ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО

ПО ТЕХНИЧЕСКОМУ РЕГУЛИРОВАНИЮ И МЕТРОЛОГИИ

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ГОСТ Р 57933— 2017

НАНОТЕХНОЛОГИИ. НАНОМАТЕРИАЛЫ

Токсиколого-гигиеническая оценка безопасности Общие требования к проведению испытаний на лабораторных животных

Издание официальное

Москва
Стандартинформ
2017

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 441 «Нанотехнологии»

3 УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 8 ноября 2017 г. № 1698-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

© Стандартинформ, 2017

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

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

НАНОТЕХНОЛОГИИ. НАНОМАТЕРИАЛЫ

Токсиколого-гигиеническая оценка безопасности Общие требования к проведению испытаний на лабораторных животных

Nanotechnologies. Nanomaterials. Toxicological and hygienic safety assessment. General requirements for testing on laboratory animals

Дата введения — 2018—09—01

1 Область применения

Настоящий стандарт распространяется на технические наноматериалы, полученные из неорганических, синтетических органических веществ или изготовленные из биополимеров с применением методов биотехнологии, и устанавливает общие требования к проведению испытаний для токсиколого-гигиенической оценки их безопасности в тестах, использующих лабораторных животных (тесты *in vivo*).

Токсиколого-гигиеническую оценку безопасности наноматериала проводят с целью количественной оценки риска наноматериала и его классифицирования в соответствии с Согласованной на глобальном уровне системой классификации и маркировки химических веществ СГС (GHS) ООН.

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 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 32296 Методы испытания по воздействию химической продукции на организм человека. Основные требования к проведению испытаний по оценке острой токсичности при внутрижелудочном поступлении методом фиксированной дозы

ГОСТ 32373 Методы испытаний по воздействию химической продукции на организм человека. Основные требования к проведению испытаний по оценке острой токсичности при накожном поступлении

ГОСТ 32378 Методы испытания по воздействию химической продукции на организм человека. Испытания по оценке репродуктивной токсичности одного поколения

ГОСТ 32379 Методы испытания по воздействию химической продукции на организм человека. Испытания по оценке репродуктивной/эмбриональной токсичности (скрининговый метод)

ГОСТ 32383 Методы испытания по воздействию химической продукции на организм человека. Изучение хронической токсичности при ингаляционном поступлении

Издание официальное

ГОСТ 32437 Методы испытания по воздействию химической продукции на организм человека. Изучение хронической токсичности при накожном поступлении

ГОСТ 32519 Методы испытания по воздействию химической продукции на организм человека. Изучение хронической токсичности при внутрижелудочном поступлении

ГОСТ 32542 Методы испытания по воздействию химической продукции на организм человека. Основные требования к проведению испытаний по оценке острой токсичности при ингаляционном поступлении

ГОСТ 32634 Методы испытания по воздействию химической продукции на организм человека. Разъедание/коррозия кожи: испытание на модели человеческой кожи *in vitro*

ГОСТ 32635 Методы испытания по воздействию химической продукции на организм человека. Микроядерный тест на клетках млекопитающих *in vitro*

ГОСТ 32636 Методы испытания по воздействию химической продукции на организм человека. Субхроническая ингаляционная токсичность: 90-дневное исследование

ГОСТ 32637 Методы испытания по воздействию химической продукции на организм человека. Повторное исследование пероральной токсичности на грызунах: 90-дневное

ГОСТ 32639 Методы испытания по воздействию химической продукции на организм человека. Субхроническая кожная токсичность: 90-дневное исследование

ГОСТ 32641 Методы испытания по воздействию химической продукции на организм человека. Определение токсичности при повторном/многократном пероральном поступлении вещества на грызунах. 28-дневный тест

ГОСТ 32643 Методы испытания по воздействию химической продукции на организм человека. Токсичность подострая ингаляционная: 28-дневное исследование

ГОСТ 32644 Методы испытания по воздействию химической продукции на организм человека. Острая пероральная токсичность — метод определения класса острой токсичности

ГОСТ 32647 Методы испытания по воздействию химической продукции на организм человека. Комбинированные исследования хронической токсичности и канцерогенности

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

ГОСТ ИСО/МЭК 17025 Общие требования к компетентности испытательных и калибровочных лабораторий

ГОСТ ISO/TS 80004-1 Нанотехнологии. Часть 1. Основные термины и определения

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

ГОСТ Р ИСО 29701 Нанотехнологии. Наноматериалы для испытаний в тест-системах *in vitro*. Метод определения содержания эндотоксинов с использованием лизата амебоцитов *Limulus* (ЛАЛ-тест)

ГОСТ Р 50258 Комбикорма полнорационные для лабораторных животных. Технические условия

ГОСТ Р 51897 Менеджмент риска. Термины и определения

ГОСТ Р 56698 Методы испытания по воздействию химической продукции на организм человека Изучение репродуктивной токсичности на двух поколениях лабораторных животных

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

ГОСТ Р 56700 Лекарственные средства для медицинского применения. Доклинические фармакологические исследования безопасности

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 57129 Лекарственные средства для медицинского применения. Часть 1. Изучение стабильности новых фармацевтических субстанций и лекарственных препаратов. Общие положения

ГОСТ Р 57146 Лекарственные средства для медицинского применения. Изучение канцерогенности лекарственных средств и вспомогательных веществ

ГОСТ Р 57147 Лекарственные средства для медицинского применения. Доклинические исследования противоопухолевых лекарственных средств

ГОСТ Р 57452 Руководство по применению критериев классификации опасности химической продукции по воздействию на организм. Репродуктивная токсичность

ГОСТ Р 57453 Руководство по применению критериев классификации опасности химической продукции по воздействию на организм. Канцерогенность

ГОСТ Р 57454 Руководство по применению критериев классификации опасности химической продукции по воздействию на организм. Мутагенность

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 ISO/TS 80004, ГОСТ Р 51897, а также следующие термины с соответствующими определениями:

3.1.1 **аналогичный материал:** Материал, относящийся к той же группе химических веществ, имеющий сходные строение и/или кристаллическую структуру, физико-химические свойства и характеристики, подтвержденные соответствующими документами.

3.1.2 **биологический материал:** Биологические жидкости (кровь, моча, слюна, желчь, бронхоальвеолярная лаважная жидкость и др.), органы и ткани, содержимое слепой кишки, получаемые от лабораторных животных прижизненно или после гибели, или выведения из испытаний (эвтаназии).

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

3.1.4 **макроматериал:** Материал, имеющий такой же химический состав, как у наноматериала, и состоящий из объектов, размеры которых превышают нанодиапазон.

3.1.5 **минимальный уровень неблагоприятного воздействия** (LOAEL): Статистически установленная минимальная однократная доза вещества, вызывающая обнаруживаемое вредное воздействие на здоровье.

3.1.6 **носитель наноматериала:** Вещество, используемое для смешивания, диспергирования или растворения исследуемого наноматериала и позволяющее облегчить его введение в тест-систему.

3.1.7 **средняя смертельная концентрация** (CL_{50}/LC_{50}): Обусловленная временем статистически выверенная оценка концентрации исследуемого вещества, которая предположительно может являться причиной смерти 50% животных, подвергшихся определенному воздействию препарата во время экспозиции или в течение определенного промежутка времени после экспозиции.

Примечание — Значение CL_{50}/LC_{50} выражается как масса исследуемого препарата на единицу объема воздуха (мг/л, мг/м^3) или как единица объема исследуемого препарата на единицу объема воздуха (промилле, частей на млрд).

3.1.8 **средняя смертельная доза** (DL_{50}/LD_{50}): Статистически установленная однократная доза вещества, которая предположительно в 50% случаев может вызвать смерть животного.

Примечание — При введении перорально DL_{50}/LD_{50} выражается в отношении единицы массы испытываемого вещества к единице массы подопытного животного, мг/кг.

3.1.9 **уровень отсутствия наблюдаемого неблагоприятного воздействия** (NOAEL): Максимальная доза вещества, не вызывающая обнаруживаемого вредного воздействия на здоровье.

3.2 Обозначения и сокращения

В настоящем стандарте применены следующие обозначения и сокращения:

ПАВ — поверхностно-активное вещество;

BMD — исходная точка для установления минимальной дозы;

CL_{50}/LC_{50} — средняя смертельная концентрация;

DL_{50}/LD_{50} — средняя смертельная доза;

LOAEL — минимальный уровень неблагоприятного воздействия;

NOAEL — уровень отсутствия наблюдаемого неблагоприятного воздействия

4 Общие положения

4.1 Испытания по токсиколого-гигиенической оценке безопасности наноматериалов проводят в соответствии с принципами надлежащей лабораторной практики по ГОСТ 33044, ГОСТ 31890, ГОСТ 31886, ГОСТ Р 56701 и с учетом [1]. Лаборатории должны соответствовать требованиям ГОСТ ИСО/МЭК 17025.

4.2 Перед проведением испытаний должна быть проанализирована вся имеющаяся информация об исследуемом наноматериале, включая результаты других испытаний, наличие которых не требует проведения дополнительных испытаний, с целью минимизации использования животных, информацию, которая может помочь в выборе наиболее подходящего вида, линии и пола тестовых животных, времени воздействия, дозы и соответствующей концентрации исследуемого наноматериала.

4.3 В зависимости от цели испытания дозу наноматериала рассчитывают как счетную концентрацию, массовую концентрацию или объемную концентрацию нанообъектов.

Для приготовления испытуемых доз используют наноматериал одной и той же партии.

При наличии сведений о свойствах испытуемого наноматериала, представленного в виде раствора/суспензии/эмульсии, к агрегации или агломерации рекомендуется проводить его ультразвуковую обработку непосредственно (не более чем за 1 ч) перед введением животным. Обработку наноматериала проводят при частоте ультразвука не менее 30 кГц, мощности не менее 0,5 Вт/см^3 в течение 5 мин при температуре (2—4) °С (охлаждение в бане со льдом). Для предотвращения образования агрегатов или агломератов нанообъектов в процессе введения животным наноматериала допускается использование принудительного перемешивания подготовленного раствора/суспензии/эмульсии наноматериала в течение всего периода введения.

4.4 В качестве носителя наноматериала рекомендуется применять стерильный апирогенный раствор хлорида натрия концентрацией 0,15 моль/дм^3. В качестве носителя наноматериала допускается применять органические растворители и поверхностно-активные вещества (ПАВ). При наличии сведений о собственной токсичности носителя наноматериала (известных значениях средней смертельной дозы (DL_{50}/LD_{50}), средней смертельной концентрации (CL_{50}/LC_{50}), уровня отсутствия наблюдаемого неблагоприятного воздействия (NOAEL) или минимального уровня неблагоприятного воздействия (LOAEL)) рекомендуется использовать такую его дозу, которая при однократном введении животным не оказывает на них токсического действия.

В случае использования в качестве носителя наноматериала органических растворителей и ПАВ, обладающих собственной токсичностью, формируют дополнительную контрольную группу животных, получающих этот носитель. Дозы носителя, применяемые в контрольной группе и в опытных группах, при всех используемых дозировках наноматериала должны быть одинаковыми.

4.5 При необходимости проведения испытаний макроматериала или аналогичного материала, обладающего собственной токсичностью, формируют дополнительную группу животных. Доза макроматериала или аналогичного материала должна соответствовать дозе наноматериала по одному из показателей, указанных в 4.3. Объем дозы макроматериала или аналогичного материала должен быть установлен в стандарте/методике на конкретный метод испытания.

4.6 Для проведения испытания используют здоровых молодых половозрелых животных. В качестве лабораторных животных используют следующие их виды:

- мышь (*Mus musculus*);
- крыса (*Rattus norvegicus, Rattus rattus*);
- морская свинка (*Cavia porcellus*);

- сирийский (золотистый) хомячок (*Mesocricetus auratus*);
- китайский хомячок (*Cricetulus griseus*);
- монгольская песчанка (*Merione sunguiculatus*);
- кролик (*Oryctolagus cuniculus*);
- собака (*Canis familiaris*);
- кошка (*Felis catus*);
- все виды нечеловекообразных приматов;
- лягушка (*Xenopus (laevis, tropicalis), Rana (temporaria, pipiens)*);
- данио-рерио (*Daniorerio*).

Наиболее предпочтительным видом лабораторных животных являются крысы и мыши. При использовании других видов лабораторных и (или) сельскохозяйственных животных должно быть представлено соответствующее обоснование.

4.7 Размещение, содержание и уход за лабораторными животными — по ГОСТ 33215, ГОСТ 33216 (грызуны, кролики). Требования к кормам для лабораторных животных — по ГОСТ Р 50258. Кормление животных следует осуществлять рационами, обеспечивающими физиологические потребности животных во всех основных пищевых веществах и энергии, за исключением особых случаев, определяемых протоколом испытания (например при проведении испытаний на животных с патологией, вызванной искусственно воспроизведенным нарушением энергетической ценности или состава пищевых веществ). Пищевая ценность рационов животных опытных и контрольных групп должна быть одинаковой.

4.8 Снабжение лабораторных животных питьевой водой при проведении испытаний осуществляют в режиме свободного доступа (в неограниченном количестве), если иное не установлено стандартом/методикой на конкретный метод испытания (например при введении исследуемого наноматериала в дозированных количествах с питьевой водой). Качество воды должно соответствовать требованиям [1]. Для животных рекомендуется использовать воду, полученную методом обратного осмоса, сбалансированную по минеральному составу.

4.9 Путь введения наноматериала должен соответствовать пути попадания его в организм человека в соответствии с имеющимися сценариями.

При пероральном пути введения рекомендуется вводить наноматериал с кормом или питьевой водой. При этом следует контролировать стабильность характеристик наноматериала и концентрацию наноматериала в корме или питьевой воде в соответствии с [2]. Для определения суточной дозы наноматериала проводят ежедневный контроль количества потребленного корма или питьевой воды, содержащих наноматериал. При проведении испытания продолжительностью менее месяца допускается введение наноматериала в желудок через зонд способом, не травмирующим животное.

Способ введения животным дозы наноматериала при ингаляционном (внутритрахеальном, внутриглоточном и внутригортанном) введении и нанесении на кожу должен быть установлен в стандарте/методике на конкретный метод испытания.

4.10 Всех животных, включая тех, что умерли во время тестирования и были удалены из исследования по соображениям благополучия животных, подвергают общей аутопсии. Отбор проб биологического материала для анализа проводят в соответствии с разделом 6.

4.11 Требования безопасности

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

4.11.2 При работе с вредными веществами необходимо соблюдать требования техники безопасности по ГОСТ 12.1.007 и [3].

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

5 Общие требования к проведению испытаний для токсиколого-гигиенической оценки безопасности наноматериалов

5.1 Оценка острой токсичности наноматериала

5.1.1 Испытания проводят с целью получения информации об острой токсичности исследуемого наноматериала и количественной оценки риска (переносимых, токсических и смертельных доз) после однократного перорального, ингаляционного введения наноматериала и нанесения на кожу.

5.1.2 Испытания при пероральном введении наноматериала в организм животных проводят по ГОСТ 32296 и ГОСТ 32644, ингаляционном введении — по ГОСТ 32542, нанесении на кожу — по ГОСТ 32373.

5.1.3 В случае если наноматериал не является токсичным или обладает токсичностью только в дозах, превышающих предельно допустимые уровни, то проводят пороговое испытание предельной дозы. В тех случаях, когда информация о токсичности наноматериала отсутствует или недостаточна, или когда испытуемый наноматериал, вероятно, является токсичным, то проводят основное испытание.

Предельную дозу наноматериала определяют на основе данных о токсичности макроматериала или аналогичных материалов. При отсутствии таких данных, выбирают максимально возможную дозу наноматериала с учетом вида, пола и возраста животного, технической возможности получения наноматериала в виде стабильного раствора/суспензии/эмульсии и заданной концентрации, допустимого максимального разового объема жидкого препарата, вводимого животному, в соответствии с таблицей 1.

Таблица 1 — Допустимые максимальные разовые объемы жидких препаратов для лабораторных животных (крыс и мышей) в зависимости от пути введения

Путь введения	Вид животных	
	Крыса	Мышь
Внутритрахеально, внутриглоточно или внутригортанно, не более, $см^3$	0,5	—
Внутрижелудочно (в зависимости от массы тела животного), не более, $см^3$	3—8*	0,5—1,0**
* При массе тела животного 100—190 г разовый объем жидкого препарата должен быть не более 3 $см^3$, 200—290 г — не более 4—5 $см^3$, 250—300 г — не более 6 $см^3$, более 300 г — не более 8 $см^3$; ** При массе тела животного 20—30 г разовый объем жидкого препарата должен быть не более 0,5 $см^3$, 25—30 г — не более 0,8 $см^3$, более 30 г — не более 1,0 $см^3$		

5.1.4 На основании данных о смертности животных выполняют количественную оценку риска наноматериала, определяя DL_{50}/LD_{50} по ГОСТ 32296 и ГОСТ 32644 (при пероральном введении наноматериалов в организм животных), по ГОСТ 32373 (при нанесении на кожу) и CL_{50} по ГОСТ 32542 (при ингаляционном введении наноматериалов в организм животных).

Класс опасности испытуемого наноматериала определяют по ГОСТ 32644.

5.1.5 Информацию о токсичности наноматериала, полученную при испытаниях по оценке острой токсичности, используют как исходную для проведения испытаний по оценке подострой и хронической токсичности.

На основе значений, полученных при испытаниях по оценке острой токсичности наноматериала, определяют дозу, вводимую животным при испытаниях по оценке подострой и хронической токсичности.

5.2 Оценка подострой (субхронической) токсичности наноматериала

5.2.1 Испытания проводят с целью получения информации об основных токсических эффектах наноматериала, выявления органов-мишеней и возможности накопления вещества, определения NOAEL и LOAEL, на основе которых определяют безопасные уровни воздействия на организм человека.

5.2.2 Испытания при пероральном введении наноматериала в организм животных проводят по ГОСТ 32637 и ГОСТ 32641, ингаляционном введении — по ГОСТ 32636 и ГОСТ 32643, нанесении на кожу — по ГОСТ 32639 и ГОСТ 32634.

5.2.3 При проведении испытаний у животных контролируют показатели, указанные в приложении А.

5.3 Оценка хронической токсичности наноматериала

5.3.1 Испытания проводят с целью получения данных о токсическом воздействии наноматериала, выявления органов-мишеней и возможности накопления вещества, определения степени обратимости вызываемых наноматериалом повреждений, описания зависимости доза-эффект, определения NOAEL и прогнозирования хронической токсичности для организма человека.

5.3.2 Испытания при пероральном введении наноматериала в организм животных проводят по ГОСТ 32519, ингаляционном введении — по ГОСТ 32383, нанесении на кожу — по ГОСТ 32437.

5.3.3 Продолжительность испытаний устанавливают в соответствии со стандартом/методикой на конкретный метод испытания, но не более средней продолжительности жизни животных. Если требуется проведение испытания наноматериала, воздействующего на организм в течение длительного времени, то продолжительность испытания составляет от 12 до 18 месяцев для лабораторных животных (грызунов). При наличии у наноматериала свойства кумуляции или в случае его отнесения к высоко опасным веществам (I-II класс по ГОСТ 12.1.007) срок испытания может быть увеличен.

5.3.4 При проведении испытаний у животных контролируют показатели, указанные в приложении А.

5.4 Определение мутагенных свойств наноматериала

5.4.1 Испытания проводят с целью получения данных о токсическом воздействии наноматериала на генетический механизм репродуктивных клеток животного, проявляющемся в повреждении ДНК и возникновении новых, потенциально вредных наследуемых признаков (мутаций).

5.4.2 Мутагенные свойства наноматериала для лабораторных животных (крыс и мышей) определяют методами учета аберраций хромосом в клетках костного мозга и учета микроядер в соматических клетках по ГОСТ 32635 и доминантных летальных мутаций в зародышевых клетках мышей по [4], повреждения ДНК в соматических клетках методом щелочного электрофореза по [5].

5.4.3 Класс опасности испытуемого наноматериала определяют в соответствии с критериями по ГОСТ Р 57454.

5.4.4 Для испытаний используют первичные культуры клеток, полученные от лабораторных животных (клеток костного мозга, лимфоцитов периферической крови и гепатоцитов печени), обработанные наноматериалами. Подготовка культур клеток для проведения тестов по ГОСТ 32635 (4.3) и [5].

5.5 Оценка репродуктивной токсичности наноматериала

5.5.1 Испытания проводят с целью получения данных о токсических воздействиях наноматериала на эмбриональное развитие, возникновение неонатальных заболеваний и тератогенеза, пренатальную и неонатальную смертность, репродуктивное поведение и фертильность (плодовитость).

5.5.2 Испытания проводят в одном поколении по ГОСТ 32378, ГОСТ 32379; в двух поколениях — по ГОСТ Р 56698.

5.5.3 Класс опасности испытуемого наноматериала определяют в соответствии с критериями по ГОСТ Р 57452.

5.6 Оценка воздействия наноматериала на функцию иммунитета

5.6.1 Испытания проводят с целью получения данных о процессах иммунной защиты организма, являющихся мишенями токсического действия наноматериалов, установления зависимости доза—эффект, выявления возможных эффектов кумуляции наноматериалов в организмах животных по показателям воздействия на функцию иммунитета.

5.6.2 Испытания проводят по [6].

5.7 Оценка канцерогенности наноматериала

5.7.1 Испытания проводят с целью установления канцерогенных свойств наноматериала, определения времени появления новообразований и органов-мишеней, описания зависимости доза-эффект и определения NOAEL или исходной точки для установления минимальной дозы (BMD).

5.7.2 Испытания проводят по ГОСТ 32647.

5.7.3 Класс опасности испытуемого наноматериала определяют в соответствии с критериями по ГОСТ Р 57453.

5.8 Оценка воздействия наноматериала на организм при доклинических исследованиях безопасности лекарственных препаратов

5.8.1 Испытания проводят с целью определение фармакологических и токсикологических аффектов до начала исследований у человека и на протяжении всей программы клинической разработки.

5.8.2 Дозу наноматериала определяют на основе данных о токсичности макроматериала или аналогичных материалов. При отсутствии таких данных, выбирают максимально возможную дозу на-

номатериала с учетом вида, пола и возраста животного, технической возможности получения наноматериала в виде стабильного раствора/суспензии/эмульсии и заданной концентрации, допустимого максимального разового объемов жидкого препарата, вводимого животному, в соответствии с таблицей 2.

Таблица 2 — Допустимые максимальные разовые объемы жидких препаратов для лабораторных животных (крыс и мышей) при парентеральном введении

Путь введения	Вид животных	
	Крыса	Мышь
Внутрибрюшинно, не более, $см^3$	5,0	1,0
Внутривенно, не более, $см^3$	2,0	0,2—0,5

5.8.3 Перед парентеральным введением наноматериала животным проводят контроль содержания в нем бактериального эндотоксина с использованием лизата амебоцитов (ЛАЛ-теста) по ГОСТ Р ИСО 29701. В качестве носителей наноматериала при парентеральном введения не допускается использование органических растворителей и ПАВ.

5.8.4 В зависимости от цели испытания проводят по ГОСТ Р 56699, ГОСТ Р 57129, ГОСТ Р 57146, ГОСТ Р 57147, ГОСТ Р 56700.

6 Отбор проб биологического материала

6.1 Пробы органов и тканей отбирают отдельно для каждого животного. Объединений проб от разных животных (в том числе, в пределах одной группы) не допускается.

6.2 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. Рекомендуется использовать методы составления случайной выборки отбираемых проб по ГОСТ Р ИСО 24153.

6.3 Для исключения влияний циркадных и более длительных биоритмов организмов животных на результаты испытаний, отбор проб проводят одновременно в опытной и контрольной группе в одно и то же время суток на протяжении не более 2—3 часов (предпочтительно между 9 и 12 часами) на следующие сутки после завершения испытания. В случае, 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 суток после завершения испытания в одно и то же время суток.

6.4 После взятия проб от животных определяют их массу (объем) пробы и выполняют анализ соответствующими методами, установленными в стандарте/методике на конкретный метод испытания, или консервируют. 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 должен быть установлен в стандарте/методике на конкретный метод испытания.

6.5 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 отбора проб и сопроводительном листе, прилагаемым к пробам, и содержащим 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 для проб и иные элементы тары, удаляемые до начала анализа проб. Коробки для хранения контейнеров с пробами должны иметь маркировку, включающую:

- дату (даты) проведения испытания;
- наименование испытания;
- наименование исследуемого наноматериала;
- наименование или номер группы;
- максимальный срок хранения пробы;
- фамилию ответственного лица.

7 Данные, отчет о проведении испытания

7.1 Данные

7.1.1 В отчете о проведении испытания регистрируют информацию о наноматериале, содержащуюся в сопроводительной документации и нормативных документах на конкретный вид наноматериала, включая идентификационные данные, химическое строение и физико-химические свойства исследуемого наноматериала, предполагаемую область применения и вероятность воздействия на человека; сведения о токсичности макроматериала и аналогичных материалов (при наличии).

7.1.2 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 токсичности, число животных, найденных мертвыми во время испытания или умерщвленных из гуманных соображений, индивидуальное время смерти животных, описание и временной ход развития токсических эффектов, их обратимость, результаты аутопсии, результаты анализа проб биологического материала.

7.2 Отчет о проведении испытания

Отчет должен содержать достаточную информацию о методе испытаний и применяемом программном обеспечении.

Отчет должен содержать сведения:

- при оценке острой токсичности наноматериала при пероральном введении в организм животных — по ГОСТ 32296 (раздел 5) и ГОСТ 32644 (раздел 5), ингаляционном введении — по ГОСТ 32542 (4.4), нанесении на кожу — по ГОСТ 32373 (раздел 6);
- при оценке подострой (субхронической) токсичности наноматериала при пероральном введении в организм животных — по ГОСТ 32637 (раздел 5) и ГОСТ 32641 (раздел 5), ингаляционном введении — по ГОСТ 32636 (раздел) и ГОСТ 32643 (раздел 7), нанесении на кожу — по ГОСТ 32639 (раздел 6) и ГОСТ 32634 (раздел 6);
- при оценке хронической токсичности наноматериала при пероральном введении в организм животных — по ГОСТ 32519 (раздел 5), ингаляционном введении — по ГОСТ 32383 (раздел 5), нанесении на кожу — по ГОСТ 32437 (раздел 5);
- при определении мутагенных свойств наноматериала по ГОСТ 32635 (раздел 6);
- при оценке репродуктивной токсичности наноматериала в одном поколении животных — по ГОСТ 32378 (раздел 6), ГОСТ 32379 (раздел 7); в двух поколениях животных — по ГОСТ Р 56698 (8.3);
- при оценке воздействия наноматериала на функцию иммунитета по [6].
- при оценке канцерогенности наноматериала — по ГОСТ 32647 (раздел 5).

При оценке воздействия наноматериала на организм в доклинических исследованиях безопасности лекарственных препаратов требования к отчету должны быть установлены в стандарте/методике на конкретный метод испытания.

7.3 Оценка результатов

7.3.1 Результаты испытаний оценивают по наблюдаемым эффектам и данным, полученным при анализе биологического материала. Оценку численных результатов испытаний, включая достоверность различия показателей жизнедеятельности животных в опытных и контрольных группах, выполняют с применением соответствующих статистических методов.

7.3.2 Эффект (воздействие) наноматериала на изучаемый показатель жизнедеятельности животного рассматривают как специфический, если:

- эффект статистически достоверно проявляется при воздействии наноматериала на организм животного, при отсутствии воздействия носителя, макроматериала или аналогичного материала;
- эффект статистически достоверно проявляется при сравнении групп животных, получавших в одинаковых количествах наноматериал или носитель наноматериала;
- эффект статистически достоверно проявляется при сравнении групп животных, получавших в одинаковых количествах наноматериал и макроматериал (или аналогичный материал).

7.3.3 Эффект (воздействие) наноматериала на изучаемый показатель жизнедеятельности животного рассматривают как дозозависимый, если достоверно установлена зависимость выраженности эффекта от величины дозы наноматериала.

Приложение А
(справочное)

Перечень показателей, контролируемых при проведении испытаний по оценке подострой (субхронической) и хронической токсичности наноматериала

Показатели, контролируемые при проведении испытаний по оценке подострой (субхронической) и хронической токсичности наноматериала, подразделяют на интегральные, гематологические, цитологические, биохимические и микробиологические показатели.

Показатели, контролируемые при проведении испытаний по оценке подострой (субхронической) и хронической токсичности наноматериала, представлены в таблице А.1.

Таблица А.1 — Показатели, контролируемые при проведении испытаний по оценке подострой (субхронической) и хронической токсичности наноматериала

Показатель	Биоматериал	Периодичность контроля
Интегральные показатели		
Общее состояние животных (внешний вид, поведение, двигательная активность, состояние шерстного покрова, характер стула)	Животное в целом	Прижизненно 1 раз в сутки
Поедаемость корма	Корм (не потребленные остатки)	Прижизненно 1 раз в сутки
Масса тела	Животное в целом	Прижизненно 1 раз в 7 суток
Объем суточной мочи	Моча	Прижизненно 1 раз в 30 суток
Абсолютная и относительная масса внутренних органов (минимальный перечень органов в соответствии с требованиями стандарта/методики на конкретный метод испытания)	Цельные органы	1 раз при выведении из исследования после удаления соединительнотканных капсул и жира
Гематологические показатели		
Концентрация гемоглобина в крови	Цельная кровь	1 раз при выведении из исследования
Гематокрит	Цельная кровь	1 раз при выведении из исследования
Общее количество эритроцитов	Цельная кровь	1 раз при выведении из исследования
Средний объем эритроцита	Цельная кровь	1 раз при выведении из исследования
Среднее содержание гемоглобина в эритроците	Цельная кровь	1 раз при выведении из исследования
Средняя концентрация гемоглобина в эритроците	Цельная кровь	1 раз при выведении из исследования
Общее число лейкоцитов	Цельная кровь	1 раз при выведении из исследования
Лейкоцитарная формула (относительное содержание от общего числа лейкоцитов, в процентах): базофилы, нейтрофилы, лимфоциты, эозинофилы, моноциты	Цельная кровь	1 раз при выведении из исследования
Скорость оседания эритроцитов	Цельная кровь	1 раз при выведении из исследования

Продолжение таблицы А.1

Показатель	Биоматериал	Периодичность контроля
Общее число тромбоцитов	Цельная кровь	1 раз при выведении из исследования
Цитологические показатели		
Апоптоз клеток печени и головного мозга	Ткани печени и головного мозга	1 раз при выведении из исследования
Стабильность мембран лизосом клеток печени	Ткань печени	1 раз при выведении из исследования
Биохимические показатели		
Общий анализ мочи (цвет, прозрачность, относительная плотность, pH, белок, глюкоза, креатинин)	Моча	Прижизненно 1 раз в 30 суток
Биохимический анализ крови (содержание общего белка, альбумина, глобулинов, глюкозы, креатинина, мочевины, желчных кислот, билирубина общего и прямого, натрия, калия, фосфора, хлоридов, активность аланинаминотрансферазы, аспартатаминотрансферазы, щелочной фосфатазы, альфа-амилазы, липазы, лактатдегидрогеназы, холинэстеразы)	Сыворотка крови	1 раз при выведении из исследования
Показатели системы 1 и 2 фазы метаболизма ксенобиотиков (общее содержание цитохромов Р-450 и b5, N-деметилирование амидопирина, О-деметилирование р-нитроанизола, гидроксилирование 3,4 бенз(а)пирена, О-деэтилирование 7-этоксикумарина, О-деэтилирование 7-этоксирезоруфина, О-деэтилирование 7-пентоксирезоруфина, эпоксидгидролаза, UDP-глюкуронозилтрансфераза, глутатионтрансфераза)	Ткань печени, микросомальная фракция	1 раз при выведении из исследования
Активность ферментов антиоксидантной защиты (глутатионредуктаза, глутатионпероксидаза, супероксиддисмутаза, каталаза)	Эритроциты	1 раз при выведении из исследования
Содержание продуктов перекисного окисления липидов: малонового диальдегида, диеновых конъюгатов полиненасыщенных жирных кислот	Плазма крови	1 раз при выведении из исследования
Содержание небелковых тиолов (в пересчете на восстановленный глутатион)	Ткань печени	1 раз при выведении из исследования
Содержание цинка	Сыворотка крови, бедренная кость	1 раз при выведении из исследования
Активность щелочной фосфатазы	Сыворотка крови	1 раз при выведении из исследования
Содержание железа	Сыворотка крови	1 раз при выведении из исследования
Ненасыщенная железо-связывающая способность	Сыворотка крови	1 раз при выведении из исследования
Общая железо-связывающая способность	Сыворотка крови	1 раз при выведении из исследования
Степень насыщения трансферрина	Сыворотка крови	1 раз при выведении из исследования
Содержание трансферрина	Сыворотка крови	1 раз при выведении из исследования

Продолжение таблицы А.1

Показатель	Биоматериал	Периодичность контроля
Содержание ферритина	Сыворотка крови	1 раз при выведении из исследования
Содержание селена	Сыворотка крови, моча	1 раз при выведении из исследования
Активность глутатионпероксидазы	Эритроциты	1 раз при выведении из исследования
Общие липиды	Плазма крови	1 раз при выведении из исследования
Холестерин	Плазма крови	1 раз при выведении из исследования
Холестерин ЛПВП	Плазма крови	1 раз при выведении из исследования
Холестерин ЛПНП	Плазма крови	1 раз при выведении из исследования
Триглицериды	Плазма крови	1 раз при выведении из исследования
Жирнокислотный состав сыворотки крови и мембран эритроцитов	Сыворотка крови, мембраны эритроцитов	1 раз при выведении из исследования
Витамин А	Сыворотка крови, ткань печени	1 раз при выведении из исследования
Витамин Е	Сыворотка крови, эритроциты	1 раз при выведении из исследования
Витамин B_1 (тиамин)	Моча	Прижизненно на 30,60 и 180 сутки
Транскетолаза эритроцитов и ТДФ-эффект	Эритроциты	1 раз при выведении из исследования
Витамин B_2	Моча	Прижизненно на 30,60 и 180 сутки
Глутатионредуктаза эритроцитов и ФАД-эффект	Эритроциты	1 раз при выведении из исследования
4-пиридоксиновая кислота	Моча	Прижизненно на 30,60 и 180 сутки
Аспартатамино-трансфераза эритроцитов и ПАЛФ-эффект	Эритроциты	1 раз при выведении из исследования
N^1-метилникотинамид	Моча	Прижизненно на 30,60 и 180 сутки
Никотинамидные коферменты (НАД и НАДФ)	Цельная кровь	1 раз при выведении из исследования
8-оксо-2-дезоксигуанозин	Моча	Прижизненно на 30,60 и 180 сутки
Цитокины (TNF-α, IL1α, IL1β, IL2, IL3, IL4, IL5, IL6, IL8, IL10, IL13, IFN-γ)	Сыворотка крови	1 раз при выведении из исследования
Хемокины (TGF-β, IGF, G-CSF, VEGF, лептин)	Сыворотка крови	1 раз при выведении из исследования

Окончание таблицы А.1

Показатель	Биоматериал	Периодичность контроля
Клеточные маркеры лимфоцитов (CD3, CD4, CD8, CD45RA, CD161a)	Цельная кровь	1 раз при выведении из исследования
Фагоцитарная активность нейтрофильных лейкоцитов	Лейкоциты	1 раз при выведении из исследования
Активность лактатдегидрогеназы	Бронхоальвеолярная лаважная жидкость	Прижизненно на 30,60 и 180 сутки
Активность γ-глутамилтранспептидазы	Бронхоальвеолярная лаважная жидкость	Прижизненно на 30,60 и 180 сутки
Активность щелочной фосфатазы	Бронхоальвеолярная лаважная жидкость	Прижизненно на 30,60 и 180 сутки
Содержание общего белка	Бронхоальвеолярная лаважная жидкость	Прижизненно на 30,60 и 180 сутки
Уровень фактора KL6	Бронхоальвеолярная лаважная жидкость	Прижизненно на 30,60 и 180 сутки
Микробиологические показатели		
Бифидобактерии (Bifidobacterium spp)	Содержимое слепой кишки	1 раз при выведении из исследования
Лактобациллы (Lactobacillus spp)	Содержимое слепой кишки	1 раз при выведении из исследования
Энтеробактерии (Enterobacteriaceae spp)	Содержимое слепой кишки	1 раз при выведении из исследования
Стафилококки (Staphylococcus spp)	Содержимое слепой кишки	1 раз при выведении из исследования
Стрептококки (Streptococcus spp)	Содержимое слепой кишки	1 раз при выведении из исследования
Энтерококки (Enterococcus spp)	Содержимое слепой кишки	1 раз при выведении из исследования
Бактероиды (Bacteroides spp)	Содержимое слепой кишки	1 раз при выведении из исследования
Мезофильные аэробные и факультативно-анаэробные микроорганизмы	Содержимое слепой кишки	1 раз при выведении из исследования
Мезофильные анаэробные микроорганизмы	Содержимое слепой кишки	1 раз при выведении из исследования
Гемолитические стрептококки	Содержимое слепой кишки	1 раз при выведении из исследования
Сульфитредуцирующие клостридии	Содержимое слепой кишки	1 раз при выведении из исследования
Золотистый стафилококк (S.aureus)	Содержимое слепой кишки	1 раз при выведении из исследования
Протеи (Proteusspp.)	Содержимое слепой кишки	1 раз при выведении из исследования
Плесени, дрожжи	Содержимое слепой кишки	1 раз при выведении из исследования

Библиография

[1]	СанПиН 2.1.4.1074-01	Санитарно-эпидемиологические правила и нормативы «Питьевая вода. Гигиенические требования к качеству воды централизованных систем питьевого водоснабжения. Контроль качества»
[2]	МР 1.2. 2641−10	Методические рекомендации «Определение приоритетных видов наноматериалов в объектах окружающей среды, пищевых продуктах и живых организмах»
[3]	СП 1.3.2322-08	Санитарно-эпидемиологические правила «Безопасность работы с микроорганизмами III—IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней»
[4]	МУ 1.2.2520-09	Методические указания «Токсиколого-гигиеническая оценка безопасности наноматериалов»
[5]	МР 4.2.0014-10	Методические рекомендации «Методы контроля. Биологические факторы. Оценка генотоксических свойств методом ДНК-комет *in vitro*»
[6]	МР 1.2.0052-11	Методические рекомендации «Оценка воздействия наноматериалов на функцию иммунитета»

УДК 57.014:59.08:006.354

ОКС 11.100
07.080
07.100.10
07.120
11.020
11.220

Ключевые слова: нанотехнологии, наноматериалы, токсиколого-гигиеническая оценка безопасности, проведение испытаний на лабораторных животных

БЗ 10—2017/109

Редактор *Г.Н. Симонова*
Технический редактор *В.Н. Прусакова*
Корректор *М.С. Кабашова*
Компьютерная верстка *Е.А. Кондрашовой*

Сдано в набор 10.11.2017. Подписано в печать 15.11.2017. Формат 60×84⅛. Гарнитура Ариал.
Усл. печ. л. 1,86. Уч.-изд. л. 1,68. Тираж 22 экз. Зак. 2276.

Подготовлено на основе электронной версии, предоставленной разработчиком стандарта

Издано и отпечатано во ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ», 123001 Москва, Гранатный пер., 4.

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

gost.e-ecolog.ru