Государственное санитарно-эпидемиологическое нормирование Российской Федерации

2.3.2. ГИГИЕНА. ГИГИЕНА ПИТАНИЯ.
ПРОДОВОЛЬСТВЕННОЕ СЫРЬЕ И ПИЩЕВЫЕ ПРОДУКТЫ

Медико-биологическая оценка безопасности генно-инженерно-модифицированных организмов растительного происхождения с комбинированными признаками

Методические указания
МУ 2.3.2.3388—16

Издание официальное

gost.e-ecolog.ru

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

2.3.2. ГИГИЕНА. ГИГИЕНА ПИТАНИЯ.
ПРОДОВОЛЬСТВЕННОЕ СЫРЬЕ И ПИЩЕВЫЕ ПРОДУКТЫ

Медико-биологическая оценка безопасности генно-инженерно-модифицированных организмов растительного происхождения с комбинированными признаками

Методические указания
МУ 2.3.2.3388—16

ББК 51.23
М42

М42 **Медико-биологическая оценка безопасности генно-инженерно-модифицированных организмов растительного происхождения с комбинированными признаками: Методические указания.**—М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2016.—30 с.

ISBN 978—5—7508—1501—2

1. Разработаны ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии» (Н. В. Тышко, Э. О. Садыкова, А. К. Голомидова, И. В. Гмошинский, А. А. Кочеткова, В. А. Саркисян, В. А. Тутельян); Федеральной службой по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (А. Ю. Попова, И. В. Брагина); Российской академией наук (Г. Г. Онищенко); Институтом биоинженерии, ФГУ «ФИЦ Биотехнологии» РАН (К. Г. Скрябин, И. В. Яковлева, Б. Б. Кузнецов); МГУ им. М. В. Ломоносова (М. П. Кирпичников).

2. Утверждены руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации А. Ю. Поповой 3 августа 2016 г.

3. Введены впервые.

ББК 51.23

ISBN 978—5—7508—1501—2

© Роспотребнадзор, 2016
© Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2016

Содержание

I. Общие положения и область применения 5
II. Проведение оценки безопасности ГМО с комбинированными признаками 5
III. Экспертный анализ и оценка данных, характеризующих ГМО с комбинированными признаками 7
IV. Методы обнаружения, идентификации и количественного определения ГМО с комбинированными признаками в пищевых продуктах 11
V. Медико-генетическая оценка ГМО с комбинированными признаками 12
VI. Оценка функционально-технологических свойств ГМО с комбинированными признаками 12
VII. Медико-биологическая оценка безопасности ГМО с комбинированными признаками 13
Список литературы 28

УТВЕРЖДАЮ
Руководитель Федеральной службы
по надзору в сфере защиты прав
потребителей и благополучия человека,
Главный государственный санитарный
врач Российской Федерации
А. Ю. Попова
26 июля 2016 г.

2.3.2. ГИГИЕНА. ГИГИЕНА ПИТАНИЯ.
ПРОДОВОЛЬСТВЕННОЕ СЫРЬЕ И ПИЩЕВЫЕ ПРОДУКТЫ

Медико-биологическая оценка безопасности генно-инженерно-модифицированных организмов растительного происхождения с комбинированными признаками

Методические указания
МУ 2.3.2.3388—16

Появление генно-инженерно-модифицированных организмов растительного происхождения (ГМО) второго поколения, в том числе ГМО с комбинированными признаками, привело к необходимости формирования новых подходов к оценке безопасности и процедуры государственной регистрации таких ГМО в Российской Федерации. Анализ мирового опыта в данной области свидетельствует о необходимости дифференцирования набора исследований в зависимости от метода получения ГМО с комбинированными признаками: 1-й метод – «трансформационный» – новый ген (гены) методом генной инженерии вводят в геном уже существующего и зарегистрированного ранее ГМО; 2-й метод – «молекулярный» – геном растения-донора методом генной инженерии трансформируют с помощью вектора, содержащего два или более генов, отвечающих за новые признаки, или с помощью множественных векторов; 3-й метод – «гибридизационный» – два уже существующих ГМО используют в качестве родительских форм для получения гибрида методами традиционной селекции. Линии, полученные с помощью трансформационного и молекулярного методов, считаются новыми ГМО и подлежат регистрационным испытаниям в полном объеме. Линии, полученные с помощью гибридизации, рассматриваются в разных юрисдикциях по-разному: в США, Канаде, Австралии и Новой Зеландии – как

продукт обычной селекции, не требующий регистрации при условии, что исходные ГМ-линии уже зарегистрированы; в странах Европейского Союза требуется регистрация каждого нового ГМО, полученного с использованием уже зарегистрированных родительских ГМ линий, однако, с точки зрения безопасности рассматриваются только возможные эффекты взаимодействия двух белков (генов), обеспечивающих проявление новых признаков. При регистрации ГМО с комбинированными признаками, полученных гибридизацией трех и более родительских линий (ГМО высокого порядка), автоматически считаются зарегистрированными все возможные комбинации, сформировавшиеся в результате генетической сегрегации таких ГМО (расщепления признаков в поколениях F1 и выше, в соответствии с законами Менделя). Например, при регистрации ГМО, полученного гибридизацией шести родительских линий, должны быть зарегистрированы все 63 возможных гибрида поколения F1, содержащие рекомбинантную ДНК. Подобный подход применяется в Европейском Союзе, Аргентине, Бразилии, Филиппинах, Парагвае, Уругвае и Японии.

На основании анализа отечественного и международного опыта были разработаны требования к оценке безопасности ГМО с комбинированными признаками, соответствующие принципам регулирования использования ГМО для пищевых целей.

I. Общие положения и область применения

1.1. Методические указания устанавливают требования к проведению оценки безопасности ГМО с комбинированными признаками.

1.2. Требования, изложенные в настоящих Методических указаниях, применяются на этапе государственной регистрации ГМО с комбинированными признаками, впервые поступающих на продовольственный рынок Российской Федерации.

1.3. Методические указания разработаны с целью обеспечения единой, научно обоснованной системы оценки безопасности ГМО с комбинированными признаками и учитывают новые методические подходы, как используемые в России, так и рекомендованные международными организациями.

II. Проведение оценки безопасности ГМО с комбинированными признаками

2.1. Перечень и объем исследований при оценке безопасности ГМО с комбинированными признаками определяются с учетом следующих факторов:

• метода получения ГМО (трансформационный метод, молекулярный метод, гибридизационный метод);

• наличия государственной регистрации исходных ГМ-линий на территории Таможенного Союза – для ГМО, полученных гибридизационным методом.

2.2. В случае если ГМО с комбинированными признаками получен трансформационным или молекулярным методом, оценка его безопасности проводится в соответствии с разделами III—VII данных Методических указаний и включает в себя следующие этапы:

• экспертный анализ и оценку данных, представленных заявителем, содержащих сравнение химического состава ГМО и его традиционного аналога (композиционная эквивалентность), результаты токсикологических, аллергологических и других исследований, результаты пострегистрационного мониторинга в стране-заявителе и других странах;

• экспертную оценку методов обнаружения, идентификации и количественного определения ГМО;

• медико-генетическую оценку ГМО;

• оценку функционально-технологических свойств ГМО;

• медико-биологическую оценку безопасности ГМО.

2.3. В случае если ГМО с комбинированными признаками получен гибридизационным методом и исходные ГМ-линии имеют свидетельства о государственной регистрации на территории Таможенного Союза, оценка его безопасности проводится в соответствии с разделами III—IV данных Методических указаний и включает в себя следующие этапы:

• экспертный анализ и оценку данных, представленных заявителем или представленных на этапе регистрации исходных ГМ-линий (для ГМО, полученных гибридизационным методом, в случае, если все исходные ГМ-линии имеют свидетельства о государственной регистрации на территории Таможенного Союза), включающих: сравнение химического состава исходных ГМ-линий с химическим составом их традиционных аналогов (композиционная эквивалентность), результаты токсикологических, аллергологических и других исследований, результаты пострегистрационного мониторинга, осуществляемого в странах, где ГМО с комбинированными признаками был зарегистрирован ранее, в случае, если в процессе мониторинга были получены данные о незаданных эффектах генетической модификации;

• экспертная оценка методов обнаружения, идентификации и количественного определения ГМО;

• подтверждение соответствия показателей качества и безопасности ГМО (содержание токсичных элементов, микотоксинов, радионуклидов, пестицидов и др.) требованиям Технических регламентов Таможенного Союза (ТР ТС 021/2011 «О безопасности пищевой продукции» и/или соответствующих Технических регламентов, устанавливающих обязательные требования к отдельным видам пищевой продукции);

• заключение о результатах оценки безопасности ГМО с комбинированными признаками, оформленное в виде отчета в соответствии с требованиями Межгосударственного стандарта ГОСТ 7.32—2001. При формировании отчета должны быть соблюдены требования к конфиденциальности информации, предоставленной на этапе регистрации исходных ГМ-линий.

2.4. Регистрация ГМО с комбинированными признаками, полученного методом гибридизации трех и более линий, уже зарегистрированных на территории Таможенного союза, означает регистрацию и всех возможных комбинаций этих линий, сформировавшихся в результате генетической сегрегации (расщепления признаков в поколениях F1 и выше, в соответствии с законами Менделя).

2.5. В случае если ГМО с комбинированными признаками получен гибридизационным методом и одна или несколько исходных ГМ-линий не имеют свидетельства о государственной регистрации на территории Таможенного Союза, оценка безопасности такого ГМО проводится в полном объеме, в соответствии с п. 2.2 данных Методических указаний.

2.6. Для проведения исследований, предусмотренных п. 2.2 и 2.3 настоящих Методических указаний, заявитель представляет в аккредитованную лабораторию образцы ГМО и их традиционных аналогов в количестве, достаточном для выполнения полного объема исследований.

III. Экспертный анализ и оценка данных, характеризующих ГМО с комбинированными признаками

3.1. Общая характеристика ГМО с комбинированными признаками включает экспертный анализ данных, представленных заявителем или представленных на этапе регистрации исходных ГМ-линий (для ГМО, полученных гибридизационным методом, в случае, если все исходные ГМ-линии имеют свидетельства о государственной регистрации на территории Таможенного Союза), включающих:

• информацию, позволяющую идентифицировать ГМО (вид, сорт, событие, исходные ГМ-линии, характеристика отличий от немодифицированного организма);

• информацию об исходном организме (таксономическая характеристика, описание способа размножения и распространения, данные о токсических, аллергенных и других неблагоприятных свойствах);

• информацию об организмах-донорах вносимых генов (таксономическая характеристика, история использования);

• информацию о методах генетических модификаций и способах получения ГМО и исходных ГМ-линий (описание методов модификаций, структур векторов, структур вставок);

• информацию о ГМО и исходных ГМ-линиях (описание свойств, приобретенных растениями в результате модификаций, описание структур встроенных генетических конструкций и мест их локализации, характеристику экспрессии встроенных генов (экспрессия в процессе онтогенеза растения, экспрессия в структурных компонентах растения и др.);

• информацию о потенциально возможном взаимодействии встроенных генетических элементов и белков-продуктов генов (при наличии такой информации), а также результатах их взаимодействия.

3.1.1. Для ГМО, полученных молекулярным, трансформационным или гибридизационным (если одна или несколько исходных ГМ-линий не имеют свидетельства о государственной регистрации на территории Таможенного Союза) методами, дополнительно должны быть проанализированы данные о генетической и фенотипической стабильности (должны быть представлены данные, полученные в результате исследований нескольких поколений ГМО).

3.2. Оценка композиционной эквивалентности проводится на основании информации о результатах сравнения химического состава ГМО с химическим составом его традиционного аналога, представленной заявителем. Для ГМО, полученных гибридизационным методом (если все исходные ГМ-линии имеют свидетельства о государственной регистрации на территории Таможенного Союза), оценка композиционной эквивалентности производится на основании информации о результатах сравнения химического состава исходных ГМ-линий с химическим составом их традиционных аналогов, представленной на этапе регистрации исходных ГМ-линий.

3.2.1. Оценка композиционной эквивалентности проводится по следующим параметрам:

• содержание белка;

• аминокислотный состав;

• содержание жира;

• жирнокислотный состав;
• содержание углеводов;
• содержание макро- и микроэлементов;
• содержание биологически активных веществ;
• содержание аллергенов, характерных для исходного вида (сорта);
• содержание антропогенных и природных контаминантов (токсичных элементов, микотоксинов, пестицидов, радионуклидов, вредных примесей и др.);
• содержание антинутриентов и других веществ, характерных для растительных организмов исходного вида (сорта).

3.2.2. Перечень показателей варьируется в зависимости от свойств изучаемого растительного организма.

3.2.3. Оценка композиционной эквивалентности ГМО и его традиционного аналога проводится с учетом биологических колебаний значений показателей, характерных для растений данного вида, и справочных данных о химическом составе исходного вида (сорта) растения.

3.2.4. В случае если целью генетической модификации является изменение нутриентного состава растения или его частей (листьев, плодов и др.), этот фактор необходимо учитывать при оценке композиционной эквивалентности.

3.3. Анализ результатов токсикологических исследований проводится на основании сведений, представленных заявителем или представленных на этапе регистрации исходных ГМ-линий (для ГМО, полученных гибридизационным методом, в случае, если все исходные ГМ-линии имеют свидетельства о государственной регистрации на территории Таможенного Союза), включающих:

• результаты оценки безопасности белков, определяющих проявление заданных признаков ГМО (молекулярная и биохимическая характеристика белков; наличие или отсутствие гомологии с токсинами белковой природы, а также с белками, обладающими фармакологической или иной биологической активностью (при использовании баз данных PIR, EMBL, SwissProt, GenBank и др.); изучение стабильности белков при обработке, хранении, технологической переработке; влияние температуры и pH, возможные модификации и/или образование стабильных белковых фрагментов в результате различных воздействий; устойчивость белков к обработке протеолитическими ферментами в эксперименте *in vitro*; исследования острой пероральной токсичности белков в эксперименте на грызунах и др.);

• результаты оценки безопасности нативного продукта (данные 90-дневных исследований на грызунах, данные исследований на молодых быстро растущих животных (цыплятах-бройлерах, ягнятах и др.) в случае, если такие исследования проводились;

• результаты других токсикологических исследований.

3.4. Анализ результатов аллергологических исследований проводится на основании сведений, представленных заявителем или представленных на этапе регистрации исходных ГМ-линий (для ГМО, полученных гибридизационным методом, в случае, если все исходные ГМ-линии имеют свидетельства о государственной регистрации на территории Таможенного Союза), включающих:

• результаты оценки аллергенных свойств белков, определяющих проявление заданных признаков ГМО (сравнение с известными аллергенами с использованием баз данных, содержащих информацию о трехмерной структуре и функции известных аллергенов и родственных им белков); определение потенциальной аллергенности белков в иммунохимических исследованиях *in vitro* с использованием IgE, выделенных из сыворотки крови пациентов, страдающих аллергией; определение устойчивости к воздействию протеолитических ферментов (пепсина и др.); скрининговые исследования с использованием сывороток крови пациентов, страдающих аллергией; дополнительные исследования (в том числе *in vivo*);

• результаты аллергологических исследований нативного продукта (сравнение набора аллергенов исследуемого ГМО с набором аллергенов его традиционного аналога и др.) в случае, если такие исследования проводились;

• результаты других аллергологических исследований.

3.5. Анализ результатов других исследований (в случае, если такие исследования были выполнены) проводится на основании сведений, представленных заявителем, или представленных на этапе регистрации исходных ГМ-линий, включая результаты применения новейших аналитических методов, таких как профильные технологии и др.

3.6. Анализ результатов пострегистрационного мониторинга, осуществляемого в странах, где ГМО был зарегистрирован ранее, проводится в случае, если в процессе мониторинга были получены данные о незаданных эффектах генетической модификации.

3.7. Анализ научных данных о ГМО с комбинированными признаками, представленных в научной литературе за весь период его использования; анализ научных данных об исходных ГМ-линиях за период, прошедший после их первичной регистрации.

IV. Методы обнаружения, идентификации и количественного определения ГМО с комбинированными признаками в пищевых продуктах

4.1. Основным методом, используемым для обнаружения, идентификации и количественного определения ГМО, является полимеразная цепная реакция (ПЦР) и ее модификации. Также для обнаружения ГМО в пищевых продуктах и продовольственном сырье, не подвергавшихся технологической переработке, могут быть использованы иммунологические методы детекции специфичных для ГМО белков.

4.2. Экспертная оценка методов идентификации ГМО с комбинированными признаками направлена на подтверждение их адекватности инструментальной и методической базе, используемой в учреждениях Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека для контроля за обращением ГМО и маркировкой пищевых продуктов, содержащих ГМО.

4.3. Экспертная оценка методов обнаружения, идентификации и количественного определения ГМО с комбинированными признаками в пищевых продуктах проводится на основании сведений, представленных заявителем, включающих:

- метод идентификации одного или нескольких трансформационных событий (событие-специфичные тест-системы);
- метод количественного определения одного или нескольких трансформационных событий (событие-специфичные тест-системы);
- протоколы проведения анализов;
- описание праймеров, ДНК-зондов и других необходимых реактивов;
- стандартные образцы состава и свойств.

4.4. Экспертная оценка методов обнаружения, идентификации и количественного определения ГМО, полученных гибридизационным методом (если все исходные ГМ-линии имеют свидетельства о государственной регистрации на территории Таможенного Союза) производится только в случае, если методы обнаружения, идентификации и количественного определения зарегистрированных исходных ГМ-линий с момента их регистрации были модифицированы, усовершенствованы или разработаны вновь.

4.4.1. Идентификация ГМО с комбинированными признаками, полученных гибридизационным методом, сложна по сравнению с идентификацией ГМО, полученных молекулярным и трансформационным методами, поскольку вставки рекомбинантной ДНК и их локализация в геноме гибридизационного события идентичны исходным ГМ-линиям.

Результаты ПЦР-анализа таких ГМО укажут на присутствие в образце родительских линий ГМО, как если бы образец содержал их смесь, что делает возможной идентификацию ГМО, полученных гибридизационным методом, только на основании экспертизы документации.

V. Медико-генетическая оценка ГМО с комбинированными признаками

5.1. Медико-генетическая оценка ГМО с комбинированными признаками включает проверку присутствия всех заявленных генетических конструкций методом ПЦР.

5.2. Медико-генетические исследования проводятся на основании сведений, представленных заявителем, включающих:

- описание молекулярной структуры всех заявленных генетических конструкций (нуклеотидная последовательность);
- метод идентификации и количественного определения одного или нескольких трансформационных событий;
- протокол проведения анализа;
- описание праймеров, ДНК-зондов и других необходимых реактивов;
- стандартные образцы состава и свойств.

5.3. Заключение о результатах медико-генетической оценки ГМО с комбинированными признаками оформляется в виде отчета в соответствии с требованиями Межгосударственного стандарта ГОСТ 7.32—2001.

VI. Оценка функционально-технологических свойств ГМО с комбинированными признаками

6.1. Перечень и объем исследований по разделу VI определяются экспертными (учеными) советами соответствующих аккредитованных испытательных центров Российской Федерации на основании анализа представленных материалов, индивидуально для каждого вида исследуемых продуктов.

6.2. Проводится сравнение функционально-технологических свойств ГМО со свойствами его традиционного аналога. Для ГМО, полученного гибридизационным методом, проводится сравнение его функционально-технологических свойств со свойствами традиционных аналогов исходных ГМ-линий.

6.3. Изучаемые функционально-технологические свойства (в соответствии со стандартами на конкретный вид исследуемых продуктов):

- сравнительная органолептическая оценка;
- сравнительная характеристика реологических свойств исследуемого продукта и/или его отдельных фракций;

• сравнительная оценка физико-химических свойств исследуемого продукта и/или его отдельных фракций.

6.4. Заключение о результатах оценки функционально-технологических свойств ГМО с комбинированными признаками оформляется в виде отчета в соответствии с требованиями Межгосударственного стандарта ГОСТ 7.32—2001.

VII. Медико-биологическая оценка безопасности ГМО с комбинированными признаками

7.1. Перечень и объем исследований по разделу VII определяются экспертными (учеными) советами соответствующих аккредитованных испытательных центров Российской Федерации на основании анализа представленных материалов.

7.2. Гигиенические исследования ГМО с комбинированными признаками включают определение показателей качества и безопасности:

7.2.1. Перечень показателей безопасности формируется на основании требований Технических регламентов Таможенного Союза (ТР ТС 021/2011 «О безопасности пищевой продукции» и/или соответствующих Технических регламентов, устанавливающих обязательные требования к отдельным видам пищевой продукции).

Изучаемые показатели:

• содержание токсичных элементов;

• содержание микотоксинов;

• содержание пестицидов;

• содержание радионуклидов;

• содержание вредных примесей;

• микробиологические показатели;

• другие показатели (в случае необходимости).

7.2.2. Перечень показателей качества формируется на основании свойств соответствующего растительного организма, а также анализа представленных заявителем материалов. В случае если заявителем представлены исчерпывающие данные по оценке композиционной эквивалентности ГМО (содержание белка, аминокислотный состав, содержание жира, жирнокислотный состав, углеводный состав, содержание витаминов, макро- и микроэлементов, специфических компонентов, биологически активных веществ, антинутриентов и других веществ, характерных для растений данного вида), исследования могут быть ограничены определением влажности, золы, содержания белка, жира, углеводов, пищевых волокон.

7.2.3. В случае если генетическая модификация направлена на изменение химического состава ГМО с комбинированными признаками, должны быть проведены исследования, подтверждающие заявленные изменения.

7.3. Изучение репродуктивной токсичности и токсичности ГМО с комбинированными признаками проводится в эксперименте на крысах линии Вистар. Токсикологические исследования включают изучение репродуктивной функции крыс поколения F_0, пре- и постнатальное развитие потомства поколения F_1, а также оценку физиолого-биохимических показателей крыс поколения F_0 (на основании данных о динамике массы тела, об абсолютной и относительной массе внутренних органов; данных гематологических, морфологических и биохимических исследований, состояния антиоксидантного статуса и функционального состояния систем, осуществляющих защиту организма от воздействия токсичных соединений экзо- и эндогенного происхождения).

7.3.1. Схема проведения эксперимента.

Вид животных	Крысы линии Вистар
Пол	Самцы, самки
Возраст	25—30 дней
Исходная масса тела	70—80 г
Количество животных в группе в начале эксперимента	Не менее 80 особей в каждой группе: 55 ♀, 25 ♂ Все животные должны быть выбраны из пометов со сходной численностью и выживаемостью потомства. При невозможности такой стандартизации количество животных в группах должно быть увеличено не менее чем в 2 раза: 110 ♀, 50 ♂
Распределение по группам	Животных делят на 2 группы: группа «контроль» получает рацион с включением традиционного аналога исследуемого ГМО; группа «опыт» получает рацион с включением исследуемого ГМО
Рацион	Пищевая и биологическая ценность рациона полностью удовлетворяет физиологические потребности животных
Карантин	Не менее 7 дней
Условия содержания	Животные получают свободный доступ к корму и воде; содержатся в отапливаемом, вентилируемом помещении
Отбор материала для гематологических, биохимических, морфологических исследований	У самцов поколения F_0 не ранее чем на 100-й день эксперимента. Количество животных, взятых на исследование, должно составлять не менее 20 на группу

7.3.2. На протяжении эксперимента животные получают полусинтетический казеиновый рацион (ПКР). Исследуемый ГМО и его традиционный аналог включают в состав корма в максимально возможном количестве, не нарушающем баланс основных пищевых веществ. Замена ингредиентов рациона должна быть проведена с учетом содержания белков, жиров и углеводов во вводимом продукте при соблюдении принципа изокалорийности.

Продуктовый набор и химический состав базового ПКР представлены в табл. 1—2.

7.3.2.1. В случае исследования ГМО, полученного гибридизационным методом, в рационе лабораторных животных в качестве традиционного аналога используется смесь традиционных аналогов исходных ГМ-линий.

Таблица 1

Состав базового полусинтетического казеинового рациона

Ингредиенты	Кол-во, г	Белок, г	Жиры, г	Углеводы, г	Калорийность	
					ккал	%
Казеин	23,949	20,21	0,36	–	84,08	23,46
Крахмал маисовый	59,0	0,59	–	51,07	206,64	57,65
Масло подсолнечное нерафинированное	5,0	–	4,99	–	44,91	12,53
Лярд	2,0	–	1,99	–	17,91	5,00
Солевая смесь[1]	3,5	–	–	–	–	–
Смесь в/р витаминов[2]	1,0	–	–	1,0	4,00	1,11
Смесь ж/р витаминов[3]	0,1	–	0,1	–	0,9	0,25
L-цистеин	0,2	–	–	–	–	–
Холин	0,25	–	–	–	–	–
Трет-бутилгидрохинон	0,001	–	–	–	–	–
Микрокристаллическая целлюлоза	5,0	–	–	–	–	–
ИТОГО	100,0	20,80	7,44	52,07	358,44	100

[1] состав солевой смеси представлен в табл. 2.
[2] 1 г содержит: тиамина (B1) – 0,6 мг, рибофлавина (B2) – 0,6 мг, пиридоксина (B6) – 0,7 мг, никотиновой кислоты – 3,0 мг, пантотената кальция – 1,6 мг, фолиевой кислоты – 0,2 мг, биотина – 0,02 мг, цианокобаламина (B12) – 0,0025 мг, викасола – 0,075 мг, L-метионина – 50 мг, глюкозы – до 1 г.
[3] 0,1 мл содержит: ретинола ацетата – 400 МЕ, эргокальциферола – 100 МЕ, α-токоферола ацетата – 7,5 мг, подсолнечного масла – до 0,1 мл

Таблица 2

Состав солевой смеси

№	Название соли	Химическая формула	Количество, г
1	Кальций углекислый	$CaCO_3$	357,00
2	Калий фосфорнокислый, одно-замещенный	KH_2PO_4	196,00
3	Калий сернокислый	K_2SO_4	46,60
4	Калий лимоннокислый, моно-гидрат	$HOC(COOK)(CH_2COOK)_2 \times H_2O$	70,78
5	Натрий хлористый	NaCl	74,00
6	Магния окись	MgO	24,00
7	Железо лимоннокислое	$C_6H_5FeO_7$	6,06
8	Цинк углекислый	ZnCO3	1,65
9	Марганец углекислый	$MnCO_3$	0,63
10	Медь углекислая	$CuCO_3 \times Cu(OH)_2$	0,30
11	Калия йодат	KIO_3	0,01
12	Натрия селенат	Na_2SeO_4	0,01025
13	Парамолибдат аммония	$(NH_4)_6Mo_7O_{24}\times 4H_2O$	0,00795
14	Натрия метасиликат	$Na_2O_3Si \times 9H_2O$	1,45
15	Хромовокалиевые квасцы	$CrK(SO_4)_2 \times 12H_2O$	0,275
16	Борная кислота	H_3BO_3	0,0815
17	Натрий фтористый	NaF	0,0635
18	Никель углекислый	$2NiCO_3{\cdot}3Ni(OH)_2 \times 4H_2O$	0,0318
19	Аммоний ванадиевокислый	NH_4VO_3	0,0066
20	Сахароза	$C_{12}H_{22}O_{11}$	221,0434
	ИТОГО		1000

7.3.3. Исследуемые показатели.

7.3.3.1. Интегральные показатели.

Изучаемые показатели	Сроки и периодичность сбора данных
1	2
Общее состояние животных (внешний вид, двигательная активность, состояние шерстного покрова)	ежедневно
Поедаемость корма	ежедневно
Масса тела	каждые 7 дней
Масса тела самок во время беременности	С 1-го по 20-й дни беременности – у самок, предназначенных для изучения пренатального развития потомства – каждые 5 дней

Продолжение

1	2
	С 1-го дня беременности до момента родов – у самок, предназначенных для изучения постнатального развития потомства – каждые 5 дней
Масса внутренних органов (головной мозг, сердце, селезенка, легкие, тимус, гипофиз, печень, почки, простата, надпочечники, семенники) у самцов поколения F_0	Не ранее чем на 100-й день эксперимента. Количество самцов, взятых на исследование, должно составлять не менее 20 на группу
Масса внутренних органов (головной мозг, сердце, селезенка, легкие, тимус, гипофиз, печень, почки, надпочечники, яичники) у беременных самок поколения F_0 – на 20-й день беременности	Количество самок, взятых на исследование, должно составлять не менее 15 на группу

7.3.3.2. Репродуктивную функцию оценивают по генеративной и эндокринной функции гонад родительских животных поколения F_0, пренатальному и постнатальному развитию потомства поколения F_1.

Показатели, характеризующие генеративную функцию.

Изучаемые показатели [1, 2]	Сроки сбора данных
1	2
Эффективность спаривания самцов и самок. Оценивают по способности к оплодотворению самок и самцов, выраженную в процентном соотношении забеременевших самок/оплодотворивших самцов к общему количеству ссаженных самок/самцов. Для получения потомства F_1 самок F_0 ссаживают с самцами F_0 в соотношении 2 : 1 не менее чем на 7 дней	В период ссаживания половозрелых крыс поколения F_0 (возраст не менее 100 дней) с целью получения потомства F_1 для оценки постнатального развития. Количество самок, взятых на исследование, должно составлять не менее 30 на группу
Эндокринная функция яичников и семенников. Оценивают по содержанию эстрадиола, прогестерона и тестостерона в сыворотке крови	У беременных самок поколения F_0 – на 20-й день беременности. Количество самок, взятых на исследование, должно составлять не менее 15 на группу. У самцов поколения F_0 не ранее чем на 100-й день эксперимента. Количество самцов, взятых на исследование, должно составлять не менее 15 на группу
Дополнительные исследования	
Спермограмма. Оценивают макроскопические параметры эякулята – pH, объем спермы, цвет, время разжижения и вязкость эякулята, а также характеристики клеточных элементов спермы – количество, подвижность, жизнеспособность, морфологию сперматозоидов, количество и типы лейкоцитов, количество и типы незрелых клеток сперматогенеза и пр.	У половозрелых самцов поколения F_0 или F_1 (возраст не менее 100 дней). Количество самцов, взятых на исследование, должно составлять не менее 15 на группу

Продолжение

1	2
Морфологические исследования семенников (определяют индекс сперматогенеза, среднее количество нормальных сперматогоний в каждом канальце, относительное количество канальцев с 12-й стадией мейоза)	У самцов поколения F_0 не ранее чем на 100-й день эксперимента. Количество самцов, взятых на исследование, должно составлять не менее 20 на группу
Морфологические исследования яичников (примордиальные фолликулы, фолликулы с двумя и более слоями фолликулярных клеток, третичные фолликулы, атретические тела, желтые тела, общее количество генеративных форм)	У беременных самок поколения F_0 – на 20-й день беременности. Количество самок, взятых на исследование, должно составлять не менее 15 на группу

Показатели, характеризующие пренатальное развитие потомства.

Изучаемые показатели	Сроки сбора данных
Эвтаназия и вскрытие не менее 15 беременных самок на группу	20-й день беременности
Визуальное исследование матки, плаценты, плодов: выявление живых и мертвых плодов, подсчет количества желтых тел, мест имплантации, количество резорбций по правому и левому рогу матки (с последующим вычислением пред- и постимплантационной гибели)	
Оценка развития плодов: макроскопический осмотр, определение массы и краниокаудального размера плодов. После осмотра, измерения и взвешивания плоды каждого помета необходимо разделить на три равные группы: одна группа предназначена для вскрытия, выделения и взвешивания внутренних органов (печени, почек, сердца, легких); плоды второй группы фиксируют в жидкости Буэна и используют для изучения внутренних органов по методу Wilson J.G.; плоды третьей группы фиксируют в 96° этаноле и используют для изучения состояния скелета по методу Dawson A.B.	

Показатели, характеризующие постнатальное развитие потомства.

Изучаемые показатели	Сроки сбора данных
1	2
Контроль рождения потомства	Самки поколения F_0, 22—25-й дни беременности
Определение средней величины помета, подсчет количества живых и мертвых крысят, подсчет особей разного пола, выявление внешних уродств	1-й день жизни крысят поколения F_1
Измерение массы тела и роста (краниокаудального размера) крысят поколения F_1	2, 5, 10, 15, 20 и 25 дни жизни крысят поколения F_1
Учет показателей физиологического развития крысят: срок отлипания ушных раковин, появление первичного волосяного покрова, прорезывание резцов, открытие глаз, опускание семенников, открытие влагалища	1—35 дни жизни крысят поколения F_1

Продолжение

1	2
Вычисление выживаемости потомства с 1-го по 5-й день жизни (отношение числа крысят, доживших до 5-го дня, к числу родившихся живыми) и с 6-го по 25-й день жизни (отношение числа крысят, доживших до 25-го дня, к числу доживших до 6-го дня), выраженное в процентах.	1—25 дни жизни крысят поколения F_1
Определение соотношения самцов и самок в пометах	1—10 дни жизни крысят поколения F_1

7.3.3.2.1. Раздел отчета по результатам оценки репродуктивной функции крыс должен включать цифровые данные в форме таблиц, содержащих основные сведения, необходимые для суждения о наличии или отсутствии у исследуемого ГМО неблагоприятного действия на репродуктивную функцию и развитие потомства.

7.3.3.3. Физиолого-биохимические показатели состояния здоровья крыс поколения F_0 оценивают на основании данных о динамике массы тела, об абсолютной и относительной массе внутренних органов; данных гематологических, морфологических и биохимических исследований, состояния антиоксидантного статуса и функционального состояния систем, осуществляющих защиту организма от воздействия токсичных соединений экзо- и эндогенного происхождения.

7.3.3.3.1. Общий клинический анализ крови.

Изучаемые показатели	Сроки отбора материала
– Концентрация гемоглобина; – Гематокрит; – Общее количество эритроцитов; – Средний объем эритроцита; – Среднее содержание гемоглобина в эритроците; – Средняя концентрация гемоглобина в эритроците (СКЭ); – Общее количество тромбоцитов; – Тромбокрит; – Средний объем тромбоцита; – Общее количество лейкоцитов; – Дифференцированный подсчет лейкоцитарной формулы (нейтрофилы, лимфоциты, эозинофилы, моноциты, базофилы)	У самцов поколения F_0 не ранее чем на 100-й день эксперимента. Количество самцов, взятых на исследование, должно составлять не менее 20 на группу

7.3.3.3.2. Общий биохимический анализ сыворотки крови

Изучаемые показатели	Сроки отбора материала
– Общий белок; – Альбумин; – Глобулин; – Триглицериды; – Общий билирубин; – Прямой билирубин; – Мочевина; – Мочевая кислота; – Креатинин; – Глюкоза; – Холестерин; – Лактатдегидрогеназа; – Альфа-амилаза; – Креатинфосфокиназа; – Щелочная фосфатаза; – Аланинаминотрансфераза; – Аспартатаминотрансфераза; – Кальций; – Магний; – Железо; – Натрий; – Калий; – Фосфор; – Хлор	У самцов поколения F_0 не ранее чем на 100-й день эксперимента. Количсство самцов, взятых на исследование, должно составлять не менее 20 на группу

7.3.3.3.3. Общий и биохимический анализ мочи.

Изучаемые показатели	Сроки отбора материала
– Суточный диурез; – Цвет и прозрачность; – Относительная плотность; – pH; – Белок; – Глюкоза; – Креатинин; – Мочевина; – Мочевая кислота; – Кальций; – Магний; – Фосфор	У самцов поколения F_0 не ранее чем на 100-й день эксперимента. Количество самцов, взятых на исследование, должно составлять не менее 20 на группу

7.3.3.3.4. Системные биомаркеры.

Система антиоксидантной защиты.

Изучаемые показатели	Сроки отбора материала
Активность ферментов антиоксидантной защиты. Материал для исследований: эритроциты [3—8] – Глутатионредуктаза; – Глутатионпероксидаза; – Супероксиддисмутаза; – Каталаза	У самцов поколения F_0 не ранее чем на 100-й день эксперимента. Количество самцов, взятых на исследование, должно составлять не менее 20 на группу
Содержание продуктов перекисного окисления липидов. Материал для исследований: кровь, печень [9—11] – Малоновый диальдегид	

Система ферментов метаболизма ксенобиотиков.

Изучаемые показатели	Сроки отбора материала
Активность ферментов 1-й и 2-й фазы метаболизма ксенобиотиков [12—16] *Материал для исследований: печень* – Общее содержание цитохрома Р-450; – Этоксирезоруфиндеалкилаза; – Пентоксирезоруфиндеалкилаза; – УДФ-глюкуронозилтрансфераза; – ХДНБ-глутатионтрансфераза	У самцов поколения F_0 не ранее чем на 100-й день эксперимента. Количество самцов, взятых на исследование, должно составлять не менее 10 на группу

Стабильность мембран лизосом.

Изучаемые показатели	Сроки отбора материала
Общая и неседиментируемая активность ферментов лизосом [17] *Материал для исследований: печень* – β-Галактозидаза; – β-Глюкуронидаза; – Арилсульфатазы А и В	У самцов поколения F_0 не ранее чем на 100-й день эксперимента. Количество самцов, взятых на исследование, должно составлять не менее 20 на группу

Интенсивность процессов апоптоза.

Изучаемые показатели	Сроки отбора материала
Щелочной гель-электрофорез изолированных клеток (метод «ДНК-комет») *Материал для исследований: печень, тимус, почки* – Индекс апоптоза; – Степень фрагментации ДНК	У самцов поколения F_0 не ранее чем на 100-й день эксперимента. Количество самцов, взятых на исследование, должно составлять не менее 20 на группу

7.3.3.3.5. Морфологические исследования

Исследуемые органы	Методы исследований [18—28]
Головной мозг; Гипофиз; Сердце; Тимус; Легкие; Печень; Селезенка; Почки; Надпочечники; ЖКТ: желудок, тонкая и толстая кишки; Яичники; Семенники; Простата	*Отбор материала у самцов поколения F_0 не ранее чем на 100-й день эксперимента. Количество самцов, взятых на исследование, должно составлять не менее 20 на группу.* 1. Макроскопические исследования 2. Микроскопические исследования: а) обзорные гистологические исследования 3. Морфометрический анализ
	Вскрытие погибших в течение эксперимента животных (внеплановый отбор) 1. Макроскопические исследования 2. Микроскопические исследования (перечень исследуемых органов может быть сокращен до минимально необходимого для установления причины смерти): а) обзорные гистологические исследования.
	Дополнительные исследования 1. Микроскопические исследования: а) гистохимические исследования; б) иммуногистохимические исследования клеточных популяций и их производных. 2. Электронно-микроскопические исследования

7.3.3.3.6. Другие исследования.

7.4. Иммунологические исследования ГМО проводятся в эксперименте на мышах линий СВА и С57Bl/6 и включают изучение его иммуномодулирующих и сенсибилизирующих свойств по четырем тестам:

• действие на гуморальное звено иммунитета – в тесте определения уровня гемагглютининов к эритроцитам барана;

• действие на клеточное звено иммунитета – в реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) к эритроцитам барана;

• действие как сенсибилизирующего агента – в тесте чувствительности к гистамину;

• действие на естественную резистентность мышей к *Salmonella typhimurium* (сальмонеллы мышиного тифа).

В табл. 3 представлены сравнительные характеристики мышей линий СВА и С57Bl/6.

Таблица 3

Характеристики мышей линий СВА и С57Bl/6

Действующий фактор	Линия мышей	
	СВА	С57Bl/6
Эритроциты барана	высокочувствительны	низкочувствительны
Гистамин	не чувствительны	чувствительны
Salmonella typhimurium	не чувствительны	чувствительны

7.4.1. Схема проведения эксперимента.

Вид животных	Мыши линий СВА и С57Bl/6
Пол	самцы
Возраст	половозрелые
Исходная масса тела	18—20 г
Количество животных в группе в начале эксперимента	Не менее 120 мышей линий СВА в каждой группе Не менее 120 мышей линий С57Bl/6 в каждой группе
Распределение по группам	Животных каждой линии делят на 2 группы: Группа «контроль» получает рацион с включением традиционного аналога исследуемого ГМО; Группа «опыт» получает рацион с включением исследуемого ГМО
Рацион*	Пищевая и биологическая ценность рациона полностью удовлетворяет физиологические потребности животных
Карантин	не менее 7 дней
Условия содержания	Животные получают свободный доступ к корму и воде; содержатся в отапливаемом, вентилируемом помещении.
* состав базового рациона приведен в п. 7.3.2	

Исследования начинают через 21 день с момента перевода мышей на экспериментальные рационы. В течение эксперимента проводят наблюдения за поедаемостью корма и общим состоянием животных.

7.4.2. Исследуемые показатели.

7.4.2.1. Влияние ГМО на гуморальный иммунный ответ оценивают на основании титров антител после иммунизации эритроцитами барана мышей высокоотвечающей (СВА) и низкоотвечающей (C57BL/6) линий. Для иммунизации животных следует использовать минимальные дозы (5×10^6) антигена.

Через 21 день эксперимента мышам контрольной (не менее 45 животных) и опытной (не менее 45 животных) групп обеих линий внутрибрюшинно вводят 0,5 мл эритроцитов барана (10 млн клеток/мл). Отбор крови для исследований проводят на 7-й, 10-й и 14-й день после введения эритроцитов барана. Сыворотку крови титруют общепринятым методом в реакции гемагглютинации [17]. Реакция основана на способности антител, содержащихся в сыворотке крови иммунизированных животных, склеивать (агглютинировать) эритроциты барана. В 96-луночных плоскодонных планшетах готовят двукратные разведения иссле-

дуемой сыворотки в объеме 0,5 мл, начиная с разведения 1 : 10. В контрольную лунку вносят 0,5 мл физиологического раствора. Ко всем лункам добавляют 0,5 мл 1 % эритроцитов барана. Учет реакции ведется после инкубации планшетов в термостате в течение 2 ч при 37 °С. При положительном результате эритроциты оседают на дне лунки планшета в виде зонтика, при отрицательном – в виде пуговки. За титр принимают то последнее разведение исследуемой сыворотки, при которой еще наблюдается положительный результат. Контрольная лунка должна быть отрицательной. Полученные данные обрабатывают методами вариационной статистики с использованием t-критерия Стьюдента. Результаты приводятся в виде $M \pm m$, где M – выборочное среднее измеряемых величин, m – стандартная ошибка.

7.4.2.2. Влияние ГМО на клеточный иммунный ответ оценивают на основании реакции гиперчувствительности замедленного типа. При выполнении теста антиген вводят двукратно: для сенсибилизации и для разрешения.

Через 21 день эксперимента мышам контрольной (не менее 15 животных) и опытной (не менее 15 животных) групп обеих линий подкожно в межлопаточную область вводят 0,5 мл эритроцитов барана (20 млн клеток/мл). Через пять дней всем мышам в подушечку одной задней лапы вводят разрешающую дозу эритроцитов барана – 0,02 мл (100 млн клеток/мышь); в контрлатеральную лапу – 0,02 мл 0,95 %-го раствора хлорида натрия. Местную воспалительную реакцию оценивают через 18—20 часов путем определения массы опытной и контрольной лапок. Интенсивность местной реакции определяют по индексу реакции (ИР) [17].

7.4.2.3. Действие ГМО как сенсибилизирующего агента оценивают в тесте чувствительности к гистамину.

Через 21 день эксперимента мышам контрольной (не менее 15 животных) и опытной (не менее 15 животных) групп обеих линий внутрибрюшинно вводят гистамин гидрохлорид (2,5 мг/мышь в 0,5 мл физиологического раствора). Реакцию учитывают через 24 часа по проценту гибели мышей [34].

7.4.2.4. Влияние ГМО на естественную резистентность мышей к *S. typhimurium* оценивают на модели внутрибрюшинного заражения мышей десятикратно отличающимися дозами *S. typhimurium* штамм 415. Через 21 день эксперимента мышей контрольной (не менее 45 животных) и опытной (не менее 45 животных) групп обеих линий заражают тремя дозами культуры: 1 000, 100, 10 микробных клеток/мышь. После заражения за животными наблюдают в течение 21 дня. Вычисляют $ЛД_{50}$,

а также процент гибели животных по каждой дозе, затем проводят сравнительный анализ результатов [18].

7.5. Аллергологические исследования ГМО с комбинированными признаками проводятся в эксперименте на лабораторных животных: потенциальную аллергенность оценивают, определяя тяжесть протекания системной анафилаксии и уровень циркулирующих сенсибилизирующих антител (субклассов IgG1 + IgG4) у крыс, получающих в составе рациона исследуемый ГМО (группа «опыт») и его традиционный аналог (группа «контроль»). В случае исследования ГМО, полученных гибридизационным методом, в рационе лабораторных животных в качестве традиционного аналога используется смесь традиционных аналогов исходных ГМ-линий. Метод основан на количественной сравнительной оценке тяжести реакции системной анафилаксии, возникающей при внутрибрюшинной (в/б) сенсибилизации взрослых крыс пищевым антигеном – овальбумином куриного яйца (OBA) с последующим внутривенным (в/в) введением сенсибилизированным животным разрешающей дозы того же белка [35].

7.5.1. Схема проведения эксперимента

Вид животных	Крысы линии Вистар
Пол	Самцы
Возраст	Половозрелые
Исходная масса тела	150—180 г
Количество животных в группе в начале эксперимента	Не менее 25 особей в каждой группе
Распределение по группам	Животных делят на 2 группы: группа «контроль» получает рацион с включением традиционного аналога исследуемого ГМО; группа «опыт» получает рацион с включением исследуемого ГМО
Рацион (состав базового рациона представлен в табл. 4)	Пищевая и биологическая ценность рациона полностью удовлетворяет физиологические потребности животных. Рацион не содержит яичного белка
Карантин	Не менее 7-ми дней
Условия содержания	Животные получают свободный доступ к корму и воде; содержатся в отапливаемом, вентилируемом помещении
Продолжительность эксперимента	29 дней
Отбор материала для исследований	На 29-й день эксперимента

Таблица 4

Стандартный рацион вивария

Ингредиент	Масса, г на 1 крысу в день
Крупа овсяная	2,5
Зерновая смесь	14,0
Хлеб 2 сорт	4,0
Творог	2,0
Рыбная мука	0,5
Мясо 2 категория	4,0
Морковь	8,0
Зелень	8,0
Рыбий жир	0,1
Дрожжи	0,1
NaCl	0,15
Основные нутриенты	
Белок	3,69
Жир	1,28
Углеводы	12,42
Энергия, ккал	76,0

7.5.2. Исследуемые показатели.

На 1-й, 3-й, 5-й день опыта крыс в/б сенсибилизируют ОВА, а на 21-й день эксперимента вводят дополнительную («бустерную») дозу антигена, уменьшенную в 10 раз в сравнении с первоначальной. Кормление рационами продолжают до утра 29-го дня эксперимента и затем вводят раствор ОВА в/в, после чего оценивают на протяжении 24 ч тяжесть развивающейся реакции анафилаксии по показателям числа летальных реакций, общего числа судорожных реакций и величины анафилактического индекса [36]. Непосредственно перед введением разрешающей дозы у крыс отбирают 0,1—0,2 мл крови из хвостовой вены для определения уровня специфических антител.

Иммуноферментное определение уровней циркулирующих специфических антител к ОВА проводят согласно [19]. Статистическую обработку результатов проводят согласно U-критерию Фишера для долевых показателей, непараметрическим критериям хи-квадрат и Манна-Уитни.

7.6. Генотоксикологические исследования ГМО с комбинированными признаками проводятся в эксперименте на лабораторных животных. Оценка потенциальной генотоксичности ГМО включает выявление

повреждений ДНК и выявление мутагенной активности в эксперименте *in vivo*. Метод выявления мутагенной активности основан на учете хромосомных аберраций в метафазных клетках пролиферирующих тканей [20]. Регистрация повреждений ДНК предусматривает оценку целостности структуры ДНК методом щелочного гель-электрофореза изолированных клеток (метод ДНК-комет) [21].

7.6.1. Схема проведения эксперимента.

Вид животных	Мыши линии С57Bl/6
Пол	Самцы
Возраст	Половозрелые
Исходная масса тела	18—20 г
Количество животных в группе в начале эксперимента	Не менее 15 особей в каждой группе
Распределение по группам	Животных делят на 2 группы: группа «контроль» получает рацион с включением традиционного аналога исследуемого ГМО; группа «опыт» получает рацион с включением исследуемого ГМО
Рацион*	Пищевая и биологическая ценность рациона полностью удовлетворяет физиологические потребности животных
Карантин	Не менее 7-ми дней
Условия содержания	Животные получают свободный доступ к корму и воде; содержатся в отапливаемом, вентилируемом помещении.
Продолжительность эксперимента	30 дней
Забор материала для исследований	На 30-й день эксперимента
* состав базового рациона приведен в п. 7.3.2	

7.6.2. Исследуемые показатели:

• в основе метода выявления мутагенной активности лежит регистрация видимых структурных нарушений хромосом в клетках костного мозга на стадии метафазы. Анализируют 100 метафаз от каждого животного. Учитывают число одиночных и парных фрагментов, хроматидных и хромосомных обменов, ахроматических пробелов (гепов) и разрывов по центромере, число клеток с множественными повреждениями и клеток с полной деструкцией хромосом. Оценку результатов цитогенетиче-

ского анализа проводят путем сопоставления долей клеток с хромосомными аберрациями в контрольной и опытной группах;

• регистрация повреждений ДНК предусматривает оценку целостности структуры ДНК методом щелочного гель-электрофореза изолированных клеток (метод ДНК-комет). Метод основан на регистрации различной подвижности ДНК и возможных фрагментов ДНК лизированных клеток, заключенных в агарозный гель, в постоянном электрическом поле. При этом ДНК мигрирует к аноду, формируя электрофоретический след, напоминающий «хвост кометы», параметры которого зависят от степени поврежденности исследуемой ДНК. Общая схема метода включает получение гель-слайдов (подложки), получение микропрепаратов, лизис, щелочную денатурацию, электрофорез, нейтрализацию/фиксацию, окрашивание и микроскопический анализ.

Микроскопический анализ проводят на эпифлуоресцентном микроскопе с соответствующими для конкретного красителя фильтрами при увеличении 200х-400х. На каждый микропрепарат анализируют не менее 100 «ДНК-комет». Анализ «ДНК-комет» может проводиться визуально или с помощью программно-аппаратного комплекса.

7.7. Заключение о результатах медико-биологической оценки безопасности ГМО с комбинированными признаками оформляется в виде отчета в соответствии с требованиями Межгосударственного стандарта ГОСТ 7.32-2001.

Список литературы

1. Меньшиков В.В. (Ред.) Лабораторные методы исследования в клинике. М.: Медицина, 1987. 368 с.

2. Мальцев Г.Ю., Васильев А.В. // Вопр. мед. химии. 1994. № 2. С. 56—58.

3. Мальцев Г.Ю., Орлова Л.А. // Вопр. мед. химии. 1994. № 2. С. 59—61.

4. Костюк В.А., Потапович А.И. // Вопр. мед. химии. 1987. № 3. С. 115—118.

5. Дингл Дж. Лизосомы. Методы исследования. М.: Мир, 1980. 344 с.

6. Автандилов Г.Г. Медицинская морфометрия. Руководство. М.: Медицина, 1990. 384 с.

7. Западнюк И.П. и др. Лабораторные животные. Разведение, содержание, использование в эксперименте. 3-е изд. Киев: Вища школа, 1983. 383 с.

8. Киселева А.Ф. и др. Морфофункциональные методы исследования в норме и при патологии. К.: Здоров'я, 1983. 163 с.

9. Лакин Г.Ф. Биометрия: Учеб. пособие для биол. спец. вузов. 4-е изд., перераб. и доп. М.: Высш. шк., 1990. 352 с.

10. Лойда З., Госсрау Р., Шиблер Т. Гистохимия ферментов. Лабораторные методы. М.: Мир, 1982. 272 с.

11. Луппа Х. Основы гистохимии. М.: Мир, 1980. 343 с.

12. Микроскопическая техника: Руководство / Под ред. Д.С Саркисова, Ю.Л. Перова М.: Медицина, 1996. 544 с.

13. Ноздрачёв А.Д., Поляков Е.Л. Анатомия крысы. С.-Пб.: Лань, 2001. 464 с.

14. Пальцев М.А., Аничков Н.М. Патологическая анатомия. В 2-х т. М.: Медицина, 2000. 1944 с.

15. Полак Д., Норден С.В. Введение в иммуноцитохимию: современные методы и проблемы. М.: Мир, 1987. 74 с.

16. Струков А.И., Серов В.В. Патологическая анатомия. М.: Медицина, 1993. 688 с.

17. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств / Под ред. Миронова А.Н. Ч. 1. М.: Гриф и К, 2012. 944 с.

18. Ведомости фармакологического комитета. 1999. №1. С. 31—36.

19. Гмошинский И.В., Кржечковская В.В., Пятницкий Н.Н. // Вопросы питания. 1994. № 1, 2. С. 30—33.

20. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / Под ред. Хабриева Р.У. 2-е изд., перераб. и доп. М.: ОАО «Издательство «Медицина», 2005. 832 с.

21. Применение метода щелочного гель-электрофореза изолированных клеток для оценки генотоксических свойств природных и синтетических соединений: Методические рекомендации. М., 2006. 27 с.

22. Weingard K., Brown G., Hall R. et al. // Fundamental and applied toxicology. 1996. Vol. 29. P. 198—201.

23. Mills G.C. // J. Biol. Chem. 1959. Vol. 234. №3. P. 502—506.

24. Niashikimi M., Rao N., Jagi K. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1972. Vol. 46. P. 849—854.

25. Oshino N., Chance B. // Arch. Biochem. Biophys. 1973. Vol. 154. № 1. P. 117—131.

26. Tillotson J.A., Sauberlich H.E. // J. Nutrition. 1971. Vol. 101. P. 1459—1466.

27. Ernster L., Nordenbrandt K. // In Methods in Enzymology. Oxidation and phosphorilation. Estabrook R.W., Pullman M.E., eds., Ac. Press N.Y. 1967. Vol. 10. P. 574—580.

28. Michara, M., Uchiyama, M., Fukuzawa, K. 1980. // Biochem. Med. Vol. 23, Issue 3, P. 302—311.

29. Burchell B., Weatherill P. // Methods Enzymol. 1981. Vol. 77. P. 169—176.

30. Burke M.D., Mayer R.T. // Chem.-Biol. Interact. 1983. Vol. 45. P. 243—258.

31. Habig W.H., Pabst M.J., Jacoby W.B. // J. Biol. Chem. 1974. Vol. 294. P. 7130—7139.

32. Omura T., Sato R. //Biol. Chem. 1964. Vol. 239. P. 2370-2378.

33. Umegaki K., Saito K., Kubota Y. et al. //Jpn. J. Pharmacol. 2002. Vol. 90. P. 345—351.

34. FAO/WHO Protein quality evaluation. Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation Held in Bethesda, Md, USA, 4-8 December, 1989, FAO Rome. 2 p.

35. Stokes C.R., Miller B.G., Bourne F.J. Animal models of food sensitivity. Food allergy and intolerance. London. 1987. P. 286—300.

36. Weigle W., Cochrane C., Dixon F. // J. Immunology. 1960. Vol. 85. P. 469—477.

Медико-биологическая оценка безопасности генно-инженерно-модифицированных организмов растительного происхождения с комбинированными признаками

Методические указания
МУ 2.3.2.3388—16

Ответственный за выпуск Н. В. Митрохина
Редакторы К. В. Шмат
Компьютерная верстка Е. В. Ломановой

Подписано в печать 27.12.16

Формат 60x90/16 Печ. л. 2,0
Тираж 125 экз. Заказ 90

Федеральная служба по надзору
в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
127994, Москва, Вадковский пер., д. 18, стр. 5, 7

Оригинал-макет подготовлен к печати и тиражирован
отделением издательского обеспечения отдела научно-методического обеспечения
Федерального центра гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора
117105, Москва, Варшавское ш., 19а
Реализация печатных изданий, тел./факс: 8 (495) 952-50-89

gost.e-ecolog.ru