет острых токсических симптомов после 1 ч, затем от 2 до 4 ч, и через 6 и 24 ч после обработки. За 2,5 ч перед забоем животным интраперитонеально вводят ингибитор веретена деления Colcemid®[3)] (2,0 мг/кг массы тела) для остановки митоза на стадии метафазы.

11.4.3 Уровни доз

В случае возникновения токсичности необходимо проводить предварительное испытание по подбору доз (DRF). Данное исследование может быть проведено перед основным экспериментом для определения токсичности препарата тестируемого образца и уровней доз для основного исследования.

При проведении исследования подбор доз следует проводить в лаборатории, задействуя тот же вид, линию и пол животных, а также режим обработки, которые будут использоваться в основном исследовании. При наличии токсичности при первом времени забоя используют три уровня доз. Эти значения доз должны охватывать диапазон от максимальной до небольшой токсичности или до ее отсутствия. При позднем времени забоя следует применять только максимальную дозу. Максимальная доза — это доза, вызывающая признаки токсичности, при которых уровни, превышающие дозы, вводимые по аналогичной схеме, приведут к летальному исходу. Вещества с конкретной биологической активностью при низких нетоксичных дозах (такие, как гормоны и митогены) могут быть исключением для критериев определения уровня дозы (доз), и их необходимо подбирать в каждом конкретном случае. Максимальная доза может также быть определена как доза, вызывающая признак токсичности для костного мозга (например, снижение митотического индекса).

11.4.4 Исследование предельных значений

Для исследований, основанных на дозах при конкретной массе тела, мг/кг, полное исследование, использующее три дозовых уровня, не является необходимым, если:

- результаты по подбору доз или существующие данные по близким линиям животных указывают на то, что режим обработки, по меньшей мере, максимальной дозы (описано ниже) не вызывает видимых токсических эффектов (включая отсутствие снижения пролиферации костного мозга); и
- предположительное отсутствие генотоксичности ввиду данных исследований генотоксичности *in vitro* или данных по структурно схожим веществам.

Введение максимальной дозы однократно в таких случаях может быть достаточным. При введении в течение 14 сут или более максимальной дозой является 1000 мг/кг массы тела/сут. При введении менее 14 сут предельной дозой является 2000 мг/кг массы тела/сут. В случае введения экстрактов (см. ISO 10993-12) использование 100 %-ного экстракта тестируемого образца приемлемо, и дальнейшее исследование доз не является необходимым. При предполагаемом отрицательном воздействии тестируемого образца на человека следует использовать более высокий уровень доз при исследовании предельных значений.

11.4.5 Уровни доз и способы их введения

Физиологические растворы, вводимые внутривенно для мышей массой тела не более 20 мл/кг, и для крыс массой тела не более 10 мл/кг, органические растворители или экстракты могут быть введены интраперитонеально при массе тела 20 мл/кг для мышей и массе тела 10 мл/кг для крыс. Другие пути воздействия могут быть приемлемы при обосновании и если показано, что экстракт усваивается таким путем. Максимальный объем жидкости, который может быть введен за один прием посредством зонда или инъекции, зависит от размера исследуемого животного. Кроме раздражающих или разъедающих веществ, которые обычно индуцируют повышенные раздражающие эффекты при высоких концентрациях, вариации вводимых объемов должны быть минимизированы путем приготовления концентраций растворов, позволяющих вводить постоянный объем для всех уровней доз. Использование других объемов должно быть обоснованным.

Для остановки клеток в метафазе все животные получают однократную интраперитонеальную инъекцию (IP) колхицина в дозе, составляющей примерно 2 мг/кг массы тела. Колхицин вводят животным не менее чем за 2—4 ч до назначенного времени забора костного мозга.

11.4.6 Забор костного мозга и приготовление гистологических препаратов

Клетки костного мозга забирают из бедренных или больших берцовых костей немедленно после умерщвления. Для остановки клеток на стадии метафазы клеточную суспензию костного мозга подвергают гипотонии, фиксируют и наносят на стекла. Препараты окрашивают по Гимза.

[3)] Colcemid является торговой маркой продукта, поставляемого компанией Ciba-Geigy Company, Базель, Швейцария. Эта информация приведена для удобства пользователей настоящего стандарта и не является рекламой ISO означенного продукта. Можно использовать эквивалентные продукты, если продемонстрировано, что они приводят к аналогичным результатам.

11.4.7 Метафазный анализ

Оценку препаратов проводят микроскопически, структурные и численные аберрации документируют. Для анализа аберраций хромосом анализируют минимум по 100 метафаз на зашифрованный препарат от каждого животного. Оценка структурных аберраций документально отражает следующее:

- аберрации хроматидного типа (хроматидные и изохроматидные разрывы и обмены), такие как квадрорадиалы (симметричные и асимметричные обмены), трирадиалы и сложные перестройки;
- аберрации хромосомного типа (хромосомные разрывы и обмены), такие как дицентрические и кольцевые хромосомы;
- фрагменты, наблюдаемые с обменами, не будут считаться аберрациями, но будут рассматриваться как часть неполного обмена;
- пульверизация хромосом, клеток и значительно поврежденные клетки (≥ 10 аберраций) также должны быть отмечены;
- хроматидные и изохроматидные пробелы будут зафиксированы, но не включены в анализ аберраций хроматидного типа.

Численные аберрации (процент полиплоидных и эндоредуплицированных клеток) оценивают на 100 клеток на стадии метафазы на каждое животное. Митотический индекс (MI) выражается как процент клеток в митозе, основываясь на подсчет 1000 клеток от каждого животного. Средний MI вычисляют для каждой группы животных (включая группу положительного и отрицательного контроля), который служит в качестве параметра ингибирования клеточного деления и цитотоксичности.

11.5 Данные и отчетность

11.5.1 Обработка результатов

Экспериментальной единицей является животное. Индивидуальные данные по животным представлены в табличной форме вместе со средними значениями, стандартным отклонением и статистической достоверностью, при определении. Количество клеток с хромосомными аберрациями и митотическим индексом приведено отдельно для каждого подопытного животного.

11.5.2 Оценка и интерпретация результатов

Существуют критерии для определения положительного результата — таких как четкое повышение количества клеток со структурными хромосомными аберрациями в группе при введении однократной дозы при однократном временном взятии материала для исследования или повышение количества клеток со структурными хромосомными аберрациями с увеличением дозы (для токсических образцов требуется несколько доз). Необходимо учитывать биологическую значимость результатов. Для помощи в оценке результатов исследования используют статистические методы. Статистическая значимость не должна быть единственным определяющим фактором положительного ответа. Неоднозначные результаты должны быть выяснены при дальнейшем исследовании, предпочтительно посредством модификации условий исследования. Если тестируемый материал введен при максимально возможной дозе или при верхнем пределе в 2000 мг/кг и значительное повышение количества клеток со структурными хромосомными аберрациями не наблюдалось, эффект должен быть классифицирован как отрицательный в условиях проведения данного исследования.

Тестируемые вещество или экстракт, результаты для которых не отвечают вышеуказанному критерию, считают некластогенным в данной тест-системе. Хотя большинство исследований дают четко положительные или отрицательные результаты, в редких случаях полученные результаты не позволяют сделать определенный вывод об активности тестируемого образца. Результаты могут оставаться неоднозначными или сомнительными вне зависимости от количества повторов исследования. Положительные результаты исследования хромосомных аберраций означают, что вещество индуцирует структурные хромосомные аберрации, являющиеся результатом хромосомных повреждений в эритробластах исследуемого вида животных. Отрицательные результаты означают, что в условиях исследования исследуемый образец не индуцирует структурные хромосомные аберрации.

Необходимо учитывать вероятность того, что исследуемый образец, экстракт или его метаболиты могут достигнуть общего кровообращения или конкретно ткани-мишени (например, в случае системной токсичности). Частота аберраций в группе отрицательного контроля должна быть ниже 2 %. Частота структурных хромосомных аберраций в группе положительного контроля должна быть значительно выше по отношению к отрицательному контролю (с разбавителем).

11.5.3 Отчет об исследовании

Отчет об исследовании должен включать следующую информацию:

a) исследуемый образец или экстракт:

1) исследуемые медицинское изделие, компоненты или материалы,

2) идентификационные данные и номер CAS, если известен,

3) физическую природу и чистоту исследуемых материалов, если известны,

4) физико-химические свойства, релевантные к проведению исследования,

5) стабильность тестируемого образца, если известна,

6) данные о стерильности,

7) описание подготовки тестируемого образца, включая обоснование выбора метода, растворителя и условий приготовления образца,

8) описание физических характеристик тестируемого образца, например прозрачность, цвет и наличие частиц,

9) информацию о длительности процесса экстракции и времени, прошедшего между приготовлением образца и использованием в исследовании,

10) метод приготовления исследуемого образца с обоснованием выбора используемого метода. Для метода B ISO 10993-3 необходимо включить процент осадка, определенный в предварительном исследовании экстракции;

b) растворитель/разбавитель:

1) обоснование выбора растворителя/разбавителя,

2) растворимость и стабильность тестируемого образца в растворителе/разбавителе, если известны,

c) исследуемые животные:

1) используемые вид/линия,

2) количество, возраст и пол животных,

3) источник, условия размещения, диету и т. д.,

4) индивидуальную массу тела животных в начале и конце исследования, включая диапазон массы тела, среднюю величину и стандартное отклонение для каждой группы,

5) документальное фиксирование результатов клинических наблюдений для каждого животного,

d) условия исследования:

1) данные положительного и отрицательного (с растворителем/разбавителем) контроля,

2) метод приготовления тестируемого образца с обоснованием выбора метода,

3) данные исследования подбора дозировки, в случае проведения,

4) обоснование выбора уровня доз,

5) подробности приготовления тестируемых образца или экстракта,

6) подробности введения тестируемого образца,

7) обоснование пути введения,

8) методы, удостоверяющие, что тестируемый образец достиг системы кровообращения или ткани-мишени, если необходимо,

9) пересчет концентрации тестируемых образца или экстракта в диете/питьевой воде (ppm) значение реальной дозы (мг/кг массы тела/день), если необходимо,

10) подробности качества пищи и воды,

11) подробное описание графиков введения тестируемого образца и отбора проб,

12) методы приготовления препаратов,

13) методы измерения токсичности,

14) критерии подсчета структурных хромосомных аберраций в клетках костного мозга,

15) количество клеток, анализированных на каждое животное,

16) критерии рассмотрения исследований как положительные, отрицательные или неоднозначные;

e) результаты:

1) признаки токсичности,

2) клетки в митозе — определение митотического индекса,

3) количество клеток со структурными и численными хромосомными аберрациями, приведенное отдельно для каждого животного,

4) данные «доза—ответ», в случае определения,

5) примененные статистический анализ и используемый метод,

6) отрицательный контроль в проведенном эксперименте и исторический отрицательный контроль лаборатории,

7) положительный контроль проведенного эксперимента и положительный исторический контроль лаборатории,

f) обсуждение результатов;

g) заключение.

Библиография

Библиография общая

[1] OECD. 471, Bacterial Reverse Mutation Test

[2] OECD. 473, *In vitro* Mammalian Chromosome Aberration Test

[3] OECD. 474, Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test

[4] OECD. 475, Mammalian Bone Marrow Chromosome Aberration Test

[5] OECD. 476, *In vitro* Mammalian Cell Gene Mutation Test

[6] OECD. 487, *In vitro* Mammalian Cell Micronucles Test

Библиография по трансгенным животным

[7] Short JM., & Kohler SW., and Provost, GS. The use of lambda phage shuttle vectors in transgenic mice for development of a short term mutagenicity assay. Prog. Clin. Biol. Res. 1990, 340A pp. 355—367

Библиография по оценке клеточной трансформации

[8] Leboeuf R.A., Kerckaert K.A., A adema M.J., Isfort R.J. Use of the Syrian hamster embryoand BALB/c 3T3 cell transformation for assessing the carcinogenic potential of chemicals. IARCSci. Publ. 1999, 146 pp. 409—425. Available at: gost.e-ecolog.ru

Библиография для оценки генотоксичности

[9] Official Journal of the European Communities. L 133/73, May 1988, concerning *in vitro* cell transformation tests

[10] Ashby J. & Tinwell H. The rodent bone marrow micronucleus assay: contrast between its sensitivity to human carcinogens and its insensitivity to NTP rodent carcinogens — Mutat. Res.1996, 352 pp. 181—184

[11] Clive D., & Spector J.F.S. Laboratory procedure for assessing specific locus mutations at the TKlocus in cultured L5178Y mouse lymphoma cells. Mutat. Res. 1975, 31 pp. 17—29

[12] Benigni R. Mouse bone marrow micronucleus assay: relationships with *in vitro* mutagenicity and rodent carcinogenicity — J. Toxicol. Environ. Health. 1995, 45 pp. 337—347

[13] Cimino M. Comparative Overview of Current International Strategies and Guidelines for Genetic Toxicology Testing for Regulatory Purposes. Environ. Mol. Mutagen. 2006, 47 pp. 362—390

[14] Guidance for Industry S2(R1) Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended for Human Use. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Biologics Evaluation and Research (CBER), June 2012, available at: gost.e-ecolog.ru gov/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidance

[15] Elespuru R.K. FORUM: Current and Future Application of Genetic Toxicity Assays: The Role and Value of In Vitro Mammalian Assays. Toxicol. Sci. 2009, 109 pp. 172—179

[16] Fellows M.D., Boyer S., O'Donovan M.R. The incidence of positive results in the mouse lymphoma TK assay (MLA) in pharmaceutical screening and their prediction by MultiCase MC4PC. Mutagenesis. 2011, 26 pp. 529—532

[17] Gollapudi B. Schisler, M.R., and Moore M.M., Evaluation of publicly available mouse lymphoma assay data using currently accepted standards to establish a curated data base. Toxicologist. 2010, 114 p. 148

[18] Kirkland D., Aardema M., Henderson L., Muller L. Evaluation of the ability of a battery of three *in vitro* genotoxicity tests to discriminate rodent carcinogens and non-carcinogens I.Sensitivity, specificity and relative predictivity — Mutat. Res. 2005, 584 pp. 1—256

[19] Mitchell A.D., Auletta A.E., Clive D., Kirby P.E., Moore M.M., Myhr B.C. TheL5178Y/tk± mouse lymphoma specific gene and chromosomal mutation assay a phase III report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. Mutat. Res. 1997 Nov 27, 394 (1—3) pp. 177—303

[20] Moore M.M., Honma M., Clements J., Bolcsfoldi G., Cifone M., Delongchamp R. Jr, Thakur A., Wakuri, S., Yoshimura, I., (2003). Mouse lymphoma thymidine kinase gene mutation assay: International Workshop on Genotoxicity Tests Workgroup report—Plymouth, UK 2002. Volume540, Issue 2, 7 October 2003, pp. 127—140

[21] Moore M.M., Honma M., Clements J., Bolcsfoldi G., Burlinson B., Cifone M. Jr, Thakur, A.K., Van Goethem, F., Wakuri, S., Yoshimura, I., (2003). Mouse lymphoma thymidine kinase gene mutation assay: follow-up meeting of the International Workshop on Genotoxicity Testing--Aberdeen, Scotland, --Assay acceptance criteria, positive controls, and data evaluation. Environ Mol Mutagen. 2006 Jan; 47(1):1-5. PMID:15991242.

[22] Moore-Brown M.M., Clive D., Howard B.E., Batson A.G., Johnson K.O. The utilization of trifluorothymidine (TFT) to select for thymidine kinase-deficient (TK−/−) mutants from L5178Y/TK± mouse lymphoma cells. Mutat. Res. 1981, 85 (5) pp. 363—378

[23] Moore M.M. The Mouse Lymphoma Thymidine Kinase locus (tk) gene mutation assay: International Workshop on Genotoxicity Test Procedures (IWGTP) Workgroup report. Environ. Mol. Mutagen. 2000, 35 pp. 185—190

[24] Morita T., Asano N., Awogi T., Sasaki Y.F., Sato S., Shimada H. Evaluation of the rodent micronucleus assay in the screening of IARC carcinogens (groups 1, 2A and 2B) — The summary report of the 6th collaborative study by CSGMT/JEMS · MMS. Mutat. Res. 1997, 389 pp. 3—122

[25] Rosenkranz H., & Cunningham A. The high production volume chemical challenge program: the relevance of the in vivo micronucleus assay — Regul. Toxicol. Pharmacol. 2000, pp. 182—189

[26] Shelby M.D. Selecting chemicals and assays for assessing mammalian germ cell mutagenicity. Mutat. Res. 1996, 352 (3) pp. 159—167

[27] Shelby M.D., Erexson G.L., Hook G.J., Tice R.R. Evaluation of the three-exposure mouse bone marrow micronucleus protocol, results with 49 chemicals. Environ. Mol. Mutagen. 1993, 21 pp. 160—179

[28] Shelby M.D., & Zeiger E. Activity of human carcinogens in the Salmonella and rodent bone marrow cytogenetics tests. Mutat. Res. 1990, 234 (3—4) pp. 257—261

[29] Snyder R.D. Possible structural and functional determinants contributing to the clastogenicity of pharmaceuticals. Environ Mol Mutagen, 2010, 51, pp. 800-14.

[30] Snyder R.D. An Update on the Genotoxicity and Carcinogenicity of Marketed Pharmaceuticals with Reference to In Silico Predictivity. Environ Mol Mutagen, 2009, 50, pp. 435—450

[31] Tweats D.J., Blakey D., Heflich R.H., Jacobs A., Jacobsen S.D., Morita T. Report of the IWGTworking group on strategy/interpretation for regulatory in vivo tests II. Identification of in vivo only positive compounds in the bone marrow micronucleus test. Mutat. Res. 2007, 627 pp. 92—105

[32] Tweats D.J., Scott A.D., Westmoreland C., Carmichael P.L. Determination of genetic toxicity and potential carcinogenicity *in vitro* — challenges post the seventh amendment to the European Cosmetics Directive. Mutagenesis. 2007, 22 pp. 5—13

[33] Witt K., Knapton A., Wehr C., Hook G., Mirsalis J., Shelby M. Micronucleated erythrocyte frequency in peripheral blood of B6C3F Mice from short-term, prechronic, and chronic studies of the NTP carcinogenesis bioassay program. Environ. Mol. Mutagen. 2000, 36 pp. 163—194

УДК 615.46:002:006.354 МКС 01.020 Р20 IDT

Ключевые слова: изделия медицинские, оценка генотоксичности, технический отчет — ТО

БЗ 5—2018/17

Редактор *Л.С. Зимилова*
Технический редактор *И.Е. Черепкова*
Корректор *М.И. Першина*
Компьютерная верстка *Л.А. Круговой*

Сдано в набор 04.10.2018. Подписано в печать 25.10.2018. Формат 60×84 1/8. Гарнитура Ариал.
Усл. печ. л. 5,58. Уч.-изд. л. 5,02.
Подготовлено на основе электронной версии, предоставленной разработчиком стандарта

Создано в единичном исполнении ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ» для комплектования Федерального информационного фонда стандартов, 117418 Москва, Нахимовский пр-т, д. 31, к. 2.

gost.e-ecolog.ru gost.e-ecolog.ru

gost.e-ecolog.ru