

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
И СОЦИАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ЭКСПЕРТИЗЫ СРЕДСТВ МЕДИЦИНСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ»

**РУКОВОДСТВО
ПО ПРОВЕДЕНИЮ
ДОКЛИНИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ
ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ**

Часть первая

Москва
2012

ГЛАВА 7

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ОЦЕНКЕ КАНЦЕРОГЕННОСТИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ И ВСПОМОГАТЕЛЬНЫХ ВЕЩЕСТВ В КРАТКОСРОЧНЫХ ТЕСТАХ

*Составители: д. м. н., проф. Г.А. Белицкий; член-корр. РАМН, проф. А.Д. Дурнев;
д. б. н., проф. Ю.А. Ревазова; д. м. н., проф. В.А. Меркулов; д. б. н. С.К. Абилов;
д. м. н., проф. Е.В. Арзамасцев; д. м. н. О.Л. Верстакова; член-корр. РАМН,
проф. Т.А. Гуськова; д. м. н., проф. В.С. Журков; д. б. н. Л.П. Сычева, к. б. н. А.К. Жанатаев*

Введение

Вопрос о возможности перехода к КИ фармакологических средств (ФС) с точки зрения его канцерогенной безопасности может решаться на основании краткосрочных скрининговых тестов (КСТ), а не после получения результатов 2–3-летних экспериментов по индукции опухолей у животных, которые в случае недостаточной эффективности ФС в клинике могут оказаться излишними.

При отрицательных результатах в КСТ дополнительная оценка потенциальной канцерогенности на млекопитающих традиционным методом необходима для лекарств, имеющих структурное сходство с известными канцерогенами или при получении неопределенных или противоречивых результатов. Новые фиксированные комбинации фармакологических средств, планируемые для широкого клинического применения, при структурном сходстве любого из компонентов комбинации с известными канцерогенами, мутагенами или их метаболитами также подвергаются исследованию на млекопитающих.

1. Общие положения

КСТ для выявления потенциальной канцерогенности основаны на современных данных о механизмах химического канцерогенеза [2, 3]. Полный объем понятия «канцерогенные соединения» включает в себя все вещества, способные увеличивать в популяции количество опухолей различных локализаций по сравнению с соответствующим контролем. Сюда входят не только полные канцерогены, способные вызывать опухоли без дополнительных воздействий, но также иницирующие агенты, промоторы и коканцерогены. Процесс химического канцерогенеза в настоящее время условно подразделяют на две стадии: инициацию и промоцию. На первой в генетическом аппарате клетки возникают стойкие изменения; во второй, в основном за счет эпигенетических эффектов, создаются условия для преимущественной пролиферации трансформированных клеток. На стадии инициации наиболее существенным событием является повреждение ДНК высокореактивными метаболитами канцерогенов, которое приводит к возникновению точечных мутаций, перестановке блоков генов и т.д. Предполагается, что в тех случаях, когда эти события затрагивают протоонкогенные участки, последние могут активироваться и иницировать злокачественную трансформацию клетки. К такому же результату приводит инактивация генов-супрессоров (ангионкогенов). Высокая степень причинной связи между мутагенезом и канцерогенезом, а также высокая частота совпадения канцерогенных и мутагенных свойств среди различных химических соединений привели к созданию многочисленных тестов, в которых показателем предполагаемой бластомогенной

активности служит способность вызывать повреждения ДНК, генные и хромосомные мутации.

Промоторы в биологически активных концентрациях не повреждают ДНК, а оказывают плеiotропное действие на клетки, изменяя, в частности, структуру и функции клеточных мембран, нарушая проницаемость межклеточных контактов. Соответственно, имеются КСТ, предназначенные для выявления этих особенностей.

Одним из интегральных показателей канцерогенной активности агента может служить его способность озлокачивать клетки в культуре, что используется в ряде КСТ.

Для литературного поиска и анализа структурного сходства между фармакологическими веществами и известными канцерогенами используются, во-первых, представительная база данных о мутагенных и канцерогенных свойствах широкого круга химических соединений, и, во-вторых, специальные компьютерные программы. Для анализа взаимосвязи между мутагенной активностью и химической структурой можно использовать программы CASE, MULTICASE и ЭММА.

Настоящие методические рекомендации должны быть пересмотрены через определенное время и модифицированы в соответствии с прогрессом знаний о молекулярных механизмах химического канцерогенеза.

2. Принципы формирования батарей КСТ и минимальная батарея КСТ

Большинство КСТ моделирует отдельные стадии канцерогенеза, поэтому наиболее успешным является их использование в виде батареи, т.е. набора гестов. Подобные батареи должны отвечать ряду требований КСТ, включаемые в одну батарею, должны быть взаимодополняющими, т.е. отличаться или по конечному эффекту (повреждение ДНК, генные мутации, хромосомные aberrации, неопластическая трансформация, нарушение метаболической кооперации и др.), или по уровню биологической организации объекта исследования (прокариоты, эукариоты, системы *in vitro*, *in vivo*). При этом последовательность исследований предполагает движение от простых к сложным и от кратких экспериментов к более длительным.

Отбираемые в батарею тесты должны быть надежно верифицированы на соединениях с известной канцерогенной активностью. По степени верификации различают рутинные, «укоренившиеся» тесты, на которых было исследовано не менее 1000 соединений, «развитые» — не менее 100 и «развивающиеся» — до 100. Эти тесты при приемлемой стоимости и достаточной разработанности должны быть высокочувствительными, специфичными и обладать большой пропускной способностью.

Для выявления одних и тех же эффектов существует ряд равноценных методов, которые могут взаимозаменяться. В ряде случаев, в зависимости от особенностей тестируемого соединения, одним методам следует отдавать предпочтение перед другими. Таким образом, батарея КСТ не является жестко фиксированной. Действующим началом большинства известных канцерогенов являются высокоактивные метаболиты, поэтому необходимым компонентом ряда КСТ является система адекватной метаболической активации исследуемых препаратов.

Исходя из приведенных соображений и реально освоенных методов, в настоящее время представляется приемлемой следующая минимальная батарея КСТ:

А. Тесты на выявление генных мутаций:

— тест Эймса (*Salmonella*/микросомы) с использованием экзогенной активации препаратов фракцией S9 печени крыс;

Равнозначными тестами являются: индукция рецессивных, сцепленных с полом, летальных мутаций или индукция соматических мутаций на дрозофиле.

Б. Цитогенетические тесты:

- индукция хромосомных aberrаций в клетках костного мозга млекопитающих *in vivo*;
- индукция микроядер в клетках костного мозга млекопитающих *in vivo*.

В. Тесты на повреждения ДНК:

— тест по учету повреждений ДНК (ДНК-комет) методом щелочного электрофореза *in vitro* и *in vivo*.

Допустимо использование репарационного теста на *E. coli* или индукцию SOS-ответа бактериальной клетки, тестов на индукцию внепланового синтеза ДНК в клетках млекопитающих или выявление повреждений ДНК методом флуориметрии или щелочной элюции.

Г. Тесты на промоторную активность:

— ГФРТ-тест на нарушение метаболической кооперации в смешанной культуре соматических клеток млекопитающих.

Д. Прямые экспресс-тесты, регистрирующие опухолеобразующий потенциал тестируемых веществ:

— тест на трансформацию клеток в культуре или индукцию опухолей у гидробионтов.

3. Правила продвижения исследуемых веществ по батарее КСТ и интерпретация результатов исследований

Результаты исследования препарата в батарее КСТ позволяют сделать заключение о наличии или отсутствии канцерогенных свойств. Это заключение носит вероятностный характер, в сущности, так же, как и предсказание канцерогенной опасности вещества для человека на основании экспериментов по индукции опухолей у животных.

При оценке результатов тестирования исходят из того, что положительный эффект имеет преимущество перед отрицательным, а данные, полученные в экспериментах *in vivo*, более весомы, чем аналогичные, полученные *in vitro*. Согласно этому правилу, интегральный положительный результат системы КСТ с гораздо большей степенью вероятности свидетельствует о потенциальной канцерогенной опасности препарата, чем общий отрицательный результат — о ее полном отсутствии.

С точки зрения прогноза канцерогенности существенное значение имеют результаты, полученные в системе мутагенной оценки при учете генных мутаций (на бактериях и дрожжах) и/или хромосомных aberrаций (в клетках костного мозга мышей).

При этом могут встречаться 4 варианта сочетаний результатов (табл. 1).

Таблица 1

№ варианта	Положительные (+) и отрицательные (–) ответы при использовании методов учета	
	генных мутаций на бактерии или дрозофиле	хромосомных aberrаций в клетках костного мозга мышей
1	+	+
2	+	–
3	–	+
4	–	–

В случае варианта 1 делается заключение о канцерогенной опасности и препарат не подвергается дальнейшим исследованиям. В остальных трех случаях ставятся уточняющие эксперименты, среди которых наиболее информативен полиорганный учет повреждений ДНК (ДНК-комет) методом щелочного электрофореза *in vivo*. Допустимо также использование репарационного теста на *E. coli* или индукции SOS-ответа у бактерий, регистрация внепланового синтеза ДНК в культуре клеток млекопитающих или повреждений ДНК с помощью щелочной элюции.

С учетом результатов 1 этапа исследований могут получиться следующие варианты сочетаний ответов (табл. 2).

Таблица 2

№ варианта	Положительные (+) и отрицательные (–) ответы при использовании методов учета		
	генных мутаций	хромосомных аберраций	повреждений ДНК
1	+	–	+
2	+	–	–
3	–	+	+
4	–	+	–
5	–	–	+
6	–	–	–

В случае вариантов 1, 3 и 6 дальнейшие исследования прекращают. В случаях 1 и 3 делается заключение о наличии, а в случае 6 — об отсутствии канцерогенной опасности. Для отдельных групп препаратов (например, гормонов), несмотря на отрицательные ответы во всех трех группах использованных тестов (вариант 6), может оказаться необходимым применение одного из прямых экспресс-тестов на опухолеобразование: трансформацию клеток в культуре или индукцию опухолей у гидробионтов.

В случаях 2, 4 и 5 переходят к следующему этапу исследований. Стратегия работы на этом этапе связана с подтверждением или отрицанием способности исследуемого препарата индуцировать определенный тип генетических эффектов.

В случае варианта 2 (см. табл. 2) проводится дополнительный учет генных мутаций с помощью альтернативного метода, способного зарегистрировать этот тип эффектов. Если на первом этапе был использован, например, учет генных мутаций на бактериях, на данном (третьем) этапе работы применяются методы тестирования генных мутаций на дрозофиле или в культуре соматических клеток млекопитающих и наоборот.

В случае варианта 4 (см. табл. 2) эффект, полученный путем индукции перестройки хромосом или в клетках костного мозга мышей, проверяется на клетках костного мозга крыс.

В случае варианта 5 (см. табл. 2) эффект, полученный с использованием бактерий (репарационный тест на *E. coli* или индукция SOS-ответа), проверяется с помощью методов учета повреждений ДНК в клетках млекопитающих *in vitro* и *in vivo* (метод «ДНК-комет», индукция внепланового синтеза ДНК или учет повреждений ДНК с помощью щелочной элюции).

При получении на данном этапе работы положительного результата в вариантах 2, 4 и 5 делается заключение о возможности наличия у исследуемого агента канцерогенной активности, связанной с индукцией определенного типа генетических эффектов. При получении отрицательного результата переходят к заключительному этапу исследований, связанному с использованием одного из прямых экспресс-тестов определения канцерогенной активности: учет опухолевой трансформации клеток в культуре или индукции опухолей у гидробионтов. Заключение об отсутствии или наличии канцерогенной активности у исследуемого вещества делается на основании соответственно отрицательного или положительного ответа, полученного в одном из этих методов.

Исследования на промоторную активность проводятся не всегда. Они обязательны лишь в случае, если ЛП предназначен для контингентов, ранее экспонированных к иницирующим злокачественный рост воздействиям: ионизирующей радиации, противоопухолевой терапии, лечению пуваленом в комбинации с УФ-облучением по поводу псориаза и др.

4. Краткосрочные скрининговые тесты для прогноза канцерогенности фармакологических препаратов и вспомогательных средств

4.1. Мутационный тест на *Salmonella typhimurium* (тест Эймса)

4.1.1. Термины и определения

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. В данном тесте эти мутации могут происходить или в сайте исходной мутации, или в другом сайте бактериальной хромосомы.

4.1.2. Цель исследования и принцип метода

Данный метод предназначен для выявления способности фармакологических веществ или их метаболитов индуцировать генные мутации у индикаторных штаммов *Salmonella typhimurium*.

Фармакологические средства 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 в сравнении с количеством спонтанных ревертантов в вариантах негативного 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 штаммов *Salmonella typhimurium* [35].

4.1.3. Процедура тестирования

4.1.3.1. Бактерии

В качестве тестерных организмов используются штаммы *Salmonella typhimurium*. Минимальный набор состоит из штаммов TA97, TA98 и TA100. При необходимости могут использоваться и другие штаммы.

Каждый штамм должен быть проверен на ауксотрофность по гистидину, чувствительность к кристаллическому фиолетовому и устойчивость к ампициллину. Тестерные штаммы должны иметь уровень спонтанных ревертантов в пределах ожидаемого на основании литературных данных.

4.1.3.2. Метаболическая активация

В качестве экзогенной метаболической активации используется фракция S9 печени крыс, предобработанных соволом (300 мг/кг, однократно, внутрибрюшинно, за 5 сут до эвтаназии) [1].

4.1.3.3. Изучаемые концентрации

Максимальная концентрация тестируемого соединения определяется его токсичностью и растворимостью. Токсичность тестируемого соединения может изменяться при использовании экзогенной метаболической активации. Для нетоксичных хорошо растворимых соединений максимальная концентрация может быть в пределах 1000–5000 мкг на чашку. Для тестируемых соединений с бактерицидной активностью максимальная концентрация 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 должно проверяться не менее 5 различных концентраций тестируемого соединения, различающихся, например, в 10 раз.

4.1.3.4. Контроли

В каждом эксперименте обязательны одновременно проводимые негативный (необработанный или растворитель) и позитивный контроли.

В качестве растворителя используются дистиллированная вода или метилсульфоксид, а при необходимости и другие растворители.

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

4.1.3.5. Проведение эксперимента

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

Исследование параллельно ведут 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 исследования вместо испытуемого образца вносят соответствующий объем растворителя.

4.1.4. Данные и их представление

4.1.4.1. 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 в каждой чашке, 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 исследование 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 концентраций (такая ситуация возможна при работе с фармакологическими средствами, обладающими бактерицидными свойствами), прибегают к «дроблению» концентраций. При этом за среднюю точку на шкале концентраций исследуемого вещества принимают концентрацию, на которой был выявлен максимальный эффект. В исследование вводят еще 4 варианта: концентрации в 2 и 5 раз меньше и больше средней.

Если при проведении повторного исследования эффект не обнаруживается, проводится еще одно дополнительное исследование, результат которого сравнивают с первыми двумя экспериментами. Заключение о наличии или отсутствии мутагенной активности испытуемого соединения делают на основании двух исследований с совпадающими результатами.

Для оценки результатов тестирования могут использоваться соответствующие статистические методы, например метод попарных сравнений Даннета [Статистическая обработка данных тестирования на мутагенность, 1989].

4.1.4.2. Оценка результатов

Критериями позитивного результата являются или статистически достоверное зависимость 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 зависимо от концентрации увеличения количества ревертантов или воспроизводимого и статистически достоверного позитивного ответа для какой-либо экспериментальной точки, рассматривается как не мутагенное в данном тесте.

Отчет должен включать следующую информацию:

- бактерии: использованные штаммы;
- условия проведения теста: уровни доз и обоснование выбора доз, количество чашек на экспериментальную точку, токсичность, состав среды, тип и состав системы метаболической активации, методика обработки, позитивные и негативные контроли;
- индивидуальные результаты для каждой культуры;
- среднее количество ревертантных колоний на чашку;
- стандартное отклонение;
- отношения «концентрация—эффект», где возможно.

4.1.4.3. 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 *Salmonella typhimurium*.

4.1.5. Отчетность

Протокол представления результатов оценки мутагенной активности вещества в тесте по учету генных мутаций у бактерий

Название эксперимента: _____
Тестерные микроорганизмы: _____
Вид _____
Штаммы _____
Вещество:
Название _____
Формула, физико-химические свойства _____
Откуда получено _____
Растворитель _____
Позитивный контроль _____
Анализ данных литературы: _____
Схема эксперимента: _____
Дата проведения (начало, окончание, отдельные эксперименты) _____
Способ обработки _____ дозы _____
Количество повторностей, количество чашек на дозу _____
Система метаболической активации _____
Полученные результаты: _____
Публикации (по результатам работы) _____
Список цитированной литературы: _____
Исполнители: _____
Дата сдачи отчета: _____

5.2. Учет рецессивных сцепленных с полом летальных мутаций дрозофилы

5.2.1. Термины и определения

Летальная мутация — изменение в геноме, проявление которого приводит к смерти его носителя.

Рецессивная мутация — изменение в геноме, которое проявляется в условиях гомозиготности или гемизиготности.

Сцепленные с полом гены присутствуют в половых (X или Y) хромосомах. Обсуждаемый метод определяет мутационные события в X-хромосоме.

5.2.2. Цель исследования и принцип метода

С помощью данного метода проводят оценку способности испытуемого вещества и продуктов его метаболизма индуцировать генные мутации в зародышевых клетках дрозофилы.

Рекомендуемый метод, называемый Меллер-5, основан на индукции исследуемыми лекарствами рецессивных летальных мутаций в X-хромосоме самцов дикого типа линии D-32. Эти мутации передаются через самок F_1 самцам второго поколения, не доживающим до стадии имаго.

5.2.3. Процедура тестирования

5.2.3.1. Используемые линии дрозофилы

Для исследований по учету рецессивных, сцепленных с полом летальных мутаций (РСПЛМ) требуется линия дикого типа с хорошо изученным спонтанным фоном мутабельности, например Canton-S или D-32, а в качестве тестерной линии лучше всего использовать линию BASC: в X-хромосоме мух этой линии имеются 2 инверсии sc8 и sc49, которые полностью исключают возможность кроссинговера между половыми хромосомами, но не нарушают жизнеспособности дрозофилы [6]. Фенотипическими маркерами служат мутации Apricot — абрикосовые глаза и Bar — полосковидные глаза. В подобного рода экспериментах можно использовать и другие тестерные линии.

5.2.3.2. Пути введения и выбор доз

Обычно используют два основных способа введения исследуемых фармакологических средств в организм дрозофилы: ингаляционный и пероральный (с пищей). Чаще всего используют последний, при введении соединения в корм. В этом случае целесообразно использовать стеклянные пористые фильтры, погруженные в бюксы с веществами, растворенными в 1–5% сахарном сиропе в исследуемых концентрациях. Если препарат нерастворим в воде, можно (при обязательном применении соответствующих контролей с растворителями) растворить его в этиловом спирте или диметилсульфоксиде так, чтобы конечная концентрация растворителей в сахарном корме не превышала 2%. Допускается внесение фармакологических средств непосредственно в корм. Ингаляционные затравки осуществляются в эксикаторах. Расчет доз при ингаляционном введении производят на объем эксикатора, а при пероральном — на объем корма.

В зависимости от токсичности фармакологического средства длительность экспозиции может колебаться от нескольких часов до нескольких дней (обычно экспозиция составляет 48–72 ч). Комбинация различных концентраций и экспозиций позволяет ориентировочно определять количество («дозу») фармакологического средства, вызывающую примерно 50%-ную стерильность самцов. Эту «дозу» принимают за максимальную, которую используют в эксперименте. Снижение «дозы» необходимо только в случае исследований фармакологических средств, обладающих выраженным стерилизующим эффектом.

5.2.3.3. Проведение эксперимента

После обработки изучаемым фармакологическим средством самцов линии D-32 скрещивают с виргинными самками тестерной линии BASC (5 самцов × 10 самок). После начала вылета мух первого поколения (F_1) отбирают виргинных гетерозиготных самок и индивидуально скрещивают их с самцами F_1 .

После вылета второго поколения (F_2) каждая культура просматривается визуально с целью обнаружения таких, в которых отсутствуют самцы дикого фенотипа (с красными глазами). Общее количество культуральных пробирок определяет число проанализированных X-хромосом самцов, подвергшихся действию изучаемых соединений. Пробирки, в которых отсутствуют самцы дикого типа, отмечают как «рецессивные летальные мутации». Постановка контролей обязательна [14].

5.2.4. Данные и их представление

Результаты опытов представляют в виде таблицы (табл. 3).

Частоту рецессивных летальных мутаций оценивают как отношение числа культур второго поколения без самцов дикого фенотипа к общему числу культур. Всего необходимо поставить не менее 1000 культур F_2 на одну экспериментальную точку.

Для оценки значимости превышения частоты рецессивных летальных мутаций в опыте над контролем следует применять точный критерий Фишера для таблиц сопряженности 2×2 .

Таблица 3

Учет рецессивных, сцепленных с полом, летальных мутаций на дрозофиле

Препарат/ Концентрация	Экспозиция	Число исследованных культур	Число не- фертильных самцов F_2	Рецессивные, сцепленные с полом, летальные мутации		Уровень значимости
				количество	$M \pm m \%$	

5.2.5. Отчетность

Название эксперимента: _____
Линии дрозофилы: _____
Вещество: _____
Название _____
Формула, физико-химические свойства _____
Откуда получено _____
Растворитель _____
Анализ данных литературы: _____
Схема эксперимента: _____
Дата проведения (начало, окончание, отдельные эксперименты) _____
Способ обработки _____ концентрации _____
Длительность обработки _____
Группы _____
Полученные результаты: _____
Публикации (по результатам работы) _____
Список цитированной литературы: _____
Исполнители: _____
Дата сдачи отчета: _____

5.3. Учет соматической рекомбинации (мозаицизма) у дрозофилы

5.3.1. Термины и определения

Под соматической рекомбинацией понимают обмен генетическим материалом между гомологичными хромосомами соматических клеток в митозе, приводящий к образованию мозаичных особей. При использовании в качестве маркеров рецессивных генов

возможно выявление генных мутаций, делеций, митотических рекомбинаций и генных конверсий.

5.3.2. Цель исследования и принцип метода

Целью данного метода является интегральное выявление рекомбинационных и других мутационных событий, индуцируемых фармакологическим средством или его метаболитами в соматических клетках личинок дрозофилы. В основе метода лежит учет мозаичных пятен, возникающих у мух тестерных линий в результате комплексного нарушения генотипа: митотической рекомбинации, потери хромосом и/или их фрагментов, транслокации, делений и генных мутаций. В качестве маркеров возможно использование генов «y» и «sn₃» в транс-положении [3].

5.3.3. Процедура тестирования

Биология, морфологии, разведение дрозофилы, а также инструмент для работы с ней и приготовление питательных сред подробно описаны в соответствующих руководствах [6].

5.3.3.1. Используемые линии дрозофилы

Для учета соматического мозаицизма в данной тест-системе необходимо поддерживать следующие тестерных линий дрозофилы:

линия 1 — yellow — генотип y/y (y — рецессивный ген, обуславливающий развитие желтой окраски тела и щетинок);

линия 2 — w, sn_3 — генотип $w\ sn_3/Y$ (w — white — белая окраска глаз, sn_3 — singed — извитая скрученная форма щетинок; оба гена рецессивные).

Спонтанный уровень мутаций и рекомбинаций невисок и колеблется у разных линий в пределах от 0,3 до 1,1 %

5.3.3.2. Пути введения и выбор «доз»

Обычно используют один из двух способов введения исследуемых фармакологических средств в организм дрозофилы: ингаляционный или пероральный (с кормом). Если препарат не растворим в воде, можно (при обязательной постановке соответствующих контролей) растворить его в этиловом спирте или диметилсульфоксиде так, чтобы конечная концентрация этих растворителей в исследуемом растворе составляла не более 2%. В любом случае в культуру с кормом вносят 200 мкл тестируемого раствора. Возможно распыление нерастворимых в воде соединений по поверхности питательной среды. Ингаляционные затравки осуществляются в эксикаторах, в этом случае расчет доз производят на объем эксикатора.

Токсичность фармакологических средств устанавливают по выживаемости самок F_1 , которая на максимальной из использованных концентраций не должна быть меньше 50%. Всего в эксперименте определяют эффект трех различных концентраций фармакологического средства. В зависимости от токсичности фармакологического средства длительность экспозиций может колебаться от нескольких часов до нескольких дней (обычно экспозиция составляет 48–72 ч).

5.3.3.3. Проведение экспериментов

Виргинных самок в количестве 10 особей помещают в пробирку, содержащую стандартную питательную среду, вместе с 5 самцами. Через 48–72 ч родителей пересаживают в пробирки со свежей питательной средой, а в прежние пробирки вносят растворы испытуемых фармакологических средств.

Просмотр вылетевших особей начинают с 9–10-го дня после начала эксперимента и продолжают до начала вылета следующего поколения. Просмотр проводят под бинокулярным стереоскопическим микроскопом в отраженном свете.

При скрещивании самок линии 1 с самцами линии 2 у гетерозиготных самок первого поколения, имеющих генотип $y + +/+ w sn_3$, регистрируют мутантные щетинки (макрохеты на голове, тораксе и скутеллюме) фенотипа yellow или singed. В протоколе регистрируют общее число просмотренных самок, число самок с одиночными (y, sn) и двойными (y, sn) пятнами [3].

5.3.4. Данные и их представление

Результаты экспериментов представляют в виде таблицы (табл. 4).

Таблица 4

Учет соматического мозаицизма при использовании маркеров «y» и «w, sn₃»

Препарат/ Концентрация/ Экспозиция	Общее число просмотренных самок	Число самок с мутациями				
		пятен «sn»	пятен «y»	пятен «y, sn»	всего пятен	%±M

$M = 1\sqrt{N}$, где N — число просмотренных особей.

Статистическую обработку результатов проводят с использованием χ^2 -критерия, сравнивая частоту появления особей с пятнами в контрольных и опытных сериях [15].

5.3.5. Отчетность

Название эксперимента: _____

Линии дрозофилы, условия скрещивания: _____

Возраст родителей на момент скрещивания _____

Вещество: _____

Название _____

Формула, физико-химические свойства _____

Откуда получено _____

Растворитель _____

Анализ данных литературы: _____

Схема эксперимента: _____

Дата проведения (начало, окончание, отдельные эксперименты) _____

Способ обработки _____ концентрации _____

Максимальный возраст личинок на момент обработки _____

Группы _____

Полученные результаты: _____

Публикации (по результатам работы) _____

Список цитированной литературы: _____

Исполнители: _____

Дата сдачи отчета: _____

5.4. Учет aberrаций хромосом
в клетках костного мозга млекопитающих

5.4.1. Термины и определения

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

Аберрации хромосомного типа — структурные нарушения на уровне идентичных локусов обеих хроматид, выявляемые как парные фрагменты или хроматидные обмены.

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

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

5.4.2. Цель исследования и принцип метода

Выявление и количественная оценка потенциальной цитогенетической активности фармакологических средств 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, включая гепы, составляет 1–2.5% [6].

5.4.3. Процедура тестирования

5.4.3.1. 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 группах.

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

5.4.3.2. Проведение эксперимента

В первой серии испытуемый препарат в дозе, соответствующей суточной терапевтической для человека, и в субтоксической дозе вводят однократно только самцам с фиксацией клеточного материала через 24 ч после введения.

Во второй серии исследуемый препарат в дозе, соответствующей суточной терапевтической для человека, вводят самцам и самкам ежедневно на протяжении 4–5 сут. Фиксацию клеточного материала осуществляют через 6 и/или 24 ч после последнего введения в зависимости от фармакокинетических особенностей испытуемого препарата [14].

5.4.3.3. Контроль

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.

5.4.3.4. Приготовление цитогенетических препаратов

Методики выделения клеток костного мозга и приготовления препаратов для цитогенетического анализа подробно описаны в соответствующих руководствах и ранее опубликованных методических указаниях [5, 14]. Полученные препараты (два стекла от каждого животного) шифруют и подвергают микроскопическому цитогенетическому анализу.

5.4.3.5. Микроскопический анализ

Анализируют 100 метафаз от каждого животного. Анализу подвергаются округлые метафазные пластинки без наложений хромосом с модальным числом 40 (39–41) — для мышей, 42 (41–43) — для крыс. Учитывают число одиночных и парных фрагментов, хроматидных и хромосомных обменов, ахроматических пробелов (гепов), число клеток с множественными повреждениями и клеток с тотальной фрагментацией хромосом.

5.4.4. Оценка результатов

Доказательством цитогенетической активности исследуемого препарата является дозозависимое и/или воспроизводимое в разных сериях эксперимента статистически зна-

чимое превышение доли клеток с хромосомными aberrациями в получавших ЛС сериях исследования по сравнению с контролем.
 Статистическую обработку проводят согласно общепринятым рекомендациям.
 Результаты документируются согласно табл. 5.

Таблица 5

Результаты оценки цитогенетической активности вещества в тесте по учету хромосомных aberrаций в клетках костного мозга млекопитающих

Условия эксперимента	Количество клеток	На 100 исследованных клеток					клеток с хромосомными повреждениями (M±m%)	уровень значимости
		гепы	одиночные фрагменты	парные фрагменты	обмены	клетки с множественными повреждениями		

5.4.5. Отчетность

Протокол представления результатов оценки цитогенетической активности вещества в тесте по учету хромосомных aberrаций в клетках костного мозга млекопитающих

Название эксперимента: _____
 Животные: _____
 Вид _____ линия _____ пол _____ масса _____
 Питомник _____
 Дата получения _____
 Количество _____
 Вещество: _____
 Название _____
 Формула, физико-химические свойства _____
 Откуда получено _____
 Растворитель _____
 Позитивный контроль _____
 Анализ данных литературы: _____
 Схема эксперимента: _____
 Дата проведения (начало, окончание, отдельные эксперименты) _____
 Пути введения _____ дозы _____
 Длительность и кратность введения _____
 Группы _____
 Методика приготовления препаратов _____
 Полученные результаты: _____
 Публикации (по результатам работы) _____
 Список цитированной литературы: _____
 Исполнители: _____
 Дата сдачи отчета: _____

5.5. Учет микроядра в клетках костного мозга млекопитающих

5.5.1. Термины и определения

Микроядра — небольшие ДНК-содержащие образования, состоящие из ацентрических фрагментов хромосом или отставших на стадии анателофазы хромосом. На стадии телофазы эти фрагменты могут включаться в ядра дочерних клеток или образовывать одиночные или множественные микроядра в цитоплазме.

5.5.2. Цель исследования и принцип метода

Выявление и количественная оценка потенциальной цитогенетической активности фармакологических средств в полихроматофильных эритроцитах костного мозга млекопитающих.

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

5.5.3. Процедура тестирования

5.5.3.1. Лабораторные животные

Эксперименты проводят на самцах и самках мелких лабораторных грызунов. Предпочтительно использование генетически однородных животных, не менее 6 особей в каждой контрольной и экспериментальной группе.

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

5.5.3.2. Проведение эксперимента

В первой серии испытуемый препарат в дозе, соответствующей суточной терапевтической для человека, и в субтоксической дозе вводят однократно только самцам с фиксацией клеточного материала через 24 ч после введения.

Во второй серии испытуемый препарат в дозе, соответствующей суточной терапевтической для человека, вводят самцам и самкам ежедневно на протяжении 4–5 сут. Фиксацию клеточного материала осуществляют через 6 и/или 24 ч после последнего введения в зависимости от фармакокинетических особенностей испытуемого препарата [10].

5.5.3.3. Контроли

Негативным контролем является используемый растворитель.

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

5.5.3.4. Приготовление цитогенетических препаратов

Методики выделения клеток и приготовления препаратов для цитогенетического анализа подробно описаны в соответствующих руководствах и методических указаниях [10]. Полученные препараты (два стекла от каждого животного) шифруют и подвергают микроскопическому цитогенетическому анализу.

5.5.3.5. Микроскопический анализ

Анализируют 2000 полихроматофильных эритроцитов от каждого животного, соотношение нормо- и полихроматофильных эритроцитов определяют при подсчете 500 эритроцитов.

5.5.4. Оценка результатов

Критерием позитивного результата является воспроизводимое и/или зависящее от дозы значимое увеличение числа полихроматофильных эритроцитов (ПХЭ) с микроядрами по крайней мере в одной из получавших ЛС групп по сравнению с контрольной. Полученный положительный результат свидетельствует, что вещество индуцирует хромосомные повреждения и/или нарушения митотического аппарата клеток у экспериментальных животных. Результаты исследований представляют в виде табл. 6. Статистическую обработку проводят согласно общепринятым рекомендациям.

Таблица 6

*Результаты оценки цитогенетической активности вещества в тесте
на индукцию микроядер в клетках костного мозга млекопитающих*

Группа (вещество, доза)	№ мыши	Количество ПХЭ с микроядрами на 1000 ПХЭ		Доля ПХЭ от всех эритроцитов
		На каждую мышь	На группу в целом	

5.5.5. Отчетность

Протокол представления результатов оценки цитогенетической активности вещества в тесте на индукцию микроядер в клетках костного мозга млекопитающих

Название эксперимента: _____
 Животные: _____
 Вид _____ линия _____ пол _____ масса _____
 Питомник _____
 Дата получения _____
 Количество _____
 Вещество: _____
 Название _____
 Формула, физико-химические свойства _____
 Откуда получено _____
 Растворитель _____
 Позитивный контроль _____
 Анализ данных литературы: _____
 Схема эксперимента: _____
 Дата проведения (начало, окончание, отдельные эксперименты) _____
 Пути введения _____ дозы _____
 Длительность и кратность введения _____
 Группы _____
 Методика приготовления препаратов _____
 Полученные результаты: _____
 Публикации (по результатам работы) _____
 Список цитированной литературы: _____
 Исполнители: _____
 Дата сдачи отчета: _____

5.6. Репарационный тест на *Escherichia coli*

5.6.1. Термины и определения

Репарационный тест на *E. coli* является бактериальной тест-системой для учета дифференциальной выживаемости бактерий при действии химических соединений и/или их метаболитов, индуцирующих в геноме этого организма повреждение ДНК, репарируемые в ходе эксцизионной и пострепликативной репарации.

5.6.2. Цель исследования и принцип метода

Данный метод предназначен для выявления способности фармакологических веществ и/или их метаболитов индуцировать повреждения ДНК у индикаторных штаммов *E. coli*.

Репарационный тест на *E. coli* основан на регистрации дифференциальной выживаемости бактерий дикого типа и мутантных бактерий, дефектных по определенным этапам репарации ДНК. Бактерии обрабатываются тестируемым соединением с системой метабо-

лической активации или без метаболической активации в жидкой среде. После инкубации в течение определенного периода времени регистрируется наличие бактериального роста у разных тестерных штаммов при одних и тех же концентрациях тестируемого соединения.

При наличии у тестируемого соединения ДНК-повреждающего действия бактериальный рост наблюдается только у штамма дикого типа.

5.6.3. Процедура тестирования

5.6.3.1. Бактерии

В качестве тестерных организмов используются штаммы *E. coli* В/г WP2 (дикий тип по репарации ДНК), WP67 (*polA*) и CM571 (*recA*).

5.6.3.2. Метаболическая активация

В качестве экзогенной метаболической активации используется фракция S9 печени крыс, предобработанных соволом (300 мг/кг, однократно, внутрибрюшинно, за 5 сут до эвтаназии).

5.6.3.3. Изучаемые дозы (концентрации)

Максимальная концентрация тестируемого соединения определяется его токсичностью и растворимостью. Токсичность тестируемого соединения может изменяться при использовании экзогенной метаболической активации. Для нетоксичных хорошо растворимых соединений максимальная концентрация может быть в пределах 1000–5000 мкг/мл. Для тестируемых соединений с бактерицидной активностью максимальная концентрация должна подавлять рост и бактерий дикого типа и мутантных бактерий. В любом случае должно проверяться не менее 5 различных концентраций тестируемого соединения, различающихся, например, в 10 раз. При отсутствии эффекта рекомендуется повторить тест с использованием более дробных концентраций.

5.6.3.4. Контроли

В каждом эксперименте обязательны одновременно проводимые негативный (необработанный или растворитель) и позитивный контроли.

В качестве растворителя используется дистиллированная вода или, в случае водонерастворимых соединений, диметилсульфоксид (конечная концентрация в инкубационной смеси не должна быть более 2,5%).

5.6.3.5. 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 [19, 24].

Исследование параллельно ведут с использованием микросомальной активирующей смеси и без нее для регистрации действия как прямых, так и непрямых мутагенов.

В контрольных вариантах исследования вместо испытуемого образца вносят соответствующий объем растворителя.

5.6.4. Данные и их представление

5.6.4.1. Обработка результатов

Наличие или отсутствие роста отмечается в таблице символами «+» или «-».

5.6.4.2. Оценка результатов

Производится визуально по мутности и изменению цвета индикатора. Отчет должен включать следующую информацию:

- бактерии: использованные штаммы;
- условия проведения теста: уровни концентраций и обоснование выбора концентраций, количество культур на экспериментальную точку, состав среды, тип и состав системы метаболической активации, методика обработки, позитивные и негативные контроли;
- индивидуальные результаты для каждой культуры;
- среднее значение определений на экспериментальную точку;
- стандартное отклонение;
- отношения доза–эффект, где возможно.

5.6.4.3. Интерпретация результатов

Позитивные результаты в этом тесте указывают на то, что тестируемое соединение индуцирует повреждения ДНК у данного микроорганизма. Негативные результаты в этом тесте указывают на то, что в данных условиях тестируемое соединение не индуцирует повреждения ДНК у *E. coli*.

5.6.5. Отчетность

Название эксперимента: _____
 Тестерные микроорганизмы: _____
 Вид _____ штаммы _____
 Вещество: _____
 Название _____
 Формула, физико-химические свойства _____
 Откуда получено _____
 Растворитель _____
 Позитивный контроль _____
 Анализ данных литературы: _____
 Схема эксперимента: _____
 Дата проведения (начало, окончание, отдельные эксперименты) _____
 Способ обработки _____ дозы _____
 Количество повторностей, количество чашек на дозу _____
 Система метаболической активации _____
 Полученные результаты: _____
 Публикации (по результатам работы) _____
 Список цитированной литературы: _____
 Исполнители: _____
 Дата сдачи отчета: _____

5.7. SOS-хромотест на *Escherichia coli*

5.7.1. Термины и определения

SOS-хромотест на *E. coli* является бактериальной тест-системой для учета индукции SOS-функций при действии химических соединений и/или их метаболитов, вызывающих нарушения репликации и/или повреждения ДНК в геноме этого организма.

5.7.2. Цель исследования и принцип метода

Данный метод предназначен для выявления способности фармакологических веществ и/или их метаболитов индуцировать SOS-функции у индикаторных штаммов *E. coli* [34].

В SOS-хромотесте используют штамм *E. coli* PQ37, в геноме которого ген *lacZ* (структурный ген фермента бета-галактозидазы) находится под контролем промотора гена *sfiA*, определяющего одну из SOS-функций клетки к контролируемому генеральным репрес-

соров SOS-системы. Экспрессия гена *sfhA* индуцируется после повреждения ДНК или остановки репликации как часть SOS-ответа клетки *E. coli*. SOS-экспрессии колориметрически определяются по активности бета-галактозидазы.

5.7.3. Процедура тестирования

5.7.3.1. Бактерии

В качестве тестерных организмов используется штамм *E. coli* PQ37. Возможно использование других штаммов.

5.7.3.2. Метаболическая активация

В качестве экзогенной метаболической активации используется фракция S9 печени крыс, предобработанных Арохлором 1254 или соволом (300 мг/кг, однократно, внутрибрюшинно, за 5 суток до эвтаназии).

5.7.3.3. Изучаемые концентрации

Максимальная концентрация тестируемого соединения определяется его токсичностью и растворимостью. Токсичность тестируемого соединения может изменяться при использовании экзогенной метаболической активации. Для нетоксичных хорошо растворимых соединений максимальная концентрация может быть в пределах 1000–5000 мкг/мл. Для тестируемых соединений с бактерицидной активностью максимальная концентрация должна подавлять рост бактерий не более чем на 50%. В любом случае должно проверяться не менее 10 различных концентраций тестируемого соединения, различающихся, например, в 2 раза.

5.7.3.4. Контроли

В каждом эксперименте обязательны одновременно проводимые негативный (необработанный или растворитель) и позитивный контроли на штамм (например, 4-нитрохиолин-1-оксид) и систему метаболической активации (например, 2-аминоантрацен). В качестве растворителя используется изотонический раствор натрия хлорида с 10% диметилсульфоксидом (конечная концентрация в инкубационной смеси не должна быть более 2,5%).

5.7.3.5. Проведение эксперимента

Необходимые для проведения эксперимента оборудование, посуда, реактивы, питательные смеси и растворы, проведение работ по получению фракции S9, а также регламент работ с бактериальными культурами с использованием анализатора «Bioscreen» описаны в [28].

Исследование параллельно ведут с использованием микросомальной активирующей смеси и без нее для регистрации действия как прямых, так и непрямых мутагенов. В контрольных вариантах исследования вместо испытуемого образца вносят соответствующий объем растворителя.

В автоматизированном варианте SOS-хромотеста ферментативная реакция определяется в кинетическом режиме в течение 30 мин. Тест можно проводить с помощью автоматизированного микробиологического анализатора «Bioscreen» фирмы «Labsystems» (Финляндия), управляемого ПК по программе «SOS Chromotest».

5.7.4. Данные и их представление

5.7.4.1. Обработка результатов

Обработка результатов проводится по программе, предложенной фирмой «Labsystems». Программа обработки результатов определяет для каждой концентрации исследуемого вещества отношение активности бета-галактозидазы к активности щелочной фосфатазы, нормализует эти отношения на начальный момент времени и вычисляет фактор индукции.

Затем автоматически строятся кривые зависимости фактора индукции от концентрации исследуемого вещества и определяется наклон кривой на ее линейном участке.

5.7.4.2. Оценка результатов

Результаты анализируют по программе «SOS Data Processing», описанной в инструкции к прибору. Получают кривые развития окраски в каждой пробе, дозозависимые кривые для каждого исследуемого вещества и контролей и кривые изменения фактора индукции в зависимости от концентрации вещества. По их линейной части определяют SOS-индуцирующий потенциал (SOSIP).

Отчет должен включать следующую информацию:

- бактерии: использованные штаммы;
- условия проведения теста: уровни концентраций и обоснование выбора концентраций, количество культур на экспериментальную точку, состав среды, тип и состав системы метаболической активации, методика обработки, позитивные и негативные контроли;
- индивидуальные результаты для каждой культуры;
- отношения доза–эффект.

5.7.4.3. Интерпретация результатов

Позитивные результаты в этом тесте указывают на то, что тестируемое соединение индуцирует SOS-функции у *E. coli*. Негативные результаты в этом тесте указывают на то, что в данных условиях тестируемое соединение не индуцирует повреждения ДНК, приводящие к индукции SOS-функции у данного штамма микроорганизмов.

5.7.5. Отчетность

Протокол представления результатов оценки генотоксической активности вещества в SOS-хромотесте

Название эксперимента: _____
Тестерные микроорганизмы: _____
Вид _____ штаммы _____
Вещество: _____
Название _____
Формула, физико-химические свойства _____
Откуда получено _____
Растворитель _____
Позитивный контроль _____
Анализ данных литературы: _____
Схема эксперимента: _____
Дата проведения (начало, окончание, отдельные эксперименты) _____
Способ обработки _____ дозы _____
Количество повторностей, количество чашек на дозу _____
Система метаболической активации _____
Полученные результаты: _____
Публикации (по результатам работы) _____
Список цитированной литературы: _____
Исполнители: _____
Дата сдачи отчета: _____

5.8. Метод определения внепланового (репаративного) синтеза ДНК

5.8.1. Термины и определения

Внеплановый синтез ДНК обозначает синтез ДНК в процессе эксцизионной репарации.

5.8.2. Цель исследования и принцип метода

Для оценки потенциальной способности фармакологических препаратов индуцировать повреждения ДНК используют прямые методы, основанные на непосредственном измерении количества повреждений, и косвенные, сущность которых сводится к оценке активности ферментов репарации повреждений ДНК. Внеплановый (или репаративный) синтез ДНК осуществляется путем вырезания дефектных участков ДНК и застройки их вновь синтезированными последовательностями нуклеотидов [14].

5.8.3. Процедура тестирования

5.8.3.1. Клеточные культуры

Можно использовать первичные фибробласты человека, лимфоциты периферической крови человека, первичные гепатоциты крыс и др.

5.8.3.2. Метаболическая активация

В качестве экзогенной метаболической активации используется фракция S9 печени крыс, предобработанных соволом (300 мг/кг, однократно, внутривентально, за 5 сут до экзотоксикации).

5.8.3.3. Изучаемые дозы (концентрации)

Используется двухэтапная схема тестирования. Используются следующие конечные концентрации: 0,1; 1,0; 10,0 и 100,0 мкг/мл. При обнаружении эффекта только при действии одной концентрации вещества эксперимент повторяют в диапазоне концентраций, в 2 и 5 раз больших и меньших (2-й этап).

5.8.3.4. Контроли

В каждом исследовании обязательной является постановка негативного контроля, которым является растворитель.

В качестве растворителя используются дистиллированная вода или диметилсульфоксид в конечной концентрации 1%, а при необходимости — другие растворители, которые используют в концентрациях, не вызывающих токсического эффекта.

В качестве позитивных контролей используют диметилнитрозамин, тиометансульфонат и др.

5.8.3.5. Проведение эксперимента

Последовательность операций, связанных с подготовкой и проведением экспериментов, а также процедура оценки полученных данных и квалификация результатов исследований описаны в соответствующих руководствах [14].

Уровень активности ферментов репарации, индуцированный действием исследуемого вещества, оценивают по включению [³H]-тимидина в ДНК используемых культур клеток в присутствии ингибитора репликативного синтеза ДНК — оксимочевина.

Радиоактивность измеряют с помощью жидкостно-сцинтилляционного счетчика. Показателем уровня индукции репаративной активности служит «индекс метки».

5.8.4. Данные и их представление

5.8.4.1. Обработка результатов

В каждом случае определение индекса радиоактивной метки проводят усреднением результатов, полученных в двух независимых аналогичных пробах. Статистическую обработку результатов экспериментов проводят с использованием одностороннего гомосkedастического t-критерия Стьюдента.

5.8 4.2. Оценка результатов

Согласно критериям Международной программы по стандартизации краткосрочных тестов на канцерогенность, достаточным свидетельством генотоксичности вещества в данном тесте является наличие дозовой зависимости, в которой достоверность превышения величин в группе обработанных исследуемым ЛС над контрольными должна быть $< 0,1$ и, по крайней мере в одной точке, $< 0,5$ [36]. Результаты документируются согласно табл. 7.

5.8.4.3. Интерпретация результатов

Позитивные результаты в этом тесте указывают на то, что тестируемое соединение или его метаболиты индуцируют внеплановый (репаративный) синтез ДНК. Негативные результаты в этом тесте указывают на то, что в данных условиях тестируемое соединение и его метаболиты не проявляют соответствующей активности.

Таблица 7

*Оценка уровня репаративного синтеза ДНК,
индуцированного фармакологическим веществом*

Вариант	Вещество	Концентрация, мкг/мл	% поврежденных клеток	Индекс метки (имп/мин/млн клеток)	$P \leq$

5.8.5. Отчетность

Название эксперимента: _____
Клеточная линия: _____
Вещество: _____
Название _____
Формула, физико-химические свойства _____
Откуда получено _____
Растворитель _____
Анализ данных литературы: _____
Схема эксперимента: _____
Дата проведения (начало, окончание, отдельные эксперименты) _____
Количество повторностей, количество чашек на дозу _____
Система метаболической активации _____
Полученные результаты: _____
Публикации (по результатам работы) _____
Список цитированной литературы: _____
Исполнители: _____
Дата сдачи отчета: _____

5.9. Метод «ДНК-комет» в клетках млекопитающих *in vivo*

5.9.1. Цель исследования и принцип метода

Цель метода — выявление и количественная оценка способности исследуемого соединения индуцировать ДНК-повреждения в различных органах и тканях млекопитающих.

Метод основан на регистрации подвижности в постоянном электрическом поле ДНК и/или фрагментов ДНК клеток, заключенных в агарозный гель. При этом ДНК мигрирует к аноду, формируя электрофоретический след, напоминающий хвост кометы, длина и содержание ДНК в котором зависят от количества одно- и двуниевых разрывов ДНК и щелочно-лабильных сайтов [21]. Метод позволяет оценивать повреждения ДНК на уровне отдельных клеток, обладает высокой чувствительностью, требует минимального ко-

личества экспериментального материала, применим ко всем типам клеток, содержащим ДНК и превосходит по указанным параметрам традиционно применяемые для оценки ДНК-повреждений методы щелочной элюции и FADU [26, 35]. На сегодняшний день метод ДНК-комет верифицирован в исследованиях соединений с известной мутагенной и канцерогенной активностью.

5.9.2. Лабораторные животные

Исследования проводят на мелких лабораторных грызунах — мышах или крысах, половозрелых самцах или самках. Во избежание большого разброса в оцениваемых показателях необходимо использовать генетически однородных животных, отклонение по массе тела и возрасту которых на момент эксперимента не превышает $\pm 10\%$. Ни одна из инбредных линий не выделяется как предпочтительная.

Каждая контрольная и получающая ЛС 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.

5.9.3. Растворители

Исследуемые соединения растворяют в деионизированной воде или физиологическом растворе. Водонерастворимые соединения вводят с Твином-80 или используют в качестве растворителя 1% раствор этилового спирта или ДМСО. Для перорального введения водонерастворимых соединений предпочтительно использовать 1% водную суспензию крахмала или растительное масло (оливковое). Применение иных растворителей допускается только при надлежащем обосновании и при условии отсутствия у них в применяемых концентрациях токсических эффектов и химического взаимодействия с исследуемым соединением. Все растворы и суспензии необходимо готовить непосредственно перед применением.

5.9.4. Выбор доз

Препарат исследуют в дозах, соответствующих $ЭД_{50}$, 10 и 100 $ЭД_{50}$, но не выше $1/2 ЛД_{50}$. Если $ЭД_{50}$ не определено, соединение испытывается в трех дозах при однократном введении: в наивысшей дозе, соответствующей $1/10-1/5 ЛД_{50}$, и более низких дозах с десятикратным интервалом между ними. В случае если токсичность исследуемого соединения настолько мала, что дозу $ЛД_{50}$ невозможно определить по техническим причинам, в качестве максимальной дозы определяется 2000 мг/кг.

5.9.5. Проведение эксперимента

Способ введения исследуемого соединения должен соответствовать планируемому пути поступления вещества в организм человека. В большинстве случаев используется пероральный способ введения. Оценка может быть проведена при внутрибрюшинном, внутримышечном, подкожном, ингаляционном и накожном способах введения, а также при введении с кормом или питьевой водой. Максимальный одновременный объем вводимого раствора или соответствующего растворителя зависит от массы тела животного и определяется из расчета не более 20 мл/кг при пероральном и внутрибрюшинном введении, не более 10 мл/кг при внутримышечном и подкожном. За исключением соединений, обладающих раздражающим действием или едких при высоких концентрациях, разница во вводимых объемах растворов для всех используемых доз соединения должна быть минимальна.

Эксперименты проводят при однократном введении исследуемого препарата с эвтаназией животных через 3–6 и 18–24 ч после введения. Более короткая экспозиция (<3 ч) оправдана для нестабильных, быстро абсорбируемых и метаболизируемых со-

единений, более длительная экспозиция (>24 ч) — для соединений, требующих большего времени для биотрансформации. При получении позитивного результата при одном из сроков экспозиции эксперименты далее не проводятся. Целью многократного введения может явиться оценка генотоксического действия соединений, обладающих кумулятивным эффектом. В этом случае исследуемое соединение вводится ежедневно в течение 7–14 дней. Животные подвергаются эвтаназии через 3 ч после последнего введения.

5.9.6. Контроли

В качестве негативного контроля используют животных, которым вводят растворитель в эквивалентных количествах. Животным позитивного контроля вводят соединение, заведомо обладающее выраженным генотоксическим действием, проявляющимся в большинстве органов и тканей и выявляемым с использованием метода ДНК-комет: метил-метансульфонат (40–80 мг/кг) [CAS № 66-27-3], N-нитрозодиметиламин (80–140 мг/кг) [CAS № 62-75-9], N-этил-N-нитрозомочевина (15–50 мг/кг) [CAS № 759-73-9]. Ввиду высокой чувствительности метода все манипуляции (способ введения, время экспозиции, условия содержания до момента эвтаназии и т.д.) с животными негативного контроля и получающей ЛС групп должны быть идентичными.

5.9.7. Приготовление микропрепаратов

При выборе органов/тканей для анализа в первую очередь необходимо ориентироваться на данные о токсикокинетических и токсикодинамических свойствах исследуемого соединения, а также на планируемый путь поступления вещества в организм человека. В частности, для ингаляционных форм основным органом-мишенью для анализа служат легкие, для адсорбентов, не способных всасываться в кровь из ЖКТ, — толстая кишка. При отсутствии таких данных анализ проводят в следующих органах/тканях: а) в печени, являющейся основным органом биотрансформации ксенобиотиков; б) в костном мозге, являющемся активно пролиферирующей тканью, клетки которой находятся на разных стадиях клеточного цикла; в) в клетках крови, осуществляющей транспорт ксенобиотиков и/или их метаболитов; г) в толстой кишке — органе-мишени для веществ и/или их метаболитов, выводимых из организма через ЖКТ; д) в головном мозге, являющемся высокочувствительным к действию нейротоксических генотоксикантов; е) в мочевом пузыре — органе, в котором ксенобиотики и/или их метаболиты задерживаются перед выведением из организма и могут подвергаться биотрансформации.

Необходимое для проведения исследования оборудование и реактивы, а также методики получения суспензий клеток исследуемых органов/тканей и приготовления микропрепаратов подробно описаны в «Методических рекомендациях по оценке ДНК-повреждений методом щелочного гель-электрофореза отдельных клеток в фармакологических исследованиях» настоящего Руководства.

Полученные микропрепараты шифруют двойным слепым методом и подвергают микроскопическому анализу.

5.9.8. Микроскопический анализ

Для окраски микропрепаратов используются флуоресцирующие красители, традиционно применяемые для визуализации ДНК. При анализе ДНК-комет с использованием программно-аппаратного комплекса рекомендуется использование красителя SYBR Green I, позволяющего получить с микропрепаратов яркие высококонтрастные изображения. Микропрепараты анализируют на эпифлуоресцентном микроскопе с соответствующими для конкретного красителя фильтрами при увеличении ×200–400. На каждый микропрепарат рандомизированно анализируют не менее 100 ДНК-комет без наложений хвостов. В анализ не включают ДНК-кометы апоптотических клеток, вы-

являемых на микропрепаратах в виде слабо флуоресцирующих ДНК-комет с широким диффузным хвостом и практически отсутствующей головой, так называемые «ежики» (hedgehogs) [35].

Программно-аппаратный комплекс для анализа ДНК-комет включает совмещенную с микроскопом высокочувствительную ССД-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). Для повышения воспроизводимости результатов, а также возможности сопоставления данных между экспериментаторами и лабораториями, 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 [13, 35]. Степень поврежденности ДНК при этом выражается как индекс ДНК-комет (ИДК), определяемый по формуле:

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

где $n_0 - n_4$ — число ДНК-комет каждого типа, Σ — сумма подсчитанных ДНК-комет.

5.9.9. Оценка результатов

Статистическую оценку результатов проводят по каждому органу путем сравнения среднегрупповых показателей поврежденности ДНК в получавших ЛС 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, дозозависимое 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. Кроме того, результаты исследования могут считаться неоднозначными при выявлении ДНК-повреждающего эффекта соединения в низкой дозе при отсутствии такового в более высоких дозах. В этих случаях исследование необходимо повторить с параллельной оценкой цитотоксичности соединения.

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;
- минимальная действующая доза;
- наличие и характер дозозависимого эффекта;
- степень превышения эффекта в получавшей ЛС группе по сравнению с контрольной.

5.9.10. Отчетность

Результаты исследования документируются согласно таблице 8.

*Итоговая таблица результатов оценки ДНК-повреждающей активности соединения
методом ДНК-комет в клетках млекопитающих in vivo*

Условия эксперимента (вещество, доза)	№ животного	Проанализировано клеток	Показатель (% ДНК в хвосте; индекс ДНК-комет)	Средний показатель по группе	Уровни значимости
1	2	3	4	5	6

Отчет предоставляется в соответствии со следующим протоколом:

Название эксперимента _____
 Животные:
 Вид _____ линия _____ пол _____ масса _____
 Питомник _____ дата получения _____
 Количество _____
 Вещество:
 название _____
 формула, № по CAS, физико-химические свойства _____
 откуда получено _____ чистота _____
 растворитель _____
 позитивный контроль _____
 Анализ литературных данных:
 Схема проведения эксперимента:
 дата проведения (начало, окончание, отдельные эксперименты) _____
 путь введения _____ дозы _____
 Обоснование выбора доз _____
 длительность, кратность введения _____
 группы _____
 выбор органов/тканей для анализа _____
 Условия проведения методики и анализа микропрепаратов _____
 Полученные результаты: _____
 Публикации (по результатам исследований) _____
 Список цитированной литературы: _____
 Заключение по соединению: _____
 Исполнители: _____
 Дата сдачи отчета: _____

5.10. Метод определения одностранных разрывов ДНК клеток млекопитающих методом щелочной элюции

5.10.1. Цель исследования и принцип метода

Метод основан на определении кинетики прохождения через мембранные фильтры одностранных фрагментов ДНК, которые образуются при денатурации ДНК в присутствии щелочи. Скорость элюции ДНК определяется скоростью денатурации ДНК, которая зависит от числа разрывов или щелочнолабильных сайтов, индуцированных исследуемым соединением или его метаболитами.

5.10.2. Процедура тестирования

5.10.2.1. Клеточные культуры

Используют культуры постоянных клеточных линий, например клетки легкого китайского хомячка линии V-79, клетки яичника китайского хомячка СНО или культуры мышинных клеток L.

5.10.2.2. Метаболическая активация

В качестве экзогенной метаболической активации используется фракция S9 печени крыс, предобработанных соволом (300 мг/кг, однократно, внутривбрюшинно, за 5 сут до эвтаназии).

5.10.2.3. Изучаемые концентрации

Используется двухэтапная схема тестирования. Используются следующие конечные концентрации: 0,1; 1,0; 10,0 и 100,0 мкг/мл. При обнаружении эффекта только при действии одной концентрации вещества эксперимент повторяют в диапазоне концентраций, в 2 и 5 раз больших и меньших (2-й этап).

5.10.2.4. Контроли

В каждом эксперименте обязательной является постановка негашеного контроля, которым является растворитель.

В качестве растворителя используются дистиллированная вода или диметилсульфоксид в конечной концентрации 1%, а при необходимости — другие растворители, которые используют в концентрациях, не вызывающих токсического эффекта.

В позитивных контролях используют диметилнитрозамин, метилметансульфонат и др.

5.10.2.5. Проведение эксперимента

Последовательность операций, связанных с подготовкой и проведением эксперимента, а также процедура оценки полученных данных и квалификация результатов исследований описаны в соответствующих руководствах [37].

Для проведения эксперимента клетки тестерной линии предварительно культивируют в среде Игла или RPMI 1640 с 15% инактивированной сывороткой крупного рогатого скота, содержащей меченный тритием тимидин до появления монослоя. Затем культуры инкубируют с исследуемым веществом. По истечении срока инкубации клетки снимают с подложки и переносят на мембранные фильтры, где проводят процедуру лизиса с последующей промывкой выделенной ДНК. Затем проводят щелочную элюцию ДНК и отбор элюатов без фракционирования. Содержание ДНК в элюатах определяют в кислотонерастворимой фракции, которую сорбируют на мембранные фильтры. Радиоактивность меченного тритием тимидина, оставшуюся на фильтрах, определяют на сцинтиляционном счетчике.

Исследование параллельно ведут 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.

5.10.3. Данные и их представление

5.10.3.1. Обработка результатов

Полученные результаты выражают в виде % ДНК, оставшейся на фильтре. При этом используют следующую формулу: $F = A_F / (A_F + A_E)$, где F — % ДНК (активность в имп/мин), оставшейся на фильтре после элюции; A_F — активность, оставшаяся на фильтре; A_E — активность, обнаруженная в элюате, в пересчете на полный его объем.

Для расчетов используют среднее арифметическое всех независимых параллелей эксперимента в том случае, если их результаты не различаются больше чем на 3σ .

5.10.3.2. Оценка результатов

Наличие у изучаемого вещества ДНК-повреждающего действия регистрируют при обнаружении достоверных различий между % оставшейся на фильтре ДНК в контрольных и обработанных ЛС вариантах.

Достоверность различий определяют с использованием критерия Стьюдента.

Если ни в одном из вариантов не получено позитивных результатов, эксперимент прекращают. Таким же образом поступают, если обнаружен эффект с четкой дозовой зависимостью. Если эффект получен только на одной концентрации, эксперимент повторяют с использованием схемы 2-го этапа.

Отчет должен включать следующую информацию:

- использованные клетки;
- условия проведения теста: уровни концентраций и обоснование выбора концентраций, количество повторностей на экспериментальную точку, состав среды, тип и состав системы метаболической активации, методика обработки, негативные контроли;
- индивидуальные результаты для каждой параллели;
- средние значения всех показателей;
- стандартное отклонение;
- уровень значимости различий с сериями негативного контроля.

5.10.3.3. Интерпретация результатов

Позитивные результаты в этом тесте указывают на то, что тестируемое соединение или его метаболиты индуцируют однонитевые разрывы ДНК или щелочелабильные сайты. Негативные результаты в этом тесте указывают на то, что в данных условиях тестируемое соединение и его метаболиты не проявляют соответствующей активности.

5.10.4. Отчетность

Протокол представления результатов определения однонитевых разрывов ДНК клеток млекопитающих методом щелочной элюции

Название эксперимента: _____
Клеточная линия: _____
Вещество: _____
Название _____
Формула, физико-химические свойства _____
Откуда получено _____
Растворитель _____
Анализ данных литературы: _____
Схема эксперимента: _____
Дата проведения (начало, окончание, отдельные эксперименты) _____
Количество повторностей, количество чашек на дозу _____
Система метаболической активации _____
Полученные результаты: _____
Публикации (по результатам работы) _____
Список цитированной литературы: _____
Исполнители: _____
Дата сдачи отчета: _____

5.11. Тест на угнетение метаболической кооперации в смешанной культуре клеток для скрининга опухолевых промоторов

5.11.1. Термины и определения

TG_S — клетки, чувствительные к токсическому аналогу пуриновых оснований 6-тиогуанину.

TG_R — клетки, резистентные к 6-тиогуанину вследствие отсутствия у них фермента гипоксантин-гуанин-фосфорибозилтрансферазы (ГФРТ).

В контексте данного метода промотор — агент, нарушающий проницаемость межклеточных контактов в культуре соматических клеток млекопитающих.

5.11.2. Цель исследования и принцип метода

Опухолевые промоторы снижают метаболическую кооперацию, которая сдерживает пролиферацию трансформированных (инициированных) клеток.

Цель метода — выявление способности изучаемого агента нарушать проницаемость щелевых контактов клеток для молекул фермента (ГФРТ), превращающего 6-тиогуанин в нуклеотид, включающийся в ДНК [23]. Тест применим для соединений, растворимых в питательной среде для культивирования клеток млекопитающих.

Метод основан на том, что выживаемость TG_R -клеток в смешанной культуре с TG_S -клетками на среде с 6-тиогуанидином резко снижается, так как в TG_S -клетках образуется нуклеотид 6-тиогуанина, который через щелевые контакты поступает в TG_R -клетки и отравляет их. Внесение в культуру агента, способного разобщать клеточные контакты, уменьшает поступление в резистентные клетки токсичного 6-тиогуанина, что приводит к возрастанию выживаемости TG_R -клеток в смешанной культуре.

5.11.3. Процедура тестирования

Основным эффектом в тесте на угнетение метаболической кооперации является увеличение выживаемости резистентных к 6-тиогуанину клеток при их совместном культивировании с чувствительными вследствие угнетения межклеточного обмена токсичным метаболитом 6-тиогуанином.

5.11.3.1. Культура клеток

В тесте используют клетки легкого китайского хомячка линии V-79 дикого типа (TG_R -клетки) и мутантные (TG_S -клетки) из банка клеток, замороженных в жидком азоте на ранних пассажах.

5.11.3.2. Изучаемые концентрации

Для выбора концентраций испытуемого вещества до постановки основного эксперимента изучается его цитотоксическое действие. На 10 чашек высевают по 5×10^5 – 10^6 TG_R -клеток. Через 4 ч после посева в среду добавляют тестируемое вещество в логарифмически снижающихся концентрациях, начиная с концентрации 100 мг/мл или 10% раствора вещества в среде, если оно жидкое. Через 72 ч культуры клеток микроскопируют. Концентрация, приводящая к гибели более 75% клеток или вызывающая выраженные морфологические изменения у 75% клеток считается токсичной. В основном исследовании клетки экспонируют с последовательно уменьшающимися концентрациями вещества, начиная с концентрации, равной половине токсичной дозы.

5.11.3.3. Контроли

В качестве позитивного контроля используют известный промотор — 12-О-тетрадеканойлфорбол-13-ацетат (ТФА) в концентрации 5–100 мг/мл.

5.11.3.4. Проведение исследования

Необходимые для проведения эксперимента оборудование, посуда, реактивы, питательные смеси и растворы, проведение работ по получению фракции S9, а также регламент работы с культурами клеток описаны [17, 22, 23].

Для того чтобы разделить специфическое разобщающее и неспецифическое токсическое действие тестируемого соединения, параллельно с изучением влияния соединения на метаболическую кооперацию проводят изучение его цитотоксического действия.

5.11.4. Данные и их представление

5.11.4.1. Критерии адекватности постановки исследования

1. Эффективность клонирования TG_R -клеток в смешанной культуре в контроле с растворителем не должна превышать 30% от эффективности клонирования TG_R -клеток в отсутствие TGs -клеток в контроле с растворителем.

2. Выживаемость TGR -клеток в смешанной культуре при обработке промотором ТФА (положительный контроль) должна быть более чем в 2 раза выше, чем в контроле с растворителем.

3. Цитотоксическое действие хотя бы 1–2 изучаемых концентраций тестируемого соединения не должно быть выше 30%.

5.11.4.2. Оценка результатов

Данные представляют в виде количества колоний на чашку во всех группах опыта и контроля. Указывают количество колоний для каждой чашки, среднее количество на чашку и стандартное отклонение.

Эксперимент повторяют не менее 5 раз.

Определяют цитогенетическое действие всех изученных концентраций тестируемого соединения. Вычисляют в % относительную эффективность клонирования TG_R -клеток по отношению к контролю с растворителем (ЭК). Концентрации тестируемого соединения, вызвавшие снижение ЭК более чем на 30% по сравнению с контролем, при оценке влияния соединения на метаболическую кооперацию не рассматривают.

Абсолютное количество колоний TG_R -клеток, выявленное в чашках каждой группы, умножают на соответствующую данной группе ЭК.

Значимость различий выживаемости TG_R -клеток в смешанной культуре, обработанной тестируемым соединением, оценивают при помощи критерия Стьюдента.

Критериями положительного ответа являются:

- наличие достоверного увеличения относительной эффективности клонирования TG_R -клеток в культурах, обработанных тестируемым соединением, по сравнению с контролем;
- высокая воспроизводимость результата (не менее чем в трех опытах из трех);
- существование зависимости «доза–эффект».

5.11.5. Отчетность

Протокол представления результатов оценки способности соединения к угнетению метаболической кооперации в смешанной культуре клеток

Название эксперимента: _____

Культура клеток: _____

Вещество: _____

Название _____

Формула, физико-химические свойства _____

Откуда получено _____

Позитивный контроль _____

Растворитель _____

Анализ данных литературы: _____

Схема эксперимента: _____

Дата проведения (начало, окончание, отдельные эксперименты) _____

Количество повторностей, количество чашек на дозу _____

Система метаболической активации _____

Полученные результаты: _____

Публикации (по результатам работы) _____

Список цитированной литературы: _____
Исполнители: _____
Дата сдачи отчета: _____

5.12. Тест на неопластическую трансформацию клеток грызунов в культуре ткани

5.12.1. Термины и определения

Неопластической трансформацией является процесс, в результате которого нормальные клетки приобретают способность расти в виде опухолей при перевивке их сингенным животным.

5.12.2. Цель исследования и принцип метода

Целью исследования является выявление способности испытуемого соединения превращать в культуре ткани нормальные клетки в злокачественные. Принцип метода состоит в том, что в системе быстро размножающихся соматических клеток малигнизующие способности канцерогенов проявляются быстрее.

5.12.3. Процедура тестирования

5.12.3.1. Культура клеток

Культуры соматических клеток длительно пассируют на среде, содержащей тестируемое соединение. Клетки, не обладающие собственной системой метаболической активации проканцерогенов, выращивают на монослое облученных клеток, обладающих высокой активностью метаболизирующих ферментов, или обрабатывают смесью S9 из постмитохондриальной фракции печени крыс. Колонии трансформированных клеток морфологически отличаются от нормальных по внешнему виду и ростовым потребностям, а также по способности давать опухоли при перевивке сингенным животным. Сравнивают количество трансформированных колоний в культурах, обработанных тестируемым соединением со спонтанным уровнем.

5.12.3.2. Метаболическая активация

Для метаболической активации проканцерогенов готовят «кормилку», которая представляет собой монослой у-облученных клеток (10 000 рад) эмбриональных фибробластов или необлученную свежеприготовленную культуру гепатоцитов взрослой крысы или мыши. Клетки «кормилки» нежизнеспособны, но они кондиционируют среду и обеспечивают метаболическую активацию проканцерогенов, к которой клетки иммортализованных линий не способны. Оптимальной является «кормилка» из первичной культуры гепатоцитов взрослых грызунов. Эмбриональные клетки первых пассажей от эмбрионов III триместра беременности также пригодны, но спектр активирующих цитохромов у них ограничен.

5.12.3.3. Изучаемые концентрации

Для изучения канцерогенности испытуемого вещества в качестве максимальной используют минимальную токсическую дозу. Для ее определения используемые для скрининга клетки сажают в лунки пластиковых плат в концентрации, обеспечивающей 30% монослоя через 48 ч. Для быстрорастущих клеток эти параметры могут быть другими, их подбирают экспериментально. Через 48 ч после посева в лунках культуральную среду заменяют средой, содержащей различные концентрации испытуемого вещества (обычно вначале с шагом 1/10, а затем 1/2, по две лунки на каждую концентрацию). Водорастворимые вещества непосредственно перед опытом растворяются в культуральной среде. Нерастворимые в воде вещества обычно растворяют в диметилсульфоксиде. Обяза-

тельно наличие контроля на растворитель и чистого контроля без каких-либо добавок (минимум по 2 лунки). Учет результатов проводят от 3-го до 7-го дня после добавления испытуемого вещества по характеру гибели клеток.

5.12.3.4. Контроли

В каждом эксперименте необходимо наличие контролей. Негативный контроль: необработанная культура и растворитель. В качестве позитивного контроля может быть использован 20-метилхолантрен либо другой известный канцероген, предпочтительно того же ряда, что и тестируемое соединение, исследованный ранее в культуре клеток.

5.12.3.5. Проведение эксперимента

В чашки Петри диаметром 50–60 мм на приготовленную «кормилку» высевает от 300 до 1000 клеток-мишеней и через 24 ч добавляют испытуемое вещество в концентрациях с шагом 1/2, с максимальной концентрацией, которая оказалась минимально токсичной в тесте на токсичность. Контролями служат чашки с растворителем в максимальной для данной серии концентрации (в случае ДМСО не более 0,5%), чашки без какого-либо воздействия и чашки с заранее известным канцерогеном в работающей концентрации (положительный контроль). При работе с эмбриональными клетками хомяка клетки выращивают в течение 9 сут без замены среды, после чего культуру отмывают любым солевым раствором и окрашивают принятым в лаборатории методом. При работе с клетками иммортализованных клеточных линий культуру отмывают от канцерогена через 24–48 ч или позже, а затем клетки культивируют 4–6 недель без пересева, сменяя среду 1–2 раза в неделю. После этого чашки промывают и окрашивают, как и в тесте с использованием эмбриональных клеток хомяка.

5.12.4. Данные и их представление

5.12.4.1. Оценка результатов

Данные представляют в виде количества трансформированных колоний на чашку. Как для тестируемого соединения, так и для позитивных и негативных контролей указывают число колоний для каждой чашки, среднее количество трансформированных колоний для каждой чашки и стандартное отклонение.

Все результаты должны быть подтверждены в независимом эксперименте. Для оценки результатов тестирования используют соответствующие статистические методы.

О трансформирующем действии испытуемого вещества судят по характеру колоний клеток или очагов роста. Колонии трансформированных клеток при достаточном навыке легко распознаются по их монослойному росту, отсутствию однонаправленной ориентированности. Такие колонии состоят из резко поляризованных, перекрещивающихся, расположенных в несколько слоев клеток. Окраска их более интенсивна за счет многослойности. Клеточные штаммы, полученные из клеток таких линий, обладают пониженной чувствительностью к концентрации сыворотки в культуральной среде, образуют колонии в полужидком агаре, а при прививке сингенным животным приводят к росту у этих животных опухолей. Показателем активности испытуемого вещества является соотношение колоний трансформированных клеток и нетрансформированных клеток.

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

5.12.4.2. Интерпретация результатов

Тестируемое соединение, не вызывающее статистически достоверного, зависящего от дозы увеличения количества трансформированных колоний или воспроизводимого

и статистически достоверного позитивного ответа для какой-либо экспериментальной точки, рассматривается как неканцерогенное в данном тесте.

5.12.5. Отчетность

Протокол представления результатов оценки способности соединения к неопластической трансформации клеток грызунов в культуре ткани

Название эксперимента: _____

Культура клеток: _____

Вещество: _____

Название _____

Формула, физико-химические свойства _____

Откуда получено _____

Позитивный контроль _____

Растворитель _____

Анализ данных литературы: _____

Схема эксперимента: _____

Дата проведения (начало, окончание, отдельные эксперименты) _____

Дозы (концентрации), обоснование выбора доз, количество чашек на экспериментальную точку, токсичность, состав среды, тип системы метаболической активации, методика обработки, позитивные и негативные контроли _____

Индивидуальные результаты для каждой культуры, среднее количество трансформированных колоний на чашку, стандартное отклонение, отношение доза–эффект, где возможно _____

Полученные результаты: _____

Публикации (по результатам работы) _____

Список цитированной литературы: _____

Исполнители: _____

Дата сдачи отчета: _____

Заключение

Общее заключение по результатам экспериментов выносится в соответствии с принципами, изложенными в разделе 4. Применение лекарств с канцерогенной активностью в общеклинической практике недопустимо, за исключением назначений по жизненным показаниям.

Работу по использованию КСТ, так же как и экспертную оценку результатов, должны проводить специалисты, имеющие достаточные профессиональные навыки по применению методов, составляющих систему тестирования.

Материалы оформляются в виде научного отчета в соответствии с ГОСТ 7.32-2001 и Приказом Минздравсоцразвития России от 23 августа 2010 г. № 708н «Об утверждении правил лабораторной практики» с предоставлением в таблицах как первичных данных по каждому веществу, так и статистически обработанных результатов. К отчету необходимо приложить аналитические паспорта или нормативные документы на референтные и тестируемые вещества.

Литература

1. Белицкий Г.А., Фонштейн Л.М., Худолей В.В. и др. // Совол как индуктор микросомальных ферментов, активирующих проканцерогены / Экспериментальная онкология, 1987. — № 3. — С. 20–23.
2. Белицкий Г.А., Худолей В.В. / Вопросы онкологии, 1986. — № 4. — С. 3–11.
3. Белицкий Г.А., Шарупич Е.Г., Хованская Е.М. // Методические рекомендации по применению соматического мутагенеза у *Drosophila melanogaster* в качестве тест-системы для ускоренного определения канцерогенов. — М., 1982. — 24 с.

4. Малашенко А.М., Суркова Н.И., Семенов Х.Х. Определение мутагенности химических соединений (генетический скрининг) на лабораторных мышах: Методические указания. — М., 1977. — 12 с.
5. Медведев Н.Н. Практическая генетика. — М.: Наука, 1968. — 294 с.
6. Метод определения разрывов ДНК как тест-система для выявления мутагенного потенциала химических веществ: Методическое указание. — М., 1980. — 11 с.
7. Методические рекомендации по исследованию канцерогенных свойств фармакологических и лекарственных средств // Ведомости Фармакологического комитета. — 1998. — № 1. — С. 21–24.
8. Методические рекомендации по проверке мутагенных свойств у новых лекарственных препаратов. — М., 1981. — 56 с.
9. Оценка мутагенности новых лекарственных средств. — М., 1992. — 31 с.
10. Оценка мутагенной активности химических веществ микроядерным методом (методические рекомендации). — М., 1984. — 17 с.
11. Оценка мутагенных свойств фармакологических средств // Ведомости Фармакологического комитета, 1998. — № 4. — С. 32–39.
12. Применение метода щелочного гель-электрофореза изолированных клеток для оценки генотоксических свойств природных и синтетических соединений. Методические рекомендации. — М., 2006. — 27 с.
13. Руководство по краткосрочным тестам для выявления мутагенных и канцерогенных химических веществ. Гигиенические критерии состояния окружающей среды 51. — Женева: ВОЗ, 1989. — 212 с.
14. Статистическая обработка данных тестирования на мутагенность: Методические указания. — Вильнюс, 1989.
15. Тестирование химических соединений на предполагаемую канцерогенную активность по реакции репаративного синтеза ДНК в культуре клеток: Методические рекомендации. — М., 1982. — 21 с.
16. Тест-система для оценки способности индуцировать генные мутации у млекопитающих: Методическое указание. — М., 1977. — 17 с.
17. Фонштейн Л.М., Абилов С.К., Бобринев Е.В. и др. Методические рекомендации по применению теста Эймса *Salmonella*/микросомы. — М., 1983. — 25 с.
18. Фонштейн Л.М., Абилов С.К., Бобринев Е.В. и др. // Методы первичного выявления генетической активности загрязнителей среды с помощью бактериальных тест-систем (методическое указание). — М., 1985. — 34 с.
19. Ashby J. Two million rodent carcinogens? The role of SAR and QSAR in their detection // *Mutat. Res.*, 1994, 305, 3–12.
20. Collins A.R. // The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications and limitations / *Molecular Biotechnology*, 2004, 26, 29–26.
21. Barrett G. C., Kakunaga T., Kuroki T. et al. *In vitro* assays that may be predictive of tumour — promoting agents. — In: Long-term and Short-term Assays for Carcinogens: A Critical Appraisal / Montesano R., Bartsch H., Vainio H. et al. (Eds) IARC Sci. Publ. № 83. — Lyon, 1986. — P. 287–302.
22. Bradley M.O., Bhuyan B., Francis M.C et al. Mutagenesis by chemical agents in V79 Chinese hamster cells: a review and analysis of the literature; a Report of the Gene-Tox Program // *Mutat. Res.*, 1981, 87, 81–142.
23. Bridges B.A. Simple bacterial systems for detecting mutagenic agents // *Labor. Practice.* — 1972, 21, 413–429.
24. Fournie J.W., Hawkins W.E., Krol R.M., Wolf M.J. Preparation of whole small fish for histological evaluation. — In: Ostander G. K. (Ed.) // *Techniques in Aquatic Toxicology*, 1996, CRC Lewis Publisher. — P. 557–587.
25. Hartmann A. et al. // Use of *in vivo* comet assay for mechanistic genotoxicity investigations / *Mutagenesis*, 2004, 19, 51–59.
26. Hawkins W.E., Walker W. W., Overstreet R. M. Carcinogenicity Test Using Aquarium Fish // *Toxicology Methods.* — 1995. — Vol. 5. — P. 225–263.
27. Huttunen T. Bioscreen Application Manual, SOS-Chromotest with Bioscreen, Labsystems Oy, Helsinki.
28. Kajiwaru Y., Ajimi S., Hosokawa A., Maekawa K. // Improvement of carcinogen detection in the BALB/3T3 cell transformation assay by using a rich basal medium supplemented with low concentration of serum and some growth factors. *Mutat. Res.*, 1997, 393, 81–90.

29. Kerckaert G.A., LeBoeuf R.A., Isfort R.J. // Use of the Syrian hamster embryo cell transformation assay for determining the carcinogenic potential of heavy metal compounds / *Fundam. Appl. Toxicol.*, 1996, 34, 67–72.
30. Klopman G. // Artificial intelligence approach to structure-activity studies. Computer automated structure evaluation of biological activity of organic molecules // *J. Am. Chem. Soc.*, 1984, 106, 7315–7321.
31. Klopman G., Rosenkranz H. // Structure-activity relations: maximizing the usefulness of mutagenicity and carcinogenicity databases / *Environ. Health Perspect.*, 1991, 96, 67–75.
32. Maron D.M., Ames B.N. // Revised methods for the Salmonella mutagenicity test / *Mutat. Res.*, 1983, 113, 173–215.
33. Quillardet P., Huisman O., D'Ari R., Hofnung M. // The SOS chromotest: direct assay of the expression of gene *sfiA* as a measure of genotoxicity of chemicals. / *Biochimie*, 1982, 64, 797–801.
34. Speit G., Hartmann A. The comet assay — a sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage and repair. In: D.S. Henderson (Ed.), *Methods in Molecular Biology*, vol. 113, *DNA Repair Protocols: Eukaryotic Systems*, 2nd ed., Humana Press Inc., Totowa, NJ, 2006, pp. 275–286.
35. Venitt S., Bartsch H., Becking G., Fuchs R.P., Hofnung M., Malaveille C., Matsushima T., Rajewsky M.R., Roberfroid M., Rosenkranz H.S. // Short-term assays to predict carcinogenicity. Short-term assays using bacteria / *IARC Sci Publ.* 1986; (83): 143–61.
36. Venitt S., Bartsch H., Becking G., Fuchs R.P., Hofnung M., Malaveille C., Matsushima T., Rajewsky M.R., Roberfroid M., Rosenkranz H.S. // Short-term assays to predict carcinogenicity. The host-mediated assay / *IARC Sci Publ.* 1986, 83, 163–165.
37. Westerfield G.M. // *The zebrafish book* / Univ. Oregon, Eugene — Oregon, 1993, 260 p.

ГЛАВА 8

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ДОКЛИНИЧЕСКОМУ ИССЛЕДОВАНИЮ КАНЦЕРОГЕННЫХ СВОЙСТВ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ В ХРОНИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ НА ЖИВОТНЫХ

*Составители: д. м. н., проф. Л.Н. Пылев; О.В. Смирнова; д. м. н., проф. Е.В. Арзамасцев;
д. м. н., проф. В.Н. Анисимов; д. м. н., проф. Г.Б. Плисс; д. м. н., проф. М.А. Забежинский;
д. м. н., проф. Г.Я. Липатов*

Введение

Исследование потенциальной канцерогенной активности ЛС и фармакологических веществ (ФВ) на стадии разработки имеет много общего с методическими принципами изучения канцерогенности вообще химических веществ и биологических продуктов.

Имеющиеся отличия в подходах при исследовании канцерогенности химических веществ и ЛС состоят в необходимости учета при тестировании последних некоторых таких особенностей, как:

- назначение пациентам с различной патологией, включая генетические повреждения и гормональные нарушения;
- применение ЛС в фиксированных диапазонах доз и длительности введения (иногда пожизненно);
- использование у людей различного возраста (включая детский и старческий);
- назначение беременным и кормящим женщинам;
- использование в качестве профилактических и косметических средств;
- неконтролируемое применение при безрецептурном отпуске.

Необходимо разделение ЛС на принципиально новые, не имеющие химических аналогов; вновь синтезируемые в известных химических рядах; воспроизводимые; выделенные из растений; полученные биотехнологическими и генноинженерными методами.

Несмотря на ряд ограничений и критических замечаний, только хронические эксперименты на лабораторных животных остаются единственными для обоснованного заключения о канцерогенной опасности для человека ЛС.

В связи с возрастающими требованиями к безопасности ЛС на стадии их доклинического токсикологического изучения возникла необходимость пересмотра и уточнения некоторых положений «Методических рекомендаций по исследованию канцерогенных свойств фармакологических веществ» (1988, 2000, 2005 гг.).

1. Принципы и критерии отбора лекарственных средств и фармакологических веществ для изучения канцерогенных свойств в хронических экспериментах на лабораторных животных

Большая длительность и высокая стоимость хронических экспериментов на животных по тестированию канцерогенных свойств веществ выдвигают необходимость проведения отбора наиболее подозрительных соединений для проведения их исследований в первую очередь.

1.1. Тестирование на канцерогенность

При решении вопроса о тестировании ЛС на канцерогенность в хроническом эксперименте необходимо принимать во внимание, что: **обязательному тестированию на канцерогенность должны подвергаться впервые полученные ЛС, рекомендуемые:**

- в качестве профилактических, контрацептивных, лечебно-косметических;
- для применения в детской практике, а также для лечения беременных женщин и в период лактации;

- для применения в течение всей жизни или длительными повторными курсами;
- гормональные и гормоноподобные вещества;
- для широкого использования при безрецептурном отпуске лекарств;
- ЛС, полученные биотехнологическими и генно-инженерными методами.

ЛС, вопрос об исследовании которых рассматривается в каждом отдельном случае:

- предназначенные для лечения онкологических заболеваний у детей;
- принимаемые однократно или краткосрочными неповторяющимися курсами.

Тестирование на канцерогенность не обязательно для ЛС, предлагаемых:

- для лечения злокачественных новообразований у взрослых;
- для лечения заболеваний, представляющих непосредственную угрозу для жизни;
- воспроизводимые ЛС, если имеются достаточно обоснованные сведения, подтверждающие отсутствие канцерогенных свойств аналога.

1.2. Критерии для установления первоочередности исследований

Критериями для установления первоочередности исследований могут также служить:

- структурное сходство с известными канцерогенами и мутагенами или их метаболитами;

- наличие цитостатических, алкилирующих, гормоноподобных, ростостимулирующих свойств;

- наличие данных о положительных реакциях в краткосрочных тестах на мутагенность или в тестах ДНК-повреждений;

- наличие данных о канцерогенном риске при применении в клинической практике аналогов;

- наличие ограниченных сведений о канцерогенности ЛС или его аналогов для человека или экспериментальных животных по ранее проведенным исследованиям.

Наличие у ЛС мутагенных свойств придает при отборе данному критерию особую значимость. В то же время по мутагенности судить о канцерогенных свойствах соединения не следует, к тому же имеются так называемые негенотоксичные канцерогены. При наличии у соединения мутагенных свойств даже в нескольких тестах можно сугубо предположительно думать о его канцерогенности. Однако этого недостаточно для утверждения о наличии этих свойств и принятия каких-либо законодательных и социальных мероприятий по критерию канцерогенности. Отсутствие мутагенных свойств не позволяет предполагать отсутствие канцерогенности. Аналогичную ситуацию мы имеем и в тестах ДНК-повреждений.

Упомянутые принципы и критерии отбора имеют различную значимость, все они служат как для выявления ЛС, нуждающихся в изучении в первую очередь, так и для обоснования необходимости исследования соединения.

Практика показывает, что обычно часть упомянутых критериев отсутствует, особенно когда речь идет о новых ЛС. В таком случае возрастает значимость оставшихся критериев и важным является опыт исследователя.

2. План эксперимента

ЛС сложного состава изучается либо целиком, либо в некоторых случаях только его действующее вещество. Необходимость исследования канцерогенных свойств составляющих обсуждается после завершения эксперимента с основным соединением в случае выявления его канцерогенных свойств.

При тестировании на канцерогенность следует стремиться к созданию условий, обеспечивающих максимальное проявление у ЛС этих свойств, исходя из концепции, что таковое возможно при использовании максимально переносимой дозы (МПД). В соответствии с международным определением МПД является дозой, не приводящей в субхроническом эксперименте к гибели животного или торможению массы тела более чем на 10%.

Следует использовать минимум два вида (см. раздел 5) экспериментальных животных (не менее 50 голов каждого пола в получающих ЛС и контрольных группах). Для полноценности исследования и с целью оценки доза–эффектной зависимости, которая является важным дополнительным критерием наличия канцерогенной активности, необходимо использовать не менее трех (3) доз ЛС, не считая контрольной группы, где доза принимается за нулевую (0). За максимальную — следует брать МПД, каждая последующая должна быть ниже предыдущей дозы не менее чем в 2 раза. Одна из доз должна соответствовать терапевтической. При возможности число доз следует увеличить.

3. Определение максимально переносимой дозы (МПД)

Определение МПД включает два этапа и проводится на каждом виде животных обоего пола при каждом методе введения.

3.1. Острая токсичность

Понятие острой токсичности включает вредное действие соединения, проявляющееся при однократном или кратковременном его применении. Задачей эксперимента является определение LD_{10} , LD_{16} , LD_{50} , LD_{84} вещества, используя метод пробит-анализа по Литчфилду и Уилкоксону.

3.2. Определение МПД в субхроническом исследовании

Эксперимент проводят на 10 животных 6–8 недельного возраста обоего пола (при каждом методе введения, дозе и каждом виде). Максимальная доза находится на уровне LD_{16} , следующая — LD_{10} , а каждая последующая доза в 1,5–2 раза ниже предыдущей. При этом следует принимать во внимание рекомендуемые для человека путь введения и терапевтические дозы (максимально разовую и суточную) в пересчете на единицу массы тела (мг/кг). ЛС вводят животным в течение 6–8 недель и затем 2 недели наблюдают за их состоянием. Критерием токсического эффекта является гибель животных или торможение нарастания массы тела. За МПД принимается максимальная доза ЛС, не приводящая к гибели животного и вызывающая торможение прироста массы тела менее чем на 10%. При тестировании на канцерогенность МПД соединения может изменяться, но не в сторону увеличения.

4. Пути введения

Путь введения ЛС животным может быть одним, но, по возможности, соответствовать или приближаться к способу введения ЛС в организм человека. Увеличение числа путей введения — желательно.

Наиболее распространенным и адекватным является введение испытуемого соединения животным перорально (зондом, с пищей или питьевой водой). Вещество вводят ежедневно, через зонд — 5 раз в неделю. Дозу рассчитывают в мг/кг и ppm массы тела или потребляемой пищи.

При наличии каких-либо особенностей во введении ЛС человеку путь введения может быть другим (подкожный, накожный, внутрилегочный, внутриплевральный, внутрибрюшинный, трансплацентарный и др.). Режим введения ЛС при этом подбирается индивидуально для каждого метода в соответствии со схемами их использования в медицинской практике. Необходимо соблюдение условий, приближенных к GLP.

5. Лабораторные животные

Для тестирования ЛС на канцерогенность наиболее часто используют крыс и мышей. Обязательным является линейность животных и их чувствительность к канцерогенным соединениям. Можно рекомендовать крыс Вистар и мышей гибридов F_1 (СВАхС₅₇Вl₆).

Тестирование следует начинать на молодых (8–12-недельных) животных. Следует при их содержании соблюдать условия, приближенные к GLP.

Стандартизация корма животных является обязательным условием экспериментов по тестированию на канцерогенность.

Взвешивание животных должно проводиться в начале исследования еженедельно в течение первых двух месяцев, два раза в месяц — последующих двух и раз в месяц — последующих двух месяцев.

В связи с вариабельностью в частоте спонтанных опухолей каждый эксперимент должен иметь адекватные по возрасту и числу контрольные группы животных.

6. Продолжительность исследования

Тестируемое ЛС вводится крысам в течение 24 месяцев, мышам — 18 месяцев. По истечении стандартного срока оставшиеся в живых животные могут быть подвергнуты эвтаназии сразу, через 3 месяца или оставлены на дожитие (по решению экспериментатора). Если к этому сроку выжило более 50% животных, введение вещества следует продолжить до их гибели.

7. Вскрытие животных, гистологическая обработка и морфологическое исследование

Павшие или подвергнутые эвтаназии животные, получавшие ЛС, и контрольных групп подвергаются тщательному патологоанатомическому исследованию. Все внутренние органы фиксируют в 10% растворе нейтрального формалина, который заменяют через 7 дней. Фиксация продолжается в течение минимум 1,5 месяцев, после чего производится вырезка кусочков для гистологической обработки (промывка, проводка через спирты, заливка в парафин, резка на микротоме и окраска срезов). Окраску препаратов проводят общепринятыми методами (прежде всего гематоксилин-эозином). Морфологическое исследование должно проводиться специалистом, обладающим знаниями в области патологии и онкологии экспериментальных животных.

8. Документация и обработка результатов

Ход экспериментов подробно протоколируется в журнале, на павшее или подвергнутое эвтаназии животное заводится протокол вскрытия с указанием пола, сроков эксперимента, степени посмертных изменений, данных вскрытия, взятых на гистологическую обработку органов, гистологического номера с шифром (серия, год и др.), а также результатов морфологического изучения препаратов. В журнале приводится подробное описание изучаемого ЛС, методики эксперимента, регистрируется изменение в ходе исследования массы тела каждого животного, обосновывается корректировка доз и режима введения ЛС.

Корректировка доз и режима введения ЛС проводится в зависимости от частоты гибели животных и торможения массы их тела. Увеличивать МПД нельзя. Осмотр животных проводят ежедневно.

По результатам исследования составляются таблицы с указанием метода введения ЛС, пола животного, общего и эффективного числа животных, количества и процента опухолей (общего и у каждого пола и по отдельным их локализациям). Указываются сроки обнаружения первой опухоли и средний латентный период.

За эффективное число животных (из которого исчисляется процент опухолей) принимается количество животных, переживших время возникновения (выявления) первой опухоли. Оно исчисляется отдельно для каждого пола и всех животных в группе и может

быть общим для всего эксперимента (отдельно для каждого вида) при отсутствии между группами выраженных различий в смертности. При наличии последних возможно в качестве эффективного числа использовать исходное количество животных или эффективное для каждой группы. Для выявления различий в выживаемости (смертности) животных составляются таблицы по получавшим ЛС и контрольным группам.

Статистическая обработка результатов проводится различными общепринятыми методами: по Стьюденту-Фишеру, по χ^2 , дозовому тренду и методу Пето для случайных и фатальных опухолей.

Заключение

ЛС признается обладающим канцерогенными свойствами, если даже в одной из получавших ЛС групп имеется статистически значимое превышение частоты опухолей (в том числе спонтанных) по сравнению с их количеством в контрольной (в том же самом эксперименте). Возможно в качестве дополнения использование «исторического» контроля.

Материалы оформляются в виде научного отчета в соответствии с ГОСТ 7.32-2001 и Приказом Минздравсоцразвития России от 23 августа 2010 г. № 708н «Об утверждении правил лабораторной практики» с предоставлением в таблицах как первичных данных по каждому веществу, так и статистически обработанных результатов. К отчету необходимо приложить аналитические паспорта или нормативные документы на референтные и тестируемые вещества.

Литература

1. Галицкий В.А. Канцерогенез и механизмы внутриклеточной передачи сигналов // Вопросы онкологии, 2003. — Т. 49. — № 3. — С. 278–293.
2. Emmert S, Leibel D, Rünger TM. Syndromes with genetic instability: model diseases for (skin) cancerogenesis. J Dtsch Dermatol Ges. 2006 Sep;4(9): 721–31. Review. English, German.
3. Konturek PC, Kania J, Burnat G, Hahn EG, Konturek SJ. Prostaglandins as mediators of COX-2 derived carcinogenesis in gastrointestinal tract. J Physiol Pharmacol. 2005 Sep;56 Suppl 5: 57–73. Review.
4. Wald M. Exogenous proteases confer a significant chemopreventive effect in experimental tumor models. Integr Cancer Ther. 2008 Dec;7(4):295-310. Review.
5. Steimer JL, Dahl SG, De Alwis DP, Gundert-Remy U, Karlsson MO, Martinkova J, Aarons L, Ahr HJ, Clairambault J, Freyer G, Friberg LE, Kern SE, Kopp-Schneider A, Ludwig WD, De Nicolao G, Rocchetti M, Troconiz IF. Modelling the genesis and treatment of cancer: the potential role of physiologically based pharmacodynamics. Eur J Cancer, 2010 Jan; 46(1): 21–32.
6. Li J. J., Li S. A., Oberley T. D., Parsons J. A. Carcinogenic activities of various steroid al and non steroid al estrogen s in the hamster kidney: relation to hormonal activity and cell proliferation // Cancer Res., 1995. Vol. 55. P. 4347–4351.