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

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

ГОСТ 34899—2022

МЕТОДЫ ИСПЫТАНИЙ ПО ВОЗДЕЙСТВИЮ ХИМИЧЕСКОЙ ПРОДУКЦИИ НА ОРГАНИЗМ ЧЕЛОВЕКА

Сенсибилизация кожи *in chemico*. Методы, основанные на ключевых событиях пути неблагоприятного исхода при ковалентном связывании с белками

(OECD 442c:2021, Guidelines for the testing of chemicals — Key event-based test guideline for In Chemico skin sensitisation assays addressing the adverse outcome pathway key event on covalent binding to proteins, MOD)

Издание официальное

Москва
Российский институт стандартизации
2023

Предисловие

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

Сведения о стандарте

1 ПОДГОТОВЛЕН республиканским унитарным предприятием «Белорусский государственный институт метрологии» (БелГИМ) на основе собственного перевода на русский язык англоязычной версии стандарта, указанного в пункте 5

2 ВНЕСЕН Государственным комитетом по стандартизации Республики Беларусь

3 ПРИНЯТ Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации (протокол от 30 сентября 2022 г. № 154-П)

За принятие проголосовали:

Краткое наименование страны по МК (ИСО 3166) 004—97	Код страны по МК (ИСО 3166) 004—97	Сокращенное наименование национального органа по стандартизации
Армения	AM	ЗАО «Национальный орган по стандартизации и метрологии» Республики Армения
Беларусь	BY	Госстандарт Республики Беларусь
Казахстан	KZ	Госстандарт Республики Казахстан
Киргизия	KG	Кыргызстандарт
Россия	RU	Росстандарт
Узбекистан	UZ	Узстандарт

4 Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 16 ноября 2023 г. № 1411-ст межгосударственный стандарт ГОСТ 34899—2022 введен в действие в качестве национального стандарта Российской Федерации с 1 мая 2024 г.

5 Настоящий стандарт является модифицированным по отношению к международному документу OECD 442c:2021 «Руководство по тестированию химической продукции. Сенсибилизация кожи *in chemico*. Методы, направленные на ключевое событие пути неблагоприятного исхода при ковалентном связывании с белками» («OECD Guidelines for the testing of chemicals — Key event-based test guideline for *in chemico* skin sensitisation assays addressing the adverse outcome pathway key event on covalent binding to proteins, MOD) путем изменения его структуры для приведения в соответствие с правилами, установленными в ГОСТ 1.5 (подразделы 4.2 и 4.3).

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

Международный документ разработан Международной организацией экономического сотрудничества и развития (OECD).

Сопоставление структуры настоящего стандарта со структурой указанного международного документа приведено в дополнительном приложении ДА

6 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

Информация о введении в действие (прекращении действия) настоящего стандарта и изменений к нему на территории указанных выше государств публикуется в указателях национальных стандартов, издаваемых в этих государствах, а также в сети Интернет на сайтах соответствующих национальных органов по стандартизации.

В случае пересмотра, изменения или отмены настоящего стандарта соответствующая информация будет опубликована на официальном интернет-сайте Межгосударственного совета по стандартизации, метрологии и сертификации в каталоге «Межгосударственные стандарты»

© Оформление. ФГБУ «Институт стандартизации», 2023

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

Содержание

1 Область применения 1
2 Термины, определения и сокращения 1
3 Методы 4
Приложение А (обязательное) Известные ограничения, связанные с применением метода кинетического прямого анализа реакционной способности пептидов 34
Приложение В (обязательное) Вещества, рекомендованные к использованию для проверки квалификации. Сенсибилизация кожи *in chemico*. Прямой анализ реакционной способности в отношении пептидов. 36
Приложение С (обязательное) Примеры последовательности анализа 38
Приложение D (обязательное) Известные ограничения, связанные с применением метода анализа реакционной способности в отношении производных аминокислот 39
Приложение Е (обязательное) Вещества, рекомендованные к использованию для проверки квалификации. Сенсибилизация кожи *in chemico*. Анализ реакционной способности в отношении производных аминокислот (ADRA) 42
Приложение F (обязательное) Примерная последовательность выполнения анализа методом ВЭЖХ 44
Приложение G (обязательное) Известные ограничения, связанные с применением метода кинетического прямого анализа реакционной способности пептидов 46
Приложение Н (обязательное) Вещества, рекомендованные к использованию для проверки квалификации. Сенсибилизация кожи *in chemico*. Кинетический прямой анализ реакционной способности пептидов (kDPRA) 49
Приложение ДА (справочное) Сопоставление структуры настоящего стандарта со структурой международного документа 51
Библиография 56

Введение

Руководство по проведению испытаний на основе ключевых событий при ковалентном связывании с белками

Под веществом, способным вызывать сенсибилизацию кожи, в соответствии с положениями Согласованной на Глобальном уровне Системы классификации и маркировки химической продукции Организации Объединенных Наций (СГС ООН) [1], принято понимать вещество, воздействие которого при его повторном контакте с кожей может приводить к развитию аллергической реакции. Существует соглашение относительно ключевых биологических событий, лежащих в основе появления сенсибилизации кожи. Совокупность имеющихся знаний о химических и биологических процессах, связанных с сенсибилизацией кожи, в обобщенном виде представлена как описание соответствующего пути неблагоприятного исхода (Adverse Outcome Pathway — AOP) [2], начинающегося с исходного молекулярного события, включающего ряд промежуточных событий, и заканчивающегося неблагоприятным исходом, а именно появлением признаков аллергического контактного дерматита. Данный AOP фокусирует внимание на такой химической продукции, которая реагирует с аминокислотными остатками (т. е. цистеином или лизином), например органической. В данном случае в роли исходного молекулярного события (т. е. первого ключевого события) выступает реакция ковалентного связывания электрофильных веществ с нуклеофильными центрами белков кожи. Второе ключевое событие в данном AOP развивается в кератиноцитах и включает как воспалительный ответ, так и изменения в экспрессии генов, связанных со специфическими путями передачи сигналов клеток, такими как пути, зависящие от элемента антиоксидантного/электрофильного ответа (antioxidant/electrophile response element — ARE). Третьим ключевым событием является активация дендритных клеток, и обычно она оценивается по экспрессии специфических поверхностных клеточных маркеров, хемокинов и цитокинов. Четвертое ключевое событие — это пролиферация Т-клеток.

Оценивание сенсибилизации кожи обычно проводится с использованием лабораторных животных. Классические методы исследований с использованием подопытных морских свинок, максимизационная сенсибилизирующая проба на морских свинках (Guinea Pig Maximisation Test — GPMT) Магнуссона и Клигмана либо тест Бюлера [11] позволяют оценить как фазу индукции, так и контрольную фазу исследования сенсибилизации кожи. Методы исследований с использованием мышей, такие как LLNA [12] и три его модификации, для которых не требуется применение радиоактивных веществ — LLNA:DA [13], LLNA:BrdU-ELISA и BrdU-FCM [14], оценивают только индукционный ответ и поэтому заслужили признание по сравнению с испытаниями на морских свинках с точки зрения меньшего нанесения вреда животным в сочетании с возможностью получения объективных данных измерений, иллюстрирующих течение фазы индукции для сенсибилизации кожи.

Методы исследований *in chemico* и *in vitro*, основанные на механизмах, касающихся первых трех ключевых событий AOP для сенсибилизации кожи, были приняты с целью содействия оценке потенциала опасности химической продукции для сенсибилизации кожи: настоящий метод исследования обеспечивает получение требуемой оценки исходя из данных о ковалентном связывании с белками, что соответствует первому ключевому событию; в центре внимания [15] находится процесс активации кератиноцитов [15], т. е. второе ключевое событие, а [16] в свою очередь рассказывает об активации дендритных клеток [16], третьем ключевом событии AOP для сенсибилизации кожи. Четвертое ключевое событие заключается в пролиферации Т-клеток, оценивается косвенным образом — по методу изучения реакции регионарных лимфатических узлов (Local Lymph Node Assay — LLNA), с использованием подопытных мышей [12].

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

МЕТОДЫ ИСПЫТАНИЙ ПО ВОЗДЕЙСТВИЮ ХИМИЧЕСКОЙ ПРОДУКЦИИ НА ОРГАНИЗМ ЧЕЛОВЕКА

Сенсибилизация кожи *in chemico*.
Методы, основанные на ключевых событиях пути неблагоприятного исхода при ковалентном связывании с белками

Methods for studying the effects of chemicals on the human body *In Chemico* Skin Sensitisation. Methods based on key events in the pathway of adverse outcomes in covalent binding to proteins

Дата введения — 2024—05—01

1 Область применения

Настоящий стандарт устанавливает методы испытаний *in chemico*, направленные на изучение механизмов, действием которых обусловлено первое ключевое событие AOP для кожной сенсибилизации, а именно ковалентное связывание с белками [2].

2 Термины, определения и сокращения

В настоящем стандарте применены следующие термины с соответствующими определениями:

2.1 **вещество** (substance): Химические элементы и их соединения, представленные в естественном состоянии или полученные при выполнении производственного процесса, включая любые добавки, необходимые для сохранения стабильности продукта, а также любые примеси, наличие которых обусловлено применяемым процессом, но исключая любые растворители, удаление которых не сказывается на стабильности вещества или на его составе [25].

2.2 **воспроизводимость** (reproducibility): Согласованность результатов, получаемых при повторном испытании одного и того же вещества с применением одного и того же протокола (см. «Надежность») [24].

2.3 **вычисления** (calculating)

Вычисление деплеции (обеднения) NAC или NAL

Деплецию (обеднение) вычисляют следующим образом:

$$\text{Процент деплеции (обеднения) NAC или NAL соответственно} = \left[1 - \left[\frac{\text{Значение площади пика NAC или NAL в инжектированной дозе параллельно обрабатываемой пробы}}{\text{Среднее значение площади пика NAC или NAL в стандартной контрольной пробе C}}\right]\right] \times 100$$

Вычисление достоверности прогнозирования

Значения чувствительности, специфичности и точности метода вычисляют исходя из имеющегося количества истинноположительных (true positive — TP), истинноотрицательных (true negative — TN), ложноотрицательных (false negative — FN) и ложноположительных (false positive — FP) результатов.

$$\text{Чувствительность} = \frac{\text{Количество истинноположительных результатов (TP)}}{\text{Общее количество исследуемой химической продукции, которое должно давать положительный отзыв (TP + FN)}},$$

Издание официальное

$$\text{Специфичность} = \frac{\text{Количество истинноотрицательных результатов (TN)}}{\text{Общее количество исследуемой химической продукции, которое должно давать отрицательный отзыв (TN+FP)}}$$

$$\text{Точность} = \frac{\text{Количество достоверных прогнозных заключений (TN+TP)}}{\text{Общее количество исследуемой химической продукции (TN+TP+FN+FP)}}.$$

2.4 **градуировочная кривая** (calibration curve): Отношение между экспериментальным значением отклика и аналитической концентрацией (также называемой стандартной кривой) известного вещества.

2.5 **достоверный метод исследования** (valid test method): Метод исследования, признаваемый в достаточной степени релевантным и надежным для применения в конкретной области и базирующийся на научно обоснованных принципах. Ни один метод исследования не является достоверным в абсолютном смысле и может рассматриваться как таковой только для ограниченной области применения [24].

2.6 **интегрированный подход к испытаниям и оценке;** IATA (Integrated Approach on Testing and Assessment): Структурированный подход, служащий для определения степени опасности (потенциала), описания характера опасности (способности) и/или оценивания безопасности (в зависимости от потенциала/способности и экспозиции) химической продукции или групп химической продукции, который заключается в стратегическом интегрировании и взвешивании всех значимых данных для обобщения информации с целью принятия решения нормативного характера о потенциальной опасности, рисках и необходимости проведения дальнейших целенаправленных и, соответственно, минимально достаточных по объему испытаний.

2.7 **исследуемая химическая продукция** (test chemical): Химическая продукция (вещества или смеси), которая подвергается испытаниям.

2.8 **исходное молекулярное событие** (molecular initiating event): Вызванное воздействием химического вещества нарушение в биологической системе, наблюдаемое на молекулярном уровне и определяемое как исходное событие в пути неблагоприятного исхода.

2.9 **контрольная проба** (reference control): Ничем не обработанная проба, включающая в себя все составляющие испытательной системы, содержащая растворитель или вещество-носитель и используемая наряду с пробами, содержащими исследуемое химическое вещество, и другими контрольными пробами для определения базового отклика для образцов, обработанных исследуемым химическим веществом, разведенным в том же растворителе или веществе-носителе. При параллельном использовании с отрицательной контрольной пробой также позволяет выяснить, взаимодействует ли растворитель или вещество-носитель с испытательной системой.

2.10 **коэффициент вариации** (coefficient of variation): Мера изменчивости, рассчитываемая для группы данных, характеризующих параллельно обрабатываемые пробы, путем деления значения стандартного отклонения на среднее значение. Значение данного коэффициента может быть выражено в процентах при умножении на 100.

2.11 **многокомпонентное вещество** (multi-constituent substance): Вещество, характеризуемое количественным составом, в котором две или более основные структурные составляющие содержатся в количестве ≥10 % (по массе), но <80 % (по массе). Образование многокомпонентного вещества происходит в процессе производства. Различие между смесью и многокомпонентным веществом состоит в том, что смесь образуется путем соединения двух или более веществ при отсутствии химической реакции. Многокомпонентное вещество, напротив, образуется в результате химической реакции.

2.12 **надежность** (reliability): Показатель того, что метод испытаний может быть реализован с получением воспроизводимых результатов в рамках одной или различных лабораторий в течение продолжительного времени при применении одного и того же протокола. Он оценивается путем вычисления внутри- и межлабораторной воспроизводимости и внутрилабораторной повторяемости [24].

2.13 **однокомпонентное вещество** (mono-constituent substance): Вещество, характеризуемое количественным составом, в котором одна основная структурная составляющая содержится в количестве не менее чем 80 % (по массе).

2.14 **опасность** (hazard): Изначально присущее свойство конкретной химической продукции или ситуации, заключающееся в их потенциальной способности вызывать деструктивные последствия в случаях, когда организм, система или субпопуляция подвергаются их воздействию.

2.15 **положительная контрольная проба** (positive control): Используемая параллельно проба, содержащая все компоненты испытательной системы и обрабатываемая с использованием вещества,

заведомо дающего положительный отклик. Чтобы обеспечить возможность учитывать изменчивость во времени ответа, получаемого для данной пробы, этот положительный отклик не должен быть слишком завышенным.

2.16 **прегаптены** (pre-haptens): Химическая продукция, приобретающая сенсибилизирующие свойства в результате абиотической трансформации.

2.17 **пригодность системы** (system suitability): Заключение о рабочих характеристиках прибора (например, чувствительности) по результатам анализа стандартного раствора, выполняемого до начала испытания аналитической партии [26].

2.18 **прогаптены** (pro-haptens): Химическая продукция, требующая ферментной активации для реализации своего сенсибилизирующего потенциала при воздействии на кожу.

2.19 **путь неблагоприятного исхода** (Adverse Outcome Pathway — AOP): последовательность событий, начиная с особенностей химической структуры, характерных для целевого химического вещества или группы однотипных химических веществ, включая исходное молекулярное событие и заканчивая неблагоприятным исходом, который можно наблюдать *in vivo* [2].

2.20 **релевантность** (relevance): Характеристика соответствия метода испытаний результату, полученному при исследованиях, а также его обоснованности и пригодности для определенных целей применения. Данная характеристика указывает пределы, в которых метод испытаний позволяет правильно измерить или спрогнозировать исследуемый биологический эффект. Релевантность включает рассмотрение точности (соответствия) метода испытаний [24].

2.21 **смесь** (mixture): Смесь или раствор, состоящие из двух или более веществ, в которых они не вступают в реакцию друг с другом [25].

2.22 **Согласованная на Глобальном уровне Система классификации и маркировки химической продукции (ООН);** СГС (Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (UN); GHS): Система, предусматривающая классификацию химической продукции (веществ и смесей) в зависимости от характерных видов и уровней физической опасности, опасности для здоровья человека или опасности для окружающей среды, с применением соответствующих средств информирования, таких как пиктограммы, сигнальные слова, краткая характеристика опасности, меры по предупреждению опасности и паспорта безопасности, чтобы обеспечить информацией о ее негативном воздействии с целью защиты людей (в том числе сотрудников, работников, перевозчиков, потребителей и представителей аварийных служб) и окружающей среды [25].

2.23 **специфичность** (specificity): Доля всей дающей отрицательный результат/неактивной химической продукции, которая была правильно классифицирована с применением соответствующего метода испытаний. Этот показатель является мерой точности для метода испытаний, позволяющего получать однозначные результаты, и служит важной отправной точкой при оценке релевантности такого метода [24]. Формула, применяемая для определения специфичности, приведена в 2.18 (см. «Расчет достоверности прогнозирования»).

2.24 **точность** (accuracy): Близость результата испытаний, полученного с применением соответствующего метода испытаний, к принятому эталонному значению величины. Точность является показателем результативности метода и одним из аспектов релевантности. Данный термин часто применяется как взаимозаменяемый для термина «согласованность» (concordance) для указания доли корректных результатов, полученных с применением соответствующего метода испытаний [23]. Формула, применяемая для определения точности, приведена в 2.18 (см. «Расчет достоверности прогнозирования»).

2.25 **установленный подход** (Defined Approach — DA): Фиксированный порядок интерпретации данных (например, статистических, математических моделей), применяемый к данным (например, предварительным прогнозам *in silico*, данным *in chemico* или *in vitro*), которые были получены с использованием определенного перечня источников информации с целью прогнозирования.

2.26 **чувствительность** (sensitivity): Доля всей дающей положительный результат/активной химической продукции, которая была правильно классифицирована с применением соответствующего метода испытаний. Этот показатель является мерой точности для методов испытаний, позволяющих получать однозначные результаты, и служит важной отправной точкой при оценке релевантности таких методов [24]. Формула, применяемая для определения чувствительности, приведена в 2.18 (см. «Расчет достоверности прогнозирования»).

2.27 **ЭДТА** (EDTA): Этилендиаминтетрауксусная кислота.

2.28 **ADRA** (Amino acid Derivative Reactivity Assay): Анализ реакционной способности производных аминокислот.

2.29 **DPRA** (Direct Peptide Reactivity Assay): Прямой анализ реакционной способности пептидов.

2.30 **kDPRA** (kinetic Direct Peptide Reactivity Assay): Кинетический прямой анализ реакционной способности пептидов.

2.31 k_{max}: Максимальное значение константы скорости реакции (в $с^{-1}М^{-1}$), определяемое на основе кинетических параметров реакции с участием исследуемого вещества при применении метода kDPRA (см. 3.4.4.1.5).

2.32 **EURL ECVAM** (European Union Reference Laboratory for Alternatives to Animal Testing): Референтная лаборатория Европейского союза по альтернативным методам испытаний на подопытных животных.

2.33 **JaCVAM**: Японский центр по валидации альтернативных методов.

2.34 **LLNA**: Метод изучения реакции региональных лимфатических узлов у подопытных мышей; описание метода опубликовано в [12].

2.35 **NAC**: N-(2-(1-нафтил)ацетил)-L-цистеин [6], [7], [8].

2.36 **NAL**: α-N-(2-(1-нафтил)ацетил)-L-лизин [6], [7], [8].

2.37 **TFA** (Trifluoroacetic acid): Трифторуксусная кислота.

2.38 **UVCB** (substances of unknown or variable composition, complex reaction products or biological materials): Вещества неизвестного или переменного состава, продукты комплексных реакций или вещества биологического происхождения.

3 Методы

3.1 Обоснование и принципы методов испытаний, представленных в настоящем стандарте по проведению испытаний на основе ключевых событий

3.1.1 В настоящее время к таким методам относятся:

- метод прямого анализа реакционной способности пептидов (Direct Peptide Reactivity Assay — DPRA) (3.2);
- метод анализа реакционной способности производных аминокислот (Amino acid Derivative Reactivity Assay — ADRA) (3.3);
- метод кинетического прямого анализа реакционной способности пептидов (kinetic Direct Peptide Reactivity Assay — kDPRA) (3.4).

3.1.2 Перечисленные методы *in chemico* основаны на использовании реакции ковалентного связывания с белками и считаются научно обоснованными. Метод DPRA прошел оценку в референтной лаборатории Европейского союза по альтернативным методам испытаний на подопытных животных (European Union Reference Laboratory for Alternatives to Animal Testing — EURL ECVAM) и дальнейшую независимую экспертную оценку в Научно-консультативном комитете EURL ECVAM (ESAC) [3—5]. Для метода ADRA аналогичным образом было проведено валидационное исследование [6—9] с последующим вынесением независимой экспертной оценки [10], координатором которого выступил Японский центр по валидации альтернативных методов (Japanese Center for the Validation of Alternative Methods — JaCVAM). Метод kDPRA был подвергнут валидационному исследованию и представлен к независимой экспертной оценке при участии в качестве координаторов соответствующих заинтересованных предприятий промышленности [17].

3.1.3 Методы исследований, включенные в настоящий стандарт, могут различаться в части содержания процедур, используемых для получения необходимой информации, однако применение любого из них обеспечивает выполнение установленных на национальном уровне требований к результатам испытаний химических веществ на их способность реагировать с белками, чему в значительной степени способствует соблюдение принципа взаимного признания данных.

3.1.4 Корреляция реактивности белка с потенциалом сенсибилизации кожи хорошо известна. [18—20]. Тем не менее, исходя из того, что реакции с белками представляют собой лишь одно из ключевых событий АОР для сенсибилизации кожи [2], [21], сведения, получаемые с помощью методов исследований, разработанных специально для наблюдения за данным ключевым событием, могут оказаться недостаточными в случае их самостоятельного применения для подготовки заключения о наличии или отсутствии у этих веществ способности оказывать сенсибилизирующее воздействие на кожу. Поэтому данные, полученные с помощью методов испытаний, описанных в настоящем стандарте, предлагается рассматривать в рамках Интегрированного подхода к испытаниям и оценке (IATA) вместе с прочей соответствующей дополнительной информацией, полученной в результате применения методов испытаний *in vitro*, характеризующей иные ключевые события АОР для сенсибилизации кожи, а также инфор-

мацией, полученной с применением методов, не предусматривающих непосредственного проведения испытаний, таких как компьютерное моделирование *in silico* или сопоставление по методу аналогий с химической продукцией, обладающей схожими химическими свойствами [21]. Опубликованы примеры использования данных, полученных с применением этих методов в рамках так называемых установленных подходов (Defined Approach — DA), т. е. подходов, стандартизированных как с точки зрения набора используемых источников информации, так и с точки зрения порядка формирования прогнозного заключения [21], которые также могут быть востребованы при выполнении работ в рамках IATA.

3.1.5 Методы исследований DPRA и ADRA, описанные в 3.2 и 3.3, обеспечивают возможность классификации химической продукции, способной (класс опасности 1 согласно СГС ООН) и не способной вызывать сенсибилизацию кожи. При условии, что это не противоречит требованиям действующего законодательства, положительные результаты, полученные с помощью этих методов, могут сами по себе рассматриваться как достаточное основание для отнесения химической продукции к классу опасности 1. В то же время указанные методы не подлежат самостоятельному применению для целей классификации сенсибилизирующей химической продукции в соответствии с подклассами опасности 1А и 1В [22], как предусмотрено СГС ООН [1] для нужд официальных органов, контролирующих эти два необязательных подкласса опасности, а также не могут применяться для целей прогнозирования способности исследуемой химической продукции вызывать сенсибилизацию кожи в процессе принятия решений по оценке необходимых мер безопасности при обращении с этой продукцией.

3.1.6 В свою очередь, метод kDPRA, описанный в 3.4, позволяет достоверно квалифицировать химическую продукцию, способную вызвать сенсибилизацию кожи и подлежащую отнесению к подклассу опасности 1А согласно СГС ООН, и химическую продукцию, не подлежащую отнесению к данному подклассу опасности (т. е. вне подкласса опасности 1А), а именно такую, которая должна классифицироваться как принадлежащая к подклассу опасности 1В или не имеющая класс опасности [1], но при этом не может применяться для целей определения сенсибилизирующей (класс опасности 1) и несенсибилизирующей химической продукции. При условии, что это не противоречит требованиям действующего законодательства, положительные результаты, полученные с помощью метода kDPRA, могут сами по себе рассматриваться как достаточное основание для отнесения химической продукции к подклассу опасности 1А согласно СГС ООН.

3.1.7 Определения соответствующих терминов даны в разделе 2. Разработаны соответствующие стандарты результативности для оценивания предлагаемых идентичных или модифицированных методов исследований для определения сенсибилизации кожи *in vitro*, в основе которых лежат DPRA и ADRA [23].

3.2 Сенсибилизация кожи *in chemico*. Прямой анализ реакционной способности в отношении пептидов (DPRA)

3.2.1 Исходные положения, пригодность и ограничения

3.2.1.1 Метод DPRA предназначен для определения исходного молекулярного события AOP для сенсибилизации кожи, а именно реакций с белками, путем количественной оценки реакционной способности исследуемой химической продукции по отношению к модельным синтетическим пептидам, в состав которых входит лизин либо цистеин [27]. В основу метода положен анализ значений показателей деплеции (обеднения) производных цистеина и лизина с целью последующего отнесения исследуемой химической продукции к продукции, способной и не способной вызывать сенсибилизацию кожи [28].

3.2.1.2 Метод DPRA обладает доказанной пригодностью для применения на базе лабораторий, которые уже имеют достаточный опыт проведения аналитических испытаний с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Воспроизводимость прогнозных заключений для данного метода составляет порядка 85 % при подготовке их в пределах одной лаборатории и 80 % при подготовке заключений различными лабораториями [5]. Результаты, полученные в ходе соответствующего валидационного исследования [29], а также опубликованные данные других исследований [30] в целом указывают, что точность различия сенсибилизирующих (т. е. относящихся к классу опасности 1 согласно СГС ООН) и несенсибилизирующих агентов с помощью метода DPRA составляет 80 % (88/109), а специфичность — 77 % (37/48) при сравнении их с аналогичными показателями для метода LLNA. Применение метода DPRA с большей вероятностью может приводить к занижению оценки опасности для химической продукции, обладающей низкой или умеренной способностью вызывать сенсибилизацию кожи (т. е. относящейся к подклассу опасности 1В согласно СГС ООН), чем для химической продукции, обладающей высокой способностью вызывать сенсибилизацию кожи (т. е. относящейся к подклассу опасности 1А согласно СГС ООН) [29], [30]. Показатели точности, приведенные выше для

DPRA как для самостоятельного метода испытания, являются ориентировочными, поскольку любые результаты, полученные с его помощью, следует рассматривать в сочетании с информацией из других источников в контексте IATA или DA и с учетом 3.1.4 и 3.1.5. При оценке эффективности применения методов определения сенсибилизации кожи, не требующих использования подопытных животных, следует иметь в виду, что применение метода LLNA, а также других методов, которые предполагают проведение испытаний на животных, может не в полной мере раскрывать характер воздействия исследуемой химической продукции на организм целевого биологического вида, представляющего основной интерес для исследователей, т. е. на организм человека. Исходя из имеющихся данных, установлено, что метод DPRA подходит для проведения исследований широкого спектра химической продукции, которая может характеризоваться наличием различных органических функциональных групп, механизмов реакций, различных сенсибилизирующих потенциалов при воздействии на кожу (подтвержденных путем проведения испытаний *in vivo*), а также различными физико-химическими свойствами [27], [28], [5], [30]. В совокупности эта информация указывает на пригодность DPRA к применению в качестве вспомогательного средства для выявления опасностей, связанных с развитием сенсибилизации кожи.

3.2.1.3 Под «исследуемой химической продукцией» для целей настоящего стандарта понимается продукция, которая подвергается испытаниям[1)], использование данного термина не связано с возможностью применения метода DPRA для испытания веществ и/или смесей (см. краткое описание известных ограничений для метода DPRA в приложении А). Данный метод неприменим для испытаний соединений металлов, так как известно, что реакции последних с белками протекают в соответствии с механизмами, отличными от ковалентного связывания. Исследуемая химическая продукция должна обладать растворимостью в выбранном растворителе при конечном значении концентрации, соответствующем 100 мМ (см. 3.2.3.2). Если испытываемая химическая продукция не может быть полностью растворена при указанном значении концентрации, это не исключает возможности проведения испытания с более низкими значениями концентрации, обеспечивающими ее надлежащее растворение. В подобных случаях положительный результат эксперимента все еще может рассматриваться как доказательство способности исследуемой химической продукции вызывать сенсибилизацию кожи, тогда как получение отрицательного результата, напротив, не позволяет с уверенностью судить об отсутствии у химической продукции сенсибилизирующих свойств. Количество доступной информации о возможности применения метода DPRA для анализа смесей веществ с известным составом в настоящее время ограничено [29], [30]. Несмотря на это, метод DPRA считается технически применимым для проведения исследований многокомпонентных веществ и смесей, состав которых заведомо известен (см. 3.2.1.4 и 3.2.3.2). При изучении целесообразности проведения исследований определенных смесей, трудно поддающейся анализу химической продукции (например, не обладающей достаточной стабильностью) либо химической продукции, не относящейся к области применения, описанной в настоящем разделе стандарта, по проведению испытаний, или область применения которой не может быть однозначно установлена, следует заранее оценить возможность получения научно обоснованного результата такого исследования. Текущая модель построения прогнозов не может быть использована при выполнении анализа сложных смесей веществ неизвестного состава, а также иных веществ неизвестного или переменного состава, продуктов комплексных реакций или биологических материалов (т. е. веществ UVCB) ввиду необходимости соблюдения определенного молярного соотношения между заданным пептидом и исследуемой химической продукцией. Для этих целей необходимо разработать новую модель построения прогнозов, в основу которой должен быть положен гравиметрический подход. При наличии доказательств, свидетельствующих о неприменимости метода для испытаний конкретных категорий химической продукции, его применять не следует.

3.2.1.4 Метод исследования, описанный в настоящем разделе стандарта, представляет собой метод *in chemico*, не учитывающий взаимодействие испытываемого вещества с метаболической системой. Он не позволяет определять химическую продукцию, для раскрытия сенсибилизирующего потенциала которой при воздействии на кожу требуется ее предварительная биологическая активация ферментами (т. е. прогаптенами). При этом химическая продукция, которая проявляет свои сенсибилизирующие свойства после абиотической трансформации (т. е. прегаптены), согласно имеющимся свидетельствам в большинстве случаев правильно определяется с помощью данного метода [29], [34], [35]. Таким образом, любые отрицательные результаты, полученные с его применением, следует рассматривать

[1)] В июне 2013 г. решением Совместного заседания было установлено, что по возможности в новых и актуализированных текстах Руководств по проведению испытаний должно обеспечиваться более последовательное использование термина «исследуемая химическая продукция» для обозначения объекта проводимого испытания.

с учетом указанных ограничений и в сочетании с информацией из других источников в контексте соответствующего IATA или DA. Проведение испытаний химической продукции, не образующей ковалентных связей с пептидами, но способствующей их окислению (т. е. димеризации цистеина), может приводить к получению завышенной оценки деплеции (обеднения) пептидов, а следовательно, к выдаче ложноположительных прогнозных заключений и/или отнесению испытуемой химической продукции к более высокому классу по реакционной способности, чем тот, к которому они принадлежат в действительности (см. 3.2.4.5 и 3.2.4.6).

3.2.1.5 Как отмечалось ранее, метод DPRA позволяет различать химическую продукцию, способную и не способную вызывать сенсибилизацию кожи. Также он может быть полезен для оценки сенсибилизирующей способности веществ [31], [36] при условии применения его в рамках комплексных исследовательских подходов, таких как IATA или DA [37]. Требуется проведение дальнейших работ, предпочтительно с использованием данных, полученных на человеке, чтобы определить, как по результатам проведения исследований методом DPRA можно дать оценку сенсибилизирующей способности.

3.2.2 Сущность метода испытания

3.2.2.1 DPRA — это метод испытания *in chemico*, предназначенный для определения остаточной концентрации цистеин- или лизинсодержащих пептидов после инкубирования их в течение 24 ч с исследуемой химической продукцией при температуре от 22,5 °С до 30 °С. Синтетические пептиды содержат фенилаланин, что облегчает процесс обнаружения. Относительную концентрацию пептидов измеряют методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с градиентным элюированием и УФ-детектированием на длине волны 220 нм. На следующем этапе рассчитывают процентные значения показателей деплеции (обеднения) пептидов для цистеина и лизина с дальнейшей подстановкой их в модель построения прогнозов (см. 3.2.4.5), которая позволяет отнести исследуемую химическую продукцию к одному из четырех классов по реакционной способности, обеспечивающих различие между сенсибилизирующими и несенсибилизирующими веществами.

3.2.2.2 До того как приступить к регулярному применению метода испытаний, описанного в настоящем разделе, лаборатории должны подтвердить свою техническую компетентность, выполнив анализ специально отобранных для этой цели веществ, перечисленных в приложении В.

3.2.3 Методика испытаний

В основу рассматриваемого метода положен протокол DPRA DB-ALM [32], соответствующий протоколу, ранее принятому для проведения валидационного исследования, в роли координатора которого выступала EURL ECVAM. Этот протокол рекомендован для повсеместного использования при внедрении и применении данного метода в лабораторной практике. Сведения об основных составляющих и процедурах метода DPRA представлены ниже. В случае использования альтернативной конфигурации оборудования для ВЭЖХ должна быть подтверждена эквивалентность ее рабочих характеристик характеристикам оборудования, использовавшегося при проведении валидационного исследования и описанного в протоколе DB-ALM (например, путем выполнения анализа веществ согласно списку для проверки квалификации, приведенному в приложении В).

3.2.3.1 Приготовление цистеин- или лизинсодержащих пептидов

Исходные растворы цистеина (Ac-RFAACAA-COOH) и лизина (Ac-RFAAKAA-COOH), содержащие синтетические пептиды, степень чистоты которых должна составлять не менее 85 %, а предпочтительно — более 90 %, должны быть свежеприготовленными непосредственно перед началом инкубирования пептидов с исследуемой химической продукцией. Конечная концентрация цистеин-содержащего пептида должна составлять 0,667 мМ в фосфатном буферном растворе с pH 7,5, а лизинсодержащего пептида — 0,667 мМ в аммонийно-ацетатном буферном растворе с pH 10,2 соответственно. Последовательность выполнения анализа посредством ВЭЖХ должна быть спланирована таким образом, чтобы общее время анализа не превышало 30 часов. Для системы ВЭЖХ, использовавшейся в ходе проведения валидационного исследования, и описанного в настоящем методе исследования в рамках одного цикла ВЭЖХ могут быть параллельно исследованы до 26 аналитических проб (включая пробу исследуемой химической продукции, положительную контрольную пробу и необходимое число контрольных проб растворителя, в зависимости от общего числа различных видов растворителей, задействованных в испытаниях, в количестве трех экземпляров каждая). Для всех параллельно анализируемых проб в одном и том же цикле используют идентичные по составу исходные растворы цистеина и лизина. Рекомендуется проверять каждую партию пептидов на растворимость до начала их использования.

3.2.3.2 Приготовление пробы исследуемой химической продукции

Перед проведением анализа растворимость исследуемой химической продукции в подходящем растворителе контролируют после процедуры солюбилизации, описанной в протоколе DPRA DB-ALM

[32]. Испытываемая химическая продукция должна полностью растворяться в этом растворителе. Поскольку в процессе выполнения анализа по методу DPRA исследуемая химическая продукция подвергается инкубированию с цистеин- или лизинсодержащими пептидами в заведомо избыточных количествах, результаты визуального контроля, свидетельствующие об образовании прозрачного раствора, следует считать достаточным подтверждением полного растворения этой продукции (и — в случае если речь идет о многокомпонентном веществе или смеси — всех его компонентов). Подходящими растворителями являются ацетонитрил, вода, смесь ацетонитрила и воды в соотношении 1:1, изопропанол, ацетон или же смесь ацетона и ацетонитрила в соотношении 1:1. Другие растворители могут быть использованы при условии, что растворение в них не оказывает влияния на стабильность пептида, которая контролируется с помощью стандартных контрольных проб С (т. е. проб, состоящих только из пептида, отдельно растворенного в соответствующем растворителе; см. приложение С). Если исследуемая химическая продукция не растворяется ни в одном из вышеуказанных растворителей, для этой цели допускается использовать ДМСО, но только в минимально достаточном количестве. Важно иметь в виду, что ДМСО может привести к димеризации пептидов, усложнить обеспечение соответствия результатов испытаний установленным критериям приемлемости. Если в качестве растворителя выбран ДМСО, сначала следует растворить исследуемую химическую продукцию в 300 мкл ДМСО, разбавляя полученный раствор 2 700 мкл ацетонитрила. Если исследуемую продукцию не удается полностью растворить в этой смеси, следует попытаться растворить аналогичное количество исследуемой химической продукции в 1 500 мкл ДМСО с разбавлением полученного раствора 1 500 мкл ацетонитрила. Предварительно подготовленные навески исследуемой химической продукции помещают в стеклянные флаконы и растворяют непосредственно перед проведением испытаний в соответствующем растворителе в концентрации 100 мМ. Для смесей и многокомпонентных веществ с известным составом общую степень чистоты продукции устанавливают на основе суммы долей ее составляющих (исключая воду), а усредненное значение молекулярной массы рассчитывают исходя из собственных значений молекулярной массы каждой такой составляющей (исключая воду) и доли, которая на нее приходится. Полученные значения степени чистоты и усредненные значения молекулярной массы используют для вычисления значения массы исследуемой химической продукции, необходимой для приготовления раствора с концентрацией 100 мМ. При исследованиях полимеров, для которых невозможно определить преобладающее значение молекулярной массы, за основу для расчетов с целью получения концентрации раствора 100 мМ может быть взята молекулярная масса соответствующего мономера (либо усредненная молекулярная масса различных мономеров, составляющих полимер). В любом случае при проведении испытаний смесей, многокомпонентных веществ или полимеров с известным составом всегда также следует рассматривать возможность выполнения анализа входящих в их состав чистых химических веществ. Для жидкостей чистые химические вещества исследуют в их исходном состоянии, без предварительного разбавления, инкубируя их в соотношении 1:10 и 1:50 с цистеин- и лизинсодержащими пептидами соответственно. При работе с твердой химической продукцией испытуемую продукцию растворяют в максимально достижимой концентрации в том же растворителе, который должен использоваться для приготовления раствора со средним значением концентрации 100 мМ. Затем выполняют анализ продукции в указанном состоянии, без дополнительного разбавления, путем инкубирования в соотношении 1:10 и 1:50 с цистеин- и лизинсодержащими пептидами соответственно. Получение согласующихся результатов (по наличию или отсутствию реакционной способности) для раствора со средней концентрацией 100 мМ и чистой химической продукции позволяет дать уверенное заключение о способности исследуемой продукции вызывать сенсибилизацию кожи.

3.2.3.3 Приготовление положительной контрольной пробы, стандартных контрольных проб и проб для контроля совместного элюирования

В качестве положительной контрольной пробы (ПК) используют раствор коричного альдегида (CAS 104-55-2; степень чистоты ≥95 %, чистый для пищевой промышленности) в ацетонитриле в концентрации 100 мМ. Использование для приготовления положительных контрольных проб других подходящих химических веществ, обеспечивающих средние значения деплеции (обеднения), допускается при наличии данных предыдущих испытаний, подтверждающих их соответствие сопоставимым критериям приемлемости при выполнении аналитического цикла. Дополнительно ВЭЖХ-анализу подвергают стандартные контрольные пробы (т. е. пробы, содержащие только пептид, растворенный в соответствующем растворителе), позволяющие убедиться в пригодности системы ВЭЖХ до начала анализа (стандартные контрольные пробы типа А), стабильности характеристик стандартных проб во времени (стандартные контрольные пробы В), а также отсутствии влияния растворителя, используемого для растворения исследуемого химического вещества, на процентные показатели деплеции (обеднения)

пептидов (стандартные контрольные пробы С) (см. приложение С). Соответствующая стандартная контрольная проба для каждого вещества служит для расчета процентного значения деплеции (обеднения) пептидов применительно к этому веществу (см. 3.2.4.2). Кроме того, для каждого исследуемого вещества в анализ должна быть включена проба для контроля совместного элюирования, состоящая только из этого вещества и предназначенная для обнаружения возможного совместного элюирования исследуемого вещества с лизин- или цистеинсодержащими пептидами.

3.2.3.4 Инкубирование исследуемой химической продукции с растворами цистеин- или лизинсодержащих пептидов

Растворы цистеин- или лизинсодержащих пептидов с добавлением испытываемой химической продукции в соотношении 1:10 и 1:50 соответственно инкубируют, поместив их в стеклянные флаконы для автоматического пробоотборника. Если непосредственно после добавления раствора исследуемой химической продукции к раствору пептидов наблюдается осадок из-за низкой растворимости исследуемой химической продукции в воде, точно определить оставшееся в смешанном растворе количество продукции, способное вступать в реакцию с пептидами, не представляется возможным. Это означает, что полученный в подобных условиях положительный результат может считаться достоверным, тогда как отрицательный результат следует рассматривать как сомнительный и использовать его с надлежащей осторожностью (см. также положения 3.2.3.2 о выполнении анализа химической продукции, нерастворимой в концентрации 100 мМ). Перед выполнением ВЭЖХ-анализа полученный реакционный раствор выдерживают в темном месте при температуре от 22,5 °С до 30 °С в течение (24 ± 2) ч. Для каждой испытываемой химической продукции анализу с использованием двух видов пептидов подвергают по три параллельно обрабатываемых пробы. До начала ВЭЖХ-анализа проводят визуальный осмотр проб. При выявлении в анализируемых растворах осадка или признаков разделения фаз соответствующие пробы могут быть обработаны в центрифуге на низкой скорости (100 – 400 × g), чтобы имеющийся осадок опустился на дно флакона. Эта мера предосторожности позволяет исключить попадание большого количества осадка в систему ВЭЖХ, что может привести к засорению соединительных трубок или хроматографических колонок. Если осадок или разделение фаз наблюдается по истечении периода инкубирования, следует иметь в виду, что значения, характеризующие деплецию (обеднение) пептидов, могут оказаться заниженными, а получение в этих условиях отрицательного результата не позволяет с уверенностью судить об отсутствии у исследуемой химической продукции способности реагировать с пептидами.

3.2.3.5 Построение стандартной градуировочной кривой ВЭЖХ

Градуировочные кривые строят для стандартных растворов цистеин- и лизинсодержащих пептидов. Стандартные растворы пептидов готовят на основе буферных растворов с 20 % или 25 % ацетонитрила с использованием фосфатного буфера (pH 7,5) для цистеинсодержащих пептидов и аммоний-ацетатного буфера (pH 10,2) для лизинсодержащих пептидов соответственно. Таким образом, выполняя серию стандартных разбавлений исходного пептидного раствора (0,667 мМ), получают шесть различных градуировочных растворов, значения концентраций которых должны охватывать диапазон от 0,534 до 0,016 7 мМ. При построении стандартной градуировочной кривой в общий ряд растворов включают также холостую пробу буферного раствора, который использовался для разбавления. Подходящие для дальнейшего применения градуировочные кривые должны удовлетворять критерию $r^2 > 0,99$.

3.2.3.6 Подготовка к выполнению анализа ВЭЖХ и порядок его выполнения

3.2.3.6.1 Перед выполнением анализа следует убедиться в пригодности используемой системы ВЭЖХ. Степени деплеции (обеднения) пептидов контролируют использованием системы ВЭЖХ с УФ-детектором (детектором на фотодиодной матрице или детектором поглощения с фиксированным значением длины волны 220 нм). Конфигурация системы ВЭЖХ согласно валидированному протоколу предусматривает предпочтительное использование колонки Zorbax SB-C-18 размерами 2,1 мм × 100 мм × 3,5 мкм. С этой колонкой с обращенной фазой для ВЭЖХ вся система должна быть уравновешена при 30 °С с 50 % фазы А (0,1 % (по объему) водного раствора трифторуксусной кислоты) и 50 % фазы В (0,085 % (по объему) раствора трифторуксусной кислоты в ацетонитриле) не менее чем за 2 ч до начала анализа. Анализ методом ВЭЖХ выполняют со скоростью потока 0,35 мл/мин и линейного градиента для ацетонитрила в пределах от 10 % до 25 % на протяжении 10 минут и дальнейшим резким увеличением последнего до 90 % для удаления сопутствующих веществ. В систему инжектируют равные объемы каждого стандартного раствора, исследуемой пробы и контрольной пробы. В промежутках между последовательными впрысками колонку необходимо повторно уравновесить с соблюдением первоначально заданных условий в течение 7 мин. Если установленная колонка ВЭЖХ с обращенной фазой отличается от рекомендованной, в параметры системы могут быть внесены соответствующие изменения для обеспечения сопоставимых условий элюирования и интегрирования

цистеин- и лизинсодержащих пептидов, в частности это касается значения инжектируемого объема пробы, которое допускает корректировку в зависимости от особенностей используемого оборудования (как правило, в диапазоне от 3 до 10 мкл). Важно учитывать, что использование альтернативной конфигурации ВЭЖХ требует подтверждения эквивалентности ее рабочих характеристик характеристикам, которые обеспечиваются валидированной конфигурацией, описанной выше (например, путем анализа веществ из списка для проверки квалификации согласно приложению В). Поглощение измеряют на длине волны 220 нм. Если система работает с детектором на фотодиодной матрице, фиксируют также значения поглощения на длине волны 258 нм. Дополнительно следует иметь в виду, что в зависимости от конкретной партии ацетонитрил может оказывать отрицательное влияние на стабильность пептидов, поэтому каждый раз перед началом использования новой партии ацетонитрила ее необходимо проверять на возможность таких нежелательных последствий. В качестве показателя вероятного совместного элюирования может рассматриваться отношение площади пиков для 220 и 258 нм. Для каждой отдельно взятой пробы признаком отсутствия совместного элюирования следует считать отношение в пределах 90 % < среднее значение[1)] площади пиков контрольных проб < 100 %.

3.2.3.6.2 Существует вероятность того, что исследуемая химическая продукция может способствовать процессу окисления цистеинсодержащих пептидов. Пик димеризованного цистеинсодержащего пептида обнаруживают при проведении визуального контроля. Все видимые случаи димеризации регистрируют во избежание получения завышенных оценок процентного значения деплеции (обеднения) пептидов, использование которых может привести к выдаче ложноположительных прогнозных заключений и/или отнесению исследуемых веществ к более высокому классу по реакционной способности, чем тот, к которому они принадлежат в действительности (см. 3.2.4.5 и 3.2.4.6).

3.2.3.6.3 К инжектированию первой из проб при анализе методом ВЭЖХ необходимо приступать спустя 22—26 ч после смешивания исследуемой химической продукции с раствором пептидов. Последовательность выполнения анализа должна быть спланирована таким образом, чтобы общее время анализа не превышало 30 ч. При выборе конфигурации системы ВЭЖХ, использовавшейся в ходе проведения валидационного исследования и включенной в описание рассматриваемого метода исследования, в рамках одного цикла ВЭЖХ могут быть параллельно исследованы до 26 аналитических проб (см. 3.2.3.1). Пример последовательности выполнения такого ВЭЖХ-анализа приведен в приложении С.

3.2.4 Данные и протоколы об испытаниях

Интерпретация данных

3.2.4.1 Концентрацию цистеин- или лизинсодержащих пептидов в каждой пробе определяют фотометрическим способом на длине волны 220 нм путем измерения площади соответствующих пиков (площади под кривой (area under the curve — AUC)) с последующим расчетом значения концентрации на основе линейной градуировочной кривой, полученной по результатам анализа стандартных растворов.

3.2.4.2 Процентное значение деплеции (обеднения) пептидов в каждой пробе определяют путем измерения значения площади пика и деления ее на среднюю площадь пика для соответствующих стандартных контрольных проб С (см. приложение В) по формуле, представленной ниже:

$$\text{Процентное значение деплеции (обеднения) пептидов} = \left[1 - \left(\frac{\text{Значение площади пика пептидов в инжектированной дозе параллельно обрабатываемой пробы}}{\text{Среднее значение площади пика пептидов в стандартной контрольной пробе С}}\right)\right] \times 100.$$

Критерии приемлемости

3.2.4.3 Должны быть соблюдены следующие критерии приемлемости:

a) градуировочная кривая стандартного раствора должна удовлетворять критерию $r^2 > 0{,}99$;

b) среднее процентное значение деплеции (обеднения) пептидов в трех параллельно обрабатываемых положительных контрольных пробах на основе коричного альдегида должно составлять от 60,8 % до 100,0 % для цистеинсодержащих пептидов и от 40,2 % до 69,0 % для лизинсодержащих пептидов (в случае использования для целей положительного контроля других химических веществ для последних должен быть установлен собственный диапазон), а максимальное стандартное отклонение (СО) для параллельно обрабатываемых положительных контрольных проб должно составлять менее 14,9 % для процентного значения деплеции (обеднения) цистеина и менее 11,6 % для процентного значения деплеции (обеднения) лизина;

[1)] Здесь и во всем документе под средним значением подразумевается среднее арифметическое.

c) средняя концентрация пептидов в стандартных контрольных пробах А должна составлять (0,50 ± 0,05) мМ, а коэффициент вариации (CV) площадей пиков пептидов для девяти стандартных контрольных проб В и С в растворе с ацетонитрилом должен быть менее 15,0 %.

Если один или несколько указанных критериев не выполняются, весь цикл анализа повторяют.

3.2.4.4 Результаты анализа в отношении конкретной химической продукции считают достоверными при условии выполнения следующих критериев:

a) максимальное значение стандартного отклонения для параллельно обрабатываемых проб этой химической продукции должно составлять менее 14,9 % для процентного значения деплеции (обеднения) цистеина и менее 11,6 % для процентного значения деплеции (обеднения) лизина;

b) среднее значение концентрации пептидов в трех стандартных контрольных пробах С в соответствующем растворителе должно составлять (0,50 ± 0,05) мМ.

Если один или несколько из этих критериев не выполняются, несоответствующие данные аннулируют и повторяют цикл анализа для этого конкретного химического вещества.

Модель построения прогнозов

3.2.4.5 Средние процентные значения деплеции (обеднения) цистеина и деплеции (обеднения) лизина рассчитывают отдельно для каждой исследуемой химической продукции. При расчете среднего значения отрицательные значения деплеции (обеднения) принимают равными «0». В соответствии с моделью построения прогнозов «цистеин 1:10/лизин 1:50», показанной в таблице 1, для различия между веществами, способными и не способными вызывать сенсибилизацию кожи, в процессе применения IATA или DA используют пороговое среднее значение деплеции (обеднения), равное 6,38 %. Использование данной модели построения прогнозов для классификации исследуемой химической продукции в зависимости от ее химической активности (т. е. низкой, умеренной либо высокой реакционной способности) может быть полезным для оценивания размера сенсибилизирующей способности продукции в рамках IATA или DA.

Таблица 1 — Модель построения прогнозов «цистеин 1:10/лизин 1:50»[1)]

Среднее значение деплеции (обеднения) цистеина и лизина, %	Класс реакционной способности	Прогнозное заключение по методу DPRA[2)]
0 % ≤ среднее значение деплеции (обеднения), % ≤ 6,38 %	Отсутствие реакционной способности или минимальная реакционная способность	Отрицательное
6,38 % < среднее значение деплеции (обеднения), % ≤ 22,62 %	Низкая реакционная способность	Положительное
22,62 % < среднее значение деплеции (обеднения), % ≤ 42,47 %	Умеренная реакционная способность	
42,47 % < среднее значение деплеции (обеднения), % ≤ 100 %	Высокая реакционная способность	

[1)] Числовые пороговые значения рассчитаны статистическим путем и не связаны с прецизионностью измерения.

[2)] Прогнозное заключение по методу DPRA следует рассматривать в контексте IATA и с учетом положений 3.2.1.2 и 3.2.1.4.

3.2.4.6 Не исключены случаи, когда исследуемая химическая продукция (чистое вещество или одна либо несколько составляющих многокомпонентного вещества или смеси) демонстрирует интенсивное поглощение на длине волны 220 нм и характеризуется тем же временем удерживания, что и соответствующий пептид (т. е. происходит их совместное элюирование). Этого можно избежать путем внесения небольших изменений в настройки системы ВЭЖХ с целью последующего разграничения во времени этапов элюирования исследуемой химической продукции и пептида. Если для решения проблемы совместного элюирования используется альтернативная конфигурация системы ВЭЖХ, эквивалентность ее рабочих характеристик характеристикам, обеспечиваемым валидированной конфигурацией, должна быть подтверждена (например, путем выполнения анализа веществ согласно списку для проверки квалификации, приведенному в приложении А). При совместном элюировании интегрирование пика пептида, а следовательно, и расчет его процентного значения деплеции (обеднения) стано-

вятся невозможными. Если совместное элюирование исследуемой химической продукции наблюдается как с цистеин-, так и с лизинсодержащими пептидами или же только с цистеинсодержащими пептидами, то при составлении отчета результаты такого анализа должны быть определены как «недостоверные». Если совместное элюирование наблюдается только с лизинсодержащими пептидами, то может использоваться модель построения прогнозов «цистеин 1:10», приведенная в таблице 2.

Таблица 2 — Модель построения прогнозов «цистеин 1:10» [1)]

Деплеция (обеднение) цистеина (Cys), %	Класс реакционной способности	Прогнозное заключение по методу DPRA [2)]
0 % ≤ значение деплеции (обеднения) Cys, % ≤ 13,89 %	Отсутствие реакционной способности или минимальная реакционная способность	Отрицательное
13,89 % < значение деплеции (обеднения) Cys, % ≤ 23,09 %	Низкая реакционная способность	Положительное
23,09 % < значение деплеции (обеднения) Cys, % ≤ 98,24 %	Умеренная реакционная способность	
98,24 % < значение деплеции (обеднения) Cys, % ≤ 100 %	Высокая реакционная способность	

[1)] Числовые пороговые значения рассчитаны статистическим путем и не связаны с прецизионностью измерения.
[2)] Прогнозное заключение по методу DPRA следует рассматривать в контексте IATA и с учетом положений 3.2.1.2 и 3.2.1.4.

3.2.4.7 Возможны случаи, когда время удерживания исследуемой химической продукции и одного из видов пептидов перекрывается лишь частично. В подобной ситуации значения процентной деплеции (обеднения) пептидов могут быть оценены и использованы в модели построения прогнозов «цистеин 1:10/лизин 1:50», однако отнесение исследуемой химической продукции к тому или иному классу реакционной способности не может быть выполнено с максимальной точностью.

3.2.4.8 Результатов однократного анализа методом ВЭЖХ для цистеин- и лизинсодержащих пептидов должно быть достаточно для оценки характеристик исследуемой химической продукции, если эти результаты обеспечивают его однозначную классификацию. При получении результатов, близких к пороговому значению, используемому для деления их на положительные и отрицательные (т. е. когда среднее процентное значение деплеции (обеднения) находится в диапазоне от 3 % до 10 % для прогнозирования в соответствии с моделью «цистеин 1:10/лизин 1:50» либо в диапазоне от 9 % до 17 % для прогнозирования в соответствии с моделью «цистеин 1:10»), рекомендуется проводить дополнительные исследования. В частности, если в соответствующую область диапазона попадают отрицательные результаты (от 3 % до 6,38 % для модели «цистеин 1:10/лизин 1:50» или от 9 % до 13,89 % для модели «цистеин 1:10»), может быть принято решение о проведении второго цикла испытаний, а также третьего — в случае расхождения результатов между двумя предыдущими.

Протокол испытаний

3.2.4.9 Протокол испытаний должен включать в себя следующую информацию:

Исследуемое химическое вещество и контрольные пробы (положительная контрольная проба и проба растворителя/вещества-носителя)

Однокомпонентное вещество (исследуемое вещество или вещество контрольной пробы):

- химическое наименование, а именно название (названия) по IUPAC или CAS, регистрационный номер (номера) CAS, коды SMILES или InChI, структурная формула и/или другие отличительные признаки;
- физико-химические свойства, такие как агрегатное состояние, внешний вид, растворимость в воде, молекулярная масса, а также другие дополнительные физико-химические свойства;
- степень чистоты, химическую характеристику примесей с учетом целесообразности и возможности практической реализации;
- способ обработки перед началом испытаний, если такая обработка проводилась (например, подогрев, измельчение);
- значение (значения) концентрации вещества при проведении испытаний;
- условия хранения и сведения о стабильности вещества, если таковые имеются.

Многокомпонентное вещество, вещество с неопределенным или переменным составом (UVCB) и смеси веществ:

- полное описание вещества, например химическое обозначение (см. выше), степень чистоты, количественные характеристики и соответствующие физико-химические характеристики (см. выше) его составляющих;
- внешний вид, растворимость в воде, а также другие физико-химические характеристики;
- значение молекулярной массы или — для смесей веществ/полимеров с известным составом — усредненной молекулярной массы либо иные сведения, важные для целей исследования;
- способ обработки перед началом испытаний, если такая обработка проводилась (например, подогрев, измельчение);
- значение (значения) концентрации вещества при испытаниях;
- условия хранения и сведения о стабильности вещества, если таковые имеются.

Дополнительные сведения о положительной контрольной пробе:

- ссылки на результаты ранее проводимых испытаний положительных контрольных проб, если таковые проводились, подтверждающие подходящий характер критериев приемлемости, использованных для циклов испытаний.

Дополнительные сведения о пробе растворителя/вещества-носителя:

- описание используемого растворителя/вещества-носителя и пропорции их составляющих, если таковые имеются;
- обоснование выбора растворителя для каждого исследуемого химического вещества;
- для ацетонитрила — результаты испытаний на способность оказывать влияние на стабильность пептидов.

Пептиды:

- сведения о поставщике, партии, степени чистоты.

Настройки оборудования для проведения анализа методом ВЭЖХ и условия выполнения анализа

- тип оборудования ВЭЖХ, описание колонок ВЭЖХ и защитных колонок, детектора, автоматического пробоотборника;
- параметры выполнения анализа ВЭЖХ, такие как температура колонки, объем впрыска, расход газа-носителя и градиент.

Пригодность аналитической системы

- площадь пика пептидов на длине волны 220 нм для каждого стандартного раствора и параллельно обрабатываемой стандартной контрольной пробы А;
- графическое представление линейной градуировочной кривой с указанием значения r^2;
- значение концентрации пептидов в каждой параллельно обрабатываемой стандартной контрольной пробе А;
- среднее значение концентрации пептидов (мМ) в трех стандартных контрольных пробах А, значения СО и CV;
- концентрацию пептидов в стандартных контрольных пробах А и С.

Порядок выполнения анализа

Для стандартных контрольных проб:

- площадь пика пептидов на длине волны 220 нм для каждой параллельно обрабатываемой пробы В и С;
- среднее значение площади пика пептидов на длине волны 220 нм для девяти стандартных контрольных проб В и С в ацетонитриле, значения СО и CV (для обеспечения стабильности стандартных контрольных проб в процессе выполнения анализа);
- среднее значение площади пика пептидов на длине волны 220 нм с каждым используемым растворителем для трех соответствующих стандартных контрольных проб С (для расчета процентного значения деплеции (обеднения) пептидов);
- значение концентрации пептидов (мМ) с каждым используемым растворителем для трех соответствующих стандартных контрольных проб С;
- среднее значение концентрации пептидов (мМ) с каждым используемым растворителем для трех соответствующих стандартных контрольных проб С, значения СО и CV.

Для положительной контрольной пробы:

- площадь пика пептидов на длине волны 220 нм для каждой параллельно обрабатываемой пробы;
- процентное значение деплеции (обеднения) пептидов в каждой параллельно обрабатываемой пробе;

- среднее процентное значение деплеции (обеднения) пептидов в трех параллельно обрабатываемых пробах, значения СО и CV.

Для каждого исследуемого химического вещества:

- сведения о появлении осадка в реакционной смеси по истечении времени инкубирования, если таковой имеется; а также о том, был ли образовавшийся осадок растворен повторно или удален путем обработки в центрифуге;
- сведения о наличии совместного элюирования;
- прочие наблюдения, важные для результатов исследования, если таковые имеются;
- площадь пика пептидов на длине волны 220 нм для каждой параллельно обрабатываемой пробы;
- процентное значение деплеции (обеднения) пептидов в каждой параллельно обрабатываемой пробе;
- среднее процентное значение деплеции (обеднения) пептидов в трех параллельно обрабатываемых пробах, значения СО и CV;
- средние процентные значения деплеции (обеднения) цистеина и лизина;
- используемую модель построения прогнозов и прогнозное заключение по методу DPRA.

Проверка квалификации

- отметку о том, что испытательная лаборатория смогла подтвердить свою компетентность в использовании данного метода исследования до начала его регулярного применения путем проведения испытаний специально отобранных для этого химических веществ.

Оценка результатов

- описание любых незапланированных изменений, внесенных в методику испытаний;
- анализ результатов, полученных с применением метода исследования DPRA, с учетом соответствия их значений диапазонам, указанным в 3.2.4.8.

Выводы

3.3 Сенсибилизация кожи *in chemico*. Анализ реакционной способности в отношении производных аминокислот (ADRA)

3.3.1 Исходные положения, пригодность и ограничения

3.3.1.1 Метод ADRA предназначен для определения исходного молекулярного события AOP для сенсибилизации кожи, а именно реакций с белками, путем количественной оценки реакционной способности исследуемой химической продукции по отношению к модельным синтетическим производным аминоксилот, в состав которых входит лизин либо цистеин [6], [38], [39]. В основу метода положен анализ значений показателей деплеции (обеднения) производных цистеина и лизина с целью последующего отнесения исследуемой химической продукции к способной и не способной вызывать сенсибилизацию кожи [6], [38], [39].

3.3.1.2 Метод ADRA обладает доказанной пригодностью для применения на базе лабораторий, которые уже имеют достаточный опыт проведения аналитических испытаний с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Воспроизводимость прогнозных заключений по методу ADRA в пределах одной лаборатории составила 100 % (10/10), 100 % (7/7), 90 % (9/10) и 100 % (10/10) для четырех участвующих лабораторий. Общая воспроизводимость при подготовке заключений различными лабораториями для 40 наименований химической продукции, рассчитанная на основе результатов трех участвующих лабораторий, составила 91,9 % [39]. Для 40 наименований исследуемой химической продукции, подвергнутой анализу при проведении валидационного исследования в четырех лабораториях, в совокупности уровень точности составил 86,9 % (139/160), чувствительности — 81,5 % (88/108), а специфичности — 98,1 % (51/52) [40], [9]. Результаты валидационного исследования [40], [9] наряду с результатами других опубликованных исследований [39] свидетельствуют о том, что метод ADRA позволяет определять вещества, способные и не способные вызывать сенсибилизацию, с точностью 79 % (98/124) (124 соединения, подпадающие под область применимости ADRA), чувствительностью 74 % (65/88) и специфичностью на уровне 92 % (33/36) по сравнению с результатами аналогичных исследований по методу LLNA [41]. При этом для 73 соединений, входящих в область применимости метода, точность прогнозирования развития кожной сенсибилизации у человека составляет 86 % (63/73), чувствительность — 85 % (44/52), а специфичность — 90 % (19/21) [41]. Показатели точности, приведенные выше для ADRA как для самостоятельного метода испытания, являются ориентированными, поскольку результаты, полученные с его помощью, рекомендуется рассматривать в сочетании с информацией из других источников в контексте IATA и с учетом положений 3.1.4 и

3.1.5. При подготовке оценки эффективности применения методов определения сенсибилизации кожи, не требующих использования подопытных животных, следует иметь в виду, что применение метода LLNA, а также других методов, которые предполагают проведение испытаний на животных, может не в полной мере раскрывать характер воздействия исследуемого вещества на организм целевого биологического вида, представляющего основной интерес для исследователей, т. е. на организм человека. Исходя из имеющихся данных, установлено, что область применения метода ADRA включает в себя широкий спектр химических веществ, которые могут характеризоваться наличием разнообразных органических функциональных групп, различными механизмами развития реакций, различным сенсибилизирующим потенциалом при воздействии на кожу (подтвержденным путем проведения испытаний *in vivo*), а также различными физико-химическими свойствами [6], [38], [39], [40]. По итогам независимой экспертной оценки результатов исследования с целью валидации метода ADRA был сделан вывод о возможности применения данного метода в рамках интегрированной стратегии испытаний для прогнозирования опасности сенсибилизации кожи [41], [10].

3.3.1.3 Под «исследуемой химической продукцией» для целей настоящего стандарта понимается продукция, подвергаемая испытаниям; использование данного термина не связано с возможностью применения метода ADRA для исследования тех или иных чистых веществ и/или их смесей (см. краткое описание известных ограничений для применения метода ADRA в приложении D). Данный метод неприменим для исследований соединений металлов, реакции которых с белками, как известно, протекают в соответствии с механизмами, отличными от ковалентного связывания. Метод исследования, описанный в настоящем разделе стандарта, представляет собой метод *in chemico*, не учитывающий взаимодействие исследуемой химической продукции с метаболической системой. Данный метод не позволяет определять химическую продукцию, для раскрытия сенсибилизирующего потенциала которой при воздействии на кожу требуется ее предварительная биологическая активация ферментами (т. е. прогаптенами). По имеющейся информации, химическая продукция, которая проявляет свои сенсибилизирующие свойства после абиотической трансформации (т. е. прегаптены), в некоторых случаях правильно определяется при помощи данного метода [6], [38], [39], [40]. Таким образом, любые отрицательные результаты, полученные с его применением, следует рассматривать с учетом указанных ограничений и в сочетании с информацией из других источников в контексте соответствующего IATA. Если присутствие исследуемой химической продукции способствует окислению реактива N-(2-(1-нафтил)ацетил)-L-цистеина (NAC) (т. е. димеризации цистеина), это может приводить к потенциальному завышению оценки деплеции (обеднения) NAC и, соответственно, к выдаче ложноположительных прогнозных заключений (см. 3.3.4.6 и 3.3.4.7). Использование средств ВЭЖХ обеспечивает возможность обнаружения и количественного определения любых вновь образующихся димеров NAC и, таким образом, позволяет подтвердить или исключить вероятность того, что деплеция (обеднение) реактива NAC была вызвана его димеризацией при окислении, а не явилась результатом реакции с исследуемым веществом (веществами) и последующего ковалентного связывания.

3.3.1.4 Метод ADRA может применяться для исследования химической продукции, характеризующейся низкими показателями растворимости [42]. Исследуемая химическая продукция должна обладать растворимостью в соответствующем растворителе при конечном значении концентрации, соответствующем 1 мМ (см. 3.3.3.4). Если исследуемая химическая продукция не может быть полностью растворена при указанном значении концентрации, это не исключает возможности проведения исследования с более низкими значениями концентрации. В подобных случаях положительный результат исследования может использоваться как доказательство способности исследуемой химической продукции вызывать сенсибилизацию кожи, тогда как получение отрицательного результата, напротив, не позволяет с уверенностью судить об отсутствии у вещества сенсибилизирующих свойств.

3.3.1.5 Известно, что многие органические соединения могут поглощать УФ-излучение в диапазоне 220 нм. В случае совместного элюирования применяемого нуклеофильного реактива и исследуемой химической продукции это может явиться причиной вынесения ложноотрицательного прогнозного заключения о сенсибилизирующих свойствах такой продукции. Это возможно при выполнении анализа по методу DPRA, в соответствии с которым количественное определение пептидсодержащих нуклеофильных реактивов должно выполняться на длине волны 220 нм. Метод ADRA, напротив, требует использовать для количественного определения нуклеофильных реактивов длину волны 281 нм. Перечень веществ, поглощающих ультрафиолетовое излучение на этом участке спектра, обычно ограничивается веществами с конъюгированными двойными связями, что существенно снижает возможность совместного элюирования [43].

3.3.1.6 Текущую модель построения прогнозов нельзя использовать при выполнении анализа сложных смесей веществ неизвестного состава, а также веществ неизвестного или переменного состава, продуктов комплексных реакций или биологических материалов (веществ UVCB) ввиду необходи-

мости соблюдения определенного молярного отношения между исследуемым химическим веществом и используемыми нуклеофильными реактивами. Количество доступной информации о возможности применения метода ADRA для анализа смесей веществ в настоящее время ограничено [44], [45]. Необходимо разработать новый протокол для проведения исследований многокомпонентных веществ и смесей в соответствии с такими методами, как ADRA, которые используют ВЭЖХ-анализ для количественной оценки деплеции (обеднения) нуклеофильных реагентов [44], [45]. Таким образом, несмотря на то что в рамках настоящего стандарта не представляется возможным однозначно указать методы, рекомендуемые для оценивания свойств многокомпонентных веществ и смесей, способ получения оценки, описанный в 3.3.3.5, в настоящее время может рассматриваться как наиболее подходящий для выполнения анализа таких многокомпонентных веществ или смесей с известным составом [44]. Следует учитывать, что возможность его применения для этих целей не была изучена в процессе валидации метода. Перед исследованием смесей, химической продукции, определение которых затруднено (например, нестабильных), или химической продукции, которая относится к области применения настоящего стандарта, следует оценить значимость результатов такого исследования с научной точки зрения.

3.3.1.7 Метод ADRA может применяться для различия химической продукции, способной и не способной вызывать сенсибилизацию кожи. Требуется проведение дальнейших работ, предпочтительно с использованием данных, полученных на человеке, чтобы определить, как по результатам проведения исследований методом ADRA можно дать оценку сенсибилизирующей способности [41].

3.3.2 Сущность метода испытания

3.3.2.1 ADRA — это метод исследования *in chemico*, предназначенный для определения остаточной концентрации производного цистеина — *N*-(2-(1-нафтил)ацетил)-*L*-цистеина (CAS 32668-00-1), также известного как NAC, и производного лизина — α-*N*-(2-(1-нафтил)ацетил)-*L*-лизина (CAS 397841-92-8), также известного как NAL, по результатам инкубирования в течение (24 ± 1) ч при температуре (25 ± 1) °C в присутствии исследуемой химической продукции. Оба этих производных имеют в своей структуре нафталиновое кольцо, которое размещается в их *N*-концевой области для облегчения УФ-детектирования. Относительную концентрацию NAC и NAL измеряют методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с градиентным элюированием и УФ-детектированием при длине волны 281 нм. На следующем этапе рассчитывают процентные значения деплеции (обеднения) для NAC и NAL и сопоставляют их с данными согласно модели построения прогнозов (см. 3.3.4.5).

3.3.2.2 До того как приступить к регулярному применению метода испытаний, лаборатории должны подтвердить свою техническую компетентность путем исследования 10 веществ специально отобранной химической продукции, перечисленных в приложении Е.

3.3.3 Методика испытаний

В основу метода ADRA положен специализированный протокол [46], соответствующий протоколу, ранее принятому для проведения соответствующего валидационного исследования, в роли координатора которого выступал JaCVAM, и рекомендованный для повсеместного использования при внедрении рассматриваемого метода в лабораторной практике. Сведения об основных составляющих и процедурах метода ADRA представлены ниже. Перед использованием альтернативной конфигурации оборудования для ВЭЖХ должна быть подтверждена эквивалентность ее рабочих характеристик характеристикам оборудования, использовавшегося при проведении валидационного исследования и описанного в действующем протоколе, предпочтительным образом путем выполнения анализа веществ согласно списку для проверки квалификации, приведенному в приложении Е.

Качество реактивов NAC и NAL

3.3.3.1 Необходимые нуклеофильные реактивы можно приобрести в виде набора ADRA Kit для испытаний на сенсибилизацию кожи, производимого компанией FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, № по каталогу 296-80901. Использование NAC/NAL в качестве реактива для определения сенсибилизации запатентовано Fujifilm Corporation только на территории Японии. В других странах получать разрешение для использования NAC/NAL не требуется. В случае использования NAC/NAL других производителей используемые реактивы должны удовлетворять трем критериям качества, перечисленным ниже. С целью исключения контроля качества реактивов и ускорения процесса проведения исследований по методу ADRA необходимо проводить закупку NAC и NAL, специально изготовленных с учетом удовлетворения этих критериев.

Требования к качеству реактивов NAC и NAL:

1) Чистота: Степень чистоты NAC и NAL должна составлять не менее 98 %.

2) Стабильность: В целях контроля стабильности используемых реактивов из стандартных растворов NAC и NAL готовят соответствующие стандартные контрольные растворы, не содержащие исследуемую химическую продукцию, и определяют остаточные уровни содержания в них NAC и NAL

сразу после приготовления (спустя 0 ч) и после инкубирования в течение 24 ч. Значение остаточных уровней содержания NAC и NAL должно составлять не менее 90 % [46]. Значение остаточного уровня NAC рассчитывают как процентную долю от суммы уровня содержания NAC и остаточного уровня содержания димеров NAC.

3) Реакционная способность: Реакционную способность NAC и NAL оценивают при помощи 10 веществ согласно перечню веществ для проверки квалификации, приведенному в приложении Е, и контролируют соответствие указанных для них требований.

Приготовление стандартных растворов NAC и NAL

3.3.3.2 Перед использованием каждую партию NAC и NAL проверяют на растворимость. Стандартный раствор NAC готовят в концентрации 2 мМ в 100 мМ фосфатного буфера с pH = 8,0 и добавлением 0,333 мкМ ЭДТА, стандартный раствор NAL — в концентрации 2 мМ в 100 мМ фосфатного буфера с pH = 10,2. Затем эти два стандартных раствора дополнительно разбавляют буферным раствором для получения стандартных растворов с концентрацией 6,667 мкМ. Стандартные растворы NAC и NAL должны быть использованы в кратчайший срок после их приготовления [39]. При необходимости хранения стандартные растворы замораживают и хранят не более 12 месяцев при температуре менее минус 75 °С. Конечное значение концентрации раствора NAC должно составлять 5 мкМ в растворе с фосфатным буфером с pH = 8,0, а конечное значение раствора NAL должно составлять 5 мкМ в растворе с фосфатным буфером с pH = 10,2.

Приготовление раствора исследуемой химической продукции

3.3.3.3 Перед проведением анализа растворимость исследуемой химической продукции в подходящем растворителе контролируют в соответствии с процедурой солюбилизации, описанной в протоколе ADRA JaCVAM [46]. Исследуемая химическая продукция должна полностью растворяться в этом растворителе. Поскольку протоколом ADRA предусматривается инкубирование NAC либо NAL с заведомо избыточным количеством исследуемой химической продукции, результат визуального осмотра, свидетельствующий об образовании прозрачного раствора, считается достаточным подтверждением полного растворения этой продукции (всех ее компонентов, если исследуются многокомпонентное вещество или смеси). Подходящим растворителем являются дистиллированная вода, ацетонитрил и ацетон. Если исследуемая химическая продукция не растворяется ни в одном из вышеуказанных растворителей, допускается использовать ДМСО — в минимально достаточном количестве. Важно иметь в виду, что ДМСО может вызвать димеризацию нуклеофильного реактива NAC [47] и усложнить обеспечение соответствия результатов испытаний установленным критериям приемлемости. Если в качестве растворителя выбран ацетонитрил с добавлением ДМСО (5 % ДМСО в ацетонитриле), вначале растворяют исследуемую химическую продукцию в ДМСО в концентрации 20Мм, а затем выполняют 20-кратное разбавление полученного раствора ацетонитрилом, чтобы получить раствор испытуемой химической продукции с концентрацией 1 мМ. Влияние ДМСО на процесс димеризации реактива NAC может быть проконтролировано аналитическим путем, поскольку димеры NAC можно обнаружить методом ВЭЖХ. Предварительно подготовленные навески исследуемой химической продукции помещают в одноразовые полипропиленовые пробирки и непосредственно перед проведением испытаний растворяют в соответствующем растворителе в концентрации 1 мМ.

3.3.3.4 При исследованиях однокомпонентных веществ с неизвестной молекулярной массой значение концентрации раствора для испытаний может быть выбрано равным 0,5 мг/мл вместо 1 мМ [44]. Для полимеров с известными характеристиками используют значение концентрации 1 мМ, устанавливаемое исходя из усредненного значения их молекулярной массы, в порядке, аналогичном применяемому для однокомпонентных веществ.

3.3.3.5 Исследования смесей и многокомпонентных веществ с известным составом проводят следующим образом.

1) Жидкости. При исследованиях жидкостей их рассматривают как неразбавленную смесь. Когда получить реакционный раствор невозможно из-за неполного растворения взятого для испытаний образца, т. е. в растворе заметно присутствие нерастворенного материала, помутнение и/или выпадение осадка, положительный результат эксперимента может использоваться в оценке, а отрицательный результат следует рассматривать как сомнительный и интерпретировать с осторожностью. При получении положительных результатов нельзя полностью исключать их вероятного ложного характера, что также требует определенной осторожности при интерпретации прогнозного заключения.

2) Твердые вещества. Исследуемую химическую продукцию растворяют до максимально возможной концентрации в том же растворителе, который использовался для приготовления раствора вещества со значением концентрации 1 мМ. При дальнейших исследованиях этот раствор с максимально

возможной концентрацией рассматривают как неразбавленную смесь. Если получить реакционный раствор с желаемыми свойствами невозможно из-за неполного растворения взятого для испытаний образца, т. е. в растворе наблюдаются нерастворенные остатки твердого вещества, помутнение и/или выпадение осадка, положительный результат исследования может считаться достоверным, а отрицательный результат следует рассматривать как сомнительный и использовать его с надлежащей осторожностью. Однако полученные положительные результаты могут быть ложноположительными, что также требует определенной осторожности при интерпретации прогнозного заключения.

При исследовании многокомпонентных смесей отсутствует возможность индивидуальной оценки сенсибилизирующих свойств каждого компонента смеси, поэтому положительный результат исследований может рассматриваться как доказательство способности исследуемой химической продукции вызывать сенсибилизацию кожи, тогда как отрицательный результат, напротив, не позволяет точно оценить отсутствие у химической продукции сенсибилизирующих свойств.

Приготовление положительной контрольной пробы, стандартных контрольных проб и проб для контроля совместного элюирования

3.3.3.6 В качестве положительной контрольной пробы (ПК) используют раствор фенилацетальдегида (CAS 122-78-1, степень чистоты ≥90 %) или диэтилового эфира скварайновой кислоты (CAS 5231-87-8, степень чистоты ≥95 %) в ацетонитриле в концентрации 1 мМ. Фенилацетальдегид непригоден для длительного хранения после вскрытия емкости в связи с риском его полимеризации и окисления. Это вещество рекомендуется приобретать в ограниченных количествах с учетом достигаемой степени деплеции (обеднения) NAC и NAL. Хранить диэтиловый эфир скварайновой кислоты необходимо вдали от мест с высокими значениями температуры и влажности, которые могут способствовать его гидролизу. Использование для приготовления положительных контрольных проб других подходящих химических веществ, обеспечивающих средние значения деплеции (обеднения) NAC и NAL, допускается при наличии данных предыдущих испытаний, подтверждающих их соответствие сопоставимым критериям приемлемости при выполнении аналитического цикла. Дополнительно ВЭЖХ-анализу подвергают стандартные контрольные пробы, состоящие только из NAC или NAL, растворенных в соответствующем растворителе, и позволяющие убедиться в пригодности системы ВЭЖХ до начала анализа (стандартные контрольные пробы А), стабильности характеристик стандартных проб во времени (стандартные контрольные пробы В), а также отсутствии влияния растворителя, используемого для растворения исследуемого химического вещества, на процентные показатели деплеции (обеднения) NAC или NAL (стандартные контрольные пробы С) (см. приложение F). Соответствующая стандартная контрольная проба для исследуемого вещества используется для расчета процентного значения деплеции (обеднения) NAC и NAL применительно к этому веществу (см. 3.3.4.2). Кроме того, для каждой исследуемой химической продукции в анализ должна быть включена проба для контроля совместного элюирования, состоящая только из этой исследуемой химической продукции и предназначенная для обнаружения возможного совместного элюирования исследуемой химической продукции с NAC или NAL.

Инкубирование исследуемой химической продукции с растворами NAC и NAL

3.3.3.7 Растворы NAC и NAL с добавлением исследуемой химической продукции в соотношении 1:50 инкубируют на 96-луночном микротитрационном планшете. Выпадение осадка непосредственно после добавления раствора исследуемой химической продукции к растворам NAC и NAL свидетельствует о низкой растворимости продукции, препятствующей точному определению ее количества, содержащегося в растворе. Это не влияет на возможность использования полученных положительных результатов, а отрицательные результаты следует оценивать как сомнительные и использовать с надлежащей осторожностью (см. также положения 3.3.1.4 о выполнении анализа исследуемой химической продукции, не поддающейся растворению в концентрации 1 мМ). Перед выполнением ВЭЖХ-анализа реакционный раствор инкубируют в темном месте при температуре (25 ± 1) °С в течение (24 ± 1) ч. По истечении периода инкубирования к нему добавляют трифторуксусную кислоту (TFA) (≥98 %) в качестве фиксирующего раствора для прекращения химической реакции [39].

Подготовка к выполнению анализа ВЭЖХ и порядок его выполнения

3.3.3.8 Для каждой исследуемой химической продукции анализу с целью определения процентного значения деплеции (обеднения) NAC и NAL соответственно должны подвергаться по три параллельно обрабатываемые пробы. Несмотря на то что добавление фиксирующего раствора останавливает реакцию, необходимые измерения характеристик реакционного раствора следует выполнять в кратчайший срок, но не позднее трех дней с момента добавления фиксирующего раствора. Например, когда ВЭЖХ-анализ для NAC и NAL выполняется по отдельности, с использованием двух 96-луночных микро-

титрационных планшетов, одновременно можно анализировать до 34 проб, включая пробу исследуемой химической продукции, положительную контрольную пробу и соответствующее число контрольных проб растворителя в зависимости от общего числа различных видов растворителей, задействованных в испытаниях, в количестве трех экземпляров каждая. Для всех проб, обрабатываемых параллельно в рамках одного аналитического цикла, следует использовать идентичные партии стандартных растворов NAC и NAL. До начала ВЭЖХ-анализа проводят визуальный осмотр растворов исследуемой химической продукции и контрольных растворов и при необходимости обрабатывают их в центрифуге на низкой скорости (100 – 400 × g), чтобы имеющийся осадок сконцентрировался на дне флакона. Эта мера предосторожности позволяет исключить попадание больших количеств осадка в систему ВЭЖХ, что может привести к засорению соединительных трубок или хроматографических колонок. Появление осадка или признаков разделения фаз, наблюдаемое по истечении периода инкубирования, свидетельствует о том, что значения, характеризующие деплецию (обеднение) NAC и NAL, могут оказаться недостоверными, а полученный в этих условиях отрицательный результат следует использовать с осторожностью, точно так же, как и в случае обнаружения осадка до перед инкубированием (см. выше).

3.3.3.9 Стандартную градуировочную кривую строят как для NAC, так и для NAL. Стандартные растворы NAC и NAL готовят на основе буферного раствора с 20 % ацетонитрила, содержащего 0,5 % трифторуксусной кислоты. Для NAC используют фосфатный буфер со значением pH = 8,0, а для NAL — фосфатный буфер со значением pH = 10,2. Серия разбавлений стандартных растворов NAC и NAL (5,0 мкМ) служит для приготовления шести калибровочных растворов со значениями концентрации от 5,0 до 0,156 мкМ, а также холостого буферного раствора, используемого при разбавлении. Подходящие для дальнейшего применения градуировочные кривые должны удовлетворять критерию $R^2 > 0{,}990$.

3.3.3.10 Перед проведением анализа следует убедиться в пригодности используемой системы ВЭЖХ. Степени деплеции (обеднения) NAC и NAL контролируют с использованием систем ВЭЖХ с УФ-детектором (детектором на фотодиодной матрице или детектором поглощения с фиксированным значением длины волны 281 нм). В системе ВЭЖХ должна быть установлена колонка соответствующей конструкции. Рекомендованная конфигурация системы ВЭЖХ согласно валидированному протоколу предусматривает предпочтительное использование хроматографической колонки с предварительно заданными параметрами (вид частиц наполнителя: силикагель типа «ядро — оболочка», размер частиц: 2,5~2,7 мкм, размеры колонки: 3,0 × 150 мм). В случае установки колонки с обращенной фазой указанного типа система ВЭЖХ должна быть уравновешена в течение не менее 30 мин при 40 °С с 50 % фазы А (0,1 % (по объему) водного раствора трифторуксусной кислоты) и 50 % фазы В (0,1 % (по объему) раствора трифторуксусной кислоты в ацетонитриле) до начала использования. После этого колонку кондиционируют, выполняя градиентное разделение не менее двух раз перед ее непосредственным использованием. Анализ методом ВЭЖХ выполняют со скоростью потока 0,30 мл/мин и линейного градиента для ацетонитрила в пределах от 10 % до 25 % для NAC и от 25 % до 45 % для NAL на протяжении 10 минут и дальнейшим резким увеличением последнего до 100 % для удаления сопутствующих веществ. Для инжектирования используют одинаковые объемы стандартных растворов, растворов исследуемой химической продукции и контрольных растворов. В промежутках между последовательными впрысками повторно уравновешивают колонку с соблюдением первоначально заданных условий в течение 6,5 мин. Если используемая колонка ВЭЖХ с обращенной фазой отличается от описанной выше, в рабочие параметры системы могут быть внесены соответствующие изменения для обеспечения сопоставимых условий элюирования и интегрирования NAC и NAL; в частности это касается значения инжектируемого объема пробы, которое допускает корректировку в зависимости от характеристик используемого оборудования (как правило, в диапазоне 10—20 мкл). Важно учитывать, что использование альтернативной конфигурации ВЭЖХ требует подтверждения эквивалентности ее рабочих характеристик характеристикам, обеспечиваемым валидированной конфигурацией, о которой идет речь выше, желательно путем анализа веществ из списка для проверки квалификации согласно приложению С. Поглощение измеряют на длине волны 281 нм. Если система работает с детектором на фотодиодной матрице, фиксируют также значения поглощения на длине волны 291 нм. Дополнительно следует иметь в виду, что в зависимости от конкретной партии ацетонитрил может оказывать отрицательное влияние на стабильность NAC и NAL, поэтому каждый раз перед началом использования новой партии ацетонитрила ее необходимо проверять на возможность таких нежелательных последствий. Показателем совместного элюирования может служить соотношение площади пиков для 281 и 291 нм. Для каждой отдельно взятой пробы признаком отсутствия совместного элюирования следует считать отношение в пределах 90 % < среднее значение площади пиков контрольных проб < 100 %. Пример последовательности выполнения такого ВЭЖХ-анализа приведен в приложении F.

3.3.3.11 Воздействие некоторой исследуемой химической продукции потенциально может способствовать окислению NAC. Пик, соответствующий димеризованному NAC, может быть обнаружен при визуальном контроле. Любые видимые признаки димеризации регистрируют во избежание получения завышенной оценки деплеции (обеднения) NAC, использование которой может привести к выдаче ложноположительного прогнозного заключения (см. 3.3.4.5 и 3.3.4.6).

3.3.4 Данные и протоколы испытаний

Интерпретация данных

3.3.4.1 Концентрацию NAC и NAL в каждой пробе определяют фотометрическим способом на длине волны 281 нм путем измерения площади соответствующих пиков (площади под кривой (AUC)) с последующим расчетом значения концентрации на основе линейной градуировочной кривой, полученной по результатам анализа стандартных растворов.

3.3.4.2 Процентное значение деплеции (обеднения) NAC и NAL в каждой пробе определяют путем измерения значения площади пика и деления ее на среднюю площадь пика для соответствующих стандартных контрольных проб С (см. приложение F) по формуле, представленной ниже.

$$\text{Процентное значение деплеции (обеднения) NAC или NAL} = \left[1 - \left(\frac{\text{Значение площади пика NAC или NAL в инжектированной дозе параллельно обрабатываемой пробы}}{\text{Среднее значение площади пика NAC или NAL в стандартной контрольной пробе С}}\right)\right] \times 100.$$

Критерии приемлемости

3.3.4.3 Должны быть соблюдены следующие критерии приемлемости:

a) градуировочная кривая стандартного раствора должна удовлетворять критерию $R^2 > 0{,}990$;

b) среднее процентное значение деплеции (обеднения) NAC и NAL и максимальное стандартное отклонение (СО) в трех параллельно обрабатываемых положительных контрольных пробах (на основе фенилацетальдегида или диэтилового эфира скварайновой кислоты) должны удовлетворять следующим критериям:

- деплеция (обеднение) NAC:

для фенилацетальдегида: от 6 % до 30 %; для диэтилового эфира скварайновой кислоты: от 15 % до 40 %;

- деплеция (обеднение) NAL:

для фенилацетальдегида: от 75 % до 100 %; для диэтилового эфира скварайновой кислоты: от 40 % до 85 %;

- максимальное стандартное отклонение (СО):

для фенилацетальдегида и диэтилового эфира скварайновой кислоты: менее 10 % при определении значения деплеции (обеднения) для NAC и NAL;

c) среднее значение концентрации NAC и NAL в стандартных контрольных пробах А и С должно составлять 3,2—4,4 мкМ, а коэффициент вариации (CV) площадей пиков NAC и NAL для девяти стандартных контрольных проб В и С в растворе с ацетонитрилом должен быть менее 10 %.

Если один или несколько из этих критериев не выполняются, несоответствующие данные аннулируют и повторяют весь цикл анализа.

3.3.4.4 Результаты анализа в отношении конкретной исследуемой химической продукции считают достоверными при условии выполнения следующих критериев:

a) максимальное значение стандартного отклонения для процентного значения деплеции (обеднения) NAC и NAL для параллельно обрабатываемых проб этой исследуемой химической продукции должно составлять менее 10 %;

b) среднее значение концентрации NAC и NAL в трех стандартных контрольных пробах С в соответствующем растворителе должно составлять 3,2—4,4 мМ. При использовании ацетонитрила с 5 %-ным содержанием ДМСО в качестве растворителя допустимый диапазон средних значений концентрации NAC в стандартных контрольных пробах С устанавливается равным 2,8—4,0 мкМ [48].

Если один или несколько из этих критериев не выполняются, несоответствующие данные аннулируют и повторяют цикл анализа.

Модель построения прогнозов

3.3.4.5 Средние процентные значения деплеции (обеднения) NAC и NAL рассчитывают отдельно для каждой исследуемой химической продукции. При расчете среднего значения отрицательные зна-

чения деплеции (обеднения) принимаются равными «0». При работе с моделью построения прогнозов «NAC/NAL», показанной в таблице 3, для различия между исследуемой химической продукцией, способной и не способной вызывать сенсибилизацию кожи, в процессе применения IATA или DA в качестве порогового используют среднее значение деплеции (обеднения), равное 4,9 %. Порог в размере 4,9 % для среднего процентного значения деплеции (обеднения) NAC и NAL был выбран с учетом параметров применяемой двоичной системы классификации таким образом, чтобы он обеспечивал как можно более достоверное предсказание наличия или отсутствия у исследуемой химической продукции сенсибилизирующих свойств.

Таблица 3 — Модель построения прогнозов «NAC/NAL»[1)]

Среднее процентное значение деплеции (обеднения) NAC и NAL	Прогнозное заключение по методу ADRA [2)]
Менее 4,9 %	Отрицательное
4,9 % или более	Положительное

[1)] Числовые пороговые значения рассчитаны статистическим путем и не связаны с прецизионностью измерения.
[2)] Прогнозное заключение по методу ADRA следует рассматривать в контексте IATA и с учетом положений 3.3.1.2 и 3.3.1.3.

3.3.4.6 Совместное элюирование происходит, когда исследуемая химическая продукция (вещество либо одна или несколько составляющих многокомпонентного вещества или смеси) демонстрирует интенсивное поглощение на длине волны 281 нм и характеризуется тем же временем удерживания, что и NAC или NAL. Этого можно избежать путем внесения небольших изменений в настройки системы ВЭЖХ с целью последующего разграничения во времени этапов элюирования исследуемого химического вещества и NAC или NAL. Если в ходе решения проблемы совместного элюирования используется альтернативная конфигурация системы ВЭЖХ, эквивалентность ее рабочих характеристик характеристикам, обеспечиваемым валидированной конфигурацией, должна быть подтверждена, желательно путем выполнения анализа веществ согласно списку для проверки квалификации, приведенному в приложении Е. При совместном элюировании невозможно интегрировать данные о пиках NAC или NAL и выполнить расчеты процентных значений деплеции (обеднения) NAC или NAL соответственно. Если элюирование исследуемой химической продукции наблюдается как с NAC, так с NAL, либо же только с NAC, и разграничить во времени этапы их элюирования невозможно, то при составлении отчета результаты такого анализа должны рассматриваться как «недостоверные». Если совместное элюирование наблюдается только с NAL и разграничить во времени этапы элюирования исследуемой химической продукции и NAL невозможно, то может использоваться модель построения прогнозов, использующая только данные для NAC (см. таблицу 4). Пороговое значение 5,6 % для процентного значения деплеции (обеднения) NAC было установлено с учетом параметров применяемой двоичной системы классификации таким образом, чтобы обеспечивать как можно более достоверное предсказание наличия или отсутствия у исследуемой химической продукции сенсибилизирующих свойств.

Таблица 4 — Модель построения прогнозов только на основе данных для NAC[1)]

Среднее процентное значение деплеции (обеднения) NAC	Прогнозное заключение по методу ADRA [2)]
Менее 5,6 %	Отрицательное
5,6 % или более	Положительное

[1)] Числовые пороговые значения рассчитаны статистическим путем и не связаны с прецизионностью измерения.
[2)] Прогнозное заключение по методу ADRA следует рассматривать в контексте IATA и с учетом положений 3.3.1.2 и 3.3.1.3.

3.3.4.7 Результатов однократного анализа методом ВЭЖХ для сочетания NAC и NAL должно быть достаточно для оценки характеристик исследуемого химического вещества, если эти результаты обеспечивают его однозначную классификацию. При получении значений результатов, близких к пороговому значению, установленному для деления их на положительные и отрицательные результаты (т. е. в ситуации, когда среднее процентное значение деплеции (обеднения) находится в диапазоне от 3 % до 10 % для модели прогнозирования «NAC/NAL» либо в диапазоне от 4 % до 11 % для модели, основанной только на данных для NAC), рекомендуется проводить дополнительные исследования.

В частности, если в соответствующую область диапазона попадают отрицательные результаты (от 3 % до 4,9 % для модели «NAC/NAL» или от 5 % до 5,6 % для модели, основанной только на данных для NAC), может быть принято решение о проведении второго цикла испытаний, а также третьего — в случае расхождения результатов между первыми двумя.

Протокол испытаний

3.3.4.8 Протокол испытаний должен включать в себя следующую информацию:

Исследуемое химическое вещество и контрольные пробы (положительная контрольная проба и проба растворителя/вещества-носителя)

Однокомпонентное вещество (исследуемое вещество или вещество контрольной пробы):

- химическое наименование, а именно название (названия) по IUPAC или CAS, регистрационный номер (номера) CAS, коды SMILES или InChI, структурную формулу и/или другие отличительные признаки;
- физическо-химические свойства, такие как агрегатное состояние, внешний вид, растворимость в воде, молекулярная масса, а также другие дополнительные физико-химические свойства;
- степень чистоты, химическую характеристику примесей, с учетом целесообразности и возможности практической реализации;
- способ обработки перед началом испытаний, если такая обработка проводилась (подогрев, измельчение);
- значение (значения) концентрации вещества при проведении испытаний;
- условия хранения и сведения о стабильности вещества, если таковые имеются.

Многокомпонентное вещество, вещество с неопределенным или переменным составом (UVCB) и смеси веществ:

- полное описание вещества, например химическое обозначение (см. выше), степени чистоты, количественные характеристики и соответствующие физико-химические свойства (см. выше) его составляющих;
- внешний вид, растворимость в воде, а также другие физико-химические свойства;
- значение молекулярной массы (или усредненной молекулярной массы) для смесей веществ или полимеров известного состава либо иные сведения, важные для целей исследования;
- способ обработки перед началом испытаний, если такая обработка проводилась (подогрев, измельчение);
- значение (значения) концентрации при испытаниях;
- условия хранения и сведения о стабильности вещества, если таковые имеются.

Дополнительные сведения о положительной контрольной пробе:

- ссылки на результаты ранее проводимых испытаний положительных контрольных проб, если таковые проводились, подтверждающие подходящий характер критериев приемлемости, использованных для циклов испытаний.

Дополнительные сведения о пробе растворителя/вещества-носителя:

- используемый растворитель и соотношение его компонентов, если применимо;
- обоснование выбора растворителя для каждого исследуемого химического вещества;
- сведения о влиянии ацетонитрила на стабильность NAC и NAL при использовании его в качестве растворителя.

Приготовление растворов NAC и NAL, положительной контрольной пробы и исследуемого химического вещества

- характеристики растворов NAC и NAL (наименование поставщика, номер партии, точная масса NAC и NAL, объем растворителя, добавляемый для получения стандартного раствора);
- характеристики растворов положительной контрольной пробы (точная масса реактива, используемого в качестве положительной пробы, объем растворителя, добавляемый для получения контрольного раствора);
- характеристики растворов исследуемых химических веществ (точная масса исследуемого химического вещества, объем растворителя, добавляемый для получения анализируемого раствора).

Настройки оборудования для проведения анализа методом ВЭЖХ и порядок выполнения анализа

- тип оборудования ВЭЖХ, описание колонок ВЭЖХ и защитных колонок, детектора, автоматического пробоотборника;
- параметры выполнения анализа ВЭЖХ, такие как температура колонки, объем впрыска, расход газа-носителя и градиент.

Пригодность аналитической системы

- площадь пиков NAC и NAL на длине волны 281 нм для каждого стандартного раствора и параллельно обрабатываемой стандартной контрольной пробы А;

- графическое представление линейной градуировочной кривой с указанием значения R2;
- значение концентрации NAC и NAL в каждой параллельно обрабатываемой контрольной пробе А;
- среднее значение концентрации NAC и NAL (мкМ) в трех стандартных контрольных пробах А, значения СО и CV;
- значение концентрации NAC и NAL в стандартных контрольных пробах А и С.

Порядок выполнения анализа

Для стандартных контрольных проб:

- площадь пиков NAC и NAL на длине волны 281 нм для каждой параллельно обрабатываемой стандартной контрольной пробы А;
- среднее значение площади пиков NAC и NAL на длине волны 281 нм для девяти стандартных контрольных проб В и С в ацетонитриле, значения СО и CV (для обеспечения стабильности стандартных контрольных проб в процессе выполнения анализа);
- среднее значение площади пиков NAC и NAL на длине волны 281 нм с каждым используемым растворителем для трех соответствующих контрольных проб С (для расчета процентного значения деплеции (обеднения) NAC и NAL);
- концентрация NAC и NAL (мкМ) с каждым используемым растворителем для трех соответствующих стандартных контрольных проб С;
- среднее значение концентрации пептидов (мкМ) с каждым используемым растворителем для трех соответствующих стандартных контрольных проб С, значения СО и CV.

Для положительных контрольных проб:

- площадь пиков NAC и NAL на длине волны 281 нм для каждой параллельно обрабатываемой пробы;
- процентное значение деплеции (обеднения) NAC и NAL в каждой параллельно обрабатываемой пробе;
- среднее значение процентной деплеции (обеднения) NAC и NAL в трех параллельно обрабатываемых пробах, значения СО и CV.

Для каждой исследуемой химической продукции:

- сведения о появлении осадка в реакционной смеси по истечении времени инкубирования, если таковой наблюдается, а также о том, был ли осадок растворен повторно или удален путем обработки в центрифуге;
- сведения о наличии совместного элюирования;
- прочие наблюдения, важные для результатов исследования, если имеются;
- площадь пиков NAC и NAL на длине волны 281 нм для каждой параллельно обрабатываемой пробы;
- процентное значение деплеции (обеднения) NAC и NAL в каждой параллельно обрабатываемой пробе;
- среднее значение процентной деплеции (обеднения) NAC и NAL в трех параллельно обрабатываемых пробах, значения СО и CV;
- среднее значение для значений процентной деплеции (обеднения) NAC и процентной деплеции (обеднения) NAL;
- используемую модель построения прогнозов и прогнозное заключение по методу ADRA.

Проверка квалификации

- отметку о том, что испытательная лаборатория смогла подтвердить свою компетентность в использовании данного метода исследования до начала его регулярного применения путем проведения испытаний специально отобранной для этого химической продукции.

Оценка результатов

- описание любых незапланированных изменений, внесенных в методику испытаний;
- анализ результатов, полученных с применением метода исследования ADRA, с учетом соответствия их значений диапазонам, указанным в 3.3.4.7.

Выводы

3.4 Сенсибилизация кожи *in chemico.* Кинетический прямой анализ реакционной способности пептидов (kDPRA)

3.4.1 Исходные положения, пригодность и ограничения

3.4.1.1 Метод kDPRA предназначен для определения исходного молекулярного события АОР для сенсибилизации кожи, а именно реакций с белками, путем количественной оценки реакционной способности исследуемой химической продукции по отношению к модельным синтетическим пептидам,

в состав которых входит цистеин, на основе данных о продолжительности реакции и концентрации химической продукции [52], [53]. Метод основан на вычислении соответствующих значений кинетических констант скорости реакции и логарифма максимальной константы скорости (значения log k_{max} в $с^{-1}М^{-1}$) для исследуемой химической продукции с целью их последующего использования для квалификации химической продукции, способной вызывать сенсибилизацию кожи, относящейся к подклассу опасности 1А согласно СГС ООН (т. е. в составе подкласса опасности 1А), и химической продукции, не подлежащей отнесению к данному подклассу опасности (т. е. вне подкласса опасности 1А), а именно такой, которая должна классифицироваться как принадлежащая к подклассу опасности 1В или не имеющая категории согласно СГС ООН [54]. С теоретической точки зрения, знание константы скорости реакции между исследуемой химической продукцией и белками, входящими в состав кожи, позволяет рассчитать количество эпитопа, образующегося из некоторого заданного количества химической продукции, и определить размеры дозы, необходимой для образования количества эпитопа, достаточного для развития сенсибилизации, а следовательно, она может рассматриваться в качестве показателя, характеризующего не только скорость протекания реакции, но и сенсибилизирующую способность химической продукции. На практике по результатам оценивания сенсибилизирующих свойств 180 наименований химической продукции значение константы скорости реакции продемонстрировало наиболее строгую зависимость от уровня сенсибилизирующей способности исследуемой химической продукции среди всех контролируемых параметров, выполнение измерений которых предусматривается требованиями настоящего стандарта и [15], [16], [54].

3.4.1.2 Установлено, что применение метода kDPRA в лаборатории не требуют предварительного обучения специалистов [55]. В процессе валидационного исследования при определении химической продукции, принадлежащей к подклассу опасности 1А согласно СГС ООН, общее значение внутрилабораторной воспроизводимости для метода kDPRA по данным испытаний 24 наименований химической продукции составило 96 %, а среднее значение межлабораторной воспроизводимости — 88 % соответственно [55]. Результаты валидационного исследования [55] наряду с результатами других опубликованных исследований [3], которые содержат сведения о 180 химических веществах, входящих в область применения метода kDPRA, свидетельствуют о том, что метод kDPRA позволяет различать вещества, способные вызывать сенсибилизацию кожи и подлежащие отнесению к подклассу опасности 1А согласно СГС ООН, и химическую продукцию, не подлежащую отнесению к данному подклассу опасности согласно СГС ООН (т. е. вне подкласса опасности 1А), со сбалансированной точностью 85 %, чувствительностью 84 % (38/45) и специфичностью 86 % (116/135) по сравнению с результатами аналогичных исследований по методу LLNA [54]. Сравнение результатов, полученных с применением метода kDPRA, и сведений, представленных в базе данных OECD LLNA, формирование которой осуществлялось с учетом требований [66], также дает близкие к указанным значения рабочих характеристик[1)]. Для 123 (из 180) наименований исследованной химической продукции, имеющей данные о сенсибилизации кожи у человека [56], [57], сбалансированная точность прогнозирования развития кожной сенсибилизации у человека зафиксирована равной 76 %, чувствительность — 64 % (21/33), а специфичность — 89 % (80/90) [54]. Кроме того, следует учитывать, что для эталонных значений, установленных путем проведения испытаний на человеке, могут быть характерны существенно более высокие показатели неопределенности[2)]. В свою очередь при подготовке оценки эффективности применения методов определения сенсибилизации кожи, не требующих использования подопытных животных, важно иметь в виду, что применение метода LLNA, равно как и других методов, которые предполагают проведение испытаний на животных, может не в полной мере раскрывать характер воздействия исследуемой химической продукции на организм целевого биологического вида, представляющего основной интерес для исследователей, т. е. на организм человека. Так, после обработки набора данных для 123 наименований химической продукции, оценка сенсибилизирующего потенциала которой при воздействии на кожу человека была подготовлена с применением метода kDPRA, сопоставимые сбалансированные значения точности для метода LLNA при определении химической продукции, относимой к подклассу опасности 1А согласно СГС ООН, составили 73 %, чувствительности — 55 % (18/33), а специфичности — 91 % (82/90). Исходя из имеющихся данных, установлено, что область применения метода kDPRA включает

[1)] В результате сравнения набора данных исследований по методу LLNA, сформированного с учетом требований [66], сбалансированное значение точности рассматриваемого метода составило 85 %, чувствительности — 82 % (31/38), а специфичности — 88 % (102/116).

[2)] В результате сравнения набора данных о развитии кожной сенсибилизации у человека, сформированного с учетом требований [66], сбалансированное значение точности рассматриваемого метода составило 67 %, чувствительности — 53 % (9/17), а специфичности — 81 % (25/31).

в себя химическую продукцию с различными органическими функциональными группами, механизмами развития реакций, сенсибилизирующим потенциалом при воздействии на кожу (подтвержденным путем проведения испытаний *in vivo*), а также различными физико-химическими свойствами [54].

По итогам проведенной независимой экспертной оценки [67] метод kDPRA признан научно обоснованным и может применяться для отнесения химической продукции к подлежащей и не подлежащей к подклассу опасности 1А (т. е. вне подкласса опасности 1А) согласно СГС ООН [58]. Таким образом, метод kDPRA может рассматриваться (i) в качестве вспомогательного метода исследования, предназначенного для проведения более точной классификации химической продукции, включенной в класс опасности 1 согласно СГС ООН по способности вызывать сенсибилизацию кожи, в соответствии с дополнительно выделяемыми подкатегориями либо (ii) в качестве самостоятельно применяемого метода исследования, позволяющего, при условии получения положительных результатов, непосредственно классифицировать ту или иную химическую продукцию в соответствии с подклассом опасности 1А согласно СГС ООН, если подобная возможность предусмотрена действующим законодательством.

3.4.1.3 Под «исследуемой химической продукцией» для целей настоящего стандарта понимается продукция, которая подвергается испытаниям; использование данного термина не связано с возможностью применения метода kDPRA для исследования веществ и/или смесей. Данный метод неприменим для исследования соединений металлов, реакции которых с белками протекают в соответствии с механизмами, отличными от ковалентного связывания. Метод kDPRA измеряет реакционную способность исследуемой химической продукции только с цистеинсодержащими пептидами, соответственно, продукция проявляет высокую сенсибилизирующую способность с лизином, так как некоторые ацилгалогениды, фенольные эфиры или альдегиды относятся к области применения данного метода. Известно несколько наименований химической продукции подкласса опасности 1А согласно СГС ООН, способной вызывать сенсибилизацию кожи, которая реагируют исключительно с остатками лизина. Использование в рамках многоуровневой стратегии исследования данных испытаний, проводимых по методу DPRA или ADRA, для проверки наличия у исследуемой химической продукции высокой реакционной способности к лизину позволяет уточнить полученный результат во многих подобных случаях. Проведение исследований химической продукции, не образующей ковалентных связей с пептидами, но способствующей их окислению (т. е. димеризации цистеина), потенциально может приводить к получению завышенной оценки деплеции (обеднения) пептидов, а следовательно, к выдаче ложноположительных прогнозных заключений и/или отнесению исследуемой химической продукции к более высокому классу по реакционной способности, чем тот, к которому она принадлежит в действительности. Метод исследования, описанный в 3.4, представляет собой метод *in chemico*, не учитывающий взаимодействие исследуемой химической продукции с метаболической системой. Он не позволяет точно определить реакционную способность химической продукции, для раскрытия сенсибилизирующего потенциала которой при воздействии на кожу требуется ее предварительная биологическая активация ферментами (т. е. прогаптенами). Однако было установлено, что ограничения в отношении исследования прогаптенов менее выражены для химической продукции, способной оказывать сильное сенсибилизирующее воздействие, по сравнению с той химической продукцией, сенсибилизирующая способность которой невелика [54]. Химические вещества, которые проявляют свои сенсибилизирующие свойства после абиотической трансформации (т. е. прегаптены), правильно определяются с применением методов исследований *in chemico* [59], [60]. Напротив, оценка сенсибилизирующей способности прегаптенов, подверженных спонтанному быстрому окислению, с использованием метода kDPRA (равно как и любого другого метода исследования сенсибилизации кожи *in vitro*) может оказаться заниженной из-за присутствия отложенной фазы окисления, снижающей общую скорость реакции. Таким образом, результаты, полученные с применением данного метода испытаний, если они не свидетельствуют об отнесении исследуемой химической продукции к подклассу опасности 1А, следует рассматривать с учетом действующих ограничений (см. также приложение G), а именно:

- для ароматических аминов, катехинов или гидрохинонов может потребоваться получение дополнительных данных, подтверждающих их низкую реакционную способность даже в условиях, способствующих окислению;
- для ацилгалогенидов, фенольных эфиров или альдегидов, избирательно реагирующих с лизиновыми остатками, например, в соответствии с результатами исследований по методу DPRA или ADRA, могут потребоваться дополнительные данные для подтверждения низкой реакционной способности.

3.4.1.4 Исследуемая химическая продукция должна обладать растворимостью в соответствующем растворителе при максимально возможной концентрации, соответствующей 20 мМ.

3.4.1.5 Если исследуемая химическая продукция не может быть полностью растворена при указанном значении концентрации (см. 3.4.3.2.1 и 3.4.3.2.2), возможно проведение исследования при более низких значениях концентрации при условии, что они позволяют определить значение k_{max} (т. е. максимальное значение константы скорости (в $с^{-1}М^{-1}$), определяемое на основе кинетических показателей реакции для данного вещества в процессе применения метода kDPRA (см. 3.4.4.1.5)). В подобном случае положительный результат исследований, позволяющий при подготовке прогнозного заключения отнести исследуемую химическую продукцию к подклассу опасности 1А согласно СГС ООН (т. е. $\log k_{max} \geq -2{,}0$), все еще может рассматриваться как доказательство способности исследуемой продукции вызывать сенсибилизацию кожи, тогда как получение отрицательного результата (т. е. активность не выявлена или $\log k_{max} < -2{,}0$), напротив, не позволяет с уверенностью судить об отсутствии у химической продукции сенсибилизирующих свойств.

3.4.1.6 Метод kDPRA основан на использовании данных флуоресцентных измерений, поэтому при подготовке и проведении исследования важно предотвратить такие потенциально нежелательные явления, как автофлуоресценция исследуемого химического вещества, гашение флуоресценции или взаимодействие вещества с соответствующим флуоресцентным реактивом (монобромбиманом). Для этого необходимо провести анализ контрольных проб исследуемого вещества, описанных в 3.4.3.3.3, и оценить зависимость между определяемым уровнем деплеции (обеднения) пептидов и продолжительностью инкубирования. Химические вещества, имеющие в своей структуре первичную сульфгидридную группу (тиолы), не могут быть исследованы методом kDPRA, так как тиоловая группа способна вступать во взаимодействие с монобромбиманом (см. 3.4.2.1), вызывая флуоресценцию. Аналогичные указанным выше ограничения действуют для химических веществ, которые подвержены разложению с выделением свободной сульфгидридной группы в условиях, предусмотренных для выполнения анализа (нейтральная кислотность, водный раствор).

3.4.1.7 Метод исследования kDPRA считается технически применимым для проведения исследований многокомпонентных веществ и смесей веществ с известным составом, хотя возможность его применения для этих веществ не была изучена в процессе валидации метода. В этом случае общая степень чистоты многокомпонентного вещества может быть установлена на основе суммы долей его составляющих (исключая воду), а усредненное значение молекулярной массы — рассчитано исходя из собственных значений молекулярной массы каждой такой составляющей (исключая воду) и доли, которая на нее приходится. Эти значения степени чистоты и усредненные значения молекулярной массы затем могут быть использованы для вычисления значения массы исследуемой химической продукции, необходимого для приготовления раствора с концентрацией 20 мМ. Результаты исследований смесей и многокомпонентных веществ известного состава могут носить нелинейный характер, соответственно, при их оценивании следует руководствоваться положениями, приведенными в 3.4.4.2.2. Что касается смесей и веществ с неопределенным или переменным составом, продуктов комплексных реакций или биологических материалов (т. е. веществ, в совокупности рассматриваемых как UVCB), то оценить их свойства с использованием текущей модели построения прогнозов невозможно из-за необходимости определения молярных соотношений. При изучении целесообразности проведения исследований определенных смесей веществ, трудно поддающейся анализу химической продукции (например, не обладающей достаточной стабильностью) либо химической продукции, не относящейся к области применения, описанной в настоящем стандарте, следует заранее оценить возможность получения научно обоснованных результатов после проведения испытаний. При наличии доказательств, свидетельствующих о непригодности метода для исследований определенных категорий химической продукции, его не следует применять с этими конкретными категориями химической продукции.

3.4.1.8 Метод kDPRA предназначен для установления различия между химической продукцией, способной вызывать сенсибилизацию кожи и подлежащей отнесению к подклассу опасности 1А согласно СГС ООН, и химической продукцией, не подлежащей отнесению к подклассу опасности 1А (т. е. вне подкласса опасности 1А) согласно СГС ООН [54]. Как и для любого метода исследования, основанного на ключевых событиях, эффективность применения метода kDPRA необходимо дополнительно оценить в сочетании с альтернативными методами исследования, такими как DPRA или ADRA, в рамках интегрированных подходов IATA или DA с целью всестороннего анализа причин развития сенсибилизации кожи [54], [61].

3.4.2 Сущность метода испытания

3.4.2.1 Метод kDPRA представляет собой модификацию метода исследования DPRA, реализуемого в условиях *in chemico* (данный метод описан в 3.2). По аналогии с DPRA метод kDPRA предусматривает использование цистеинсодержащего пептида (Ac-RFAACAA-COOH), но в отличие от него исключает

возможность использования лизинсодержащих пептидов. Конечные значения концентрации раствора используемого для испытаний пептида (0,5 мМ) и реакционной среды (25 % ацетонитрила в фосфатном буферном растворе), установленные для kDPRA и DPRA, одинаковы. В то время как DPRA описывает выполнение измерений лишь при одном значении концентрации исследуемой химической продукции (5 мМ в случае использования цистеинсодержащего пептида) и лишь в одной временной точке (≥24 ч), kDPRA осуществляет параллельное проведение реакции с пятью различными значениями концентрации (5, 2,5, 1,25, 0,625 и 0,312 5 мМ) и в шести различных временных точках (10, 30, 90, 150, 210 и 1 440 мин) при значении температуры (25 ± 2,5) °С. Значение остаточной концентрации цистеинсодержащего пептида по окончании времени, отведенного для протекания реакции, измеряется остановкой реакции путем добавления монобромбимана (monobromobimane — mBrB, МББ; CAS 74235-78-2). Обладающий высокой реакционной способностью и не способный к самостоятельной флуоресценции МББ быстро вступает во взаимодействие с несвязанными цистеиновыми молекулами модельного пептида, образуя флуоресцентный комплекс, интенсивность свечения которого затем измеряют с целью количественного определения концентрации таких молекул. Если показатель деплеции (обеднения) пептида при самой высокой концентрации последнего превышает значение 13,89 % (пороговый уровень, используемый при испытаниях по методу DPRA для определения положительного результата на основе модели построения прогнозов, включающей только данные о цистеине) и он статистически значимым образом отличается от аналогичных показателей для контрольных проб, содержащих только этот пептид, то выполняют все дальнейшие необходимые расчеты (в противном случае исследуемое химическое вещество признают неактивным в соответствии с моделью построения прогнозов, показанной в 3.4.4.3.1).

Строят график, отражающий зависимость натурального логарифма для значений концентрации не подвергшегося деплеции (обеднению) пептида от концентрации исследуемой химической продукции в каждый выбранный момент времени. Если зависимость на графике носит линейный характер (коэффициент корреляции превышает 0,90), определяют наклон этой кривой, затем делят соответствующее значение на значение времени инкубирования, чтобы получить значение константы скорости в [мин$^{-1}$мМ$^{-1}$]. Переводят данное значение константы скорости в [с$^{-1}$М$^{-1}$] и вычисляют логарифм. Максимальное значение по итогам наблюдений в любой момент времени принимают в качестве log k_{max} и, таким образом, устанавливают максимальное значение константы скорости — первичного показателя, определяемого в процессе испытаний. Данное значение дает количественную оценку максимальной кинетической скорости реакции исследуемой химической продукции с используемым для испытаний пептидом. Значения кинетической скорости реакции, описывающие процесс истощения цистеинсодержащего пептида, служат для установления различия между химической продукцией, способной вызывать сенсибилизацию кожи и подлежащей отнесению к подклассу опасности 1А согласно СГС ООН, и химической продукцией, не подлежащей отнесению к подклассу опасности 1А (т. е. вне подкласса опасности 1А) согласно СГС ООН. К подклассу опасности 1А согласно СГС ООН при подготовке прогнозного заключения относят химическую продукцию, демонстрирующую значение log kmax ≥ -2,0. В дальнейшем полученное значение кинетической константы скорости также может быть использовано в рамках реализации комплексных подходов, таких как IATA или DA, для оценивания сенсибилизирующего потенциала исследуемой химической продукции при ее воздействии на кожу, выполняемого по непрерывной шкале, как это предусмотрено требованиями оценки рисков [54], [61].

3.4.2.2 До того как приступить к регулярному применению метода испытания, лаборатории должны подтвердить свою техническую компетентность путем исследования девяти специально отобранных химических веществ, перечисленных в приложении Н.

3.4.3 Методика испытаний

В основу рассматриваемого метода положен протокол kDPRA DPRA DB-ALM № 217 [62], соответствующий протоколу, ранее принятому для проведения валидационного испытания, в роли координаторов которого выступали заинтересованные предприятия промышленности. Этот протокол рекомендован для повсеместного использования при внедрении и применении данного метода в лабораторной практике. Сведения об основных составляющих и процедурах метода kDPRA представлены ниже.

3.4.3.1 Приготовление растворов цистеинсодержащего пептида

Исходный раствор цистеинсодержащего синтетического пептида (Ac-RFAACAA-COOH) со степенью чистоты не менее 95 % должен быть свежеприготовленным перед началом инкубирования пептида с исследуемой химической продукцией. Конечное значение концентрации цистеинсодержащего пептида в фосфатном буферном растворе с значением pH = 7,5 должно составлять 0,667 мМ для исследуемой химической продукции, растворяемой в ацетонитриле, и 1,0 мМ — для исследуемой химической продукции, растворяемой в фосфатном буфере со значением pH = 7,5.

3.4.3.2 Приготовление пробы исследуемой химической продукции

3.4.3.2.1 Перед проведением анализа контролируют растворимость исследуемой химической продукции в подходящем веществе-носителе. В качестве носителя используют химически неактивное, способное смешиваться с водой вещество, обеспечивающее полное растворение исследуемой химической продукции. Растворимость контролируют визуально, при этом достаточным подтверждением полного растворения этой продукции считают образование прозрачного раствора. Наиболее предпочтительным для использования веществом-носителем является ацетонитрил. Если исследуемая химическая продукция не растворяется в ацетонитриле, следует рассмотреть возможность ее растворения в фосфатном буферном растворе со значением pH = 7,5. Целесообразность использования других видов веществ-носителей к настоящему времени еще не проверена экспериментально, однако такое использование не исключается, если доказано, что вещества-носители не оказывают влияния на анализ. Это означает, что все контрольные пробы могут быть приготовлены с использованием того же самого вещества-носителя, а значения скорости реакции, получаемые для положительной контрольной пробы и исследуемой химической продукции согласно списку для проверки квалификации, находятся в пределах диапазонов, указанных в 3.4.4.2.1 и приложении Н к нему соответственно. Важно отметить, что использование в качестве вещества-носителя ДМСО может привести к димеризации пептидов.

3.4.3.2.2 Предварительно подготовленные навески исследуемой химической продукции помещают в стеклянные флаконы и растворяют непосредственно перед проведением испытаний в соответствующем веществе-носителе, описанном в 3.4.3.2.1, в концентрации 20 мМ. Разбавление растворов исследуемой химической продукции выполняют последовательно, добиваясь получения значений концентрации 20, 10, 5, 2,5 и 1,25 мМ.

3.4.3.3 Приготовление контрольных проб

3.4.3.3.1 В качестве положительной контрольной пробы (ПК) используют раствор коричного альдегида (CAS 104-55-2, степень чистоты ≥95 %, чистый для пищевой промышленности). Его растворяют в концентрации 20 мМ в ацетонитриле непосредственно перед началом испытаний. Выполняют последовательные разбавления, добиваясь получения значений концентрации 20, 10, 5, 2,5 и 1,25 мМ. Использовать для приготовления положительных контрольных проб другие вещества не рекомендуется, поскольку данный вид анализа предусматривает выполнение точных измерений скорости протекания реакции, и в этих условиях согласованное использование одного и того же вида положительных контрольных проб обеспечивает возможность адекватного количественного сравнения получаемых результатов с результатами различных лабораторий, с данными валидационных исследований, а также с результатами испытаний контрольных проб за прошедший период внутри одной лаборатории.

3.4.3.3.2 Контрольная проба вещества-носителя (КН), являющаяся одновременно и отрицательной контрольной пробой, включает в себя раствор пептида, приготовленный с использованием буферного раствора и вещества-носителя соответственно, но без добавления к ним исследуемого вещества или материала ПК. Уровень деплеции (обеднения) пептидов в пробах, инкубированных с добавлением исследуемой химической продукции или ПК, рассчитывают относительно соответствующего уровня для КН.

3.4.3.3.3 Анализу подвергают также контрольные пробы исследуемой химической продукции, представляющие собой растворы с определенной концентрацией исследуемой химической продукции в веществе-носителе и буферном растворе, но без добавления пептида. Такие контрольные пробы предназначены для выявления влияния исследуемой химической продукции (автофлуоресценции и гашения флуоресценции) при выполнении флуоресцентных измерений, например для оценки взаимодействия этого вещества с монобромбиманом и для определения соответствующих фоновых показателей.

3.4.3.3.4 Холостая контрольная проба (ХК) используется для выполнения измерений фоновых показателей и включает в себя вещество-носитель и буферный раствор без добавления исследуемой химической продукции, ПК или пептида.

3.4.3.4 Инкубирование исследуемой химической продукции с раствором цистеинсодержащего пептида

Последовательные разведения исследуемой химической продукции и ПК предварительно выполняют на 96-луночных микротитровальных планшетах, называемых планшетами для нанесения. После этого для каждого используемого значения времени экспозиции подготавливают отдельный 96-луночный планшет из материала черного цвета, называемый аналитическим планшетом, в лунки которого помещают необходимые для протекания реакции вещества (т. е. исходный раствор пептида, вещество-носитель и буферный раствор), соблюдая заранее установленную схему заполнения планшета. Примером последней может служить соответствующая схема, рекомендованная протоколом kDPRA [62]. Для каждого значения концентрации исследуемой химической продукции анализу должны подвер-

гаться три параллельно обрабатываемые пробы. Для начала реакции соответствующие разбавления исследуемой химической продукции и ПК переносят со вспомогательных планшетов на аналитические. Если вследствие низкой растворимости исследуемой химической продукции в воде непосредственно после добавления ее раствора к раствору пептидов в последнем образуется осадок, точно определить оставшееся количество испытуемого вещества в растворе для реакции с пептидами не представляется возможным. В подобных случаях положительный результат исследования (т. е. $\log k_{max} \geq -2{,}0$) все еще может считаться достоверным, тогда как отрицательный результат (т. е. активность не выявлена или $\log k_{max} < -2{,}0$), напротив, следует использовать с надлежащей осторожностью (см. также положения 3.4.1.4, касающиеся порядка исследования по методу kDPRA исследуемой химической продукции, которая не может быть полностью растворена при значении концентрации 20 мМ). После добавления исследуемой химической продукции и ПК планшеты герметизируют газонепроницаемой адгезивной фольгой и встряхивают при 200 об/мин в течение 5 мин. Перед добавлением раствора МББ аналитические планшеты инкубируют в темном месте при температуре (25 ± 2,5) °С с использованием нескольких значений периода инкубирования (времени экспозиции), т. е. 10, 30, 90, 150, 210 и 1 440 мин. Необходимая продолжительность инкубирования может быть скорректирована для выполнения анализа в таких временных точках, выбор которых наилучшим образом подходит для исследования конкретной исследуемой химической продукции (например, при работе с исследуемой химической продукцией, для которой характерна высокая скорость протекания реакций, может быть целесообразно использовать сокращенные периоды инкубирования). Исключение составляет временной отрезок, равный 1 440 мин, использование которого для испытаний обязательно во всех случаях, так как он соответствует периоду инкубации, установленному для метода DPRA. Периодом инкубации (времени экспозиции) следует считать промежуток времени между моментом переноса разбавлений исследуемой химической продукции и ПК в лунки аналитического планшета и моментом добавления туда МББ.

3.4.3.5 Измерения интенсивности флуоресценции

По истечении выбранного периода инкубации (времени экспозиции) в лунки аналитических планшетов (по одному на каждое значение времени экспозиции), избегая попадания на них света, быстро добавляют свежеприготовленный раствор МББ (в концентрации 3 мМ) в ацетонитриле. Планшеты снова герметизируют газонепроницаемой адгезивной фольгой и встряхивают при 200 об/мин в течение 5 мин. После этого определяют интенсивность наблюдаемой флуоресценции, используя значения длины волны 390 нм для фильтра возбуждения и 480 нм — для фильтра эмиссии соответственно.

3.4.4 Данные и протоколы испытаний

3.4.4.1 Интерпретация данных

3.4.4.1.1 Для оценки данных рекомендуется использовать таблицу в формате Excel, предлагаемую вместе с протоколом DB-ALM. Подробные указания приведены в протоколе DB-ALM № 217 [62].

3.4.4.1.2 Для каждого периода инкубации (времени экспозиции) t вычисляют значения следующих параметров:

- среднее арифметического и стандартное отклонение интенсивности флуоресценции для 12 холостых контрольных проб (ХК);
- среднее арифметического и стандартное отклонение интенсивности флуоресценции для 12 контрольных проб вещества-носителя (КН);
- скорректированные значения КН путем вычитания из первоначального значения КН среднего значения ХК;
- скорректированные значения исследуемой химической продукции и ПК путем вычитания из значений, полученных для каждого значения концентрации исследуемой химической продукции и ПК, соответствующего значения, полученного для контрольной пробы исследуемой химической продукции.

3.4.4.1.3 С целью определения процентного значения деплеции (обеднения) пептидов для каждого значения концентрации исследуемой химической продукции при каждом значении времени экспозиции выполняют следующий расчет:

$$\text{Относительная деплеция (обеднение) пептида [\%]} = \left[1 - \left(\frac{\text{Исправленное значение для исследуемой химической продукции или ПК}}{\text{Среднее исправленное значение для КН}}\right)\right] \times 100\ \%.$$

3.4.4.1.4 Рассчитывают среднее арифметическое и стандартное отклонение для трех параллельно обрабатываемых проб при каждом значении концентрации исследуемой химической продукции (при каждом значении времени экспозиции). Чтобы узнать, являются ли значения концентрации

пептидов, измеренные в трех параллельно обрабатываемых пробах, статистически значимо более низкими по сравнению со значениями концентрации в 12 лунках с КН, используют оценку на основе t-критерия Стьюдента.

3.4.4.1.5 При выполнении испытаний по методу kDPRA значения кинетической константы скорости реакции определяют в порядке, указанном ниже, если (i) деплеция (обеднение) пептида в размере, большем или равном 13,89 %, отмечается при самом высоком значении концентрации исследуемой химической продукции (при конечном значении концентрация исследуемой химической продукции 5 мМ) в заданный момент времени и если (ii) значение расхождения статистически отличается от значения, установленного для КН. Основанием для принятого «критерия позитивности» является аналогичный «положительный» критерий оценивания реакционной способности пептидов, который предусмотрен моделью построения прогнозов для метода DPRA, включающий в себя только данные о цистеине и подробно описанный в приложении G. Если этот положительный критерий не выполняется, исследуемая химическая продукция признается неактивной в соответствии с моделью построения прогнозов, представленной в 3.4.4.3.1.

Строят график, отражающий зависимость натурального логарифма значений концентрации не подвергшегося деплеции (обеднению) пептида (100%-ная относительная деплеция (обеднение) пептида) от концентрации исследуемой химической продукции в каждом выбранном моменте времени. Если зависимость на графике носит линейный характер (коэффициент корреляции превышает 0,90), определяют наклон этой кривой. Абсолютное значение данного отрицательного наклона соответствует значению наблюдаемой кинетической константы реакции (значению константы скорости кажущегося первого порядка $k_{\text{наблюдения}}$ в мМ$^{-1}$). Используя значение $k_{\text{наблюдения}}$ для каждого времени экспозиции, производят расчет значений кинетической константы реакции (k_t) для каждого значения концентрации и каждого периода инкубации (времени экспозиции) t следующим образом, а именно:

$$k_t\left[M-1_s-1\right]=k_{\text{наблюдения}}\cdot\frac{1000}{60t},$$

где t — время экспозиции в минутах. Если линейная зависимость не обнаружена (т. е. коэффициент корреляции составляет менее 0,90), дальнейшие действия выполняют в соответствии с рекомендациями, изложенными в 3.4.4.2.2.

3.4.4.1.6 Для каждого времени экспозиции t со значением корреляции, превышающим 0,90, рассчитывают десятичный логарифм ($\log k_t$) и принимают наибольшее полученное значение в качестве $\log k_{max}$.

3.4.4.2 Критерии приемлемости

3.4.4.2.1 Должны быть соблюдены следующие критерии приемлемости для получения достоверных результатов исследования. Если один или несколько из указанных критериев не выполняются, весь цикл анализа повторяют.

a) ПК: Значение $\log k$ для ПК по истечении 90 мин ($\log k_{90\text{min}}$) должно находиться в диапазоне от –1,75 до –1,40 М$^{-1}$с$^{-1}$. Если значение $\log k_{90\ \text{min}}$ получить не удалось, например по той причине, что признаки наличия реакционной способности все еще не являются статистически значимыми, можно воспользоваться аналогичным значением для 150 мин экспозиции ($\log k_{150\text{min}}$), которое должно находиться в промежутке от –1,90 до –1,45 М$^{-1}$с$^{-1}$.

b) КН: Коэффициент вариации, рассчитанный для 12 значений КН на одном и том же планшете, должен составлять менее 12,5 % по меньшей мере для пяти из шести значений времени экспозиции.

3.4.4.2.2 Данные, полученные для исследуемой химической продукции, подвергают дополнительной оценке с целью выявления побочных факторов, которые могли бы повлиять на окончательные результаты исследования.

(i) Прекращение реакции: Если существенная деплеция (обеднение) пептидов отмечалась в ранних временных точках, но не происходила в дальнейшем, то это свидетельствует либо о нелинейном течении реакции, присущем данной конкретной исследуемой химической продукции, либо о том, что эксперимент был проведен с отклонениями. В подобных случаях весь цикл анализа повторяют. Если при новых повторениях картина, наблюдавшаяся ранее, сохраняется, то нелинейный кинетический характер реакции считают доказанным и определяют значение константы скорости на основе показателей, полученных на ранних этапах экспозиции.

(ii) Зависимость «концентрация — эффект»: В редко встречающихся ситуациях зависимость «концентрация — эффект» может быть нелинейной, при этом процесс истощения пептида наблюдается достаточно отчетливо. В подобных случаях для расчета значений константы скорости не может быть

использован метод определения наклона кривой, так как значение коэффициента регрессии для нее составляет $R_2 < 0{,}90$. Вместо этого необходимые значения могут быть рассчитаны исходя из индивидуальных значений показателя истощения в соответствии со следующей формулой:

$$k = \left[ln\left(100 / \left(100 - dp\right)\right)\right] / \left(E \cdot t\right),$$

где dp — показатель деплеции (обеднения), в %, E — концентрация исследуемой химической продукции, а t — период инкубации (время экспозиции). Данная формула позволяет рассчитать значения константы скорости в каждой временной точке t и при каждом значении концентрации E для значений деплеции (обеднения), превышающих пороговое значение, равное 13,89 %. Для каждой временной точки t используют среднее значение для различных значений концентрации, а затем подобно тому, как это происходит в базовом случае, выбирают значение k_{max}, соответствующее самой высокой скорости по всем заданным временным точкам.

В таком случае необходимо аналогичным образом повторить выполнение анализа, чтобы определить, является ли эта нелинейность присущей исследуемой химической продукции или это отклонения в ходе исследования. Если нелинейность воспроизводима, то для вычисления окончательного результата применяют представленный выше порядок расчетов, основанный на использовании индивидуальных значений показателя деплеции (обеднения).

(iii) Помехи при измерениях интенсивности флуоресценции, т. е. автофлуоресценция или тушения флуоресценции: Контрольные лунки, содержащие исследуемую химическую продукцию без добавления к ней исследуемого пептида, предназначены для выявления случаев автофлуоресценции исследуемой химической продукции или случаев тушения им искомой флуоресценции. Поскольку результаты скорректированны с учетом уровня автофлуоресценции, зарегистрированного в лунках с контрольной пробой исследуемой химической продукции, компенсация низких значений автофлуоресценции не представляет затруднений, однако при ее высокой интенсивности показатели флуоресценции аддуктов пептида и собственной флуоресценции вещества могут быть не полностью аддитивными по отношению друг к другу, таким образом, простое вычитание значений, соответствующих автофлуоресценции, может приводить к искажению оценки истощения пептида, связанному не с ослабеванием флуоресцентного сигнала, а именно с указанным фактом неаддитивности. Соответственно, рекомендуется проверить, зависит ли наблюдаемая деплеция (обеднение) пептида от времени. Если подобная зависимость не подтверждается и при этом регистрируется автофлуоресценция, то предполагается, что происходит уменьшение концентрации от флуоресценции. Явление тушения флуоресценции также может привести к «кажущейся деплеции (обеднению)» пептида, это происходит в самом начале, в дальнейшем измеряемое значение деплеции (обеднения) не увеличивается со временем. Если выполняются оба указанных условия, то это свидетельствует о том, что видимый уровень деплеции (обеднения) обусловлен тушением флуоресценции. Такие случаи встречаются редко. Если имеющиеся результаты вызывают сомнения, испытания можно повторить, однако если описанный эффект выражен четко, повторение не требуется. В подобной ситуации оценка исследуемой химической продукции не может быть получена с применением метода kDPRA (в силу технических причин), за исключением случаев, когда аналогичные измерения могут быть выполнены с использованием другого флуоресцентного маркера, не вызывающего автофлуоресценцию и не подверженного гашению (см. раздел II приложения 1 к протоколу DB-ALM [62]).

(iv) Все перечисленные выше случаи подробно описаны в протоколе DB-ALM, а в процессе обработки информации с использованием шаблона Excel, предлагаемого вместе с протоколом DB-ALM, для них автоматически генерируются соответствующие предупреждения.

3.4.4.3 Модель построения прогнозов

3.4.4.3.1 Метод kDPRA предусматривает использование данных о кинетической скорости реакции деплеции (обеднения) пептида для различия между исследуемой химической продукцией, способной вызывать сенсибилизацию кожи и подлежащей отнесению к подклассу опасности 1А согласно СГС ООН, и исследуемой химической продукцией, не подлежащей отнесению к подклассу опасности 1А (т. е. вне подкласса опасности 1А) согласно СГС ООН [54]. Любые результаты, полученные с применением данного метода, если они не свидетельствуют о необходимости отнесения исследуемой химической продукции к подклассу опасности 1А, следует рассматривать с учетом ограничений, описанных в 3.4.1.3 и приложении G.

3.4.4.3.2 Если результат log k_{max} принимает значение, близкое к пороговому значению минус 2,0 и находящееся в установленном для kDPRA граничном диапазоне (т. е. в интервале значений между минус 1,93 и минус 2,06 [63]), то сделать окончательный прогноз невозможно. В подобных случаях для подготовки достоверного прогнозного заключения испытания должны проводиться повторно либо должны использоваться дополнительные сведения/данные, получаемые из других источников.

Таблица 5 — Модель построения прогнозов для kDPRA

Скорость реакции	Прогнозное заключение по методу kDPRA
$\log k_{max} \geq -2{,}0$	Подкласс опасности 1А согласно СГС ООН
Неактивное вещество или $\log k_{max} < -2{,}0$	Не относится к подклассу опасности 1А* согласно СГС ООН (вне подкласса опасности 1А)
* Дальнейшее деление исследуемой химической продукции на продукцию, принадлежащую к подклассу опасности 1В согласно СГС ООН, и продукцию, не имеющую класса опасности согласно СГС ООН, возможно лишь при наличии информации, полученной с применением других методов. В зависимости от общего контекста проведения исследования (например, в соответствии с требованиями IATA, DA) такая информация может быть получена как до выполнения анализа по методу kDPRA, так и после него.	

3.4.4.3.3 Значение кинетической константы скорости может быть дополнительно использовано в рамках реализации комплексных подходов, таких как IATA или DA, для оценивания сенсибилизирующего потенциала исследуемой химической продукции при его воздействии на кожу по непрерывной шкале, как это предусмотрено требованиями оценки рисков [54], [61].

3.4.4.4 Протокол испытаний

Протокол испытаний должен включать в себя следующую информацию:

Исследуемая химическая продукция и контрольные пробы (положительная контрольная проба и проба растворителя/вещества-носителя)

Однокомпонентное вещество (исследуемая химическая продукция или контрольная проба):

- химическое наименование, а именно название (названия) по IUPAC или CAS, регистрационный номер (номера) CAS, коды SMILES или InChI, структурную формулу и/или другие отличительные признаки;
- физико-химические свойства, такие как агрегатное состояние, внешний вид, растворимость в воде, молекулярная масса, а также другие дополнительные физико-химические свойства;
- степень чистоты, химическую характеристику примесей, с учетом целесообразности и возможности практической реализации;
- способ обработки перед началом испытаний, если такая обработка проводилась (подогрев, измельчение);
- значение (значения) концентрации вещества при проведении испытаний;
- сведения об условиях хранения и сведения о стабильности вещества, если таковые имеются.

Дополнительные сведения о положительной контрольной пробе:

- ссылки на результаты предыдущих испытаний положительных контрольных проб, если таковые проводились, подтверждающие подходящий характер критериев приемлемости, использованных для циклов испытаний.

Дополнительные сведения о пробе растворителя/вещества-носителя:

- описание используемого растворителя/вещества-носителя и соотношение его компонентов, если таковые имеются;
- обоснование выбора растворителя, отличного от ацетонитрила, и исследовательная оценка влияния растворителя на стабильность пептида.

Пептид

- сведения о поставщике, партии, степени чистоты.

Флуоресцентный анализ

- сведения об используемом флуориметре (например, модель и тип прибора), включая выбранные настройки длины волны.

Проверка квалификации

- отметку о том, что испытательная лаборатория смогла подтвердить свою компетентность в использовании данного метода исследования до начала его регулярного применения путем проведения испытаний специально отобранной для этого химической продукции.

Оценка результатов

- описание любых незапланированных изменений, внесенных в методику испытаний;
- анализ результатов, полученных с применением метода исследования kDPRA, с учетом соответствия их значений диапазонам, указанным в 3.4.4.3.2;

- прочие наблюдения, важные для результатов исследования, например, сведения о появлении осадка в реакционной смеси по истечении времени инкубирования, если это имело место, и о том, был ли образовавшийся осадок растворен повторно или удален путем обработки в центрифуге.

Выводы

Приложение А
(обязательное)

Известные ограничения, связанные с применением метода кинетического прямого анализа реакционной способности пептидов

В таблице А.1 представлены известные ограничения для метода DPRA.

Таблица А.1 — Ограничения для метода DPRA

Класс веществ/характер помех	Потенциальные причины занижения оценки опасности или возникновения помех	Интерпретация данных	Примеры описываемых веществ
Металлы и неорганические соединения	Известно, что реакции таких веществ с белками протекают в соответствии с механизмами, отличными от ковалентного связывания	Метод не подходит для применения	Сульфат никеля: 7786-81-4
Прогаптены	Такие химические вещества требуют для раскрытия своего сенсибилизирующего потенциала предварительной биологической активации ферментами и не могут быть определены с помощью данного метода до тех пор, пока они не были соответствующим образом активированы, например путем автоокисления до уровня, который можно наблюдать *in vivo* у животных/человека. В ходе исследования, однако, нельзя гарантировать успешность подобной активации	Существует вероятность получения ложноотрицательных результатов. Любые отрицательные результаты, полученные с применением данного метода, следует рассматривать с учетом указанных ограничений и в сочетании с информацией из других источников в контексте соответствующего IATA или DA	Диэтилентриамин: 111-40-0 (испытания на человеке: 1A, LLNA: данные отсутствуют)
Прегаптены	Такие химические вещества проявляют свои сенсибилизирующие свойства после абиотической трансформации и в большинстве случаев поддаются точному определению при помощи данного метода		Линалоол: 78-70-6
Химические вещества с высоким уровнем поглощения на длине волны 220 нм и временем удерживания, аналогичным времени удерживания пептидов (совместное элюирование)	В условиях совместного элюирования интегрирование пика пептида, а следовательно, и расчет его процентного значения деплеции (обеднения) становятся невозможны	Если совместное элюирование исследуемого химического вещества наблюдается как с цистеин-, так и с лизинсодержащими пептидами или же только с цистеинсодержащими пептидами, то при составлении протокола испытаний результаты такого анализа следует определить как «сомнительные» и рассмотреть возможность использования альтернативной конфигурации ВЭЖХ (см. 3.2.4.6). Если совместное элюирование наблюдается только с лизинсодержащими пептидами, то может использоваться модель построения прогнозов «цистеин 1:10», показанная в таблице 2	Салициловая кислота: 69-72-7

Окончание таблицы А.1

Класс веществ/характер помех	Потенциальные причины занижения оценки опасности или возникновения помех	Интерпретация данных	Примеры описываемых веществ
Вещества с неизвестным или переменным составом, продукты комплексных реакций или биологические материалы	Отсутствует возможность соблюдения определенного молярного соотношения между заданным пептидом и исследуемым химическим веществом	Неизвестно	Вещества с неопределенным или переменным составом, химические выбросы, продукты и смеси с неопределенным или переменным составом
Химические вещества, нерастворимые в соответствующем растворителе при конечном значении концентрации 100 мМ	Отсутствует возможность обеспечения достаточной экспозиции исследуемого вещества	Если исследуемое вещество не может быть полностью растворено при указанном значении концентрации, это не исключает возможности проведения исследования с более низкими значениями концентрации, обеспечивающими его полное растворение. В подобном случае положительный результат исследования может рассматриваться как доказательство способности исследуемого химического вещества вызывать кожную сенсибилизацию, тогда как получение отрицательного результата, напротив, не позволяет с уверенностью судить об отсутствии у вещества сенсибилизирующих свойств	Неизвестно
Химические вещества, образующие осадок в реакционном растворе	Отсутствует возможность обеспечения достаточной экспозиции исследуемого вещества	Получение отрицательного результата не позволяет с уверенностью судить об отсутствии у вещества сенсибилизирующих свойств	Изопропилмиристат CAS: 110-27-0
Химические вещества, не образующие ковалентных связей с цистеинсодержащими пептидами, но способствующие их окислению (т. е. димеризации цистеина)	Исследование может приводить к получению завышенной оценки деплеции (обеднения) цистеинсодержащих пептидов, а следовательно, к выдаче ложноположительных прогнозных заключений		ДМСО Окислитель
Химические вещества, растворимые только в ДМСО	Воздействие ДМСО приводит к дополнительной деплеции (обеднению) пептидов за счет димеризации цистеина, что существенно увеличивает его фоновый уровень истощения	Существует вероятность получения ложноотрицательных результатов	Неизвестно

Приложение В
(обязательное)

Вещества, рекомендованные к использованию для проверки квалификации. Сенсибилизация кожи *in chemico*. Прямой анализ реакционной способности в отношении пептидов

До того как приступить к регулярному применению метода DPRA, лаборатории должны подтвердить свою техническую компетентность, подготовив на его основе достоверный прогноз сенсибилизирующей способности для 10 специально отобранных химических веществ, перечисленных в таблице А.1, и правильно определив значения деплеции (обеднения) цистеина и лизина в соответствующем нормированном диапазоне для 8 из 10 таких контрольных веществ для каждого пептида. Вещества согласно приведенному списку для проверки квалификации подобраны таким образом, чтобы охватить весь диапазон возможных реакций при развитии сенсибилизации кожи. Дополнительными критериями отбора послужили доступность этих веществ для коммерческого приобретения, наличие для них как достоверных справочных данных, полученных *in vivo,* так и достоверных данных, полученных *in vitro* с использованием метода DPRA, а также положительный опыт их практического использования в ходе соответствующего валидационного исследования, в роли координатора которого выступала EURL ECVAM, для подтверждения успешной реализации рассматриваемого метода лабораториями, принимавшими участие в исследовании.

Таблица В.1 — Список рекомендованных веществ для проверки квалификации при проведении испытаний по методу прямого анализа реакционной способности в отношении пептидов

Вещества, используемые для проверки квалификации	Регистрационный номер CAS	Агрегатное состояние	Прогнозное заключение по итогам исследований *in vivo*[1)]	Прогнозное заключение по методу DPRA[2)]	Диапазон[3)] деплеции (обеднения) пептида цистеина, в %	Диапазон[3)] деплеции (обеднения) пептида лизина, в %
2,4-динитрохлорбензол	97-00-7	Твердое	Вызывает сенсибилизацию (экстремальную)	Положительное	90—100	15—45
Оксазолон	15646-46-5	Твердое	Вызывает сенсибилизацию (экстремальную)	Положительное	60—80	10—55
Формальдегид	50-00-0	Жидкое	Вызывает сенсибилизацию (сильную)	Положительное	30—60	≤24
Бензилиденацетон	122-57-6	Твердое	Вызывает сенсибилизацию (умеренную)	Положительное	80—100	≤7
Фарнезаль	19317-11-4	Жидкое	Вызывает сенсибилизацию (слабую)	Положительное	15—55	≤25
2,3-бутанедион	431-03-8	Жидкое	Вызывает сенсибилизацию (слабую)	Положительное	60—100	10—45
1-бутанол	71-36-3	Жидкое	Не вызывает сенсибилизации	Отрицательное	≤7	≤5,5
6-метилкумарин	92-48-8	Твердое	Не вызывает сенсибилизации	Отрицательное	≤7	≤5,5
Молочная кислота	50-21-5	Жидкое	Не вызывает сенсибилизации	Отрицательное	≤7	≤5,5
4-метокси-ацетофенон	100-06-1	Твердое	Не вызывает сенсибилизации	Отрицательное	≤7	≤5,5

Окончание таблицы В.1

[1] Прогнозные заключения о степени опасности (сенсибилизирующей способности) химических веществ *in vivo* подготовлены в соответствии с данными, полученными по методу LLNA [5]. Степень сенсибилизирующей способности веществ *in vivo* оценивалась с использованием критериев, предложенных ECETOC [8]. [2] Прогнозное заключение, подготавливаемое по результатам применения метода DPRA, должно рассматриваться в контексте IATA или DA и с учетом положений 3.2.1.2 и 3.2.1.4. [3] Границы диапазонов определены с учетом по меньшей мере 10 различных процентных значений деплеции (обеднения), представленных шестью независимыми лабораториями.

Приложение С
(обязательное)

Примеры последовательности анализа

Градуировочные стандартные растворы и стандартные контрольные пробы	STD1 STD2 STD3 STD4 STD5 STD6 Буферный раствор для разбавления Стандартная контрольная проба А, пр. 1 Стандартная контрольная проба А, пр. 2 Стандартная контрольная проба А, пр. 3
Пробы для контроля совместного элюирования	Проба для контроля совместного элюирования 1 для исследуемого вещества 1 Проба для контроля совместного элюирования 2 для исследуемого вещества 2
Стандартные контрольные пробы	Стандартная контрольная проба В, пр. 1 Стандартная контрольная проба В, пр. 2 Стандартная контрольная проба В, пр. 3
Первая группа параллельно обрабатываемых проб	Стандартная контрольная проба С, пр. 1 Коричный альдегид, пр. 1 Исследуемая проба 1, пр. 1 Исследуемая проба 2, пр. 1
Вторая группа параллельно обрабатываемых проб	Стандартная контрольная проба С, пр. 2 Коричный альдегид, пр. 2 Исследуемая проба 1, пр. 2 Исследуемая проба 2, пр. 2
Третья группа параллельно обрабатываемых проб	Стандартная контрольная проба С, пр. 3 Коричный альдегид, пр. 3 Исследуемая проба 1, пр. 3 Исследуемая проба 2, пр. 3
Стандартные контрольные пробы	Стандартная контрольная проба В, пр. 4 Стандартная контрольная проба В, пр. 5 Стандартная контрольная проба В, пр. 6

В последовательности выполнения анализа должна быть предусмотрена обработка трех комплектов стандартных контрольных проб (т. е. проб, представленных только соответствующими пептидами, растворенными в выбранном растворителе):

- стандартная контрольная проба А. Для проверки пригодности системы ВЭЖХ;
- стандартная контрольная проба В. Исследуется дважды, в начале и в конце анализа, для подтверждения стабильности характеристик стандартных контрольных проб во время выполнения анализа;
- стандартная контрольная проба С. Включается в обработку для подтверждения отсутствия влияния растворителя, служащего для растворения исследуемой химической продукции, на показатели процентной деплеции (обеднения) пептидов.

Приложение D
(обязательное)

Известные ограничения, связанные с применением метода анализа реакционной способности в отношении производных аминокислот

В таблице D.1 представлено краткое описание известных ограничений для метода ADRA.

Таблица D.1 — Известные ограничения для метода ADRA

Класс веществ/характер помех	Потенциальные причины занижения оценки опасности или возникновения помех	Интерпретация данных	Примеры описываемых веществ
Металлы и неорганические соединения	Известно, что реакции таких веществ с белками протекают в соответствии с механизмами, отличными от ковалентного связывания	Метод не подходит для применения	Сульфат никеля: 7786-81-4
Прогаптены	Такие химические вещества требуют для раскрытия своего сенсибилизирующего потенциала предварительной биологической активации ферментами и не могут быть определены с помощью данного метода до тех пор, пока они не были соответствующим образом активированы, например путем автоокисления до уровня, который можно наблюдать *in vivo* у животных/человека. В ходе исследования, однако, нельзя гарантировать успешность подобной активации	Существует вероятность получения ложноотрицательных результатов. Любые отрицательные результаты, полученные с применением данного метода, следует рассматривать с учетом указанных ограничений и в сочетании с информацией из других источников в контексте соответствующего IATA	Диэтилентриамин: 111-40-0 (испытания на человеке: 1A, LLNA: данные отсутствуют)
Прегаптены	Такие химические вещества проявляют свои сенсибилизирующие свойства после абиотической трансформации и, согласно имеющимся свидетельствам, в некоторых случаях поддаются корректному определению при помощи данного метода		Линалоол: 78-70-6
Химические вещества с высоким уровнем поглощения на длине волны 281 нм и временем удерживания, аналогичным времени удерживания NAC или NAL (совместное элюирование)	В условиях совместного элюирования интегрирование пика NAC или NA, а следовательно, и расчет их процентного значения истощения становятся невозможными	Перечень веществ, поглощающих ультрафиолетовое излучение на этом участке спектра, обычно ограничивается веществами с конъюгированными двойными связями, что существенно снижает риск нежелательного совместного элюирования. Если совместное элюирование исследуемого химического вещества наблюдается как с NAC, так и с NAL или же только с NAC, то при составлении отчета результаты такого анализа следует определить как «сомнительные» и рассмотреть возможность использования альтернативной конфигурации ВЭЖХ	Сафраналь: 116-26-7

Продолжение таблицы D.1

Класс веществ/характер помех	Потенциальные причины занижения оценки опасности или возникновения помех	Интерпретация данных	Примеры описываемых веществ
		(см. 3.3.4.6). Если совместное элюирование наблюдается только с NAL, то может использоваться модель построения прогнозов, основанная только на данных для NAC и показанная в таблице 4	
Вещества с неопределенным или переменным составом, продукты комплексных реакций или биологические материалы	Отсутствует возможность соблюдения определенного молярного соотношения между нуклеофильным реактивом и исследуемым химическим веществом. Количество доступной информации о возможностях применения метода ADRA в настоящее время ограничено	Неизвестно	Вещества с неопределенным или переменным составом, химические выбросы, продукты и смеси с неопределенным или переменным составом
Химические вещества, не поддающиеся растворению в соответствующем растворителе при конечном значении концентрации 1 мМ (впрочем, это маловероятно, поскольку все растворы исследуемых веществ при выполнении анализа по методу ADRA приготавливаются с низким значением концентрации (1 мМ))	Отсутствует возможность гарантированного обеспечения достаточной экспозиции исследуемого вещества	Метод ADRA может применяться для проведения исследований химических веществ, характеризующихся низкими показателями растворимости. Если исследуемое вещество не может быть полностью растворено при указанном значении концентрации, это не исключает возможности проведения исследования с более низкими значениями концентрации, обеспечивающими его надлежащее растворение. В подобном случае положительный результат исследования может рассматриваться как доказательство способности исследуемого химического вещества вызывать кожную сенсибилизацию, тогда как получение отрицательного результата, напротив, не позволяет с уверенностью судить об отсутствии у вещества сенсибилизирующих свойств	Неизвестно
Химические вещества, образующие осадок в реакционном растворе (впрочем, маловероятно, что вещество выпадет в осадок после добавления его раствора к реакционному раствору, поскольку при выполнении анализа по методу ADRA все растворы исследуемых веществ имеют низкое значение концентрации (1 мМ))	Отсутствует возможность обеспечения достаточной экспозиции исследуемого вещества	Если исследуемое вещество образует осадок в реакционном растворе несмотря на достаточную степень растворения в соответствующем растворителе, это не исключает возможности проведения исследования с более низкими значениями концентрации, обеспечивающими его надлежащее растворение. В подобных случаях положительный результат исследования все еще может рассматриваться как доказательство способности исследуемого химического вещества вызывать кожную сенсибилизацию, тогда как получение отрицательного результата, напротив, не позволяет с уверенностью судить об отсутствии у вещества сенсибилизирующих свойств	Изопропил-миристат CAS: 110-27-0

Окончание таблицы D.1

Класс веществ/характер помех	Потенциальные причины занижения оценки опасности или возникновения помех	Интерпретация данных	Примеры описываемых веществ
Химические вещества, не образующие ковалентных связей с NAC, но способствующие его окислению (т. е. димеризации NAC)	Исследование может приводить к получению завышенной оценки деплеции (обеднения) NAC, а следовательно, к выдаче ложноположительных прогнозных заключений	В ряде случаев существует возможность обнаружения и количественного определения любых вновь образующихся димеров NAC с применением средств ВЭЖХ, которая позволяет подтвердить или исключить вероятность того, что истощение реактива NAC было вызвано его димеризацией при окислении, а не явилось результатом реакции с исследуемым(ыми) веществом(ами) и последующего ковалентного связывания. Таким образом, применение метода ADRA может помочь избежать ошибочных выводов, связанных с окисляющим воздействием исследуемого химического вещества	ДМСО Окислитель
Химические вещества, растворимые только в ДМСО	Воздействие ДМСО приводит к дополнительному истощению NAC за счет димеризации, что существенно увеличивает его фоновый уровень истощения	Предельно допустимый уровень содержания ДМСО в растворе исследуемого вещества составляет 5 %. При выборе ДМСО в качестве растворителя вначале стараются растворить исследуемое химическое вещество в смеси ДМСО и ацетонитрила, характеризующейся соотношением 1:20 (5 % ДМСО в ацетонитриле)	Неизвестно

Приложение Е
(обязательное)

Вещества, рекомендованные к использованию для проверки квалификации. Сенсибилизация кожи *in chemico*. Анализ реакционной способности в отношении производных аминокислот (ADRA)

До того как приступить к регулярному применению метода ADRA, лаборатории должны подтвердить свою техническую компетентность, подготовив на его основе достоверный прогноз сенсибилизирующей способности для 10 специально отобранных веществ, перечисленных в таблице В.1, и правильно определив значения деплеции (обеднения) NAC и NAL в соответствующих нормированных диапазонах для 8 из 10 таких контрольных веществ. Вещества согласно приведенному списку для проверки квалификации подобраны таким образом, чтобы полностью охватить диапазон возможных реакций при развитии кожной сенсибилизации. Дополнительными критериями отбора послужили доступность этих веществ для коммерческого приобретения, наличие для них как достоверных справочных данных, полученных *in vivo*, так и достоверных данных, полученных с использованием метода ADRA, а также опыт их практического использования в ходе валидационного исследования, в роли координатора которого выступал JaCVAM, для подтверждения успешного применения проверяемого метода.

Таблица Е.1 — Список рекомендованных химических веществ для проверки квалификации при проведении исследований по методу ADRA

№	Исследуемые химические вещества	Номер CAS	Агрегатное состояние	Молекулярная масса	Прогнозное заключение по итогам исследований *in vivo* [1)]	Прогнозное заключение по методу ADRA [2)]	Диапазон деплеции (обеднения), %	
							NAC [3)]	NAL [3)]
1	*p*-бензохинон	106-51-4	Твердое	108,09	Вызывает сенсибилизацию (экстремальную)	Положительное	90—100	40—70
2	Дифенил-циклопропенон	44886-38-4	Твердое	206,24	Вызывает сенсибилизацию (сильную)	Положительное	15—45	≤10
3	2-метил-2Н-изотиазол-3-он	2682-20-4	Твердое	115,15	Вызывает сенсибилизацию (умеренную)	Положительное	80—100	≤7
4	Пальмитоил-хлорид	112-67-4	Жидкое	274,87	Вызывает сенсибилизацию (умеренную)	Положительное	≤10	50—100
5	Имидазолидинил-мочевина	39236-46-9	Твердое	388,29	Вызывает сенсибилизацию (слабую)	Положительное	10—45	≤10
6	Фарнезаль	19317-11-4	Жидкое	220,35	Вызывает сенсибилизацию (слабую)	Положительное	20—40	≤15
7	Глицерин	56-81-5	Жидкое	92,09	Не вызывает сенсибилизации	Отрицательное	≤7	≤7
8	Изопропанол	67-63-0	Жидкое	460,10	Не вызывает сенсибилизации	Отрицательное	≤7	≤7
9	Диметил изофталат	1459-93-4	Твердое	194,19	Не вызывает сенсибилизации	Отрицательное	≤7	≤7
10	Пропил парабен	94-13-3	Твердое	180,20	Не вызывает сенсибилизации	Отрицательное	≤7	≤7

[1)] Прогнозные заключения о степени опасности (сенсибилизирующей способности) химических веществ *in vivo* подготовлены в соответствии с данными, полученными по методу LLNA [9], [50], [51]. Степень сенсибилизирующей способности веществ *in vivo* оценивалась с использованием критериев, предложенных ECETOC [33].

Окончание таблицы Е.1

[2)] Прогнозное заключение, подготавливаемое по результатам применения метода ADRA, должно рассматриваться в контексте IATA или DA и с учетом положений 3.3.1.2 и 3.3.1.3.

[3)] Границы диапазонов определены с учетом по меньшей мере 10 различных процентных значений деплеции (обеднения), представленных пятью независимыми лабораториями.

Приложение F
(обязательное)

Примерная последовательность выполнения анализа методом ВЭЖХ

Исследование каждой пробы при выполнении ВЭЖХ-анализа осуществляют в соответствии с пунктами алгоритма, представленными ниже. Дополнительные сведения о порядке выполнения ВЭЖХ-анализа см. в таблице F.1 с примерами аналитических последовательностей для ВЭЖХ ниже.

1. Приступают к анализу градуировочных стандартных растворов и стандартной контрольной пробы А (N = 3).

2. Поочередное выполнение анализа пробы для контроля совместного элюирования не требуется, если такой анализ предусмотрен после выполнения анализа стандартного раствора и стандартной контрольной пробы А.

3. Анализ контрольной пробы В выполняют трижды (в общей сложности шесть раз): до и после анализа исследуемой пробы, стандартной контрольной пробы С и положительной контрольной пробы.

4. Выполняют анализ растворов стандартной контрольной пробы С, положительной контрольной пробы и исследуемого химического вещества (после выполнения анализа первой группы каждого вида параллельно обрабатываемых проб выполняют анализ второй группы каждого вида параллельно обрабатываемых проб).

Таблица F.1 — Дополнительные сведения о порядке выполнения ВЭЖХ-анализа

Градуировочные стандартные растворы и стандартные контрольные пробы	STD1 STD2 STD3 STD4 STD5 STD6 Буферный раствор для разбавления Стандартная контрольная проба А, пр. 1 Стандартная контрольная проба, пр. 2 Стандартная контрольная проба А, пр. 3
Пробы для контроля совместного элюирования	Проба для контроля совместного элюирования 1 для исследуемого вещества 1 Проба для контроля совместного элюирования 2 для исследуемого вещества 2
Стандартные контрольные пробы	Стандартная контрольная проба В, пр. 1 Стандартная контрольная проба В, пр. 2 Стандартная контрольная проба В, пр. 3
Первая группа параллельно обрабатываемых проб	Стандартная контрольная проба С, пр. 1 Положительная контрольная проба, пр. 1 Исследуемая проба 1, пр. 1 Исследуемая проба 2, пр. 1
Вторая группа параллельно обрабатываемых проб	Стандартная контрольная проба С, пр. 2 Положительная контрольная проба, пр. 2 Исследуемая проба 1, пр. 2 Исследуемая проба 2, пр. 2
Третья группа параллельно обрабатываемых проб	Стандартная контрольная проба С, пр. 3 Положительная контрольная проба, пр. 3 Исследуемая проба 1, пр. 3 Исследуемая проба 2, пр. 3
Стандартные контрольные пробы	Стандартная контрольная проба В, пр. 4 Стандартная контрольная проба В, пр. 5 Стандартная контрольная проба В, пр. 6

В последовательности выполнения анализа должна быть предусмотрена обработка трех комплектов стандартных контрольных проб (т. е. проб, представленных NAC или NAL соответственно, растворенных в выбранном растворителе):

Стандартная контрольная проба А: Контрольная проба для проверки пригодности системы ВЭЖХ. Пробу А используют для контроля значений концентрации NAC и NAL, соответствующих каждой градуировочной кривой, при добавлении ацетонитрила вместо исследуемой химической продукции.

Стандартная контрольная проба B: Контрольная проба для проверки стабильности реакционного раствора при выполнении анализа. Пробу B используют для контроля значений коэффициента изменчивости (CV) для каждой тройки значений площадей пиков NAC/NAL в анализируемом растворе при добавлении ацетонитрила вместо исследуемой химической продукции в начале и в конце анализа.

Стандартная контрольная проба C: Контрольная проба для расчета значения деплеции (обеднения) NAC/NAL для каждого раствора исследуемой химической продукции. Расчет значения деплеции (обеднения) NAC/NAL осуществляют после выполнения измерений на трех контрольных пробах C с добавлением растворителя вместо исследуемой химической продукции. Пробу C приготавливают для всех растворителей, используемых для растворения исследуемой химической продукции.

Приложение G
(обязательное)

Известные ограничения, связанные с применением метода кинетического прямого анализа реакционной способности пептидов

В таблице G.1 представлены известные ограничения для метода kDPRA.

Таблица G.1 — Известные ограничения для метода kDPRA

Класс веществ/характер помех	Потенциальные причины занижения оценки опасности или возникновения помех	Интерпретация данных	Примеры описываемых веществ
Металлы и неорганические соединения	Известно, что реакции таких веществ с белками протекают в соответствии с механизмами, отличными от ковалентного связывания	Метод не подходит для применения	Сульфат никеля: 7786-81-4
Гидрохиноны, катехины и ароматические амины	Наличие задержки перед началом окисления может приводить к деплеции (обеднению) видимой скорости протекания реакции	Результаты, для которых значение $\log k_{max} < -2{,}0$, могут быть признаны достоверными лишь при условии подтверждения низкого уровня реакционной способности вещества по окончании окисления	Пара-фенилендиамин: 106-50-3; испытания на человеке и LLNA: 1A
Тиолы или вещества, высвобождающие тиолы	Исследуемая химическая продукция, обладающая первичными сульфгидридными группами или высвобождающая их при разложении в условиях, предусмотренных для выполнения анализа, может непосредственно вступать в реакцию с детектирующим маркером	Исследуемая химическая продукция не подходит для исследования по методу kDPRA с дериватизацией маркерами, которые способны вступать в реакцию с тиолами. Получение соответствующих кинетических данных с используемым пептидом возможно при условии применения других методов, например ВЭЖХ (в настоящем руководстве не рассматривается)	Тиоглицерин: 96-27-5; LLNA: класс опасности 1B согласно СГС ООН; испытания на человеке: данные отсутствуют
Исследуемая химическая продукция, обладающая избирательной реакционной способностью по отношению к лизину, регистрируемой при проведении исследований по методу DPRA или ADRA	kDPRA обеспечивает возможность измерений реакционной способности только в отношении цистеинсодержащих пептидов	Результаты, соответствующие $\log k_{max} < -2{,}0$, если они были получены для такой химической продукции, которая, по данным анализа с применением метода DPRA или ADRA, избирательным образом реагирует с NH_2-группами, вызывая их деплецию (обеднение), но при этом не вызывая деплеции (обеднения) SH-групп, не являются убедительными	Некоторые ацилгалогениды, фенольные эфиры или альдегиды, дигидрокумарин: 119-84-6; LLNA: класс опасности 1B согласно СГС ООН; испытания на человеке: данные отсутствуют; глутаровый альдегид: 111-30-8; испытания на человеке и LLNA: класс опасности 1A согласно СГС ООН

Продолжение таблицы G.1

Класс веществ/характер помех	Потенциальные причины занижения оценки опасности или возникновения помех	Интерпретация данных	Примеры описываемых веществ
Прогаптены	Согласно имеющимся свидетельствам, такая исследуемая химическая продукция для раскрытия своего сенсибилизирующего потенциала требует предварительной биологической активации ферментами	Оценка, получаемая для ярко выраженных прогаптенов, может быть заниженной. С другой стороны, исследуемая химическая продукция, которая i) является ярко выраженными прогаптенами (т. е. не обладает свойствами, присущими непосредственно действующим гаптенам или прегаптенам) и одновременно ii) способна вызывать сильные аллергические реакции, встречается относительно редко	Диэтилентриамин: 111-40-0; (испытания на человеке и LLNA: категория 1А согласно СГС ООН)
Флуоресцентная химическая продукция с частотой возбуждения, соответствующей диапазону используемого флуоресцентного маркера	Если показатели интенсивности флуоресценции исследуемой химической продукции и аддукта пептида с МББ не обладают аддитивностью по отношению друг к другу, то регистрируется кажущаяся деплеция (обеднение) пептида	Для оценки влияния создаваемых помех должны применяться соответствующие положения протокола DB-ALM № 217 [62]	Тетрахлор-салициланилид: 1154-59-2; испытания на человеке и LLNA: категория 1А согласно СГС ООН
Исследуемая химическая продукция, диапазон поглощения которой соответствует диапазону излучения маркера	Если исследуемая химическая продукция гасит флуоресцентную эмиссию пептида с МББ, то регистрируется кажущаяся деплеция (обеднение) пептида	Для оценки влияния создаваемых помех должны использоваться соответствующие положения протокола DB-ALM № 217 [62]	Ванилин: 121-33-5 LLNA: без класса опасности; испытания на человеке: данные отсутствуют
Смеси с неизвестным составом, вещества с неопределенным или переменным составом, продукты комплексных реакций или биологические материалы	Информация о возможности применения метода kDPRA в доступной литературе отсутствует	Неизвестно	UVCB, химические выбросы, продукция с неопределенным или переменным составом
Исследуемая химическая продукция, нерастворимая в воде, ацетонитриле или подобных ему растворителях, способных смешиваться с водой	Отсутствует возможность гарантированного обеспечения достаточной экспозиции исследуемой химической продукции	В подобных случаях значение log k_{max} > -2,0 все еще может рассматриваться как доказательство способности исследуемой химической продукции вызывать сенсибилизацию кожи с отнесением ее к подклассу опасности 1А согласно СГС ООН, тогда как значение log k_{max} < –2,0, напротив, не позволяет с уверенностью судить об отсутствии у вещества сенсибилизирующих свойств. Использование другого вещества-носителя допускается при условии соблюдения требований согласно 3.4.3.2.1	Неизвестно

Окончание таблицы G.1

Класс веществ/характер помех	Потенциальные причины занижения оценки опасности или возникновения помех	Интерпретация данных	Примеры описываемых веществ
Исследуемая химическая продукция, образующая осадок в реакционном растворе	Отсутствует возможность гарантированного обеспечения достаточной экспозиции исследуемой химической продукции. Если вследствие низкой растворимости исследуемой химической продукции в воде непосредственно после добавления ее раствора к раствору пептидов в последнем образуется осадок, точно определить оставшееся в растворе количество продукции, способной вступать в реакцию с пептидами, не представляется возможным	В подобных случаях положительный результат исследования (т. е. log k_{max} ≥ –2,0) все еще может считаться достоверным, тогда как отрицательный результат (т. е. активность не выявлена или log k_{max} < –2,0), напротив, следует использовать с надлежащей осторожностью (см. также положения 3.4.1.4, касающиеся порядка исследования по методу kDPRA химической продукции, которая не может быть полностью растворена при значении концентрации 20 мМ)	Метил 2-нониноат[1]: 111-80-8; LLNA: без класса опасности
Исследуемая химическая продукция, способствующая окислению цистеинсодержащих пептидов		Существует вероятность получения завышенной оценки реакционной способности пептидов	ДМСО

[1] Roberts, D. W. and A. Natsch, High throughput kinetic profiling approach for covalent binding to peptides: Application to skin sensitization potency of michael acceptor electrophiles. Chem. Res. Toxicol., 2009. 22 (3): p. 592—603 (Высокопропускной метод кинетического профилирования для анализа ковалентного связывания с белками. Применение для оценивания способности электрофильных акцепторов Михаэля вызывать кожную сенсибилизацию) [53].

Приложение Н
(обязательное)

Вещества, рекомендованные к использованию для проверки квалификации. Сенсибилизация кожи *in chemico*. Кинетический прямой анализ реакционной способности пептидов (kDPRA)

До того как приступить к регулярному применению метода испытания, описанного в настоящем приложении, лаборатории должны подтвердить свою техническую компетентность, подготовив достоверный прогноз по методу kDPRA по меньшей мере для восьми из девяти рекомендованных химических веществ, перечисленных в таблице Н.1, и представив значения log k_{max} для константы скорости реакции с цистеином, находящиеся в соответствующем нормированном диапазоне, по меньшей мере для семи из девяти таких контрольных веществ. Вещества согласно приведенному списку для проверки квалификации подобраны таким образом, чтобы охватить весь диапазон возможных реакций с точки зрения степени опасности и потенциальной вероятности развития кожной сенсибилизации. Дополнительными критериями отбора послужили доступность этих веществ для коммерческого приобретения, наличие для них как достоверных справочных данных, полученных *in vivo*, так и достоверных данных, полученных *in vitro* с использованием метода kDPRA, а также положительный опыт их практического использования в ходе соответствующего валидационного исследования, в роли координаторов которого выступали заинтересованные предприятия промышленности, для подтверждения успешной реализации рассматриваемого метода лабораториями, принимавшими участие в исследовании.

Таблица Н.1 — Список рекомендованных веществ для проверки квалификации при проведении исследований по методу кинетического прямого анализа реакционной способности в отношении пептидов

Вещества, рекомендованные к использованию для проверки квалификации	Регистрационный номер CAS	Агрегатное состояние	Прогнозное заключение по итогам исследований *in vivo* [1)]	Класс опасности согласно СГС ООН по итогам испытаний по методу LLNA	Класс опасности согласно СГС ООН по итогам испытаний на человеке	Прогнозное заключение по методу kDPRA [2)]	Диапазон значений log k_{max} [2)]
2,4-динитрохлор бензол	97-00-7	Твердое	Вызывает сенсибилизацию (экстремальную)	1А	1А	1А	(–0,8)—(–0,4)
Метилизотиазолинон	2682-20-4	Твердое	Вызывает сенсибилизацию (экстремальную)	1А	1А	1А	(–0,5)—(–0,1)
Оксазолон	15646-46-5	Твердое	Вызывает сенсибилизацию (экстремальную)	1А	Нет данных	1А	(–0,3)—(0,0)
Метил-2-октиноат	111-12-6	Жидкое	Вызывает сенсибилизацию (сильную)	1А	1А	1А	(–1,6)—(–1,2)
Изоэвгенол	97-54-1	Жидкое	Вызывает сенсибилизацию (умеренную)	1А	1А	1А	(–1,4)—(–1,1)
2,3-бутанедион	431-03-8	Жидкое	Вызывает сенсибилизацию (слабую)	1В	Нет данных	Вне категории 1А (1В или без категории)	(–3,2)—(–2,1)
Этиленгликоль диметакрилат (ДМЭГ)	97-90-5	Жидкое	Вызывает сенсибилизацию (слабую)	1В	1В	Вне категории 1А (1В или без категории)	(–2,8)—(–2,1)

Окончание таблицы Н.1

Вещества, рекомендованные к использованию для проверки квалификации	Регистрационный номер CAS	Агрегатное состояние	Прогнозное заключение по итогам исследований *in vivo* [1]	Класс опасности согласно СГС ООН по итогам испытаний по методу LLNA	Класс опасности согласно СГС ООН по итогам испытаний на человеке	Прогнозное заключение по методу kDPRA [2]	Диапазон значений log k_{max} [2]
4-метоксиацетофенон	100-06-1	Твердое	Не вызывает сенсибилизацию	Нет кат. [3]	Нет кат. [3]	Вне категории 1А (1В или без категории)	Неактивное
Хлорбензол	108-90-7	Жидкое	Не вызывает сенсибилизацию	Нет кат. [3]	Нет кат. [3]	Вне категории 1А (1В или без категории)	Неактивное

[1] Прогнозные заключения о степени опасности (сенсибилизирующей способности) химических веществ *in vivo* подготовлены в соответствии с данными, полученными по методу LLNA [64]. Степень сенсибилизирующей способности веществ *in vivo* оценивалась с использованием критериев, предложенных ECETOC [65].

[2] Округленные границы диапазонов определены с учетом по меньшей мере 14 определений значений log k_{max}, представленных семью независимыми лабораториями.

[3] Вещества, не вызывающие сенсибилизации, согласно СГС ООН.

Приложение ДА
(справочное)

Сопоставление структуры настоящего стандарта со структурой международного документа

Таблица ДА.1

Структура настоящего стандарта			Структура международного документа	
Разделы	Подразделы	Перечисления	Разделы	Перечисления
Введение			1—3, введение	—
1	—	—	4, введение	—
2	2.1	—	Приложение, определения	—
	2.2	—	Приложение, определения	—
	2.3	—	Приложение, определения	—
	2.4	—	Приложение, определения	—
	2.5	—	Приложение, определения	—
	2.6	—	Приложение, определения	—
	2.7	—	Приложение, определения	—
	2.8	—	Приложение, определения	—
	2.9	—	Приложение, определения	—
	2.10	—	Приложение, определения	—
	2.11	—	Приложение, определения	—
	2.12	—	Приложение, определения	—
	2.13	—	Приложение, определения	—
	2.14	—	Приложение, определения	—
	2.15	—	Приложение, определения	—
	2.16	—	Приложение, определения	—
	2.17	—	Приложение, определения	—
	2.18	—	Приложение, определения	—
	2.19	—	Приложение, определения	—
	2.20	—	Приложение, определения	—
	2.21	—	Приложение, определения	—
	2.22	—	Приложение, определения	—
	2.23	—	Приложение, определения	—
	2.24	—	Приложение, определения	—
	2.25	—	Приложение, определения	—
	2.26	—	Приложение, определения	—
	2.27	—	Приложение, определения	—
	2.28	—	Приложение, определения	—
	2.29	—	Приложение, определения	—

Продолжение таблицы ДА.1

Структура настоящего стандарта			Структура международного документа	
Разделы	Подразделы	Перечисления	Разделы	Перечисления
	2.30	—	Приложение, определения	—
	2.31	—	Приложение, определения	—
	2.32	—	Приложение, определения	—
	2.33	—	Приложение, определения	—
	2.34	—	Приложение, определения	—
	2.35	—	Приложение, определения	—
	2.36	—	Приложение, определения	—
3	3.1.1	—	4, введение	—
	3.1.2	—	5, введение	—
	3.1.3	—	6, введение	—
	3.1.4	—	7, введение	—
	3.1.5	—	8, введение	—
	3.1.6	—	9, введение	—
	3.1.7		10, введение	
	3.2.1.1	—	1, дополнение I	—
	3.2.1.2	—	2, дополнение I	—
	3.2.1.3	—	3, дополнение I	—
	3.2.1.4	—	4, дополнение I	—
	3.2.1.5	—	5, дополнение I	—
	3.2.2.1	—	6, дополнение I	—
	3.2.2.2	—	7, дополнение I	—
	3.2.3	—	8, дополнение I	—
	3.2.3.1	—	9, дополнение I	—
	3.2.3.2	—	10, дополнение I	—
	3.2.3.3	—	11, дополнение I	—
	3.2.3.4	—	12, дополнение I	—
	3.2.3.5	—	13, дополнение I	—
	3.2.3.6.1	—	14, дополнение I	—
	3.2.3.6.2	—	15, дополнение I	—
	3.2.3.6.3	—	16, дополнение I	—
	3.2.4.1	—	17, дополнение I	—
	3.2.4.2	—	18, дополнение I	—
	3.2.4.3	—	19, дополнение I	—
	3.2.4.4	—	20, дополнение I	—

Продолжение таблицы ДА.1

Структура настоящего стандарта			Структура международного документа	
Разделы	Подразделы	Перечисления	Разделы	Перечисления
	3.2.4.5	—	21, дополнение I	—
	3.2.4.6	—	22, дополнение I	—
	3.2.4.7	—	23, дополнение I	—
	3.2.4.8	—	24, дополнение I	—
	3.2.4.9	—	25, дополнение I	—
	3.3.1.1	—	1, дополнение II	—
	3.3.1.2	—	2, дополнение II	—
	3.3.1.3	—	3, дополнение II	—
	3.3.1.4	—	4, дополнение II	—
	3.3.1.5	—	5, дополнение II	—
	3.3.1.6	—	6, дополнение II	—
	3.3.1.7	—	7, дополнение II	—
	3.3.2.1	—	8, дополнение II	—
	3.3.2.2	—	9, дополнение II	—
	3.3.3	—	10, дополнение II	—
	3.3.3.1	—	11, дополнение II	—
	3.3.3.2	—	12, дополнение II	—
	3.3.3.3	—	13, дополнение II	—
	3.3.3.4	—	14, дополнение II	—
	3.3.3.5	—	15, дополнение II	—
	3.3.3.6	—	16, дополнение II	—
	3.3.3.7	—	17, дополнение II	—
	3.3.3.8	—	18, дополнение II	—
	3.3.3.9	—	19, дополнение II	—
	3.3.3.10	—	20, дополнение II	—
	3.3.3.11	—	21, дополнение II	—
	3.3.4.1	—	22, дополнение II	—
	3.3.4.2	—	23, дополнение II	—
	3.3.4.3	—	24, дополнение II	—
	3.3.4.4	—	25, дополнение II	—
	3.3.4.5	—	26, дополнение II	—
	3.3.4.6	—	27, дополнение II	—
	3.3.4.7	—	28, дополнение II	—
	3.3.4.8	—	29, дополнение II	—

Продолжение таблицы ДА.1

Структура настоящего стандарта			Структура международного документа	
Разделы	Подразделы	Перечисления	Разделы	Перечисления
	3.4.1.1	—	1, дополнение III	—
	3.4.1.2	—	2, дополнение III	—
	3.4.1.3	—	3, дополнение III	—
	3.4.1.4	—	4, дополнение III	—
	3.4.1.5	—	5, дополнение III	—
	3.4.1.6	—	6, дополнение III	—
	3.4.1.7	—	7, дополнение III	—
	3.4.2.1	—	8, дополнение III	—
	3.4.2.2	—	9, дополнение III	—
	3.4.3	—	10, дополнение III	—
	3.4.3.1	—	11, дополнение III	—
	3.4.3.2.1	—	12, дополнение III	—
	3.4.3.2.2	—	13, дополнение III	—
	3.4.3.3.1	—	14, дополнение III	—
	3.4.3.3.2	—	15, дополнение III	—
	3.4.3.3.3	—	16, дополнение III	—
	3.4.3.3.4	—	17, дополнение III	—
	3.4.3.4	—	18, дополнение III	—
	3.4.3.5	—	19, дополнение III	—
	3.4.4.1.1	—	20, дополнение III	—
	3.4.4.1.2	—	21, дополнение III	—
	3.4.4.1.3	—	22, дополнение III	—
	3.4.4.1.4	—	23, дополнение III	—
	3.4.4.1.5	—	24, дополнение III	—
	3.4.4.1.6	—	25, дополнение III	—
	3.4.4.2.1	—	26, дополнение III	—
	3.4.4.2.2	—	27, дополнение III	—
	3.4.4.3.1	—	28, дополнение III	—
	3.4.4.3.2	—	29, дополнение III	—
	3.4.4.3.3	—	30, дополнение III	—
	3.4.4.4	—	31, дополнение III	—
	Приложение А	—	Дополнение I Приложение 1	—
	Приложение В	—	Дополнение I Приложение 2	—

Окончание таблицы ДА.1

Структура настоящего стандарта			Структура международного документа	
Разделы	Подразделы	Перечисления	Разделы	Перечисления
	Приложение C	—	Дополнение I Приложение 3	—
	Приложение D	—	Дополнение II Приложение 1	—
	Приложение E	—	Дополнение II Приложение 2	—
	Приложение F	—	Дополнение II Приложение 3	—
	Приложение G	—	Дополнение III Приложение 1	—
	Приложение H	—	Дополнение III Приложение 2	—
Библиография			Литература	

Библиография

[1] United Nations (UN) (2017) Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Seventh revised edition, New York and Geneva, United Nations Publications. Available at: [https://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev07/07files_e0.html] (Согласованная на Глобальном уровне Система классификации и маркировки химических веществ (СГС). Седьмое пересмотренное издание).

[2] OECD (2012) Series on Testing and Assessment No. 168. The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Scientific Evidence. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO(2012)10/PART1&docLanguage=En (Серия по испытаниям и оценке № 168. Путь неблагоприятного исхода для кожной сенсибилизации, обусловленной ковалентным связыванием с белками. Часть 1. Научное обоснование).

[3] GF Gerberick, Vassallo JD, Bailey RE, Chaney JG, Morrall SW, Lepoittevin JP (2004), Development of a peptide reactivity assay for screening contact allergens. Toxicol Sci. 81, 332-343 (Разработка метода анализа реакционной способности веществ в отношении пептидов для целей скрининговых исследований контактных аллергенов).

[4] GF Gerberick, Vassallo JD, Foertsch LM, Price BB, Chaney JG, Lepoittevin JP (2007), Quantification of chemical peptide reactivity for screening contact allergens: a classification tree model approach (Количественное оценивание реакционной способности в отношении пептидов для целей скрининговых исследований контактных аллергенов. Древовидная структура классификации).

[5] EC EURL-ECVAM (2013) Recommendation on the Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA) for the skin sensitization testing Available at: https://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_labs/eurl-ecvam/eurl-ecvam-recommendations/eurl-ecvam-recommendaion-on-the-directpeptide-reactivity-assay-dpra (Рекомендации по применению метода прямого анализа реакционной способности в отношении пептидов (DPRA) при проведении исследований кожной сенсибилизации).

[6] M Fujita, Yamamoto Y, Tahara H, Kasahara T, Jimbo Y, Hioki T (2014), Development of a prediction method for skin sensitisation using novel cysteine and lysinederivatives. J PharmacolToxicol Methods. 70, 94-105 (Разработка инновационного метода предсказания способности вызывать кожную сенсибилизацию с использованием производных цистеина и лизина).

[7] Y Yamamoto, Tahara H, Usami R, Kasahara T, Jimbo Y, Hioki T, Fujita M.(2015) A novel in chemico method to detect skin sensitisers in highly diluted reactionconditions. J Appl Toxicol. 35, 1348-1360 (Инновационный метод in chemico для обнаружения веществ, способных вызывать кожную сенсибилизацию, при проведении реакций в условиях высокого разбавления).

[8] M Fujita, Yamamoto Y, Watanabe S, Sugawara T, Wakabayashi K, Tahara K, Horie N, Fujimoto K, Kusakari K, Kurokawa Y, Kawakami T, Kojima K, Kojima H, Ono A, Katsuoka Y, Tanabe H, Yokoyama H and Kasahara T (2019), Cause of and Countermeasures for Oxidation of the Cysteine-Derived Reagent Used in the Amino acid Derivative Reactivity Assay, J. Appl. Toxicology, Feb; 39(2):191-208 (doi: 10.1002/jat.3707) (Причины окисления цистеинпроизводного реактива, используемого при проведении экспериментов по методу анализа реакционной способности в отношении производных аминокислот, и способы его предотвращения).

[9] OECD (2019) Draft validation report: Amino acid Derivative Reactivity Assay (ADRA) — JaCVAM Validation Study Report. Series on testing and Assessment n° 304. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris (Проект отчета о валидационных испытаниях. Метод анализа реакционной способности в отношении производных аминокислот (ADRA). Отчет о валидационных испытаниях JaCVAM. Серия по испытаниям и оценке № 304).

[10] OECD (2019) Amino acid Derivative Reactivity Assay (ADRA) — Report of the Peer Review Panel. Series on testing and Assessment n° 305. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris (Метод анализа реакционной способности в отношении производных аминокислот (ADRA). Отчет независимой группы экспертов. Серия по испытаниям и оценке № 305).

[11] OOECD (1992) OECD Guidelines for the Testing of Chemicals No. 406. Skin Sensitisation. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines] (Руководство по проведению испытаний химических веществ № 406. Кожная сенсибилизация).

[12] OECD (2010) OECD Guidelines for Chemical Testing No. 429. Skin sensitisation: Local Lymph Node assay. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines] (Руководство по проведению испытаний химических веществ № 429. Кожная сенсибилизация. Метод изучения реакции регионарных лимфатических узлов).

[13] OECD (2010) OECD Guidelines for Chemical Testing No. 442A. Skin sensitisation: Local Lymph Node assay: DA. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines] (Руководство по проведению испытаний химических веществ № 442. Кожная сенсибилизация. Метод изучения реакции регионарных лимфатических узлов. Протокол DA).

[14] OECD (2018) OECD Guidelines for Chemical Testing No. 442B. Skin sensitisation: Local Lymph Node assay: BrdU-ELISA or — FCM. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines] (Руководство по проведению испытаний химических веществ № 442B. Кожная сенсибилизация. Метод изучения реакции регионарных лимфатических узлов. Протокол BrdU-ELISA или — FCM).

[15] OECD (2018) OECD Key Event based test Guideline 442D: In vitro Skin Sensitisation Assays Addressing AOP Key Event on Keratinocyte Activation. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines] (Руководство по проведению испытаний на основе ключевых событий 442D. Методы исследований кожной сенсибилизации in vitro с использованием ключевого события активации кератиноцитов согласно AOP).

[16] OECD (2018) OECD Key event based test Guideline 442E: In Vitro Skin Sensitisation Assays Addressing the Key Event on Activation of Dendritic Cells on the Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines] (Руководство по проведению испытаний на основе ключевых событий 442E. Методы исследований кожной сенсибилизации in vitro с использованием ключевого события активации дендритных клеток в структуре пути неблагоприятного исхода).

[17] Wareing, B., Kolle, S.N., Birk, B., Alépée, N., Haupt, T., Kathawala, R., Kern, P., Nardelli, L., Raabe, H., Rucki, M., Ryan, C., Verkaart, S., Westerink, W., Landsiedel, R., Natsch, A. (2020), 'The kinetic Direct Peptide Reactivity Assay (kDPRA): Intra- and inter-laboratory reproducibility in a seven-laboratory ring trial', ALTEX, preprint, DOI: 10.14573/altex.2004291 (Метод кинетического прямого анализа реакционной способности в отношении пептидов (kDPRA). Воспроизводимость на внутри- и межлабораторном уровне при проведении ключевых сличений в семи лабораториях).

[18] Landsteiner and Jacobs (1936), Studies on the sensitisation of animals with simple chemical compounds. Journal of Experimental Medicine 64:625-639 (Исследование процессов сенсибилизации у животных при воздействии простых химических соединений).

[19] Dupuis and Benezra (1982), Allergic contact dermatitis to simple chemicals: a molecular approach. New York & Basel: Marcel Dekker Inc. (Аллергический контактный дерматит при воздействии простых химических веществ. Молекулярный подход).

[20] JP Lepoittevin, Basketter DA, Goossens A, Karlberg AT (1998), Allergic contact dermatitis: the molecular basis, Springer, Berlin (doi: 10.1007/978-3-642-80331-4) (Аллергический контактный дерматит. Молекулярные основы).

[21] OECD (2016) Series on Testing & Assessment No. 256: Guidance Document On The Reporting Of Defined Approaches And Individual Information Sources To Be Used Within Integrated Approaches To Testing And Assessment (IATA) For Skin Sensitisation, Annex 1 and Annex 2. ENV/JM/HA(2016)29. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: [https://community.oecd.org/community/iatass] (Серия по испытаниям и оценке № 256. Руководящий документ по предоставлению отчетности об установленных подходах и индивидуальных источниках информации, подлежащих использованию в рамках интегрированных подходов к испытаниям и оценке (IATA) для кожной сенсибилизации. Приложение 1 и Приложение 2).

[22] B Wareing, Urbisch D, Kolle SN, Honarvar N, Sauer UG, Mehling A, Landsiedel R (2017) Prediction of skin sensitization potency sub-categories using peptide reactivity data, Toxicol In Vitro Dec; 45(Pt 1):134-145 (doi: 10.1016/j.tiv.2017.08.015) (Предсказание принадлежности к подкатегориям по способности вызывать кожную сенсибилизацию в соответствии с данными о реакционной способности в отношении пептидов).

[23] OECD (2019) Performance Standards for the assessment of proposed similar or modified in vitro skin sensitisation DPRA and ADRA test methods, Series on Testing & Assessment No. 303, Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris (Стандарты результативности для предлагаемых идентичных или модифицированных методов исследований кожной сенсибилизации in vitro на основе DPRA и ADRA).

[24] OECD (2005) Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. OECD Series on Testing and Assessment, No. 34. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris, France (Руководящий документ по валидации и международному признанию новых или актуализированных методов испытаний для оценивания опасностей. Публикации по охране труда, окружающей среды и технике безопасности. Серия по испытаниям и оценке № 34).

[25] United Nations (UN) (2013) Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Fifth revised edition, UN New York and Geneva, 2013. Available at: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html (Согласованная на Глобальном уровне Система классификации и маркировки химических веществ (СГС). Пятое пересмотренное издание).

[26] FDA (Food and Drug Administration) (2018) Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation 41 pp. Accessible at: https://www.fda.gov/files/drugs/published/Bioanalytical-Method-Validation-Guidance-for-Industry.pdf (Руководство для промышленности. Валидация биоаналитических методов).

[27] Gerberick *et al.* (2004) Development of a peptide reactivity assay for screening contact allergens. Toxicological Sciences 81:332-343 (Разработка метода анализа реакционной способности в отношении пептидов для целей скрининговых контроля контактных аллергенов).

[28] Gerberick *et al.* (2007), Quantification of chemical peptide reactivity for screening contact allergens: A classification tree model approach. Toxicological Sciences 97:417-427 (Количественное оценивание реакционной способности в отношении пептидов для целей скрининговых исследований контактных аллергенов. Древовидная структура классификации).

[29] EC EURL ECVAM (2012) Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA) Validation Study Report 74 pp. Accessible at: http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_labs/eurl-ecvam/eurl-ecvam-recommendations/eurl-ecvam-recommendation-on-the-direct-peptide-reactivity-assay-dpra (Метод прямого анализа реакционной способности в отношении пептидов (DPRA). Отчет о валидационных испытаниях).

[30] Natsch *et al.* (2013) A dataset on 145 chemicals tested in alternative assays for skin sensitization undergoing prevalidation. Journal of Applied Toxicology, published online, 9 April 2013, DOI:10.1002/jat.2868 (База данных по 145 химическим веществам, прошедшим испытания на сенсибилизацию кожи с применением альтернативных методов, подлежащих валидации).

[31] Jaworska *et al.* (2013) Bayesian integrated testing strategy to assess skin sensitization potency: from theory to practice Journal of Applied Toxicology, published online, 14 May 2013, DOI: 10.1002/jat.2869 (Применение байесовской интегрированной стратегии проведения испытаний для оценивания сенсибилизирующего потенциала при воздействии на кожу. От теории к практике).

[32] DB-ALM (INVITTOX) Protocol 154: Direct Peptide Reactivity assay (DPRA) for skin sensitisation testing 17 pp. Accessible at: http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/) (Протокол 154. Прямой анализ реакционной способности в отношении пептидов при проведении исследований кожной сенсибилизации).

[33] ECETOC (2003) Contact sensitization: Classification according to potency. European Centre for Ecotoxicology & Toxicology of Chemicals (Technical Report No. 87) (Контактная сенсибилизация. Классификация по уровню сенсибилизирующей способности).

[34] Urbisch et al. (2016) Assessment of Pre- and Pro-haptens Using Nonanimal Test Methods for Skin Sensitization, Chem Res Toxicol. 29(5):901-13 doi: 10.1021/acs.chemrestox.6b00055 (Оценивание способности пре- и прогаптенов вызывать сенсибилизацию кожи с применением методов исследований, не предусматривающих проведение испытаний на подопытных животных).

[35] Pattlewicz et al. (2016) Can currently available non-animal methods detect pre and pro-haptens relevant for skin sensitization? Regul Toxicol Pharmacol.; 82:147-155. doi: 10.1016/j.yrtph.2016.08.007 (Обеспечивают ли существующие методы исследований без использования подопытных животных возможность определения пре- и прогаптенов, способных вызывать сенсибилизацию кожи?).

[36] Jaworska et al. (2015) Arch Toxicol. 2015 Dec; 89(12):2355-83. doi: 10.1007/s00204-015-1634-2).

[37] OECD (2016). Series on Testing & Assessment No. 256: Guidance Document On The Reporting Of Defined Approaches And Individual Information Sources To Be Used Within Integrated Approaches To Testing And Assessment (IATA) For Skin Sensitisation, Annex 1 and Annex 2. ENV/JM/HA(2016)29. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: [https://community.oecd.org/community/iatass] (Серия по испытаниям и оценке № 256. Руководящий документ по предоставлению отчетности об установленных подходах и индивидуальных источниках информации, подлежащих использованию в рамках интегрированных подходов к испытаниям и оценке (IATA) для кожной сенсибилизации. Приложение 1 и Приложение 2).

[38] Yamamoto Y, Tahara H, Usami R, Kasahara T, Jimbo Y, Hioki T and Fujita M (2015), A novel *in chemico* method to detect skin sensitisers in highly diluted reaction conditions, Journal of Applied Toxicology, 35:1348-60. DOI: 10.1002/jat.3139 (Инновационный метод *in chemico* для обнаружения веществ, способных вызывать сенсибилизацию кожи, при проведении реакций в условиях высокого разбавления).

[39] Fujita M, Yamamoto Y, Watanabe S, Sugawara T, Wakabayashi K, Tahara K, Horie N, Fujimoto K, Kusakari K, Kurokawa Y, Kawakami T, Kojima K, Kojima H, Ono A, Katsuoka Y, Tanabe H, Yokoyama H and Kasahara T (2019), Cause of and Countermeasures for Oxidation of the Cysteine-Derived Reagent Used in the Amino acid Derivative Reactivity Assay, Journal of Applied Toxicology, 39,191-208. DOI: 10.1002/jat.3707 (Причины окисления цистеинпроизводного реактива, используемого при проведении экспериментов по методу анализа реакционной способности в отношении производных аминокислот, и способы его предотвращения).

[40] Fujita M, Yamamoto Y, Watanabe S, Sugawara T, Wakabayashi K, Tahara Y, Horie N, Fujimoto K, Kusakari K, Kurokawa Y, Kawakami T, Kojima K, Sozu T, Nakayama T, Kusao T, Richmond J, Kleinstreuer N, Kim BH, Kojima H, Kasahara T, Ono A, (2019), The within- and between-laboratory reproducibility and predictive capacity of the in chemico Amino acid Derivative Reactivity Assay (ADRA): Results of validation study implemented in four participating laboratories, Journal of Applied Toxicology, 39, 1492-1505. DOI: 10(4).1002/jat.3834. (Внутри- и межлабораторная воспроизводимость и достоверность прогнозирования при применении метода анализа реакционной способности производных аминокислот (ADRA). Результаты валидационного исследования в четырех участвующих лабораториях).

[41] Yamamoto Y, Fujita M, Wanibuchi S, Sato A, Akimoto M, Katsuoka Y, Ono A, Kasahara T. (2019), Applicability of amino acid derivative reactivity assay for prediction of skin sensitization by combining multiple alternative methods to evaluate key events. Journal of Toxicological Sciences, accepted on 44, 585-600. doi: 10.2131/jts.44.585 (Возможность применения метода анализа реакционной способности в отношении производных аминокислот для предсказания кожной сенсибилизации путем комбинирования нескольких альтернативных методов с целью получения оценки ключевых событий).

[42] Yamamoto Y, Wanibuchi S, Sato A, Kasahara T, Fujita M. Precipitation of test chemicals in reaction solutions used in the amino acid derivative reactivity assay and the direct peptide reactivity assay. (2019) Journal of Pharmacological and Toxicological Methods, 100, 106624. doi: 10.1016/j.vascn.2019.106624 (Осаждение тестируемых химикатов в реакционных растворах, используемых в анализе реактивности производных аминокислот и прямом анализе реактивности пептидов).

[43] Fujira M, Yamamoto Y, Wanibuchi S, Katsuoka Y, Kasahara T, (2019), The underlying factors that explain why nucleophilic reagents rarely co-elute with test chemicals in the ADRA. Journal of Pharmacological and Toxicological Methods. 96, 95-105. DOI: 10.1016/j.vascn.2019.02.004 (Базовые факторы, объясняющие низкую встречаемость совместного элюирования нуклеофильных реактивов и исследуемых химических веществ в случае применения метода ADRA).

[44] Yamamoto Y, Fujita M, Wanibuchi S, Katsuoka Y, Ono A, Kasahara T. (2019), Expanding the applicability of the Amino acid Derivative Reactivity Assay (ADRA): Determining a weight concentration for preparation of test chemical solutions that yields a predictive capacity identical to the conventional method using molar concentration and demonstrating the capacity to detect sensitizers in liquid mixtures. Journal of Pharmacological and Toxicological Methods. 97, 67-79. DOI: 10.1016/j.vascn.2019.01.001 (Расширение области применения метода анализа реакционной способности в отношении производных аминокислот (ADRA). Определение необходимого значения массовой концентрации исследуемых химических веществ для приготовления растворов, обеспечивающего уровень достоверности прогнозирования, аналогичный достигаемому с помощью обычно применяемого метода, для которого используется молярное значение концентрации и который позволяет обнаруживать аллергенные вещества при выполнении анализа жидких смесей).

[45] Fujita M, Yamamoto Y, Wanibuchi S, Katsuoka Y, Kasahara T A Newly Developed Means of HPLC-Fluorescence Analysis for Predicting the Skin Sensitization Potential of Multi-Constituent Substances Using ADRA. Toxicology In Vitro, 59, 161-178. DOI: 10.1016/j.tiv.2019.04.014 (Новейшие разработки в области средств выполнения флуоресцентного ВЭЖХ-анализа для целей предсказания сенсибилизирующего действия многокомпонентных веществ при их воздействии на кожу с применением метода ADRA).

[46] ADRA protocol: JaCVAM Statements. Available at: http://www.jacvam.jp/en_effort/effort02.html (Протокол ADRA).

[47] James P. Tam JP, Cui Rong Wu CR, Wen Liu W, Jing Wen Zhang JW. (1991), Disulfide bond formation in peptides by dimethyl sulfoxide. Scope and applications. Journal of the American Chemical Society, 113, 6657—6662. DOI: 10.1021/ja00017a044 (Формирование дисульфидных связей в пептидах при воздействии диметил сульфоксида. Область и возможности применения).

[48] Akimoto M, Yamamoto Y, Watanabe S, Yamaga H, Yoshida K, Wakabayashi K, Tahara Y, Horie N, Fujimoto K, Kusakari K, Kamiya K, Kojima K, Kawakami T, Kojima H, Ono A, Kasahara T, Fujita M (2020) Oxidation of a cysteine-derived nucleophilic reagent by dimethyl sulfoxide in the amino acid derivative reactivity assay. J Appl Toxicol., 40, 843-854. DOI: 10.1002/jat.3948 (Окисление цистеинпроизводного реактива диметил сульфоксидом при проведении экспериментов по методу анализа реакционной способности в отношении производных аминокислот).

[49] Natsch A, Ryan CA, Foertsch L, Emter R, Jaworska J, Gerberick F, Kern P. (2013). A dataset on 145 chemicals tested in alternative assays for skin sensitisation undergoing prevalidation. Journal of Applied Toxicology, 33 (11):1337-52, DOI:10.1002/jat.2868 (База данных по 145 химическим веществам, прошедшим испытания на сенсибилизацию кожи с применением альтернативных методов, подлежащих валидации).

[50] Gerberick GF, Vassalo JD, Foertsch LM, Price BB, Chaney JG, Lepoittevin J-P (2007), Quantification of chemical peptide reactivity for screening contact allergens: A classification tree model approach, Toxicological Sciences, 97, 417-427. DOI: 10.1093/toxsci/kfm064 (Количественное оценивание реакционной способности в отношении пептидов для целей скрининговых исследований контактных аллергенов. Древовидная структура классификации).

[51] Basketter DA, Scholes EW (1992), Comparison of the local lymph node assay with the guinea-pig maximization test for the detection of a range of contact allergens, Food and Chemical Toxicology, 30, 65-69 (Сравнение эффективности метода изучения реакции регионарных лимфатических узлов и теста максимизации для морских свинок при определении ряда контактных аллергенов).

[52] Wareing, B., Urbisch, D., Kolle, S. N., Honarvar, N., Sauer, U. G., Mehling, A.and Landsiedel, R. (2017), Prediction of skin sensitization potency sub-categories using peptide reactivity data. Toxicol In Vitro 45, 134-145 (Предсказание принадлежности к подкатегориям по степени опасности с точки зрения способности вызывать кожную сенсибилизацию в соответствии с данными о реакционной способности в отношении пептидов).

[53] Roberts, D. W. and Natsch, A., (2009) High throughput kinetic profiling approach for covalent binding to peptides: Application to skin sensitization potency of michael acceptor electrophiles. Chem. Res. Toxicol. 22, 592-603 (Высокопропускной метод кинетического профилирования для анализа ковалентного связывания с белками. Применение для оценивания способности электрофильных акцепторов Михаэля вызывать кожную сенсибилизацию).

[54] Natsch, A., Haupt, T., Wareing, B., Landsiedel, R., and Kolle, S.N. (2020) Predictivity of kinetic direct peptide reactivity assay (kDPRA) for sensitizer potency as-sessment and subclassification (Достоверность прогнозирования при использовании метода кинетического прямого анализа реакционной способности в отношении пептидов (kDPRA) для оценивания сенсибилизирующей способности веществ и их классификации в соответствии с подкатегориями).

[55] Wareing, B., Kolle, S.N., Birk, B., Alépée, N., Haupt, T., Kathawala, R., Kern, P., Nardelli, L., Raabe, H., Rucki, M., Ryan, C., Verkaart, S., Westerink, W., Landsiedel, R., Natsch, A. (2020) The kinetic Direct Peptide Reactivity Assay (kDPRA): Intra- and inter-laboratory reproducibility in a seven-laboratory ring trial. ALTEX, 37(4), 639-651, DOI: 10.14573/altex.2004291 (Метод кинетического прямого анализа реакционной способности в отношении пептидов (kDPRA). Воспроизводимость на внутри- и межлабораторном уровне при проведении ключевых сличений в семи лабораториях).

[56] Hoffmann S., Kleinstreuer N., Alépée N., Allen D., Api A. M., Ashikaga T., Clouet E., Cluzel M., Desprez B., Gellatly N., Goebel C., Kern P. S., Klaric M., Kühnl J., Lalko J. F., Martinozzi-Teissier S., Mewes K., Miyazawa M., Parakhia R., van Vliet E., Zang Q., Petersohn D., Non-animal methods to predict skin sensitization (I): the Cosmetics Europe database. Crit Rev Toxicol, 2018. 48(5): p. 344-358 (Применение методов, не требующих использования подопытных животных, в целях предсказания кожной сенсибилизации).

[57] Basketter, D. A., Alepee, N., Ashikaga, T., Barroso, J., Gilmour, N., Goebel, C., Hibatallah, J., Hoffmann, S., Kern, P., Martinozzi-Teissier, S., Maxwell, G., Reisinger, K., Sakaguchi, H., Schepky, A., Tailhardat, M. and Templier, M. (2014) Categorization of chemicals according to their relative human skin sensitizing potency. Dermatitis 25, 11-21 (Классификация химических веществ по их относительной способности вызывать кожную сенсибилизацию у человека).

[58] International ad hoc Expert Panel (2020) Independent Peer-Review Panel Report on the scientific validity of the kinetic Direct Peptide Reactivity Assay (kDPRA) as a modified version of the DPRA assay according to OECD TG 442C, to extend its regulatory applicability to identify UN GHS Subcategory 1A (Отчет независимой экспертной группы по результатам оценки научной обоснованности метода кинетического прямого анализа реакционной способности в отношении пептидов (kDPRA) как модифицированной разновидности метода исследования DPRA в соответствии с OECD TG 442C с точки зрения возможности применения его в сфере государственного регулирования для определения веществ, относящихся к категории 1А согласно СГС ООН).

[59] S. Casati, K. A., B.D. Asturiol, D. Basketter, S. Dimitrov, C. Dumont, A.T. Karlberg, J. P. Lepoittevin, G. Patlewicz, D. Roberts, A. Worth (2016) Ability of non-animal methods for skin sensitisation to detect pre- and pro-haptens: Report and recommendations of an EURL ECVAM expert meeting. Available at: http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC100479http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC100479, last accessed 27.05.206 (Способность методов определения кожной сенсибилизации, не требующих использования подопытных животных, к выявлению пре- и прогаптенов. Отчет и рекомендации заседания экспертов EURL ECVAM).

[60] Urbisch, D., Becker, M., Honarvar, N., Kolle, S. N., Mehling, A., Teubner, W., Wareing, B. and Landsiedel, R. (2016) Assessment of Pre- and Pro-haptens Using Nonanimal Test Methods for Skin Sensitization. Chem. Res. Toxicol. 29, 901-13 (Оценивание способности пре- и прогаптенов вызывать кожную сенсибилизацию с применением методов исследования, не предусматривающих использование подопытных животных).

[61] Natsch A, Emter R, Gfeller H, Haupt T, Ellis G (2015). Predicting Skin Sensitizer Potency Based on In Vitro Data from KeratinoSens and Kinetic Peptide Binding: Global Versus Domain-Based Assessment. Toxicol Sci 143, 319-32 (Предсказание сенсибилизирующей способности веществ при их воздействии на кожу в соответствии с данными in vitro, полученными с применением метода KeratinoSens и метода, использующего кинетическое связывание пептидов. Сравнение глобального подхода к получению оценки и подхода на основе анализа отдельных областей).

[62] DB-ALM Protocol 217: The kinetic Direct Peptide Reactivity assay (kDPRA). Accessible at: http://cidportal.jrc.ec.europa.eu/ftp/jrc-opendata/EURL-ECVAM/datasets/DBALM/LATEST/online/DBALM_docs/217_P_kDPRA_final_27Oct20.pdf (Протокол DB-ALM № 217. Метод кинетического прямого анализа реакционной способности в отношении пептидов (kDPRA)).

[63] Manuscript in preparation: Borderline ranges for in chemico and in vitro skin sensitization OECD test guideline methods determined from ring trials (Документ на стадии подготовки. Граничные диапазоны значений для исследований кожной сенсибилизации в соответствии с методами in chemico и in vitro, описанными в руководствах по проведению испытаний ОЭСР, определенные по итогам круговых сличительных испытаний).

[64] ICCVAM, ICCVAM Test Method Evaluation Report: Usefulness and Limitations of the Murine Local Lymph Node Assay for Potency Categorization of Chemicals Causing Allergic Contact Dermatitis in Humans. 2011. NIH Publication 11-7709 (Эффективность и возможные ограничения применения метода изучения реакции регионарных лимфатических узлов, реализуемого на подопытных мышах, для классификации химических веществ в зависимости от их способности вызывать аллергический контактный дерматит у человека).

[65] ECETOC, ECETOC Document No. 46: Potency Values from the Local Lymph Node Assay: Application to Classification, Labelling and Risk Assessment. 2008 (Значения сенсибилизирующей способности по результам применения метода изучения реакции регионарных лимфатических узлов. Применение для целей классификации, маркировки и оценки рисков).

[66] OECD (2021) Validation report: Kinetic Direct Peptide Reactivity Assay (kDPRA). Series on testing and Assessment n° 337 Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris (Отчет о валидации метода кинетического прямого анализа реакционной способности в отношении пептидов (kDPRA). Серия по испытаниям и оценке № 337).

[67] OECD (2021) Independent Peer-Review Panel Report on the scientific validity of the kinetic Direct Peptide Reactivity Assay (kDPRA). Series on testing and Assessment n 338. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris (Отчет независимой экспертной группы по результатам оценки научной обоснованности метода кинетического прямого анализа реакционной способности в отношении пептидов (kDPRA). Серия по испытаниям и оценке № 338).

УДК 661:615.099:006.354 МКС 71.040.10; 13.020.01 MOD

Ключевые слова: химическая продукция, сенсибилизация кожи *in chemico,* ключевое событие AOP, пути неблагоприятных исходов, ковалентное связывание с белками, метод DPRA, метод ADRA, метод kDPRA

Редактор *Г.Н. Симонова*
Технический редактор *В.Н. Прусакова*
Корректор *О.В. Лазарева*
Компьютерная верстка *Е.О. Асташина*

Сдано в набор 17.11.2023. Подписано в печать 05.12.2023. Формат 60×84⅛. Гарнитура Ариал.
Усл. печ. л. 7,91. Уч.-изд. л. 7,12.

Подготовлено на основе электронной версии, предоставленной разработчиком стандарта

Создано в единичном исполнении в ФГБУ «Институт стандартизации»
для комплектования Федерального информационного фонда стандартов,
117418 Москва, Нахимовский пр-т, д. 31, к. 2.
www.gostinfo.ru info@gostinfo.ru