Государственное санитарно-эпидемиологическое нормирование Российской Федерации

1.2. ОБЩИЕ ВОПРОСЫ. ГИГИЕНА, ТОКСИКОЛОГИЯ, САНИТАРИЯ

Оценка мутагенной активности пестицидов

Методические указания
МУ 1.2.3364—16

Издание официальное

Москва • 2016

gost.e-ecolog.ru

Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

1.2. ОБЩИЕ ВОПРОСЫ. ГИГИЕНА, ТОКСИКОЛОГИЯ, САНИТАРИЯ

Оценка мутагенной активности пестицидов

Методические указания
МУ 1.2.3364—16

ББК 51.2
О-93

О-93 **Оценка** мутагенной активности пестицидов: Методические указания.—М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2016.—49 с.

ISBN 978—5—7508—1495—4

1. Разработаны ФБУН «Федеральный научный центр гигиены им. Ф.Ф. Эрисмана» Роспотребнадзора (академик РАН, профессор В. Н. Ракитский; д.б.н., профессор Ю. А. Ревазова; к.б.н. Н. А. Илюшина; к.б.н. О. В. Егорова; д.м.н., профессор Т. А. Синицкая; д.м.н., профессор Е. Г. Чхвиркия); ФГБУ «Научно-исследовательский институт экологии человека и гигиены окружающей среды им. А. Н. Сысина» (д.м.н., профессор В. С. Журков; д.б.н., профессор Л. П. Сычева); ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фармакологии им. В. В. Закусова» (профессор, член-корр. РАН, А. Д. Дурнев, к.б.н. А. К. Жанатаев); ФГБУН «Институт общей генетики им. Н. В. Вавилова» РАН (д.б.н., профессор С. К. Абилев).

2. Рекомендованы к утверждению Комиссией по государственному санитарно-эпидемиологическому нормированию Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека.

3. Утверждены Руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации А. Ю. Поповой 4 июля 2016 г. и введены в действие с момента утверждения.

4. Введены впервые.

ББК 51.2

ISBN 978—5—7508—1495—4

© Роспотребнадзор, 2016
© Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2016

Содержание

1. Область применения 4
2. Нормативные ссылки 5
3. Термины и определения 6
4. Оценка мутагенной активности пестицидов 8
4.1. Описание системы оценки мутагенной активности 9
4.2. Принципы отбора пестицидов, препаративных форм и их компонентов для испытания на мутагенную активность 10
5. Пути введения пестицидов, выбор доз, объекты исследования 10
5.1. Исследования *in vivo*. 10
5.2. Исследования *in vitro* 12
6. Методы оценки мутагенности пестицидов 13
6.1. Мутационный тест на *Salmonella typhimurium* и *Escherichia coli* (тест Эймса) 13
6.2. Учет аберраций хромосом в клетках костного мозга млекопитающих 18
6.3. Оценка хромосомных аберраций в клетках млекопитающих *in vitro* 22
6.4. Учет микроядер в клетках млекопитающих *in vivo* 27
6.5. Учет микроядер в клетках млекопитающих *in vitro* 30
6.6. Оценка ДНК-повреждающей активности *in vivo* методом ДНК-комет в щелочной версии 37
6.7. Оценка ДНК-повреждающей активности *in vitro* методом ДНК-комет в щелочной версии 43
Заключение 47
Библиографические данные 49

УТВЕРЖДАЮ
Руководитель Федеральной службы
по надзору в сфере защиты прав
потребителей и благополучия человека,
Главный государственный санитарный
врач Российской Федерации
А. Ю. Попова
4 июля 2016 г.

1.2. ОБЩИЕ ВОПРОСЫ. ГИГИЕНА,
ТОКСИКОЛОГИЯ, САНИТАРИЯ

Оценка мутагенной активности пестицидов

Методические указания
МУ 1.2.3364—16

1. Область применения

Настоящие методические указания устанавливают порядок проведения комплексной оценки мутагенной активности действующих веществ пестицидов, препаративных форм и их компонентов согласно требованиям отечественных и международных нормативных правовых документов.

Методические указания предназначены для использования при токсиколого-гигиенической оценке пестицидов для установления класса опасности по показателю «мутагенность» и разработке мер по предотвращению их неблагоприятного влияния на здоровье населения и повышению надежности разрабатываемых гигиенических нормативов и регламентов применения пестицидов.

Методы оценки мутагенной активности пестицидов применимы в случаях:

– регистрации и перерегистрации пестицидов;

– изменения состава или вида препаративной формы;

– разработки гигиенических нормативов и регламентов применения;

– проведения эпидемиологических исследований в регионах с повышенной пестицидной нагрузкой.

Методические указания предназначены для специалистов органов и организаций Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, а также научно-исследовательских

организаций, лабораторий и кафедр гигиенического профиля, занимающихся оценкой опасности пестицидов на всех этапах их обращения и гигиеническим нормированием пестицидов в объектах окружающей среды.

2. Нормативные ссылки

2.1. Федеральный закон от 30 марта 1999 г. № 52-ФЗ «О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения» (с изменениями и дополнениями).

2.2. Федеральный закон от 19 июля 1997 г. № 109-ФЗ «О безопасном обращении с пестицидами и агрохимикатами» (с изменениями и дополнениями).

2.3. Федеральный закон от 21 июля 2012 г. № 126-ФЗ «О ратификации Протокола присоединения Российской Федерации к Маракешскому соглашению об учреждении Всемирной торговой организации» от 15 апреля 1994 г. с приложениями.

2.4. Единые санитарно-эпидемиологические и гигиенические требования к товарам, подлежащим санитарно-эпидемиологическому надзору (контролю), утвержденные Решением Комиссии Таможенного союза от 28 мая 2010 г. № 299.

2.5. Постановление Правительства Российской Федерации от 28 сентября 2009 г. № 761 «Об обеспечении гармонизации российских санитарно-эпидемиологических требований, ветеринарно-санитарных и фитосанитарных мер с международными стандартами».

2.6. Санитарные правила и нормативы СанПиН 1.2.2584—10 «Гигиенические требования к безопасности процессов испытаний, хранения, перевозки, реализации, применения, обезвреживания и утилизации пестицидов и агрохимикатов, утвержденные Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации 2 марта 2010 г.

2.7. Приказ Министерства сельского хозяйства Российской Федерации от 10 июля 2007 г. № 357 «Об утверждении Порядка государственной регистрации пестицидов и агрохимикатов».

2.8. Руководство Р 1.2.3156—13 «Оценка токсичности и опасности химических веществ и их смесей для здоровья человека», утвержденное Главным государственным санитарным врачом РФ 27 декабря 2013 г.

2.9. ГОСТ 32376—2013 «Методы испытания по воздействию химической продукции на организм человека. Метод оценки обратных мутаций на бактериях», введенный в действие приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 22 ноября 2013 г. № 805-ст.

2.10. ГОСТ 32635—2014 «Методы испытания по воздействию химической продукции на организм человека. Микроядерный тест на клетках млекопитающих *in vitro*», введен в действие 01.06.2015.

3. Термины и определения

Аберрации хроматидного типа – структурные нарушения на уровне одной хроматиды, выявляемые как одиночные фрагменты или хроматидные обмены.

Аберрации хромосомного типа – структурные нарушения на уровне идентичных локусов обеих хроматид, выявляемые как парные фрагменты и хромосомные обмены.

Анеуген – любое соединение, которое, взаимодействуя с компонентами цикла деления митотических и мейотических клеток, приводит к анеуплоидии в клетках или организмах.

Анеуплоидия – любое отклонение от нормального диплоидного (или гаплоидного) числа хромосом на одну или более хромосом, но не на полный набор хромосом (полиплоидия).

Ахроматические пробелы (гепы) – определяемые визуально нарушения целостности окраски хроматиды, не превышающие по размеру ее ширины и не сопровождающиеся сдвигом дистального участка относительно ее оси.

Длина хвоста – показатель поврежденности ДНК, определяемый расстоянием между концом профиля головы и концом профиля хвоста.

Индекс пролиферации при блоке цитокинеза (*CBPI*) – доля клеток второго деления в обработанной популяции относительно контроля без обработки.

Индекс репликации (*RI*) – доля завершенных циклов клеточного деления в обработанных культурах по отношению к культурам без обработки в течение периода экспозиции и восстановления.

Кластоген – любое соединение, которое вызывает структурные хромосомные аберрации в популяции клеток или организмов.

Комета – структура, формируемая ДНК клетки, лизированной в агарозном геле, под действием электрического поля.

Метод ДНК-комет (гель-электрофорез отдельных клеток) – метод регистрации первичных повреждений ДНК на уровне ДНК отдельных клеток/ядер.

Микроядерный тест – определение частоты клеток с микроядрами и числа микроядер на клетку.

Микроядра – небольшие ДНК-содержащие образования, состоящие из ацентрических фрагментов хромосом или отставших на стадии

ана- и телофазы хромосом. На стадии телофазы эти фрагменты могут включаться в ядра дочерних клеток или образовывать одиночные или множественые микроядра в цитоплазме.

Митотический индекс – отношение числа клеток в метафазе к общему числу клеток в наблюдаемой клеточной популяции; показатель клеточной пролиферации в данной популяции.

Момент хвоста – показатель поврежденности ДНК, определяемый произведением процента ДНК (%ДНК) в хвосте и длины хвоста ДНК-кометы.

Момент хвоста по Оливе – показатель поврежденности ДНК, определяемый произведением %ДНК в хвосте и расстояния между центрами плотности головы и хвоста ДНК-кометы.

Мутагены, индуцирующие замены пар оснований – агенты, вызывающие мутации типа замены пар оснований в молекуле ДНК. В данном тесте эти мутации могут происходить или в сайте исходной мутации, или в другом сайте хромосомы.

Мутагены, индуцирующие мутации типа сдвига рамки считывания – агенты, вызывающие вставку или делецию одной или нескольких пар оснований в молекуле ДНК.

Мутационный тест на *Salmonella typhimurium* является бактериальной тест-системой для учета мутаций к прототрофности по гистидину при действии химических соединений и (или) их метаболитов, индуцирующих мутации типа замены оснований или сдвига рамки считывания в геноме этого организма.

Нормохроматофильный эритроцит – (син. нормохроматофил, НХЭ) зрелый эритроцит, окрашивается в красновато-розовый цвет.

Относительное увеличение количества клеток (*RICC*) – увеличение числа клеток в опытных культурах относительно увеличения числа клеток в контрольных культурах в процентах, показатель цитотоксичности в методиках, при которых не используют цитохалазин В.

Относительное удвоение популяции клеток (*RPD*) – удвоение популяции в опытных культурах относительно удвоения популяции в контрольных культурах в процентах, показатель цитотоксичности в методиках, при которых не используется цитохалазин В.

Полихроматофильный эритроцит – (син. полихроматофил, ПХЭ) незрелый эритроцит, цитоплазма которого вследствие неполного насыщения ее гемоглобином окрашивается одновременно как кислыми, так и основными красителями, приобретая серо-фиолетовый цвет.

Пролиферативный индекс (*PI*) – процент делящихся клеток, показатель цитотоксичности в методиках, при которых не используется цитохалазин В.

Процентное содержание ДНК в хвосте (%ДНК в хвосте) – показатель поврежденности ДНК, определяемый отношением интенсивности флуоресценции хвоста к общей интенсивности флуоресценции ДНК-кометы в процентах.

Цитогенетическая активность – способность вещества вызывать структурные и численные хромосомные нарушения в соматических и зародышевых клетках.

Эндоредупликация – удвоение хромосом в интерфазе, не сопровождающееся митотическим делением. В следующем цикле в ядре могут обнаруживаться диплохромосомы, состоящие из четырех хроматид.

4. Оценка мутагенной активности пестицидов

Применение химических средств защиты растений может быть одной из причин интенсивного роста химического загрязнения окружающей и производственной среды. Проблема оценки степени опасности пестицидов является одной из ключевых проблем при проведении предупредительного и текущего санитарного надзора, при внедрении и дальнейшем применении новых препаратов.

Пестициды различных групп характеризуются рядом особенностей, в том числе высокой биологической активностью, преднамеренностью их внесения в окружающую среду, неизбежностью циркуляции в ней, возможностью контакта широких слоев населения с остаточными количествами пестицидов. Среди неблагоприятных воздействий особое место занимает потенциальная мутагенность действующих веществ пестицидов, препаративных форм и их компонентов. Поэтому важной задачей является предотвращение неблагоприятного мутагенного действия пестицидов на здоровье населения. В связи с этим анализ мутагенной активности пестицидов и их основных метаболитов является обязательной составной частью их токсиколого-гигиенической оценки при установлении класса опасности (СанПиН 1.2.2584—10) и прогнозировании возможных отдаленных эффектов, а также для обеспечения надежности разрабатываемых гигиенических нормативов и регламентов применения пестицидов.

В оценке биологического действия пестицидов большое значение имеют чувствительность, специфичность и доступность методов, с помощью которых можно в довольно короткие сроки изучить мутагенную активность действующих веществ пестицидов, препаративных форм и их отдельных компонентов.

В соответствии с действующим порядком государственной регистрации пестицидов и агрохимикатов предусмотрена оценка индукции

генных, хромосомных и/или геномных мутаций с помощью методов, соответствующих международным стандартным протоколам. Для определения способности пестицидов индуцировать мутации разных типов необходимо использование комплекса методов, выполняемых на разных тест-объектах.

В методических указаниях впервые представлена гармонизированная с международными требованиями комплексная система проверки генетической активности действующих веществ пестицидов, препаративных форм и их компонентов на этапе токсикологических исследований на различных тест-объектах в опытах *in vitro* и *in vivo* для установления класса опасности по данному признаку вредности в соответствии с гигиенической классификацией пестицидов и агрохимикатов по степени опасности (СанПиН 1.2.2584—10) и разработки гигиенических нормативов содержания пестицидов в объектах окружающей среды с учетом мутагенности для обеспечения их безопасного обращения.

4.1. Описание системы оценки мутагенной активности

Изучение мутагенности действующих веществ пестицидов, препаративных форм и их компонентов наряду с другими возможными отдаленными последствиями (эмбриотоксичность и тератогенность, репродуктивность, канцерогенность) проводят на этапе токсикологических исследований. Эта работа предусматривает оценку способности пестицидов к индукции мутаций разных типов и делает необходимым использование для оценки мутагенных свойств комплекса методов, выполняемых на разных тест-объектах. Основой создания предлагаемой системы оценки мутагенности является опыт работы отечественных исследователей по тестированию мутагенности пестицидов, накопленный с момента выхода первых отечественных методических рекомендаций, а также существующие в настоящее время международные регламенты проведения экспериментальных работ.

В батарею тестов анализа мутагенности пестицидов и компонентов препаративных форм следует включать методы оценки индукции генных мутаций (тест Эймса), методы оценки цитогенетических повреждений (учет хромосомных аберраций или микроядер в клетках *in vivo* или *in vitro*) и методы оценки повреждений ДНК (метод гель-электрофореза одиночных клеток (метод ДНК-комет) *in vivo* и *in vitro*).

Все перечисленные методы в рамках каждого изучаемого типа генетических нарушений являются взаимозаменяемыми, что соответствует современным международным требованиям и подходам. В случае проведения эпидемиологических наблюдений в зонах высокой пести-

цидной нагрузки целесообразно применение методов учета хромосомных аберраций, оценки повреждений ДНК в лимфоцитах периферической крови человека и учет микроядер в клетках буккального эпителия.

Изучение генетической активности действующих веществ пестицидов, препаративных форм и их компонентов требует профессиональной подготовки.

Данные методические указания описывают комплексную систему проверки генетической активности пестицидов, но не являются пособием для освоения методов. Последние в должном объеме можно освоить только в результате стажировки в лабораториях соответствующего профиля. Дополнения и уточнения регламента выполнения рекомендованных методов и трактовка экспериментальных результатов описаны в соответствующих разделах.

4.2. Принципы отбора пестицидов, препаративных форм и их компонентов для испытания на мутагенную активность

Тестированию на мутагенную активность подвергаются новые оригинальные действующие вещества и дженерики пестицидов, которые могут быть использованы как гербициды, инсектициды, нематоциды, акарициды, фунгициды, репелленты, регуляторы роста растений и др., созданные химическими, биотехнологическими, генно-инженерными и иными способами, включая полученные из сырья природного происхождения, а также их препаративные формы и отдельные компоненты препаративных форм. Новые фиксированные комбинации пестицидов, планируемые для широкого применения в сельском хозяйстве, при структурном сходстве компонентов комбинации с известными канцерогенами, мутагенами или их метаболитами также подвергаются испытанию. Для анализа структурного сходства используют, во-первых, представительную базу данных о мутагенных свойствах широкого круга химических соединений и, во-вторых, специальные компьютерные программы.

5. Пути введения пестицидов, выбор доз, объекты исследования

5.1. Исследования in vivo

Пути введения исследуемого пестицида или препаративной формы *in vivo* должны соответствовать основным путям поступления их в организм.

Как правило, пестициды изучают при внутрижелудочном пути введения млекопитающим. Изучение мутагенной активности аэрозольных, фумигантных форм или мазей и т. п. проводят в условиях предполагае-

мого применения (ингаляционный, накожный) и/или при парентеральном введении (внутрибрюшинный, внутримышечный или подкожный пути введения).

Исследуемые пестициды растворяют в дистиллированной воде или физиологическом растворе. Водонерастворимые препараты вводят с твином-80 или используют растворители (этиловый спирт, растительное масло, диметилсульфоксид в конечной концентрации до 5 %); для перорального введения порошкообразных пестицидов можно использовать растительное масло или 0,5—1,0 %-й водный раствор крахмала или метилцеллюлозы. Следует использовать свежеприготовленные растворы исследуемого вещества, пока не будет доказана стабильность растворов вещества при хранении.

Оптимальный объем вводимых растворов изучаемых средств и соответствующих растворителей (для контрольных групп животных) должен составлять при пероральном (внутрижелудочном) и внутрибрюшинном способах введения не более 1 мл на 100 г массы тела млекопитающих. Допустимо при испытании водных растворов вводить по 2 мл на 100 г массы тела. При внутримышечном введении объем раствора не должен превышать 0,2 мл.

При испытании веществ, которые вызывают раздражающий эффект в высоких концентрациях, вводимые объемы должны быть минимизированы и должны быть одинаковыми на всех уровнях доз.

Выбор доз для исследований определяется на основе результатов оценки острой токсичности и биологической эффективности вещества.

При исследовании мутагенности тестируют не менее 3 доз, которые различаются в 2—4 раза. В случае, когда исследуемое вещество малотоксично, максимальная доза составляет 2 000 мг на кг массы тела в сутки. Если тестируемое вещество является токсичным, то диапазон испытываемых доз определяется по результатам оценки токсичности вещества и должен находиться в диапазоне от максимально переносимой дозы (МПД) до минимально токсичной или не вызывающей токсичности дозы. МПД определяют как дозу, вызывающую слабые токсические эффекты (например, такие клинические признаки как аномальное поведение или реакции, небольшая потеря массы тела или цитотоксичность в ткани-мишени), но не вызывающую гибель животного или явные признаки боли, страдания, которые требуют эвтаназии (если при повышении уровня доз при том же режиме затравки ожидается летальный эффект). Низшая доза определяется как минимально действующая или не действующая в токсикологическом эксперименте. Средняя доза рассчитывается как равноудаленная между максимальной и минимальной.

В эксперименты включают положительные и отрицательные контроли. В качестве положительного контроля служат вещества с известной мутагенной активностью. Отрицательным контролем, как правило, служит растворитель или наполнитель, в котором вводят вещество. Данные контролей следует использовать для установления пределов колебаний исторического контроля. Такие оценки необходимы для решения вопроса об адекватности соответствующих негативных/позитивных контролей в эксперименте.

Изучение цитогенетической активности можно проводить в рамках исследований хронической токсичности. Образцы для исследований мутагенной активности можно получить во время забоя животных для патолого-анатомического исследования.

В исследованиях, в которых предполагается более полное исследование зависимости «доза-ответ», используют дополнительные уровни доз. Возможна корректировка доз в случае наличия специфичных токсикологических эффектов в отношении определенных органов-мишеней.

Проведение экспериментов *in vivo* диктует необходимость применения генетически однородных животных. При этом использование мышей предпочтительнее, однако не исключено применение других видов. Животных содержат в соответствии с действующими санитарными правилами по устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев), на стандартной диете, при 12-часовом световом режиме, в условиях свободного доступа к воде и пище.

Общие клинические наблюдения за здоровьем животных следует проводить по меньшей мере один раз в день в одно и то же время.

Полученных из питомника животных рандомизированно распределяют в группы по 5—10 особей (но не менее 5 особей на группу), до использования в эксперименте они находятся в карантине и проходят акклиматизацию в течение 7—14 дней. Во избежание большого разброса оцениваемых показателей необходимо использовать генетически однородных животных, отклонение по массе тела и возрасту которых на момент эксперимента не превышает ± 20 %. Обработке следует подвергать половозрелых самцов и самок. Обычно в эксперименте проводят введение изучаемых веществ в течение 1—5 дней.

5.2. Исследования in vitro

Основными критериями при выборе максимальной концентрации вещества в случае исследований *in vitro* являются цитотоксичность, растворимость, изменение pH или осмотической концентрации. Цитотоксичность может быть определена в основном эксперименте в вариантах

с метаболической активацией и без нее с использованием в качестве показателей эффективности клонирования (выживаемости) или относительного общего роста. Полезно определить цитотоксичность и растворимость в предварительном эксперименте. Следует использовать по меньшей мере 4 концентрации. При наличии цитотоксичности концентрации должны быть в диапазоне от максимальной до минимальной по токсичности или до отсутствия токсичности. Шаг между концентрациями составляет от 2 до $\sqrt{10}$. Максимальная концентрация, выбранная на основании цитотоксичности, должна приводить к уровню относительной выживаемости (относительной эффективности клонирования) или относительного общего роста приблизительно 10—20 % (но не меньше 10 %). Для нецитотоксичных веществ максимальные концентрации должны соответствовать наименьшей, выбранной из 2 мг/мл, 2 мкл/мл или 0,01 М. В случае исследования вещества неизвестного состава, сложных смесей или экстрактов биологических материалов наибольшая исследуемая концентрация при отсутствии цитотоксичности должна быть увеличена (например, до 5 мг/мл или 5 мкл/мл), чтобы повысить концентрации каждого компонента. При проведении бактериальных тестов рекомендуемая максимальная концентрация для растворимых нецитотоксичных веществ составляет 5 мг на чашку или 5 мкл на чашку. Малорастворимые вещества следует тестировать в тех концентрациях, при которых достигается их растворимость в культуральной среде. Преципитат не должен мешать анализу результатов.

6. Методы оценки мутагенности пестицидов

6.1. Мутационный тест на Salmonella typhimurium и Escherichia coli (тест Эймса)

6.1.1. Цель исследования и принцип метода

Данный метод предназначен для выявления способности химических (биологически активных) веществ или их метаболитов индуцировать генные мутации у индикаторных штаммов *Salmonella typhimurium и Escherichia coli.*

Пестициды с выраженной антибактериальной активностью изучать в тесте Эймса нецелесообразно.

Бактерии обрабатываются тестируемым соединением с системой метаболической активации или без метаболической активации. После инкубации в течение определенного периода времени подсчитывается количество ревертантных колоний у разных тестерных штаммов и сравнивается с количеством спонтанных ревертантов в вариантах негативно-

го контроля (необработанные культуры или культуры, обработанные растворителем).

Если тестируемое соединение и (или) его метаболиты обладают мутагенной активностью, то они будут индуцировать обратные мутации от ауксотрофности к прототрофности по гистидину у гистидин-зависимых индикаторных штаммов.

6.1.2. Процедура тестирования

Бактерии

В качестве тестерных организмов используются штаммы *Salmonella typhimurium*: *TA1535*; *TA1537* или *TA97*, или *TA97a*; *TA98*; *TA100*; *TA102*; *Escherichia coli WP2 uvrA* или *Escherichia coli WP2 uvrA* (*pKM101*). В эксперименте используют не менее 5 штаммов.

Тестерные штаммы должны иметь уровень спонтанных ревертантов в пределах ожидаемого на основании литературных данных.

Для исследования могут быть использованы готовые тестовые наборы.

Потребность аминокислоты для роста следует проверять для каждой замороженной исходной культуры (гистидин для *Salmonella typhimurium* и триптофан для *Escherichia coli*). Также должны быть проверены другие фенотипические характеристики: присутствие или отсутствие плазмид *R*-фактора для соответствующих штаммов (резистентность к ампициллину у штаммов *TA98*, *TA100* и *TA97a* или *TA97*, *WP2 uvrA* и *WP2 uvrA* (*pKM101*) и резистентность к ампициллину + тетрациклину у штамма *TA 102*); присутствие специфических мутаций (*rfa*-мутаций у штаммов *Salmonella typhimurium* по контролю чувствительности к кристаллическому фиолетовому и *uvrA*-мутации у *Escherichia coli* или *uvrB*-мутации у *Salmonella typhimurium* по контролю чувствительности к ультрафиолетовому свету).

Свежие культуры бактерий должны быть выращены до состояния поздней экспоненциальной или ранней стационарной фазы роста (приблизительно 10^9 клеток на 1 мл). Культуры в поздней стационарной фазе не используются. Необходимо, чтобы культуры, используемые в эксперименте, содержали высокий титр жизнеспособных бактерий. Рекомендуемая температура инкубации: 37 °С.

Метаболическая активация

В качестве экзогенной метаболической активации обычно используется фракция *S9* печени крыс, предварительно обработанных арохлором 1254 (35 мг/кг, один раз в сутки в течение 5 суток), смесью полихлорированных бифенилов (300 мг/кг, однократно, внутрибрюшинно, за

5 суток до забоя). Постмитохондриальную фракцию обычно используют в диапазоне концентраций от 5 до 30 объемных процентов смеси *S9*.

Изучаемые концентрации

Максимальная концентрация тестируемого соединения определяется его токсичностью и растворимостью, которые следует определить в предварительном эксперименте. Нерастворимость выявляется как преципитация в конечной смеси в реальных условиях, выявляемая невооруженным глазом. Цитотоксичность можно оценить по снижению числа колоний ревертантов на чашку, отсутствию или уменьшению фонового газона или степени выживаемости обработанных культур. Цитотоксичность вещества может меняться в присутствии системы метаболической активации.

Для нетоксичных хорошо растворимых соединений максимальная доза может быть в пределах 1 000—5 000 мкг на чашку. Для тестируемых соединений с бактерицидной активностью максимальная доза должна подавлять рост бактерий не более, чем на 50 %, что определяется либо по уменьшению количества спонтанных ревертантов, либо по подавлению роста бактериального газона. В любом случае следует проверять не менее 5 различных доз тестируемого соединения с шагом приблизительно в половину log ($\sqrt{10}$) между тестируемыми точками для начального эксперимента. Меньшие интервалы могут быть использованы в тех случаях, когда исследуют зависимость концентрация–эффект.

Контроли

В каждом эксперименте обязательно одновременное использование негативного (наполнитель без обработки веществом) и позитивного контролей. В качестве позитивных контролей в случае с метаболической активацией используют 9,10-диметилантрацен, 7,12-диметилбенз[а]антрацен, бенз[а]пирен, 2-аминоантрацен, циклофосфамид, моногидрат циклофосфамида, а в качестве позитивных контролей в вариантах без метаболической активации используют азид натрия, 2-нитрофлуарен, 9-аминоакридин, *ICR 191*, гидропероксид кумена, митомицин С, *N*-этил-*N*-нитро-*N*-нитрозогуанидин, 4-нитрохинолин-1-оксид, фурилфурамид (*AF2*).

В качестве растворителя используются дистиллированная вода или диметилсульфоксид, а при необходимости и другие растворители, которые не являются цитотоксичными и не обладают мутагенной активностью.

Позитивные контроли должны быть специфичны для каждого тестерного штамма. Позитивный контроль для вариантов с метаболической активацией должен соответствовать типу используемой системы экзогенной метаболической активации.

Проведение эксперимента

Необходимые для проведения эксперимента оборудование, посуда, реактивы, питательные смеси и растворы, проведение работ по получению фракции *S9*, а также регламент работы с бактериальными культурами описаны в литературе.

Опыт ведут параллельно с использованием микросомальной активирующей смеси и без нее для регистрации действия как прямых мутагенов, так и непрямых, активность которых связана с образованием мутагенных метаболитов, учитываемых при работе с микросомальной фракцией.

В контрольных вариантах опыта вместо испытуемого образца вносят растворитель в соответствующем объеме.

6.1.3. Обработка результатов

Данные должны быть представлены в виде количества ревертантных колоний на чашку. Как для тестируемого соединения, так и для позитивных и негативных контролей указывается количество колоний для каждой чашки, среднее количество ревертантных колоний на чашку и стандартное отклонение. Если ни в одном из вариантов на данном штамме (штаммах) не получено статистически значимых результатов, эксперимент прекращают. В случае обнаружения позитивного результата опыт повторяют с целью подтверждения эффекта, причем работу ведут только на том штамме (штаммах), на котором был выявлен эффект. Если максимальный эффект зарегистрирован на одной из промежуточных доз, обладающей бактерицидными свойствами, прибегают к дроблению доз. При этом за среднюю точку на шкале доз испытуемого вещества принимают дозу, на которой был выявлен максимальный эффект. В опыт вводят еще 4 варианта: дозы в 2 и 5 раз меньше и больше средней дозы.

Если при проведении повторного опыта эффект не обнаруживается, проводится еще один дополнительный опыт, результат которого сравнивают с первыми двумя экспериментами. Заключение о наличии или отсутствии мутагенной активности испытуемого соединения делают на основании двух опытов с совпадающими результатами.

Для оценки результатов тестирования необходимо использовать соответствующие статистические методы.

Критериями позитивного результата являются или статистически достоверное зависимое от дозы увеличение количества ревертантов или воспроизводимый и статистически достоверный позитивный ответ по крайней мере для одной экспериментальной точки.

Тестируемое соединение, не вызывающее статистически достоверного зависимого от дозы увеличения количества ревертантов или воспроизводимого и статистически достоверного позитивного ответа для какой-либо экспериментальной точки, рассматривается как немутагенное в данном тесте.

Интерпретация результатов

Позитивные результаты в этом тесте указывают на то, что тестируемое соединение индуцирует генные мутации типа замены пар оснований или сдвига рамки считывания у данного микроорганизма. Негативные результаты в этом тесте указывают на то, что в данных условиях тестируемое соединение не мутагенно для использованных штаммов.

6.1.4. Отчетность

Отчет испытания должен включать следующую информацию.

Исследуемое соединение:

• идентификационные данные и *CAS no* (если известны);

• физическая природа и степень химической очистки;

• физико-химические свойства, относящиеся к проведению исследования;

• стабильность соединения (если известна).

Растворитель/среда:

• обоснование выбора растворителя/среды;

• растворимость и стабильность испытуемого вещества в растворителе/среде (если известно).

Штаммы:

• используемые штаммы;

• число клеток на культуру;

• характеристики штаммов.

Условия испытания:

• количество испытуемого вещества на чашку (мг на чашку или мкг на чашку) с обоснованием выбора дозы и числа чашек на концентрацию;

• используемая среда;

• тип и состав системы метаболической активации, включающей критерии ее использования;

• процедуры обработки.

Результаты:

• признаки токсичности;

• признаки преципитации;

• количество колоний ревертантов на каждую чашку;

• среднее число колоний ревертантов на чашку и стандартное отклонение;

• зависимость эффекта от дозы, где возможно;

• статистический анализ, если есть;

• результаты оценки по отрицательным (растворитель/среда) и положительным контролям с пределами колебаний, средними и стандартными отклонениями;

• данные по историческим (лабораторным) отрицательным (растворитель/среда) и положительным контролям с пределами колебаний, средними и стандартными отклонениями.

Обсуждение результатов.

Заключение.

6.2. Учет аберраций хромосом в клетках костного мозга млекопитающих

6.2.1. Цель исследования и принцип метода

Цель исследования – выявление и количественная оценка потенциальной цитогенетической активности пестицидов в клетках костного мозга млекопитающих. В основе метода лежит регистрация видимых структурных нарушений хромосом в клетках на стадии метафазы. Клетки костного мозга характеризуются высоким уровнем митотической активности, спонтанная частота клеток с хромосомными повреждениями составляет 1,0—2,5 %.

6.2.2. Процедура тестирования

Лабораторные животные

Эксперименты проводят на самцах и самках мелких лабораторных грызунов. Предпочтительно использование генетически однородных животных, не менее 5 особей в каждой контрольной и экспериментальной группе.

Животные должны содержаться при 12-часовом световом режиме в условиях свободного доступа к воде и пище.

Проведение эксперимента

Применяют преимущественно схему однократного введения вещества. Исследуемое вещество может быть введено в дробных дозах, т. е. два введения в тот же день, разделенных не больше чем на несколько часов, чтобы ввести большой объем материала. Другие дозовые режимы должны быть научно обоснованы.

Забой животных следует проводить через 2 интервала времени после введения вещества. Для грызунов первый забой после введения вещества проводят через 24 часа. Так как время, требуемое для поступления и метаболизма исследуемого вещества, а также возможный эффект на кинетику клеточного цикла могут влиять на оптимальное время для выявления аберраций хромосом, рекомендуется второй забой проводить через 24 ч после первого забоя (т. е. через 48 часов после введения). Если введение проводят в течение двух и более дней (с 24-часовыми интервалами), рекомендуется один срок забоя через 24 часа после последнего введения вещества. Перед забоем животным вводят внутрибрюшинно соответствующую дозу вещества, блокирующую митоз на стадии метафазы (т. е. колцемид или колхицин). Через определенный интервал времени, составляющий от 2 до 5 часов, животных забивают (для мышей этот интервал составляет 3—5 ч, для китайских хомячков – 4—5 ч).

Принципы выбора доз и пути введения описаны выше (раздел 5).

Контроли

В качестве позитивных контролей целесообразно использовать циклофосфамид в дозе 20 мг/кг при однократном внутрибрюшинном введении или любой другой известный агент, заведомо обладающий цитогенетической активностью.

Негативным контролем является используемый растворитель.

Приготовление цитогенетических препаратов

Сразу после забоя выделяют костный мозг. Методика выделения клеток костного мозга и приготовления препаратов для цитогенетического анализа подробно описаны в «Руководстве по краткосрочным тестам для выявления мутагенных и канцерогенных химических веществ. Гигиенические критерии состояния окружающей среды 51» (ВОЗ, Женева, 1989) и методических рекомендациях «Определение мутагенной активности химических соединений с использованием лабораторных мышей» (Москва, издание РАМН, 1985). Полученные препараты (два стекла от каждого животного) шифруют и подвергают микроскопическому цитогенетическому анализу.

Микроскопический анализ

Следует оценить митотический индекс как показатель цитотоксичности, анализируя минимум по 1 000 клеток на каждое экспериментальное животное, включая положительный и отрицательный контроли.

Для анализа аберраций хромосом следует анализировать минимум по 200 метафаз на каждое животное. Число клеток может быть уменьшено, если наблюдают высокое число аберраций. Все стекла, включая

положительный и отрицательный контроли, перед микроскопическим анализом должны быть зашифрованы. При приготовлении препаратов часто возможна потеря хромосом, поэтому анализируемые метафазы должны содержать число центромер в пределах $2n \pm 2$.

Анализу подвергаются округлые метафазные пластинки без наложений хромосом с модальным числом 40 – для мышей, 42 – для крыс.

Данные по каждому животному следует представлять в табличной форме. Экспериментальной единицей является животное. По каждому животному приводят число проанализированных клеток, число аберраций на клетку и процент клеток со структурными аберрациями хромосом. Следует указать число и частоту разных типов структурных аберраций хромосом для опытных и контрольных групп.

Учитывают число одиночных и парных фрагментов, хроматидных и хромосомных обменов, ахроматических пробелов (гепов) и разрывов по центромере, число клеток с множественными повреждениями и клеток с полной деструкцией хромосом.

6.2.3. Оценка результатов

Оценку результатов цитогенетического анализа проводят путем сопоставления долей клеток с хромосомными аберрациями в контрольной и опытных сериях эксперимента. Сравнение долей клеток с пробелами (гепами) и разрывами по центромере следует рассматривать в качестве дополнительных критериев цитогенетической активности исследуемого препарата.

Статистическую обработку проводят согласно общепринятым рекомендациям.

Доказательством цитогенетической активности исследуемого препарата является статистически значимое превышение доли аберрантных клеток в опыте по сравнению с негативным контролем.

6.2.4. Отчетность

Отчет должен включать следующую информацию.

Исследуемое соединение:

- идентификационные данные и номер CAS, если известен;
- физическая природа и чистота;
- физико-химические параметры, имеющие значение для данного исследования;
- стабильность веществ.

Растворитель/разбавитель:

- обоснование выбора растворителя/разбавителя;

• растворимость и стабильность исследуемого вещества в растворителе/разбавителе, если известно.

Животные:

• вид и линии животных;

• число животных, возраст и пол;

• откуда получены животные, условия содержания и кормления и т. д.;

• масса каждого животного в начале опыта, включая для каждой группы колебания массы тела, среднее значение и стандартное отклонение.

Условия эксперимента:

• данные по положительному и отрицательному (растворитель/разбавитель) контролю;

• данные опыта по выбору диапазона доз, если проводили;

• обоснование выбора доз;

• детальное описание приготовления вещества;

• детальное описание введения вещества;

• обоснование пути введения вещества;

• методы для верификации того, что вещество циркулирует в организме или достигло ткани-мишени, если использовали;

• пересчет концентрации исследуемого вещества в питьевой воде или пище в дозу вещества (мг/кг массы тела в день), если проводили;

• детальное описание качества пищи или воды;

• детальное описание схемы обработки и забора материала;

• методы оценки токсичности;

• вещество, используемое для блокады метафаз, его концентрация и длительность экспозиции;

• метод приготовления препаратов метафазных хромосом;

• критерии анализа аберраций хромосом;

• число анализируемых клеток от одного животного;

• критерии учета вещества как позитивное, негативное или сомнительное.

Результаты:

• признаки токсичности;

• митотический индекс;

• типы и число аберраций, отдельно по каждому животному;

• общее число аберраций хромосом в группе с указанием среднего значения и стандартного отклонения;

• число клеток с аберрациями хромосом на группу с указанием среднего значения и стандартного отклонения;

• изменения плоидности, если анализировали;

• оценка зависимости эффекта от дозы, где это возможно;

• статистический анализ, если проводили;

• данные по отрицательному контролю;

• исторические данные по отрицательному контролю с колебаниями показателя, среднего значения и стандартного отклонения;

• данные по положительному контролю.

Обсуждение результатов.

Заключение.

6.3. Оценка хромосомных аберраций в клетках млекопитающих in vitro

6.3.1. Цель исследования и принцип метода

Цель исследования – выявление структурных аберраций хромосом в культивируемых клетках млекопитающих, индуцированных пестицидами. Имеется два типа структурных аберраций хромосом: хроматидные и хромосомные.

Исследования по оценке хромосомных аберраций *in vitro* проводят на перевиваемых клеточных линиях или первичных культурах клеток. Используемые клетки отбирают на основе способности к росту в культуре, стабильности кариотипа, числа и разнообразия хромосом и спонтанного уровня хромосомных аберраций.

Тесты *in vitro* требуют использования экзогенной системы метаболической активации. Экспозицию клеточных культур с изучаемым веществом проводят в вариантах без и в присутствии системы метаболической активации. Через определенное время после экспозиции исследуемым соединением в культуры вносят вещество, блокирующее клеточный цикл на стадии метафазы (например, колцемид или колхицин). Затем клетки фиксируют, красят и анализируют под микроскопом для обнаружения хромосомных аберраций.

6.3.2. Процедура тестирования

Клетки

В экспериментах могут быть использованы различные перевиваемые клеточные линии и первичные культуры, включая клетки человека и других млекопитающих.

Среды и условия культивирования

Для культивирования следует использовать соответствующие культуральные среды и условия инкубации (посуда для культивирования, концентрация CO_2, температура и влажность). Клеточные линии и штаммы, на которых проводят исследования, следует постоянно проверять на стабильность модального числа хромосом и отсутствие контаминации микоплазмой. При изменении числа хромосом или контаминации микоплазмой их использовать нельзя. Для клеток и условий их культивирования должна быть известна нормальная продолжительность клеточного цикла.

Подготовка культур

Клеточные линии для размножения берут из коллекции культур, рассевают в культуральной среде до плотности, при которой клетки не будут мешать друг другу до времени фиксации, и инкубируют при 37 °С.

Лимфоциты: цельная кровь с антикоагулянтом (например, гепарином) или выделенные лимфоциты, полученные от здоровых доноров, вводят в культуральную среду, содержащую митоген (например, фитогемагглютинин), и инкубируют при 37 °С.

Метаболическая активация

Клетки экспонируют с изучаемым веществом как в присутствии, так и без соответствующей системы метаболической активации. Для метаболической активации используется микросомальная фракция *S9* печени крыс, предварительно обработанных арохлором 1254 (35 мг/кг, один раз в сутки в течение 5 суток) или смесью полихлорированных бифенилов (300 мг/кг, однократно, внутрибрюшинно, за 5 суток до забоя).

Микросомную фракцию *S9* обычно добавляют в объеме 1—10 % от объема культуральной среды.

Подготовка исследуемого вещества

Твердые вещества должны быть растворены или суспендированы в соответствующих растворителях/разбавителях и, если необходимо, разведены до введения в культуру. Жидкие вещества могут быть введены в культуру непосредственно и/или в виде заранее приготовленного раствора. Следует использовать свежеприготовленные растворы исследуемого вещества, пока не будет доказана стабильность растворов вещества при хранении.

Растворитель/разбавитель не должен вступать в химическую реакцию с испытуемым веществом, не должен снижать выживаемость клеток и активность смеси *S9*. Рекомендуется, если возможно, всегда в ка-

честве растворителя/разбавителя использовать воду. При тестировании веществ, водные растворы которых нестабильны, следует использовать безводный органический растворитель, не обладающий цитотоксичностью.

Проведение эксперимента

Обработка культур исследуемым веществом

Пролиферирующие клетки обрабатывают исследуемым веществом в присутствии системы метаболической активации и без нее.

Выбор доз и схема введения описаны выше в разделе 5.

В частности, обработку лимфоцитов проводят через 48 ч после стимуляции митогеном.

В первом опыте клетки экспонируют с исследуемым веществом в условиях с метаболической активацией и без нее в течение 3—6 ч и фиксируют через 24 часа после начала воздействия веществом. Если получен отрицательный результат в вариантах с метаболической активацией и без нее, следует провести опыт с метаболической активацией, увеличив длительность воздействия до времени фиксации, т. е. до 24 часов. Действие некоторых химических веществ может быть легче выявлено при длительности воздействия/фиксации более 24 часов.

Контроли

Соответствующие положительные и отрицательные контроли (растворитель или разбавитель) в вариантах с метаболической активацией и без нее должны быть в каждом эксперименте. В варианте с метаболической активацией вещество положительного контроля должно проявлять мутагенный эффект после метаболической активации.

Для учета эффективности тест-системы в качестве положительного контроля следует применять кластоген в концентрации, которая обеспечивает значимое и воспроизводимое повышение эффекта над контролем. Концентрации положительного контроля следует подбирать так, чтобы был четкий эффект, но в то же время его уровень не позволял исследователю определить зашифрованный препарат. В качестве положительных контролей без метаболической активации можно использовать: метилметансульфонат, этилметансульфонат, этилнитрозомочевину, митомицин С, *N*-нитрохинолин-*N*-оксид, а с метаболической активацией: бенз(а)пирен, циклофосфамид (моногидрат).

Отрицательный контроль включает введение в культуральную среду только растворителя/разбавителя.

Приготовление препаратов хромосом

Обычно за 1—3 ч до фиксации в культуру клеток вводят колцемид или колхицин. Каждую культуру клеток фиксируют отдельно для приготовления препаратов метафазных хромосом. Клетки подвергают гипотонической обработке, фиксируют и окрашивают.

Микроскопический анализ

Все стекла, включая положительный и отрицательный контроли, перед микроскопическим анализом должны быть зашифрованы. Поскольку фиксация часто приводит к появлению метафаз с потерей хромосом, анализируемые метафазы должны содержать число центромер в пределах ± 2 от модального числа для исследуемого типа клеток. Следует анализировать минимум 300 хорошо разбросанных метафаз на концентрацию и контроль, равно деля это количество между 2 повторами, если они ставятся. Это число может быть снижено, если наблюдается большое число аберраций.

Хотя основная цель теста – выявление структурных хромосомных аберраций, важно учитывать также полиплоидию и эндоредупликацию, если эти события имеются.

6.3.3. Оценка результатов

Оценивают процент клеток со структурными аберрациями хромосом. Учитывают число и частоту разных типов структурных аберраций хромосом в экспериментальных и контрольных культурах. Пробелы регистрируют отдельно и не включают в общую частоту аберраций.

Следует также проводить оценку цитотоксичности во всех экспериментальных и контрольных культурах.

Представляют данные по каждой культуре. Все данные суммируют в табличной форме.

Используют следующие критерии определения положительного результата: зависимое от концентрации повышение числа клеток с аберрациями хромосом или повышение числа клеток с аберрациями хромосом, воспроизводимое в повторностях.

Повышение частоты полиплоидных клеток может показывать, что вещество ингибирует процесс митоза и индуцирует численные хромосомные аномалии. Повышение числа клеток с эндоредупликацией хромосом может указывать на то, что вещество ингибирует прогрессию клеточного цикла.

Вещества, результаты исследования которых не соответствуют вышеприведенным критериям, считаются немутагенами в данной тест-системе.

Положительные результаты в тесте на хромосомные аберрации *in vitro* показывают, что вещество индуцирует структурные аберрации хромосом в культивируемых соматических клетках млекопитающих. Отрицательные результаты указывают на то, что при данных условиях эксперимента вещество не индуцирует хромосомные аберрации в культивируемых соматических клетках млекопитающих.

6.3.4. Отчетность

Отчет должен включать следующую информацию.

Исследуемое соединение:

• идентификационные данные и номер CAS, если известен;

• физическая природа и чистота;

• физико-химические параметры, имеющие значение для данного исследования;

• стабильность веществ, если известна.

Растворитель/разбавитель:

• обоснование выбора растворителя/разбавителя;

• растворимость и стабильность исследуемого вещества в растворителе/разбавителе, если известны.

Клетки:

• тип и источник клеток;

• особенности кариотипа и пригодность использованного типа клеток;

• отсутствие микоплазмы, если определяли;

• информация о длительности клеточного цикла;

• пол донора, использовали для культивирования цельную кровь или выделяли лимфоциты, митоген;

• число пассажей, если использовали;

• методы поддержания клеточных культур, если использовали;

• модальное число хромосом.

Условия эксперимента:

• препарат, использованный для метафазного блока, концентрация и длительность экспозиции;

• обоснование выбора концентраций и числа клеточных культур, например, данные по цитотоксичности и ограничения по растворимости, если имеются;

• состав среды, концентрация CO_2;

• концентрации исследуемого вещества;

• объем растворителя и количество добавленного исследуемого вещества;

• температура инкубации;
• длительность инкубации;
• длительность обработки культуры;
• клеточная плотность во время обработки, если оценивали;
• тип и состав системы метаболической активации, включая критерии приемлемости;
• положительные и отрицательные контроли;
• методика приготовления препаратов;
• критерии учета аберраций хромосом;
• число проанализированных метафаз;
• методы оценки токсичности;
• критерии оценки результата как положительный, отрицательный или противоречивый.

Результаты:

• признаки токсичности, например: рост клеток, данные по клеточному циклу, числу клеток, митотическому индексу;
• признаки преципитации;
• данные по pH и осмотической концентрации во время обработки исследуемым веществом, если определяли;
• число клеток с хромосомными аберрациями, типы хромосомных аберраций для каждой экспериментальной и контрольной культуры;
• изменения плоидности, если есть;
• оценка зависимости эффекта от дозы, где это возможно;
• статистический анализ, если проводили;
• данные отрицательного (растворитель/разбавитель) и положительного контролей;
• исторические данные по отрицательному (растворитель/разбавитель) и положительному контролям с указанием пределов колебаний, среднего значения и стандартного отклонения.

Обсуждение результатов.

Заключение.

6.4. Учет микроядер в клетках млекопитающих in vivo

6.4.1. Цель исследования и принцип метода

Цель исследования – выявление и количественная оценка потенциальной цитогенетической активности пестицидов в полихроматофильных эритроцитах костного мозга млекопитающих.

Метод основан на микроскопической регистрации клеток с микроядрами. Спонтанная частота клеток с микроядрами составляет 0,1—0,2 %.

6.4.2. Процедура тестирования

Лабораторные животные

Эксперименты проводят на самцах и самках мелких лабораторных грызунов. Предпочтительно использование генетически однородных животных, не менее 5 особей в каждой контрольной и экспериментальной группе. Животные должны содержаться при 12-часовом световом режиме в условиях свободного доступа к воде и пище.

Проведение эксперимента

Эксперимент может быть проведен 2 способами.

1. Животных обрабатывают однократно. Пробы отбирают по меньшей мере 2 раза, начиная не ранее 24 ч после введения вещества, но не превышая 48 ч после введения с соответствующим интервалом между пробами. Использование времени забоя менее 24 ч после введения должно быть обосновано. Пробы периферической крови также отбирают по крайней мере дважды, начиная не ранее 36 ч после введения, с соответствующим временным интервалом после первой пробы, но не превышая 72 ч после введения. При выявлении положительного ответа при одном интервале времени забора пробы, дополнительные интервалы времени для забора проб не требуются.

2. При режимах двух и более ежедневных введений (т. е. два и более введения с интервалом 24 ч) пробу отбирают спустя 18—24 ч после последнего введения для костного мозга и спустя 36—48 ч после последнего введения для периферической крови.

При необходимости можно использовать другие интервалы времени отбора проб как дополнительные.

Принципы выбора доз и пути введения описаны выше (раздел 5).

Контроли

Негативным контролем является используемый растворитель.

В качестве позитивных контролей целесообразно использовать циклофосфамид, этилметансульфонат или любой другой известный агент, заведомо обладающий цитогенетической активностью, который вводят однократно.

Приготовление цитогенетических препаратов

Методика выделения клеток и приготовления препаратов для цитогенетического анализа подробно описаны в методических рекомендациях «Оценка мутагенной активности факторов окружающей среды в клетках разных органов млекопитающих микроядерным методом» (2001). Полученные препараты (два стекла от каждого животного) шифруют и подвергают микроскопическому цитогенетическому анализу.

Микроскопический анализ

Анализируют по меньшей мере 4 000 полихроматофильных эритроцитов от каждого животного, учитывают полихроматофильные эритроциты с микроядрами. Соотношение нормо- и полихроматофильных эритроцитов определяют при подсчете 500 эритроцитов. При анализе препаратов доля незрелых эритроцитов от общего числа эритроцитов должна быть не меньше 20 % от контрольного уровня.

6.4.3. Оценка результатов

Критерием позитивного результата является воспроизводимое и статистически значимое увеличение числа полихроматофильных эритроцитов (ПХЭ) с микроядрами по крайней мере в одной из опытных групп по сравнению с контрольной. Полученный положительный результат свидетельствует, что вещество индуцирует хромосомные повреждения и/или нарушения митотического аппарата клеток у экспериментальных животных.

Статистическую обработку проводят согласно общепринятым рекомендациям.

6.4.4. Отчетность

Отчет должен включать следующую информацию.

Исследуемое соединение:

- идентификационные данные и номер CAS, если известен;
- физическая природа и чистота;
- физико-химические параметры, имеющие значимость для данного исследования;
- стабильность веществ.

Растворитель/разбавитель:

- обоснование выбора растворителя;
- растворимость и стабильность исследуемого вещества в растворителе, если известно.

Животные:

- вид и линии животных;
- число животных, возраст и пол;
- откуда получены животные, условия содержания и кормления и т. д.;
- масса каждого животного в начале опыта, включая для каждой группы колебания массы тела, среднее значение и стандартное отклонение.

Условия эксперимента:

- данные по положительному и отрицательному (растворитель/разбавитель) контролю;
- данные опыта по выбору диапазона доз, если проводили;

• обоснование выбора доз;
• детальное описание приготовления вещества;
• детальное описание введения вещества;
• обоснование пути введения вещества;
• методы для верификации того, что вещество циркулирует в организме или достигло ткани-мишени, если использовались;
• пересчет концентрации исследуемого вещества в питьевой воде или пище в дозу вещества (мг/кг массы тела в день), если проводили;
• детальное описание качества пищи или воды;
• детальное описание схемы обработки и забора материала;
• методы приготовления препаратов;
• методы оценки токсичности;
• критерии учета незрелых эритроцитов с микроядрами;
• число анализируемых клеток на животное;
• критерии учета вещества как положительное, отрицательное или сомнительное.

Результаты:
• признаки токсичности;
• доля незрелых эритроцитов от общего числа эритроцитов;
• число незрелых эритроцитов с микроядрами, отдельно по каждому животному;
• среднее ± стандартное отклонение для незрелых эритроцитов с микроядрами на группу;
• оценка зависимости эффекта от дозы, где это возможно;
• статистический анализ и использованные методы;
• данные по отрицательному контролю в опыте и исторические данные по отрицательному контролю;
• данные по положительному контролю.

Обсуждение результатов.
Заключение.

6.5. Учет микроядер в клетках млекопитающих in vitro

6.5.1. Цель исследования и принцип метода

Микроядерный тест – метод оценки генотоксичности по выявлению микроядер в цитоплазме интерфазных клеток. Микроядра могут образовывать ацентрические фрагменты хромосом (т. е. с отсутствием центромеры) или целые хромосомы, которые не способны мигрировать к полюсам на стадии анафазы клеточного деления. Метод оценивает класто-

генную и анеугенную активность химических веществ в клетках, которые проходят клеточное деление во время или после экспозиции исследуемого вещества. Добавление ингибитора актинполимеразы цитохалазина В перед изучаемым митозом позволяет идентифицировать и проводить анализ частоты микроядер в клетках, которые прошли один митоз, т. к. такие клетки имеют два ядра. Также приведен вариант протокола без блока цитокинеза, применяемый в том случае, когда анализируемая клеточная популяция митотически активна.

Во время и после воздействия исследуемого вещества клетки должны расти такой период времени, который достаточен для формирования хромосомных нарушений или нарушений веретена деления и в результате – микроядер в интерфазных клетках. Для индукции анеуплоидии тестируемое вещество обычно должно присутствовать на протяжении всего митоза. Микроядра анализируют в фиксированных и окрашенных интерфазных клетках.

В культурах, в которых анализируют микроядра (или параллельных культурах), должна быть определена цитотоксичность и цитостатичность.

6.5.2. Процедура тестирования

Материалы

Используют первичные культуры лимфоцитов периферической крови человека и клеточные линии грызунов, такие как *CHO*, *V79*, *CHL/IU* и *L5178Y* и др., которые характеризуются низкой стабильной спонтанной частотой образования микроядер.

Лимфоциты человека следует отбирать у молодых (возраст приблизительно 18—35 лет), здоровых, некурящих индивидов, которые не имели недавнего контакта с генотоксическими химическими веществами и радиацией.

Среды и условия культивирования

Для культивирования следует использовать соответствующие культуральные среды и условия инкубации (посуда для культивирования, концентрация CO_2, температура и влажность). Клеточные линии и штаммы, на которых проводят исследования, следует постоянно проверять на стабильность модального числа хромосом и отсутствие контаминации микоплазмой. При изменении числа хромосом или контаминации микоплазмой их использовать нельзя. Для клеток и условий их культивирования должна быть известна нормальная продолжительность клеточного цикла.

Метаболическая активация

Клетки экспонируют с изучаемым веществом как в присутствии, так и без соответствующей системы метаболической активации. Для метаболической активации используется микросомальная фракция *S9* печени крыс, предварительно обработанных арохлором 1254 (35 мг/кг, один раз в сутки в течение 5 суток) или смесью полихлорированных бифенилов (300 мг/кг, однократно, внутрибрюшинно, за 5 суток до забоя).

Постмитохондриальную фракцию обычно добавляют в объеме 1—10 % от объема культуральной среды.

Подготовка исследуемого вещества

Твердые вещества должны быть растворены или суспендированы в соответствующих растворителях/разбавителях и, если необходимо, разведены до введения в культуру. Жидкие вещества могут быть введены в культуру непосредственно и/или в виде заранее приготовленного раствора.

Проведение эксперимента

Обработка культур исследуемым веществом

Культуры клеток человека или животных обрабатывают исследуемым веществом без добавления или с добавлением системы метаболической активации, сопровождая положительными и отрицательными (растворитель/разбавитель) контролями. Схемы обработки для клеточных линий и первичных клеточных культур могут отличаться от схемы для лимфоцитов, которые требуют стимуляции митогеном для начала клеточного цикла. Выбор доз и схема введения описаны выше в разделе 5.

Как правило, используют короткий период обработки от 3 до 6 часов в присутствии и в отсутствие *S9* с последующим удалением исследуемого соединения и периодом роста в течение 1,5—2,0 клеточных циклов. После начала или окончания обработки клетки фиксируют через промежуток времени, эквивалентный приблизительно 1,5—2,0-кратной продолжительности нормального (т. е. без обработки) клеточного цикла. Время фиксации или восстановления может быть увеличено, если известно или ожидается, что вещество нарушает продолжительность клеточного цикла.

Все виды обработок культуры должны начинаться и заканчиваться в период, когда клетки растут экспоненциально. Для лимфоцитов наиболее целесообразно начать экспозицию с исследуемым веществом через 44—48 часов после стимуляции митогеном.

Следует использовать по две культуры для каждой концентрации исследуемого вещества, для контроля с растворителем/разбавителем и

негативного контроля. Когда предшествующие данные лаборатории показывают минимальные вариации между двумя культурами, можно использовать в опыте одну культуру. При использовании в опыте одной культуры рекомендуется увеличить число анализируемых концентраций.

Использование цитохалазина В как блокатора цитокинеза

Цитохалазин В используют для блокирования цитокинеза, так как он подавляет сборку актина и таким образом препятствует разделению дочерних клеток после митоза, приводя к формированию двуядерных клеток. Подсчет микроядер может быть ограничен клетками, которые прошли митоз во время или после воздействия. Параллельно оценивают действие вещества на кинетику пролиферации.

Необходимые концентрации цитохалазина В определяют в лаборатории для каждого типа клеток с целью достижения оптимальной частоты двуядерных клеток в контрольных культурах с растворителем/разбавителем. Приемлемая концентрация цитохалазина В находится в диапазоне от 3 до 6 мкг/мл.

Обработка культур цитохалазином В и определение относительных частот одноядерных, двуядерных и многоядерных клеток в культуре является точным методом установления количественного эффекта воздействия на клеточную пролиферацию, цитостатическую и цитотоксическую активность и позволяет анализировать только клетки, которые делились во время или после воздействия.

Контроли

В каждый опыт для вариантов в присутствии и без метаболической активации должны быть включены позитивные контроли и контроли с растворителем/разбавителем.

Кластогены, для которых необходима метаболическая активация (например, циклофосфамид, бенз(а)пирен), следует использовать, чтобы показать как метаболическую компетентность, так и способность теста идентифицировать кластогены. При обосновании можно использовать другие вещества в качестве позитивного контроля. К веществам, используемым в качестве позитивного контроля для оценки анеугенной активности, относятся колхицин и винбластин. Позитивные контроли на кластогенность и анеугенность следует использовать на клетках, которые не требуют *S9*.

Фиксация клеток и приготовление препаратов

Каждую культуру фиксируют отдельно. Приготовление препаратов может включать гипотоническую обработку. Однако этот этап не обязателен, если достигается адекватный разброс клеток. Можно использо-

вать различные методики приготовления препаратов, которые позволяют получать препараты высокого качества для анализа. Должна сохраняться цитоплазма клеток, чтобы определять микроядра и (при методе блока цитокинеза) реально идентифицировать двуядерные клетки.

Микроскопический анализ

Перед микроскопическим анализом все препараты, включая варианты с растворителем/разбавителем и контроли, должны быть независимо зашифрованы.

В культурах с цитохалазином В для оценки частоты микроядер следует анализировать минимум 2 000 двуядерных клеток на концентрацию (минимум 1 000 двуядерных клеток на культуру при постановке двух культур на концентрацию). В опытах с одной культурой следует анализировать минимум 2 000 двуядерных клеток на концентрацию. Не следует учитывать клетки неправильной формы или с двумя ядрами, значительно различающимися в размерах. Клетки, содержащие более чем два ядра не должны анализироваться на микроядра, так как исходная (спонтанная) частота микроядер в этих клетках может быть выше. Возможен подсчет одноядерных клеток, если показано, что исследуемое вещество влияет на активность цитохалазина В.

В опытах с клеточными линиями без цитохалазина В микроядра анализируют минимум в 2 000 клетках на концентрацию (минимум 1 000 клеток на культуру при постановке двух культур на концентрацию). В опытах с постановкой одной культуры на концентрацию анализируют минимум 2 000 клеток на культуру.

При использовании цитохалазина В следует определять *CBPI* или *RI* для оценки клеточной пролиферации, анализируя минимум 500 клеток на культуру. При воздействии в отсутствие цитохалазина В, следует получить данные, что клетки, которые анализируют, прошли деление.

Контроль с растворителем/разбавителем и контроль без обработки должны давать воспроизводимо низкий и постоянный уровень частоты микроядер (обычно 5—25 микроядер на 1 000 клеток).

6.5.3. Оценка результатов

Параллельно следует проводить оценку цитотоксичности и/или цитостатичности во всех обработанных и контрольных с растворителем/разбавителем культурах. Необходимо рассчитать *CBPI* или *RI* для всех обработанных и контрольных культур как меру задержки клеточного цикла при использовании метода блока цитокинеза. В отсутствии цитохалазина В следует использовать *RPD* или *RICC* или *PI*.

Данные приводят по отдельным культурам. Дополнительно все данные следует объединить (суммировать) в табличной форме.

Существует ряд критериев для определения положительного результата: зависимость эффекта от концентрации или воспроизводимое повышение частоты мутаций. При оценке результатов используют соответствующую статистическую обработку.

Положительные/отрицательные результаты в микроядерном тесте показывают, что вещество индуцирует/не индуцирует хромосомные разрывы и потери хромосом в культивируемых клетках млекопитающих.

6.5.4. Отчетность

Отчет должен содержать следующую информацию.

Исследуемое соединение:

- идентификационные данные и номер CAS;
- физическая природа и чистота;
- физико-химические параметры, имеющие значимость для данного исследования;
- взаимодействие исследуемого вещества с растворителем/разбавителем или с культуральной средой.

Растворитель/разбавитель:

- обоснование выбора растворителя/разбавителя;
- растворимость и стабильность исследуемого вещества в растворителе/разбавителе.

Клетки:

- тип и источник клеток;
- пригодность используемого типа клеток;
- отсутствие микоплазмы, если оценивали;
- информация о продолжительности клеточного цикла, времени удвоения или пролиферативный индекс;
- пол, возраст и число доноров крови (при работе с лимфоцитами);
- использовали цельную кровь или выделенные лимфоциты (при работе с лимфоцитами);
- число пассажей, если используются;
- методы поддержания клеточных культур, если используются;
- модальное число хромосом;
- нормальное (негативный контроль) время клеточного цикла.

Условия эксперимента:

- вещество, применяемое для блока цитокинеза (например, цитохалазина В), его концентрация и длительность экспозиции в культуре;

• обоснование выбора концентраций и числа клеточных культур, включающее данные по цитотоксичности и ограничения по растворимости, если имеются;

• состав среды, концентрация CO_2;

• концентрации исследуемого вещества;

• концентрации (и/или объем) растворителя и количество добавленного исследуемого вещества;

• температура и время инкубации;

• длительность обработки культуры;

• время после обработки до фиксации;

• клеточная плотность при посеве, если применяли;

• тип и состав системы метаболической активации, включая критерии приемлемости;

• позитивные и негативные контроли;

• методы приготовления препаратов и методика окраски;

• критерии учета микроядер;

• число проанализированных клеток;

• методы оценки цитотоксичности;

• любая дополнительная информация в отношении цитотоксичности;

• критерии учета результата как положительный, отрицательный или противоречивый (сомнительный);

• методы статистической обработки;

• методы для характеристики содержания в микроядре целых хромосом или фрагментов хромосомы, такие как использование антител к кинетохору.

Результаты:

• оценка цитотоксичности, например, *CBPI* или *RI* при использовании методов с блоком цитокинеза, *RICC*, *RPD* или *PI*, когда блок цитокинеза не используется, а также других признаков, таких как клеточное слияние (конфлюентность), апоптоз, подсчет метафаз, частота двуядерных клеток, если имеются;

• признаки преципитации;

• данные величины pH и осмотической концентрации во время обработки исследуемым веществом, если определяли;

• определение приемлемости клеток для анализа;

• распределение одно-, двух- и многоядерных клеток при применении метода блока цитокинеза, если проводили;

• число клеток с микроядрами, приведенное отдельно для каждой обработанной и контрольной культуры, и отдельно выделенное в двуядерных или одноядерных клетках, если применяли;

• оценка зависимости эффекта от дозы, где это возможно;

• данные негативного (растворитель/разбавитель) и позитивного контролей (концентрации и растворитель);

• исторические данные по негативному (растворитель/разбавитель) и позитивному контролям с указанием пределов колебаний, среднего и стандартного отклонения и доверительных интервалов (95 %-х);

• статистический анализ, значения Р.

Обсуждение результатов.

Заключение.

6.6. Оценка ДНК-повреждающей активности in vivo методом ДНК-комет в щелочной версии

6.6.1. Цель исследования и принцип метода

Метод щелочного гель-электрофореза отдельных клеток или метод ДНК-комет (*comet assay*) используется для оценки способности пестицидов индуцировать ДНК-повреждения в органах и тканях лабораторных животных. В щелочной версии метод позволяет интегрально оценивать первичные ДНК-повреждения, включающие одно- и двунитевые разрывы ДНК и щелочно-лабильные сайты, а также апуриновые и апиримидиновые сайты, возникающие вследствие эксцизионной репарации.

Метод основан на регистрации подвижности в электрическом поле ДНК и/или фрагментов ДНК клеток, заключенных в агарозный гель. Исследуемые клетки вносят в агарозный гель и наносят на подготовленные гель-слайды. После затвердевания геля клетки подвергают лизису, в процессе которого происходит диссоциация клеточных структур и выпетливание хроматина в поры агарозы. Препараты подвергаются щелочной денатурации (pH > 13), в результате которой ДНК переходит в однонитевую форму, щелочно-лабильные сайты реализуются в однонитевые разрывы. В процессе электрофореза под действием электрического поля ДНК в виде петель и/или отдельных фрагментов мигрирует к аноду, формируя электрофоретический след, напоминающий хвост кометы, параметры которого зависят от количества разрывов в исследуемой ДНК. После завершения щелочного электрофореза микропрепараты нейтрализуют/фиксируют, окрашивают и микроскопируют под флуоресцентным микроскопом. Измерения могут быть выполнены визуально, непосредственно под микроскопом либо с использованием сохраненных цифровых изображений. Использование компьютерного анализа

цифровых изображений расширяет исследовательские возможности метода. Преимуществами метода являются высокая чувствительность, дифференцированная оценка ДНК-повреждений на уровне отдельных клеток, минимальное количество материала для исследования, применимость к любым типам клеток, содержащим ДНК. Метод обладает приемлемой стоимостью и пропускной способностью, но вместе с тем требует высококвалифицированного подхода к проведению.

6.6.2. Процедура тестирования

Лабораторные животные

Эксперименты предпочтительно проводить на мелких лабораторных половозрелых грызунах – мышах или крысах. Во избежание большого разброса в оцениваемых показателях необходимо использовать генетически однородных животных, отклонение по массе тела и возрасту которых на момент эксперимента не превышает ± 20 %.

Каждая контрольная и подопытная группа должна содержать не менее 5 особей. При наличии на момент исследования данных об отсутствии существенных межполовых различий в токсических эффектах исследуемого соединения эксперименты проводят на животных одного пола. В противном случае исследование следует проводить на животных обоих полов.

Контроли

В качестве негативного контроля используют животных, которым вводят растворитель в эквивалентных объемах.

Животным позитивного контроля вводят соединение, заведомо обладающее выраженным генотоксическим действием, проявляющимся в большинстве органов и тканей и выявляемым с использованием метода ДНК-комет: метилметансульфонат (40—80 мг/кг), *N*-нитрозодиметиламин (80—140 мг/кг), *N*-этил-*N*-нитрозомочевина (15—50 мг/кг). Допускается использование трех животных в группе позитивного контроля.

В виду высокой чувствительности метода все манипуляции (способ введения, время экспозиции, условия содержания до момента забоя и т. д.) с животными негативного контроля и подопытной группы должны быть идентичными.

Проведение эксперимента

Принципы выбора доз и пути введения описаны выше (раздел 5).

Исследуемое вещество вводят в течение двух или трех суток с 24-часовыми интервалами между введениями. Забой животных и взятие образцов проводят через 2—6 часов после последнего введения.

В случае высокой токсичности исследуемого вещества используют схему экспериментов с однократным введением. В этом случае забой животных и отбор образцов осуществляют два раза через 2—6 и 16—26 часов после введения. При получении позитивного результата при одном из сроков экспозиции эксперименты далее не проводят.

При исследовании соединений, обладающих кумулятивным эффектом, используют многократное их введение в течение 7—14 дней с забоем животных через 3 часа после последнего введения.

При выборе органов/тканей для анализа в первую очередь необходимо ориентироваться на данные о токсикокинетических и токсикодинамических свойствах исследуемого вещества, а также на планируемый путь его поступления в организм человека. Список органов/тканей для проведения исследования включает: а) желудок, являющийся одной из первых мишеней действия ксенобиотиков при пероральном пути поступления; б) печень, являющуюся основным органом биотрансформации ксенобиотиков; в) костный мозг, являющийся активно пролиферирующей тканью, клетки которой находятся на разных стадиях клеточного цикла; г) почки, осуществляющие выведение ксенобиотиков и/или его метаболитов; д) клетки крови (альтернативно селезенку), осуществляющей транспорт ксенобиотиков и/или их метаболитов; е) головной мозг, чувствительный к действию непрямых генотоксикантов. Исследование проводят минимум в трех органах/тканях с обязательным включением печени.

Выделение клеток является одним из ключевых моментов при методе ДНК-комет в экспериментах *in vivo*. Длительные манипуляции при получении суспензии клеток могут приводить к искажению результатов вследствие продолжающихся в клетках процессов, в частности, ДНК-репарации. Исходя из этого используют методы выделения клеток, требующие минимального времени, но вместе с тем позволяющие получать приемлемой чистоты клеточные суспензии. Не рекомендуется использование методов ферментативной обработки протеазами (трипсин и/или коллагеназа), которые приводят к увеличению спонтанного уровня ДНК-повреждений при выделении клеток, за исключением случаев, когда не применимы иные методы.

Получение микропрепаратов и гель-электрофорез

Методика приготовления микропрепаратов, лизис и условия проведения электрофореза подробно описаны в рекомендациях OECD Guideline № 489 «In vivo mammalian alkaline comet test assay» (2014) и в МР 4.2.0014—10 «Оценка генотоксических свойств методом ДНК-комет *in vitro*».

Окрашивание и микроскопический анализ

Для окраски микропрепаратов используются флуоресцирующие красители, применяемые для визуализации ДНК – этидиум бромид или пропидиум йодид, 4,6-диамидино-2-дифенилиндол (*DAPI*), *SYBR Green I*, *YOYO-1* или акридиновый оранжевый. При анализе ДНК-комет с использованием программно-аппаратного комплекса рекомендуется использование красителя *SYBR Green I*, позволяющего получить с микропрепаратов высококонтрастные изображения.

Микропрепараты анализируют на эпифлуоресцентном микроскопе с соответствующими для красителя фильтрами. Перед проведением анализа микропрепараты шифруют. На каждый микропрепарат рандомизированно анализируют не менее 100 ДНК-комет без наложений хвостов. В анализ не включают атипичные ДНК-кометы, выявляемые на микропрепаратах, в виде слабо флуоресцирующих ДНК-комет с широким диффузным хвостом и практически отсутствующей головой, обозначаемые в литературе как «ежики» (*hedgehogs*).

Программно-аппаратный комплекс для анализа ДНК-комет включает совмещенную с микроскопом высокочувствительную *CCD*-камеру и специализированное программное обеспечение, что позволяет проводить цифровую регистрацию и обработку параметров ДНК-комет. В зависимости от имеющегося программного обеспечения анализ параметров ДНК-комет проводится в режиме «реального времени» либо с сохраненных цифровых изображений. В качестве показателя поврежденности ДНК используют показатели длина хвоста, процентное содержание ДНК в хвосте (%ДНК в хвосте) или их произведение – момент хвоста (*tail moment*). Принимая во внимание, что показатель длины хвоста ДНК-комет в значительной степени зависит от экспериментальных условий (плотность агарозы, напряженность электрического поля, температура электрофорезного буфера и т. д.), для повышения воспроизводимости результатов, а также для возможности сопоставления данных, полученных разными экспериментаторами и в разных лабораториях, рекомендуется использовать при оценке ДНК-повреждений показатель %ДНК в хвосте.

При визуальном анализе ДНК-кометы ранжируются на пять условных типов с соответствующим для каждого числовым значением от 0 до 4. Степень поврежденности ДНК при этом выражается как индекс ДНК-комет ($И_{ДК}$), определяемый по формуле:

$$И_{ДК} = (0n_0 + 1n_1 + 2n_2 + 3n_3 + 4n_4)/\Sigma, \text{ где}$$

n_0—n_4 – число ДНК-комет каждого типа;

Σ – сумма подсчитанных ДНК-комет.

6.6.3. Оценка результатов

Статистическую оценку результатов проводят по каждому органу путем сравнения показателей поврежденности ДНК в опытной и контрольной группах с использованием непараметрических критерия Даннета (%ДНК в хвосте, момент хвоста, длина хвоста) или критерия Краскела-Уоллиса (индекс ДНК-комет). Критериями положительного результата являются статистически достоверное, зависимое от дозы увеличение показателя поврежденности ДНК при одном из сроков экспозиции или статистически достоверный, воспроизводимый эффект по крайней мере для одной экспериментальной точки. Полученный положительный результат свидетельствует о том, что исследуемое соединение проявляет *in vivo* ДНК-повреждающее действие в данном органе-мишени.

Метод ДНК-комет дает, как правило, четкие положительные или отрицательные результаты. При получении неоднозначно трактуемых результатов следует обратить внимание на возможный цитотоксический эффект соединения, свидетельством которого является бимодальное распределение ДНК-комет с низкой и высокой степенью поврежденности ДНК. Вероятны случаи выявления ДНК-повреждающей активности вещества в низкой дозе при отсутствии позитивного эффекта в более высоких дозах. Такое действие в методе ДНК-комет характерно для веществ, обладающих ДНК-интеркалирующими свойствами. В этом случае необходимо провести дополнительные исследования с однократным введением наименьшей из действующих доз при различных сроках экспозиции. Кроме того, вероятны случаи выявления значимого снижения спонтанного уровня ДНК-повреждений под действием вещества на фоне отсутствия позитивных эффектов, что может свидетельствовать об индукции сшивок ДНК-ДНК или ДНК-белок. Такие результаты также трактуются как неоднозначные и требуют проведения дополнительных исследований в соответствии с описанными в литературе подходами.

При получении положительных результатов рекомендуется оценить также органо- и тканеспецифичность ДНК-повреждающего действия соединения, сопоставляя следующие параметры по каждому органу: наличие или отсутствие ДНК-повреждающего эффекта, минимальную действующую дозу, наличие и характер дозозависимого эффекта, степень превышения эффекта в опытной группе по сравнению с контрольной.

6.6.4. Отчетность

Отчет должен включать следующую информацию.

Исследуемое вещество:

• идентификационные данные и номер CAS, если известен;

• чистота;
• физико-химические свойства;
• стабильность.

Растворитель/разбавитель:

• обоснование выбора растворителя/разбавителя;
• растворимость и стабильность исследуемого вещества в растворителе/разбавителе, если известно.

Животные:

• вид и линия животных;
• число животных, возраст и пол;
• источник получения, условия содержания и кормления и т. д.;
• масса каждого животного на начало опыта, включая для каждой группы колебания массы тела, среднее значение и стандартное отклонение.

Условия эксперимента:

• данные по положительному и отрицательному (растворитель/разбавитель) контролю;
• данные опыта по выбору диапазона доз, если проводили;
• обоснование выбора доз;
• детальное описание приготовления вещества;
• детальное описание введения вещества;
• обоснование пути введения вещества;
• способы приготовления образцов, гистопатологический анализ, если использовали, особенно для пестицидов, дающих положительный ответ в методе ДНК-комет;
• обоснование выбора тканей;
• методы для верификации того, что вещество циркулирует в организме или достигло ткани-мишени, если использовали;
• пересчет концентрации исследуемого вещества в питьевой воде или пище в дозу вещества (мг/кг массы тела в день), если это проводили;
• детальное описание качества пищи или воды;
• детальное описание схемы обработки и забора материала;
• способ эвтаназии;
• способы выделения и хранения тканей;
• способы приготовления суспензии отдельных клеток/ядер;
• источники и номера партий всех реагентов, если это возможно;
• методы оценки цитотоксичности;
• условия электрофореза;

• используемые методы окрашивания;

• способы подсчета и измерения параметров ДНК-комет.

Результаты:

• общие клинические наблюдения, если таковые проводись, до исследования и на протяжении исследования для каждого животного;

• в случае исследований продолжительностью более недели: масса тела для каждого животного и для каждой группы, потребление пищи;

• зависимость доза-ответ в том случае, когда она явно выражена;

• для каждого органа/ткани/животного показатель %ДНК в хвосте (или иной показатель) и медианное значение для отдельного микропрепарата, средние значения для животного и средние значения для группы;

• контрольные данные (для позитивного и негативного контроля, полученные одновременно или исторические) с указанием диапазонов, средних/медианных значений и стандартных отклонений для каждого оцениваемого органа/ткани;

• статистический анализ и применяемые статистические методы;

• критерии оценки ответа как позитивного, негативного или неоднозначного;

• частота атипичных ДНК-комет.

Обсуждение результатов.

Заключение.

6.7. Оценка ДНК-повреждающей активности in vitro методом ДНК-комет в щелочной версии

6.7.1. Цель исследования и принцип метода

Метод щелочного гель-электрофореза отдельных клеток или метод ДНК-комет (*comet assay*) используется для оценки способности пестицидов индуцировать ДНК-повреждения в клетках млекопитающих в условиях *in vitro*.

Принцип метода описан в п. 6.6.1 настоящих методических указаний.

6.7.2. Процедура тестирования

Клеточные культуры

Для оценки генотоксических свойств соединений *in vitro* методом ДНК-комет в качестве тест-объекта используют традиционно применяемые в генотоксикологических исследованиях клетки первичных культур (лимфоциты периферической крови и фибробласты человека, гепатоциты грызунов) и перевиваемых клеточных культур животных и человека (клетки китайского хомячка *V79*, *CHO*, клетки мышиной лимфомы *L5178Y* и др.).

Для культивирования следует использовать соответствующие культуральные среды и условия инкубации (посуда для культивирования, концентрация CO_2, температура и влажность).

Метаболическая активация

Клетки экспонируют с исследуемым изучаемым веществом как в присутствии, так и без соответствующей системы метаболической активации. Для метаболической активации используется микросомальная фракция *S9* печени крыс, предварительно обработанных арохлором 1254 (35 мг/кг, один раз в сутки в течение 5 суток) или смесью полихлорированных бифенилов (300 мг/кг, однократно, внутрибрюшинно, за 5 суток до забоя).

Подготовка исследуемого вещества

Для гидрофильных веществ в качестве растворителя предпочтительнее использование культуральной среды или деионизированной воды. При работе с гидрофобными веществами используется диметилсульфоксид (ДМСО) или этиловый спирт в конечной концентрации не более 1 %. Допускается при необходимости использование иных растворителей в концентрациях, не вызывающих цитотоксического эффекта. Во всех экспериментах контроли на растворители и растворы исследуемых соединений следует готовить *ex tempore*.

Исследуемые концентрации

Исследование начинают с определения цитотоксичности *in vitro*. С этой целью допустимо применение метода комбинированной окраски этидиум бромид/акридиновый оранжевый, окраски трипановым синим или МТТ-тест.

Принципы выбора концентраций описаны выше в разделе 5 «Пути введения пестицидов, выбор доз, объекты исследования». Принимая во внимание возможность увеличения токсичности соединения при его биотрансформации, оценку токсичности проводят параллельно в условиях с метаболической активацией.

Контроли

В качестве негативного контроля используется растворитель, вносимый в эквивалентных объемах. В тестах без метаболической активации в качестве позитивного контроля используют мутагены прямого действия: метилметансульфонат, этилнитрозомочевину или 4-нитрохинолин-*N*-оксид. В тестах с метаболической активацией используют непрямые мутагены: бенз[а]пирен, диметилбензатрацен или циклофосфамид.

Проведение эксперимента

Обработка клеток исследуемым веществом

Тестирование ведут параллельно с использованием микросомальной фракции *S9* и без нее для регистрации действия как прямых мутагенов, так и непрямых, активность которых связана образованием генотоксичных метаболитов. Срок экспозиции клеток с исследуемым веществом составляет 1—3 часа. При соответствующем обосновании допускается более длительная экспозиция. Каждый эксперимент проводится в трех повторностях, включая негативный и позитивный контроли. При тестировании на лимфоцитах периферической крови для исключения случайностей методического плана и вариантов с резко измененной индивидуальной чувствительностью тестирование следует проводить на образцах клеток не менее двух доноров.

Получение микропрепаратов и гель-электрофорез

Методика приготовления препаратов, лизис клеток и условия проведения электрофореза подробно описаны в рекомендациях OECD Guideline № 489 «In vivo mammalian alkaline comet test assay» (2014) и в МР 4.2.0014—10 «Оценка генотоксических свойств методом ДНК-комет *in vitro*».

Окрашивание и микроскопический анализ

Процедура окрашивания и микроскопического анализа приведены в п. 6.6.2.

6.7.3. Оценка результатов

Статистическая обработка экспериментальных данных проводится по всем повторностям каждой экспериментальной точки путем сравнения показателей поврежденности ДНК в опытной и контрольной группах с использованием непараметрического критерия Даннета (%ДНК в хвосте, момент хвоста, длина хвоста) или критерия Краскела-Уоллиса (индекс ДНК-комет). Данные повторностей объединяются, если перекрываются 95 %-е доверительные интервалы.

6.7.4. Интерпретация результатов

Критериями положительного результата являются статистически достоверное, концентрационно-зависимое увеличение показателя поврежденности ДНК или статистически достоверный, воспроизводимый эффект по крайней мере для одной экспериментальной точки. Позитивный результат в данном тесте указывает на то, что исследуемое вещество индуцирует ДНК-повреждения в данном типе клеток в условиях *in vitro*.

Порядок дальнейших действий в случае получения неоднозначно трактуемых результатов описан в п. 6.6.3.

6.7.5. Отчетность

Отчет должен включать следующую информацию.

Исследуемое вещество:

- идентификационные данные и номер CAS, если известен;
- чистота;
- физико-химические свойства;
- стабильность.

Растворитель/разбавитель:

- обоснование выбора растворителя/разбавителя;
- растворимость и стабильность исследуемого вещества в растворителе/разбавителе, если известно.

Клетки:

- вид и источник клеток;
- отсутствие микоплазмы, если определяли;
- информация о длительности клеточного цикла;
- пол донора, использовали для культивирования цельную кровь или выделяли лимфоциты;
- число пассажей, если использовали;
- методы поддержания клеточных культур, если использовали.

Условия эксперимента:

- обоснование выбора концентраций и числа клеточных культур, например, данные по цитотоксичности и ограничения по растворимости, если имеются;
- состав среды, концентрация CO_2;
- концентрации исследуемого вещества;
- объем растворителя и количество добавленного исследуемого вещества;
- температура инкубации;
- длительность инкубации;
- длительность обработки культуры;
- клеточная плотность во время обработки, если оценивали;
- тип и состав системы метаболической активации, включая критерии приемлемости;
- положительные и отрицательные контроли;
- метод оценки цитотоксичности;
- методика приготовления препаратов.

Результаты:

• признаки токсичности, например: рост клеток, данные по клеточному циклу, числу клеток, митотическому индексу;

• признаки преципитации;

• данные по pH и осмотической концентрации во время обработки исследуемым веществом, если определяли;

• %ДНК в хвосте (или иные показатели, которые выбраны) и медианное значение для каждого микропрепарата, среднее значение для повторностей;

• контрольные данные (для позитивного и негативного контроля, полученные одновременно или исторические) с указанием диапазонов, средних/медианных значений и стандартных отклонений;

• статистический анализ и применяемые статистические методы;

• критерии оценки ответа как позитивного, негативного или неоднозначного;

• частота атипичных ДНК-комет;

• данные отрицательного (растворитель/разбавитель) и положительного контролей;

• исторические данные по отрицательному (растворитель/разбавитель) и положительному контролям с указанием пределов колебаний, среднего значения и стандартного отклонения.

Обсуждение результатов.

Заключение.

Заключение

Анализ мутагенной активности пестицидов и их основных метаболитов является обязательной составной частью их токсикологического анализа, необходимого для последующей оценки риска здоровью населения. Основные методы, которые следует использовать при проведении анализа мутагенности пестицидов, включают: оценку индукции генных мутаций на микроорганизмах (тест Эймса, сальмонелла/микросомы); анализ индукции микроядер (микроядерный тест) или аберраций хромосом в клетках костного мозга млекопитающих *in vivo*, анализ ДНК-повреждений в соматических клетках *млекопитающих in vivo*. В ряде случаев следует использовать дополнительные методы, например, при наличии информации о мутагенной активности структурных аналогов в тестах, не отнесенных к основным; при органной специфичности действия вещества; при специфической активности вещества (бактериостатический эффект; сильное угнетение деления клеток кроветворной систе-

мы и т. д.), ограничивающей использование основных тестов. К дополнительным методам следует отнести оценку хромосомных аберраций и микроядер, а также повреждений ДНК в клетках млекопитающих и человека *in vitro*. Цитогенетическое исследование хромосомных аберраций в лимфоцитах и клетках буккального эпителия человека, а также методы оценки повреждений ДНК в указанных клетках могут быть использованы при проведении эпидемиологических расследований или в процессе изучения условий применения пестицидов в сельском хозяйстве, при которых работают специалисты, непосредственно осуществляющие эти работы.

Результаты оценки мутагенной активности применяют для установления класса опасности по мутагенному эффекту согласно гигиенической классификации пестицидов и агрохимикатов по степени опасности (СанПиН 1.2.2584—10) и для разработки гигиенических нормативов содержания пестицидов в объектах окружающей среды с учетом мутагенности для обеспечения безопасности их применения. В случае отсутствия доказательств мутагенности при учете повреждений ДНК, генных и хромосомных мутаций на стандартных генетических объектах исследуемое вещество может быть отнесено к 4-му классу опасности. При наличии достаточных доказательств мутагенности на стандартных лабораторных генетических объектах (не млекопитающие, культуры клеток млекопитающих и человека *in vitro*) и/или воспроизводимых позитивных результатов на млекопитающих в дозе, равной максимально переносимой дозе (МПД) или выше по меньшей мере в одном тесте, вещество относится к 3-му классу опасности. Ко 2-му классу могут быть отнесены вещества, для которых либо получена зависимость мутагенности от дозы, либо (при отсутствии такой зависимости) получены воспроизводимые позитивные результаты на млекопитающих *in vivo* в дозе ниже МПД в сочетании с достаточными доказательствами мутагенности на стандартных лабораторных генетических объектах *in vitro*. К этому же классу относят вещества, для которых имеются единичные эпидемиологические наблюдения мутагенного эффекта в соматических клетках человека. Достаточные доказательства мутагенности для человека в эпидемиологических исследованиях (наличие мутаций в зародышевых и соматических клетках) или – в порядке исключения – ограниченные доказательства мутагенности для человека (наличие мутаций в соматических клетках) в сочетании с достаточными доказательствами мутагенности для млекопитающих (зависимая от дозы мутагенность в рамках стандартных протоколов исследований в соматических и зародышевых клетках *in vivo*) позволяют отнести вещество к 1-му классу опасности.

Используемые методы требуют специальной квалифицированной подготовки и должны проводиться опытными сотрудниками, прошедшими обучение в области генетической токсикологии.

Библиографические данные

1. Регламент (ЕС) № 1107/2009 Европейского парламента и Совета Европейского союза о размещении на рынке средств защиты растений и отмене Директив Совета ЕС 79/117/ЕЕС и 91/414/ЕЕС от 21 октября 2009 г.

2. МР 4.2.0014—10 «Оценка генотоксических свойств методом ДНК-комет *in vitro*». М., 2010.

3. МР «Оценка мутагенной активности факторов окружающей среды в клетках разных органов млекопитающих микроядерным методом», Межведомственный научный совет по экологии человека и гигиене окружающей среды Российской Федерации, 2001.

4. МР «Определение мутагенной активности химических соединений с использованием лабораторных мышей». М.: РАМН, 1985.

5. Руководство по краткосрочным тестам для выявления мутагенных и канцерогенных химических веществ. Гигиенические критерии состояния окружающей среды 51. ВОЗ, Женева, 1989.

6. OECD Guideline № 471 «Bacterial Reverse Mutation Test», 1997.

7. OECD Guideline № 473 «In Vitro Mammalian Chromosomal Aberration Test», 2014.

8. OECD Guideline № 474 («Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test»), 2014.

9. OECD Guideline № 475 «Mammalian Bone Marrow Chromosome Aberration Test»), 2014.

10. OECD Guideline № 487 «Genetic Toxicology: In Vitro Mammalian Cell Micronucleus Test», 2014.

11. OECD Guideline № 489 «In vivo mammalian alkaline comet test assay», 2014.

Оценка мутагенной активности пестицидов

Методические указания
МУ 1.2.3364—16

Ответственный за выпуск Н. В. Митрохина

Редакторы Л. С. Кучурова, Ю. А. Паршина
Компьютерная верстка Е. В. Ломановой

Подписано в печать 13.12.2016

Формат 60x88/16 Печ. л. 3,25
Тираж 125 экз. Заказ 69

Федеральная служба по надзору
в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
127994, Москва, Вадковский пер., д. 18, стр. 5, 7

Оригинал-макет подготовлен к печати и тиражирован
отделением издательского обеспечения отдела научно-методического обеспечения
Федерального центра гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора
117105, Москва, Варшавское ш., 19а
Реализация печатных изданий, тел./факс: 8 (495) 952-50-89

gost.e-ecolog.ru