

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 5

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ОЦЕНКЕ МУТАГЕННЫХ СВОЙСТВ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

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

Введение

Исследования мутагенности новых фармакологических средств и вспомогательных компонентов лекарственных форм проводятся на этапе доклинического изучения и предусматривают оценку способности ЛС к индукции разных типов мутаций в зародышевых и соматических клетках. С этой целью используют комплекс методов, выполняемых на разных тест-объектах. Опыт работы по тестированию лекарств, накопленный различными группами исследователей с момента выхода первой редакции «Методических рекомендаций по оценке мутагенности новых ЛС» (1981), показывает, что на доклиническом этапе исследования целесообразно применение следующего набора тестов для оценки ЛС на мутагенность:

— тест на индукцию генных мутаций (тест Эймса на *Salmonella typhimurium* или учет рецессивных, сцепленных с полом, летальных мутаций/соматической рекомбинации у дрозофилы).

— тест на индукцию хромосомных повреждений *in vivo* (учет хромосомных aberrаций в клетках костного мозга млекопитающих либо учет микроядер в клетках костного мозга или периферической крови млекопитающих).

Регламент выполнения рекомендованных методов и алгоритмы трактовки результатов исследований описаны в соответствующих разделах, общие вопросы по генотоксикологии ЛС изложены ранее [1].

Исследование мутагенных свойств фармакологических средств, так же как и экспертную оценку результатов, должны проводить специалисты, имеющие достаточные профессиональные навыки по применению методов, составляющих систему тестирования. Данные методические рекомендации описывают комплексную систему проверки генетической активности новых ЛС, но не является пособием для освоения методов. Последние в должном объеме можно освоить только в результате стажировки в лабораториях соответствующего профиля.

1. Общие подходы

Тестированию на мутагенную активность подвергаются новые оригинальные фармакологические средства, созданные химическими, биотехнологическими, генно-инженерными и иными способами, включая полученные из сырья природного происхождения и фитопрепараты¹, а также новые фиксированные комбинации фармакологических средств, планируемые для широкого клинического применения.

В случае получения положительных результатов в обоих тестах делается заключение о наличии мутагенной активности и препарат не подвергается дальнейшим исследова-

¹ Настоящие методические указания не распространяются на лекарства-кандидаты на основе наночастиц и бессмысловых последовательностей. До разработки специальной системы исследования мутагенности таких субстанций и лекарственных форм оценка их мутагенности должна проводиться по программам, специально разработанным для каждой из них в отдельности на основе тестов *in vivo*, позволяющих учитывать зависимость манифестации возможного эффекта от особенностей биодоступности, биодegradации, кинетики, пути введения и времени экспозиции в организме.

дованиям. В случае получения положительного результата только в тесте на индукцию генных мутаций необходимо проведение дополнительного исследования на индукцию ДНК-повреждений в различных органах и тканях млекопитающих *in vivo*, с включением в анализ зародышевых клеток. Исследование проводится с использованием методов, описанных в «Методических указаниях по оценке канцерогенности ЛС и вспомогательных веществ в краткосрочных тестах» настоящего Руководства.

При условии получения отрицательных результатов препарат может быть допущен к 1-й и 2-й фазам КИ.

Перед 3-й фазой КИ необходимо провести изучение способности ЛП индуцировать мутации в зародышевых клетках (метод учета доминантных летальных мутаций у мышей).

В случае получения в экспериментальных тестах результатов, не позволяющих с полной определенностью сделать заключение о мутагенных свойствах тестируемого фармакологического вещества, на заключительных этапах КИ (3-я фаза) следует провести исследование методами учета хромосомных aberrаций и/или повреждений ДНК в клетках периферической крови леченых больных.

2. Тесты на индукцию генных мутаций

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

2.1.1. 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.

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

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

2.1.2. 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 вещества 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 гистидинзависимых штаммов *Salmonella typhimurium* [2, 3].

2.1.3. Процедура тестирования

2.1.3.1. Бактерии

В качестве тестерных организмов используются штаммы *Salmonella typhimurium*. Минимальный набор состоит из штаммов TA 97, TA 98 и TA 100. При необходимости могут использоваться и другие виды и штаммы микроорганизмов.

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

Для исследования могут быть использованы готовые тестовые наборы (киты), разработанные в соответствии с требованиями настоящих указаний.

2.1.3.2. Метаболическая активация

В качестве экзогенной метаболической активации используется фракция S9 печени крыс, предобработанных соволом (300 мг/кг, однократно внутривентриально, за 5 суток до эвтаназии) [4].

2.1.3.3. 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 доза может быть в пределах 1000–5000 мкг на чашку. Для нетоксичных водонерастворимых соединений максимальная концентрация определяется как наименьшая нерастворимая, определяемая по преципитации в агаре. Для тестируемых соединений с бактерицидной активностью максимальная доза должна подавлять рост бактерий не более чем на 50%, что определяется либо по уменьшению количества спонтанных ревертантов, либо по подавлению роста бактериального газона. В любом случае должно проверяться не менее 5 различных концентраций тестируемого соединения, различающихся, например, в 10 раз.

2.1.3.4. Контроли

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

В качестве растворителя используются дистиллированная вода или диметилсульфоксид, 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.

2.1.3.5. 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. Исследования 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.

2.1.4. Данные и их представление

2.1.4.1. 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 для каждой чашки, среднее количество ревертантных колоний на чашку и стандартное отклонение. Если ни в одном из вариантов на данном

штамме (штаммах) не получено статистически значимых результатов, эксперимент прекращают. В случае обнаружения позитивного результата 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 доз (такая ситуация возможна при работе с фармакологическими средствами, обладающими бактерицидными свойствами), прибегают к дроблению доз. При этом за среднюю точку на шкале доз испытуемого вещества принимают дозу, на которой был выявлен максимальный эффект. В исследование вводят еще 4 варианта: дозы в 2 и 5 раз меньше и больше средней дозы.

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 [5].

2.1.4.2. Оценка результатов

Критериями позитивного результата являются или статистически достоверное зависимость от дозы увеличение количества ревертантов, или воспроизводимый и статистически достоверный позитивный ответ хотя бы для одной экспериментальной точки.

Тестируемое соединение, не вызывающее статистически достоверного зависимо от дозы 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 доза–эффект (где возможно).

2.1.4.3. 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. Они могут быть специфичны для микроорганизмов, поэтому их выявление не должно рассматриваться в качестве повода для заключения о мутагенности вещества для человека. Однако в этом случае проводится дополнительное исследование по алгоритму, описанному в пункте 2. Негативные результаты в этом тесте указывают на то, что в данных условиях тестируемое соединение не мутагенно для использованных штаммов *Salmonella typhimurium*.

2.1.5. 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 _____
Количество повторностей, количество чашек на дозу _____
Система метаболической активации _____
Полученные результаты: _____
Публикации (по результатам работы) _____
Список цитированной литературы: _____
Исполнители: _____
Дата сдачи отчета: _____

2.2. Учет рецессивных, сцепленных с полом, летальных мутаций у дрозофилы

2.2.1. 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.

2.2.2 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-хромосомах самцов дикого типа линии D-32. Эти мутации передаются через самок F₁ самцам второго поколения, не доживающим до стадии имаго.

2.2.3. Процедура тестирования

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

2.2.3.1. 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 d49, которые полностью исключают возможность кроссинговера между половыми хромосомами, но не нарушают жизнеспособности дрозофилы [6]. Фенотипическими маркерами служат мутации Argicot — абрикосовые глаза и Bag — полосковидные глаза. В подобном рода экспериментах можно пользоваться также тестерной линией CIV.

2.2.3.2. Пути введения и выбор доз

Обычно используют два основных способа введения испытуемых фармакологических средств в организм дрозофилы: ингаляционный и пероральный. 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 не растворим в воде, можно (при обязательном применении соответствующих контролей с растворителями) растворить его в этиловом спирте или диметилсульфоксиде так, чтобы конечная концентрация этих 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 экспозиций 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 % стерильность самцов. Эту «дозу» принимают за максимальную, которую используют в эксперименте. Снижение «дозы» необходимо только в случае исследований фармакологических средств, обладающих выраженным стерилизующим эффектом.

2.2.3.3. 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 (F1) отбирают виргинных гетерозиготных самок и индивидуально скрещивают их с самцами F1.

После вылета второго поколения (F2) 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 «летали». Постановка контролей обязательна [7].

2.2.4. Данные и их представление

Результаты исследований представляют в виде табл. 1.

Частоту рецессивных леталей оценивают как отношение числа культур второго поколения без самцов дикого фенотипа к общему числу культур. Всего необходимо поставить не менее 1000 культур F₂ на одну экспериментальную точку.

Для оценки значимости превышения частоты рецессивных леталей в опыте над контролем следует применять точный критерий Фишера для таблиц сопряженности 2×2. Различия между опытом и контролем считаются значимыми при $p < 0.01$ [5].

Таблица 1

Учет рецессивных, сцепленных с полом, летальных мутаций на дрозофиле

Препарат	Экспозиция	Число изученных культур в F ₂	Число не фертильных самцов F ₂	Рецессивные сцепленные с полом летальные мутации		Уровень значимости
				Количество	% ±m	
концентрация						

2.2.5. Отчетность

Протокол представления результатов оценки мутагенной активности вещества в тесте на индукцию рецессивных, сцепленных с полом, летальных мутаций у дрозофилы

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: _____

2.3. Учет соматической рекомбинации (мозаицизма) у дрозофилы

2.3.1. 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.

2.3.2. Цель исследования и принцип метода

Целью данного метода является интегральное выявление рекомбинационных и других мутационных событий, индуцируемых лекарственным веществом 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, транслокаций, делеций и генных мутаций. В качестве маркеров возможно использование генов «*y*» и «*sn*³» в трансположении [8].

2.3.3. Процедура тестирования

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

2.3.3.1. Используемые линии дрозофилы

Для учета соматического мозаицизма в данной тест-системе необходимо поддержание следующих 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*³ – извитая скрученная форма щетинок; оба гена рецессивные).

Спонтанный уровень мутаций и рекомбинаций невысок и колеблется у разных линий в пределах от 0.3 до 1.1%.

2.3.3.2. Пути введения и выбор доз

Обычно используют один из двух способов введения испытуемых фармакологических средств в организм дрозофилы: ингаляционный или пероральный (с кормом). Если препарат нерастворим в воде, можно (при обязательной постановке соответствующих контролей) растворить его в этиловом спирте или диметилсульфоксиде так, чтобы конечная концентрация этих растворителей в испытуемом 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 F₁, которая на максимальной из использованных концентраций не должна быть меньше 50%. Всего в эксперименте определяют эффект 3 различных концентраций фармакологического средства. В зависимости от токсичности фармакологического средства длительность экспозиции может колебаться от нескольких часов до нескольких дней (обычно экспозиция составляет 48–72 ч).

2.3.3.3. Проведение экспериментов

Девственных 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 биноклярным 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^3) и двойными (y, sn^3) пятнами [8].

2.3.4. Данные и их представление

Результаты экспериментов представляют в виде таблицы 2.

Статистическую обработку результатов проводят с использованием χ^2 -критерия, сравнивая частоту появления особей с пятнами в контрольных и опытных сериях [5].

Таблица 2

Учет соматического мозаицизма при использовании маркеров y, w и sn^3 .

Препарат концентрация/ экспозиция	Общее число просмотренных самок	Число самок с мутациями				
		пятен « sn^3 »	пятен « y »	пятен « $y sn^3$ »	все пятен	% $\pm m^*$

* $m = 1/\sqrt{N}$, где N — число просмотренных особей.

2.3.5. Отчетность

Протокол представления результатов оценки мутагенной активности вещества в тесте на индукцию соматического мозаицизма у дрозофилы

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: _____

3. Тесты на индукцию хромосомных повреждений *in vivo*

Путь введения исследуемого фармакологического вещества должен соответствовать планируемому в клинике. Если предполагается возможность энтерального и парентерального введения, можно использовать внутрибрюшинный, подкожный или внутримышечный способы введения. Фармакологические средства перорального применения изучают при внутрижелудочном пути введения. Изучение мутагенной активности ингаляционных анестетиков, мазей и т.п. проводят в условиях предполагаемого применения (ингаляционное, накожное) и при парентеральном введении.

Исследуемые фармакологические средства растворяют в дистиллированной воде или изотоническом растворе натрия хлорида. Водонерастворимые препараты вводят с твином-80 или используют растворители (этиловый спирт, диметилсульфоксид в конечной концентрации до 5%); для перорального введения порошкообразных лекарств можно использовать растительное масло или 1% водный раствор крахмала. 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. Оптимальный объем вводимых растворов фармакологических средств и соответствующих растворителей (для контрольных групп животных) должен составлять при пероральном и внутрибрюшинном способах введения не более 20 мл/кг и при внутримышечном — не более 10 мл/кг массы животного.

Выбор доз для исследований определяется на основе результатов оценки острой токсичности и специфической активности фармакологического вещества. Вещество или лекарственная форма исследуются в двух дозах. Первая соответствует предполагаемой суточной терапевтической дозе для человека, пересчитанной на 1 кг массы или поверхность тела экспериментального животного², а вторая выбирается на основе данных по острой токсичности и составляет 1/10–1/5 ЛД₅₀ для используемого вида млекопитающих. В случае если токсичность исследуемого соединения настолько мала, что дозу ЛД₅₀ невозможно определить по техническим причинам, в качестве максимальной дозы определяется 2000 мг/кг.

Проведение экспериментов *in vivo* предусматривает применение генетически однородных животных, чаще половозрелых самцов и самок мышей. Ни одна из инбредных линий не выделяется как предпочтительная. Не исключается применение мышей-гибридов или других видов животных.

² Общие принципы пересчета доз изложены в «Методических указаниях по изучению общетоксического действия фармакологических веществ».

3.1. Учет хромосомных aberrаций в клетках костного мозга млекопитающих

3.1.1. 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 и хромосомные 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 ширину и не сопровождающиеся сдвигом дистального участка относительно ее оси.

Кластогенез — способность вещества вызывать разрывы хромосом с образованием одиночных и парных фрагментов.

3.1.2. Цель исследования и принцип метода

Выявление и количественная оценка потенциальной цитогенетической (кластогенной) активности фармакологических веществ 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% [9].

3.1.3. Процедура тестирования

3.1.3.1. Лабораторные животные

Исследования проводят на самцах и самках мелких лабораторных грызунов, 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.

3.1.3.2. 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 суток. Фиксацию клеточного материала осуществляют через 6 и/или 24 ч после последнего введения в зависимости от фармакокинетических особенностей исследуемого препарата [7].

3.1.3.3. Контроли

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

Негативным контролем является используемый растворитель.

3.1.3.4. Приготовление цитогенетических препаратов

Методика выделения клеток костного мозга и приготовления препаратов для цитогенетического анализа подробно описаны в соответствующих руководствах и ранее опубликованных методических указаниях [9, 10]. Полученные препараты (два стекла от каждого животного) шифруют и подвергают микроскопическому цитогенетическому анализу.

3.1.3.5. Микроскопический анализ

Анализируют по 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.

3.1.4. Оценка результатов

Доказательством цитогенетической активности исследуемого препарата является дозозависимое и/или воспроизводимое в разных сериях исследования статистически значимое превышение доли клеток с хромосомными aberrациями в получавших исследуемый препарат сериях исследования по сравнению с контролем.

Статистическую обработку проводят согласно общепринятым указаниям [5].

Результаты документируются согласно табл. 3.

Таблица 3

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

Условия эксперимента	Количество клеток	на 100 исследованных клеток					Количество клеток с хромосомными повреждениями ($M \pm m\%$)	Уровень значимости
		гепы	одиночные фрагменты	двойные фрагменты	обмены	клетки с МП*		

* — клетки с множественными (более 5 на метафазу) повреждениями

3.1.5. 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: _____

3.2. Учет микроядер в клетках млекопитающих

3.2.1. Термины и определения

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

3.2.2. Цель исследования и принцип метода

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

Метод основан на микроскопической регистрации клеток с микроядрами. Спонтанная частота клеток с микроядрами составляет 0.1–0.2% [11].

3.2.3. Процедура тестирования

3.2.3.1. 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 группах.

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

3.2.3.2. 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 костного мозга через 24 ч после введения или периферической крови через 48 ч после введения.

Во второй серии исследуемый препарат в дозе, соответствующей суточной терапевтической для человека, вводят самцам и самкам ежедневно на протяжении 4–5 суток. Фиксацию клеточного материала осуществляют через 6 и/или 24 ч после последнего введения в зависимости от фармакокинетических особенностей испытуемого препарата [7, 11, 12].

3.2.3.3. Контроли

Негативным контролем является используемый растворитель.

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

3.2.3.4. Приготовление цитогенетических препаратов

Методики выделения клеток и приготовления препаратов для цитогенетического анализа подробно описаны в соответствующих руководствах и методических указаниях [7, 11, 13]. Для окраски препаратов предпочтительнее использование ДНК-специфичных красителей (акридиновый оранжевый, Hoechst 33258+pyronin Y), что позволяет избежать возможной ложноположительной оценки вследствие артефактного окрашивания [12]. Полученные препараты (два стекла от каждого животного) шифруют и подвергают микроскопическому цитогенетическому анализу.

3.2.3.5. Микроскопический анализ

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

3.2.4. Оценка результатов

Критерием позитивного результата является воспроизводимое и/или зависимое от дозы значимое увеличение числа полихроматофильных эритроцитов (ПХЭ) с микроядрами, по крайней мере, в одной из получавших препарат 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. 4.

Таблица 4

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	

Статистическую обработку проводят согласно общепринятым указаниям [5].

3.2.5. Отчетность

Протокол представления результатов оценки цитогенетической активности вещества в тесте на индукцию микроядер в клетках костного мозга или периферической крови 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: _____

4. Оценка мутагенности в зародышевых клетках

4.1. Метод учета доминантных летальных мутаций в зародышевых клетках мышей

4.1.1. Термины и определения

Доминантные летальные мутации — генетические изменения, индуцированные в родительских зародышевых клетках и приводящие к гибели первое поколение потомков на эмбриональных стадиях развития. Большая часть доминантных деталей представляет собой численные и структурные aberrации хромосом, частично они могут быть представлены генными мутациями.

4.1.2. Цель исследования и принцип метода

Выявление влияния исследуемого препарата на генетические структуры зародышевых клеток. Мутагенный эффект проявляется в виде повышенной эмбриональной смертности. Если яйцеклетка оплодотворена сперматозоидом, несущим доминантную леталь, то смерть развивающегося эмбриона может произойти как до, так и после имплантации. Для оценки мутагенных свойств фармакологических средств учитывают постимплантационную смертность.

4.1.3. Процедура тестирования

Обычная схема проведения эксперимента включает обработку фармакологическим средством самцов с последующим спариванием их с интактными самками [9,14,15]

4.1.3.1. Лабораторные животные

Эксперименты проводят на самках и самцах мелких лабораторных грызунов. Предпочтительно использование генетически однородных животных.

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

4.1.3.2. Проведение эксперимента

Для каждого варианта групп животных, получающих препарат, и контроля (понедельного) следует использовать животных приблизительно одного срока рождения. Самки в течение 2–3 недель после привоза не рекомендуется брать в исследование для исключения неконтролируемых беременностей.

Для выявления возможного мутагенного эффекта фармакологическое средство исследуется в дозах $1/2$ и $1/10$ LD_{50} при однократном введении. Применяемые дозы не должны снижать фертильность более чем на 50%. В противном случае их уменьшают и повторяют эксперимент. Исследование проводят в течение 3 недель на постмейотических стадиях сперматогенеза. На каждую дозу и контроль берут не менее 15 самцов. Сразу же после затравки к каждому обработанному или контрольному самцу подсаживаются по три виргинных самки. Подсадки самок проводятся еженедельно, с тем, чтобы вести анализ доминантной летальности соответственно стадиям сперматогенеза обработанных самцов. Эмбриональная смертность плодов у самок, забеременевших в 1-ю неделю после введения химического вещества, будет свидетельствовать о мутационных событиях, произошедших в зрелых сперматозоидах, 2-я неделя соответствует поздним сперматозоидам, 3-я неделя — ранним и средним сперматозоидам.

Отсаженных от самцов самок вскрывают на 15–17 день беременности. Большая часть доминантных леталей вызывает смерть эмбрионов при или вскоре после имплантации. Погибшие на этой стадии мертвые эмбрионы выглядят, как темные гомогенные округлые тела диаметром 2.5–3 мм. При вскрытии регистрируют количество живых и мертвых эмбрионов у каждой самки отдельно. Особенное внимание следует обращать на

дистальные отделы матки, так как именно там часто располагаются мертвые эмбрионы, которые в силу своих небольших размеров могут быть не учтены при обычном просмотре матки, растягиваемой двумя пинцетами. Данные вскрытия фиксируют в следующей форме (табл. 5).

Таблица 5

Форма регистрации первичного экспериментального материала в тесте на доминантные летальные мутации

Номер самца	Номер самки	Число живых эмбрионов	Число мертвых эмбрионов

4.1.3.3. Контроли

В качестве позитивных контролей целесообразно использовать фотрин, циклофосфамид или любой другой известный агент, заведомо обладающий мутагенной активностью на зародышевых клетках млекопитающих.

Негативным контролем является используемый растворитель.

4.1.4. Оценка результатов

В итоговую таблицу 6 вносят данные по каждой серии эксперимента (за серию принимают группу самцов, обработанных определенной дозой изучаемого фармакологического средства на данной стадии сперматогенеза), включая число беременных самок и процент фертильности.

Основным показателем уровня доминантных летальных мутаций служит уровень постимплантационных потерь, представляющий собой отношение числа мертвых эмбрионов к сумме живых и мертвых эмбрионов [14, 15]. Он характеризует постимплантационную смертность. Для оценки значимости увеличения этого показателя в группах получавших ЛС по сравнению с контрольным вариантом при работе с линейными животными используют критерий χ^2 для соотношения сумм живых и мертвых эмбрионов. В связи с тем, что при таком подходе будет игнорироваться индивидуальная чувствительность мышей, для снижения доли ложнопозитивных результатов решение о наличии мутагенного эффекта следует принимать на 1% уровне значимости.

Корректным представляется использование двухфакторного дисперсионного анализа.

Для заключения о степени мутагенной активности используют данные постимплантационной смертности на самой чувствительной стадии сперматогенеза.

Таблица 6

Изучение способности фармакологического средства индуцировать доминантные летальные мутации в зародышевых клетках мышей

Стадия сперматогенеза	Доза (мг/кг)	Число беременных самок	Фертильность (%)	Постимплантационная смертность	Значение χ^2 статистик
Зрелые сперматозоиды					
Поздние сперматиды					
Ранние сперматиды					

4.1.5. Отчетность

Протокол представления результатов оценки мутагенной активности вещества в тесте по учету доминантных летальных мутаций в зародышевых клетках 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 _____
Полученные результаты: _____
Публикации (по результатам работы) _____
Список цитированной литературы: _____
Исполнители: _____
Дата сдачи отчета: _____

5. Оценка эффектов препарата у леченых больных

5.1. Учет хромосомных aberrаций в лимфоцитах периферической крови леченых больных

5.1.1. Цель исследования и принцип метода

Выявление и количественная оценка потенциальной цитогенетической активности фармакологических средств в клетках периферической крови больных, подвергавшихся лечению исследуемым ЛП.

В основе метода лежит регистрация видимых на стадии метафазы структурных нарушений хромосом в культуре клеток периферической крови, стимулируемых к пролиферации действием митогена.

5.1.2. Процедура тестирования

Для исследования используется цельная гепаринизированная кровь больных, находящихся на стационарном лечении. Взятие крови производится у каждого больного стерильно дважды — до начала лечения и не позднее 24 ч после завершения курса. Численность группы составляет 12–15 человек вне зависимости от пола и возраста. В случае необходимости возможно включение в одну группу больных, находящихся в разных лечебных учреждениях. При этом следует избегать включения в цитогенетическое обследование пациентов, подвергающихся рентгенодиагностическим процедурам и приему заведомо мутагенных лекарств (цитостатики и пр.).

5.1.3. Методика культивирования лимфоцитов периферической крови

5.1.3.1. Подготовка и проведение эксперимента

Взятие крови производится стерильными шприцами с гепарином (30 МЕ/мл). На каждого больного ставится четыре культуры клеток цельной крови; две до начала лечения и две не позднее 24 ч после завершения курса лечения.

Необходимое для проведения эксперимента оборудование, посуда, реактивы, питательные смеси и растворы, а также регламент работы с культурами клеток, условия фиксации и подготовка препаратов для цитогенетических анализов описаны ранее [7, 16].

5.1.3.2. Цитогенетический анализ

Перед анализом препараты шифруют, исследование проводится слепым методом. На каждого больного анализируется не менее 200 метафазных пластинок: 100 до и 100 после завершения лечения.

Для анализа отбирают метафазные пластинки правильной формы с хорошим разбросом хромосом и модульным числом 46 (45–47).

Учитывают число одиночных и парных фрагментов, хроматидных и хромосомных обменов, число клеток с множественными абберациями, клеток с тотальной фрагментацией хромосом.

5.1.3.3. Статистическая обработка полученных результатов

Заключение о мутагенной активности исследуемого фармакологического средства делают при сравнении долей клеток с абберациями хромосом у больных до и после лечения с использованием критерия Уилкоксона для разности пар [5].

5.1.4. Отчетность

Сводные данные об индивидуальном уровне хромосомных аббераций, определенном у каждого больного до и после лечения, представляются в табл. 7.

Обобщение результатов исследования проводят на основе данных, представленных в табл. 8.

Заключение о цитогенетической активности делается по результатам статистического анализа.

5.2. Анализ ДНК-повреждений в клетках периферической крови леченых больных методом щелочного гель-электрофореза отдельных клеток (метод ДНК-комет)

5.2.1. Цель исследования и принцип метода

Выявление и количественная оценка щелочно-лабильных сайтов и разрывов ДНК в клетках периферической крови больных, принимавших ЛС на этапах его КИ.

В основе метода лежит оценка целостности ДНК в клетках цельной крови больных. Использование цельной крови исключает длительные манипуляции с исследуемыми клетками, что снижает вероятность артефактного повреждения ДНК *ex vivo* и повышает точность анализа [17].

5.2.2. Процедура тестирования

Взятие крови у каждого больного проводят дважды — до начала лечения препаратом и не позднее 24-х ч после завершения курса лечения. Количество больных в группе составляет 12–15 человек вне зависимости от пола и возраста. Из исследования исключают больных, подвергшихся рентгенодиагностическим процедурам или терапии препаратами, заведомо обладающими ДНК-повреждающими свойствами.

Венозную кровь асептически отбирают в стерильные пробирки, содержащие антикоагулянт. При необходимости допускается замораживание образцов. Для этого цельную кровь смешивают в соотношении 1:1 со средой RPMI-1640, содержащей 10% диметилсульфоксида и 20 мМ EDTA-Na₂, замораживают и хранят в криобирках при –70 °С не более 2 месяцев. Непосредственно перед получением микропрепаратов образцы размораживают в водяной бане при 37 °С в течение 1–2 мин. Время с момента взятия крови до получения микропрепаратов или замораживания образцов не должно превышать 3 ч. Во всех случаях временные интервалы должны быть унифицированы.

Таблица 7

*Уровень хромосомных aberrаций
в лимфоцитах периферической крови больных до и после лечения*

№ больного	Условия взятия крови	№ образца крови	Шифр стекла	Количество проанализированных метафаз	Количество клеток с aberrациями	Aberrации					
						одиночные фрагменты	хроматидные обмены	парные фрагменты	хромосомные обмены	всего aberrаций	пробелы
1	До лечения										
2	После лечения										

Таблица 8

*Средние значения уровня хромосомных aberrаций
в группах: до лечения — после лечения*

Количество больных	Количество проанализированных метафаз	Количество клеток с aberrациями ($x \pm m$)*	Aberrации (количество)					клеток с пробелами
			одиночные фрагменты	хроматидные обмены	парные фрагменты	хромосомные обмены	всего aberrаций ($x \pm m$)*	

* $m = 1/\sqrt{N}$, где N — число просмотренных метафазных пластинок

Необходимое для проведения исследования оборудование и реактивы, а также процедура получения микропрепаратов подробно описаны [18].

5.2.3. 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 $\times 200-400$. На каждый микропрепарат рандомизированно анализируют не менее 100 ДНК-комет без наложений хвостов. В анализ не включают апоптотические ДНК-кометы, выявляемые на микропрепаратах в виде слабофлуоресцирующих ДНК-комет с широким диффузным хвостом и практически отсутствующей головой [19].

Программно-аппаратный комплекс для анализа ДНК-комет включает совмещенную с микроскопом высокочувствительную CCD-камеру и специализированное программное обеспечение, что позволяет проводить цифровую регистрацию и обработку параметров ДНК-комет. В зависимости от имеющегося программного обеспечения анализ параметров ДНК-комет проводится в режиме «реального времени» либо с сохраненных цифровых изображений. В качестве показателя поврежденности ДНК используют показатель % ДНК в хвосте.

При визуальном анализе ДНК-кометы ранжируются на пять условных типов с соответствующим для каждого числовым значением от 0 до 4 [18]. Степень поврежденности ДНК при этом выражается как индекс ДНК-комет (ИДК), определяемый по формуле:

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

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

5.2.4. Оценка результатов

Статистическую оценку результатов проводят путем сравнения показателей ДНК-повреждений у больных до и после лечения с использованием критерия Уилкоксона для разности пар [5]. Позитивный результат указывает на то, что исследуемое фармакологическое средство индуцирует ДНК-повреждения в клетках периферической крови человека.

Дополнительно к основному анализу проводят регистрацию ДНК-комет апоптотических клеток с целью определения потенциальной апоптогенной активности исследуемого препарата. Рекомендуется также провести сравнительную оценку показателей у больных до и после лечения с референсными показателями для здоровых людей.

5.2.5. Отчетность

Данные о больных и индивидуальных показателях ДНК-повреждений, определенных до и после лечения, документируются согласно таблице 9.

Таблица 9

Уровень ДНК-повреждений
в клетках периферической крови больных до и после лечения

№ п/п	Ф.И.О. больного	Диагноз	№ больницы, отделения	Условия взятия крови	Дата взятия крови	№ образца крови	Шифр микропрепарата	Проанализировано клеток	Показатель (% ДНК, индекс ДНК-комет и т.д.)
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
				До лечения					
				После лечения					

Обобщенные результаты исследования приводят согласно таблице 10.

Таблица 10

Средние значения уровней ДНК-повреждений
в группах: до лечения – после лечения

Условия	Количество больных	Проанализировано клеток	Средний показатель по группе (% ДНК, индекс ДНК-комет и т.д.)	Уровни значимости
До лечения				
После лечения				

Отчет предоставляется в соответствии со следующим протоколом:

Дата проведения исследования (начало, окончание, отдельные исследования) _____

Данные о больных (лечебное учреждение, диагноз, длительность заболевания, возраст, и т.д.) _____

Лекарственный препарат:

Название _____ Производитель _____

Длительность применения, дозы _____

Условия проведения методики и анализа микропрепаратов _____

Полученные результаты _____

Публикации (по результатам работы) _____

Список цитированной литературы: _____

Заключение по препарату _____
Исполнители: _____
Дата сдачи отчета: _____

Заключение

Заключение о наличии у исследуемого фармакологического вещества мутагенных свойств выносится, если дозозависимый и/или воспроизводимый мутагенный эффект зарегистрирован хотя бы в одном эукариотическом тесте.

Результаты исследований фармакологического вещества на мутагенность являются частью материалов, оцениваемых в аспекте пользы и риска при решении вопроса о возможности КИ. 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. Дурнев А.Д., Середенин С.Б. Мутагены: скрининг и фармакологическая профилактика воздействий. — М.: Медицина, 1998. — 328 с.
2. Методы первичного выявления генетической активности загрязнителей среды с помощью бактериальных тест-систем: Методические указания. — М., 1985. — 34 с.
3. Gatehouse, D. G., Haworth T., Cebula E. et al. Report from the working group on bacterial mutation assays: International workshop on standardization of genotoxicity test procedures // *Mutat Res*, 1994, 312, 217-233.
4. Белицкий Г.А., Фоншейн Л.М., Худолей В.В. и др. Сокол как индуктор микросомальных ферментов, активирующих проканцерогены // *Экспериментальная онкология*, 1987. — №3. — С. 20–23.
5. Статистическая обработка данных тестирования на мутагенность: Методические указания. — Вильнюс, 1989.
6. Медведев Н. Н. Практическая генетика. — М.: Наука, 1968. — 294 с.
7. Руководство по краткосрочным тестам для выявления мутагенных и канцерогенных химических веществ. Гигиенические критерии состояния окружающей среды, 51. — Женева, ВОЗ, 1989. — 212 с.
8. Методические рекомендации по применению соматического мутагенеза у *Dr. melanogaster* в качестве тест-системы для ускоренного определения канцерогенов. / МЗ СССР. — М., 1982.
9. Определение мутагенности химических соединений (генетический скрининг) на лабораторных мышах: Методические указания. — М.: Медицина, 1977. — 12 с.
10. Preston R.J., Dean B.J., Galloway S. et al. Mammalian *in vivo* cytogenetic assays. Analysis of chromosome aberrations in bone marrow cells// *Mutation Research*, 1987, 189, 157–165.
11. Оценка мутагенной активности химических веществ микроядерным методом (методические рекомендации). — М., 1984, 17 с.
12. Hayashi M., MacGregor J.T., Gatehouse D.G. et al. *In vivo* rodent erythrocyte micronucleus assay: II. Some aspects of protocol design including repeated treatments, integration with toxicity testing and automated scoring // *Environ Mol Mutagen.*, 2000, 35, 234–252.
13. Mavournin K.H., Blakey D.H., Cimino M.C. et al. The *in vivo* micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program // *Mutat Res*, 1990, 239, 29–80.
14. Ehling U.H., Machemer L., Buselmaier W., Dýcka J., Frohberg H., Kratochvilova J., Lang R., Lorke D., Müller D., Peh J., Röthrborn G., Roll R., Schulze-Schencking M., Wiemann H.// Standard protocol for the dominant lethal test on male mice set up by the work group «Dominant Lethal Mutations of the ad hoc Committe Chemogenetics» // *Arch Toxicol*. 1978, 39, 173–185.
15. Оценка мутагенности новых лекарственных средств: Методические рекомендации. М., 1994. — 20 с.
16. Метод учета хромосомных aberrаций как биологический индикатор влияния факторов внешней среды на человека: Методические рекомендации. — М., 1994. — 32 с.

17. Chuang C.H., Hu M.L. Use of whole blood directly for single-cell gel electrophoresis (comet) assay *in vivo* and white blood cells for *in vitro* assay // *Mutat Res.*, 2004; 564, 75–82.
18. Применение метода щелочного гель-электрофореза изолированных клеток для оценки генотоксических свойств природных и синтетических соединений: Методические рекомендации. — М., 2006. — 27 с.
19. Collins A.R., Oscoz A.A., Brunborg G. et al. The comet assay: topical issues // *Mutagenesis* 2008, 23(3):143–151.

ГЛАВА 6

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ОЦЕНКЕ ДНК-ПОВРЕЖДЕНИЙ МЕТОДОМ ЩЕЛОЧНОГО ГЕЛЬ-ЭЛЕКТРОФОРЕЗА ОТДЕЛЬНЫХ КЛЕТОК В ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ

*Составители: член-корр. РАМН, проф. А.Д. Дурнев; д. м. н., проф. В.А. Меркулов;
к. б. н. А.К. Жанатаев; к. м. н. В.А. Никитина, к. м. н. Е.С. Воронина;
академик РАМН С.Б. Середенин*

Введение

Использование биомаркеров при доклинической оценке токсичности, изучении патогенетических механизмов и механизмов формирования фармакологических эффектов приобретает все большее распространение [1]. Целостность ДНК, регистрируемая методом щелочного гель-электрофореза отдельных клеток (метод ДНК-комет), является одним из наиболее перспективных биомаркеров. Его применение обосновывается современными представлениями о ведущей роли первичных ДНК-повреждений в нарушениях клеточной пролиферации, дифференцировки, гибели клеток и мутагенезе, т.е. процессах, лежащих в основе развития патологий любого генеза, и примерах успешного применения в сфере медико-биологических исследований [2–8].

В настоящих рекомендациях изложены методические основы и особенности проведения исследований по оценке ДНК-повреждений в системах *in vitro* и *in vivo* с использованием метода ДНК-комет (comet-assay).

1. Общие положения

Метод основан на регистрации подвижности в электрическом поле ДНК и/или фрагментов ДНК клеток, заключенных в агарозный гель [9, 10]. Процедура проведения метода включает получение гель-слайдов (подложки), получение микропрепаратов клеток, лизис, щелочную денатурацию, электрофорез, нейтрализацию/фиксацию, окрашивание и микроскопический анализ [9]. Для получения гель-слайдов используют стандартные предметные стекла, которые покрывают 1% агарозным гелем. Исследуемые клетки вносят в агарозный гель и наносят на подготовленные гель-слайды. После затвердевания геля клетки подвергают лизису, в процессе которого происходит диссоциация клеточных структур и выпетливание хроматина в поры агарозы. Препараты подвергаются щелочной денатурации ($\text{pH} > 13$), в результате которой щелочно-лабильные сайты в ДНК реализуются в одностранные разрывы. При электрофорезе под влиянием электрического поля ДНК в виде петель и отдельных фрагментов мигрирует к аноду, формируя электрофоретический след, напоминающий хвост кометы (рис.1), параметры которого зависят от количества разрывов в исследуемой ДНК. После завершения щелочного электрофореза микропрепараты нейтрализуют/фиксируют, окрашивают и микроскопируют под флуоресцентным микроскопом. Измерения могут быть выполнены визуально, непосредственно под микроскопом, либо с сохраненных цифровых изображений. Использование компьютерного анализа цифровых изображений расширяет исследовательские возможности метода. В этом случае могут быть измерены также такие показатели, как общее содержание ДНК в ДНК-комете и процентное содержание в хвосте кометы. Преимуществами метода является высокая чувствительность, дифференцированная оценка ДНК-

повреждений на уровне отдельных клеток, минимальное количество материала для исследования, применимость к любым типам клеток, содержащих ДНК. Метод обладает приемлемой стоимостью и пропускной способностью, но вместе с тем требует высококвалифицированного подхода к проведению [11].

2. Проведение тестов

2.1. Тесты *in vitro*

2.1.1. Клеточные культуры

Для оценки генотоксических свойств соединений *in vitro* методом ДНК-комет в качестве тест-объекта используют традиционно применяемые в генотоксикологических исследованиях клетки первичных и перевиваемых клеточных культур животных и человека: лимфоциты периферической крови и фибробласты человека, гепатоциты грызунов, перевиваемые клетки китайского хомячка (CHL, V79, CHO), клетки мышинной лимфомы L5178Y и др. Среди данных тест-объектов целесообразно использовать лимфоциты периферической крови человека, что обусловлено рядом их преимуществ по сравнению с другими клетками: простота процедуры получения материала; высокая синхронизированность популяций клеток, широкая изученность биологических процессов. Кроме того, лимфоциты периферической крови являются непролиферирующими клетками, что снижает вероятность получения ложноположительных результатов при исследовании соединений, влияющих на синтез ДНК путем нарушения клеточного метаболизма.

2.1.2. Растворители

В качестве растворителя используется деионизированная вода, диметилсульфоксид (ДМСО) или этиловый спирт в конечной концентрации не более 1%. При необходимости допускается использование других растворителей в концентрациях, не вызывающих токсического эффекта. Во всех экспериментах контроля на растворители и растворы исследуемых соединений следует готовить *ex tempore*.

2.1.3. Метаболическая активация

Для метаболической активации используется микросомальная фракция S9 печени крыс, предобработанных АроХлором 1254 или соволом (300 мг/кг, однократно, внутрибрюшинно, за 5 суток до эвтаназии).

2.1.4. Контроли

В качестве негативного контроля используется растворитель, вносимый в эквивалентных объемах. В тестах без метаболической активации в качестве позитивного контроля используют мутагены прямого действия: метилметансульфонат [CAS № 66-27-3], этилнитрозомочевину [CAS № 759-73-9] или 4-нитрохиолин-*N*-оксид [CAS № 56-57-5]. В тестах с метаболической активацией используют непрямые мутагены: бензо[а]пирен [CAS № 50-32-8], диметилбензатрацен [CAS № 57-97-6] или циклофосфамид [CAS № 50-18-0].

2.1.5. Исследуемые концентрации

Исследование начинают с определения цитотоксичности *in vitro*. В качестве максимальной исследуемой концентрации принимается $1/2 LC_{50}$. Если $1/2 LC_{50}$ превышает 10 мМ, то в качестве максимальной концентрации принимается последняя. Две последующие концентрации для исследования составляют $1/10$ и $1/100$ от максимальной. Принимая во внимание возможность увеличения токсичности соединения при его биотрансформации, оценку токсичности проводят параллельно в условиях с метаболической активацией.

2.1.6. Проведение эксперимента

2.1.6.1. Выделение лимфоцитов

Для исследования кровь берут у здоровых доноров в возрасте от 20 до 40 лет, не работающих в сфере химического производства, не контактирующих с источниками ионизирующего излучения, не болевших за последние 3–6 месяцев вирусными заболеваниями и не проходивших за последние 6 месяцев рентгенодиагностическое обследование. Из локтевой вены асептически отбирают около 2 мл крови и переносят в стерильные пробирки, содержащие 200 мкл раствора гепарина (250 МЕ/мл). Возможно также использование коммерчески доступных готовых систем забора крови, содержащих антикоагулянт. Цельную кровь смешивают с равным объемом среды RPMI-1640 (без L-глутамина) и осторожно наслаивают на 3 мл градиентной смеси фиколла Ficoll-Paque (или аналогичную) плотностью 1,077 и центрифугируют при 400 g в течение 40 мин. Образующее на разделе фаз «кольцо» из мононуклеаров аккуратно отбирают пипеткой и дважды отмывают средой RPMI-1640 центрифугированием при 400 g в течение 10 мин. После второй отмывки осадок разводят в среде RPMI-1640 до концентрации клеток $1-5 \times 10^5$ /мл и помещают до использования в холодильник при 4 °С.

2.1.6.2. Оценка токсичности

При оценке токсичности жизнеспособность клеток определяют методом комбинированной окраски этидиум бромидом и акридиновым оранжевым.

Готовится 100 × стоковый раствор красителей. 50 мг этидиум бромид и 15 мг акридинового оранжевого растворяют в 1 мл 95% этилового спирта. Добавляют 40 мл деионизированной воды, хорошо перемешивают, делят на аликвоты по 1 мл, замораживают и хранят при -20 °С.

Готовится рабочий раствор красителей, для чего 10 мкл стокового раствора разводят в 990 мкл ФСБ. Полученный рабочий раствор хранится в течение месяца при 4 °С в защищенном от света месте.

В микроцентрифужные пробирки с 350 мкл среды RPMI-1640 вносят 100 мкл суспензии лимфоцитов и 50 мкл раствора исследуемого соединения соответствующей концентрации и инкубируют в течение 3 ч при 37 °С. Параллельно ставят контроль с растворителем. Аналогично проводят тест с метаболической активацией. Фракцию S9 вносят в реакционную среду в конечной концентрации 2%.

По окончании инкубации 25 мкл суспензии клеток переносят в микроцентрифужные пробирки, добавляют 25 мкл рабочего раствора красителей и инкубируют при 37 °С в течение 5 мин. 25 мкл клеточной суспензии наносят на предметные стекла и накрывают покровным стеклом (25×25 мм). Препараты анализируют на флуоресцентном микроскопе с набором фильтров для FITC. На каждые 100 клеток подсчитывается количество живых (зеленая флуоресценция) и мертвых (оранжевая флуоресценция в ядре) клеток.

2.1.6.3. Процедура тестирования

Тестирование параллельно ведут с использованием микросомальной фракции S9 и без нее, для регистрации действия как прямых мутагенов, так и непрямых, активность которых связана с образованием генотоксичных метаболитов. В каждом эксперименте обязательны одновременно проводимые негативный и позитивный контроли. Для исключения случайностей методического плана и вариантов с резко измененной индивидуальной чувствительностью каждый эксперимент рекомендуется проводить в двух повторностях на лимфоцитах двух разных доноров.

В микроцентрифужные пробирки с 700 мкл среды RPMI-1640 вносят 200 мкл суспензии лимфоцитов и 100 мкл раствора исследуемого соединения соответствующей концентрации и инкубируют в течение 3 ч при 37 °С. Параллельно ставят контроль с растворителем. В исследованиях с метаболической активацией инкубационная смесь содержит

600 мкл среды RPMI-1640, 200 мкл клеточной суспензии, 100 мкл раствора исследуемого соединения и 100 мкл микросомальной фракции S9 в конечной концентрации в среде 2%. Для позитивного контроля в исследованиях без метаболической активации в инкубационную среду вносят метилметансульфонат в конечной концентрации 4 мкг/мл, в исследованиях с метаболической активацией — циклофосфамид в конечной концентрации 20 мкг/мл.

По окончании инкубации реакционная смесь центрифугируется при 1000 g в течение 10 мин. Супернатант удаляют, осадок ресуспендируют в 1 мл среды RPMI-1640. Центрифугирование повторяют, после удаления надосадочной жидкости клетки ресуспендируют 1 мл охлажденного ФСБ [рН 7.5], содержащего 20 мМ EDTA-Na₂ и 10% ДМСО. Клеточные суспензии до получения микропрепаратов (пункт 3.3.) помещают в холодильник (при 4 °С).

2.2. Тесты *in vivo*

2.2.1. Лабораторные животные

Эксперименты предпочтительно проводить 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.

Животных содержат в соответствии с действующими Санитарными правилами по устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев), на стандартной диете, при 12-часовом световом режиме, в условиях свободного доступа к воде и пище. Полученные из питомника животные рандомизированно распределяются в группы по 5–10 особей и до использования в эксперименте проходят карантин и акклиматизацию в течение 10–14 дней.

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.

2.2.2. 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.

2.2.3. 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: метилметансульфонат (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 экс-

позиции, условия содержания до момента эвтаназии и т.д.) с животными негативного контроля и получающих ЛС групп должны быть идентичными.

2.2.4. Способ введения

Способ введения исследуемого соединения должен соответствовать планируемому пути поступления вещества в организм человека. В большинстве случаев используется пероральный способ введения. Оценка генотоксичности может быть проведена при внутрибрюшинном, внутримышечном, подкожном, ингаляционном и наочном способах введения, а также при введении с кормом или питьевой водой. Максимальный одно-временный объем вводимого раствора или соответствующего растворителя зависит от массы тела животного и определяется из расчета не более 20 мл/кг при пероральном и внутрибрюшинном введениях, 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.

2.2.5. Исследуемые дозы

Препарат исследуют в дозах, соответствующих ЭД₅₀, 10 и 100 ЭД₅₀, но не выше 1/2 ЛД₅₀. Если ЭД₅₀ не определено, соединение испытывается в трех дозах при однократном введении: в наивысшей дозе, соответствующей 1/10–1/5 ЛД₅₀, и более низких дозах с десятикратным интервалом между ними. В случае если токсичность исследуемого соединения настолько мала, что дозу ЛД₅₀ невозможно определить по техническим причинам, в качестве максимальной дозы определяется 2000 мг/кг.

2.2.6. Схема эксперимента

Приемлемы схемы экспериментов с однократным и многократным введением исследуемого соединения. Эксперименты проводят при однократном введении исследуемого соединения. Животные подвергаются эвтаназии через 3–6 и 18–24 ч после введения. Более короткая экспозиция (<3 ч) оправдана для нестабильных, быстро абсорбируемых и метаболизируемых соединений, 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 является 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.

2.2.7. Выбор органов и тканей для анализа

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 непрямым генотоксикантов; е) в мочевом пузыре — органе, в котором ксенобиотики и/или их метаболиты задерживаются перед выведением из организма и могут подвергаться биотрансформации.

2.2.8. Выделение клеток

Выделение клеток является одним из ключевых моментов при методе ДНК-комет в экспериментах *in vivo* [9, 11]. Длительные манипуляции при получении суспензии клеток могут приводить к искажению результатов вследствие продолжающихся в клетках процессов, в частности, ДНК-репарации. Исходя из этого, целесообразно использовать методы выделения клеток, требующие минимального времени, но вместе с тем позволяющие получать приемлемой чистоты клеточные суспензии. Не рекомендуется использование методов ферментативной обработки протеазами (трипсин и/или коллагеназа), которые приводят к увеличению спонтанного уровня ДНК-повреждений при выделении клеток, за исключением случаев, когда не применимы иные методы. Ниже приведены рекомендуемые методики получения клеточных суспензий различных органов/тканей.

Методом цервикальной дислокации животное подвергают эвтаназии, вскрывают и по возможности быстро выделяют анализируемые органы/ткани. Кровь отбирают в микропробирки, содержащие 20 мкл 100 мМ раствора EDTA-Na₂. Печень, почки, легкие и головной мозг (150–200 мг ткани) измельчают на льду, переносят в стеклянные пробирки с 3 мл охлажденного до 4 °С ФСБ [рН 7,5], содержащего 20 мМ EDTA-Na₂ и 10% ДМСО, дважды отмывают от клеток крови и интенсивно раздавливают в новой порции буфера. Пробирки выдерживают 5 мин при комнатной температуре для осаждения крупных фрагментов ткани, после чего 1,5 мл верхнего слоя переносят в микроцентрифужные пробирки и центрифугируют при 1000 g в течение 10 мин. Супернатант удаляют, осадок клеток разводят в 1 мл охлажденного буфера. Бедренные кости очищают от мышц, срезают эпифизы и вымывают клетки костного мозга 3 мл (по 1,5 мл на кость) того же буфера. 1,5 мл суспензии клеток переносят в микроцентрифужную пробирку и центрифугируют при 1000 g в течение 10 мин. Супернатант удаляют, осадок клеток разводят в 2 мл охлажденного ФСБ. Органы ЖКТ (пищевод, преджелудок, желудок, тонкая и толстая кишка) выворачивают слизистой оболочкой наружу и тщательно промывают в охлажденном ФСБ. Образцы помещают на лед, аккуратно разрезают вдоль, соскабливают скальпелем слизистую, переносят в пробирку с 1,5 мл буфера и гомогенизируют. Гомогенат центрифугируют при 1000 g 10 мин, супернатант удаляют и осадок ресуспендируют в 1,5 мл ФСБ. Центрифугирование повторяют, после удаления супернатанта осадок ресуспендируют в 500 мкл буфера. Мочевой пузырь вскрывают, промывают в ФСБ, гомогенизируют в 0,5 мл того же буфера, центрифугируют при 1000 g 10 мин, супернатант удаляют и осадок ресуспендируют в 250 мкл буфера. С семенников удаляют оболочку, выделяют семенные каналы и тщательно промывают в 5 мл ФСБ. Буфер удаляют, семенные каналы раздавливают в 3 мл свежего буфера и интенсивно встряхивают. Пробирки выдерживают 5 мин при комнатной температуре для осаждения крупных фрагментов семенных канальцев, после чего верхний слой жидкости переносят в микроцентрифужные пробирки и центрифугируют при 1000 g в течение 10 мин. Супернатант удаляют, осадок клеток разводят в 1 мл охлажденного ФСБ. Клеточные суспензии доводят до конечной концентрации клеток (1–5)×10⁵/мл и до получения микропрепаратов помещают в холодильник (при 4 °С).

2.3. Получение и анализ микропрепаратов

2.3.1. Буферы и растворы

— Лизирующий раствор. Готовится основной лизирующий раствор — 10 мМ Tris-HCl [рН 10], 2,5 М NaCl, 100 мМ EDTA-Na₂. Раствор хранится при комнатной температуре не более месяца. Непосредственно перед экспериментом готовится рабочий лизирующий раствор путем добавления к основному лизирующему раствору Triton X-100 и ДМСО до конечных концентраций 1 и 10% соответственно. Раствор перед использованием охлаждают до 4 °С.

— Раствор для электрофореза. Готовятся основные 10 М раствор NaOH (раствор А) и 200 мМ раствор EDTA-Na₂ (раствор Б). Растворы хранятся при комнатной темпера-

туре не более двух месяцев. Непосредственно в день эксперимента готовится рабочий раствор для электрофореза — 300 мМ NaOH, 1 мМ EDTA-Na₂, (pH>13). Раствор перед применением охлаждают до 4 °С.

- Раствор для фиксации. 70% раствора этилового спирта.
- SYBR Green I (10000× в 50% глицерине).
- TE-буфер. 10 мМ Tris-HCl [pH 7,5], 1 мМ EDTA-Na₂.

2.3.2. Подготовка гель-слайдов

Используются традиционно применяемые в световой микроскопии предметные стекла с шероховатой на ¼ поверхность. Во избежание искажений фона флуоресценции не рекомендуется использование полностью шероховатых стекол. На водяной бане готовят 1 % раствор универсальной агарозы ($T_{пл} < 65$ °С). Прозрачность полученного агарозного геля контролируют на свету. Не рекомендуется использование для плавления агарозы микроволновой печи. На поверхность плитки, нагретой до 65 °С, кладут предметные стекла так, чтобы вся не шероховатая поверхность находилась на поверхности плитки. На плитку также ставят флакон с агарозным гелем. 150 мкл агарозного геля дозатором наносят на край стекла противоположный шероховатому. Наконечником дозатора плашмя растягивают гель по всей не шероховатой поверхности и на 3–5 мм по шероховатой. Обязательно контролируют полное заполнение всей поверхности агарозой. Не допускается образование пузырей. После затвердевания агарозы (1–2 ч) на шероховатой поверхности делается пометка (только грифельным карандашом) для запоминания локализации слоя агарозы. Гель-слайды хранят в сухом темном месте.

2.3.3. Получение микропрепаратов и гель-электрофорез

Проводится подготовка рабочих растворов в соответствии с пунктом 3.3.1. Готовится 1 % раствор легкоплавкой агарозы ($T_{пл} < 42$ °С) в ФСБ. Полученный гель разливают на аликвоты по 240 мкл в микроцентрифужные пробирки, помещенные в микротермостат при 42 °С. На подготовленные предметные стекла с агарозой грифельным карандашом по шероховатой поверхности наносится шифр. Стекла раскладывают на плитке с нагретой до 42 °С поверхностью. В микроцентрифужные пробирки с агарозным гелем вносят 60 мкл клеточной суспензии (аналогично 60 мкл цельной крови) и 2–3 раза прокачивают дозатором. В центральную часть нагретого на плитке предметного стекла наносят 60 мкл полученного агарозного геля с клетками и накрывают покровным стеклом под углом так, чтобы не было пузырей. Предметные стекла кладут на поверхность емкости со льдом и оставляют на 10 мин для затвердевания геля. Аккуратно снимают покровные стекла (тянут за край) и предметные стекла помещают в стеклянную кювету (тип Шиффендеккер).

Далее все манипуляции проводят только в затемненном помещении при свете желтой или зеленой лампы.

В кювету с предметными стеклами заливают предварительно охлажденный до 4 °С лизирующий раствор, накрывают кювету фольгой и помещают в холодильник. Проводят лизис не менее 1 ч. Допускается нахождение препаратов в лизирующем растворе до 24 ч. По окончании лизиса стекла вынимают из раствора, дают стечь жидкости под углом и раскладывают на поверхности камеры для горизонтального электрофореза. Стекла должны лежать точно перпендикулярно краю емкости шероховатым краем в сторону минуса, не шероховатым — плюса. Камеру заполняют раствором для электрофореза на 2–3 мм выше поверхности предметных стекол. Стекла не должны изменить положение при внесении жидкости для электрофореза. Микропрепараты выдерживают 20 мин без включенного аппарата для электрофореза. Проводят электрофорез в течение 20 мин при напряженности поля 1 В/см и силе тока ~300 мА. Параметры электрофореза регулируются добавлением или удалением электрофорезного раствора при включенном аппарате. По окончании электрофореза удаляют из углублений камеры большую часть раствора для электрофореза так, чтобы показались стекла. Пинцетом вытаскивают стекла, дают

стечь жидкости под углом и помещают в стеклянную кювету и заливают раствором для фиксации. Проводят фиксацию в течение 15 мин. Микропрепараты высушивают при комнатной температуре (1–2 ч) и хранят до анализа в сухом темном месте.

2.3.4. Окрашивание и микроскопический анализ

Для окраски микропрепаратов используются флуоресцирующие красители, применяемые для визуализации ДНК — этидийм бромид или пропидийм иодид, 4,6-диамидино-2-дифенилиндол (DAPI), SYBR Green I, YOYO-1 или акридиновый оранжевый. При анализе ДНК-комет с использованием программно-аппартного комплекса рекомендуется использование красителя SYBR Green I, позволяющего получить с микропрепаратов яркие высококонтрастные изображения. Готовят рабочий раствор SYBR Green I. Для этого 1 мкл концентрата красителя разводят в 10 мл охлажденного ТЕ-буфера. Рабочий раствор хранится не более 2 недель при 4°C в защищенном от света месте. 200 мкл рабочего раствора красителя наносят на половину предметного стекла и проводят окраску в течение 20 мин. По окончании окраски остающийся на микропрепаратах краситель не удаляется.

Микропрепараты анализируют на эпифлуоресцентном микроскопе с соответствующими для конкретного красителя фильтрами (при окраске SYBR Green I используются фильтры для FITC) при увеличении $\times 200$ –400. Перед проведением анализа микропрепараты шифруют двойным слепым методом. На каждый микропрепарат рандомизированно анализируют не менее 100 ДНК-комет без наложений хвостов. В анализ не включают апоптотические клетки, выявляемые на микропрепаратах в виде слабофлуоресцирующих ДНК-комет с широким диффузным «хвостом» и практически отсутствующей «головой», так называемые «ежики» (hedgehogs) [11] (рис. 1).

Программно-аппаратный комплекс для анализа ДНК-комет включает совмещенную с микроскопом высокочувствительную ССD-камеру и специализированное программное обеспечение, что позволяет проводить цифровую регистрацию и обработку параметров ДНК-комет [13]. В зависимости от имеющегося программного обеспечения анализ параметров ДНК-комет проводится в режиме «реального времени» либо с сохраненных цифровых изображений. В качестве показателя поврежденности ДНК используют показатели: длина хвоста, процентное содержание ДНК в хвосте (% ДНК в хвосте) или их произведение — момент хвоста (tail moment). Принимая во внимание, что показатель длины хвоста ДНК-комет в значительной степени зависит от экспериментальных условий (плотность агарозы, напряженность электрического поля, температура электрофорезного буфера и т.д.), для повышения воспроизводимости результатов, а также возможности сопоставления данных между исследователями и лабораториями, рекомендуется использовать при оценке ДНК-повреждений показатель % ДНК в хвосте.

При визуальном анализе ДНК-кометы ранжируются на пять условных типов (рис.1) с соответствующим для каждого числовым значением от 0 до 4. 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.

2.4. Оценка результатов

2.4.1. Тесты *in vitro*

Статистическую оценку результатов проводят по каждой экспериментальной точке путем сравнения показателей поврежденности ДНК в получающих ЛС и контрольной группах с использованием непараметрических **критерия Даннета** (% ДНК в хвосте, момент хвоста, длина хвоста) или **критерия Краскела-Уоллиса** (индекс ДНК-комет).

Данные двух повторностей объединяются и определяется среднее, если 95% доверительные интервалы перекрываются. Критериями положительного результата являются статистически достоверное, дозозависимое увеличение показателя поврежденности ДНК или статистически достоверный, воспроизводимый эффект по крайней мере для одной экспериментальной точки. Позитивный результат в данном тесте указывает на то, что исследуемое соединение индуцирует ДНК-повреждения в данном типе клеток в условиях *in vitro*.

2.4.2. Тесты *in vivo*

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). Критерием положительного результата является 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 генотоксического 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 орган- 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 группе получавших ЛС по сравнению с контрольной.

2.5. Отчетность

2.5.1. Тесты *in vitro*

Результаты исследований документируются согласно таблице 1.

Таблица 1

Результаты оценки ДНК-повреждающей активности соединения *in vitro* методом ДНК-комет

Условия эксперимента (вещество, концентрация)	Количество жизнеспособных клеток (%)		Количество проанализированных клеток		Показатель (%ДНК, индекс ДНК-комет и т.д.)		Средний показатель по двум повторам	Уровни значимости
	п1*	п2	п1	п2	п1	п2		
1	2	3	4	5	6	7	8	9

* — повторность

Отчет предоставляется в соответствии со следующим протоколом:

Протокол предоставления результатов оценки ДНК-повреждающей активности соединения *in vitro* методом ДНК-комет

Название эксперимента _____
Тест-объект _____
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) _____
концентрации _____
количество повторностей на концентрацию _____
система метаболической активации _____
проведения методики и анализа микропрепаратов _____
Полученные результаты _____
Публикации (по результатам работы) _____
Список цитированной литературы _____
Заключение по соединению _____
Исполнители _____
Дата сдачи отчета _____

2.5.2. Тесты *in vivo*

Результаты исследований документируются согласно таблице 2.

Таблица 2

Результаты оценки ДНК-повреждающей активности соединения методом ДНК-комет на млекопитающих *in vivo*

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

Отчет предоставляется в соответствии со следующим протоколом:

Протокол предоставления результатов оценки ДНК-повреждающей активности соединения методом ДНК-комет на млекопитающих *in vivo*

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 _____
Условия проведения методики и анализа микропрепаратов _____
Полученные результаты _____
Публикации (по результатам работы) _____
Список цитированной литературы _____
Заключение по соединению _____
Исполнители _____
Дата сдачи отчета _____

2.6. Оценка ДНК-повреждений в клетках периферической крови здоровых доноров и леченых больных

Практика генотоксикологических исследований показывает, что нередко возникают ситуации, когда в отдельных тестах получают неоднозначные, но воспроизводимые результаты. В этих случаях на заключительных этапах КИ проводят оценку уровня хромосомных aberrаций в лимфоцитах периферической крови больных, подвергавшихся лечению ЛП. Метод ДНК-комет может явиться важным дополнительным тестом, поскольку позволяет провести оценку во всех типах клеток крови, являющихся потенциальной мишенью генетических эффектов фармакологического средства. Использование цельной крови исключает длительные манипуляции с исследуемыми клетками, что снижает вероятность артефактного повреждения ДНК *ex vivo* и повышает точность анализа [14].

2.6.1. Процедура тестирования

Взятие крови у каждого больного проводят дважды — до начала лечения препаратом и не позднее 24-х ч после завершения курса лечения. Количество больных в группе составляет 12–15 человек вне зависимости от пола и возраста. Из исследования исключают больных, подвергшихся рентгенодиагностическим процедурам или терапии препаратами, заведомо обладающими ДНК-повреждающими свойствами.

Венозную кровь асептически отбирают в стерильные пробирки, содержащие антикоагулянт. Процедура получения и анализ микропрепаратов ДНК-комет клеток периферической крови человека идентичны описанным выше, за исключением пункта 3.3.3., где цельную кровь вносят в агарозный гель из расчета 40 мкл крови на 500 мкл геля. При необходимости допускается замораживание образцов. Для этого цельную кровь смешивают в соотношении 1:1 со средой RPMI-1640, содержащей 10% ДМСО и 20 мМ EDTA-Na₂, замораживают и хранят в криопробирках при –70 °С не более 2 месяцев. Непосредственно перед получением микропрепаратов образцы размораживают в водяной бане при 37 °С в течение 1–2 мин и проводят эксперимент с пункта 3.3.3. Время с момента взятия крови до получения микропрепаратов или замораживания образцов не должно превышать 3 ч. Во всех случаях временные интервалы должны быть по возможности унифицированы.

2.6.2. Оценка результатов

Статистическую оценку результатов проводят путем сравнения показателей ДНК-повреждений у больных до и после лечения с использованием **критерия Уилкоксона** для разности пар. Позитивный результат указывает на то, что исследуемое фармакологическое средство индуцирует ДНК-повреждения в клетках периферической крови человека.

Дополнительно к основному анализу проводят регистрацию ДНК-комет апоптотических клеток (пункт 3.3.4.) с целью определения потенциальной апоптогенной активности исследуемого препарата. Рекомендуется также провести сравнительную оценку показателей у больных до и после лечения с референсными показателями для здоровых людей [15].

2.6.3. Отчетность

Данные о больных и индивидуальных показателях ДНК-повреждений, определенных до и после лечения, документируются согласно таблице 3.

Таблица 3

Данные о больных и индивидуальных показателях ДНК-повреждений, определенных до и после лечения

№ п/п	Ф.И.О. больного	Диагноз	№ больницы, отделения	Условия взятия крови	Дата взятия крови	№ образца крови	Шифр микропрепарата	Проанализировано клеток	Показатель (%ДНК, индекс ДНК-комет и т.д.)
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
				до лечения					
				после лечения					

Обобщенные результаты исследования приводят согласно таблице 4.

Таблица 4

Обобщенные результаты исследования

Условия	Количество больных	Проанализировано клеток	Средний показатель по группе (%ДНК, индекс ДНК-комет и т.д.)	Уровни значимости
До лечения				
После лечения				

Отчет предоставляется в соответствии со следующим протоколом:

Протокол предоставления результатов оценки методом ДНК-комет ДНК-повреждающей активности лекарственного препарата в клетках крови леченых больных

Дата проведения исследования (начало, окончание, отдельные исследования) _____

Данные о больных (лечебное учреждение, диагноз, длительность заболевания, возраст и т.д.) _____

Лекарственный препарат:

Название _____

Производитель _____
Длительность применения, дозы _____
Условия проведения методики и анализа микропрепаратов _____
Полученные результаты _____
Публикации (по результатам работы) _____
Список цитированной литературы _____
Заключение по препарату _____
Исполнители _____
Дата сдачи отчета _____

Заключение

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. Дурнев А.Д., Середин С.Б. // Мутагены: скрининг и фармакологическая профилактика воз- действий. — М.: Медицина, 1998. — 328 с.
2. Su TT. Cellular responses to DNA damage: one signal, multiple choices // *Annu Rev Genet.* 2006; 40:187–208.
3. Mercer J., Mahmoudi M., Bennett M. DNA damage, p53, apoptosis and vascular disease // *Mutat. Res.* 2007, 621(1-2):75–86.
4. Kulkarni A, Wilson DM. The involvement of DNA-damage and -repair defects in neurological dysfunction // *Am J Hum Genet.*, 2008; 82(3):539–66.
5. de Villartay J.P., Fischer A., Durandy A. The mechanisms of immune diversification and their disorders // *Nature Rev. Immunol.*, 2003; 12:962–72.
6. Применение метода щелочного гель-электрофореза изолированных клеток для оценки гено- токсических свойств природных и синтетических соединений: Методические рекомендации. — М., 2006. — 27 с.
7. 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.
8. Dusinska M., Collins A.R. The comet assay in human biomonitoring: gene-environment interactions // *Mutagenesis*, 2008, Mar.7, pp. 1–15.
9. Collins AR, Oscoz AA, Brunborg G et al. The comet assay: topical issues // *Mutagenesis* 2008, 23(3):143–151.
10. Klaude M., Eriksson S., Nygren J. and Ahnrtrom G. The comet assay: mechanisms and technical considerations. *Mutation Research*, 1996, 363:89–96.
11. Hartmann A. et al. Recommendations for conducting the *in vivo* alkaline comet assay. *Mutagenesis*, 2003, v.18, 1:45–51.
12. Hartmann A. et al. Use of *in vivo* comet assay for mechanistic genotoxicity investigations. *Mutagenesis*, 2004, 19:51–59.
13. Konca K., Lankoff A., Banasik A. A cross-platform public domain PC image-analysis program for the comet assay / *Mutation Research*, 2003, 534(1–2): 15–20.
14. Chuang C.H., Hu M.L. Use of whole blood directly for single-cell gel electrophoresis (comet) assay *in vivo* and white blood cells for *in vitro* assay / *Mutat. Res.* 2004; 564(1): 75–82.
15. Moller P. Assessment of reference values for DNA damage detected by the comet assay in human blood cell DNA / *Mutat. Res.* 2006, 612(2):84–104.

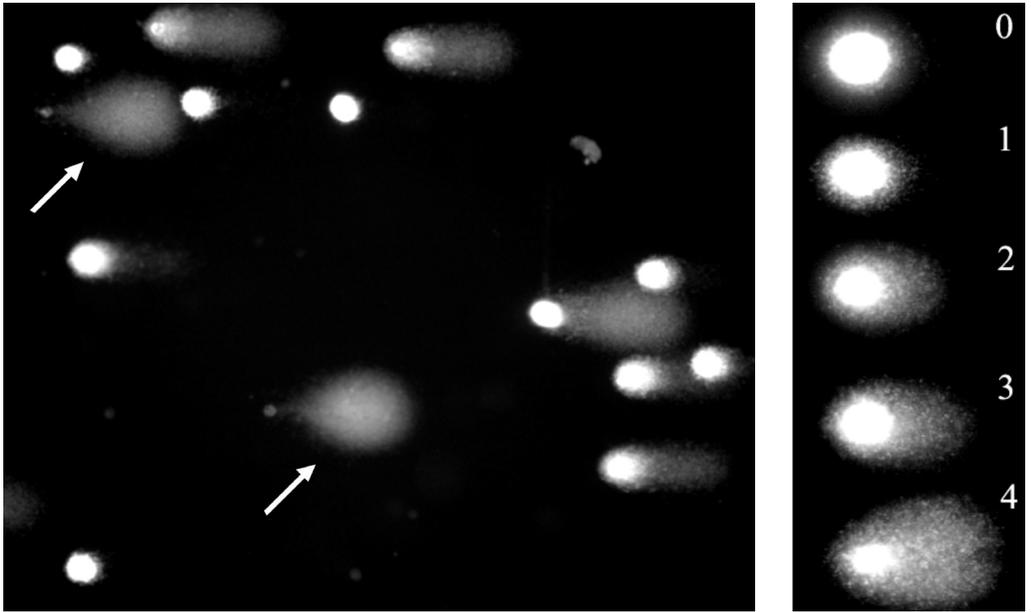


Рис.1. Слева: Цифровое изображение препарата ДНК-комет. Стрелками указаны ДНК-кометы апоптотических клеток. Справа: ДНК-кометы клеток с различной степенью поврежденности ДНК. Указаны числовые значения для каждого типа ДНК-комет, используемые при визуальном анализе микропрепаратов