ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО

ПО ТЕХНИЧЕСКОМУ РЕГУЛИРОВАНИЮ И МЕТРОЛОГИИ

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ГОСТ Р 70355— 2022

ПРОДУКЦИЯ ПИЩЕВАЯ СПЕЦИАЛИЗИРОВАННАЯ

Общие требования к проведению доклинических испытаний на лабораторных животных

Издание официальное

Москва
Российский институт стандартизации
2022

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

1 РАЗРАБОТАН Федеральным государственным бюджетным учреждением науки «Федеральный исследовательский центр питания, биотехнологии и безопасности пищи» (ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии»)

2 ВНЕСЕН Техническим комитетом по стандартизации ТК 036 «Продукция пищевая специализированная»

3 УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 15 сентября 2022 г. № 939-ст

4 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

*Правила применения настоящего стандарта установлены в статье 26 Федерального закона от 29 июня 2015 г. № 162-ФЗ «О стандартизации в Российской Федерации». Информация об изменениях к настоящему стандарту публикуется в ежегодном (по состоянию на 1 января текущего года) информационном указателе «Национальные стандарты», а официальный текст изменений и поправок — в ежемесячном информационном указателе «Национальные стандарты». В случае пересмотра (замены) или отмены настоящего стандарта соответствующее уведомление будет опубликовано в ближайшем выпуске ежемесячного информационного указателя «Национальные стандарты». Соответствующая информация, уведомление и тексты размещаются также в информационной системе общего пользования — на официальном сайте Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии в сети Интернет (*gost.e-ecolog.ru

© Оформление. ФГБУ «РСТ», 2022

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 Нормативные ссылки 1
3 Термины, определения, обозначения и сокращения 2
4 Общие положения 5
5 Воспроизведение *in vivo* моделей алиментарно-зависимых заболеваний 7
6 Дизайн доклинических испытаний специализированной пищевой продукции 8
7 Протокол доклинических испытаний специализированной пищевой продукции 8
8 Оценка состояния животных по физиологическим показателям 9
9 Отбор и исследования проб биологического материала 9
10 Отчет о проведении испытания 10
Приложение А (справочное) Выбор вида и линии животных для воспроизведения *in vivo* моделей алиментарно-зависимых заболеваний 12
Приложение Б (справочное) Модели, применяемые для воспроизведения алиментарно-зависимых заболеваний *in vivo* 13
Приложение В (рекомендуемое) Состав экспериментальных рационов 14
Приложение Г (рекомендуемое) Методы исследования биологических проб лабораторных животных 16
Библиография 21

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ПРОДУКЦИЯ ПИЩЕВАЯ СПЕЦИАЛИЗИРОВАННАЯ

Общие требования к проведению доклинических испытаний на лабораторных животных

Specialized food products. General requirements for preclinical tests on laboratory animals

Дата введения — 2023—06—01

1 Область применения

Настоящий стандарт распространяется на специализированную пищевую продукцию, включая пищевую продукцию диетического лечебного и диетического профилактического питания, пищевую продукцию диабетического питания, пищевую продукцию для питания спортсменов, биологически-активные добавки к пище для взрослых, а также на используемые при производстве указанных видов продукции сельскохозяйственную продукцию (сырье), пищевые ингредиенты и пищевые добавки и устанавливает общие требования к доклиническим испытаниям указанных видов продукции в тестах на лабораторных животных.

Настоящий стандарт не распространяется на исследования и доклинические испытания специализированной пищевой продукции детского ассортимента, продукции для беременных и кормящих женщин, смесей для энтерального зондового и парентерального питания и специализированной пищевой продукции для больных с врожденными нарушениями обмена веществ (орфанными заболеваниями).

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы нормативные ссылки на следующие стандарты:

ГОСТ 12.1.004 Система стандартов безопасности труда. Пожарная безопасность. Общие требования

ГОСТ 12.1.007 Система стандартов безопасности труда. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности

ГОСТ 12.1.008 Система стандартов безопасности труда. Биологическая безопасность. Общие требования

ГОСТ 12.1.018 Система стандартов безопасности труда. Пожаровзрывобезопасность статического электричества. Общие требования

ГОСТ 13867 Продукты химические. Обозначение чистоты

ГОСТ 30178 Сырье и продукты пищевые. Атомно-абсорбционный метод определения токсичных элементов

ГОСТ 31886 Принципы надлежащей лабораторной практики (GLP). Применение Принципов GLP к краткосрочным исследованиям

ГОСТ 31890 Принципы надлежащей лабораторной практики (GLP). Организация и управление исследованиями, проводимыми на нескольких испытательных площадках

ГОСТ 33044 Принципы надлежащей лабораторной практики

ГОСТ 33215 Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила оборудования помещений и организации процедур

ГОСТ 33216 Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за лабораторными грызунами и кроликами

Издание официальное

ГОСТ 34566 Комбикорма полнорационные для лабораторных животных. Технические условия

ГОСТ ISO/IEC 17025 Общие требования к компетентности испытательных и калибровочных лабораторий

ГОСТ Р 52349 Продукты пищевые. Продукты пищевые функциональные. Термины и определения

ГОСТ Р 56699 Лекарственные средства для медицинского применения. Доклинические исследования безопасности биотехнологических лекарственных препаратов. Общие рекомендации

ГОСТ Р 56701 Лекарственные средства для медицинского применения. Руководство по планированию доклинических исследований безопасности с целью последующего проведения клинических исследований и регистрации лекарственных средств

ГОСТ Р ИСО 14155 Клинические исследования. Надлежащая клиническая практика

ГОСТ Р ИСО 24153 Статистические методы. Процедуры рандомизации и отбора случайной выборки

Примечание — При пользовании настоящим стандартом целесообразно проверить действие ссылочных стандартов в информационной системе общего пользования — на официальном сайте Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии в сети Интернет или по ежегодному информационному указателю «Национальные стандарты», который опубликован по состоянию на 1 января текущего года, и по выпускам ежемесячного информационного указателя «Национальные стандарты» за текущий год. Если заменен ссылочный стандарт, на который дана недатированная ссылка, то рекомендуется использовать действующую версию этого стандарта с учетом всех внесенных в данную версию изменений. Если заменен ссылочный стандарт, на который дана датированная ссылка, то рекомендуется использовать версию этого стандарта с указанным выше годом утверждения (принятия). Если после утверждения настоящего стандарта в ссылочный стандарт, на который дана датированная ссылка, внесено изменение, затрагивающее положение, на которое дана ссылка, то это положение рекомендуется применять без учета данного изменения. Если ссылочный стандарт отменен без замены, то положение, в котором дана ссылка на него, рекомендуется применять в части, не затрагивающей эту ссылку.

3 Термины, определения, обозначения и сокращения

3.1 Термины и определения

В настоящем стандарте применены термины по ГОСТ Р ИСО 14155, ГОСТ 33044, ГОСТ Р 52349, [1], [2], [3], а также следующие термины с соответствующими определениями:

3.1.1

биологически активные добавки к пище (БАД): Природные и (или) идентичные природным биологически активные вещества, а также пробиотические микроорганизмы, предназначенные для употребления одновременно с пищей или введения в состав пищевой продукции.

[[1], статья 4]

3.1.2 **биологический материал:** Биологические жидкости (кровь, моча, слюна, желчь), органы и ткани, получаемые от лабораторных животных прижизненно или после гибели или путем выведения из испытаний (эвтаназии).

3.1.3 **дизайн доклинических испытаний специализированной пищевой продукции:** Документ, устанавливающий используемые при проведении доклинических испытаний вид животных, их пол, линию, возраст, рационы, перечень исследуемых характеристик эффективности и безопасности и способы их оценки.

3.1.4 **доза-эффект:** Взаимосвязь между дозой и степенью выраженности биологического эффекта у экспонируемого животного или группы животных.

3.1.5 **доклинические испытания специализированной пищевой продукции:** Экспериментально-лабораторное изучение новых видов специализированной пищевой продукции и ее ингредиентов с целью определения их безопасности и эффективности.

3.1.6

компонент пищевой продукции (пищевой ингредиент): Продукт или вещество (включая пищевые добавки, ароматизаторы), которые в соответствии с рецептурой используются при производстве (изготовлении) пищевой продукции и являются ее составной частью.

[[1], статья 4]

3.1.7

минорные и биологически активные вещества пищи с установленным физиологическим действием: Природные вещества пищи установленной химической структуры, присутствующие в ней в миллиграммах и микрограммах, играющие важную и доказанную роль в адаптационных реакциях организма, поддержании здоровья, но не являющиеся эссенциальными пищевыми веществами.

[[2], статья 2]

3.1.8

нутриенты (пищевые вещества): Вещества, являющиеся составными частями пищевой продукции, которые используются организмом человека как источники энергии, источники или предшественники субстратов для построения, роста и обновления органов и тканей, образования физиологически активных веществ, участвующих в регуляции процессов жизнедеятельности, и определяющие пищевую ценность пищевой продукции.

[[1], статья 4]

3.1.9

обогащенная пищевая продукция: Пищевая продукция, в которую добавлены одно или более пищевые и (или) биологически активные вещества и (или) пробиотические микроорганизмы, не присутствующие в ней изначально, либо присутствующие в недостаточном количестве или утерянные в процессе производства (изготовления); при этом гарантированное изготовителем содержание каждого пищевого или биологически активного вещества, использованного для обогащения, доведено до уровня, соответствующего критериям для пищевой продукции — источника пищевого вещества или других отличительных признаков пищевой продукции, а максимальный уровень содержания пищевых и (или) биологически активных веществ в такой продукции не должен превышать верхний безопасный уровень потребления таких веществ при поступлении из всех возможных источников (при наличии таких уровней).

[[1], статья 4]

3.1.10 **отбор проб (биологического материала):** Отделение части биологического материала или изъятие из организма животного цельного органа (ткани) с целью формирования пробы для последующего определения ее (его) состава, структуры и/или свойств.

3.1.11 **отчет о доклиническом исследовании:** Документ, содержащий результаты доклинического исследования и их анализ в соответствии с требованиями правил надлежащей лабораторной практики, включая любые изменения и (или) отклонения, их причины и обоснования и соответствующее результатам исследования заключение о безопасности и эффективности.

3.1.12

пищевая продукция диабетического питания: Пищевая продукция диетического лечебного или диетического профилактического питания, в которой отсутствуют или снижено содержание легкоусвояемых углеводов (моносахаридов — глюкоза, фруктоза, галактоза, и дисахаридов — сахароза, лактоза) относительно их содержания в аналогичной пищевой продукции и (или) изменен углеводный состав.

[[3], статья 4]

3.1.13

пищевая продукция диетического лечебного питания: Специализированная пищевая продукция с заданной пищевой и энергетической ценностью, физическими и органолептическими свойствами, предназначенная для использования в составе лечебных диет.

[[3], статья 4]

3.1.14

пищевая продукция диетического профилактического питания: Специализированная пищевая продукция, предназначенная для коррекции углеводного, жирового, белкового, витаминного и других видов обмена веществ, в которой изменено содержание и (или) соотношение отдельных веществ относительно естественного их содержания, и (или) в состав которой включены не присутствующие изначально вещества или компоненты, а также пищевая продукция, предназначенная для снижения риска развития заболеваний.

[[3], статья 4]

3.1.15

пищевая продукция для питания спортсменов: Специализированная пищевая продукция заданного химического состава, повышенной пищевой ценности и (или) направленной эффективности, состоящая из комплекса продуктов или представленная их отдельными видами, которая оказывает специфическое влияние на повышение адаптивных возможностей человека к физическим и нервно-эмоциональным нагрузкам.

[[3], статья 4]

3.1.16

пищевая продукция: Продукты животного, растительного, микробиологического, минерального, искусственного или биотехнологического происхождения в натуральном, обработанном или переработанном виде, которые предназначены для употребления человеком в пищу, в том числе специализированная пищевая продукция, упакованная питьевая вода (в том числе природная минеральная вода, купажированная питьевая вода, обработанная питьевая вода, питьевая вода для детского питания, искусственно минерализованная питьевая вода), алкогольная продукция (в том числе пиво и напитки на основе пива), безалкогольные напитки, биологически активные добавки к пище (БАД), жевательная резинка, закваски и стартовые культуры микроорганизмов, дрожжи, пищевые добавки и ароматизаторы, а также продовольственное (пищевое) сырье.

[[1], статья 4]

3.1.17 **проба:** Часть биологического материала или цельный орган (ткань), полученные из организма лабораторного животного и предназначенные для проведения исследований.

3.1.18 **протокол (испытаний):** Документ, содержащий результат(ы) исследования и информацию, необходимую для правильного и однозначного понимания этих результатов.

3.1.19

специализированная пищевая продукция: Пищевая продукция, для которой установлены требования к содержанию и (или) соотношению отдельных веществ или всех веществ и компонентов, и (или) изменено содержание и (или) соотношение отдельных веществ относительно естественного их содержания в такой пищевой продукции, и (или) в состав включены не присутствующие изначально вещества или компоненты (кроме пищевых добавок и ароматизаторов), и (или) изготовитель заявляет об их лечебных и (или) профилактических свойствах, и которая предназначена для целей безопасного употребления этой пищевой продукции отдельными категориями людей.

[[1], статья 4]

3.1.20 **стандартные операционные процедуры,** СОП: Подробные письменные инструкции, содержащие описание процессов проведения испытаний или другой деятельности, как правило, не представленные детально в планах исследования или руководствах по проведению испытаний и предназначенные для достижения единообразия при осуществлении определенной деятельности.

3.2 Обозначения и сокращения

В настоящем стандарте применены следующие обозначения и сокращения:

БАВ — биологически-активные вещества;

ВЭЖХ — высокоэффективная жидкостная хроматография;

ИФА — иммуноферментный анализ;

КФ — каталог ферментов;

ЛПВП — липопротеиды высокой плотности;
ЛПНП — липопротеиды низкой плотности;
ПНЖК — полиненасыщенные жирные кислоты;
ТБК — тиобарбитуровая кислота;
ТГ — триглицериды;
ХС — холестерин;
AIN-93 — стандартизованный рацион для грызунов (American Institute of nutrition);
CYP — цитохром Р-450;
QSAR — модель количественной связи структура—активность.

4 Общие положения

4.1 Доклинические испытания специализированной пищевой продукции проводят с целью предварительной оценки ее предполагаемой эффективности в диетотерапии алиментарно-зависимых заболеваний, а также выявления возможных неблагоприятных (включая токсические) эффектов компонентов и ингредиентов указанных видов пищевой продукции. Результаты доклинических испытаний специализированной пищевой продукции являются основанием для доработки ее рецептур и технологии с последующим переходом к клиническим испытаниям специализированной продукции оптимизированного состава у соответствующих групп больных и условно здоровых лиц. Результаты доклинических испытаний учитывают при Государственной регистрации пищевой продукции нового вида в соответствии с требованиями технических регламентов ЕАЭС.

4.2 Доклинические испытания специализированной пищевой продукции проводят в соответствии с принципами надлежащей лабораторной практики по ГОСТ 33044, ГОСТ 31890, ГОСТ 31886, ГОСТ Р 56701, ГОСТ Р 56699 и в других источниках[1)]. Лаборатории для проведения испытаний должны соответствовать требованиям ГОСТ ISO/IEC 17025. На все операции, выполняемые в ходе испытаний, должны быть установлены стандартные операционные процедуры.

4.3 При проведении доклинических испытаний обязательным является соблюдение принципов гуманного обращения с лабораторными животными. Перед проведением доклинических испытаний должна быть проанализирована вся имеющаяся информация об исследуемой специализированной пищевой продукции и (или) ее компонентах, включая результаты ранее проведенных испытаний, наличие которых не требует проведения дополнительных испытаний, с целью минимизации использования животных, а также информация, которая может помочь в выборе наиболее подходящего вида, линии и пола тестовых животных, времени воздействия, дозы исследуемой продукции. При проведении испытаний следует прилагать все возможные усилия к тому, чтобы в ходе выполнения экспериментальных процедур избегать действий, способных привести к долговременным повреждениям, боли, страданиям или тревоге, а в случае их неизбежности, чтобы такие последствия были сведены к минимуму. При составлении дизайна исследования следует выбирать минимальное число и размер (численность) групп лабораторных животных, руководствуясь необходимостью получения корректно интерпретируемого и статистически достоверного результата испытаний.

4.4 Для уменьшения общего количества используемых животных в доклинических исследованиях целесообразно применять методы математического моделирования, основанные на моделях количественной связи, структура—активность (QSAR), моделях прогнозирования на основе правил и знаний, а также на математических биокинетических моделях. Для разработки указанных моделей могут быть использованы различные математические методы, такие как машинное/глубокое обучение в случае QSAR и другие модели, основанные на правилах (например, байесовские сети). Биокинетические модели, как правило, основаны на дифференциальных уравнениях[2)]. Для обеспечения условий прослеживаемости и воспроизводимости данных исследований необходимо применять валидированное программное обеспечение. Результаты исследований методами математического моделирования могут быть использованы в дополнение к результатам исследований *in vivo* для механистического понимания путей действия специализированной пищевой продукции и ее компонентов[3)].

[1)] См. [4], [5].

[2)] Построение биокинетических моделей в соответствии с рекомендациями [6].

[3)] См. рекомендации [7].

4.5 Специализированная пищевая продукция и ее компоненты, используемые в испытаниях, ингредиенты экспериментальных рационов должны иметь прослеживаемое происхождение и сопровождаться спецификацией, раскрывающей химический и ингредиентный составы, наличие примесей, в том числе представляющих опасность для здоровья человека и лабораторных животных, а также ограничиваемых (нормируемых) согласно требованиям [1] и стандартам Codex alimentarius для соответствующих видов пищевой продукции, наличие ингредиентов, получаемых из генетически-модифицированных организмов или генетически-модифицированных микроорганизмов при обоснованном предположении об их использовании при производстве пищевой продукции, применяемой при составлении экспериментальных рационов.

4.6 Доклинические испытания специализированной пищевой продукции проводят с применением биологических *in vivo* моделей. Предпочтительным является использование биологических моделей на лабораторных грызунах [мышах (*Mus spp.*), крысах (*Rattus spp.*)]. Это определяется наличием достоверной научной информации о механизмах развития алиментарно-зависимых заболеваний у животных этих таксономических групп, полной расшифровкой их геномов, максимальными объемами аннотирования функций их генов и метаболических путей, наиболее полной информацией о биомаркерах патологического процесса и наличием однозначных соответствий экспериментально определяемых показателей с теми, которые связаны с развитием аналогичных видов патологии у человека. Допускается использование животных других видов, если это диктуется целями и дизайном доклинических испытаний специализированной пищевой продукции.

4.7 При проведении доклинических испытаний следует использовать лабораторные животные стандартизованных линий и пород, поступающие из авторизованных питомников или содержащиеся в лабораторной колонии и являющиеся прослеживаемыми. Линии лабораторных животных, применяемые при проведении доклинических испытаний, могут быть конвенциональными (аутбредными и инбредными) либо генетически модифицированными (мутантными, трансгенными, нокаутными). Выбор вида и линии животных определен задачами воспроизведения адекватной экспериментальной *in vivo* модели и свойствами испытуемой специализированной пищевой продукции.

4.8 В доклинических испытаниях могут быть использованы животные обоих полов (самцы и самки). При формировании каждой экспериментальной группы животных, включаемых в исследование, она должна быть укомплектована животными только одного пола. В зависимости от задач и дизайна исследования, сравниваемые экспериментальные группы животных могут быть представлены животными одного вида, линии и пола, либо животными одного вида и линии, но разных полов, либо животными одного вида и пола, но разных линий. Не допускается проведение сравнений животных, получающих разные экспериментальные рационы и при этом принадлежащих к разным (не совпадающим) виду, полу и линии.

Примечание — Для проведения испытания используют здоровых молодых половозрелых животных, если иное не диктуется задачами и дизайном исследования (например, исследования на стареющих животных, животных, подвергнутых гонадэктомии, животных, обработанных фармакологическими препаратами, такими как стрептозотоцин).

4.9 Животных при проведении доклинических испытаний содержат в специализированных виварииях (клиниках лабораторных животных). Размещение, содержание и уход за лабораторными животными должны соответствовать ГОСТ 33215, ГОСТ 33216. Кормление животных следует осуществлять рационами по ГОСТ 34566, обеспечивающими физиологические потребности животных во всех основных пищевых веществах и энергии, за исключением особых случаев, определяемых дизайном испытания (например, при проведении испытаний на животных с патологией, вызванной искусственно воспроизведенным нарушением энергетической ценности или состава пищевых веществ). Пищевую ценность рационов животных опытных и контрольных групп (содержание основных групп макро- и микронутриентов, а также минорных БАВ) устанавливают при разработке дизайна испытаний в соответствии с их задачами и составом исследуемой пищевой продукции.

4.10 Режим доступа животных к экспериментальным рационам (свободный или ограниченный) устанавливают в дизайне испытаний в соответствии с их задачами и используемой биологической *in vivo* моделью.

4.11 Доступ лабораторных животных к питьевой воде при проведении доклинических испытаний является свободным (в неограниченном количестве), если иное не установлено дизайном испытания (например, при введении исследуемых БАВ или компонентов экспериментальной диеты в дозированных количествах с питьевой водой). Качество воды должно соответствовать требованиям [8]. Для жи-

вотных рекомендуется использовать воду, полученную методом обратного осмоса, сбалансированную по минеральному составу.

4.12 В помещении, где содержатся животные, следует поддерживать физиологически оптимальные условия внешней среды для животных данного вида и линии (для крыс и мышей большинства линий это температура от 21 °С до 22 °С и относительная влажность от 60 % до 80 %). Животные должны содержаться в клетках из нетоксичного биологически инертного материала на нетоксичной подстилке из натуральных (природных) материалов. Специальные меры по предотвращению копрофагии предпринимаются в случаях, определяемых дизайном испытаний. Режим освещенности в помещении, где находятся животные, должен соответствовать 12/12-часовому чередованию светлых и темных периодов. Устройство укрытий для животных и обогащение среды обитания (environmental enrichment) являются желательными (рекомендуемыми)[1)].

4.13 Мелкие животные (крысы, мыши) в пределах каждой экспериментальной группы содержатся в клетках, как правило, по две — четыре особи. Индивидуальное (по одному животному в клетке) содержание должно быть в отношении агрессивных животных, а также в других случаях, определяемых дизайном испытаний.

4.14 При проведении доклинических испытаний проводят ежедневный визуальный осмотр состояния всех животных экспериментальных групп, фиксируя особенности поведения, состояние кожношерстяного покрова и слизистых оболочек, стула. Павших, а также больных животных (после гуманной эвтаназии) подвергают обзорному патологоанатомическому изучению. Взвешивание (определение массы тела) животных, раздачу экспериментальных рационов, определение непотребленных остатков рационов и питьевой жидкости, проведение тестов поведенческих реакций и нейромоторики выполняют по графику, устанавливаемому дизайном испытания.

4.15 При выведении животных из эксперимента следует применять гуманные методы эвтаназии[2)]. Выбор метода эвтаназии определен дизайном эксперимента и набором изучаемых лабораторных показателей.

4.16 Требования безопасности

4.16.1 При работе с биологическими объектами необходимо соблюдать требования техники безопасности по ГОСТ 12.1.008.

4.16.2 При работе с вредными веществами необходимо соблюдать требования техники безопасности по ГОСТ 12.1.007.

4.16.3 Безопасность при работе с электроустановками обеспечивается соблюдением требований ГОСТ 12.1.004, ГОСТ 12.1.018 и эксплуатационной документацией на оборудование.

5 Воспроизведение *in vivo* моделей алиментарно-зависимых заболеваний

5.1 Доклинические испытания специализированной пищевой продукции проводят с использованием как здоровых нормальных животных, так и животных с экспериментальными моделями алиментарно-зависимых заболеваний. Выбор экспериментальных моделей определяется целью доклинических испытаний и показаниями к применению исследуемой специализированной пищевой продукции.

5.2 Экспериментальные модели алиментарно-зависимых заболеваний могут воспроизводиться с использованием животных конвенциональных линий, получающих рационы с измененной пищевой ценностью (соотношением основных макро- и микронутриентов), генетически модифицированных линий животных (мутантных, трансгенных, нокаутных), животных, обработанных фармакологическими препаратами и/или подвергнутых хирургическим вмешательствам, а также путем сочетания указанных моделей. Характеристика наиболее часто используемых экспериментальных *in vivo* моделей алиментарно-зависимых заболеваний и применяемых при этом рационов приведена в приложениях А, Б и В.

5.3 При проведении доклинических испытаний специализированную пищевую продукцию или ее отдельные компоненты вводят в состав применяемых рационов или при наличии такой возможности растворяют в питьевой воде. При составлении дизайна испытаний следует принимать во внимание химическую и биологическую совместимость компонентов экспериментальных диет, их эквивалентность по основным показателям пищевой ценности (за исключением содержания тестируемого компонента).

[1)] Методы обогащения среды обитания представлены в [9].

[2)] См. [5], [10].

Допускается введение продукции, подлежащей испытаниям, через желудочный зонд. Введение компонентов пищевой продукции в организм животных минуя желудочно-кишечный тракт (парентерально), не допускается.

5.4 При введении животным пищевой продукции, подлежащей испытаниям, в составе экспериментального рациона или в виде раствора в питьевой воде дозу продукции определяют ежедневно расчетным методом на основании фактически потребленного количества корма или жидкости. При расхождении в предыдущие сутки эксперимента количества потребленной продукцией с дозой, установленной в дизайне эксперимента, количество продукции, вводимой в состав корма или жидкости, корректируют. Фактически потребленную дозу продукции и выполняемые коррекции фиксируют в протоколе испытаний. Дозу пищевой продукции, вводимой через желудочный зонд, измеряют непосредственно.

6 Дизайн доклинических испытаний специализированной пищевой продукции

6.1 Дизайн доклинических испытаний разрабатывается после получения технического задания на проведение испытаний в соответствии с 4.6 и визируется руководителем подразделения (испытательной лаборатории).

6.2 Дизайн доклинических испытаний содержит следующие основные разделы:

- цель испытаний;
- наименование продукции, ее спецификация;
- вид, линия, пол экспериментальных животных;
- перечень экспериментальных и контрольных групп животных, их численность;
- применяемые рационы, способ введения в них подлежащей испытаниям продукции, ее доза;
- численность размещаемых животных в клетках;
- информация об одобрении этическим комитетом;
- длительность кормления экспериментальными рационами;
- график проведения тестов животным на протяжении периода кормления, периодичность проведения тестов;
- способ эвтаназии животных;
- перечень отбираемых проб, способ их отбора;
- перечень определяемых у животных лабораторных показателей;
- методы статистической обработки результатов испытаний;
- а также предусмотренное задачами испытаний.

7 Протокол доклинических испытаний специализированной пищевой продукции

7.1 Протокол доклинических испытаний специализированной пищевой продукции ведется на протяжении всего периода испытаний в соответствии с разделом 6.

7.2 В протоколе испытаний в соответствии с периодичностью, устанавливаемой дизайном испытаний, фиксируют:

- количество потребленных корма и жидкости, дозы потребленной специализированной пищевой продукции;
- внешний вид животных, особенности поведения, состояние кожно-шерстяного покрова и слизистых оболочек, стул;
- массу тела животных на протяжении кормления;
- результаты обзорного патологоанатомического исследования погибших животных и животных, досрочно выведенных из эксперимента, причины досрочного выведения;
- результаты проведения прижизненных тестов;
- массу тела животных при выведении из эксперимента, массу внутренних органов, результаты обзорного патологоанатомического исследования;
- перечень отобранных биологических образцов, сведения об их передаче на исследование.

7.3 Ведение протокола допускается как на бумажном, так и на электронных носителях.

8 Оценка состояния животных по физиологическим показателям

8.1 Тестирование физиологических показателей животных при проведении доклинических испытаний специализированной пищевой продукции проводят прижизненно, на протяжении периода кормления экспериментальными рационами, в соответствии с дизайном доклинических испытаний согласно разделу 6. Тестирование животных всех опытных и контрольных групп проводят в идентичных условиях. Животных из разных групп вводят в проводимые тесты в случайной последовательности (рандомизированно) согласно ГОСТ Р ИСО 24153.

8.2 Допускается проведение нескольких повторов одного физиологического теста и нескольких тестов для учета динамики показателей на одном животном на протяжении периода кормления экспериментальным рационом в контролируемых исследованиях. График проведения тестов установлен дизайном испытаний и составлен таким образом, чтобы стресс, вызываемый тестами у животных, не оказывал воздействия на результаты других тестов.

8.3 При оценке состояния нейромоторики (мышечного тонуса) животных используют силы хватки передних лап у крыс и мышей[1)]. Результаты теста выражают в максимальной силе хватки, выражаемой в миллиньютонах, в расчете на 1 г (кг) массы тела животного.

8.4 Уровень тревожности животных оценивают в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт». Тест проводят в двух повторах на первой и предпоследней неделе периода кормления экспериментальным рационом[2)].

8.5 Оценку когнитивной функции (краткосрочной и долгосрочной памяти животных) проводят в тесте «Условный рефлекс пассивного избегания» (УРПИ)[3)].

8.6 Уровень систолического и диастолического артериального давления у крыс и мышей измеряют с помощью хвостовой манжеты согласно инструкции производителя применяемого средства измерений.

8.7 Прижизненный мониторинг уровня глюкозы крови, пероральный глюкозотолерантный тест, тест на инсулинорезистентность у крыс и мышей проводят с использованием портативного глюкометра согласно инструкции производителя.

8.8 Для прижизненного определения уровней гликированного гемоглобина крови[4)], уровней цитокинов[5)], хемокинов[5)], ростовых факторов[5)], адипокинов[5)] используются валидированные методы.

8.9 При проведении доклинических испытаний специализированной пищевой продукции в соответствии с дизайном испытаний допускается использование других физиологических тестов.

9 Отбор и исследования проб биологического материала

9.1 Пробы органов и тканей отбирают отдельно для каждого животного. Объединения проб от разных животных (в том числе в пределах одной группы) не допускаются.

9.2 В целях исключения влияния внешних факторов на качественные и количественные характеристики отбираемых проб биологического материала отбор проб от животных опытных и контрольных групп осуществляют в случайной последовательности по ГОСТ Р ИСО 24153.

9.3 Для исключения влияний циркадных и более длительных биоритмов организмов животных на результаты испытаний отбор проб проводят одновременно в опытной и контрольной группах в одно и то же время суток на протяжении не более 2-3 ч (предпочтительно между 9-ю и 12-ю часами) на следующие сутки после завершения испытания. Если число групп животных или число животных в каждой группе не позволяет выполнить отбор проб в указанном интервале времени, животных опытных и контрольных групп следует выводить из исследования равными группами на протяжении не более 2-3 сут после завершения испытания в одно и то же время суток. Животных из разных групп выводят из эксперимента в случайной последовательности (рандомизированно) согласно 9.2.

9.4 После взятия проб определяют массу (объем) пробы и выполняют анализ соответствующими методами, установленными в стандарте/методике на конкретный метод испытания, или консервируют.

---

1) Методика проведения теста представлена в [11].

2) Методика проведения теста представлена в [12].

3) Методика проведения теста представлена в [13].

4) Методика проведения испытаний в соответствии с [14].

5) Методика проведения испытаний в соответствии с [15,16].

Применяемый метод консервации не должен приводить к изменениям определяемых физико-химических и биологических (включая микробиологические) показателей отобранной пробы на протяжении всего периода хранения до проведения анализа. Метод консервации проб биологического материала установлен в методике на конкретный метод испытания.

9.5 Отобранные пробы биологического материала помещают в контейнеры (пробирки или флаконы) и маркируют. Маркировка должна обеспечивать прослеживаемость проб биологического материала на протяжении всего периода испытаний. На контейнере (пробирке или флаконе) указывают только номер пробы. Остальную информацию указывают в протоколе испытаний и сопроводительном листе, прилагаемом к пробам и содержащем сведения о порядке нумерации проб и их принадлежности к животным опытных и контрольных групп. Запрещается нанесение номеров и иных идентифицирующих надписей на пробки (крышки) контейнеров и иные элементы тары, удаляемые до начала анализа проб. Коробки для хранения контейнеров с пробами должны иметь маркировку, включающую:

- дату проведения испытания;
- наименование испытания;
- наименование специализированной пищевой продукции;
- наименование или номер группы;
- максимальный срок хранения пробы;
- фамилию ответственного лица.

9.6 Для оценки действия специализированной пищевой продукции на лабораторных животных в пробах биологического материала осуществляют анализ маркеров, характеризующих состояние:

- липидного обмена;
- углеводно-энергетического обмена;
- белкового обмена;
- минерального обмена;
- биосинтетических процессов (экспрессия белков и нетранслируемых РНК);
- морфологии внутренних органов;
- иммунологических показателей.

Перечень тестируемых показателей и анализируемых проб биологического материала устанавливается дизайном испытаний по разделу 6. Список рекомендуемых при проведении доклинических испытаний специализированной пищевой продукции лабораторных показателей представлен в приложении Г.

9.7 При проведении испытаний специализированной пищевой продукции необходимо учитывать информацию, приведенную в 9.7.1—9.7.3.

9.7.1 Методы, применяемые при отборе биологического материала животных (включая тип используемой анестезии), отборе и хранении до анализа биологических образцов, не должны приводить к неконтролируемым изменениям биохимических показателей.

9.7.2 Количество отбираемых биологических образцов должно быть достаточным для проведения всех необходимых анализов с учетом указанного числа повторностей анализируемых проб (как правило, не менее двух). Ввиду этого в зависимости от числа анализов, массы тела и возраста животных численность экспериментальных групп животных может быть изменена в сторону увеличения.

9.7.3 Не допускается проводить объединение проб биологического материала от разных животных одной группы, так как данный подход может замаскировать биологическую вариабельность данных и привести к ложному завышению статистической значимости результата.

10 Отчет о проведении испытания

10.1 В отчете о проведении испытания регистрируют информацию о специализированной пищевой продукции, содержащуюся в сопроводительной документации и нормативных документах на конкретный вид продукции, включая идентификационные данные, ингредиентный и химический состав продукции, показания к применению, сведения о санитарно-химических и санитарно-биологических показателях безопасности согласно [1].

10.2 В отчете должны быть представлены данные по отдельным животным и результаты аутопсии. Данные наблюдений и испытаний должны быть представлены в табличной форме, демонстрирующей для каждой группы: число используемых животных; число животных с определенными признаками патологии; число животных, найденных мертвыми во время испытания или умерщвленных из гуманных

соображений; индивидуальное время смерти животных; описание и временной ход развития патологических эффектов, их обратимость; результаты аутопсии и анализа проб биологического материала.

10.3 Отчет о проведении испытания

Отчет должен содержать достаточную информацию о методах испытаний и математической обработки полученных первичных данных.

Требования к отчету о проведенных испытаниях устанавливают в соответствии со стандартами или методиками на применяемые методы испытаний.

10.4 Оценка результатов

Оценку эффективности специализированного пищевого продукта и его компонентов в диетотерапии алиментарно-зависимого заболевания проводят комплексно с позиции критериев причинности Хилла[1)]. В результате исследований должна быть показана:

- воспроизводимость результатов исследований в других условиях и другими методами;
- статистическая достоверность наблюдаемых эффектов;
- специфичность наблюдаемого эффекта, т. е. то, что введение специализированного пищевого продукта или его компонента в рацион животного вызывает один специфический эффект;
- зависимость «доза — эффект»;
- временная зависимость наблюдаемого эффекта, т. е. то, что введение продукта в рацион животного всегда предшествует наблюдаемому положительному эффекту;
- согласованность наблюдаемого эффекта с существующими представлениями о патобиологических процессах;
- сопоставимость полученных результатов с существующими теоретическими знаниями.

[1)] Методика проведения теста представлена в [17].

Приложение А
(справочное)

Выбор вида и линии животных для воспроизведения *in vivo* моделей алиментарно-зависимых заболеваний

Для воспроизведения *in vivo* моделей алиментарно-зависимых заболеваний в качестве оптимального варианта рекомендуется использование лабораторных грызунов — мышей и крыс обоих полов. С одной стороны, эти животные имеют целый ряд преимуществ при биологическом моделировании, включая относительно небольшую естественную продолжительность жизни, быструю смену поколений, высокую степень изученности генома, наличие большого числа стандартизованных линий, включая как конвенциональные (полученные путем длительного близкородственного скрещивания или выведенные путем фенотипического отбора), так и всевозможные линии мутантных и нокаутных животных. Преимуществом последних является их способность развивать симптомы алиментарно-зависимых заболеваний (ожирения, гиперлипидемии, атеросклероза и др.) даже при потреблении стандартных виварных рационов в течение непродолжительного (от одного до двух месяцев) времени.

С другой стороны, предрасположенность таких животных к развитию целевой патологии определена наличием ограниченного числа (часто одного) мутантных генов, что не вполне соответствует полиэтиологической природе алиментарно-зависимых заболеваний у человека. В этом отношении более релевантным является использование животных, принадлежащих к линиям, полученным традиционными селекционными методами. Среди них в качестве подходящих для реализации отдельных целей исследований следует задействовать крыс линий Wistar и Dark Aguti, мышей линий ICR-1 (синоним CD-1), DBA/2J, C57Black/6J, Balb/c.

Определенный интерес вызывают также животные-гибриды 1-го и 2-го поколения между отдельными чистыми линиями. Это, например, такие межлинейные гибридные животные, как гибриды крыс Wistar и Dark Aguti 1-го поколения (F1) и сложные межлинейные гибриды мышей DBCB, полученных путем скрещивания четырех различных инбредных линий мышей (DBA/2J, BALB/c, CBA/lac и C57Black/6J). Для получения последних самок мышей DBA/2J скрещивают с самцами BALB/c (1-й гибрид F1), а самок CBA/lac — с самцами C57Black/6J (2-й гибрид F1); для получения тетрагибридов животных из обоих гибридов F1 скрещивают между собой. Преимуществами гибридных животных является их повышенная по сравнению с родительскими линиями стрессоустойчивость, резистентность к непредусмотренным планом исследования патогенным факторам. Гибриды отличаются большей по сравнению с исходными родительскими инбредными линиями степенью гетерозиготности, критически важной для поддержания высокого уровня углеводного/липидного метаболизма и воспроизведения требуемой патологии.

Моделирование алиментарно-зависимых заболеваний возможно с использованием как самцов, так и самок животных. Оба варианта имеют как преимущества, так и недостатки с позиции техники эксперимента. Так, самки мышей большинства линий по сравнению с самцами обладают большей стрессоустойчивостью и меньшей агрессивностью, легче адаптируются к потреблению экспериментальных рационов, однако могут характеризоваться большей широтой нормы реакции некоторых молекулярных биомаркеров из-за несогласованности используемой популяции животных по фазе эстрального цикла. Следует также иметь в виду, что потребление одних и тех же, в частности высокоуглеводных, экспериментальных рационов самки и самцы одной и той же линии крыс или мышей могут по-разному отвечать изменением фенотипических признаков, присущих моделируемому состоянию, в частности степенью развития ожирения, гипергликемии, инсулиновой резистентности и гипертриглицеридемии.

Приложение Б
(справочное)

Модели, применяемые для воспроизведения алиментарно-зависимых заболеваний *in vivo*

Б.1 Основные виды моделей, применяемых для воспроизведения алиментарно-зависимых заболеваний *in vivo*, приведены в таблице Б.1.

Таблица Б.1 — Основные виды моделей, применяемых для воспроизведения алиментарно-зависимых заболеваний *in vivo*

Моделируемое состояние	Вид/линия/пол животных	Применяемый рацион*	Длительность кормления, нед
1 Ожирение	Крысы аутбредной линии Wistar, мыши аутбредной линии ICR-1, инбредной линии DBA/2J; C57Bl/6J; мыши гибридных кроссов (самцы и самки)	Высокожировой с 30 % жира по массе; 20 %-ный раствор фруктозы или сахарозы вместо питьевой воды	13
2 Ожирение	Крысы мутантной линии Zucker fa/fa; мыши мутантных линий db/db; ob/ob (самцы и самки)	Стандартный по AIN-93	10—12
3 Неалкогольный стеатогепатит	Крысы аутбредной линии Wistar, крысы инбредной линии Dark Aguti, мыши гибридных кроссов, (самцы и самки)	Стандартный по AIN-93; 20 %-ный раствор фруктозы или сахарозы вместо питьевой воды	13
4 Метаболический синдром	Крысы аутбредной линии Wistar, мыши аутбредной линии ICR-1, инбредной линии DBA/2J; C57Bl/6J; мыши гибридных кроссов (самцы и самки)	30 %-ный раствор фруктозы или сахарозы вместо питьевой воды	20—24
5 Метаболический синдром	Крысы линии DahlS.Z-Leprfa/Leprfa (DS/obese). Кросс мутантных линий Zucker ZF×Dahl, Мыши линии POUND (C57BL/6NCrl-Leprdb-lb/Crl)	Стандартный по AIN-93	4—14
6 Алиментарная дислипидемия	Крысы аутбредной линии Wistar, мыши аутбредной линии ICR-1, инбредной линии C57Black/6J (самки)	Стандартный по AIN-93 с 0,5 %-ного холестерина по массе вместо такой же части жира; 20 %-ный раствор фруктозы вместо питьевой воды	10—12
7 Сахарный диабет 2-го типа	Крысы мутантной линии Zucker ZDF, крысы мутантной линии Goto-Kakizaki (самцы и самки), крысы OLETF, мыши Lepr ob/ob, мыши Lepr db/db, мыши KK	Стандартный по AIN-93	2—14
8 Атеросклероз	Мыши нокаутной линии ApoE-/-, мыши трансгенной линии АпоЕ- Leiden, мыши трансгенной линии ApoB	Стандартный по AIN-93	4—12
9 Гипертензия	Спонтанно тучные крысы с гипертензией линии Koletsky, крысы SHR/Wistar Kyoto (самцы и самки)	Стандартный по AIN-93	4—12
* Рекомендуемый состав рационов — см. приложение В.			

Приложение В
(рекомендуемое)

Состав экспериментальных рационов

В.1 Основной рацион

При воспроизведении *in vivo* моделей алиментарной гиперлипидемии, ожирения, атеросклероза и метаболического синдрома у крыс и мышей в качестве основного рекомендуется использовать сбалансированный полусинтетический рацион, состав которого представлен в таблицах В.1—В.3.

Таблица В.1 — Исходный состав рациона для крыс и мышей из расчета на 100 г массы сухого рациона

Ингредиент, г	Количество на 100 г
1 Казеин	20,0
2 Крахмал кукурузный	60,05
3 Целлюлоза микрокристаллическая	5,0
4 Солевая смесь	3,5
5 Холин хлорид (60% холина)	0,25
6 L-цистеин	0,2
7 Витаминная смесь	1,0
8 Масло подсолнечное	5,0
9 Лярд (свиной жир)	5,0
Итого	100,0

Таблица В.2 — Состав витаминной смеси

Витамин*	Содержание в 100 г рациона	Содержание г на кг смеси
1 Никотиновая кислота (B_3)	—	3
2 Пантотенат кальция (B_5)	—	1,6
3 Пиридоксина гидрохлорид (B_6)	—	0,7
4 Тиамина гидрохлорид (B_1)	—	0,6
5 Рибофлавин (B_2)	—	0,6
6 Фолиевая кислота (B_9)	—	0,2
7 D-биотин (B_7)	—	0,02
8 Цианкобаламин (B_{12})	—	0,0025
9 Менадион (витамин K_1)	—	0,075
10 Витамин А (порошок на носителе или масляный раствор)	400МЕ**	0,8
11 Витамин D_3 (порошок на носителе или масляный раствор)	100МЕ**	1,0
12 Витамин Е (порошок на носителе или масляный раствор)	4МЕ**	8,0
13 Сахароза	—	До 1000,00
* Используют формы витаминов, удовлетворяющие фармакопейным требованиям. ** Вносят в жировой компонент рациона.		

Таблица В.3 — Состав солевой смеси

Наименование соли*	Брутто-формула	Содержание, г на 1кг смеси
1 Кальций углекислый, безводный	$CaCO_3$	357
2 Калий фосфорнокислый, одноосновный	KH_2PO_4	250
3 Натрий хлористый	NaCl	74
4 Калий сернокислый	K_2SO_4	46,6
5 Калий лимоннокислый, моногидрат	$K_3C_6H_5O_7 \times H_2O$	28
6 Магния оксид	MgO	24
7 Железо лимоннокислое	$C_6H_5FeO_7 \cdot H_2O$	6,06
8 Цинк углекислый	$ZnCO_3$	1,65
9 Марганец углекислый	$MnCO_3$	0,63
10 Медь углекислая	$CuCO_3 \cdot Cu(OH)_2$	0,3
11 Калия йодат	KIO_3	0,01
12 Натрия селенат, безводный	Na_2SeO_4	0,01025
13 Аммония парамолибдат, 4-водный	$(NH_4)_6Mo_7O_{24} \times 4H_2O$	0,00795
14 Натрия метасиликат	Na_2SiO_3	0,63
15 Хромокалиевые квасцы, 12-водные	$CrK(SO_4)_2 \times 12H_2O$	0,275
16 Борная кислота	H_3BO_3	0,0815
17 Натрий фтористый	NaF	0,0635
18 Никель углекислый	$NiCO_3 \cdot 2Ni(OH)_2 \times H_2O$	0,0318
19 Литий хлористый	LiCl	0,0174
20 Аммония ванадат	NH_4VO_3	0,0066
21 Сахароза	$C_{12}H_{22}O_{11}$	210,626
* При составлении смеси следует использовать чистые химические реактивы минеральных солей с квалификацией чистоты не менее ч. д. а по ГОСТ 13867.		

В.2 Модификация основного рациона для воспроизведения модели алиментарной дислипидемии

Модификацию основного рациона по В.1 проводят одним из следующих способов:

а) модифицированный высокожировой рацион — замена части (20/100 г) крахмала рациона на 20/100 г смеси 1:1 лярда и подсолнечного масла;

б) модифицированный высокохолестериновый рацион — замена части (0,5/100 г) жирового компонента рациона на 0,5 г холестерина;

в) модифицированный высокохолестериновый, высокоуглеводный рацион — рацион по перечислению (б), дополненный потреблением 20 %-ного или 30 %-ного раствора фруктозы вместо питьевой воды.

В.3 Модификация основного рациона для воспроизведения моделей ожирения и метаболического синдрома

Модификацию основного рациона по В.1 проводят одним из следующих способов:

а) модифицированный высокожировой, высокоуглеводный рацион — рацион по перечислению а) В.2, дополненный потреблением 20 %-ного или 30 %-ного растворов простых сахаров (глюкоза, фруктоза или сахароза) вместо питьевой воды;

б) модифицированный высокоуглеводный рацион — основной рацион, дополненный потреблением от 25 % до 30 % растворов простых сахаров (глюкоза, фруктоза или сахароза) вместо питьевой воды.

Приложение Г
(рекомендуемое)

Методы исследования биологических проб лабораторных животных

Г.1 При проведении доклинических испытаний специализированной пищевой продукции при анализе биологических проб, используемых в испытаниях животных, рекомендуется пользоваться биохимическими, морфологическими, микробиологическими, витаминологическими, постгеномными (транскриптомными, протеомными, метаболомными), статистическими методами исследования. Наиболее часто используемые в испытаниях методы оценки состояния обмена веществ у лабораторных животных представлены в таблицах Г.1 — Г.9.

Таблица Г.1 — Методы исследования показателей липидного обмена

Показатель	Исследуемый биосубстрат	Метод	Источник
Общие липиды	Печень	Гравиметрический	*
Жирнокислотный состав клеточных мембран	Печень, эритроциты	Газовая хроматография	**
Триглицериды (ТГ)	Плазма крови	Спектрофотометрия	***
Общий холестерин (ХС)	Плазма крови	Спектрофотометрия	***
Холестерин ЛПВП (ХС ЛПВП)	Плазма крови	Спектрофотометрия	***
Холестерин ПНП (ХС ЛПНП)	Плазма крови	Расчетный метод	****
Липаза	Плазма крови	Потенциометрия	**

* См. [18].

** См. [19].

*** См. [20].

**** Расчет осуществляют по формуле ХС ЛПНП = общий ХС — ХС ЛПВП — ТГ/2,2; размерность всех концентраций, ммоль/дм^3.

Таблица Г.2 — Методы исследования показателей белкового и азотистого обмена

Показатель	Исследуемый биосубстрат	Метод
Общий белок	Сыворотка крови	Спектрофотометрия*
Альбумин	Сыворотка крови	Спектрофотометрия*
Глобулины	Сыворотка крови	Спектрофотометрия, 1D-электрофорез*
Креатинин	Сыворотка, плазма крови (после депротеинизации)	Спектрофотометрия*
Мочевина	Сыворотка, плазма крови	Спектрофотометрия*
Мочевая кислота	Сыворотка, плазма крови	Спектрофотометрия*

* См. [20].

Таблица Г.3 — Методы исследования показателей белкового и азотистого обмена

Показатель	Исследуемый биосубстрат	Метод
Глюкоза	Сыворотка, плазма крови	Энзиматический глюкозооксидазный метод*
Гликированный гемоглобин	Кровь	Спектрофотометрия**

* По [21].

** См. [22].

Таблица Г.4 — Методы исследования маркеров минерального обмена

Показатель	Исследуемый биосубстрат	Метод	Источник
Натрий	Плазма крови	Пламенная фотометрия	*
Калий	Плазма крови	Пламенная фотометрия	*
Магний	Плазма крови	Пламенная фотометрия	*
Кальций	Плазма крови	Пламенная фотометрия	*
Фосфор	Плазма крови	Спектрофотометрия	*
Цинк	Костная ткань	Атомно-абсорбционная спектрофотометрия	По ГОСТ 30178
Щелочная фосфатаза	Плазма крови	Спектрофотометрия	*
Железо	Плазма крови	Атомно-абсорбционная спектрофотометрия	По ГОСТ 30178
Железосвязывающая активность	Плазма крови	Спектрофотометрия	*
Трансферрин	Плазма крови	Иммуноферментный анализ	**
Ферритин	Плазма крови	Иммуноферментный анализ	**
Гемоглобин	Кровь, эритроциты	Спектрофотометрия	*
Селен	Плазма крови	Спектрофлуориметрия	***
Глутатионпероксидаза	Эритроциты	Спектрофотометрия	*4
Содержание эссенциальных и токсичных микроэлементов	Печень, почки, селезенка, легкие, головной мозг	Масс-спектрометрия с индуктивно-связанной плазмой, Атомно-эмиссионная спектрометрия с индуктивно связанной плазмой	**

* См. [20].

** Согласно инструкциям фирм — производителей наборов и/или средств измерений.

*** См. [21].

*4 См. [23].

Таблица Г.5 — Методы исследования энзимологических показателей

Активность ферментов	Исследуемый биосубстрат	Метод	Источник
Аланинаминотрансфераза* (КФ 2.6.1.2)	Сыворотка крови	Спектрофотометрия	*
Аспартатамино-трансфераза* (КФ 2.6.1.1)	Сыворотка крови	Спектрофотометрия	*
Щелочная фосфатаза (КФ 3.1.3.1)	Сыворотка крови	Спектрофотометрия	*
Гамма-глутамилтранспептидаза	Сыворотка крови	Спектрофотометрия	*
Креатинфосфокиназа	Сыворотка крови	Спектрофотометрия	*
CYP1A2 (МРОД) (КФ 1.14.14.1)	Печень (микросомальная фракция)	Спектрофлюориметрия	**
CYP2B1 (ПРОД) (КФ 1.14.14.1)	Печень (микросомальная фракция)	Спектрофлюориметрия	**
Глутатион-S-трансфераза (ГТ) (КФ 2.5.1.18)	Печень (цитозоль)	Спектрофотометрия	***

Окончание таблицы Г.5

Активность ферментов	Исследуемый биосубстрат	Метод	Источник
β-галактозидаза (КФ 3.2.1.23) неседиментируемая активность	Печень (гомогенат, цитозоль)	Спектрофотометрия	*4
Арилсульфатаза (КФ 3.1.6.1) неседиментируемая активность	Печень (гомогенат, цитозоль)	Спектрофотометрия	*5
CYP3A (КФ 1.14.14.1)	Печень (микросомальная фракция)	ВЭЖХ	*5
УДФ-глюкуронозилтрансфераза (КФ 2.4.1.17)	Печень (микросомальная фракция)	Спектрофотометрия	*6

* См. [20].

** См. [24].

*** См. [25].

*4 См. [26].

*5 См. [27].

*6 См. [28].

Таблица Г.6 — Методы исследования иммунологических показателей

Показатель	Исследуемый биосубстрат	Метод	Источник
Цитокины: IFN-γ, IL-1α, IL-1β, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-12 (p40), IL-12 (p70), IL-13, IL-17A, IL-18, TNF-α	Плазма крови, жировая ткань, селезенка	Мультиплексный иммуноанализ, ИФА	*
Хемокины и ростовые факторы: Eotaxin, G-CSF, GM-CSF, EPO, GM-CSF, GRO/KC, M-CSF, MCP-1, MIP-1α, TGF-β(1-3), MIP-3α, RANTES, VEGF	То же	Мультиплексный иммуноанализ, ИФА	*
Адипокины Leptin, Ghrelin, Adiponectin	Плазма крови, жировая ткань, головной мозг	Мультиплексный иммуноанализ, ИФА	*
Маркеры диабета: инсулин, GLP-1, Glucagon, PAI-1, GIP, resistin, IGF-1	Плазма крови	Мультиплексный иммуноанализ, ИФА	*
Сигнальные молекулы: Akt, IRS-1, GCK-3a/b, p70/S6, BAD, m-TOR, PTEN, S6 ribosomal protein	Жировая ткань, головной мозг	ИФА	**

* См. [14].

** См. [29], [30].

Таблица Г.7 — Методы исследования показателей окислительного стресса

Показатель	Исследуемый биосубстрат	Метод
Малоновый диальдегид (ТБК-реактивные вещества)	Плазма крови, печень (гомогенат)	Спектрофотометрия*
Диеновые конъюгаты ПНЖК	Плазма крови, печень (гомогенат)	Спектрофотометрия**
Каталаза (КФ 1.11.1.6)	Печень (цитозоль)	Спектрофотометрия***
Супероксиддисмутаза (КФ 1.15.1.1)	Печень (цитозоль)	Спектрофотометрия*4
Глутатионредуктаза (КФ 1.8.1.7)	Печень (цитозоль)	Спектрофотометрия*5

Окончание таблицы Г.7

Показатель	Исследуемый биосубстрат	Метод
Гемоксигеназа I (КФ 1.14.14.18)	Печень (микросомальная фракция)	Спектрофотометрия*[6]
Хинонредуктаза (КФ 1.6.5.5.)	Печень (цитозоль)	Спектрофотометрия*[7]

* См. [31], [32].
** См. [33], [34].
*** См. [35].
*4 См. [36].
*5 См. [37].
*6 См. [38].
*7 См. [39].

Таблица Г.8 — Методы оценки протеомных маркеров

Показатель	Исследуемый биосубстрат	Метод
Протеом (состав белков, включая варианты, образующиеся при посттрансляционной модификации: протеолизе, фосфорилировании, гликозилировании, ацилировании, убиквитинилировании и др.)	Плазма крови, печень (цитозоль, микросомальная фракция)	2D-электрофорез, ВЭЖХ, масс-спектрометрия высокого разрешения *

* См. [40], [41].

Таблица Г.9 — Методы транскриптомного анализа

Показатель	Исследуемый биосубстрат	Метод
Транскриптом (совокупность всех транскриптов, синтезируемых одной клеткой или группой клеток, включая мРНК и некодирующие РНК)	Печень, почки, поджелудочная железа, головной мозг (гомогенат ткани)	ПЦР-ОТ* ДНК-микрочип* Полногеномное секвенирование библиотек кДНК*

* См. [42], [43].

Г.2 Методы изучения морфологических показателей

При изучении морфологических показателей внутренних органов животных (печень, почки, селезенка, головной мозг, жировая ткань, тонкая и толстая кишка и др.) используют методы светооптической и конфокальной микроскопии[1)].

Г.3 Методы статистического и биоинформатического анализа

Г.3.1 Статистическую обработку результатов доклинических испытаний специализированной пищевой продукции проводят по единому плану, включающему следующие стадии:

а) описательная статистика параметрических показателей с определением числа значимых значений (*N*), выборочного среднего (*M*), стандартного отклонения (*SD*), стандартной ошибки среднего (*m*), медианы (μ);

б) тест на нормальность распределения показателя в исследуемых группах с помощью критерия Шапиро-Уилка;

в) трехфакторный дисперсионный анализ (ANOVA) распределений в сравниваемых группах с определением критерия *F*, достоверности влияния (*p*) и меры корреляционной связи (η);

г) определение достоверности различия средних значений между группами с использованием двустороннего *t*-теста Стьюдента для несвязанных показателей. При расчете величины *t*-критерия вносят поправку на различие величины дисперсий сравниваемых групп, оцененную в тесте Levine's на остаточную дисперсию.

При достоверном ($p < 0,05$) отличии распределения параметрических показателей в группах от нормального дополнительно проводят следующие тесты:

1) Методики представлены в [44], [45], [46], [47].

а) тест на однородность распределения исследуемого показателя с помощью непараметрического рангового критерия Краскалла-Уоллеса;

б) определение достоверности различия распределения в сравниваемых группах с помощью непараметрического рангового критерия Мана-Уитни.

Г.3.2 При проведении анализа по перечислению г) Г.3.1 сравнивают попарно:

а) группу животных, получающую основной рацион (контроль) со всеми опытными группами;

б) группы, получающие опытные рационы и БАВ, с группами, получающими опытные рационы без добавок;

в) группы животных разного пола или линии, получающие идентичные рационы, с добавлением и без добавления БАВ.

Различия принимают за достоверные при вероятности принятия нуль-гипотезы (уровне значимости) $p < 0,05$.

Статистическую обработку проводят с использованием лицензионного профессионального программного обеспечения.

Биоинформатический анализ проводят с выявлением метаболических путей, являющихся потенциальными мишенями воздействия опытных рационов и БАВ[1)]. В качестве источника информации о метаболических путях используют размещенный в Интернете ресурс[2)], в качестве программной среды для проведения расчетов — среду *R* с присоединяемыми дополнительными пакетами *AnnotationDbi, org.Rn.eg.db, pathview, gage, gageData*[3)]. Оценку достоверности изменения экспрессии генов в полнотранскриптомном анализе проводят с использованием Т-теста с множественной коррекцией Бенджамини — Хохберга[4)].

---

1) Алгоритмы установления соответствия между метаболическими путями и изменениями в транскриптоме представлены в [48].

2) Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG). [URL: gost.e-ecolog.ru (дата обращения: 10 июля 2022 г.)].

3) Руководство по использованию программной среды представлено в [49].

4) См. [50].

Библиография

[1] Технический регламент Таможенного союза ТР ТС 021/2011 — О безопасности пищевой продукции

[2] Методические рекомендации МР 2.3.1.2432-08 — Рациональное питание. Нормы физиологических потребностей в энергии и пищевых веществах для различных групп населения Российской Федерации.

[3] Технический регламент Таможенного союза ТР ТС 027/2012 — О безопасности отдельных видов специализированной пищевой продукции, в том числе диетического лечебного и диетического профилактического питания»

[4] 2010/63/EU — Директива 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского союза по охране животных, используемых в научных целях. Русский перевод RusLASA, Санкт-Петербург, 2012, 50 с. (Directive on the protection of animals used for scientific purposes)

[5] ILAR/DELS (2011) — Руководство по содержанию и использованию лабораторных животных. 8-е издание — М.: Ирбис, 2017 (Guide for the care and use of laboratory animals. Eighth Edition / Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals; Institute for Laboratory Animal Research (ILAR); Division on Earth and Life Studies (DELS); National Research Council of the national academies. Washington: The National Academies Press. 2011)

[6] OECD (2020) — Серия по тестированию и оценке № 329. Обзор концепций и имеющихся руководств, связанных с интегрированными подходами к тестированию и оценке. Организация Экономического сотрудничества и развития (ОЭСР), 2020 (Series on Testing and Assessment No. 329 Overview of concepts and available guidance related to integrated approaches to testing and assessment (IATA). ENV/JM/MONO(2020)25)

[7] OECD (2018) — Серия по тестированию и оценке № 233. Приложение к руководству пользователя по анализу и оценке путей неблагоприятного исхода. Организация Экономического сотрудничества и развития (ОЭСР), 2018 (Series on Testing and Assessment No. 233: Users' handbook supplement to the Guidance Document for developing and assessing AOPs. ENV/JM/MONO(2016)12)

[8] СанПиН 2.1.4. 1116-02 — Питьевая вода. Гигиенические требования к качеству воды, расфасованной в емкости. Контроль качества

[9] Coleman K., Weed J.L., Schapiro S.J. Animal Models for the Study of Human Disease (Second Edition),Editor(s): P. Michael Conn. Chapter 2: Psychological Environmental Enrichment of Animals in Research. Academic Press, 2017, P. 47—69 (Модели на животных для исследования болезней человека. Глава 2. Психологическое обогащение среды обитания у животных в исследовании)

[10] Close B., Banister K., Baumans V., et al. (1996) Recommendations for euthanasia of experimental animals — Part 1: DGXI of the European Commission. Lab Anim. 30: 293—316 (Рекомендации по эвтаназии у экспериментальных животных. Часть 1. Генеральный директорат XI Европейской комиссии)

[11] Каркищенко В.Н., Фокин Ю.В., Казакова Л.Х., Алимкина О.В., Касинская Н.В. (2012) Методики изучения физиологических функций лабораторных животных для доклинических исследований в спортивной медицине. Биомедицина. 4: 22—31

[12] Schrader A.J., Taylor R.M., Lowery-Gionta E.G., Moore N.L.T. (2018) Repeated elevated plus maze trials as a measure for tracking within-subjects behavioral performance in rats (Rattus norvegicus). PLOS ONE. 13: e0207804 (Повторные тесты в приподнятом крестообразном лабиринте как мера отслеживания поведенческих характеристик в пределах отдельных субъектов у крыс)

[13] Mzhelskaya K.V.; Shipelin V.A.; Shumakova, A.A. et al. (2020) Effects of quercetin on the neuromotor function and behavioral responses of Wistar and Zucker rats fed a high-fat and high-carbohydrate diet. Behav. Brain Res. 378: 2270 (Влияние кверцетина на нейромоторную функцию и поведенческие реакции у крыс Вистар и Цукер, получающих высокожировой и высокоуглеводный рацион)

[14] Benedé-Ubieto, Raquel et al. (2020) Guidelines and Considerations for Metabolic Tolerance Tests in Mice. Diabetes, metabolic syndrome and obesity: targets and therapy. 13: 439—450 (Руководство и рекомендации по тестам на метаболическую толерантность у мышей)

[15] Türkan Yiğitbaşı (2012) Multiplex Immunoassay and Bead Based Multiplex, Trends in Immunolabelled and Related Techniques, Dr. Eltayb Abuelzein (Ed.), InTech, ISBN: 978-953-51-0570-1 (Мультиплексный иммуноанализ и мультиплекс, основанный на микросферах. Тенденции в иммунологическом мечении и родственных технологиях)

[16] Khalifian S., Raimondi G. Brandacher G. (2015) The Use of Luminex Assays to Measure Cytokines. Journal of Investigative Dermatology, 135, e31 (Использование Люминекс анализов для определения цитокинов)

[17] Hill B.A. (1965) The environment and disease: Association or causation. Proc. R. Soc. Med. 58: 295—300. (Окружающая среда и болезнь: связь или зависимость)

[18] Бергельсон Л.Д., Дятловицкая Э.В. (1981) Препаративная биохимия липидов. — М.: Наука, 259 с.

[19] IUPAC (1979) IUPAC 2.301, 2.302 «Standart methods for the analysis of oils, fats and derivates», Pergamon Press,1979 [Стандартные методы анализа масел, жиров и их производных. Международный союз чистой и прикладной химии, 2.301, 2.302 (1979)]

[20] Камышников В.С. (2016) Методы клинических лабораторных исследований / под ред. проф. В.С.Камышникова. — 8-е изд. — М.: МЕДпресс-информ. — 736 с.: ил. ISBN 978-5-00030-273-6

[21] Р 4.1.1672-03 Руководство по методам контроля качества и безопасности биологически активных добавок к пище

[22] Sidorova Y., Shipelin V., Mazo V. et al. (2017) Hypoglycemic and hypolipidemic effect of Vaccinium myrtillus L. leaf and Phaseolus vulgaris L. seed coat extracts in diabetic rats. Nutrition; 41: 107—112. (Гипогликемическое и гиполипидемическое действие экстрактов из листьев черники и семян фасоли у крыс, страдающих диабетом)

[23] Мальцев Г.Ю., Тышко Н. В. (2002) Методы определения содержания глютатиона и активности глутатионпероксидазы в эритроцитах. Гигиена и санитария. 2: 69—72

[24] Burke M.D., Mayer R.T. (1983) Differential effects of phenobarbitone and 3-methylcholanthrene induction on the hepatic microsomal metabolism and cytochrome P-450-binding of phenoxazone and a homologous series of its n-alkyl ethers (alkoxyresorufins). Chem. Biol. Interact. 45: 243—258. (Различные эффекты фенобарбитона и 3-метилхолантрена в отношении индукции печеночного цитохрома Р-450, осуществляющего микросомальный метаболизм феноксазона и гомологичных серий его N-алкиловых эфиров)

[25] Habig W.H., Pabst W.J., Jacoby W.B. (1974) Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. J. Biol.Chem. 249: 7130—7139 (Глутатион-S-трансферазы. Первая ферментативная стадия в образовании меркаптуровой кислоты)

[26] Дингл Д. (1980) Лизосомы. Методы исследования. М., 344 с.

[27] Umegaki K., Saito K., Kubota Y., et al. (2002) Ginkgo biloba extract markedly induces pentoxyresorufin O-dealkylase activity in rats. Jpn. J. Pharmacol. 90: 345—351 (Экстракт Гингко двудольного выраженно индуцирует активность пентоксирезоруфин-О-деалкилазную активность у крыс)

[28] Burchell B., Weatherill P. (1981) 4-Nitrophenol UDPglucuronyltransferase (rat liver). Methods Enzymol. 77: 169—177 [4-нитрофенол-УДФ-глюкуронозилтрансфераза (печень крысы)]

[29] Долгов В.В. (2015) Иммунохимический анализ в лабораторной медицине / В. В. Долгов. — М.—Тверь: ООО «Издательство Триада», С. 34—38. — ISBN 978-5-94789-695-4

[30] Mandy Alhajj, Aisha Farhana (2022) Enzyme Linked Immunosorbent Assay. In: StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 (Иммуноферментный анализ)

[31] Mihara M., Uchiyama M. (1978) Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. Anal. Biochem. 86: 271—278 (Определение предшественника малонового диальдегида в тканях с использованием теста с тиобарбитуровой кислотой)

[32] Ohkawa H., Ohishi N., Yagi K. (1979) Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. Anal. Biochem. 95: 351—358 (Определение перекисей липидов в тканях животных по реакции с тиобарбитуровой кислотой)

[33] Nourooz-Zadeh J. (1999) Ferrous ion oxidation in presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxides in plasma. Methods Enzymol. 300: 58—62. (Окисление иона двухвалентного железа в присутствии ксиленолового оранжевого для определения содержания гидроперекисей липидов в плазме крови)

[34] Hermes-Lima M., Willmore W.G., Storey K.B. (1995) Quantification of lipid peroxidation in tissue extracts based on Fe(III)xylenol orange complex formation. Free Radic. Biol. Med. 19: 271—280 (Количественное определение перекисного окисления липидов в экстрактах тканей на основе образования комплекса ксиленолового оранжевого с трехвалентным железом)

[35] Aebi H. (1984) Catalase in vitro. Methods Enzymol. 105: 121—126 (Метод определения каталазы в системе *in vitro*)

[36] Nishikimi M., Appaji N., Yagi K. (1972) The occurrence of superoxide anion in the reaction of redused phenazine methosulfate and molecular oxygen. Biochem. Biophys. Res. Connum. 46: 849—854 (Участие супероксид-аниона в реакции восстановленного феназин метасульфата с молекулярным кислородом)

[37] Cai Q., Wei H. (1996) Effect of dietary genistein on antioxidant enzyme activities in SENCAR mice. Nutr. Cancer. 25: 1—7 (Влияние содержащегося в пище генистеина на активности антиоксидантных ферментов у мышей линии SENCAR)

[38] McNally S.J., Ross J.A., James Garden O., Wigmore S.J. (2004) Optimization of the paired enzyme assay for heme oxygenase activity. Anal. Biochem. 332: 398—400 (Оптимизация метода двойного ферментативного анализа активности гемоксигеназы)

[39] Benson A.M., Hunkeler M.J., Talalay P. (1980) Increase of NAD(P)H:quinone reductase by dietary antioxidants: possible role in protection against carcinogenesis and toxicity. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 77: 5216—5220 (Повышение активности НАДФН-зависимой хинонредуктазы под влиянием пищевых антиоксидантов: возможная роль в защите против канцерогенеза и токсичности)

[40] Методические рекомендации МР 1.2.0053-11 Оценка воздействия наноматериалов на протеомный профиль и биосинтетические процессы в тестах на лабораторных животных. — М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2011 — 39 с.

[41] Zgoda V.G., Moshkovskii S.A., Ponomarenko E.A., et al. (2009) Proteomics of mouse liver microsomes: performance of different protein separation workflows for LC-MS/MS. Proteomics. 9: 4102—4105 (Протеом микросом печени мыши. Выполнение различных рабочих процессов разделения белка для жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией)

[42] Lashkari D.A., DeRisi J.L., McCusker J.H., et al. (1997) Yeast microarrays for genome wide parallel genetic and gene expression analysis. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 94: 13057—13062 (Микрочипы на основе дрожжей для широкогеномного, параллельного генетического исследования и анализа генетической экспрессии)

[43] Haas B.J., Zody M.C., 2010 Advancing RNA-Seq analysis. Nature Biotechnology. 28: 421—423 (Современные методы секвенирования РНК)

[44] Роскин Г.И., Левинсон Л.Б. (1957) Микроскопическая техника. — М: Сов. наука. 1957

[45] Hausman G.J. (1981) Techniques for studying adipocytes. Stain Technol. 56: 149—154 (Методы исследования адипоцитов)

[46] Martinez-Santibañez G., Cho K.W., Lumeng C.N. (2014) Imaging white adipose tissue with confocal microscopy. Methods Enzymol.: 537: 17—30 (Изучение строения жировой ткани с использованием конфокальной микроскопии)

[47] Berry R, Church CD, Gericke MT, Jeffery E, Colman L, Rodeheffer MS. (2014) Imaging of adipose tissue. Methods Enzymol. 537:47—73 (Изучение строения жировой ткани)

[48] Du J., Li M., Yuan Z., Guo M., Song J., Xie X., Chen Y (2016) A decision analysis model for KEGG pathway analysis. BMC Bioinformatics.17: 407 (Модель принятия решений при анализе метаболических путей)

[49] Кабаков Р.И. R в действии. Анализ и визуализация данных в программе R / пер. с англ. — М.: «ДМК Пресс, 2014. — 588 с.: ил. ISBN 978-5-947060-077-1

[50] Benjamini Y., Hochberg Y. (1995) Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. J.Royal Statistical Soc. Series B. 57: 289—300 (Контроль частоты ложных результатов: мощный практический подход к множественным тестам)

УДК 57.044:57.084.1:612.392:615.011.5:
616-056.52:616-031:006.354

ОКС 07.080
11.100.20
11.100.01
67.040
67.050

ОКПД2 72.19.16.000

Ключевые слова: специализированная пищевая продукция, доклинические испытания, биологически активные вещества, лабораторные животные, биомаркеры

Редактор *Л.С. Зимилова*
Технический редактор *В.Н. Прусакова*
Корректор *Е.Ю. Митрофанова*
Компьютерная верстка *Е.А. Кондрашовой*

Сдано в набор 19.09.2022. Подписано в печать 30.09.2022. Формат 60×84⅛. Гарнитура Ариал.
Усл. печ. л. 3,26. Уч.-изд. л. 2,64.

Подготовлено на основе электронной версии, предоставленной разработчиком стандарта

Создано в единичном исполнении в ФГБУ «РСТ»
для комплектования Федерального информационного фонда стандартов,
117418 Москва, Нахимовский пр-т, д. 31, к. 2.

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

gost.e-ecolog.ru