МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СОВЕТ ПО СТАНДАРТИЗАЦИИ, МЕТРОЛОГИИ И СЕРТИФИКАЦИИ
(МГС)

INTERSTATE COUNCIL FOR STANDARDIZATION, METROLOGY AND CERTIFICATION
(ISC)

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

ГОСТ 32635— 2014

МЕТОДЫ ИСПЫТАНИЯ ПО ВОЗДЕЙСТВИЮ ХИМИЧЕСКОЙ ПРОДУКЦИИ НА ОРГАНИЗМ ЧЕЛОВЕКА

Микроядерный тест на клетках млекопитающих *in vitro*

(OECD, Test №487: 2010, IDT)

Издание официальное

Москва
Стандартинформ
2015

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

Цели, основные принципы и основной порядок проведения работ по межгосударственной стандартизации установлены в ГОСТ 1.0–92 «Межгосударственная система стандартизации. Основные положения» и ГОСТ 1.2–2009 «Межгосударственная система стандартизации. Стандарты межгосударственные, правила, рекомендации по межгосударственной стандартизации. Правила разработки, принятия, обновления и отмены»

Сведения о стандарте

1 ПОДГОТОВЛЕН Федеральным государственным унитарным предприятием «Всероссийский научно-исследовательский центр стандартизации, информации и сертификации сырья, материалов и веществ» (ФГУП «ВНИЦСМВ»);

Техническим комитетом по стандартизации № 339 «Безопасность сырья, материалов и веществ» Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии

2 ВНЕСЕН Федеральным агентством по техническому регулированию и метрологии

3 ПРИНЯТ Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации (протокол от 30 мая 2014 г. № 67-П)

За принятие стандарта проголосовали:

Краткое наименование страны по МК (ИСО 3166) 004 – 97	Код страны по МК (ИСО 3166) 004 – 97	Сокращенное наименование национального органа по стандартизации
Азербайджан	AZ	Азстандарт
Армения	AM	Минэкономики Республики Армения
Беларусь	BY	Госстандарт Республики Беларусь
Казахстан	KZ	Госстандарт Республики Казахстан
Киргизия	KG	Кыргызстандарт
Молдова	MD	Молдова-Стандарт
Россия	RU	Росстандарт
Таджикистан	TJ	Таджикстандарт
Туркменистан	TM	Туркменстандартлары
Узбекистан	UZ	Узстандарт
Украина	UA	Департамент технического регулирования Минэкономторг

4 Настоящий стандарт идентичен международному документу OECD Test № 487:2010 In Vitro Mammalian Cell Micronucleus Test (ОЭСР, Тест № 487:2010 «Микроядерный тест на клетках млекопитающих in vitro»).

Перевод с английского языка (en).

Степень соответствия – идентичная (IDT)

5 Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 29 сентября 2014 г. № 1233-ст межгосударственный стандарт ГОСТ 32635—2014 введен в действие в качестве национального стандарта Российской Федерации с 1 июня 2015 г.

6 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

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

© Стандартинформ, 2015

В Российской Федерации настоящий стандарт не может быть полностью или частично воспроизведен, тиражирован и распространен в качестве официального издания без разрешения Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии

Введение

Микроядерный тест *in vitro* (МЯТ) – 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 кластогенную и анеугенную активность химических веществ [2, 3] в клетках, которые проходят клеточное деление во время или после экспозиции исследуемого вещества. Данное руководство касается использования протоколов без или с применением ингибитора актин полимеразы цитохолазина В (ЦХБ). Добавление ЦХБ перед изучаемым митозом позволяет идентифицировать и проводить анализ частоты микроядер в клетках, которые прошли один митоз, т.к. такие клетки двуядерны [4, 5]. Это руководство также дает описание протокола без блока цитокинеза при условии наличия данных, что анализируемая клеточная популяция митотически активна.

В дополнении к использованию МЯТ для идентификации индуцирующих микроядра химических веществ, цитокинезный блок, иммунохимическое мечение кинетохоров или гибридизация с центромерными/теломерными зондами (флуоресцентная гибридизация in situ (FISH)) позволяют получить информацию по механизмам хромосомных нарушений и образования микроядер [6, 7, 8. 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17]. Процедуры мечения и гибридизации можно использовать в случаях, когда имеется повышение образования микроядер и исследователь хочет выяснить, является ли это возрастание результатом кластогенных и/или анеугенных событий.

Микроядра представляют собой нарушения хромосом, которые передаются дочерним клеткам, тогда как аберрации хромосом, анализируемые в метафазных клетках, могут не передаваться. Поскольку выявление микроядер в интерфазных клетках достаточно объективно, сотрудникам лабораторий необходимо определить прошла или не прошла клетка клеточное деление и как много клеток содержит микроядра. В результате анализ препаратов проводится относительно быстро и может быть автоматизирован. На практике это позволяет анализировать тысячи, а не сотни, клеток на экспериментальную точку, увеличивая силу метода. Наконец, поскольку микроядра могут образовывать отставшие хромосомы, возникает возможность выявлять агенты, индуцирующие анеуплоидию, что трудно оценивать в стандартном тесте на хромосомные аберрации, (например, Руководство OECD 473 [18]). Однако МЯТ не позволяет выявлять вещества, индуцирующие полиплоидию, от веществ, которые индуцируют кластогенность, без специальных методик, таких как FISH.

МЯТ – является методом *in vitro*, который проводится на культивируемых клетках человека и грызунов. Тест дает полное основание исследовать хромосомные нарушения *in vitro*, поскольку выявляет как анеугены, так и кластогены.

МЯТ надежен и эффективен в различных типах клеток как в присутствии, так и отсутствии ЦХВ. Имеется большое количество данных, показывающих приемлемость МЯТ при использовании различных линий клеток грызунов (CHO, V79, CHL/IU и L5178Y) и лимфоцитов человека [19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32]. Они включают Международное исследование по валидации теста, координируемое the Société Francaise de Toxicologie Génétique (SFTG) [19, 20, 21, 22, 23] и доклады Международных совещаний по генетическому тестированию [5, 17]. Все приемлемые данные были также повторно оценены в weight-of-evidence ретроспективном валидационном исследовании Европейского центра по валидизации альтернативных методов (ECVAM) Европейской Комиссии (ЕС). Метод тестирования был рекомендован как научно обоснованный ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC) [33, 34, 35]. Имеются данные по использованию клеточной линии лимфобластных клеток человека TK6 [36], HepG2 клеток [37, 38] и первичных эмбриональных клеток сирийского хомячка [39], хотя они не проходили валидизационное исследование.

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

МЕТОДЫ ИСПЫТАНИЯ ПО ВОЗДЕЙСТВИЮ ХИМИЧЕСКОЙ ПРОДУКЦИИ НА ОРГАНИЗМ ЧЕЛОВЕКА

Микроядерный тест на клетках млекопитающих *in vitro*

OECD guidelines for the testing of chemicals.
In Vitro Mammalian Cell Micronucleus Test

Дата введения – 2015–06–01

1 Область применения

Тесты *in vitro* обычно требуют использования экзогенного источника метаболической активации, за исключением клеток, которые метаболически компетентны в отношении исследуемых соединений. Система метаболической активации не может полностью воспроизводить условия, присутствующие у млекопитающих *in vivo*. Следует тщательно избегать условий, которые могут привести к результатам, не отвечающим реальной мутагенности. Позитивные результаты, не отвечающие реальной мутагенности, могут возникать вследствие изменения pH, осмотической концентрации, высокого уровня токсичности [41, 42]. Если исследуемое вещество вызывает изменение pH среды во время введения в культуру, pH должно быть скорректирована, предпочтительно забуферив исходный раствор. Таким образом, все объемы при всех концентрациях и все контроли будут иметь одинаковую pH.

Для анализа индукции микроядер необходимо, чтобы митозы были как в опытных, так и контрольных культурах. Для анализа микроядер наиболее информативна является стадия, при которой клетки прошли один митоз во время или после воздействия исследуемого вещества.

2 Термины и определения

2.1 **анеуген** (Aneugen): любое соединение или процесс, которые, взаимодействуя с компонентами цикла деления митотических и мейотических клеток, приводят к анеуплоидии в клетках или организмах.

2.2 **анеуплоидия** (Aneuploidy): любое отклонение от нормального диплоидного (или гаплоидного) числа хромосом на одну или более хромосом, но не на полный набор хромосом (полиплоидия).

2.3 **апоптоз** (Apoptosis): запрограммированная клеточная гибель, характеризующаяся серией этапов, ведущих к дезинтеграции клеток в мембранно-связанные частицы, которые затем элиминируются затем фагоцитозом или выбросом.

2.4 **генотоксический** (Genotoxic): общий термин, охватывающий все типы повреждений ДНК или хромосом, включающий разрывы, аддукты, перестройки, мутации, хромосомные аберрации и анеуплоидию. Не все типы генотоксических эффектов приводят к мутациям или стабильным хромосомным нарушениям.

2.5 **индекс пролиферации при цитокинетическом блоке (CBPI)** (Cytokinesis-Block Proliferation index (CBPI)): доля клеток второго деления в обработанной популяции относительно контроля без обработки (см. формулы в Приложении А).

2.6 **индекс репликации (RI)** (Replication Index (RI)): доля завершенных циклов клеточного деления в обработанных культурах по отношению к культурам без обработки в течение периода экспозиции и восстановления (см. формулы в Приложении А).

2.7 **интерфазные клетки** (Interphase cells): клетки не в стадии митоза.

2.8 **кинетохор** (Kinetochore)**:** белок содержащая структура, которая расположена в центромере хромосомы, с которой во время клеточного деления связаны волокна веретена, позволяющие точно расходиться дочерним хромосомам к полюсам дочерних клеток.

2.9 **клеточная пролиферация** (Cell proliferation): увеличение числа клеток в результате митотического деления клеток.

2.10 **кластоген** (Clastogen): любое соединение или процесс, которые вызывают структурные хромосомные аберрации в популяции клеток или организмов.

Издание официальное

2.11 **микроядра** (Micronuclei): небольшие ядерные образования, отделенные от основного ядра клетки, образовавшиеся во время телофазы митоза или мейоза в результате отставания хромосомных фрагментов или целых хромосом.

2.12 **митоз** (Mitosis): деление клеточного ядра, обычно подразделяющееся на профазу, прометафазу, метафазу, анафазу и телофазу.

2.13 **митотический индекс** (Mitotic index): отношение числа клеток в метафазе к общему числу клеток в наблюдаемой клеточной популяции; показатель клеточной пролиферации в данной популяции.

2.14 **мутагенный** (Mutagenic): образование наследуемых изменений последовательности пар оснований в ДНК или структуры хромосом (хромосомные аберрации).

2.15 **нерасхождение** (Non-disjunction): нарушение расхождения парных хроматид и правильной сегрегации при образовании дочерних клеток, приводящее к аномальному числу хромосом в дочерних клетках.

2.16 **относительное возрастание количества клеток (RICC)** (Relative Increase in Cell Count (RICC)): метод измерения цитотоксичности в методиках, при которых не используется ЦХВ (см. формулы в Приложении А).

2.17 **относительное удвоение популяции (RPD)** (Relative Population Doubling (RPD)): метод измерения цитотоксичности в методиках, при которых не используется ЦХВ (см. формулы в Приложении А).

2.18 **полиплоидия** (Polyploidy): численные нарушения хромосом в клетках или организмах, затрагивающие полный набор(ы) хромосом, в противоположность нарушениям по одной или нескольким хромосомам (анеуплоидия).

2.19 **пролиферативный индекс (PI)** (Proliferation Index (PI)): метод измерения цитотоксичности в методиках, при которых не используется ЦХВ (см. формулы в Приложении А).

2.20 **центромера** (Centromere): участок ДНК хромосомы, где две хроматиды соединяются вместе и в котором оба кинетохора соединяются друг с другом.

2.21 **цитокинез** (Cytokinesis): процесс клеточного деления сразу после митоза, формирующий дочерние клетки, каждая из которых содержит одно ядро.

2.22 **цитостатичность** (Cytostasis): ингибирование роста клеток (см. формулы в Приложении А).

2.23 **цитотоксичность** (Cytotoxicity): вредные эффекты на структуру или функцию клеток, в конечном счете приводящие к гибели клетки.

3 Принцип исследования

Культуры клеток человеческого или животного происхождения обрабатывают исследуемым веществом как без, так и в присутствии экзогенного источника метаболической активации за исключением клеток с адекватными особенностями метаболизма. Во все тесты включают контроли с растворителем/разбавителем и позитивные контроли.

Во время и после воздействия исследуемым веществом клетки должны расти такой период времени, который достаточен для формирования из хромосомных нарушений и нарушений веретена деления микроядер в интерфазных клетках. Для индукции анеуплоидии вещество должно обычно присутствовать во время митоза. Микроядра анализируют в фиксированных и окрашенных интерфазных клетках. Идеально, микроядра следует анализировать только в тех клетках, которые закончили митоз во время экспозиции исследуемого вещества или в течение постэкспозиционного периода, если таковой используется. В культурах, которые обрабатывают блокатором цитокенеза, это достигается при анализе двуядерных клеток. В отсутствии блока цитокинеза важно показать, что анализируемые клетки прошли клеточное деление во время или после воздействия исследуемым веществом. Для всех протоколов важно показать, что пролиферация клеток была как в контрольных, так и опытных культурах. Степень индуцированных исследуемым веществом цитотоксичности и цитостатичности должны быть определена в культурах (или параллельных культурах), в которых анализируют микроядра.

4 Описание метода

4.1 Материалы

Используют первичные культуры лимфоцитов периферической крови человека [6, 20, 43, 44] и ряд клеточных линий грызунов, таких как CHO, V79, CHL/IU и L5178Y [19, 20, 21, 22, 23, 26, 27, 28, 29, 31]. Использование других клеточных линий и типов должно быть научно обосновано по критериям, описанным в разделе «Критерии приемлемости». Так как спонтанная частота микроядер влияет на

чувствительность метода, рекомендуются использовать типы клеток с 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. Если клетки более чем одного донора объединяют для использования, число доноров должно быть указано. Частота микроядер возрастает с возрастом индивидов и этот тренд более заметен у женщин, чем у мужчин [45]. Это следует принимать во внимание при отборе доноров для объединения.

4.2 Среды и условия культивирования

Необходимо использовать соответствующую культуральную среду и условия инкубации (культуральная посуда, температура, концентрация CO_2 и влажность). Перевиваемые клеточные линии и штаммы должны обычно проверяться на стабильность модального числа хромосом и отсутствие контаминации микоплазмой. Не следует использовать культуры, если выявлена контаминация микоплазмой или модальное число хромосом изменено. Должна быть известна нормальная продолжительность клеточного цикла для условий культивирования, используемых в лаборатории. Если используется метод цитокинетического блока, то концентрация ингибитора цитокинеза должна быть оптимизирована для каждого типа клеток и должно быть показано, что имеется хороший для анализа выход двуядерных клеток.

4.3 Подготовка культур

4.3.1 Перевиваемые клеточные линии и штаммы

Клетки отбирают из исходных (сток) культур, высевают в культуральную среду в плотности, такой, чтобы культура не достигла слияния в монослое, а суспензионные культуры не достигли избыточной плотности, перед временем фиксации. Клетки инкубируют при 37 °С.

4.3.2 Лимфоциты

Цельную кровь, обработанную антикоагулянтом (например, гепарином), или выделенные лимфоциты культивируют в присутствии митогена фитогемагглютинина (ФГА) перед воздействием исследуемого вещества и ЦХВ.

4.4 Метаболическая активация

При работе с клетками, у которых отсутствует адекватная эндогенная метаболическая система, следует использовать систему экзогенной метаболической активации. Наиболее часто используемая система включает кофакторы и постмитохондриальную фракцию (S9) печени грызунов, обработанных индукторами ферментов такими как Arochlor 1254 [46, 47] или комбинацию фенобарбитала и ß-нафтофлавона [47, 48, 49, 50]. Последняя комбинация не противоречит Стокгольмской конвенции по стойким органическим загрязнениям [51] и, как было показано, так же эффективна как Arochlor 1254 по индукции оксигеназ смешанной функции [47, 48, 49, 50]. Обычно S9 фракцию используют в концентрации в диапазоне 1 % — 10 % от конечного объема среды. Условия системы метаболической активации зависят от класса тестируемого химического соединения. В некоторых случаях возможно проведение опыта с более, чем одной концентрацией постмитохондриальной фракции.

Генетически инженерные клеточные линии, экспрессирующие специфические активирующие ферменты человека или грызунов, могут ограничить необходимость применения экзогенных систем метаболической активации и могут быть использованы в данной тест системе. В этом случае выбор клеточных линий должен быть научно обоснован, например, пригодность оксидаз смешанной функции для метаболизма исследуемого вещества [52] и по ответу при тестировании известных кластогенов и анеугенов (смотри раздел «Критерии приемлемости»). Следует помнить, что тестируемое вещество может не метаболизироваться экспрессируемыми оксидазами смешанной функции. В этом случае отрицательный результат не указывает на то, что вещество не индуцирует микроядра.

4.4.1 Подготовка исследуемого вещества

Твердые вещества необходимо растворять в соответствующих растворителях или разбавителях и разводить перед обработкой клеток. Газообразные и летучие соединения следует тестировать при соответствующих модификациях стандартного протокола, таких как обработка в закупоренных сосудах [53, 54]. Свежие препараты должны использоваться до тех пор, пока не будут получены данные об их стабильности при соответствующих условиях хранения.

4.5 Условия тестирования

4.5.1 Растворитель/разбавитель

Растворитель/разбавитель не должен химически взаимодействовать с исследуемым веществом и не должен влиять на выживаемость клеток и активность S9 системы в используемых концентрациях. Если, помимо хорошо изученных (например, вода, культуральная среда, диметлсульфоксид), используется другой растворитель/разбавитель, его применение должно быть

обосновано данными, показывающими его совместимость с исследуемым веществом и отсутствие у него генетической активности. Рекомендуется, если возможно, использовать в первую очередь водные растворы/суспензии.

4.5.2 Использование ЦХВ как блокатора цитокинеза

Одним из важнейших моментов проведения МЯТ является гарантия того, что анализируемые клетки прошли митоз во время обработки или в период инкубации после обработки, если его использовали в методике. ЦХВ – вещество, которое наиболее широко используется для блокирования цитокинеза, так как он подавляет сборку актина и таким образом препятствует разделению дочерних клеток после митоза, приводя к формированию двуядерных клеток [6, 55, 56]. Поэтому, подсчет микроядер может быть ограничен клетками, которые прошли митоз во время или после воздействия. Одновременно можно оценить действие вещества на кинетику пролиферации. ЦХВ следует использовать как блокатор цитокинеза в опытах с лимфоцитами человека, так как длительность клеточного цикла может варьировать между культурами и между донорами и не все лимфоциты будут отвечать на ФГА. Когда тестируют клеточные линии, другие методики использует, чтобы определить, прошли ли учитываемые клетки деление. Это рассмотрено ниже.

Необходимые концентрации ЦХВ следует определить в лаборатории для каждого типа клеток, чтобы достичь оптимальной частоты двуядерных клеток в контрольных культурах с растворителем/разбавителем. Обычно приемлемая концентрация ЦХВ находится в диапазоне между 3 и 6 мкг/мл.

4.5.3 Измерение клеточной пролиферации и цитотоксичности и выбор экспозиционных концентраций

При определении максимальной исследуемой концентрации вещества следует избегать концентраций, которые могут вызвать искусственный положительный ответ, вызывая сильную цитотоксичность, преципитацию в культуральной среде и заметное изменение pH и осмотической концентрации [40, 41, 42].

Анализ клеточной пролиферации проводится для того, чтобы установить, что клетки находились в митозе во время обработки и что воздействие привело к приемлемому уровню цитотоксичности. Цитотоксичность следует оценивать в вариантах с и без метаболической активации в клетках, которые не требуют метаболической активации, используя относительное возрастание количества клеток (RICC) и относительное удвоение популяции (RPD) (см. Приложение 1 для формул), когда не используется ЦХВ. Когда используется ЦХВ, цитотоксичность может быть определена используя индекс репликации (RI) (см. Приложение А для формул).

Обработка культур ЦХВ 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 [6] и позволяет анализировать только клетки, которые делились во время или после воздействия.

В исследованиях с ЦХВ цитотостатичность/цитотоксичность можно количественно оценить индексом пролиферации при цитокинезном блоке (CBPI) [6, 27, 57] или вывести из RI при анализе 500 клеток на культуру. Эти параметры, наряду с другими, можно использовать при оценке цитотоксичности, сравнивая величины в экспериментальных и контрольных культурах. Оценка других показателей цитотоксичности (слияние, число клеток, апоптоз, некроз, подсчет метафаз) также дает полезную информацию.

В экспериментах без ЦХВ необходимо показать, что анализируемые клетки прошли деление во время или после воздействия исследуемым веществом. Если это не сделать, то могут быть получены ложноотрицательные результаты. Методы, которые используются для установления того, что были проанализированы делящиеся клетки, включают инкорпорацию и последующее выявление бромдезоксиуридина (БДУ), для идентификации клеток, которые реплицировались [58], образование клонов, когда обрабатываются клетки перевиваемых клеточных линий и подсчитывается in situ под микроскопом стекло (индекс пролиферации (PI)) [26, 27, 28, 29] или определяется относительное удвоение популяции (RPD) или относительное возрастание количества клеток (RICC) или другими обоснованными методами [17, 57, 59, 60] (см. Приложение А для формул). Оценка других показателей цитотоксичности (слияние, число клеток, апоптоз, некроз, подсчет метафаз) также дает полезную информацию.

Должны быть оценены по крайней мере 3 концентрации, которые позволяют провести анализ. Для достижения этого возможно необходимо провести эксперимент, используя большое число близко ранжированных концентраций, и анализировать микроядра при концентрациях, проявивших подходящий уровень цитотоксичности. Альтернативная стратегия – проведение предварительного эксперимента по оценке цитотоксичности, чтобы ограничить диапазон концентраций для основного теста.

Наивысшая концентрация должна вызывать цитотоксичность на уровне 55 ± 5 %. Высокие концентрации могут индуцировать хромосомные нарушения, которые являются вторичным эффектом цитотоксичности [61]. При выявлении цитотоксичности, исследуемые концентрации должны быть в диапазоне от концентрации, вызывающей цитотоксичность 55 ± 5 %, до концентрацией с минимальной цитотоксичностью или отсутствием цитотоксичности.

Если не наблюдается цитотоксичность или преципитация, максимальные концентрации следует брать 0,01М, 5 мг/мл или 5 мкл/мл, выбирая из них наименьшую. Интервал между выбранными концентрациями следует брать не более √10. Для веществ, у которых выявляется крутая зависимость концентрация-эффект, возможно использование более узкого интервала между концентрациями, анализируя культуры со средним и низким уровнем токсичности.

Когда ограничивающим фактором является растворимость, максимальная концентрация, если не ограничивает цитотоксичность, берется на уровне наименьшей концентрации, при которой в культуре отмечается минимальная преципитация, не мешающая анализу препарата. Оценка преципитации проводится методами световой микроскопии, при выявлении преципитации, которая персистирует, или появлению приципитации во время культивирования (в конце воздействия).

4.6 Контроли

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

Позитивные контроля необходимы, чтобы показать способность использованных клеток и протокола тестирования выявлять кластогены и анеугены и подтвердить метаболическую способность препарата S9. Позитивные контроли выбираются из известных веществ, индуцирующих образование микроядер в концентрациях, которые вызывают небольшое, но воспроизводимое повышение эффекта над контролем и демонстрируют чувствительность тест-системы. Концентрации позитивных контролей подбирают так, чтобы эффект был четким, но не позволял исследователю сразу идентифицировать зашифрованный препарат.

Кластогены, которым 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 для позитивного контроля. Поскольку некоторые позитивные контроли, которые нуждаются в метаболической активации, могут быть активны без экзогенной метаболической активации при определенных условиях воздействия или в определенных клеточных линиях, необходимость метаболической активации и активность S9 препаратов следует исследовать в выбранных клеточных линиях и при отобранных концентрациях.

В настоящее время не известны анеугены, которые требуют метаболической активации для проявления генотоксической активности [17]. К веществам, принятым как позитивный контроль для оценки анеугенной активности, относятся, например, колхицин и винбластин. Можно использовать другие вещества, если они индуцируют микроядра исключительно или в основном через анеугенную активность. Чтобы избежать необходимости двух контролей (для кластогенности и анеугенности) без метаболической активации, анеугенный контроль может применяться как позитивный в вариантах без S9, а контроль кластогенности может использоваться для оценки адекватности используемой системы метаболической активации. Позитивные контроли на кластогенность и анеугенность следует использовать на клетках, которые не требуют S9. Предполагаемые позитивные контроли приведены в Приложении Б.

Может допускаться использование веществ химически связанного класса с известными позитивными контролями. Все используемые вещества позитивного контроля должны соответствовать типу клеток и условиям активации.

Контроль с растворителем/разбавителем должен присутствовать для каждого времени фиксации. Дополнительно, негативный контроль без обработки также может ставиться, пока опубликованные данные или исторический контроль лаборатории не покажет, что растворитель в использованных концентрациях не индуцирует генотоксические и другие вредные эффекты.

5 Проведение теста

5.1 Схема обработки

Для того, чтобы максимизировать вероятность выявления анеугена или кластогена, активных в специфических стадиях клеточного цикла, необходимо, чтобы достаточное число клеток было обработано исследуемым веществом в течение всех стадий клеточного цикла. Схемы обработки для клеточных линий и первичных клеточных культур могут отличаться от таковой для лимфоцитов, которые требуют стимуляции митогеном, для начала клеточного цикла [17].

Теоретические подходы вместе с опубликованными данными [19] показывают, что большинство анеугенов и кластогенов будут выявлены при коротком периоде обработки, от 3 до 6 часов, в присутствии и отсутствии S9, последующем удалении исследуемого соединения и периоде роста в течение 1,5 – 2,0 клеточных циклов [7]. 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, (см. Таблицу 1). Время фиксации или восстановления может быть увеличено, если известно или ожидается, что вещество нарушает продолжительность клеточного цикла (например, при исследовании аналогов нуклеозидов).

Из-за потенциальной цитотоксичности препаратов S9 для культивируемых клеток млекопитающих длительность экспозиции 1,5-2,0 нормального клеточного цикла используется только в вариантах с отсутствием S9. Существует мнение, что при длительной экспозиции можно проводить обработку клеток химическим веществом при отсутствии и в присутствии ЦХВ. Это мнение относится к ситуациям, когда предполагается возможное взаимодействие между исследуемым веществом и ЦХВ.

Предлагаемая схема обработки клеток представлена в таблице 1. Эти общие схемы обработки можно модифицировать в зависимости от стабильности и реакционной способности исследуемого вещества или особых характеристик роста используемых клеточных линий. Все виды обработки культуры должны начинаться и заканчиваться в период, когда клетки растут экспоненциально.

Таблица 1 Время обработки клеток и фиксации в МЯТ тесте.

Лимфоциты, первичные клеточные культуры и клеточные линии с введением ЦХВ	+S9	Длительность обработки 3-6 часа в присутствии S9; удаление S9 и среды с веществом; добавление свежей среды и ЦХВ; фиксация через промежуток времени 1,5-2,0 нормального клеточного цикла.
	-S9, кратковременная экспозиция	Длительность обработки 3-6 часа; удаление среды с веществом; добавление свежей среды и ЦХВ; фиксация через промежуток времени 1,5-2,0 нормального клеточного цикла.
	-S9, длительная экспозиция	*Вариант А*: Обработка 1,5-2,0 нормального клеточного цикла в присутствии ЦХВ; Фиксация в конце периода экспозиции. *Вариант Б*: Обработка 1,5-2,0 нормального клеточного цикла; удаление исследованного вещества; добавление свежей среды и ЦХВ; фиксация через промежуток времени 1,5-2,0 нормального клеточного цикла.
Клеточные линии обрабатываются без ЦХВ (Схемы введения идентичны представленным выше, за исключением того, что ЦХВ не добавляется).		

5.2 Лимфоциты, первичные клетки и клеточные линии с ЦХВ.

Для лимфоцитов наиболее эффективный подход – начать экспозицию исследуемым веществом через 44-48 часов после стимуляции ФГА, когда исчезает синхронизация клеточного цикла [6]. В начальном эксперименте клетки обрабатывают исследуемым веществом от 3 до 6 часов в отсутствии или присутствии S9. Затем среду с веществом удаляют и замещают свежей средой, содержащей ЦХВ. Клетки фиксируют через промежуток времени 1,5-2,0 нормального клеточного цикла.

Если начальные тесты с коротким (3-6 часов) периодом обработки показали отрицательный или сомнительный результат, используют протокол с длительной экспозицией без S9. Одинаково приемлемы 2 варианта обработки. Однако, возможно для стимулированных лимфоцитов более подходит Вариант А, когда экспоненциальный рост может снижаться к 96 часу после стимуляции. Также в культурах клеток не следует достигать слипания при выборе времени фиксации в Варианте Б.

- Вариант А. Клетки обрабатывают исследуемым веществом в течение 1,5—2,0 нормального клеточного цикла и фиксируют в конце периода экспозиции.

- Вариант Б. Клетки обрабатывают исследуемым веществом в течение 1,5—2,0 нормального клеточного цикла. Среду с веществом удаляют и замещают свежей средой. Клетки фиксируют через дополнительный промежуток времени 1,5 — 2,0 нормального клеточного цикла.

Первичные клетки и клеточные линии обрабатывают сходным способом, что и лимфоциты, за исключением того, что нет необходимости стимуляции их ФГА и обрабатывать через 44—48 часов. Клетки, кроме лимфоцитов, следует обрабатывать в таком режиме, чтобы во время окончания обработки клетки еще находились в логарифмической фазе роста.

5.3 Клеточные линии без ЦХВ

Клетки следует обрабатывать 3-6 часов в присутствии и отсутствии ЦХВ. Среду с веществом удаляют и замещают свежей средой, содержащей ЦХВ. Клетки фиксируют через промежуток времени 1,5—2,0 нормального клеточного цикла.

Если начальные тесты с коротким (3-6 часов) периодом обработки показали отрицательный или сомнительный результат, используют протокол с длительной экспозицией без S9. Подходят 2 варианта обработки. Оба варианта одинаково приемлемы.

- Вариант А. Клетки обрабатывают исследуемым веществом в течение 1,5—2,0 нормального клеточного цикла и фиксируют в конце периода экспозиции.
- Вариант Б. Клетки обрабатывают исследуемым веществом в течение 1,5—2,0 нормального клеточного цикла. Среду с веществом удаляют и замещают свежей средой. Клетки фиксируют через дополнительный промежуток времени 1,5—2,0 нормального клеточного цикла.

В монослое митотические клетки (идентифицируются как шарообразные образования и отделяющиеся от поверхности) могут появляться в конце 3—6 часовой обработки. Так как эти митотические клетки легко отделяются, их можно потерять, при удалении среды, содержащей исследуемое вещество. Следует тщательно собрать их при отмывании культуры и вернуть их в культуру, чтобы избежать потерь клеток, находящихся в митозе, которые ко времени фиксации являются клетками риска для микроядер.

5.4 Число культур

По две культуры следует использовать для каждой концентрации исследуемого вещества и для контрольных культур с растворителем/разбавителем и негативного контроля. Когда предыдущие 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.

5.5 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 использовать 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.

Можно использовать различные методы окраски препаратов, такие как Гимза или специфические к ДНК флуоресцентные красители [60]. Использование специфичных красителей к ДНК (например, акридин оранж [62] или Hoechst 33258 плюс пиронин-Y [63]) может убрать ряд артефактов, связанных с применением не специфичных к ДНК красителям. Анти-кинетохорные антитела, FISH с панцентромерными ДНК зондами или *in situ* мечение с панцентромеры специфическими праймерами, в сочетании с соответствующими красителями могут быть использованы для идентификации содержания (хромосома/фрагменты хромосомы) микроядер, если интересует информация по механизму их формирования [16, 17]. Возможно использование других методов дифференцировки между кластогенами и анеугенами, если показана их эффективность.

5.6 Анализ

Перед микроскопическим анализом все препараты, включая с растворителем/разбавителем и контроли, должны быть независимо зашифрованы. Альтернативно, шифруются пробы, которые анализируются адекватными системами проточной цитометрии или анализа изображения.

В культурах с ЦХВ для оценки частоты микроядер следует анализировать минимум 2000 двуядерных клеток на концентрацию (минимум 1000 двуядерных клеток на культуру при постановке двух культур на концентрацию). В опытах с одной культурой минимум 2000 двуядерных клеток на концентрацию следует анализировать в этой культуре. Если на каждую концентрацию учитывается существенно меньше, чем 1000 двуядерных клеток на культуру или менее 2000, при постановке одной культуры, и если не выявлено значимого повышения частоты микроядер, опыт должен быть повторен, используя больше клеток для анализа или менее токсичные концентрации. Не следует учитывать клетки неправильной формы или с двумя ядрами, значительно различающимися в размерах. Не следует путать двуядерные клетки с плохо разбросанными многоядерными клетками. Клетки, содержащие более чем два ядра не должны анализироваться на микроядра, так как исходная (спонтанная) частота микроядер в этих клетках может быть выше [64, 65]. Возможен подсчет одноядерных клеток, если показано, что исследуемое вещество влияет на активность ЦХВ.

В опытах с клеточными линиями без ЦХВ, микроядра анализируют минимум в 2000 клетках на концентрацию (минимум 1000 клеток на культуру при постановке двух культур на концентрацию). В опытах с постановкой одной культуры на концентрацию анализируют минимум 2000 клеток на культуру.

При использовании ЦХВ следует определять CBPI или RI для оценки клеточной пролиферации (см. Приложение А), анализируя минимум 500 клеток на культуру. При воздействии в отсутствии ЦХВ, следует получить данные, что клетки, которые анализируют, имели пролиферацию.

5.7 Критерии приемлемости

Описанные в данном руководстве лабораторные правила использования МЯТ теста показывают его возможность реально и точно выявлять вещества с известной анеугенной и кластогенной активностью в условиях с и без метаболической активации, а также известные негативные вещества, используемые в качестве контрольных соединений (Приложение Б). Когда получены данные по возможности корректно выполнять данный тест, лаборатория должна показать, что анализируемые на микроядра клетки прошли одно клеточное деление, если тест проводится без использования ЦХВ.

Вещества, представленные в Приложении Б, рекомендуются использовать в качестве контрольных соединений. Может быть проведена замена или дополнение, если известна активность этих веществ, если у них сходный механизм действия и если они относятся к веществам, которые будут тестированы, используя методику МЯТ. Обоснование может включать валидационное исследование, включающее широкий спектр веществ, или сфокусированное на сужение спектра, основанное на химическом классе исследованного вещества или изученном механизме нарушений.

Контроль с растворителем/разбавителем и контроль без обработки должны давать воспроизводимо низкий и постоянный уровень частоты микроядер (типично 5-25 микроядер на 1000 клеток для клеточных типов). Другие типы клеток могут иметь разные уровни ответов, которые следует определить, когда обосновывается возможность использования их в МЯТ тесте. Данные контролей позитивного, негативно и с растворителем следует использовать для установления пределов колебаний исторического контроля. Эти оценки необходимо использовать при решении вопроса об адекватности соответствующих негативных/позитивных контролей в эксперименте.

Если предполагаются минорные изменения протокола эксперимента (например, методики автоматического анализа, использование нового типа клеток), то, если их эффективность показана до модификации протокола, они могут считаться приемлемыми для использования. Демонстрация эффективности включает показ того, что главные механизмы, хромосомные разрывы и отставания и потери могут быть определены, и что соответствующие позитивные и негативные результаты могут быть получены для тестируемого класса отдельных веществ или широкого ряда веществ.

6 Результаты и отчет

6.1 Обработка результатов

Если используется методика цитокинезного блока, то для оценки индукции микроядер используется только частота двуядерных клеток с микроядрами (независимо от числа микроядер на клетку). Учет числа клеток с одним, двумя и более микроядрами может дать полезную информацию, но не обязателен.

Параллельно следует проводить оценку цитотоксичности и/или цитостатичности во всех обработанных и контрольных с растворителем/разбавителем культурах [59]. Необходимо рассчитать CBPI или RI для всех обработанных и контрольных культур, как меру задержки клеточного цикла при использовании метода цитокинетического блока. В отсутствии ЦХВ, следует использовать RPD или RICC или PI (см. Приложение 1).

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

Вещества, которые индуцируют микроядра в МЯТ, индуцируют хромосомные разрывы, потери хромосом или комбинацию этих событий. Дальнейший анализ с применением анти-кинетохорных антител, специфических центромерных зондов *in situ* или других методов может использоваться для установления механизма индукции микроядер, вследствие кластогенного и/или анеугенного эффектов.

6.2 Оценка и интерпретация результатов

Нет требований по дополнительному тестированию для верификации четко положительного или отрицательного ответа. Противоречивые результаты следует прояснить, проводя дополнительный анализ 1000 клеток из всех культур, чтобы избежать потери слепого тестирования. Если это не разрешает ситуацию следует провести дальнейшее тестирование. В последующих экспериментах следует модифицировать параметры исследования, расширяя или сужая колебания условий. Параметры исследования, которые могут быть модифицированы включают диапазон

изучаемых концентраций, время обработки и фиксации клеток и/или условия метаболической активации.

Существует ряд критериев для определения положительного результата: зависимость от концентрации или воспроизводимое повышение частоты мутаций. На первом месте должна быть биологическая обоснованность результатов. Рассмотрение того, находится ли оценка в пределах или за пределами колебаний исторического контроля может дать информацию по оценке биологической значимости ответа. Соответствующие статистические методы дополнительно могут быть использованы при оценке результатов [66]. Однако, при оценке зависимости доза-эффект статистическая обработка необходима. Следует принимать во внимание воспроизводимость и исторические данные.

Хотя в большинстве исследований получают четкие положительные или отрицательные результаты, в редких случаях данные не позволяют сделать заключение об активности вещества. Результаты могут оставаться противоречивыми или сомнительными, несмотря на то, что эксперименты несколько раз повторены.

Положительные результаты в МЯТ тесте показывает, что вещество индуцирует хромосомные разрывы и потери в культивируемых клетках млекопитающих. Отрицательные результаты показывают, что при данных условиях исследуемое вещество не индуцирует хромосомные разрывы и/или отставание или потери хромосом в культивируемых клетках млекопитающих.

6.3 Отчет

Отчет должен включать следующую информацию.

Исследуемое соединение:

- идентификационные данные и номер CAS;
- физическую природу и чистоту;
- 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;
- при работе с лимфоцитами, пол, возраст и число доноров крови;
- при работе с лимфоцитами, использовали цельную кровь или выделенные лимфоциты;
- число пассажей, если используются;
- методы поддержания клеточных культур, если используется;;
- модальное число хромосом;
- нормальное (негативный контроль) время клеточного цикла.

Условия эксперимента:

- вещество, применяемое для блока цитокинеза (например, ЦХВ), его концентрацию и длительность экспозиции в культуре;
- обоснование выбора концентраций и числа клеточных культур, включающее данные по цитотоксичности и ограничения по растворимости, если имеются;
- состав среды, концентрацию CO_2;
- концентрации исследуемого вещества;
- концентрации (и/или объем) растворителя и количество добавленного исследуемого вещества;
- температура и время инкубации;
- длительность обработки культуру;
- время после обработки до фиксации;
- клеточную 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, такие как использование антител к кинетохору, для характеристики содержания в микроядре целых хромосом или фрагментов хромосомы.

Результаты:

- оценка цитотоксичности, например, CBPI или RI при использования методов с блоком цитокинеза, RICC, RPD или PI, когда блок цитокинеза не используется, другие признаки, если имеются, такие как клеточное слипание, апоптоз, подсчет метафаз, частота двуядерных клеток;
- признаки преципитации;
- данные 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 моноядерных клетках, если применяли;
- оценка зависимости эффекта от дозы, где это возможно;
- данные негативному (растворитель/разбавитель) и позитивного контроля (концентрации и растворитель);
- исторические данные по негативному (растворитель/разбавитель) и позитивному контролям с указанием пределов колебаний, средней и стандартного отклонения и доверительных интервалов (95%);
- статистический анализ, значения P.

Обсуждение результатов.

Заключение.

Приложение А
(рекомендуемое)

ФОРМУЛЫ АНАЛИЗА ЦИТОТОКСИЧНОСТИ

1. **При использовании ЦХВ** оценка цитотоксичности основана на Индексе пролиферации при цитокинезном-блоке (Cytokinesis-Block Proliferation Index (CBPI)) и индексе репликации (Replicative Index (RI)) [17, 59]. CBPI показывает среднее число клеточных циклов на клетку, в течение периода экспозиции ЦХВ. Он может быть использован для подсчета клеточной пролиферации. RI показывает относительное число ядер в обработанной культуре по сравнению с контрольной культурой и может использоваться при расчете % цитостатичности:

Цитостатичность (%) = 100 - 100{$(CBPI_T - 1)/(CBPI_k - 1)$}

$$CBPI = \frac{((число\ одноядерных\ клеток) + (2 \times число\ двуядерных\ клеток) + (3 \times число\ многоядерных\ клеток))}{(общее\ число\ клеток)}$$

Таким образом, при CBPI = 1 (все клетки с одним ядром) цитостатичность у 100% клеток.

Цитостатичность = 100 – RI

$$RI = \frac{((число\ двуядерных\ клеток)_T + (2 \times число\ многоядерных\ клеток)_T) \div (общее\ число\ клеток)_T}{((число\ двуядерных\ клеток)_R + (2 \times число\ многоядерных\ клеток)_R) \div (общее\ число\ клеток)_R} \times 100$$

где Т – культура с введением исследуемого вещества;

К – контрольная культура с растворителем.

2. Таким образом, RI 53% означает, что по сравнению с числом клеток, которые делятся, образуя двуядерные и многоядерные клетки в контрольной культуре, только 53% от этого числа делятся в обработанной культуре, т.е цитостатичность в 47%.

3. **Эксперименты без использования ЦХВ.** Оценку цитотоксичности рекомендуется представлять в виде показателей относительного возрастания количества клеток (Relative Increase in Cell Count) (RICC) или относительного удвоения популяции (Relative Population Doubling) (RPD) [59]. Оба показателя принимают во внимание долю клеток в популяции, которые делятся.

$$RICC = \frac{(увеличение\ числа\ клеток\ в\ опытных\ культурах\ (начало - конец)}{(увеличение\ числа\ клеток\ в\ контрольных\ культурах\ (начало - конец)} \times 100$$

$$RPD = \frac{(удвоение\ популяции\ в\ опытных\ культурах)}{(удвоение\ популяции\ в\ контрольной\ культуре)} \times 100$$

где:

$$Удвоение\ популяции = [\log(число\ клеток\ после\ обработки) \div (начальное\ число\ клеток)] \div \log 2$$

4. Таким образом, RICC или RPD 53% показывает 47% цитотоксичности/цитостатичности.

5. Используя индекс пролиферации (Proliferatin Index) (PI), цитотоксичность может быть рассчитана через подсчет числа клонов, состоящих из 1 клетки (c11), 2 клеток (c12), 3-4 клеток (c14) и 5-8 клеток (c18)

$$PI = \frac{((1 \times c11) + (2 \times c12) + (3 \times c14) + (4 \times c18))}{(c11 + c12 + c14 + c18)}$$

6. PI используется как реальный параметр цитотоксичности для клеточных линий, культивируемых *in situ* в отсутствии ЦХВ [26, 27, 28, 29].

Приложение Б
(рекомендуемое)

Стандартные (референсные) вещества, рекомендованные для оценки качества[1]

Категория	Вещество	Номер CAS
1. Кластогены, активные без метаболической активации.		
	Цитозин арабинозид	147-94-4
	Митомицин С	50-07-7
2. Кластогены, требующие метаболическую активацию.		
	Бенз(а)пирен	50-32-8
	Циклофосфамид	50-18-0
3. Анеугены.		
	Колхицин	64-86-8
	Винбластин	143-67-9
4. Негативные контрольные вещества.		
	Ди(2-этилгексил)фталат	117-81-7
	Налидиксовая кислота	389-08-2
	Пирен	129-00-0
	Хлорид натрия	7647-17647-14-5

[1] Стандартные (референсные) вещества – рекомендованные к использованию вещества. Замена или добавление химического вещества к перечисленным выше может быть сделана, если известна их активность, если они индуцируют микроядра по тому же механизму действия и если было показано, что они относятся к веществам, которые будут оценены в методе МЯТ. В зависимости от цели обоснование может включать валидационное (проверочное) исследование, включающее широкий спектр веществ, или сфокусированное на сужение спектра, основанное на химическом классе исследованного вещества или изученном механизме нарушений.

Библиография

[1] Руководящий документ OECD Test № 487 «In Vitro Mammalian Cell Micronucleus Test».

[2] Kirsch-Volders, M. (1997), Towards a validation of the micronucleus test. Mutation Res., 392, 1-4.

[3] Parry, J.M. and Sors, A. (1993), The detection and assessment of the aneugenic potential of environmental chemicals: the European Community aneuploidy project, Mutation Res., 287, 3-15.

[4] Fenech, M. and Morley, A.A. (1985), Solutions to the kinetic problem in the micronucleus assay, Cytobios., 43, 233-246.

[5] Kirsch-Volders, M., Sofuni, T., Aardema, M., Albertini, S., Eastmond, D., Fenech, M., Ishidate, M. Jr, Lorge, E., Norppa, H., Surralles, J., von der Hude, W. and Wakata, A. (2000), Report from the In Vitro Micronucleus Assay Working Group, Environ. Mol. Mutagen., 35, 167-172.

[6] Fenech, M. (2007), Cytokinesis-block micronucleus cytome assay, Nature Protocols, 2(5), 1084-1104.

[7] Fenech, M. and Morley, A.A. (1986), Cytokinesis-block micronucleus method in human lymphocytes: effect of in-vivo ageing and low dose X-irradiation, Mutation Res., 161, 193-198.

[8] Eastmond, D.A. and Tucker, J.D. (1989), Identification of aneuploidy-inducing agents using cytokinesis-blocked human lymphocytes and an antikinetochore antibody, Environ. Mol. Mutagen., 13, 34-43.

[9] Eastmond, D.A. and Pinkel, D. (1990), Detection of aneuploidy and aneuploidy-inducing agents in human lymphocytes using fluorescence in-situ hybridisation with chromosome-specific DNA probes, Mutation Res., 234, 9-20.

[10] Miller, B.M., Zitzelsberger, H.F., Weier, H.U. and Adler, I.D. (1991), Classification of micronuclei in murine erythrocytes: immunofluorescent staining using CREST antibodies compared to in situ hybridization with biotinylated gamma satellite DNA, Mutagenesis, 6, 297-302.

[11] Farooqi, Z., Darroudi, F. and Natarajan, A.T. (1993), The use of fluorescence in-situ hybridisation for the detection of aneugens in cytokinesis-blocked mouse splenocytes, Mutagenesis, 8, 329-334.

[12] Migliore, L., Bocciardi, R., Macri, C. and Lo Jacono, F. (1993), Cytogenetic damage induced in human lymphocytes by four vanadium compounds and micronucleus analysis by fluorescence in situ hybridization with a centromeric probe, Mutation Res., 319, 205-213.

[13] Norppa, H., Renzi, L. and Lindholm, C. (1993), Detection of whole chromosomes in micronuclei of cytokinesis-blocked human lymphocytes by antikinetochore staining and in situ hybridization, Mutagenesis, 8, 519-525.

[14] Eastmond, D.A, Rupa, D.S. and Hasegawa, L.S. (1994), Detection of hyperdiploidy and chromosome breakage in interphase human lymphocytes following exposure to the benzene metabolite hydroquinone using multicolor fluorescence in situ hybridization with DNA probes, Mutation Res., 322, 9-20.

[15] Marshall, R.R., Murphy, M., Kirkland, D.J. and Bentley, K.S. (1996), Fluorescence in situ hybridisation (FISH) with chromosome-specific centromeric probes: a sensitive method to detect aneuploidy, Mutation Res., 372, 233-245.

[16] Zijno, P., Leopardi, F., Marcon, R. and Crebelli, R. (1996), Analysis of chromosome segregation by means of fluorescence in situ hybridization: application to cytokinesis-blocked human lymphocytes, Mutation Res., 372, 211-219.

[17] Kirsch-Volders, M., Sofuni, T., Aardema, M., Albertini, S., Eastmond, D., Fenech, M., Ishidate Jr., M., Lorge, E., Norppa, H., Surrallés, J., von der Hude, W. and Wakata, A. (2003), Report from the in vitro micronucleus assay working group. Mutation Res., 540, 153-163.

[18] OECD (1997), In Vitro Mammalian Chromosome Aberration Test, Test Guideline No. 473, OECD Guidelines for Testing of Chemicals, OECD, Paris.

[19] Lorge, E., Thybaud, V., Aardema, M.J., Oliver, J., Wakata, A., Lorenzon G. and Marzin, D. (2006), SFTG International collaborative Study on in vitro micronucleus test. I. General conditions and overall conclusions of the study, Mutation Res., 607, 13-36.

[20] Clare, G., Lorenzon, G., Akhurst, L.C., Marzin, D., van Delft, J., Montero, R., Botta, A., Bertens, A., Cinelli, S., Thybaud, V. and Lorge, E. (2006), SFTG International collaborative study on the in vitro micronucleus test. II. Using human lymphocytes, Mutation Res., 607, 37-60.

[21] Aardema, M.J., Snyder, R.D., Spicer, C., Divi, K., Morita, T., Mauthe, R.J., Gibson, D.P., Soelter, S., Curry, P.T., Thybaud, V., Lorenzon, G., Marzin, D. and Lorge, E. (2006), SFTG International collaborative study on the in vitro micronucleus test, III. Using CHO cells, Mutation Res., 607, 61-87.

[22] Wakata, A., Matsuoka, A., Yamakage, K., Yoshida, J., Kubo, K., Kobayashi, K., Senjyu, N., Itoh, S., Miyajima, H., Hamada, S., Nishida, S., Araki, H., Yamamura, E., Matsui, A., Thybaud, V., Lorenzon, G., Marzin, D. and Lorge, E. (2006), SFTG International collaborative study on the in vitro micronucleus test, IV. Using CHO/IU cells, Mutation Res., 607, 88-124.

[23] Oliver, J., Meunier, J.-R., Awogi, T., Elhajouji, A., Ouldelhkim, M.-C., Bichet, N., Thybaud, V., Lorenzon, G., Marzin, D. and Lorge, E. (2006), SFTG International collaborative study on the in vitro micronucleus test, V. Using L5178Y cells, Mutation Res., 607, 125-152.

[24] Albertini, S., Miller, B., Chetelat, A.A. and Locher, F. (1997), Detailed data on in vitro MNT and in vitro CA: industrial experience, Mutation Res., 392, 187-208.

[25] Miller, B., Albertini, S., Locher, F., Thybaud, V. and Lorge, E. (1997), Comparative evaluation of the in vitro micronucleus test and the in vitro chromosome aberration test: industrial experience, Mutation Res., 392, 45-59.

[26] Miller, B., Potter-Locher, F., Seelbach, A., Stopper, H., Utesch, D. and Madle, S. (1998), Evaluation of the in vitro micronucleus test as an alternative to the in vitro chromosomal aberration assay: position of the GUM Working Group on the in vitro micronucleus test. Gesellschaft fur Umwelt-Mutations-forschung, Mutation Res., 410, 81-116.

[27] Kalweit, S., Utesch, U., von der Hude, W. and Madle, S. (1999), Chemically induced micronucleus formation in V79 cells – comparison of three different test approaches, Mutation Res. 439, 183-190.

[28] Kersten, B., Zhang, J., Brendler Schwaab, S.Y., Kasper, P. and Müller, L. (1999), The application of the micronucleus test in Chinese hamster V79 cells to detect drug-induced photogenotoxicity, Mutation Res. 445, 55-71.

[29] von der Hude, W., Kalweit, S., Engelhardt, G., McKiernan, S., Kasper, P., Slacik-Erben, R., Miltenburger, H.G., Honarvar, N., Fahrig, R., Gorlitz, B., Albertini, S., Kirchner, S., Utesch, D., Potter-Locher, F., Stopper, H. and Madle, S. (2000), In vitro micronucleus assay with Chinese hamster V79 cells - results of a collaborative study with in situ exposure to 26 chemical substances, Mutation Res., 468, 137-163.

[30] Garriott, M.L., Phelps, J.B. and Hoffman, W.P. (2002), A protocol for the in vitro micronucleus test, I. Contributions to the development of a protocol suitable for regulatory submissions from an examination of 16 chemicals with different mechanisms of action and different levels of activity, Mutation Res., 517, 123-134.

[31] Matsushima, T., Hayashi, M., Matsuoka, A., Ishidate, M. Jr., Miura, K.F., Shimizu, H., Suzuki, Y., Morimoto, K., Ogura, H., Mure, K., Koshi, K. and Sofuni, T. (1999), Validation study of the in vitro micronucleus test in a Chinese hamster lung cell line (CHL/IU), Mutagenesis, 14, 569-580.

[32] Elhajouji, A., and Lorge, E. (2006), Special Issue: SFTG International collaborative study on in vitro micronucleus test, Mutation Res., 607, 1-152.

[33] ECVAM (2006), Statement by the European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM) Scientific Advisory Committee (ESAC) on the scientific validity of the in vitro micronucleus test as an alternative to the in vitro chromosome aberration assay for genotoxicity testing. ESAC 25th meeting, 16-17 November, 2006.

[34] ESAC (2006), ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC) Peer Review, Retrospective Validation of the In Vitro Micronucleus Test, Summary and Conclusions of the Peer Review Panel, .

[35] Corvi, R., Albertini, S., Hartung, T., Hoffmann, S., Maurici, D., Pfuhler, S, van Benthem, J., Vanparys P. (2008), ECVAM Retrospective Validation of in vitro Micronucleus Test (MNT), Mutagenesis, 23, 271-283.

[36] Zhang, L.S., Honma, M., Hayashi, M., Suzuki, T., Matsuoka, A. and Sofuni, T. (1995), A comparative study of TK6 human lymphoblastoid and L5178Y mouse lymphoma cell lines in the in vitro micronucleus test, Mutation Res., 347, 105-115.

[37] Ehrlich, V., Darroudi, F., Uhl, M., Steinkellner, S., Zsivkovits, M. and Knasmeuller, S. (2002), Fumonisin B1 is genotoxic in human derived hepatoma (HepG2) cells, Mutagenesis, 17, 257-260.

[38] Knasmüller, S., Mersch-Sundermann, V., Kevekordes, S., Darroudi, F., Huber, W.W., Hoelzl, C., Bichler, J. and Majer, B.J. (2004), Use of human-derived liver cell lines for the detection of environmental and dietary genotoxicants; current state of knowledge, Toxicol., 198, 315-328.

[39] Gibson, D.P., Brauninger, R., Shaffi, H.S., Kerckaert, G.A., LeBoeuf, R.A., Isfort, R.J. and Aardema, M.J. (1997), Induction of micronuclei in Syrian hamster embryo cells: comparison to results in the SHE cell transformation assay for National Toxicology Program test chemicals, Mutation Res., 392, 61-70.

[40] Scott, D., Galloway, S.M., Marshall, R.R., Ishidate, M. Jr., Brusick, D., Ashby, J. and Myhr, B.C. (1991), International Commission for Protection Against Environmental Mutagens and Carcinogens, Genotoxicity under extreme culture conditions. A report from ICPEMC Task Group 9, Mutation Res., 257, 147-205.

[41] Morita, T., Nagaki, T., Fukuda, I. and Okumura, K. (1992), Clastogenicity of low pH to various cultured mammalian cells, Mutation Res., 268, 297-305.

[42] Brusick, D. (1986), Genotoxic effects in cultured mammalian cells produced by low pH treatment conditions and increased ion concentrations, Environ. Mutagen., 8, 789-886.

[43] Fenech, M. and Morley, A.A. (1985), Measurement of micronuclei in lymphocytes, Mutation Res., 147, 29-36.

[44] Fenech, M. (1997), The advantages and disadvantages of cytokinesis-blood micronucleus method, Mutation Res., 392, 11-18.

[45] Bonassi, S., Fenech, M., Lando, C., Lin, Y.P., Ceppi, M., Chang, W.P., Holland, N., Kirsch-Volders, M., Zeiger, E., Ban, S., Barale, R., Bigatti, M.P., Bolognesi, C., Jia, C., Di Giorgio, M., Ferguson, L.R., Fucic, A., Lima, O.G., Hrelia, P., Krishnaja, A.P., Lee, T.K., Migliore, L., Mikhalevich, L., Mirkova, E., Mosesso, P., Muller, W.U., Odagiri, Y., Scarffi, M.R., Szabova, E., Vorobtsova, I., Vral, A. and Zijno, A. (2001), HUman MicroNucleus Project: international database comparison for results with the cytokinesis-block micronucleus assay in human lymphocytes, I. Effect of laboratory protocol, scoring criteria and host factors on the frequency of micronuclei, Environ. Mol. Mutagen. 37, 31-45.

[46] Maron, D.M. and Ames, B.N. (1983), Revised methods for the Salmonella mutagenicity test, Mutation Res., 113, 173-215.

[47] Ong, T.-m., Mukhtar, M., Wolf, C.R. and Zeiger, E. (1980), Differential effects of cytochrome P450-inducers on promutagen activation capabilities and enzymatic activities of S-9 from rat liver, J. Environ. Pathol. Toxicol., 4, 55-65.

[48] Elliott, B.M., Combes, R.D., Elcombe, C.R., Gatehouse, D.G., Gibson, G.G., Mackay, J.M. and Wolf, R.C. (1992), Alternatives to Aroclor 1254-induced S9 in in-vitro genotoxicity assays. Mutagenesis, 7, 175-177.

[49] Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K. and Sugimura, T. (1976), A safe substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems, In: de Serres, F.J., Fouts, J. R., Bend, J.R. and Philpot, R.M. (eds), In Vitro Metabolic Activation in Mutagenesis Testing, Elsevier, North-Holland, pp. 85-88.

[50] Johnson, T.E., Umbenhauer, D.R. and Galloway, S.M. (1996), Human liver S-9 metabolic activation: proficiency in cytogenetic assays and comparison with phenobarbital/beta-naphthoflavone or Aroclor 1254 induced rat S-9, Environ. Mol. Mutagen., 28, 51-59.

[51] UNEP (2001), Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants, United Nations Environment Programme (UNEP).

[52] Doherty, A.T., Ellard, S., Parry, E.M. and Parry, J.M. (1996), An investigation into the activation and deactivation of chlorinated hydrocarbons to genotoxins in metabolically competent human cells, Mutagenesis, 11, 247-274.

[53] Krahn, D.F., Barsky, F.C. and McCooey, K.T. (1982), CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids, In: Tice, R.R., Costa, D.L. and Schaich, K.M. (eds), Genotoxic Effects of Airborne Agents. New York, Plenum, pp. 91-103.

[54] Zamora, P.O., Benson, J.M., Li, A.P. and Brooks, A.L. (1983), Evaluation of an exposure system using cells grown on collagen gels for detecting highly volatile mutagens in the CHO/HGPRT mutation assay, Environ. Mutagenesis 5, 795-801.

[55] Fenech, M. (1993), The cytokinesis-block micronucleus technique: a detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations, Mutation Res., 285, 35-44.

[56] Phelps, J.B., Garriott, M.L., and Hoffman, W.P. (2002), A protocol for the in vitro micronucleus test. II. Contributions to the validation of a protocol suitable for regulatory submissions from an examination of 10 chemicals with different mechanisms of action and different levels of activity, Mutation Res., 521, 103-112.

[57] Kirsch-Volders, M., Sofuni, T., Aardema, M., Albertini, S., Eastmond, D., Fenech, M., Ishidate, M. Jr., Kirchner, S., Lorge, E., Morita, T., Norppa, H., Surralles, J., Vanhauwaert, A. and Wakata, A. (2004), Corrigendum to "Report from the in vitro micronucleus assay working group", Mutation Res., 564, 97-100.

[58] Pincu, M., Bass, D. and Norman, A. (1984), An improved micronuclear assay in lymphocytes, Mutation Res., 139, 61-65.

[59] Lorge, E., Hayashi, M., Albertini, S. and Kirkland, D. (2008), Comparison of different methods for an accurate assessment of cytotoxicity in the in vitro micronucleus test. I. Theoretical aspects, Mutation Res., 655, 1-3.

[60] Surralles, J., Xamena, N., Creus, A., Catalan, J., Norppa, H. and Marcos, R. (1995), Induction of micronuclei by five pyrethroid insecticides in whole-blood and isolated human lymphocyte cultures, Mutation Res., 341, 169-184.

[61] Galloway, S. (2000), Cytotoxicity and chromosome aberrations in vitro: Experience in industry and the case for an upper limit on toxicity in the aberration assay, Environ. Molec. Mutagenesis 35, 191-201.

[62] Hayashi, M., Sofuni, T., and Ishidate, M. Jr. (1983), An Application of Acridine Orange Fluorescent Staining to the Micronucleus Test, Mutation Res., 120, 241-247.

[63] MacGregor, J. T., Wehr, C. M., and Langlois, R. G. (1983), A Simple Fluorescent Staining Procedure for Micronuclei and RNA in Erythrocytes Using Hoechst 33258 and Pyronin Y, Mutation Res., 120, 269-275.

[64] Hayashi, M., Sofuni, T. and Ishidate, M. Jr. (1983), An application of acridine orange fluorescent staining to the micronucleus test, Mutation Res., 120, 241-247.

[65] Fenech, M., Chang, W.P., Kirsch-Volders, M., Holland, N., Bonassi, S. and Zeiger, E. (2003), HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures, Mutation Res., 534, 65-75.

[66] Hoffman, W.P., Garriott, M.L. and Lee, C. (2003), In vitro micronucleus test, In: Encyclopedia of Biopharmaceutical Statistics, Second edition. S. Chow (ed.), Marcel Dekker, Inc. New York, NY, pp. 463-467.

УДК 661:615.099:006.354 МКС 13.020.01 IDT

Ключевые слова: химическая продукция, воздействие на организм человека, метод испытаний, микроядерный тест, клетки млекопитающих, *in vitro*

Подписано в печать 12.01.2015. Формат 60x84 1/8.

Усл. печ. л. 2,33. Тираж 33 экз. Зак. 160.

Подготовлено на основе электронной версии, предоставленной разработчиком стандарта

ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ»

123995 Москва, Гранатный пер., 4.

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

gost.e-ecolog.ru