Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

1.2. ГИГИЕНА, ТОКСИКОЛОГИЯ, САНИТАРИЯ

Порядок оценки действия наноматериалов на рыб по морфологическим и генетическим признакам

Методические указания
МУ 1.2.2967—11

gost.e-ecolog.ru

ББК 51.2
П59

П59 **Порядок** оценки действия наноматериалов на рыб по морфологическим и генетическим признакам: Методические указания.—М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2012.—22 с.

1. Разработаны Федеральной службой по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Г. Г. Онищенко, И. В. Брагина, О. И. Аксенова, Т. Ю. Завистяева); Учреждением Российской академии медицинских наук «Научно-исследовательский институт питания» (В. А. Тутельян, И. В. Гмошинский, С. А. Хотимченко, А. А. Кочеткова, В. В. Бессонов, М. Гаппаров, Р. В. Распопов, В. В. Смирнова, О. Н. Тананова, А. А. Шумакова, О. И. Передеряев, А. А. Казак); Учреждением Российской академии наук «Институт проблем экологии и эволюции им. А. Н. Северцова» (Д. С. Павлов, Ю. Ю. Дгебуадзе, Е. Ю. Крысанов, Т. Б. Демидова, А. В. Купцов); Федеральным государственным унитарным предприятием «Всероссийский научно-исследовательский институт метрологической службы» (С. А. Кононогов, С. С. Голубев); Учреждением Российской академии наук Центр «Биоинженерия» (К. Г. Скрябин, О. А. Зейналов, Н. В. Равин, С. П. Комбарова); Учреждением Российской Академии наук «Институт биохимии им. А. Н. Баха» (В. О. Попов, Б. Б. Дзантиев, А. В. Жердев, И. В. Сафенкова, О. Д. Гендриксон); ООО «Интерлаб» (А. Н. Веденин, Г. В. Казыдуб).

Разработаны в рамках Федеральной целевой программы «Развитие инфраструктуры наноиндустрии в Российской Федерации на 2008—2011 годы».

2. Рекомендованы Государственной Комиссией по санитарно-эпидемиологическому нормированию при Федеральной службе по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека.

3. Утверждены Руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации Г. Г. Онищенко 17 октября 2011 г.

4. Введены в действие с момента утверждения.

5. Введены впервые.

ББК 51.2

© Роспотребнадзор, 2012
© Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2012

Содержание

I. Область применения 4
II. Нормативные ссылки 5
III. Порядок оценки действия наноматериалов на рыб по морфологическим и генетическим признакам 6
3.1. Цель и задачи изучения действия наноматериалов на рыб по морфологическим и генетическим признакам 6
3.2. Общие требования к лабораториям, проводящим исследование токсического действия наноматериалов на рыб 7
3.3. Требования к условиям содержания и работы с рыбами 10
3.4. Требования к аквариальной 11
3.5. Требования к вспомогательному оборудованию, помещениям, техническому оснащению 12
3.6. Требования к квалификации персонала и безопасности проводимых работ 13
IV. Порядок проведения экспериментов по изучению эмбриотоксичного, тератогенного и мутагенного действия наноматериалов на рыб 14
4.1. Принципы выбора индикаторных организмов 14
4.2. Порядок проведения эксперимента по установлению эмбриотоксичного и тератогенного действия наноматериалов на рыб 14
4.3. Порядок проведения эксперимента по установлению мутагенного действия наноматериалов на рыб 16
Приложение 1. Летальные и сублетальные признаки для эмбрионов данио рерио (Danio rerio) 18
Приложение 2. Порядок проведения теста на генотоксичность 19
Приложение 3. Протокол представления результатов оценки ДНК-повреждающей активности наноматериала методом ДНК-комет 22

УТВЕРЖДАЮ
Руководитель Федеральной службы
по надзору в сфере защиты прав
потребителей и благополучия человека,
Главный государственный санитарный
врач Российской Федерации
Г. Г. Онищенко
17 октября 2011 г.
Дата введения: с момента утверждения

1.2. ГИГИЕНА, ТОКСИКОЛОГИЯ, САНИТАРИЯ

Порядок оценки действия наноматериалов на рыб по морфологическим и генетическим признакам

Методические указания МУ 1.2.2967—11

I. Область применения

1.1. Настоящие методические указания определяют порядок и методы оценки действия наноматериалов на рыб по морфологическим и генетическим признакам при проведении тестирования безопасности искусственных наноматериалов.

1.2. Настоящие методические указания применяются в ходе проведения тестирования безопасности искусственных наноматериалов для рыб в целях принятия решений по оценке рисков, связанных с воздействием наночастиц и наноматериалов на организм человека и объекты окружающей среды.

1.3. Методические указания разработаны с целью обеспечения единства измерений и адаптации имеющихся методов и средств измерений в ходе оценки безопасности наноматериалов и нанотехнологий для состояния здоровья человека и животных.

1.4. Методические указания предназначены для специалистов органов и организаций Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, а также могут быть использованы научно-исследовательскими организациями гигиенического профиля, медицинскими учебными заведениями, производителями нанотехнологической продукции и иными организациями и учреждениями, проводящими оценку безопасности наноматериалов для здоровья

человека, производителями и поставщиками нанотехнологической продукции.

II. Нормативные ссылки

2.1. Федеральный закон от 30 марта 1999 г. № 52-ФЗ «О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения».

2.2. Федеральный закон от 26 июня 2008 г. № 102-ФЗ «Об обеспечении единства измерений».

2.3. Федеральный закон от 27 декабря 2002 г. № 184-ФЗ «О техническом регулировании».

2.4. Федеральный закон от 10 января 2002 г. № 7-ФЗ «Об охране окружающей среды».

2.5. Приказ Минздравсоцразвития России от 23 августа 2010 г. № 708н «Об утверждении Правил лабораторной практики».

2.6. Постановление Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 23 июля 2007 г. № 54 «О надзоре за продукцией, полученной с использованием нанотехнологий и содержащей наноматериалы».

2.7. Постановление Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 31 октября 2007 г. № 79 «Об утверждении Концепции токсикологических исследований, методологии оценки риска, методов идентификации и количественного определения наноматериалов».

2.8. Приказ Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека от 19 июля 2007 г. № 224 «О санитарно-эпидемиологических экспертизах, обследованиях, исследованиях, испытаниях и токсикологических, гигиенических и иных видах оценок».

2.9. ГН 1.2.2633—10 «Гигиенические нормативы содержания приоритетных наноматериалов в объектах окружающей среды».

2.10. СанПиН 2.1.4.1074—01 «Питьевая вода. Гигиенические требования к качеству воды централизованных систем питьевого водоснабжения. Контроль качества».

2.11. СП 2.2.2.1327—03 «Гигиенические требования к организации технологических процессов, производственному оборудованию и рабочему инструменту».

2.12. МУ 1.2.2520—09 «Токсиколого-гигиеническая оценка безопасности наноматериалов».

2.13. МУ 1.2.2744—10 «Порядок отбора проб для выявления, идентификации и характеристики действия наноматериалов в рыбах».

2.14. МР 1.2.2566—09 «Оценка безопасности наноматериалов in vitro и в модельных системах in vivo».

2.15. МР 1.2.2641—10 «Определение приоритетных видов наноматериалов в объектах окружающей среды, пищевых продуктах и живых организмах».

2.16. МР 1.2.2639—10 «Использование методов количественного определения наноматериалов на предприятиях наноиндустрии».

2.17. МР 1.2.2522—09 «Методические рекомендации по выявлению наноматериалов, представляющих потенциальную опасность для здоровья человека».

2.18. МР 4.2.0014—10 «Оценка генотоксических свойств методом ДНК-комет in vitro».

2.19. ГОСТ 2761—84 «Источники централизованного хозяйственно-питьевого водоснабжения. Гигиенические, технические требования и правила выбора».

2.20. ГОСТ Р 51232—98 «Вода питьевая. Общие требования к организации и методам контроля качества».

2.21. ГОСТ Р 51652—2000 «Спирт этиловый ректификованный из пищевого сырья. Технические условия».

2.22. ГОСТ 6709—72 «Вода дистиллированная. Технические условия».

2.23. ГОСТ 8.207—76 «Государственная система обеспечения единства измерений. Прямые измерения с многократными наблюдениями. Методы обработки результатов наблюдений. Основные положения».

2.24. ГОСТ 30333—2007 «Паспорт безопасности химической продукции. Общие требования».

2.25. ГОСТ 12.0.004—79 «Организация обучения работающих безопасности труда. Общие положения».

2.26. ГОСТ 12.1.007—76 «Вредные вещества. Классификация и общие требования».

2.27. ГОСТ 7.32—2001 «Отчет о научно-исследовательской работе. Структура и правила оформления».

III. Порядок оценки действия наноматериалов на рыб по морфологическим и генетическим признакам

3.1. Цель и задачи изучения действия наноматериалов на рыб по морфологическим и генетическим признакам

3.1.1. Оценка действия наноматериалов на рыб по морфологическим и генетическим признакам проводится в целях обеспечения безопасности, предотвращения и/или снижения риска для возникновения

заболеваний у человека и животных с учетом свойств и разнообразных условий применения наноматериалов.

3.1.2. Оценка действия наноматериалов на рыб по морфологическим и генетическим признакам является видом специальных токсиколого-гигиенических исследований, направленных на установление возможной тератогенной и мутагенной токсичности наноматериалов.

3.1.3. Токсиколого-гигиенические исследования наноматериалов на животных проводятся в соответствии с МУ 1.2.2520—09, МР 1.2.2566—09 и другими нормативными и методическими документами, утверждёнными в установленном порядке.

3.1.4. При постановке экспериментов обязательно наличие контрольных групп рыб, содержащихся в таких же условиях, как и подопытные, и получающих вспомогательные ингредиенты (дисперсионная среда, стабилизатор), входящие в состав исследуемого наноматериала, тем же путём, что и тестируемый наноматериал.

3.1.5. При наличии у вещества, входящего в состав наноматериала, собственных токсических свойств в макродисперсной («традиционной») форме (как, например, у наночастиц, содержащих мышьяк, свинец, кадмий, теллур, селен и другие токсичные элементы) необходимо наличие дополнительной контрольной группы, получающей в эквивалентных дозах химический аналог наноматериала «традиционной» степени дисперсности (в форме макроскопической дисперсии или молекулярного (ионного) раствора).

3.2. Общие требования к лабораториям, проводящим исследование токсического действия наноматериалов на рыб

3.2.1. Исследования по оценке действия наноматериалов на рыб проводятся в лабораториях, аккредитованных в установленном порядке.

3.2.2. Требованиями, предъявляемыми к лабораториям при их аккредитации, являются: использование стандартизованных и (или) метрологически аттестованных методик определения показателей качества исследуемого объекта; наличие стандартных образцов наноматериалов; наличие поверенных средств измерений для контроля качества объекта по исследуемым показателям; наличие системы повышения квалификации сотрудников лаборатории; наличие системы контроля качества проводимых исследований.

3.2.3. Проведение исследований по действию наноматериалов на рыб определяется правилами надлежащей лабораторной практики.

3.2.4. На все производственные операции, включая: содержание и разведение рыб, проведение экспериментов и обработку результатов,

хранение стандартов; обслуживание и калибровку измерительных приборов; приготовление реактивов, ведение записей, отчетов и их хранение; обслуживание помещений; обезвреживание и утилизацию наноматериалов; осуществление программы по обеспечению качества, – разрабатываются стандартные операционные процедуры (СОП). Соблюдение СОП осуществляется в целях обеспечения качества, достоверности и воспроизводимости результатов исследований.

3.2.5. К выполнению исследований с использованием наноматериалов допускаются сотрудники со специальным образованием, имеющие опыт работы с соответствующими средствами измерений не менее 1 года, изучившие техническое описание измерительных приборов и методику выполнения измерений, имеющие опыт работы в химической лаборатории, обученные в соответствии с ГОСТ 12.0.004.

3.2.6. Средства измерений, используемые в организациях, проводящих оценку воздействия наноматериалов на рыб, проходят метрологический контроль (поверку) аккредитованными для этого организациями в установленном порядке и в установленные сроки.

3.2.7. Эксплуатация лабораторного оборудования и средств измерений проводится в соответствии с техническим паспортом и инструкцией по применению.

3.2.8. Калибровка измерительной аппаратуры при количественном определении наноматериалов должна проводиться с применением стандартных образцов наноматериалов по показателям химического состава (включая наличие примесей), размеру и форме частиц, удельной площади поверхности, типу кристаллической структуры. Результаты проведения калибровки измерительной аппаратуры фиксируются в специальном журнале.

3.2.9. Каждый стандартный образец должен быть оснащен «Паспортом безопасности наноматериалов», который составляется в соответствии с ГОСТ 30333—2007.

3.2.10. Хранение стандартных образцов наноматериалов осуществляется отдельно от остальных веществ (реактивов) с соблюдением условий, указанных в паспорте безопасности на протяжении всего срока годности образца.

3.2.11. Контроль за качеством работ включает в себя: оформление перечня исследований, проводимых в организации, с указанием для каждого исследования руководителя и заказчика, названия определяемого наноматериала, даты начала и состояния каждого исследования на текущий момент времени; оценку протоколов и методов исследования на соответствие правилам лабораторной практики; мониторинг текущих

исследований; отчет о проведенных проверках и рекомендации по устранению недостатков.

3.2.12. Оценка действия наноматериалов на рыб по морфологическим и генетическим показателям проводится по утвержденному плану с ведением протокола (прилож. 3) и составлением отчета, в который заносятся все результаты исследований.

3.2.13. При выполнении работы с наноматериалами сотрудники должны быть проинструктированы об основных правилах безопасности при работе в химической лаборатории, о мерах техники безопасности при работе с веществами 1—2-го класса опасности, органическими растворителями (ГОСТ 12.0.004—79, ГОСТ 12.1.007—76).

3.2.14. В процессе выполнения работ с наноматериалами персонал обязан соблюдать личную гигиену. После завершения работ с наноматериалами проводят влажную уборку на рабочем месте и в помещении.

3.2.15. Руководство организации, выполняющей исследования с использованием наночастиц и наноматериалов, несет ответственность за проведение надлежащего наблюдения за здоровьем сотрудников. Для этого необходимо проведение в установленные сроки медицинских осмотров сотрудников и обеспечение контроля за лабораторным загрязнением наночастицами, в частности загрязнением аэрозолями наночастиц воздуха производственных помещений.

3.2.16. При возникновении нештатных ситуаций, способных нанести вред здоровью работающих, руководство организации обязано принять меры к их устранению и обеспечить доставку пострадавших в медицинское учреждение для оказания необходимой помощи.

3.2.17. Результаты исследований по оценке воздействия наноматериалов на рыб заносят в протокол, в котором отражены цели работ и методы, используемые для достижения этих целей, используемые стандартные образцы, схема исследований и ее обоснование, методы отбора проб объектов исследований, результаты исследований, статистическая обработка результатов исследований, заключение. Протокол исследований утверждается руководителем организации, проводящей исследования.

3.2.18. По окончании проведенных исследований оформляется отчет в соответствии с требованиями ГОСТ 7.32—2001, содержащий следующие позиции: название отчета; адрес организации, проводившей исследования; дату начала и завершения исследований; цели и задачи исследования, характеристику определяемого наноматериала; перечень исследованных образцов и применяемых стандартов; схему проведения исследования; описание методов статистической обработки результатов; результаты исследования, представленные в виде обобщенных таблиц,

рисунков с соответствующей статистической обработкой и комментариев к ним; заключение.

3.3. Требования к условиям содержания и работы с рыбами

3.3.1. Исследования проводятся на здоровых рыбах. Вновь прибывших рыб изолируют (подвергают карантину) для оценки состояния их здоровья. Источники поступления, условия и дата поступления должны быть документально оформлены. В случае ухудшения состояния здоровья животных и их гибели, не связанные с проведением исследования, указанных животных необходимо изолировать от основной группы.

3.3.2. Корма и вода для рыб должны обеспечивать как пищевые потребности, так и необходимые условия существования их в соответствии с протоколом исследования, быть свободными от патогенных микроорганизмов и вредных примесей и не должны влиять на результаты исследования. Корма хранятся в специально отведенном для этой цели помещении (холодильнике).

3.3.3. Водоподготовка для содержания рыб осуществляется в специально оборудованном помещении в соответствии с рецептурой, разработанной для каждого вида рыбы.

3.3.4. Места содержания рыб и производственные помещения подвергаются периодической санитарной обработке, не оказывающей влияние на результаты исследования.

3.3.5. Кормление рыб должно осуществляться только после окончания уборки помещения и мытья аквариумов. Отбор рыб, пересаживание их в другие аквариумы проводится только с помощью специально закрепленных за каждым аквариумом средств (сачков). Мытье и дезинфекция аквариумов проводится 1—2 раза в месяц. Замена воды осуществляется 1 раз в неделю, допускается замена не более ⅓ объема.

3.3.6. Не реже одного раза в месяц проводится санитарный день, в течение которого производится уборка всех помещений. Порядок проведения санитарного дня определяется заведующим аквариальной.

3.3.7. В аквариальной необходимо установить постоянный контроль за температурно-влажностным режимом и режимом освещения. Кроме того, необходимо контролировать состав воды (pH, жесткость, уровень кислорода, минеральный состав, температуру). Величины температуры и влажности, цикличность смены светлого и тёмного периода суток определяются условиями содержания.

3.3.8. Посещение аквариальной посторонними лицами без специального разрешения запрещается. Сотрудники учреждения, выполняющие работы в аквариальной, обязаны:

• соблюдать установленные правила распорядка дня и режим работы;

• вести систематические наблюдения за своими экспериментальными животными;

• по окончании экспериментов или любой другой текущей работы с лабораторными животными оставлять рабочее место в надлежащем порядке;

• сообщать специалистам аквариальной обо всех замеченных случаях заболеваний среди экспериментальных животных, а также своевременно уведомлять специалистов аквариальной о предполагаемых патологических состояниях животных в соответствии с условиями эксперимента.

3.4. Требования к аквариальной

3.4.1. Аквариальную размещают в отдельном, изолированном от других, помещении, имеющем автономные системы вентиляции и теплообеспечения.

3.4.2. Аквариальная должна предусматривать содержание в отдельных помещениях животных, подвергаемых воздействию различных тестируемых образцов (наноматериалов). Она должна быть обеспечена квалифицированными кадрами, включая ветеринарного врача и технический персонал.

3.4.3. На каждом аквариуме прикрепляют этикетку с указанием номера аквариума, названия опыта, даты начала и окончания исследования, даты введения тестируемого образца, фамилии, имени, отчества ответственного сотрудника, что и когда вводилось животным.

3.4.4. В аквариальной должны быть:

• помещение для хранения кормов;

• помещение и система для водоподготовки;

• помещение для чистого запасного инвентаря, аквариумов, стоек и др.

3.4.5. Аквариальная должна иметь документы, содержащие следующую информацию:

• источники получения рыб, дату получения, количество, возраст, пол, вид;

• перечень и количество рыб, находящихся в аквариальной, из них: на карантине; в опыте, подвергнутые воздействию тестируемых образцов – с указанием в каких помещениях находятся все эти группы рыб.

3.5. Требования к вспомогательному оборудованию, помещениям, техническому оснащению

3.5.1. Эксплуатация вспомогательного оборудования проводится в соответствии с техническим паспортом и инструкцией по применению. Результаты проведения поверки измерительного оборудования, профилактических осмотров и текущего ремонта фиксируются в специальном журнале, доступном в любое время сотрудникам, эксплуатирующим оборудование или обеспечивающим его обслуживание, и содержащем следующие сведения: наименование прибора, производителя, страны происхождения; модель прибора; серийный (заводской) номер; дата получения и постановки на учет в лаборатории; дата запуска в эксплуатацию; инвентарный номер; место расположения прибора; сотрудник, ответственный за использование прибора; сотрудник (подразделение, организация), ответственный за техническое обслуживание прибора; детальные записи о плановом обслуживании оборудования, датированные и заверенные подписью ответственного лица; детальные записи о любых повреждениях, отказах, ремонте прибора, датированные и заверенные подписью сотрудника (лица), ответственного за техническое состояние прибора; детальные записи о калибровке прибора, датированные и заверенные подписью лица, ответственного за обслуживание прибора.

3.5.2. Объемно-планировочные и конструктивные решения аквариальных помещений должны отвечать установленным требованиям. Гигиенические параметры производственных факторов должны отвечать действующим гигиеническим нормативам.

3.5.3. Предусмотренные отопление и вентиляция аквариальных совместно с другими технологическими системами должны обеспечивать в них оптимальные параметры микроклимата (температуры, влажности, подвижности воздуха) и химического состава воздушной среды, не превышающие гигиенические нормативы.

3.5.4. Для обеспечения гигиенически оптимального температурно-влажностного режима необходимо предусмотреть:

- автоматическое регулирование температуры и влажности помещения;
- механическое регулирование системы аэрации (фрамуги, форточки и т. д.).

На все отопительно-вентиляционные системы должны быть заведены паспорта и эксплуатационные журналы.

3.5.5. Выбор источников водоснабжения должен проводиться в соответствии с ГОСТ 2761—84. Качество воды должно отвечать требованиям СанПиН 2.1.4.1074—01.

3.5.6. Производственные стоки, образующиеся при дезинфекции и уборке помещений, транспортных средств, аппаратуры, оборудования, тары, спецодежды, собираются в водонепроницаемые бетонированные резервуары с мешалками, нейтрализуются, очищаются на местных (локальных) очистных сооружениях и передаются на поля орошения или спускаются в водоемы при соблюдении требований положения о водоохранных зонах, зонах санитарной охраны поверхностных и подземных водоисточников.

3.5.7. Теплогенераторы следует размещать в изолированных помещениях или специально оборудованных технических коридорах. Аппаратуру для водоподготовки необходимо размещать в специально оборудованном помещении. При обогреве воздухораспределительные устройства должны обеспечивать равномерное распределение тепла в обогреваемом объеме при оптимальной подвижности воздуха. Перепады температур в аквариальной должны быть не более 2—3 °С, подвижность воздуха не более 0,5—1,0 м/с. Открывание (закрывание) вентиляционных проемов должно быть автоматизировано либо механизировано. Лаборатории, комнаты отдыха и санитарно-бытовые помещения должны иметь обособленные системы вентиляции.

3.6. Требования к квалификации персонала и безопасности проводимых работ

3.6.1. Все сотрудники, участвующие в работах с рыбами, проходят инструктаж по методам работы, порядку эксплуатации оборудования аквариальной, правилам техники безопасности при работе.

3.6.2. Руководитель аквариальной должен иметь высшее зоотехническое, биологическое, медицинское или ветеринарное образование и подчиняться директору учреждения или его заместителю по научной работе. Руководитель аквариальной несет ответственность за ее санитарное состояние и эпизоотическое благополучие.

3.6.3. Штатная численность обслуживающего персонала аквариальной определяется в зависимости от объема и характера экспериментальных исследований, а также от количества лабораторных животных.

3.6.4. Сотрудники аквариальной несут ответственность за соблюдение инструкций и правил по уходу, кормлению и содержанию рыб. Обслуживающий персонал аквариальной осуществляет уход за лабораторными животными в течение всего времени их содержания. Контроль за состоянием подопытных животных осуществляется сотрудниками научного подразделения, проводящими тестирования на животных.

IV. Порядок проведения экспериментов по изучению эмбриотоксичного, тератогенного и мутагенного действия наноматериалов на рыб

4.1. Принципы выбора индикаторных организмов

4.1.1. Выбор видов рыб, на которых выполняется оценка воздействия наноматериалов по морфологическим и генетическим признакам определяется следующими характеристиками: простотой содержания и разведения в лабораторных условиях, небольшими размерами, коротким жизненным циклом, возможностью получения необходимого количества икры, коротким периодом развития икры.

4.1.2. Экспериментальная модель должна давать возможность проводить сравнение результатов, полученных в других лабораториях. В качестве объектов, подвергаемых воздействию искусственных наночастиц в эксперименте, используют икру и взрослых особей рыб данио рерио (Danio rerio).

4.1.3. Порядок тестирования, включая численность опытных и контрольных групп животных, методики их содержания и кормления, способ введения наночастиц должны соответствовать МР 1.2.2566—09 (п. 6.4). Тестируемые наночастицы добавляют в воду, в которой содержатся тестируемые организмы, как минимум, в пяти последовательно 10-кратно возрастающих концентрациях в виде дисперсии в дехлорированной питьевой воде по ГОСТ Р 51232—98. При диспергировании наноматериала применяют физические методы диспергирования (перемешивание, встряхивание, ультразвуковая обработка). Применение органических растворителей и детергентов не допускается. В порядке исключения допустимо введение наноматериалов на носителе, биологическая инертность которого подтверждена в дополнительных контрольных исследованиях. Финальная концентрация носителя, вносимого вместе с тестируемым наноматериалом, не должна превышать 100 $мм^3/дм^3$. Стандартизованная вода используется в качестве отрицательного контроля.

4.2. Порядок проведения эксперимента по установлению эмбриотоксичного и тератогенного действия наноматериалов на рыб

4.2.1. За день до начала теста самцов и самок в соотношении 2 : 1 помещают в нерестовые аквариумы непосредственно перед началом темного периода. Рекомендуется одновременно использовать как минимум 3 нерестовых аквариума. Для стимуляции икрометания и в качестве субстрата используются искусственные растения. Спаривание, нерест

икры и оплодотворение начинаются через 30 мин после светлого периода утром.

4.2.2. Так как данио рерио (Danio rerio) могут поедать икринки, дно нерестового аквариума должно быть закрыто сеткой. Через 30—60 мин после начала спаривания, икру собирают пластиковой пипеткой, рассматривают под бинокуляром и подсчитывают количество икринок, при этом неоплодотворенные (непрозрачные) икринки изымают.

4.2.3. Для отбора оплодотворенных икринок используется инвертированный микроскоп или бинокуляр с минимальным увеличением 25х. Для теста используются только оплодотворенные икринки на стадии от 4 до 128 бластомеров. Икринки с явными аномалиями (асимметрия, образование пузырьков) или поврежденной мембраной также изымаются. Неоплодотворенные икринки можно легко отличить по отсутствию бластомеров и непрозрачности.

4.2.4. Тест на тератогенность начинают не позднее 3 ч после оплодотворения икринок (стадия 128 бластомеров). Для того чтобы начать тестирование с минимальной задержкой как минимум 30 случайно выбранных икринок для каждого тестируемого вещества первоначально помещают в чашки Петри, содержащие по 50 $см^3$ тестовых веществ каждой концентрации, и контроль.

4.2.5. Наноматериалы должны быть протестированы как минимум в 5 концентрациях, приготовленных в соответствии с пунктом 4.1.3 настоящих методических указаний.

4.2.6. Тест проводится в 24-луночных плашках. Для каждой тестируемой концентрации под бинокуляром отбирают по 10 икринок, которые помещают в лунки, заполненные 2 мл свежеприготовленного тестируемого вещества, и контроль. Плашки накрывают крышкой и инкубируют без аэрации при $t = (26{,}0 \pm 1{,}0)$ °С в течение 120 ч.

4.2.7. Обследование икринок проводят каждые 24 ч. Эмбрион считается погибшим, если отмечается один из перечисленных признаков: коагуляция эмбриона, отсутствие отделения хвоста, нерегулярность туловищных сомитов и отсутствие сердцебиения (прилож. 1).

4.2.8. Результаты эксперимента подвергают статистической обработке с целью установления различий в показателях между экспериментальными группами. Анализ результатов основан на установлении частоты гибели эмбрионов и морфологических аномалий. Статистическую обработку результатов проводят по единому плану, включающему: описательную статистику, расчёт выборочного среднего (M), выборочной ошибки среднего (m), медианы распределения (Med), максимального и минимального значения выборки.

4.2.9. Проверку достоверности различия между контрольной группой и группами, получавшими наноматериалы, осуществляют с использованием критериев непараметрической статистики – критерий Хи-квадрат или критерий Фишера. Проводят также проверку достоверности различия между группами, получавшими наноматериал и группами, получавшими носитель наноматериала, и/или группами, получавшими в эквивалентных количествах химический аналог наноматериала традиционной степени дисперсности (при его наличии).

4.2.10. Эффект наноматериала (воздействие на выбранный показатель организма животного) считается выявленным при достоверности различия контрольной и опытной групп (вероятности принятия нуль-гипотезы) на уровне $P = 0,05$ и менее.

4.3. Порядок проведения эксперимента по установлению мутагенного действия наноматериалов на рыб

4.3.1. Для исследования мутагенного действия наноматериалов на рыб проводят «комет-тест». Щелочной «комет-тест» (применяемый буфер для электрофореза имеет pH ≥ 13) детектирует широкий спектр повреждений ДНК, что позволяет использовать его для оценки генотоксичности наноматериалов. Этот метод позволяет определять как двунитевые, так и однонитевые разрывы ДНК.

4.3.2. Для проведения эксперимента используют взрослых особей данио рерио (Danio rerio). В каждой экспериментальной группе должно быть не менее 5 рыб. Порядок приготовления водных суспензий наночастиц по п. 4.1.3 настоящих методических указаний.

4.3.3. При отсутствии каких либо сведений, характеризующих токсические эффекты изучаемого вещества, исследование начинают с определения острой токсичности согласно МР 1.2.2566—09. После определения LD_{50} соединение испытывается в трех дозах при однократном введении: в наивысшей дозе, соответствующей $^1/_{10}$—$^1/_5$ LD_{50} и более низких дозах с десятикратным интервалом между ними.

4.3.4. В качестве негативного контроля используется стандартизованная вода, а в качестве позитивного – генотоксичные агенты, такие как этилметансульфанат (CAS № 62-50-0) или циклофасфамид (CAS № 50-18-0).

4.3.5. Эксперимент проводят при однократном добавлении наночастиц в воду. Через 72 ч рыб забивают, извлекают печень и проводят щелочной «комет-тест» (прилож. 2).

4.3.6. Микропрепараты анализируют на флуоресцентном микроскопе с соответствующими для конкретного красителя фильтрами. Рекомендуемое увеличение 200×—400×. На каждый микропрепарат анали-

зируют не менее 100 «ДНК-комет» без наложений хвостов. В анализ не включают апоптотические клетки, выявляемые на микропрепаратах в виде слабо флуоресцирующих «ДНК-комет» с широким диффузным «хвостом» и практически отсутствующей «головой». Анализ «ДНК-комет» проводится с помощью программно-аппаратного комплекса, например «Comet assay» (MetaSystems).

4.3.7. Статистическую оценку результатов проводят путем сравнения среднегрупповых показателей поврежденности ДНК в опытной и контрольной группах с использованием непараметрических критериев Даннета («ДНК в хвосте», «момент хвоста», «длина хвоста») или критерия Краскалла-Уоллеса (индекс «ДНК-комет»). Критериями положительного результата являются статистически достоверное, дозозависимое увеличение показателя поврежденности ДНК при одном из сроков экспозиции или статистически достоверный, воспроизводимый эффект, по крайней мере, для одной экспериментальной точки. Полученный положительный результат свидетельствует о том, что исследуемый наноматериал проявляет генотоксическое действие. Полученные результаты заносят в протокол опыта (прилож. 3).

Приложение 1

Летальные и сублетальные признаки для эмбрионов данио рерио (Danio rerio)

	8 ч	24 ч	48 ч	96 ч	108/120 ч
Летальные					
Коагуляция эмбриона	*	*	*	*	
Хвост не отделился		*	*	*	
Отсутствие туловищных сомитов		*	*	*	
Нет сердцебиения			*	*	
Не вылупился					*
Сублетальные					
Отсутствие сомитов		*			
Нарушение развития глаз		*	*	*	
Отсутствие спонтанных движений		*	*	*	
Отсутствие сердцебиения/циркуляции крови			*	*	
Отсутствие пигментации			*	*	
Образование отека перикарда			*	*	
Тератогенные					
Уродства головы		*	*	*	
Уродства хвоста		*	*	*	
Уродства сердца		*	*	*	
Сколиоз		*	*	*	
Рахит		*	*	*	
Деформации желточного мешка		*	*	*	
Уменьшение размера тела					
Уменьшение длины хвоста					*
* Сроки, на которых возможно проявление указанных признаков					

Приложение 2

Порядок проведения теста на генотоксичность

Вид исследуемого материала	Фрагменты тканей и органов рыб
1	2
Биологический материал	Печень данио рерио
Приборное обеспечение	Камера для горизонтального электрофореза, флуоресцентный микроскоп, оборудованный цифровой фотокамерой и компьютер, центрифуга (ускорение не ниже 1 000 g), микроволновая печь, плитка для нагревания предметных стекол, холодильник
Материалы	Пинцет, ножницы, автоматические пипетки вместимостью 1 $см^3$ и 200 $мм^3$, наконечники к автоматическим пипеткам, пипетки вместимостью 5 $см^3$, колбы вместимостью 100 $см^3$, пробирки вместимостью 1,2 $см^3$, пробирки вместимостью 1,2 $см^3$, флакон пенициллиновый, стакан химический вместимостью 50 $см^3$, стакан химический вместимостью 500 $см^3$, контейнер для окраски предметных стекол (тип Шиффердеккер), лампа желтая или зеленая, микроцентрифужные пробирки, стекла предметные с шероховатым краем, стекла покровные (24 × 50 мм)
Химические реактивы	Реактивы фирмы «Sigma-Aldrich» (США) или аналогичные Агароза легкоплавкая Агароза универсальная Диметилсульфоксид (ДМСО) Этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА) Фосфатно-солевой буфер (NaCl – 137 мкМ, KCl – 2,68 мкМ, KH_2PO_4 – 1,47 мкМ, $Na_2HPO_4 \times 7H_2O$ – 10 мкМ, pH = 7,4) Хлорид натрия (NaCl) Гидроксид натрия (NaOH) Трис(гидроксиметил)аминометан гидрохлорид (Tris-HCl) Triton X-100 Спирт этиловый ректифицированный, 96 % по ГОСТ Р 51652—2000 Вода дистиллированная по ГОСТ 6709—79 Этидиум бромид

Продолжение прилож. 2

1	2
Процедура подготовки печени *D. rerio* для проведения комет-теста	
Подготовка реактивов и материалов к эксперименту	– приготовление 0,1 М фосфатно-солевого буфера (ФСБ) с pH 7,0—7,5; – приготовление лизирующего раствора: 10 мкМ Tris-HCl (pH = 10), 2,5 мкМ NaCl, 100 мкМ ЭДТА. Раствор можно хранить при комнатной температуре в течение 1 месяца. Непосредственно в день проведения теста готовится рабочий лизирующий раствор путем добавления к основному лизирующему раствору Triton X-100 и ДМСО до конечных концентраций 1 и 10 % соответственно. Готовый раствор охладить перед использованием до 4 °С; – приготовление буфера для электрофореза. Рабочий раствор для электрофореза готовится непосредственно в день эксперимента: 300 мкМ NaOH, 1 мкМ ЭДТА (pH > 13). Готовый раствор охладить перед использованием до 4 °С; – приготовление нейтрализационного буфера: 0,4 М Tris-HCl; – приготовление раствора для фиксации: 70 % этиловый спирт; – приготовление раствора этидиума бромида; – приготовление 1 %-го раствора легкоплавкой агарозы на ФСБ
Подготовка предметных стекол	– приготовление 1 %-го раствора универсальной агарозы. Флакон с агарозой нагревают в микроволновой печи до 65 °С; – предметные стекла нагревают на плитке до 65 °С; – универсальную агарозу наносят на предметное стекло и высушивают
Получение клеточных суспензий	– рыб умерщвляют, помещая в раствор для эвтаназии (трикаина метан сульфонат, MS222 в концентрации 300 мг/дм^3). После того как у рыб прекратится дыхание быстро выделяют печень; – печень (150—200 мг ткани) измельчают на льду и переносят в пробирки с 3 см^3 охлажденного до 4 °С ФСБ, содержащего 20 мкМ EDTA-Na_2 и 10 % ДМСО; – пробирки выдерживают 5 мин при комнатной температуре, а затем 1,5 см^3 верхнего слоя центрифугируют при 1 000 g в течение 10 мин. Супернатант удаляют, а осадок разводят в 1 см^3 охлажденного буфера

Продолжение прилож. 2

1	2
Приготовление микропрепаратов	– в 240 мм^3 1 %-го раствора легкоплавкой агарозы, нагретой до 37 °С, вносят 60 мм^3 клеточной суспензии; – полученный агарозный гель с клеточной суспензией наносят (60 мм^3) на подготовленное предметное стекло с нанесенной универсальной агарозой и накрывают покровным стеклом; – предметные стекла кладут на поверхность емкости со льдом и оставляют до затвердевания геля; – аккуратно снимают покровные стекла и предметные стекла помещают в кювету (тип Шиффендеккер). Далее все процедуры проводят только в затемненном помещении при свете желтой или зеленой лампы; – в кювету с предметными стеклами наливают охлажденный лизирующий раствор, накрывают фольгой и помещают в холодильник. Проводят лизис не менее 1 ч
Проведение щелочного электрофореза	Все процедуры проводят только в затемненном помещении при свете желтой или зеленой лампы: – после лизиса, стекла вынимают из раствора и раскладывают на поверхности камеры для электрофореза; – в камеру заливают буфер для электрофореза так, чтобы предметные стекла были покрыты на 2—3 мм и оставляют на 20 мин без включенного тока; – проводят электрофорез в течение 20 мин при напряженности поля 1 вольт/см и 300 мА. Параметры электрофореза регулируются уровнем буфера в камере при включенном аппарате; – после окончания электрофореза химическим стаканом удаляют из камеры буфер для электрофореза. Затем пинцетом вынимают стекла; – стекла поместить в нейтрализационный буфер на 5 мин, высушить и повторить еще 2 раза; – затем зафиксировать стекла в 70 %-м этаноле 15 мин
Окрашивание микропрепаратов	Для окраски микропрепаратов используют флуоресцирующие красители, например этидиум бромид, акридиновый оранжевый и др.

Приложение 3

Протокол представления результатов оценки ДНК-повреждающей активности наноматериала методом ДНК-комет

Наименование эксперимента _____
Рыбы вид пол возраст (мес.)
дата _____ количество _____
Наноматериал: _____
название, формула, физико-химические свойства (состав, размер, форма частиц)

Откуда получен _____ чистота _____
Растворитель (носитель) _____
Позитивный контроль
Схема проведения эксперимента
Дата проведения (начало, окончание, отдельные эксперименты) _____
Дозы _____
Длительность _____
Условия проведения методики и анализа микропрепаратов _____
Полученные результаты _____
Заключение _____
Дата и подпись ответственного лица _____

gost.e-ecolog.ru