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

1.2. ГИГИЕНА, ТОКСИКОЛОГИЯ, САНИТАРИЯ

Медико-биологическая оценка безопасности наноматериалов

Методические указания
МУ 1.2.2635—10

gost.e-ecolog.ru

ББК 51.2
М42

М42 **Медико**-биологическая оценка безопасности наноматериалов: Методические указания.—М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2010.—122 с.

1. Авторский коллектив: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Г. Г. Онищенко); Учреждение Российской академии медицинских наук научно-исследовательский институт питания РАМН (В. А. Тутельян, И. В. Гмошинский, С. А. Хотимченко, И. В. Аксенов, Е. А. Арианова, В. В. Бессонов, В. М. Верников, М. М. Гаппаров, Р. В. Распопов, В. В. Смирнова, А. А. Шумакова, О. Н. Тананова, О. И. Передеряев); Федеральное государственное учреждение науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (И. А. Дятлов, В. П. Холоденко, В. А. Чугунов, Е. Н. Кобзев, В. Д. Потапов, Т. И. Рудницкая, Н. С. Грищенко, П. А. Шрамко, В.В. Фирстова, Г. М. Титарева, И. В. Бахтеева, А. С. Бутыркина, О. В. Полежаева, Е. В. Зырина, А. И. Борзилов, Т. И. Комбарова); Учреждение Российской академии медицинских наук научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Почетного академика Н. Ф. Гамалеи РАМН (А. Л. Гинцбург, Б. С. Народицкий, М. М. Шмаров, Д. Ю. Логунов, Л. Н. Нестеренко, Н. А. Зигангирова, Ю. М. Романова, А. Ф. Мороз, М. В. Мезенцева, Д. В. Щебляков, И. Л. Тутыхина, Л. В. Черенова, А. И. Тухватулин, И. Ю. Грибова); Государственное учебно-научное учреждение Биологический факультет Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова (М. П. Кирпичников, К. В. Шайтан, А. П. Бонарцев, А. В. Феофанов, Т. Г. Сазонтова, Ю. В. Архипенко, Д. В. Багров); Учреждение Российской академии наук «Центр «Биоинженерия» РАН (К. Г. Скрябин, О. А. Зейналов, Н. В. Равин, С. П. Комбарова); Учреждение Российской Академии наук Институт биохимии им. А. Н. Баха РАН (В. О. Попов, Б. Б. Дзантиев, А. В. Жердев, Н. В. Голуб); Федеральное государственное унитарное предприятие «Всероссийский научно-исследовательский институт метрологической службы» (ФГУП ВНИИМС) (С. А Кононогов, С. С. Голубев); ООО «Интерлаб» (А. Н. Веденин, Г. В. Казыдуб).

2. Разработаны в рамках реализации Федеральной целевой программы «Развитие инфраструктуры наноиндустрии в Российской Федерации на 2008—2010 гг.».

3. Утверждены Руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации Г. Г. Онищенко 24 мая 2010 г.

4. Введены в действие с 24 мая 2010 г.

5. Введены впервые.

ББК 51.2

© Роспотребнадзор, 2010
© Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2010

Содержание

1. Область применения 6
2. Введение 7
3. Общие положения 8
4. Медико-биологическое тестирование безопасности наноматериалов на культурах клеток высших животных 14
4.1. Требования к используемым культурам клеток 14
4.2. Схема введения наноматериалов животным и сроки наблюдения 14
4.3. Подготовка аэрозольно обработанных наноматериалами животных 15
4.4. Приборы и оборудование 15
4.5. Материалы и реактивы 17
4.6. Приготовление растворов и сред 20
4.7. Получение и культивирование клеточных культур 22
4.7.1. Получение первичных клеточных культур 22
4.7.2. Ведение и подготовка перевиваемых клеточных культур к тестированию 24
4.8. Проведение тестирования безопасности наноматериалов *in vitro* с использованием клеточных культур 24
4.8.1. Подготовка клеточных культур и образцов наноматериалов к тестированию и внесение образца наноматериала в культуру 24
4.8.2. Ход тестирования 26
4.9. Оценка цитотоксических свойств наноматериалов 26
4.9.1. Оценка цитотоксичности с помощью МТТ 26
4.9.2. Оценка цитотоксичности путем определения активности лактатдегидрогеназы 28
4.9.3. Оценка цитотоксичности путем определения концентрации АТФ в лейкоцитах 29
4.9.4. Оценка влияния наноматериалов на функциональную активность макрофагов 31
4.9.5. Определение активности ферментов, участвующих в «респираторном взрыве» 34
4.9.6. Оценка влияния наноматериалов на ФМА-индуцированную дифференцировку моноцитарных клеточных культур в макрофаги. 36
4.9.7. Оценка влияния наноматериалов на продукцию макрофагами фактора некроза опухоли-альфа 37
4.10. Оценка иммунотропного действия наноматериалов 40
4.10.1. Оценка влияния наноматериалов на поликлональную активацию лимфоцитов в реакции бласттрансформации лимфоцитов 40
4.10.2. Оценка влияния наноматериалов на продукцию лимфоцитами интерферона-гамма (ИНФ-γ) методом ИФА 42

4.11. Оценка безопасности наноматериалов методом проточной цитофлюориметрии по качественным и количественным изменениям в клетках высших животных 43
4.11.1. Определение содержания Т- и В-лимфоцитов и соотношения Т-хелперов и цитотоксических Т-лимфоцитов 44
4.11.2. Выявление маркера ранней активации лимфоцитов 45
4.11.3. Оценка апоптотической и пролиферативной активности лейкоцитов 48
4.11.4. Оценка цитотоксического действия наноматериалов на лейкоциты периферической крови человека 49
4.11.5. Определение цитолитической активности лимфоцитов 50
4.11.6. Оценка фагоцитарной активности перитонеальных макрофагов животных 51
5. Оценка безопасности наноматериалов с использованием в качестве тест-объекта семян высших растений 53
5.1. Принцип биотестирования на проростках высших растений 53
5.2. Оборудование, материалы, реактивы 54
5.3. Характеристика тест-систем 55
5.4. Условия тестирования 55
5.5. Подготовка к проведению тестов 55
5.5.1. Подготовка посуды для биотестирования 55
5.5.2. Подготовка субстрата для проращивания семян высших растений 56
5.5.3. Приготовление исследуемых проб наноматериалов 56
5.5.4. Подготовка семян 57
5.6. Процедура биотестирования 57
5.7. Оценка и интерпретация результатов биотестирования 57
6. Оценка безопасности наноматериалов с использованием интегральных тестов на лабораторных животных 58
6.1. Предварительные замечания 58
6.2. Методики измерения легочной функции 60
6.2.1. Методика измерения легочной функции *in vivo* – электроплетизмография 60
6.3. Методики измерения функций сердечно-сосудистой системы 63
6.3.1. Тестирование безопасности наноматериалов на инвазивной модели тромбогенеза 63
6.3.2. Методика электроплетизмографического измерения артериального давления в хвостовой артерии 67
6.3.3. Методика регистрации АД с использованием имплантируемых катетеров 71

6.3.4. Методика регистрации ЭКГ у бодрствующих крыс в покое и при стрессирующем воздействии ... 87
6.4. Тестирование безопасности наноматериалов на основе определения гематологических показателей лабораторных животных ... 93
6.4.1. Определение кинетики агрегации и дезагрегации эритроцитов ... 93
6.4.2. Оценка деформационных свойств эритроцитов и вязкости крови ... 97
6.5. Оценка безопасности наноматериалов по интегральным показателям системы детоксикации ксенобиотиков ... 100
6.5.1. Метод гексеналовой пробы ... 100
6.5.2. Метод пробы с бромсульфалеином ... 102
6.6. Оценка безопасности наноматериалов по интенсивности местных воспалительных реакций ... 104
6.6.1. Методика накожных аппликаций ... 104
6.6.2. Методика конъюнктивальной пробы ... 106
6.7. Тестирование безопасности наноматериалов по поведенческим реакциям животных ... 108
6.7.1. Методика теста «открытое поле» ... 108
6.7.2. Методика теста «приподнятый крестообразный лабиринт» ... 111
6.7.3. Методика условного рефлекса пассивного избегания ... 114
6.8. Тестирование безопасности наноматериалов на основе определения физической выносливости животных ... 116
6.8.1. Метод истощающего плавания ... 116
6.8.2. Методика динамометрического измерения произвольной силы скелетных мышц передних конечностей ... 118
Приложение 1. Нормативные ссылки ... 121

УТВЕРЖДАЮ
Руководитель Федеральной службы
по надзору в сфере защиты прав
потребителей и благополучия человека,
Главный государственный санитарный
врач Российской Федерации
Г. Г. Онищенко
24 мая 2010 г.
Дата введения: 24 мая 2010 г.

1.2. ГИГИЕНА, ТОКСИКОЛОГИЯ, САНИТАРИЯ

Медико-биологическая оценка безопасности наноматериалов

Методические указания
МУ 1.2.2635—10

1. Область применения

1.1. Настоящие методические указания устанавливают требования к медико-биологической оценке безопасности наночастиц и наноматериалов искусственного происхождения на основе тестов на культурах клеток, семенах высших растений и лабораторных животных

1.2. Требования, изложенные в настоящих методических указаниях, применяются в ходе установления безопасности наноматериалов на стадиях их производства, оборота, использования и утилизации в Российской Федерации в целях принятия решений по оценке рисков, связанных с данными процессами.

1.3. Методические указания разработаны с целью обеспечения единства измерений и адаптации имеющихся методов и средств измерений в ходе оценки безопасности наноматериалов искусственного происхождения.

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

2. Введение

Наноматериалы и наночастицы, являющиеся продуктом современных нанотехнологий, обладают комплексом уникальных свойств, которые открывают широкие перспективы их промышленного применения. Одновременно это создаёт риск возможных неблагоприятных воздействий наноматериалов на организм человека, сельскохозяйственных животных и растения, компоненты природных биоценозов. В ближайшей перспективе следует ожидать резкого увеличения объёмов производства во всём мире и в России ряда приоритетных наноматериалов, в частности таких, как наночастицы оксидов, нитридов и карбидов кремния, титана, цинка, железа, церия, алюминия, вольфрама, металлические наночастицы железа, меди, кобальта, никеля, алюминия, серебра, золота, металлов платиновой группы, кремния, селена, квантовые точки, углеродные нанотрубки, фуллерены, наночастицы биополимеров и рекомбинантных вирусов. Это с неизбежностью приведёт к поступлению значительных количеств наноматериалов в окружающую среду, их накоплению в компонентах биоты и абиотических средах с последующей возможной передачей человеку.

В настоящее время накоплен значительный экспериментальный материал относительно токсичности некоторых наноматериалов для живых организмов. Однако большинство исследований по изучению биологических эффектов наночастиц и наноматериалов выполнено с помощью разнообразных, недостаточно стандартизированных методик и тест систем, причём полученные при этом результаты часто не сопоставимы. В связи с этим большое значение приобретает разработка единой системы стандартных тестов, позволяющих оценивать безопасность новых искусственных наноматериалов по их воздействию на показатели жизнедеятельности стандартизированных биологических систем.

Биологические системы, применение которых возможно для выявления вредных воздействий антропогенных веществ, к числу которых относятся искусственные наноматериалы, весьма разнообразны. В настоящее время их подразделяют на семь подгрупп в соответствии с основными биологическими дисциплинами: микроорганизмы, растения, простейшие организмы, клеточные и субклеточные элементы, различные гидробионты, организмы высших животных. Биотестирование – один из приемов исследования в области токсикологии, используемый с целью установления степени токсического действия химических, физических и биологически неблагоприятных факторов среды, потенциально опасных для человека и компонентов экосистем. Биотестирование не

отменяет систему аналитических и аппаратурных методов контроля за содержанием наноматериалов в природной среде, а дополняет ее качественно новыми биологическими показателями, т. к. с точки зрения оценки рисков сами по себе определения концентраций токсикантов имеют относительную ценность. Важно знать не только уровни экспонирования, но и вызываемые ими биологические эффекты. Кроме того, в отличие от физико-химического анализа, биологические методы позволяют оценить обобщенную, или интегральную, реакцию на действие неблагоприятных факторов, характеризуя направленность и скорость происходящих в организмах изменений.

Не существует универсальной тест-системы, способной обнаружить все возможные эффекты искусственных наноматариалов одинаково хорошо. Поэтому на практике все более широкое применение находят наборы тестов, включающих использование различных тест-организмов (бактерий, водорослей, простейших, ракообразных, рыб, растений и ряд других). В настоящее время наибольшее внимание с точки зрения оценки интегральной токсичности почв и вод привлекают биотесты с использованием культур микробных клеток и клеток высших животных, растений, ракообразных, физиологических и поведенческих реакций у высших животных.

В связи с вышеизложенным в качестве биотестов для оценки потенциального вредного воздействия искусственных наноматериалов на живые организмы, входящие в состав природных экосистем, предлагаются микроорганизмы: биолюминесцентный тест на фотобактериях, почвенные микроорганизмы: бактерии *Pseudomonas fluorescens* и *Bacillus subtilis*, дрожжи *Candida lipolytica*, семена высших растений.

Настоящие методические указания разработаны в целях внедрения единого, научно обоснованного, стандартизированного количественного подхода к оценке безопасности искусственных наноматериалов. Разработка методических указаний осуществлена в рамках Федеральной целевой программы «Развитие инфраструктуры наноиндустрии в Российской Федерации на период 2008—2010 гг.»

3. Общие положения

3.1. Проведение исследований по медико-биологической оценке безопасности наноматериалов определяется правилами надлежащей лабораторной практики.

3.2. Требования к стандартным и исследуемым наноматериалам.

3.2.1. Для верификации, стандартизации и калибровки методов, применяемых при медико-биологической оценке безопасности наноматериалов, используются стандартные образцы наноматериалов (стандарты).

3.2.2. Каждый стандартный образец наноматериала должен быть охарактеризован по показателям химического состава (включая наличие примесей), размеру и форме частиц, удельной площади поверхности, типу кристаллической структуры. Указанные характеристики определяются с использованием методов масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой, трансмиссионной электронной микроскопии, определения изотерм адсорбции инертных газов, рентгенофазового (рентгенодифракционного) анализа. В случае стандартных образцов фуллеренов следует использовать метод обращённофазовой ВЭЖХ.

3.2.3. Каждый стандартный образец наноматериала должен быть снабжён «Паспортом безопасности наноматериалов», который должен быть составлен в соответствии с ГОСТ 30333—2007.

3.2.4. Стандартные образцы наноматериалов должны быть упакованы для защиты при транспортировании от загрязнения или порчи.

3.2.5. Хранение стандартных образцов наноматериалов осуществляется отдельно от остальных применяемых веществ с соблюдением условий хранения, указанных в «Паспорте безопасности», на протяжении всего срока годности образца.

3.2.6. Хранение и использование стандартных образцов наноматериалов осуществляется в соответствии с утвержденным протоколом исследования.

3.2.7. Перед проведением тестирования наноматериалов необходимо получить основные физико-химические характеристики наноматериалов, которые включают:

- химический состав наноматериалов (содержание основного вещества, содержание примесей и токсичных компонентов);
- содержание растворителей или носителей (если они использовались);
- рекомендуемый состав среды для получения дисперсий наночастиц;
- размеры и форма наночастиц;
- стабильность наночастиц при хранении.

3.3. Требования к используемому оборудованию.

3.3.1. Организации, проводящие исследования по медико-биологической оценке безопасности наноматериалов, должны быть оснащены

необходимым оборудованием, прошедшим метрологический контроль и калибровку в установленном порядке.

3.3.2. Эксплуатация оборудования проводится в соответствии с техническим паспортом и инструкцией по применению. Результаты проведения калибровки и текущего ремонта оборудования фиксируются в специальном журнале, доступном в любое время сотрудникам, эксплуатирующим оборудование или обеспечивающим его обслуживание.

3.3.3. Для каждого прибора, используемого в исследованиях, в журнале фиксируются следующие сведения: наименование прибора, наименование производителя, страна происхождения, модель прибора, серийный (заводской) номер, дата получения и постановки на учет в лаборатории, дата запуска в эксплуатацию, инвентарный номер, место расположения прибора.

3.3.4. Сотрудник, ответственный за использование и за техническое обслуживание прибора, должен делать записи о плановом обслуживании оборудования, датированные и заверенные подписью ответственного лица, записи о любых повреждениях, отказах, ремонте прибора, датированные и заверенные подписью сотрудника.

3.3.5. Лаборатории, проводящие исследования по медико-биологическому тестированию безопасности наноматериалов методами, связанными с использованием радиоактивных изотопов, должны быть аккредитованы и иметь санитарный паспорт для работы с источниками ионизирующего излучения. Хранение, использование радиоизотопов и утилизация контаминированных ими материалов осуществляется в соответствии с СанПиН 2.6.1.2523—09 «Нормы радиационной безопасности (НРБ-99/2009)».

3.4. Требования к используемым тест-системам:

3.4.1. Характеристики тест-систем, используемых в экспериментах, должны быть паспортизованы и иметь документированный сертификат гарантированного срока использования. Условия проведения исследований на тест-системах должны выполняться строго по инструкции производителя или специально разработанного СОПа и исключать воздействие внешних факторов, способных повлиять на качество получаемых данных.

3.5. Планирование и проведение исследований.

3.5.1. Медико-биологическая оценка безопасности наноматериалов проводится по утвержденному плану с ведением протокола и составлением отчета, в который заносятся все результаты исследований.

3.5.2. Медико-биологическое тестирование наноматериалов, требующее использования лабораторных животных, поводится только на здоровых животных, прошедших карантин.

3.5.3. Животные, используемые в экспериментах, должны иметь ветеринарный сертификат. Преимущественно должны использоваться свободные от патогенной микрофлоры SPF линейные виды.

3.5.4. Для обеспечения индивидуального наблюдения в процессе выполнения исследования животные должны быть идентифицированы. Способ идентификации животного документируется. Все клетки, вольеры, контейнеры, предназначенные для содержания животных, также подлежат маркировке.

3.5.5. Помещения для лабораторных животных должны обеспечивать изоляцию (карантин) поступающих животных, больных животных и животных, подозреваемых в носительстве инфекций; позволять осуществлять раздельное содержание различных видов животных и животных одного вида, соответствовать санитарно-эпидемиологическим и ветеринарным требованиям. Животные, предназначенные для исследования различных наноматериалов, пространственно изолируются друг от друга.

3.5.6. Корма, оборудование и инвентарь для ухода за животными необходимо хранить в помещениях, изолированных от мест содержания животных.

3.5.7. Исследования безопасности наноматериалов на животных проводятся в соответствии с установленными правилами. Исполнителем должен быть обеспечен контроль за соблюдением правовых и этических норм использования лабораторных животных в соответствии с утверждённым протоколом.

3.5.8. Корма и вода для животных должны обеспечивать пищевые потребности в соответствии с протоколом исследования и действующими нормативными документами.

3.5.9. Результаты медико-биологического тестирования безопасности наноматериалов заносятся в протокол, в котором отражены цели работы и методы, используемые в работе. Протокол исследования утверждается руководителем организации, проводящей исследования, и включает: цель и задачи исследования, имеющиеся сведения о тестируемом наноматериале (физические, химические, биологические, токсикологические свойства), используемые стандарты, схему проведения медико-биологического тестирования и её обоснование, методы введения наноматериала в биологические объекты, применяемые дозы наномате-

риала, методы исследования, определяемые показатели, результаты исследований, метрологическую характеристику анализа, статистическую обработку результатов исследования, заключение, список используемой литературы.

3.5.10. Вносимые изменения в протокол исследования и отклонения от протокола (незапланированные события, непредвиденные обстоятельства и т. д.) записываются, пронумеровываются, подписываются руководителем исследования, датируются в приложении с указанием причин и утверждаются руководителем организации.

3.6. Требования к оформлению отчета.

3.6.1. По окончании медико-биологического тестирования безопасности наноматериалов на модельных биологических тест-системах оформляется отчет, в котором должны быть представлены: название, адрес организации, даты начала и завершения исследований, цель и задачи исследования; характеристика тестируемого наноматериала, включая имеющиеся сведения о физических, химических, биологических, токсикологических свойствах; перечень протестированных образцов наноматериала и применяемых стандартов, метод введения наноматериала в биологические объекты, схема проведения исследования, описание методов статистической обработки результатов, результаты исследования, представленные в виде обобщающих таблиц, рисунков с соответствующей статистической обработкой, обсуждение результатов, выводы, список использованной литературы.

3.6.2. Отчет о результатах проведенного исследования составляется ответственным исполнителем, утверждается руководителем организации и скрепляется печатью организации.

3.7. Система обеспечения качества медико-биологического тестирования безопасности наноматериалов.

3.7.1. Контроль за качеством проведения медико-биологического тестирования безопасности наноматериалов включает в себя оформление перечня исследований, проводимых в организации, с указанием для каждого исследования руководителя и заказчика, названия определяемого наноматериала, даты начала и состояния каждого исследования на текущий момент времени, оценку протоколов и методов исследования на соответствие правилам лабораторной практики, мониторинг текущих исследований, отчет о проведенных проверках и рекомендации по устранению недостатков.

3.7.2. Для осуществления контроля качества руководитель организации, проводящей медико-биологическое тестирование безопасности

наноматериалов, назначает в соответствии с правилами надлежащей лабораторной практики ответственных лиц за мониторинг исследования из числа сотрудников, не участвующих в исследовании.

3.8. Стандартные операционные процедуры (СОП).

3.8.1. СОП разрабатываются организацией, проводящей медико-биологическую оценку безопасности наноматериалов, на все производственные операции, включая: поступление, идентификацию, маркировку, отбор, обработку проб, использование и хранение исследуемых проб, хранение и аттестацию стандартов; обслуживание и калибровку измерительных приборов и оборудования; ведение биологических тест-систем и их поддержание в функциональном состоянии; приготовление реактивов, ведение записей, отчетов и их хранение; обслуживание помещений; обезвреживание или утилизацию наноматериалов, содержащих образцы и использованные компоненты биологических тест-систем (если это необходимо); осуществление программы по обеспечению качества, и утверждаются руководителем организации.

3.8.2. Соблюдение СОП осуществляется в целях обеспечения качества, достоверности и воспроизводимости результатов исследования.

3.8.3. Отклонения от СОП должны быть документально оформлены, подписаны руководителем исследования и утверждены руководителем организации.

3.8.4. Организация, проводящая исследование по медико-биологической оценке безопасности наноматериалов, обязана:

- иметь утвержденный порядок приема и учета поступления анализируемых проб и стандартов наноматериалов;
- проводить учет анализируемых проб и стандартов наноматериалов при поступлении, расходовании, возврате заказчику или их утилизации;
- принимать меры по обеспечению идентификации исследуемых веществ (название, химическая формула, номер серии, дата выпуска, условия хранения и срок годности) и их стабильности на протяжении всего исследования. Для образцов наноматериалов на этикетке дополнительно должны указываться размер, форма частиц, при необходимости удельная площадь поверхности и кристаллическая структура.

3.9. Меры конфиденциальности.

3.9.1. Сотрудники, принимающие участие в проведении медико-биологического тестирования безопасности наноматериалов, обязаны соблюдать конфиденциальность в отношении любых данных, получен-

ных в ходе исследования, в соответствии с законодательством Российской Федерации.

3.9.2. Организация, проводящая исследования по медико-биологической оценке безопасности наноматериалов, должна обеспечить конфиденциальность результатов исследований в рамках принятых ею обязательств и в соответствии с законодательством Российской Федерации.

4. Медико-биологическое тестирование безопасности наноматериалов на культурах клеток высших животных

4.1. Требования к используемым культурам клеток

Используемые в экспериментах перевиваемые культуры клеток должны быть получены из организаций, сертифицированных по соответствующему профилю. На хранение и ведение культур клеток и тканей должны составляться инструкции или СОП, гарантирующие качество клеточных и тканевых культур. Перед использованием культуры клеток должны быть протестированы на жизнеспособность и функциональную активность и иметь соответствующий стандарт, указанный в методике.

Работы по исследованию токсичности и биологической активности наноматериалов на первичных и перевиваемых культурах тканей *in vitro*, а также на первичных культурах макрофагов в системе *ex vivo* должны проводиться по утвержденным инструкциям и СОП. Эти документы должны регламентировать каждый этап эксперимента, соответствовать требованиям проведения безопасных работ с данным видом материалов.

4.2. Схема введения наноматериалов животным и сроки наблюдения

Группы мышей обрабатывают исследуемым наноматериалом для определения острой токсичности аэрозольно, подкожно, внутривенно, перитонеально, внутрижелудочно (в зависимости от предполагаемого пути попадания наноматериала). Исследования проводят на 1, 10 и 30-е сутки после введения наноматериалов на животных.

Для изучения хронической иммунотоксичности животных подвергают воздействию наноматериала ежедневно на протяжении 21 дня. Исследования проводят на 1, 30 и 60-е сутки после окончания введения наноматериалов.

4.3. Подготовка аэрозольно обработанных наноматериалами животных

В экспериментах по воздействию наночастиц в аэрозольном состоянии используются морские свинки, линейные белые мыши для последующего получения и изучения *in vitro* их альвеолярных макрофагов. Животные обрабатываются аэрозольно в затравочной камере. Затравочная камера должна иметь объем не менее 100 $дм^3$ и позволять одновременно обработать до 10 морских свинок или до 60 мышей, которых предварительно помещают в специальную корзину. Аэрозоль генерируется из водной или водно-органической дисперсии наноматериала калиброванным стеклянным распылителем, представляющем конструктивно трубку Вентури с объемом распыляемой жидкости до 7 $см^3$. Система снабжается HEPA-фильтрами на входе воздушного потока, на выходе воздух фильтруется через HEPA-фильтр с термообработкой выходящего воздуха при температуре 840 °С. Камера имеет возможность регулирования времени ингаляции аэрозоля, времени распада облака. Работает по заранее выбранной программе в автоматическом режиме.

Перед экспериментом необходимо провести подбор рецептур жидкости для распыления предлагаемого для исследования наноматериала, исходя из его физико-химических свойств и токсичности самой жидкости. После обработки животные выдерживаются в условиях вивария необходимое количество времени и далее поступают либо на гистологические эксперименты, либо из них получают альвеолярные макрофаги с целью изучения их функций в условиях *in vitro* в культуре тканей. Последним исследованиям придается особое значение, т. к. на макрофагах одного и того же животного возможно исследовать действие различных веществ в разных концентрациях и оценить различные функции (фагоцитоз, бактерицидную активность, цитотоксичность, окислительный взрыв).

4.4. Приборы и оборудование

4.4.1. Средства измерения:

Весы лабораторные электронные, погрешность при измерении не более 0,001 г, Sartorius Германия или аналогичные;

Весы лабораторные общего назначения по ГОСТ 24104—2001

pH-метр лабораторный MP220 Mettler-Toledo GmbH, Швейцария или аналогичный

4.4.2. Оборудование:

Цитофлюориметр FACSCalibur, BD – 2 – лазерный с возможностью одновременной детекции 4 различных флюорохромов или аналогичный	
Плашечный термостатируемый универсальный сканер флюоресцентных сигналов, Victor, Perkin Elmer или аналогичный	
Планшетный спектрофотометр Titertek Multiscan Plus или аналогичный	
Планшетный сцинтилляционно-люминесцентный счетчик Top Count, Packard, США или аналогичный	
Термостат, поддерживающий рабочую температуру +28—45 °С с отклонением от заданной ±1 °С	ТУ 64-1-1382—72
Ламинарный шкаф марки ЛШ1 фирмы Biokom или аналогичный отечественный ламинарный шкаф БОВ-001-АМС (вариант СПШ), Россия	
Центрифуга со скоростью вращения ротора до 3 000 об./мин для пробирок вместимостью 15 $см^3$	
СМ 6.03 ELMI (Латвия) или аналогичная	
Встряхиватель вибрационный типа «Вортекс» со скоростью вращения до 3 000 об./мин	
Шейкер планшетный термостатируемый	
Холодильник бытовой электрический	ГОСТ 26678–85
Мембранные установки для получения деионизованной воды	ОСТ 11-029.003—80
Облучатель бактерицидный настенный ОБН-150	
Автоклав ВК-75, завод медоборудования, г. Тюмень, Россия	
Аппарат для приготовления деионизованной воды Direct-Q 5, Millipore, США или аналогичный	
Баня водяная с электрическим подогревом, ГСП-2, завод РЭМО, г. Львов, Украина или аналогичная	
Дистиллятор ДЭ-4-2, завод медоборудования, г. Саранск, Россия	
Морозильная камера бытовая, обеспечивающая температуру – 18 °С, Stinol, Россия	
Шкаф сушильный ШС-80-01 СПУ, ОАО «Смоленское СКТБ СПУ» или аналогичный	

CO_2-инкубатор Nuaire CF AUTOFLOW или аналогичный
Харвестер для переноса клеток на фильтр
Инвертированный микроскоп Биолам П2-1, ЛОМО, г. С.-Петербург, Россия или аналогичный
Регулируемые автоматические пипетки (0,5—10, 10—100, 100—1000, 500—5 000 мм^3), Ленпипет, Россия или аналогичные

4.5. Материалы и реактивы

4.5.1. Лабораторная посуда и вспомогательные материалы:

Пробирки пластиковые стерильные с крышкой вместимостью 15 см^3, Costar, США или аналоги	
Наконечники пластиковые объемом 1—200 мм^3	
Наконечники пластиковые объемом 200—1 000 мм^3	
Перчатки резиновые	ГОСТ 3—88
Колбы плоскодонные конические разной вместимости	ГОСТ 1770—74
Цилиндры стеклянные мерные лабораторные вместимостью 25, 100, 1 000 см^3	ГОСТ 1770—74
Колбы мерные (50, 100, 200, 500, 1 000 см^3)	ГОСТ 1770—74
Лабораторный штатив	ТУ 64-1-2669—73

Микроцентрифужные пробирки (1,5 см^3), «Eppendorf», Германия
Пластиковые флаконы для культур клеток объемом 25 см^3, Corning Costar, США или аналогичные
Пластиковые планшеты для культур клеток 96-луночные, Corning Costar, США или аналогичные
Стерильные пластиковые пипетки градуированные, Corning Costar, США или аналогичные
Пробирки для цитометрического анализа FALCON, BD
Пробирки TRUCount BD
Камера Горяева для счета форменных элементов крови, модель 851, Россия
Фибростеклянные фильтры для сбора клеток, Wathman

4.5.3. Реактивы:
Среда Игла в модификации Дульбекко (DMEM)
сухая (Sigma)
Среда РПМИ-1640 сухая (Sigma)
Среда 199 сухая (Sigma)
Раствор Хенкса без фенолового красного (Sigma)
Фиколл (Sigma)
Верографин, 76 %-й раствор в ампулах (Sigma)
Фетальная сыворотка теленка (FCS) (Sigma)
L-глутамин (Sigma)
Трипсин (Sigma)
Раствор Версена (Sigma)
Гентамицина сульфат, 4 %-й раствор для инъекций
в ампулах (Sigma)
Тест-система для определения лактатдегидрогеназы
CytoTox 96, Промега, США или аналогичная
Тест-система для определения мышиного фактора некроза опухоли-альфа (ФНО-α) методом иммуно-ферментного анализа (ИФА), Amersham Biosciences, США или аналогичная
Тест-система для определения мышиного
интерферона-гамма (ИНФ-γ) методом ИФА,
Amersham Biosciences, США или аналогичная
Тест-система для определения человеческого
интерферона-гамма методом ИФА, Вектор-Бест,
Россия или аналогичная
Тест-система для оценки фагоцитоза методом
проточной флуорометрии Phagotest, BD
Тест-система для оценки активности АТФ
методом проточной флуорометрии ATP
Determination Kit
Люминол (5-`amino-2,3-dihidro-1,4-phthalasinedione) (Fluko)
Человеческий сывороточный альбумин (Sigma)
Гепарин (Sigma)
Раствор желатина в ампулах (Sigma)
Сцинтилляционная жидкость для жидкостного
сцинтилляционного счёта Top Count, Packard,
США или аналог
3-(4,5-диметитиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолий
бромид (МТТ) (Sigma)
Нитросиний тетразолий (НСТ) (Sigma)

Конконавалин А (КонА) (Sigma)	
Липополисахарид (ЛПС) *Escherichia coli* (Sigma)	
[H^3] тимидин, НПО Изотоп, Россия	
Моноклональные антитела к CD3 PerCP, CD19 PE, CD4 APC, CD8 FITC (Sigma)	
Моноклональные антитела к CD3 PerCP, CD19 PE, CD69 FITC (Sigma)	
Изотипический контроль IgG1-FITC (Sigma)	
FACS Lysing Solution, BD (Sigma)	
Азид натрия (Sigma)	
Параформальдегид (Sigma)	
Тритон Х-100 (Sigma)	
ДНК-аза (Sigma)	
РНК-аза (Sigma)	
Коллагеназа (Sigma)	
7-AAD (7-амино-актиномицин D) (Sigma)	
Пропидия йодид (Sigma)	
CD45 FITC (Sigma)	
Бромистый этидиум (Sigma)	
Ортофенилендиамин (ОФД) (Sigma)	
Форболмиристилацетат (ФМА) (Sigma)	
1-флуоресцеинизотиоцианат (ФИТЦ) (Sigma)	
Зимозан (Sigma)	
Диметилсульфоксид (ДМСО) (Sigma)	
Натрия додецилсульфат (ДСН) (Sigma)	
Краситель трипановый синий (Sigma)	
Буфер HEPES (Sigma)	
ТРИС-HCl (Sigma)	
Лимонная кислота чда	ГОСТ 2158—76
Этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА) двунатриевая соль (Sigma)	
Натрия цитрат чда	ГОСТ 22280—76
Аммоний хлористый чда	ГОСТ 3773—72
Натрия фосфат однозамещенный чда	ГОСТ 245—75
Натрия фосфат двузамещенный чда	ГОСТ 4172—76
Натрий хлористый хч	ГОСТ 4233—77
Калий фосфорно-кислый однозамещенный чда	ГОСТ 4198—75
Натрий бикарбонат безводный (Sigma)	
Едкий натр (хч)	ГОСТ 2263—79
Соляная кислота 1Н (хч)	ГОСТ 3118—77

Серная кислота 1Н (хч)	ГОСТ 4278—76
Вода дистиллированная (хч)	ГОСТ 6709—72
Перекись водорода 33 %-я	ГОСТ 177—88
Спирт этиловый технический (чда)	ГОСТ 17299—78
Гексенал (Sigma)	
Пенициллин (Sigma)	
Стрептомицин (Sigma)	

4.6. Приготовление растворов и сред

Состав применяемых питательных сред представлен в табл. 1.

Таблица 1

Состав питательных сред

Компоненты	Количество
Среда РПМИ-1640	
Сухая среда РПМИ-1640 (Sigma)	10,4 г
Деионизированная вода	До 1 000 см^3
Полная питательная среда (ППС) на основе РПМИ-1640	
Сухая среда РПМИ-1640 (Sigma)	10,4 г
Натрий бикарбонат безводный	2 г
Буфер HEPES	5,96 г
L-глутамин	0,146 г
Фетальная сыворотка телёнка (FCS)	50 см^3
Деионизированная вода	До 1 000 см^3
Полная питательная среда (ППС) на основе DMEM	
Сухая среда Игла в модификации Дульбекко (DMEM) (Sigma)	9,99 г
Натрий бикарбонат безводный	2 г
Буфер HEPES	5,96 г
L-глутамин	0,146 г
Фетальная сыворотка телёнка (FCS)	100 см^3
Деионизированная вода	До 1 000 см^3
Среда 199	
Сухая среда 199 (Sigma)	9,9 г
Деионизированная вода	До 1 000 см^3

Таблица 2

Состав растворов

Компоненты	Количество
1	2
Фосфатно-солевой буфер (ФСБ)	
Калий фосфорнокислый однозамещенный	0,21 г
Натрий хлористый	9 г
Натрия фосфат двузамещенный	0,726 г
Деионизированная вода	до 1 000 $см^3$
Цитратный буфер (pH 5,0)	
Лимонная кислота	7,3 г
Натрия фосфат двузамещенный	11,86 г
Дистиллированная вода	до 1 000 $см^3$
Раствор трипсин/Версена	
Раствор трипсина в ФСБ (Sigma)	5 г
Раствор Версен (Sigma)	0,2 г
Натрий хлористый	0,85 г
Деионизированная вода	до 1 000 $см^3$
Лизирующий буфер для эритроцитов	
Аммоний хлористый	8,3 г
Tris-HCl	1,21 г
Деионизированная вода	до 1 000 $см^3$
Градиент плотности фиколл-верографин плотностью 1,077	
Фиколл	9,66 г
Верографин, 76 %-й раствор в ампулах (Sigma)	20 $см^3$
Дистиллированная вода	132 $см^3$
Лизирующий буфер для теста МТТ	
Додецилсульфат натрия	10 г
Соляная кислота 1Н	1 $см^3$
Дистиллированная вода	До 100 $см^3$
Натрий-цитратный буфер (pH 5,5)	
Цитрат натрия	25,5 г
Дистиллированная вода	До 100 $см^3$
Раствор люминола	
Люминол	17,7 мг
Человеческий сывороточный альбумин	50 мг
Буфер HEPES (Sigma)	596 мг
Дистиллированная вода	До 100 $см^3$

4.7. Получение и культивирование клеточных культур

4.7.1. Получение первичных клеточных культур

Выделение перитонеальных макрофагов мыши

Клетки выделяют из перитонеальной полости мышей за сутки до начала эксперимента. Перитонеальные макрофаги мыши получают с помощью промывания брюшной полости раствором фосфатно-солевого буфера. Мышей эвтаназируют ингаляцией CO_2, затем асептически вскрывают брюшину и промывают брюшную полость 4—6 $см^3$ ФСБ, используя пинцет и пипетку. Для исключения адгезии клеток к пластику пробирку с суспензией перитонеальных клеток держат на ледяной бане. Суспензию клеток перитонеальной полости мыши центрифугируют при 250 g 10 мин, затем убирают надосадочную жидкость, лизируют эритроциты добавлением 1 $см^3$ деионизованной воды на 15 с с тщательным перемешиванием. Восстанавливают солевой баланс раствора добавлением 1 $см^3$ 2-кратного ФСБ, снова центрифугируют и убирают надосадочную жидкость. После этого добавляют ППС на основе DMEM, подсчитывают количество клеток в камере Горяева, доводят концентрацию до $3—5 \times 10^6$ клеток/$см^3$, высевают в плоскодонный 96-луночный планшет для культур тканей и оставляют на 24 ч до формирования монослоя.

Выделение альвеолярных макрофагов морской свинки

Суспензию интерстициальных легочных клеток получают по методу [Holt et al., 1985] в модификации [Lyadova et al., 1998]. После анестезии гексеналом (5 мг/мышь) кровеносную систему через правый желудочек сердца перфузируют раствором Версена с антибиотиками (100 ед./$см^3$ пенициллина и 100 мкг/$см^3$ стрептомицина) до молочно-белой окраски легочной ткани. Для удаления бронхоальвеолярных клеток легкие несколько раз промывают этим же раствором через канюлированный надрез в трахее. Легочные доли измельчают глазными ножницами до кусочков размером 1—2 $мм^3$ и помещают в ППС на основе среды RPMI 1640, содержащую 150 ед./$см^3$ коллагеназы, 50 ед./$см^3$ ДНК-азы и антибиотики (гентамицин 100 мкг/$см^3$ или пенициллин 100 мкг/$см^3$), из расчета 5 $см^3$ среды/мышь. После инкубации в течение 90 мин в CO_2-инкубаторе полученный дезинтеграт для улучшения моноклеточности интенсивно пипетируют. Суспензию клеток трижды промывают ФСБ с антибиотиками (гентамицин 100 мкг/$см^3$ или пенициллин 100 мкг/$см^3$), ресуспендируют в среде 199 с 10 % FCS и антибиотиками (гентамицин 100 мкг/$см^3$ или пенициллин 100 мкг/$см^3$), а затем инкубируют в культу-

ральных флаконах Costar (75 $см^3$) в CO_2-инкубаторе (60 мин) из расчета 20—30 × 10^6 легочных клеток в 8—10 $см^3$ на флакон.

Дальнейшую отмывку от неприлипших клеток и перевод макрофагов из монослоя в суспензию проводят в среде DMEM без антибиотиков так же, как описано выше для перитонеальных макрофагов.

Получение спленоцитов мыши

Клетки получают в день эксперимента. Мышей эвтаназируют ингаляцией CO_2, затем асептически вскрывают брюшную полость и изолируют селезенку. Селезенку стерильно гомогенизируют через капроновый фильтр в среду РПМИ-1640, дважды центрифугируют полученную суспензию спленоцитов при 250 g по 10 мин, ресуспендируют в ППС на основе РПМИ-1640 до конечной концентрации 5 × 10^6 клеток/$см^3$ и вносят в плоскодонный 96-луночный планшет для культур тканей. Клеточную суспензию спленоцитов используют как источник лимфоцитов.

Получение лейкоцитов и мононуклеаров периферической крови человека

Клетки получают в день эксперимента. Лейкоциты человека получают из периферической крови здоровых доноров методом осаждения крови в 1 %-м растворе желатина. Периферическая венозная кровь в количестве 5 $см^3$ забирается в пробирку, содержащую гепарин из расчета 10 ед. на 1 $см^3$ крови. Гепаринизированная кровь смешивается с 1 %-м раствором желатина в среде-199 или среде РПМИ-1640 в равных объемах и инкубируется 30 мин при 37 °С. После осаждения эритроцитов надосадок забирается и трижды отмывается раствором Хенкса без фенолового красного при 250 g по 10 мин. После последней отмывки клеточный осадок ресуспензируют в ППС на основе РПМИ-1640 до конечной концентрации 5 × 10^6 клеток/$см^3$ и помещают в 96-луночный плоскодонный планшет для культур клеток по 100 $мм^3$ в лунку. Клеточную суспензию лейкоцитов используют как источник нейтрофилов.

Мононуклеары человека получают из венозной крови здоровых доноров методом центрифугирования в градиенте плотности фиколл-верографина, состоящем из смеси фиколла и верографина плотностью 1,077. Периферическую венозную кровь в количестве 5 $см^3$ забирают в стерильную пробирку, содержащую гепарин из расчета 25 ед. на 1 $см^3$ крови. Гепаринизированную кровь разводят средой 199 или средой РПМИ-1640 в равных объемах, аккуратно с помощью пипетки по стенке пробирки наслаивают ее на 3 $см^3$ фиколл-верографина и центрифугируют 45 мин при 400 g и температуре 21 °С на центрифуге с горизонтальным (бакетным) ротором. Затем аккуратно собирают пипеткой слой мо-

нонуклеаров (белое кольцо, образующееся на разделе фаз между градиентом плотности и плазмой крови) и трижды отмывают средой 199 или средой РПМИ-1640 центрифугированием при 1 000 g и температуре 4 °С в течение 5 мин. Дополнительно освобождаются от эритроцитов, ресуспендируя мононуклеары в 2 $см^3$ лизирующего раствора с последующим осаждением и двукратным отмыванием средой 199. После последней отмывки клеточный осадок ресуспендируют в ППС на основе РПМИ-1640 до концентрации $2—3 \times 10^6$ кл/$см^3$ и вносят в плоскодонный 96-луночный планшет для культур тканей. Клеточную суспензию мононуклеаров используют как источник лимфоцитов.

4.7.2. Ведение и подготовка перевиваемых клеточных культур к тестированию

В тестах по оценке безопасности наноматериалов используются в качестве моделей следующие клеточные линии: мышиные макрофагоподобные клетки J774.A1, мышиные фибробласты L929, эмбриональные мышиные фибробласты линии Balb/3T3 (линия 3T3), человеческие моноцитарные линии THP-1 и HL-60, человеческая лимфоидная линия K-562.

Клетки готовят за 24 ч до тестирования. Суспензионные клеточные линии разводят свежей ППС на основе D-MEM до концентрации $1—4 \times 10^5$ клеток/$см^3$ и вносят по 100 $мм^3$ в лунки 96-луночного планшета. Для подготовки адгезивных клеток во флакон, содержащий клеточный монослой, вносят 5 $см^3$ раствора трипсин/ЭДТА и инкубируют 10 мин. После удаления раствора трипсин/ЭДТА клетки снимают с пластиковой подложки интенсивным встряхиванием флакона и затем смывают 10 $см^3$ раствора Хенкса без фенолового красного (Sigma). Полученную суспензию клеток центрифугируют при 500 g 10 мин, помещают в свежую питательную среду в концентрации $1—4 \times 10^5$ клеток/$см^3$, вносят в лунки 96-луночного планшета и инкубируют 24 ч для кондиционирования и формирования монослоя в стандартных условиях.

4.8. Проведение тестирования безопасности наноматериалов in vitro с использованием клеточных культур

4.8.1. Подготовка клеточных культур и образцов наноматериалов к тестированию и внесение образца наноматериала в культуру

4.8.1.1. Исследования безопасности наноматериалов *in vitro* проводятся как на первичных, так и на перевиваемых клеточных культурах. В

случае использования перевиваемых клеточных линий допускается использование только стандартизированных культур, полученных из аккредитованных источников.

4.8.1.2. В случае использования первичных клеточных культур они должны быть получены из здоровых половозрелых животных, прошедших карантин в течение не менее 10 дней. Можно использовать как линейных (мыши линий СВА, С57В1/6 и др.), так и нелинейных животных. В случае использования линейных животных необходимо указать линию животных.

4.8.1.3. Для получения первичных клеточных культур используют стандартные методики, рекомендованные для конкретного вида клеток и приведённые в разделе 4.7.1.

4.8.1.4. Для унификации исследований первичные и перевиваемые клеточные культуры (в дальнейшем именуемые клетки-мишени) на протяжении всех экспериментов культивируют в стандартных условиях (при 37 °С, 5 % CO_2 и 95 % влажности), в стандартных питательных средах, которые рекомендованы в паспорте культуры для каждого конкретного вида клеток. Среды стерилизуют холодной фильтрацией через фильтры 0,22 микрон. При подготовке перевиваемых клеточных культур к экспериментам используют стандартную методику пересева, изложенную в разделе 4.7.2.

4.8.1.5. Непосредственно перед экспериментом клетки стандартизируются по концентрации (рекомендованной для конкретного метода и вида клеток) с помощью подсчета клеток в камере Горяева с использованием 0,5 %-го раствора трипанового синего в ФСБ. Разброс по концентрации клеток в сравниваемых группах не должен превышать ±10 %. Количество повторов в группе должно быть менее не менее 5, чтобы можно было оценить статистическую достоверность результатов.

4.8.1.6. Количество вносимого наноматериала рассчитывают на кубический сантиметр полной питательной среды. Для выражения количества наноматериала используют единицы массы наноматериала (мг). Дополнительно для выражения количества наноматериала можно использовать такие параметры, как число частиц в единице объёма питательной среды ($см^3$) или общая площадь поверхности частиц в единице объёма питательной среды ($м^2/см^3$).

4.8.1.7. Наноматериалы, предоставленные для тестирования в сухом виде (в виде порошков) диспергируются в соответствующей питательной среде. Допускается использование только физических методов диспергирования (встряхивание, перемешивание, обработка ультразву-

ком). Использование детергентов и органических растворителей для диспергирования наночастиц в общем случае не допускается.

4.8.1.8. Если наноматериалы находятся в растворителе или на носителе или растворитель или носитель необходим для получения их дисперсий, то в отдельном ряде тестов проводятся исследования цитотоксичности самого растворителя (носителя), который также добавляется в среду культивирования в той же дозировке, что и в составе исследуемого образца наноматериала.

4.8.2. Ход тестирования

4.8.2.1. Общая продолжительность воздействия наноматериалов на клетки-мишени варьирует в зависимости от вида клеток-мишеней и типа экспериментов и может составлять от 24 ч до 14 дней (для непролиферирующих и слабопролиферирующих клеточных культур), при этом учитывается жизнеспособность клеток, изменение их пролиферативной способности и функциональной активности.

4.8.2.1. Подбор концентраций наноматериала, вносимого в культуру, осуществляется на основе предварительной информации производителя. Используемый диапазон концентраций (доз) тестируемого материала должен перекрывать не менее трёх порядков величины, начиная от недействующих концентраций и до концентраций, вызывающих стойкие изменения в клетках и (или) их гибель.

4.8.2.2. Если из-за низкой цитотоксичности испытуемого наноматериала не детектируется гибель клеток или снижение их жизнеспособности и функциональной активности, то в отчёте о тестировании указывается максимальная и минимальная дозы наноматериала, которые были добавлены в среду культивирования.

4.9. Оценка цитотоксических свойств наноматериалов

4.9.1. Оценка цитотоксичности с помощью МТТ

Принцип метода МТТ основан на способности фермента сукцинатдегидрогеназы митохондриальной мембраны клеток млекопитающих восстанавливать желтую соль 3-[4,5-диметилтиазол-2-ил]-2,5-дифенилтетразолия бромид (МТТ) до кристаллов формазана фиолетового цвета, накапливающихся в результате этой реакции в цитоплазме живых клеток. Таким образом, по интенсивности накопления кристаллов формазана в цитоплазме можно судить об уровне митохондриального дыхания клетки, что является показателем ее жизнеспособности. Количество об-

разуемого формазана в клеточном монослое пропорционально имеющемуся количеству живых клеток. Безопасность наноматериалов оценивают по величине ингибирующего эффекта наночастиц на пролиферацию и жизнеспособность эукариотических клеток-мишеней.

Выбор клеток-мишеней зависит от предполагаемых биологических эффектов наночастиц, заявленных их производителями. Чаще всего в качестве клеток-мишеней используют перевиваемые клеточные культуры: мышиные фибробластоы L929, мышиные макрофагоподобные клетки J774.1A или эпителиальные клетки человека HeLa S3.

Мышиные фибробласты L929 культивируют в ППС на основе DMEM. Для эксперимента клетки L929 пересевают в соответствии со стандартной процедурой (раздел 4.7.2) в 96-луночный плоскодонный планшет для культур клеток в ППС в концентрации 2×10^5 клеток/см^3 по 100 мм^3 в лунку.

Наноматериалы подготавливают и вводят в культуру клеток, как описано в разделе 4.8.1. Образцы наноматериалов разводят в ППС. Обычно при первичном исследовании образца используют титрование шагом от концентрации 10 мг/см^3 до пикограммовых концентраций. Затем раститрованный образец добавляют к монослою клеток (по 100 мм^3 в лунку) и проводят культивирование клеток в стандартных условиях (37 °С, 5 % CO_2, 95 % влажности). В качестве контроля используется среда или растворитель (носитель) образца (в случае его применения), который также добавляется в среду культивирования в той же концентрации, что и в составе исследуемого образца наноматериала.

Через 24, 48, 72, 96 и 120 ч после добавления препаратов наноматериалов в каждую лунку добавляют по 10 мм^3 раствора МТТ в ФСБ (5 мг/см^3), инкубируют 4 ч и затем вносят 50 мм^3 лизирующего буфера на основе ДСН (табл. 2) для лизиса клеточного монослоя и растворения фиолетовых кристаллов формазана в цитоплазме клеток. Через 18 ч инкубации при комнатной температуре определяют интенсивность фиолетового окрашивания по оптической плотности раствора на планшетном спектрофотометре при длине волны 595 нм. Оценку результатов теста МТТ проводят путем сопоставления оптической плотности в опытных и контрольных лунках. Величина оптической плотности пропорциональна количеству живых клеток в лунках. По изменению оптической плотности судят о цитотоксической активности препарата. Достоверность разницы оптической плотности по сравнению с контролем определяют по критерию Стьюдента. Возможное негативное воздействие наноматериа-

ла на жизнеспособность клеток считается выявленным при установлении различия на уровне значимости $P < 0,05$.

4.9.2. Оценка цитотоксичности путем определения активности лактатдегидрогеназы

Лактатдегидрогеназа (LDГ) является стабильным цитозольным ферментом. При повреждении клеточной мембраны (клеточный лизис или некроз) LDГ высвобождается во внеклеточное пространство. Таким образом, по активности LDГ в бесклеточном супернатанте можно судить о количестве погибших клеток. Активность LDГ определяют колориметрическим методом с использованием набора CytoTox 96 фирмы «Промега».

Принцип метода определения активности LDГ основан на способности LDГ восстанавливать лактат в пируват, превращая при этом NAD^+ в $HADH/H^+$. Активность LDГ определяется в два этапа. На первом этапе LDГ катализирует превращение лактата в пируват и восстановление NAD^+ в $NADH/H^+$. На втором этапе фермент диафораза, используя образовавшийся на первом этапе $NADH/H^+$, катализирует восстановление желтой соли тетразолия INT в красный формазан. Таким образом, по интенсивности окраски можно судить об активности внеклеточной LDГ. Негативное воздействие наноматериалов оценивают по величине их воздействия на целостность мембран клеток, измеряемой по активности появляющейся во внеклеточной среде LDГ.

В качестве клеток-мишеней используют клетки перевиваемых линий, указанные в разделе 4.9.1. Подготовку клеток к эксперименту, разведение и внесение образцов наноматериалов проводят, как в разделе 4.9.1.

Через 24, 48, 72, 96 и 120 ч после добавления препаратов наноматериалов из каждой лунки отбирают 0,05 $см^3$ супернатанта для измерения активности LDГ. Реагент Mix substrat из набора, содержащего лактат и NAD^+, смешивают с равным количеством реагента assay buffer, содержащего фермент диафоразу. 0,05 $см^3$ этой смеси вносят в каждую лунку плоскодонного 96-луночного планшета. Туда же вносят по 0,05 $см^3$ исследуемого супернатанта. Планшет инкубируют 30 мин при комнатной температуре. Через 30 мин определяют интенсивность окрашивания по оптической плотности раствора на планшетном фотометре при длине волны 490 нм.

Оценку результатов теста проводят путем сопоставления оптической плотности в опытных и контрольных лунках. Величина оптической

плотности пропорциональна количеству погибших клеток. Достоверность разницы оптической плотности опытного образца по сравнению с контролем определяют по критерию Стьюдента. Негативное воздействие наноматериала на жизнеспособность клеток считается выявленным при установлении различия на уровне значимости $P < 0,05$.

4.9.3. Оценка цитотоксичности путем определения концентрации АТФ в лейкоцитах

АТФ является маркером жизнеспособности клеток и необходимым компонентом для поддержания жизнеспособности клеток, ее наличие необходимо для всех метаболических процессов внутри клетки. Уровень АТФ строго регулируется в здоровых клетках и резко уменьшается, когда клетки погибают. Например, быстрое уменьшение концентрации АТФ происходит в случае апоптоза или некроза клеток, поэтому определение концентрации АТФ является индикатором цитостатического или пролиферационного воздействия на клетку. Для проведения исследования используют тест-набор ATP Determination Kit (A22066), Invitrogen или аналог.

В качестве клеток-мишеней можно использовать как клетки перевиваемых линий, так и первичные культуры клеток, полученные от лабораторных животных. Подготовку клеток к эксперименту, разведение и внесение образцов наноматериалов проводят, как указано в разделе 4.8.1.

Приготовление реагентов:

1) Приготовление реакционного буфера.

0,5 $см^3$ 20-кратного глицинового буфера (содержащего 500 мМ глицина, 100 мМ $MgSO_4$, 2 мМ ЭДТА и 2 мМ азида натрия, pH 7,8) растворить в 9,5 $см^3$ деионизованной воды.

2) Приготовление раствора субстрата (10 мМ D-люциферин): 1 $см^3$ рабочего раствора реакционного буфера добавить во флакон, содержащий 3 мг лиофилизированного D-люциферина. Хранить в темноте до использования в течение не более 2 недель при температуре –20°С.

3) Приготовление 100 мМ раствора дитиотреитола (ДТТ).

25 мг ДТТ растворить в 1,6 $см^3$ дистиллированной воды. Разлить в микропробирки по 100 $мм^3$, хранить при температуре –20°С от 6 до 12 месяцев. Размороженный раствор держат на льду или при –4°С до использования.

4) Приготовление стандарта АТФ.

Раствор АТФ низкой концентрации готовится из готового 5 мМ раствора АТФ в ТЕ буфере (Sigma). Концентрация и объем раствора зависят от чувствительности люминометра и объема лунки используемого планшета. Обычно готовят стандарты АТФ с концентрациями от 1 нМ до 1 мкМ. Стандарт можно хранить несколько недель при температуре –20° С.

5) Приготовление реакционного раствора.

0,5 $см^3$ 20-кратного буфера из готового реакционного набора (5 $мг/см^3$ люциферазы в 25 мМ трис-ацетате, 0,2 М сульфата аммония, 15 % глицерола и 30 % этиленгликоля, 0,1 $см^3$ 100 мМ ДТТ, 0,5 $см^3$ 10 мМ D-люциферина, 2,5 $см^3$ рекомбинантной люциферазы, pH 7,8) растворить в 8,9 $см^3$ дистиллированной воды. Аккуратно перемешать, не встряхивая резко, т. к. фермент легко может денатурировать. Готовый раствор можно хранить несколько дней при 2—6 °С в темноте.

6) Приготовление стандартов.

Для построения калибровочной кривой, позволяющей определить количество АТФ в испытуемом растворе, приготавливают серию двукратных разведений известного количества АТФ в растворе.

Проведение реакции

Для тестов *in vivo* используют лейкоциты, выделенные из животных сразу после их обработки аэрозолями наноматериалов, как описано в разделе 4.2, и лейкоциты интактных животных, которые инкубируют с различными концентрациями наноматериалов, как описано в разделе 4.8.1. В этом случае образцы инкубируют 18—24 ч при 37 °С в присутствии 5 % CO_2 во влажной атмосфере (тест *in vitro*). Реакционный раствор вносят по 0,1 $см^3$ в лунки 96-луночного планшета. В контрольных лунках измеряют фоновую люминесценцию реакционного раствора. В опытные лунки вносят по 0,1 $см^3$ клеточной взвеси с концентрацией 1×10^6 $кл/см^3$. В лунки стандартов вносят по 0,09 $см^3$ питательной среды и 0,01 $см^3$ разведений стандарта АТФ, как описано в разделе 4.8.1.

Планшет устанавливают в плашечный термостатируемый универсальный сканер флюоресцентных сигналов Victor (Perkin Elmer) и производят измерения.

Оценку результатов теста проводят путем сопоставления концентрации АТФ в лунках, содержащих опытные и контрольные (не подвергнутые действию наноматериалов) клетки. По степени снижения концентрации АТФ в опытных лунках судят о цитотоксической активности препарата. Достоверность разницы опыта по сравнению с контролем определяют по критерию Стьюдента. Искомое воздействие наноматериалов

териала на жизнеспособность клеток считается выявленным при установлении различия на уровне значимости $P < 0,05$.

4.9.4. Оценка влияния наноматериалов на функциональную активность макрофагов

Тестирование наноматериалов осуществляется путем определения их влияния на различные функции макрофагов: продукцию активных форм кислорода, активность ферментов, участвующих в «респираторном взрыве», способность к дифференцировке моноцитов в зрелые макрофаги, уровень синтеза провоспалительных цитокинов (в частности, фактора некроза опухоли-альфа).

Определение уровня активных форм кислорода по уровню восстановления нитросинего тетрозолия в НСТ-тесте

Для оценки респираторного взрыва в макрофагах наиболее простым и в то же время очень надежным является НСТ-тест. Принцип метода заключается в способности супероксидных радикалов, образующихся при активации макрофагов, восстанавливать нитросиний тетразолий (НСТ) до образования нерастворимых окрашенных зерен диформазана. Таким образом, по интенсивности накопления кристаллов диформазана в цитоплазме можно судить об уровне синтеза супероксида, что является показателем функциональной активности фагоцитов. Безопасность наноматериалов оценивают по величине их ингибирующего эффекта на синтез активных форм кислорода.

В качестве клеток-мишеней используют мышиные макрофагоподобные клетки J774.1A, первичные мышиные перитонеальные и альвеолярные макрофаги, нейтрофилы периферической крови человека. Клетки J774.1A и мышиные макрофаги культивируют в ППН на основе DMEM. Для эксперимента используют суточные клетки J774.1A, как описано в разделе 4.7.2, первичные мышиные макрофаги получают не более чем за сутки до начала анализа, как описано в разделах 4.3, 4.7.1.

Нейтрофилы периферической крови культивируют в ППС на основе РПМИ-1640 и получают в день эксперимента, как описано в разделе 4.7.1.

Образцы наноматериалов и контроль разводят и вносят в культуры клеток, как указано в разделе 4.8.1. Через 24 и 48 ч после добавления образцов наноматериалов клетки-мишени отмывают от среды культивирования раствором Хенкса без фенолового красного и добавляют к ним раствор НСТ в ФСБ с концентрацией 1 мг/см^3 по 0,1 см^3 в лунку. Одновременно с НСТ добавляют активаторы респираторного взрыва. В ка-

честве активаторов используют опсонизированный зимозан и/или активатор протеинкиназы С форболмиристат ацетат (ФМА). Для приготовления опсонизированного зимозана его суспендируют в ФСБ в концентрации 20 мг/см^3 и кипятят на водяной бане 30 мин, затем дважды центрифугируют в ФСБ, убирают супернатант и добавляют к осадку соответствующую сыворотку крови (к мышиным клеткам – мышиную сыворотку от 10 мышей, к человеческим – смешанную человеческую сыворотку от 10 доноров) до конечной концентрации зимозана в сыворотке – 20 мг/см^3. Смесь инкубируют 45 мин при 37 °С периодически встряхивая, затем трижды отмывают раствором ФСБ и ресуспендируют в нем до концентрации 20 мг/см^3.

ФМА для активации фагоцитов используют в концентрации 100 нг/см^3 в ФСБ.

В опытные лунки добавляют по 50 мм^3 суспензии опсонизированного зимозана или раствора ФМА, а в контрольные – по 50 мм^3 раствора Хенкса без фенолового красного. Планшет инкубируют 30 мин в стандартных условиях (37 °С, 5 % CO_2, 95 % влажности). После инкубации клетки с образовавшимися в цитоплазме зернами диформазана осторожно, но тщательно трижды отмываются от раствора НСТ и зимозана раствором Хенкса без фенолового красного. Планшет высушивают и клеточный монослой растворяют до 80 °С диметисульфоксидом (ДМСО) по 100 мм^3 на лунку. Определяют интенсивность окрашивания по оптической плотности раствора на планшетном фотометре при длине волны 540 нм.

Оценку результатов теста проводят путем сопоставления оптической плотности в опытных и контрольных лунках. Величина оптической плотности коррелирует с уровнем продукции супероксида. По изменению оптической плотности судят о наличии негативного влияния наноматериала на синтез активных форм кислорода. Достоверность разницы оптической плотности в опытных лунках по сравнению с контролем определяют по критерию Стьюдента. Негативное воздействие наноматериала на функциональную активность клеток считается выявленным при установлении различия на уровне значимости $P < 0,05$.

Определение спонтанной и индуцированной хемилюминесценции

«Респираторный взрыв» в фагоцитах может быть оценен также путём измерения спонтанной и индуцированной активаторами (опсонизированным зимозаном или ФМА) хемилюминесценции. Принцип метода основан на способности кислородных радикалов вызывать хемилюминесценцию – слабое свечение, которое существенно усиливается люми-

нофорами – люминолом, люцигенином и др. Первый преимущественно позволяет идентифицировать образование перекиси водорода и гипохлорной кислоты, второй – супероксидного радикала. При взаимодействии с активными формами кислорода люминофоры переходят в возбужденное состояние и при возвращении в исходное испускают квант света, регистрируемый с помощью люминометра.

В качестве клеток-мишеней используют мышиные макрофагоподобные клетки J774.1A, первичные мышиные перитонеальные и альвеолярные макрофаги, нейтрофилы периферической крови человека. Клетки J774.1A и мышиные макрофаги культивируют в ППН на основе DMEM. Для эксперимента используют суточные клетки J774.1A, как описано в разделе 4.7.2, первичные мышиные макрофаги получают не более чем за сутки до начала анализа, как описано в разделах 4.3, 4.7.1. Все манипуляции с клетками проводят, как в случае НСТ теста (см. выше).

Образцы наноматериалов и контроль разводят и вносят в культуры клеток, как указано в разделе 4.8.1. Через 24 и 48 ч после добавления образцов наноматериалов клетки отмывают от среды культивирования ФСБ и добавляют к ним по 50 мм^3 активатора (опсонизированного зимозана или раствора ФМА, приготовленных, как указано выше) и 50 мм^3 10^{-6} М раствора люминола (табл. 2). Раствор люминола готовят в день опыта, не хранят. Примечание: поскольку феноловый красный, находясь в реакционной среде, обладает способностью подавлять (тушить) окисление люминола, реакция хемилюминесценции выполняется в отсутствие этого индикатора. Разливание среды и добавление клеток выполняют при красном свете.

Помещают планшеты в планшетный сканер флюоресцентных и люминесцентных сигналов и проводят измерение хемилюминесценции при 37 °С в 0,1-минутные интервалы на протяжении 90—120 мин, фиксируя динамику числа импульсов в минуту (СРМ) в виде кривой. Результат хемилюминесценции оценивается по максимальному значению на кинетической кривой, построенной счетчиком. Измеряется спонтанная (без активатора) и индуцированная (с активатором) хемилюминесценция. По значению СРМ судят об уровне синтеза активных форм кислорода и о наличии негативного влияния на него наноматериала. Достоверность разницы хемилюминесценции в опытных лунках по сравнению с контролем определяют по критерию Стьюдента. Искомое воздействие наноматериала на функциональную активность клеток считается выявленным при установлении различия на уровне значимости $P < 0,05$.

4.9.5. Определение активности ферментов, участвующих в «респираторном взрыве»

Определение активности миелопероксидазы в фагоцитирующих клетках

Принцип метода основан на способности фермента фагоцитов миелопероксидазы разлагать перекись водорода с образованием кислородных радикалов. Система миелопероксидазы является одной из самых мощных бактерицидных систем фагоцитирующей клетки. При участии миелопероксидазы происходит образование таких бактерицидных агентов, как перекись водорода, гипохлорная кислота и другие. Определение активности миелопероксидазы в фагоцитирующих клетках является одним из наиболее существенных тестов, позволяющих судить о бактерицидной активности фагоцитов.

В качестве клеток-мишеней используют мышиные макрофагоподобные клетки J774.1A, первичные мышиные перитонеальные и альвеолярные макрофаги, нейтрофилы периферической крови человека. Клетки J774.1A и мышиные макрофаги культивируют в ППН на основе DMEM. Для эксперимента используют суточные клетки J774.1A, как описано в разделе 4.7.2, первичные мышиные макрофаги получают не более чем за сутки до начала анализа, как описано в разделах 4.3, 4.7.1.

Образцы наноматериалов и контроль разводят и вносят в культуры клеток, как указано в разделе 4.8.1. Через 24 и 48 ч после добавления образцов наноматериалов клетки отмывают от среды культивирования раствором Хенкса без фенолового красного, добавляют к ним по 0,05 $см^3$ в лунку опсонизированного зимозана (раздел 4.9.4) и инкубируют 30 мин в стандартных условиях (37 °С, 5 % CO_2, 95 % влажности). После этого клеточный монослой дважды отмывается раствором Хенкса без фенолового красного и тестируется на активность миелопероксидазы.

Непосредственно перед тестированием готовят раствор ортофенилендиамина (ОФД) в цитратном буфере (pH 5,0) с концентрацией 0,4 $мг/см^3$. Далее 100 $мм^3$ 33 %-й перекиси водорода разводят 10 $см^3$ дистиллированной воды до 0,33 %-й концентрации. Затем 0,5 $см^3$ 0,33 %-й перекиси водорода добавляют в 10 $см^3$ раствора ОФД и полученный раствор вносится в лунки с монослоем фагоцитирующих клеток по 0,1 $см^3$. Планшет инкубируется при комнатной температуре 10 мин, затем реакция останавливается добавлением 10 % серной кислоты (по 100 $мм^3$ на лунку). Интенсивность окрашивания регистрируют по оптической плотности раствора при длине волны 490 нм на планшетном спек-

трофотометре против контрольной лунки, в которой используют раствор ОФД и серной кислоты без клеток. Величина оптической плотности пропорциональна активности миелопероксидазы. Таким образом, измеряется спонтанная (без активатора) и индуцированная (с активатором) активность фермента миелопероксидазы. Добавлением тестируемых наноматериалов оценивается их негативное действие на активность фермента миелопероксидазы. Каждый тест выполняется в трёх повторах. Достоверность разницы оптической плотности в опытных лунках (клетки, обработанные наноматериалом) и в контрольных лунках определяют по критерию Стьюдента. Искомое воздействие наноматериала на активность миелопероксидазы считается выявленным при установлении различия на уровне значимости $P < 0,05$.

Определение активности кислой фосфатазы в фагоцитирующих клетках

Принцип метода основан на способности фермента кислой фосфатазы гидролизовать субстрат паранитрофенилфосфат с образованием цветного продукта. Кислая фосфатаза – один из ключевых ферментов бактерицидности фагоцитирующей клетки, содержащийся в азурофильных гранулах. Активность фермента определяет способность клетки к перевариванию и экстрацеллюлярному киллингу бактериальных агентов.

В качестве клеток-мишеней используют мышиные макрофагоподобные клетки J774.1A, первичные мышиные перитонеальные и альвеолярные макрофаги, нейтрофилы периферической крови человека. Клетки J774.1A и мышиные макрофаги культивируют в ППС на основе DMEM. Для эксперимента используют суточные клетки J774.1A, которые высевают, как описано в разделе 4.7.2, или первичные мышиные макрофаги, которые получают не более чем за сутки до начала анализа, как описано в разделах 4.3, 4.7.1.

Образцы наноматериалов и контроль разводят и вносят в культуры клеток, как указано в разделе 4.8.1. Через 24 и 48 ч после добавления образцов наноматериалов клетки отмывают от среды культивирования раствором Хенкса без фенолового красного, добавляют к ним по 50 мм^3 в лунку опсонизированного зимозана (раздел 4.9.4) и инкубируют 30 мин в стандартных условиях (37 °С, 5 % CO_2, 95 % влажности). После этого клеточный монослой дважды отмывают раствором Хенкса без фенолового красного и тестируют на активность кислой фосфатазы.

Непосредственно перед тестированием готовят раствор паранитрофенилфосфата, для чего 90 мг паранитрофенилфосфата и 0,31 г NaCl

растворяют в 37 $см^3$ натрий-цитратного буфера (раствор хранится в холодильнике не более 7—10 дней).

Перед постановкой реакции раствор паранитрофенилфосфата инкубируют 5 мин при 37 °С. В лунки плоскодонного 96-луночного планшета, содержащие клетки, вносится по 0,05 $см^3$ раствора паранитрофенилфосфата. Реакция проводится при 37 °С 30 мин, останавливается добавлением 0,2 М раствора NaOH по 0,1 $см^3$ на лунку.

Интенсивность окрашивания регистрируют по оптической плотности раствора при длине волны 405 нм на планшетном фотометре против контрольной лунки, в которой используют раствор паранитрофенилфосфата и NaOH без клеток. По величине оптической плотности судят об активности кислой фосфатазы. Таким образом измеряется спонтанная (без активатора) и индуцированная (с активатором) активность фермента кислой фосфатазы. По изменению активности фермента оценивается негативное действие на него тестируемых наноматериалов. Каждый тест выполняется в трёх повторах. Достоверность разницы оптической плотности в опытных лунках (клетки, обработанные наноматериалом) и в контрольных лунках определяют по критерию Стьюдента. Негативное воздействие наноматериала на активность миелопероксидазы считается выявленным при установлении различия на уровне значимости $P < 0,05$.

4.9.6. Оценка влияния наноматериалов на ФМА-индуцированную дифференцировку моноцитарных клеточных культур в макрофаги

Метод основан на способности суспензионных моноцитарных клеточных культур под влиянием некоторых агентов (например, активатора протеинкиназы С ФМА) дифференцироваться в зрелые макрофагоподобные клетки, приобретая при этом способность к адгезии к абиотическим поверхностям (стекло, пластик), как и все зрелые макрофаги. Таким образом, по количеству адгезированных клеток судят о глубине клеточной дифференцировки. Количество адгезированных клеток оценивается методом МТТ, изложенным в разделе 4.9.1. Количество фиолетового формазана в адгезированном клеточном монослое пропорционально количеству дифференцировавшихся клеток. Безопасность наноматериалов оценивают по величине негативного эффекта наночастиц на дифференцировку клеток-мишеней.

В качестве модельной системы используют перевиваемые суспензионные культуры человеческих моноцитарных клеток THP-1 и HL-60.

Клеточные линии THP-1 и HL-60 культивируют в ППС на основе РПМИ-1640. Для эксперимента клетки переносят в 96-луночный плос-

кодонный планшет для культур клеток в ППС в концентрации 2—5 × 10^5 клеток/$см^3$ по 0,1 $см^3$ в лунку. Дифференцировку клеток THP-1 и HL-60 в макрофаги индуцируют добавлением в ППС активатора протеинкиназы С форболмиристилацетата (ФМА) в конечной концентрации 30 нг/$см^3$ и затем культивируют в течение 3 дней в стандартных условиях (37 °С, 5 % CO_2, 95 % влажности).

Образцы наноматериалов разводят в ППС, как указано в разделе 4.8.1, и добавляют в клеточную суспензию одновременно с ФМА по 0,05 $см^3$ в лунку. По истечении срока инкубации лунки осторожно, но тщательно трижды отмывают от неприлипших (недифференцированных) клеток раствором Хенкса без фенолового красного. Количество прикрепленных к пластику клеток определяют в тесте МТТ, как описано в разделе 4.9.1.

Каждое тестирование проводят в трёх повторах. Оценку результатов проводят путем сопоставления оптической плотности в опытных и контрольных лунках. Величина оптической плотности пропорциональна количеству дифференцированных макрофагов. Достоверность разницы оптической плотности по сравнению с контролем определяют по критерию Стьюдента. Искомое воздействие наноматериала на дифференцировку клеток считается выявленным при установлении различия на уровне значимости $P < 0,05$.

4.9.7. Оценка влияния наноматериалов на продукцию макрофагами фактора некроза опухоли-альфа

Одним из важных звеньев функциональной активности фагоцитирующих клеток является способность к передаче клеточных сигналов, приводящих к синтезу провоспалительных цитокинов, основным из которых является фактор некроза опухоли-альфа (ФНО-α). Уровень синтеза ФНО-α определяют методом ИФА и с помощью ФНО-чувствительной клеточной линии мышиных фибробластов L929.

Определение продукции фактора некроза опухоли (ФНО-α) с помощью ФНО-чувствительной клеточной линии L929

Принцип метода основан на чувствительности мышиных фибробластов L929 к токсическому действию ФНО-α в присутствии актиномицина D. В качестве модельной клеточной системы для синтеза ФНО-α используют культуру мышиных макрофагоподобных клеток J774.1A, в качестве клеток-мишеней – культуру мышиных фибробластов L929.

Мышиные фибробласты L929 и макрофагоподобные клетки J774.1A культивируют в ППС на основе DMEM. Для эксперимента клетки пересевают в соответствии со стандартной процедурой (раздел 4.7.2) в 96-луночный плоскодонный планшет для культур клеток в ППС в концентрации 2×10^5 клеток/см^3 по 100 мм^3 в лунку. Образцы наноматериалов разводят в ППС, как указано в разделе 4.8.1.

В качестве активатора синтеза ФНО-α используют липополисахарид (ЛПС) *Escherichia coli* в конечной концентрации 100 нг/см^3, которая является субоптимальной для активации синтеза ФНО-α макрофагами. Тест ставится в два этапа. На первом этапе индуцируют синтез ФНО-α макрофагами J774.1A в присутствии ЛПС и наночастиц. На втором этапе оценивают количество ФНО-α в супернатанте макрофагов.

К монослою макрофагов в лунки 96-луночного планшета добавляют по 0,05 см^3 ЛПС *E. coli* до конечной концентрации 100 нг/см^3 и 0,05 см^3 разведенных наночастиц. Планшет культивируют при 37 °С, 5 % CO_2 и 95 % влажности. Через 24 и 48 ч отбирают супернатант макрофагов и используют для определения количества ФНО-α в тесте на фибробластах L929.

Для этого к монослою фибробластов L929 в лунки 96-луночного планшета добавляют по 0,05 см^3 полученных супернатантов и 0,05 см^3 раствора актиномицина D до конечной концентрации 1 мкг/см^3. Планшет культивируют при 37 °С, 5 % CO_2 и 95 % влажности 24 ч.

Для определения изменения продукции фактора некроза опухоли (ФНО-α) с помощью ФНО-чувствительной клеточной линии L929 через 24 ч определяют количество погибших клеток L929 с помощью теста МТТ, как описано в разделе 4.9.1. Каждый тест выполняют в трёх повторах. Величина оптической плотности пропорциональна концентрации ФНО-α в супернатанте макрофагов. Достоверность разницы оптической плотности по сравнению с контролем определяют по критерию Стьюдента. Негативное воздействие наноматериала на образование ФНО-α считается выявленным при установлении различия на уровне значимости $P < 0,05$.

Определение продукции фактора некроза опухоли (ФНО-α) методом ИФА

Принцип метода основан на выявлении комплекса антиген-антитело с помощью ферментативной реакции окисления субстрата (ОФД). Степень окисления субстрата оценивается колориметрически, по интенсивности окраски судят о количестве ФНО-α в клеточном супер-

натанте. В качестве модельной клеточной системы для синтеза ФНО-α используют культуру мышиных макрофагоподобных клеток J774.1A.

Клетки J774.1A культивируют в ППС на основе DMEM. Для эксперимента клетки пересевают в соответствии со стандартной процедурой (раздел 4.7.2) в 96-луночный плоскодонный планшет для культур клеток в ППС в концентрации 2×10^5 клеток/см^3 по 100 мм^3 в лунку. Образцы наноматериалов разводят в ППС, как указано в разделе 4.8.1.

В качестве активатора синтеза ФНО-α используют ЛПС в конечной концентрации 100 нг/см^3.

К монослою макрофагов в лунки 96-луночного планшета добавляют по 0,05 см^3 ЛПС до конечной концентрации 100 нг/см^3 и 0,05 см^3 разведений наночастиц. Планшет культивируют при 37 °С, 5 % CO_2 и 95 % влажности. Через 24 и 48 ч отбирают супернатант макрофагов и используют для определения количества ФНО-α с помощью иммуноферментной тест-системы на основе моноклональных антител.

Реакцию ставят в 96-луночном полистироловом планшете из тест-системы с адсорбированными мышиными моноклональными антителами к ФНО-α. Дважды промывают каждую лунку планшета 200 мм^3 буфера для промывания из состава набора (ФСБ + 0,05 % Твин-20).

Калибровочный стандарт и исследуемые образцы супернатанта разводят буфером для разведения на основе ФСБ согласно инструкции к набору. Вносят по 0,1 см^3 разведенного стандарта в лунки планшета в двух повторах (первые два ряда). В остальные лунки планшета вносят по 0,1 см^3 исследуемых образцов супернатанта в дубликатах. Далее во все лунки вносят по 0,1 см^3 раствора биотинилированного коньюгата МАТ, разведенного буфером для разведения согласно инструкции к набору. Герметично закрывают планшет липкой лентой и инкубируют при встряхивании на шейкере при комнатной температуре 2 ч.

Удаляют содержимое лунок, трижды промывают лунки 200 мм^3 буфера для промывания и вносят в каждую лунку по 0,1 см^3 коньюгата проявляющего субстрата со стрептавидином, разведенного буфером для разведения согласно инструкции к набору. Инкубируют планшет при комнатной температуре 10—20 мин, пока интенсивность окраски минимальных разведений калибровочного стандарта не достигнет значений оптической плотности при 450 нм – 0,8—0,9. Останавливают реакцию добавлением 0,1 см^3 стоп-раствора. Измеряют интенсивность окрашивания по оптической плотности на планшетном фотометре при длине волны 450 нм против контрольных лунок. В качестве контроля используют лунки, содержащие только ППС и конъюгат МАТ.

Оценку результатов теста проводят путем сопоставления оптической плотности в опытных и контрольных лунках. Величина оптической плотности пропорциональна количеству ФНО-α. В присутствии ЛПС оценивают индуцированный синтез ФНО-α, а без него – спонтанный уровень синтеза ФНО-α. Безопасность наноматериалов оценивают по негативному влиянию на спонтанный и индуцированный уровень синтеза ФНО-α макрофагами.

Каждый тест выполняют в трёх повторах. Достоверность разницы оптической плотности опытного образца по сравнению с контролем определяют по критерию Стьюдента. Негативное воздействие наноматериала на жизнеспособность клеток считается выявленным при установлении различия на уровне значимости $P < 0,05$.

4.10. Оценка иммунотропного действия наноматериалов

Целью данной серии тестов является получение информации о воздействии наноматериалов на функциональную активность иммунокомпетентных клеток человека и животных, в частности, лимфоцитов. Изучение иммунотропного действия наноматериалов проводят с помощью реакции бласттрансформации лимфоцитов, оценки синтеза лимфоцитами интерферона-гамма, оценки продукции иммуноглобулина Е.

4.10.1. Оценка влияния наноматериалов на поликлональную активацию лимфоцитов в реакции бласттрансформации лимфоцитов

Интегральным тестом для оценки функционального состояния лимфоцитов является реакция спонтанной и индуцированной бласттрансформации лимфоцитов. Принцип метода основан на способности лимфоцитов к моно- и поликлональной активации (образованию бластных форм клеток) и пролиферации под действием многих неспецифических (митогенов) и специфических (антигенов) стимуляторов. Уровень поликлональной активации лимфоцитов оценивается радиометрически по интенсивности включения в клетки [^{3}H]-тимидина.

В качестве источника лимфоцитов в реакции бласттрансформации используют взвесь мононуклеаров (лимфоциты и моноциты) периферической крови человека либо спленоциты экспериментальных животных. Получение обоих видов клеток проводят, как описано в разделе 4.7.1. Лимфоциты культивируют в ППС на основе РПМИ-1640.

В качестве митогенов для неспецифической активации Т-лимфоцитов используют конканавалин А (Кон А) в конечной концентрации

5 мкг/см^3, для активации В-лимфоцитов – ЛПС в конечной концентрации 50 мкг/см^3. Для оценки негативного действия наноматериалов на фоне действия митогенов используют субоптимальную концентрацию митогенов. Субоптимальную дозу митогена определяют в предварительных экспериментах.

Образцы наноматериалов разводят в ППС, как описано в разделе 4.8.1.

При постановке реакции концентрацию мононуклеаров доводят до 5×10^6 кл/см^3. Реакцию ставят в 96-луночных плоскодонных планшетах в объеме 0,2 см^3. В опытные лунки вносят 0,1 см^3 мононуклеаров с указанной выше концентрацией клеток, 0,05 см^3 раствора митогена в соответствующей дозе и 0,05 см^3 наночастиц в соответствующих концентрациях. В контрольные лунки вместо наночастиц вносят ППС. Планшеты инкубируют от 48 до 120 ч в стандартных условиях (37 °С, 5 % CO_2, 95 % влажности). За 18 ч до окончания инкубации к клеткам добавляют меченый тритием тимидин в концентрации 1мкКи/лунку в объёме 0,3 см^3.

После окончания инкубации с помощью планшетного харвестера лимфоциты из лунок планшета переносят на стекловолокнистые или бумажные фильтры, которые после промывки водой и фиксации спиртом помещают в лунки планшета. Затем добавляют 0,1 см^3 сцинтилляционной жидкости для определения концентрации изотопа и измеряют их радиоактивность на планшетном сцинтилляционно-люминесцентном счетчике Top Count (Packard, США). Каждую пробу выполняют в 3 повторах и результаты по определению радиоактивности усредняют.

Оценку результатов опыта определяют по двум показателям: числу импульсов в минуту (СРМ) и индексу стимуляции, рассчитанному как отношение импульсов в минуту в присутствии митогена и без него. По уровню включения радиоактивной метки судят о степени поликлональной активации лимфоцитов. В присутствии митогена оценивают индуцированную поликлональную активацию лимфоцитов, а без митогена – спонтанную. Безопасность наноматериалов оценивают по негативному влиянию на спонтанную и индуцированную поликлональную активацию лимфоцитов. Сравнение результатов опытных (с наноматериалом) и контрольных тестов проводят с использованием t-критерия Стьюдента. Эффект наноматериала признаётся выявленным при уровне значимости различия $P < 0,05$.

4.10.2. Оценка влияния наноматериалов на продукцию лимфоцитами интерферона-гамма (ИНФ-γ) методом ИФА

Принцип метода основан на выявлении комплекса антиген-антитело с помощью ферментативной реакции окисления субстрата (ОФД). Степень окисления оценивается колориметрически, по интенсивности окраски судят о количестве ИНФ-γ в клеточном супернатанте. В качестве модельной клеточной системы для синтеза ИНФ-γ используют взвесь мононуклеаров (лимфоциты и моноциты) человека либо спленоциты экспериментальных животных. Получение обоих видов клеток проводят, как описано в разделе 4.7.1. Клетки культивируют в ППС на основе РПМИ-1640.

В качестве митогенов для активации синтеза ИНФ-γ лимфоцитами используют ФМА в конечной концентрации 100 нг/см^3 вместе с иономицином в конечной концентрации 1 мкг/см^3. Для оценки действия наноматериалов используют субоптимальную концентрацию активаторов, которую определяют в предварительном эксперименте. Для предварительной оценки субоптимальных концентраций активаторов определяют концентрацию, при которой отсутствует окисление субстрата (ОФД), что оценивается колориметрически.

Образцы наноматериалов разводят в ППС, как описано в разделе 4.8.1.

При постановке реакции концентрацию мононуклеаров доводят до 5×10^6 кл/см^3. Реакцию ставят в 96-луночных плоскодонных планшетах в объеме 0,2 см^3. В опытные лунки вносят 0,1 см^3 разведения мононуклеаров с указанной выше концентрацией клеток, 0,05 см^3 активаторов в вышеуказанных дозах и 0,05 см^3 дисперсии наночастиц в соответствующих концентрациях. В контрольные лунки вместо наночастиц вносят ППС. Планшеты инкубируют от 24 до 48 ч в стандартных условиях (37 °С, 5 % CO_2, 95 % влажности). Через 24 и 48 ч отбирают супернатант макрофагов и используют для определения количества ИНФ-γ.

Определение количества ИНФ-γ производят с помощью иммуноферментной тест-системы на основе моноклональных антител. Реакцию ставят в 96-луночном полистироловом планшете из тест-системы с адсорбированными мышиными или человеческими моноклональными антителами к ИНФ-γ. Промывают дважды каждую лунку планшета 200 мм^3 буфера для промывания (ФСБ + 0,05 % Твин-20).

Разводят стандарт и исследуемые образцы супернатанта буфером для разведения на основе ФСБ согласно инструкции к набору. Вносят по

0,1 см^3 разведенного стандарта в двух репликах в лунки планшета (первые два ряда). В остальные лунки планшета вносят по 0,1 см^3 исследуемых супернатантов в трёх повторностях. Далее во все лунки вносят по 0,1 см^3 раствора биотинилированного конъюгата МАТ, разведенного буфером для разведения согласно инструкции фирмы-производителя. Герметично закрывают планшет липкой лентой и инкубируют при встряхивании на шейкере при комнатной температуре 2 ч.

Удаляют содержимое лунок, трижды промывают лунки 0,2 см^3 буфера для промывания и вносят в каждую лунку по 0,1 см^3 коньюгата проявляющего субстрата со стрептавидином, разведенного буфером для разведения согласно инструкции фирмы-производителя.

Инкубируют планшет при комнатной температуре 10—20 мин, пока интенсивность окраски наименьших разведений стандарта не достигнет значений оптической плотности при 450 нм – 0,8—0,9. Останавливают реакцию добавлением 0,1 см^3 стоп-раствора. Определяют интенсивность окрашивания по оптической плотности раствора на планшетном фотометре при длине волны 450 нм против контрольной лунки, в которой содержится только ППС и конъюгат МАТ.

Оценку результатов теста проводят путем сопоставления оптической плотности в опытных и контрольных лунках. Величина оптической плотности пропорциональна количеству ИНФ-γ. В присутствии активаторов оценивают индуцированный синтез ИНФ-γ, а без них – спонтанный уровень синтеза ИНФ-γ. Безопасность наноматериалов оценивают по негативному влиянию на спонтанный и индуцированный уровень синтеза ИНФ-γ лимфоцитами.

Каждый опытный и контрольный тест выполняют в трёх повторностях. Достоверность разницы оптической плотности по сравнению с контролем определяют по критерию Стьюдента. Искомое воздействие наноматериала на жизнеспособность клеток считается выявленным при установлении различия на уровне значимости $P < 0,05$.

4.11. Оценка безопасности наноматериалов методом проточной цитофлюориметрии по качественным и количественным изменениям в клетках высших животных

Для оценки безопасности наноматериалов используют методы проточной цитофлюориметрии, которые основаны на считывании флюоресцентных сигналов с каждой клетки биологического образца, меченной моноклональными антителами к специфическим рецепторам или флюорохромными красителями. Методами проточной цитофлюоримет-

рии изучаются клетки иммунной системы, которые являются наиболее чувствительными к повреждающему действию наноматериалов или иных факторов.

Основными путями поступления наноматериалов в организм человека являются: ингаляционный, алиментарный и перкутанный. Поступая в организм человека, наноматериалы могут оказывать цитотоксическое действие на иммунную систему. Стратегия определения иммунотоксичности наноматериалов состоит в последовательном изучении состояния клеточных элементов иммунной системы в условиях действия наноматериалов на организм животных (схема эксперимента в разделах 4.2 и 4.3). Объектом для анализа являются клетки селезенки и перитонеальные макрофаги интактных и обработанных наноматериалами лабораторных животных.

4.11.1. Определение содержания Т- и В-лимфоцитов и соотношения Т-хелперов и цитотоксических Т-лимфоцитов

Центральное место в иммунных реакциях организма принадлежит лимфоцитам. Количественное нарушение субпопуляций лимфоцитов приводит к развитию иммунодефицитных состояний. В ходе медико-биологического тестирования наноматериалов производится определение абсолютного количества Т- и В-лимфоцитов, обеспечивающих развитие иммунного ответа, а также субпопуляций регуляторных Т-лимфоцитов (хелперов и цитотоксических лимфоцитов) после обработки животного наноматериалом.

Выявление субпопуляций лимфоцитов основано на способности специфических моноклональных антител связываться с антигенными детерминантами, которые экспрессированы лейкоцитами. Анализируется флуоресценция ограниченной популяции клеток, чтобы отличить положительно окрашенные клетки от неокрашенных. Результаты выражают в виде доли флуоресцирующих клеток в процентах от общего числа клеток.

Например, определяют количество Т-лимфоцитов (CD3+, т. е. несущих на своей поверхности CD3 рецепторы), В-лимфоцитов (CD19+), Т-хелперов (CD3+CD4+) и цитотоксических лимфоцитов (CD3+CD8+).

Анализируется содержание Т- и В-лимфоцитов и соотношения Т-хелперов и цитотоксических Т-лимфоцитов следующим образом. В пробирки вносят по 0,005 $см^3$ моноклональных антител к поверхностным рецепторам CD3, CD19, CD4, CD8, меченных разными флуорохромами (например FITC, PerCP, PE, APC). Добавляют по 0,1 $см^3$ суспензии

спленоцитов (1×10^6 кл/см^3). Исследуемые образцы тщательно перемешивают и инкубируют в темноте 15—30 мин при температуре (22 ± 4) °С.

Далее лизируют эритроциты с использованием FACS Lysing Solution, BD. Концентрированный лизирующий раствор предварительно разводят деионизованной водой в 10 раз. В каждую пробирку вносят по 2 см^3 рабочего раствора, смешивают на вортексе и инкубируют в темноте 10—12 мин (не больше!) при температуре 20—25 °С. Осаждают лейкоциты центрифугированием (200—300 g, 5 мин). Встряхивают клеточный осадок на вортексе и отмывают лейкоциты в 2 см^3 ФСБ с 0,1 % азидом натрия. Дважды осаждают лейкоциты центрифугированием (200—300 g, 5 мин). Вносят в каждую пробирку по 0,5 см^3 ФСБ с 0,1 % азидом натрия, перемешивают.

Затем фиксируют лимфоциты, для этого в каждую пробирку вносят по 500 мм^3 1 %-го раствора параформальдегида, хорошо перемешивают. Препараты хранят до проведения анализа при температуре 4 °С не более 24 ч.

Анализ подготовленных образцов проводят на проточном цитофлюориметре с использованием программного обеспечения (например, Cell Quest или Multiset).

Специфичность моноклональных антител гарантируется предприятием-изготовителем. Уровень неспецифического свечения контролируют по изотипическому контролю (флюоресценция должна отсутствовать).

Для количественного определения субпопуляций лимфоцитов строят стандартную зависимость с использованием пробирок TRUCount BD, содержащих известное количество флуоресцирующих частиц или аналог.

Эффект негативного воздействия наноматериала на содержание Т- и В-лимфоцитов и соотношение Т-хелперов и цитотоксических Т-лимфоцитов выявляют по достоверному увеличению/снижению данных показателей относительно контрольных значений у интактных доноров (здоровых, не подвергавшихся воздействию наноматериалов).

4.11.2. Выявление маркера ранней активации лимфоцитов

Для определения влияния наноматериалов на функциональное состояние лимфоцитов анализируют способность Т-клеток активироваться в ответ на стимуляцию *in vitro* фитогемагглютинином (ФГА), а В-клеток – в ответ на стимуляцию липополисахаридом (ЛПС). Один из признаков активации – появление антигена ранней активации CD69 на

поверхности лимфоцита. Принцип метода заключается в подсчете CD3+ клеток, экспрессирующих антиген ранней активации CD69 в ответ на стимуляцию *in vitro* ФГА и в учете CD19+CD69+ клеток в ответ на стимуляцию *in vitro* ЛПС. Сравнивают количество митоген-активированных CD69-позитивных Т- и В-лимфоцитов, выделенных из групп контрольных мышей и опытных групп животных, обработанных анализируемым наноматериалом. Низкий уровень экспрессии CD69 рецептора на поверхности Т- и В-лимфоцитов, стимулированных соответствующим митогеном, свидетельствует о снижении функциональной активности лимфоцитов под воздействием наноматериала.

Высокий уровень спонтанной активации клеток (увеличение CD69-позитивных Т- и В-лимфоцитов у мышей, обработанных наноматериалом), свидетельствует о гиперактивации клеток иммунной системы.

Возможно также сравнение количества CD69-позитивных Т- и В-лимфоцитов, стимулированных соответствующим митогеном, в присутствии и без наноматериала в среде. Снижение уровня экспрессии CD69 рецептора на поверхности митоген-активированных Т- и В-лимфоцитов за счет присутствия наноматериала в среде свидетельствует о нарушении функциональной активности лимфоцитов.

При анализе маркера ранней активации лимфоцитов используют внесенные по 0,1 $см^3$ в лунки планшета разведения лимфоцитов каждой из исследуемых групп мышей, затем добавляют питательную среду, растворы КонА, ЛПС и дисперсии наноматериала в питательной среде в соответствии со схемой (табл. 3).

Инкубируют планшет 18—24 ч при 37 °С, во влажной атмосфере, 5 % CO_2. Затем переносят по 0,1 $см^3$ исследуемых биологических образцов в соответственно промаркированные пробирки для цитометрического анализа FALCON.

После чего добавляют в пробирки по 1 $мм^3$ моноклональных флюорохром-конъюгированных антител: CD3 PerCP, CD19 APC, CD69 FITC. В отдельную пробирку добавляют 1 $мм^3$ изотипического контроля IgG1-FITC. Аккуратно перемешивают пробирки на вортексе в течение 10 с и помещают в темное место при комнатной температуре (18—20 °С) на 20—30 мин.

Таблица 3

Схема анализа маркера ранней активации лимфоцитов для одной группы мышей

Клеточная взвесь 1×10^6 кл/см^3	Питательная среда	ConA	ЛПС	Наноматериал (высокая концентрация)	Наноматериал (низкая концентрация)
0,100 см^3	0,110 см^3				
0,100 см^3	0,010 см^3	0,100 см^3			
0,100 см^3		0,100 см^3		0,010 см^3	
0,100 см^3		0,100 см^3			0,010 см^3
0,100 см^3	0,010 см^3		0,100 см^3		
0,100 см^3			0,100 см^3	0,010 см^3	
0,100 см^3			0,100 см^3		0,010 см^3

Затем лизируют эритроциты. Для этого в каждую пробирку вносят по 1 см^3 1 X Facs Lysing Solytion (BD), аккуратно перемешивают на вортексе в течение 10 с, инкубируют 10—12 мин в темноте при комнатной температуре (18—20 °С).

Затем осаждают лейкоциты центрифугированием при 300 g 5 мин. Удаляют надосадочную жидкость. Дважды отмывают лейкоциты в ФСБ (300 мм^3), 400 g, 5 мин.

Затем фиксируют лейкоциты. Для этого ресуспендируют клеточную взвесь, вносят в каждую пробирку по 500 мм^3 1 %-го раствора параформальдегида и встряхивают клетки на вортексе. Анализ проводят на проточном цитофлюориметре в программе Cell Quest Pro. Меченные моноклональными антителами образцы можно хранить при температуре 4 °С (в холодильнике) 24 ч.

Оценку негативного действия наноматериала *ex vivo* на функциональную активность Т- и В-лимфоцитов проводят на основании сравнения количества митоген-активированных CD69-позитивных Т- и В-лимфоцитов, выделенных из групп контрольных (интактных) мышей и обработанных анализируемым наноматериалом. Достоверное уменьшение Т- и В-лимфоцитов, несущих на своей поверхности CD69 рецептор, после стимулирования соответствующим митогеном свидетельствует о снижении функциональной активности лимфоцитов. Спонтанное увеличение у мышей, обработанных наноматериалом (по сравнению с интактными), CD69 позитивных Т- и В-лимфоцитов после культивирования клеток в среде свидетельствует о гиперактивации клеток иммунной системы.

Оценку негативного действия наноматериала *in vitro* проводят на основании сравнения количества CD69-позитивных Т- и В-лимфоцитов, стимулированных соответствующим митогеном в присутствии и без наноматериала в среде. Снижение уровня экспрессии CD69 рецептора на поверхности митоген-активированных Т- и В-лимфоцитов в присутствии наноматериала в среде по сравнению с количеством CD69-позитивных митоген-активированных Т- и В-лимфоцитов без добавления наноматериала в среду свидетельствует о нарушении функциональной активности лимфоцитов.

4.11.3. Оценка апоптотической и пролиферативной активности лейкоцитов

Апоптоз лимфоцитов – важнейший механизм иммунорегуляции от момента созревания и дифференцировки иммунокомпетентных клеток до этапа реализации механизмов врожденного и адаптивного иммунитета. Отсутствие адекватного апоптоза сопровождает лимфопролиферативную патологию. Усиление апоптоза лимфоцитов является причиной формирования иммунологической недостаточности. При проведении тестирования определяют процент апоптотических клеток в селезенке мышей после обработки их наноматериалом согласно разделам 4.2 и 4.3.

Спленоциты, выделенные из групп контрольных мышей и групп, обработанных анализируемым наноматериалом согласно разделу 4.7.1, разводят в среде RPMI-1640 до концентрации 10^6 кл/см^3 и в объеме 0,1 см^3 помещают в пробирки для проведения цитометрического анализа (например, Falkon). Отмывают в ФСБ 1 раз. Клетки фиксируют охлажденным до 4 °С 70° этиловым спиртом в течение не менее 1 ч (можно оставить препарат в фиксаторе до 24 ч). Спирт добавляют по каплям, тщательно перемешивая лейкоцитарную взвесь, во избежание образования конгломератов. Фиксированные образцы центрифугируют при 400 g 5 мин. Супернатант удаляют.

Тщательно перемешивают лейкоцитарную взвесь и добавляют пропидий йодид в концентрации 5 мкг/см^3 в 0,2 см^3 в ФСБ, содержащем 0,1 % тритона Х-100, 0,005 см^3 раствора РНК-азы и 0,1 % азид натрия. Пробы перемешивают, инкубируют в темноте 1 ч при комнатной температуре. Анализ проводят на проточном цитофлюориметре (FACSCalibur, BD или аналог) с аргоновым лазером при длине волны 488 нм в программе Cell Quest.

Анализируют 10 000 клеток, среди которых определяют процент гиподиплоидных (апоптотических) и пролиферирующих клеток с использованием программы Cell Quest.

Цитотоксичными считаются наноматериалы, индуцирующие после иммунизации животных апоптоз более чем у 10 % спленоцитов или снижающие до 15 % количество пролиферирующих клеток.

4.11.4. Оценка цитотоксического действия наноматериалов на лейкоциты периферической крови человека

Оценку цитотоксичности наноматериалов *in vitro* в методе проточной цитофлуориметрии проводят с использованием красителя 7-AAD (7-амино—актиномицин D). 7-AAD может использоваться вместе с флюорохромами ФИТЦ (флюоресцеин изотиоционат) и PE (фикоэритрин). Одновременное окрашивание клеток CD45 ФИТЦ (маркер всех кроветворных клеток лейкоцитов) и 7-AAD позволяет точно оценить количество жизнеспособных клеток.

Анализ проводят следующим образом. Разведения культуры донорских лейкоцитов человека, полученных согласно разделу 4.7.1, вносят в лунки 96-луночного планшета по 100 мм^3. Схема эксперимента представлена в табл. 4.

Таблица 4

Схема анализа цитотоксического действия наноматериалов на лейкоциты периферической крови человека

Клеточная взвесь 1×10^6 кл/см^3	Питательная среда	Наноматериал (высокая концентрация)	Наноматериал (низкая концентрация)
0,100 см^3	0,110 см^3		
0,100 см^3	0,100 см^3		
0,100 см^3	0,100 см^3		0,010 см^3

Планшеты инкубируют 24 ч при 37 °С, 5 % CO_2 во влажной атмосфере. Клеточную взвесь в каждой лунке тщательно перемешивают и переносят по 0,1 см^3 в маркированные пробирки для проведения цитофлюориметрического анализа Falcon. Добавляют 7-AAD и CD45 ФИТЦ из расчета по 0,005 см^3 раствора красителей на 1×10^6 клеток. Инкубируют 30 мин при 4 °С в темноте.

При необходимости лизируют эритроциты. Для этого в каждую пробирку вносят по 1 см^3 1 X Facs Lysing Solytion (BD), аккуратно перемешивают на вортексе в течение 10 с, инкубируют 10—12 мин в темноте при комнатной температуре (18—20 °С).

Осаждают лейкоциты центрифугированием при 300 g 5 мин. Удаляют надосадочную жидкость. Дважды отмывают лейкоциты в ФСБ (300 мм^3), 400 g, 5 мин.

Лейкоциты фиксируют путём добавления к ресуспендированной клеточной взвеси по 500 мм^3 1 %-го раствора параформальдегида, образцы встряхивают на вортексе.

Анализ проводят на проточном цитофлюориметре в программе Cell Quest Pro.

Цитотоксичным считается наноматериал, индуцирующий гибель более чем 18 % лейкоцитов через 18—24 ч после совместной инкубации *in vitro* при 37 °С при 5 % CO_2 во влажной атмосфере.

4.11.5. Определение цитолитической активности лимфоцитов

Литическая активность естественных киллеров – один из показателей иммунного статуса. Естественные киллеры – это несенсибилизированные большие гранулярные лимфоциты, осуществляющие независимый от антител и комплемента лизис широкого спектра клеток-мишеней – опухолевых, зараженных вирусами, поврежденных клеток. Естественные киллеры играют важную роль в иммунном надзоре за состоянием клеточной пролиферации и цитодифференцировки.

В качестве клеток-эффекторов (КЭ) используют спленоциты линейных мышей Balb/c, выделенные из групп контрольных мышей и групп, обработанных анализируемым наноматериалом. Для этого выделяют клетки селезенки, лизируют эритроциты, готовят клеточную суспензию $1{,}5 \times 10^5$ кл/см^3, как описано в разделе 4.7.1.

В качестве клеток-мишеней (КМ) используют эмбриональные мышиные фибробласты линии Balb/3T3 (линия 3T3) или клетки эритробластоза человека – К-562 ($1{,}3 \times 10^4$ кл/см^3), подготовленные к анализу, как описано в разделе 4.7.2. В лунки 96-луночного планшета раскапывают клетки-эффекторы и клетки-мишени по указанной ниже схеме:

	1 лунка (соотношение КМ : КЭ = 1 : 10)	2 лунка (соотношение КМ : КЭ = 1 : 15)	Контроль клеток-эффекторов	Контроль клеток-мишеней
Спленоциты	0,080 см^3	0,080 см^3	0,080 см^3	–
К-562 (или 3T3)	0,080 см^3	0,120 см^3	–	0,080 см^3
Полная среда RPMI (без сыворотки)	0,040 см^3	–	0,120 см^3	0,120 см^3

Инкубируют планшеты 4 ч при 37 °С в условиях 5 % CO_2 во влажной атмосфере. Добавляют в лунки контролей по 0,007 $см^3$ 1 % бромистого этидиума (на дистиллированной воде), инкубируют 30 мин при 4 °С. На цитофлюориметре определяют процент жизнеспособных клеток. Живые клетки с целостной мембраной не окрашиваются красителем. В контрольных лунках жизнеспособность спленоцитов в норме должна составлять не менее 95 %, жизнеспособность клеток-мишеней – не менее 87 %.

Для оценки цитолитической активности естественных киллеров из лунок, содержащих клетки-мишени и клетки-эффекторы, отбирают по 0,070 $см^3$ клеточной взвеси в двух повторах. Добавляют по 200 $мм^3$ раствора Версена.

Затем готовится окрашивающий раствор, состоящий из 0,007 $см^3$ 1 %-го раствора (на дистиллированной воде) тритона X100, 0,005 $см^3$ РНК-азы и 0,007 $см^3$ 1 %-го бромистого этидиума.

На цитофлюориметре анализируют процент спленоцитов с гиподиплоидным содержанием ДНК, используя программу Cell Quest.

Коэффициент литической активности рассчитывают по формуле:

$$K_c = \frac{n_1 - n_2}{n_1} \cdot 100\ \%, \text{ где}$$

K_c – коэффициент литической активности;

n_1 – количество гиподиплоидных клеток в 1-й лунке (соотношение КМ : КЭ = 1 : 10);

n_2 – количество гиподиплоидных клеток во 2-й лунке (соотношение КМ : КЭ = 1 : 15).

Достоверное снижение/увеличение цитолитической активности лимфоцитов, выделенных от животных, обработанных наноматериалом, по сравнению с цитолитической активностью лимфоцитов, выделенных от интактных животных, свидетельствует об ингибировании/активации наноматериалом литической активности естественных киллеров.

4.11.6. Оценка фагоцитарной активности перитонеальных макрофагов животных

Фагоцитоз является одной из важнейших реакций, обеспечивающих как естественную резистентность организма (неспецифический иммунитет), так и представление антигена, необходимое для развития специфического иммунного ответа. Нарушения на различных этапах фаго-

цитоза приводят к развитию многочисленных патологических состояний.

Анализ фагоцитарной активности можно проводить, используя коммерческий набор Phagotest, BD или с применением приготовленных ФИТЦ-меченых бактерий (например, *E. coli* – ФИТЦ).

Для этого штамм *E. coli* НВ 101 выращивают в среде LB (1 % триптон, 0,5 % дрожжевой экстракт и 1 %-й раствор хлорида натрия) на возвратном вибраторе (150 об./мин). После культивирования в течение ночи при 37 °С бактерии осаждают центрифугированием при 1 500 *g*, дважды промывают ФСБ и один раз дистиллированной водой. Бактерии инактивируют нагреванием в течение 60 мин на водяной бане при 56 °С.

Инактивированные клетки *E. coli* (1×10^9 клеток/см^3) отмывают в 0,15 М фосфатном буфере. Инкубируют в 2,5 см^3 0,1 М карбонат-бикарбонатного буфера, pH 9,0 (0,15 М NaCl, 0,5 М $NaHCO_3$, 0,5 М Na_2CO_3), содержащего 500 мкг изомера 1-флуоресцеинизотиоцианата (ФИТЦ) в течение 60 мин при 4 °С.

Клетки перемешивают, энергично промывают 2—3 раза охлажденным на льду 0,15 М фосфатным буфером и 1 раз дистиллированной водой, каждый раз осаждая клетки центрифугированием (1 500 g).

Меченные ФИТЦ клетки *E. coli* можно хранить в малом количестве сбалансированного солевого раствора Хенкса, pH 7,4 при температуре –20 °С в течение 2 месяцев.

Для оценки фагоцитоза меченные ФИТЦ клетки *E. coli* суспендируют в сбалансированном солевом растворе Хенкса. Перитонеальные макрофаги вносят в пробирки по 0,1 см^3 в разведении 1×10^6 кл/см^3. Перед добавлением ФИТЦ-меченных бактерий макрофаги инкубируют на льду в течение 10 мин для того, чтобы охладить их до 0 °С. Тщательно перемешивают охлажденные ФИТЦ-меченные клетки *E. coli* и добавляют их в объёме 0,01 см^3 к взвеси макрофагов. Пробирки встряхивают. Контрольные пробы оставляют на льду. Исследуемые пробы инкубируют 10 мин при температуре 37 °С на водяной бане.

Для подавления флуоресценции непоглощенных макрофагами бактерий непосредственно перед окончанием времени инкубации достают все образцы одновременно из водяной бани и помещают их на лед для того, чтобы остановить фагоцитоз. В каждую пробирку добавляют по 0,1 см^3 ФСБ, содержащего 1 % азид натрия (или Quenching Solution, BD). Пробирки встряхивают.

Добавляют по 3 см^3 ФСБ в каждую пробирку. Перемешивают содержимое пробирок встряхиванием. Осаждают клетки центрифугирова-

нием (5 мин при 250 g, 4 °С). Удаляют супернатант. Отмывают образцы еще один раз, добавив 3 $см^3$ ФСБ.

Лизируют эритроциты. При использовании FACS Lysing Solution, BD концентрированный лизирующий раствор предварительно разводят деионизованной водой в 10 раз. В каждую пробирку вносят по 2 $см^3$ рабочего лизирующего раствора, смешивают на вортексе и инкубируют в темноте 10—12 мин (не больше!) при температуре 20—25 °С. Осаждают макрофаги центрифугированием (200—300 g, 5 мин). Встряхивают осадок на вортексе и отмывают макрофаги в 2 $см^3$ ФСБ с 0,1 % азидом натрия. Осаждают макрофаги центрифугированием (200—300g, 5 мин). Повторяют процедуру отмывки. Вносят в каждую пробирку по 0,5 $см^3$ ФСБ с 0,1 % азидом натрия и диспергируют клетки.

Для фиксации макрофагов в каждую пробирку вносят по 0,5 $см^3$ 1 % раствора параформальдегида и встряхивают на вортексе. Препараты можно хранить до проведения анализа при температуре 2—4 °С не более 24 ч.

Измеряется общее количество фагоцитирующих макрофагов (поглощение одной или более бактерий одним макрофагом) с использованием программы Cell Quest.

Оценку влияния наноматериала на функцию фагоцитоза проводят, сравнивая фагоцитарную активность макрофагов, выделенных от обработанных наноматериалом мышей, и интактных животных. Снижение фагоцитарной активности макрофагов мышей, обработанных наноматериалом, свидетельствует о снижении естественной резистентности организма.

5. Оценка безопасности наноматериалов с использованием в качестве тест-объекта семян высших растений

5.1. Принцип биотестирования на проростках высших растений

Метод тестирования безопасности наноматериалов основан на оценке различных реакций проростков высших растений на изменение внешних факторов, а именно:

- изменение морфологических признаков;
- изменение химического состава;
- появление аномалий в развитии;
- снижение всхожести;
- физиологические сдвиги;
- степень развития грибковых заболеваний и т. п.

Суть биотестирования состоит в определении указанных реакций и в последующем анализе полученных данных. Данные, полученные на проростках растений, переносятся на иные живые объекты не прямолинейно, а через пропорциональное изменение показателей жизненности.

Метод биотестирования позволяет проводить анализ наноматериалов:

- предварительно растворенных в увлажняющей субстрат воде;
- нанесенных на поверхность семян.

В результате тестирования становится возможным подбор безопасной концентрации наноматериала, не оказывающей отрицательного действия; определение степени токсичного действия того или иного наноматериала на тест-объекты.

5.2. Оборудование, материалы, реактивы

Весы лабораторные общего назначения, 4-го класса точности, с наибольшим пределом взвешивания 200 г	ГОСТ 24104—2001
Весы лабораторные общего назначения, 4-го класса точности, с наибольшим пределом взвешивания 1 000 г	ГОСТ 24104—2001
Термостат ТС-1/80 СПУ	ТУ 9452-02-00141798—97
Ультразвуковой дезинтегратор, модель MSS 150, фирмы «Sanyo» или аналог	
Термометр лабораторный шкальный с диапазоном измерения от 0 до 50 °С с ценой деления шкалы 0,5 °С	ГОСТ 28498—90
Холодильник бытовой, обеспечивающий замораживание (–20 ± 1 °С) и хранение проб (от 2 до 4 °С)	ГОСТ 26678—85 с изм. от 1987 г.
Чашки Петри	ТУ 9443-004-16548645—00
Пипетки автоматические дозаторы (любого типа) объемом 0,1 $см^3$ и 0,2 $см^3$	ТУ 9452-002-33189998—02
Колбы мерные 2-25-2; 2-50-2; 2-100-2	ГОСТ 1770—74
Пипетки вместимостью 1, 2, 5, 10 $см^3$ с ценой деления 0,1 $см^3$	ГОСТ 29227—91
Вода дистиллированная	ГОСТ 6709—72
Вода питьевая	ГОСТ Р 51232—98

5.3. Характеристика тест-систем

В качестве индикаторов токсичности наноматериалов используются проростки семян следующих высших растений: пшеницы, ржи, ячменя, овса, кукурузы, редиса красного круглого, белой горчицы, лука, фасоли обыкновенной.

Семена тест-культур должны принадлежать к одному виду и сорту, соответствовать 1-му классу, быть одного года урожая, не обработанными протравителями и удостоверенными соответствующими документами.

5.4. Условия тестирования

Биотестирование проводится в лабораторных условиях в соответствии с ГОСТ 15150. Помещение не должно содержать токсичных паров и газов.

Температура окружающего воздуха в лаборатории от 18 до 25 °С. Относительная влажность воздуха 80 ± 5 %. Атмосферное давление 84—106 кПа (630—800 мм рт.ст.). Температура для биотестирования (20 ± 2) °С.

Освещение помещения естественное или искусственное, не ограничивается особыми требованиями.

5.5. Подготовка к проведению тестов

Для проведения биотестирования необходимо предварительно подготовить посуду, пробоотборники, места хранения отобранных проб, а также рабочие места для обработки доставленных в лабораторию проб наноматериалов и исследования их на токсичность. Все процедуры предварительной подготовки должны исключать попадание токсичных, органических и каких-либо других веществ из окружающих предметов или среды в исследуемые образцы.

5.5.1. Подготовка посуды для биотестирования

Термостаты перед проведением исследований моют горячей водой с моющими средствами и дезинфицируют 1 %-м раствором марганцовокислого калия.

Чашки Петри моют и ополаскивают чистой водой. При необходимости их стерилизуют в сушильном шкафу при температуре 130 °С в течение одного часа или кипятят в воде 40 мин.

Вся грязная посуда, использованная при отборе проб, в процессе подготовки проб и проведения биотестирования должна подвергаться стерилизации кипячением в течение одного часа. Посуду для отбора и

подготовки проб желательно подвергать автоклавированию при 121 °С и давлении 1,05 кг/см^2 в течение 15 мин.

5.5.2. Подготовка субстрата для проращивания семян высших растений

В качестве субстрата используют кварцевый песок или иной инертный субстрат.

Кварцевый песок промывают, просеивают на ситах для получения фракции 0,5—2,0 мм, высушивают и прокаливают в сушильном шкафу при температуре 130 °С в течение одного часа.

Непосредственно перед проведением работы песок увлажняют до требуемой влагоемкости:

- на 60 % от полной влагоемкости при 7-суточной экспозиции;
- до полной влагоемкости при 14-суточной экспозиции.

Влагоёмкость песка определяется заранее по ГОСТ 12038—84. Если используются разные субстраты, то для каждого из них заранее определяется влагоёмкость и в соответствии с ней проводят увлажнение субстрата.

Этикетки нарезаются из плотной бумаги и подписываются простым карандашом или шариковой ручкой. На них указывается наименование эксперимента.

5.5.3. Приготовление исследуемых проб наноматериалов

Внесение исследуемого образца в инертный субстрат (кварцевый песок) осуществляется в результате диспергирования предварительно подготовленной навески в таком объеме дистиллированной воды, который бы соответствовал 60 и 100 % влагоёмкости субстрата из расчета на 1 кг.

Рассчитанные навески нерастворимых в воде наноматериалов диспергируют в минимальном количестве дистиллированной воды, обрабатывают ультразвуком 15 мин при 10 КГц для повышения дисперсности пробы, добавляют такой объем воды, который бы соответствовал 60 % и 100 % влагоёмкости из расчета на 1 кг субстрата и оставляют на сутки при интенсивном перемешивании на магнитной мешалке. Полученную взвесь используют в биотестировании на токсичность.

Нанесение исследуемого образца на поверхность семян проводят путем легкого встряхивания семян в бюксе с нужным количеством образца в течение 30 с. Для вещества с низкой прилипающей способностью добавляют 1 см^3 дистиллированной воды.

5.5.4. Подготовка семян

Предназначенные для проращивания семена предварительно прогревают при температуре 30—40 °С в течение 5—7 суток в термостате.

5.6. Процедура биотестирования

Заранее подготовленные чашки Петри заполняются увлажненным кварцевым песком или иным инертным субстратом на 90 % их объема. Песок выравнивают и слегка уплотняют до полного удаления пустот.

На песок помещают 10—30 семян растений, заглубляют на их толщину так, чтобы поверхность семян была на одном уровне с поверхностью с субстрата. Повторность опыта трехкратная для каждого варианта обработки (контроль, наноматериал, традиционный аналог).

Сначала проводят посев контрольных семян, затем опытных с минимальными интервалами по времени. Перерывы в работе не допускаются.

Между песком и стенкой чашки вставляют этикетку с наименованием эксперимента.

Подготовленные таким образом чашки Петри помещают в термостат на проращивание.

Условия проращивания:

- температура постоянная (20 ± 2) °С;
- отсутствие освещенности;
- влажность воздуха постоянная – 80—90 %;
- экспозиция 7 (14) дней.

Необходимая влажность воздуха создается за счет испарения воды с поддона, с чашек Петри и непосредственно побегами. При необходимости проводят дополнительное опрыскивание дистиллированной водой при помощи пульверизатора.

По истечении времени экспозиции чашки Петри достают из термостата, проводят необходимые наблюдения, исследования и замеры параметров проростков.

5.7. Оценка и интерпретация результатов биотестирования

После соответствующей экспозиции чашки извлекают из термостата, расставляют согласно вариантам обработки и проводят визуально выбраковку. Выбраковываются образцы, отличающиеся от массива образцов в варианте. Если «нетипичных» чашек две и более на вариант – вариант бракуется полностью.

Далее проводятся наблюдения и замеры, а данные замеров записывают в соответствующие таблицы.

1. Количество взошедших, нормально развитых побегов. Взошедшим считается побег длиной 5 мм и более, у которого первый настоящий лист занимает не менее половины колеоптиля. Нормальные побеги не должны иметь видимых морфологических изменений.

2. Измеряют длину корней, исключая из ряда данных пять наименьших значений, включая и не проросшие семена.

3. Взвешивают отдельно корни растений.

Результаты измерений для каждого показателя в каждом варианте обработки выстраиваются в виде вариационного ряда и проводится оценка достоверности различия групп с использованием t-критерия Стьюдента. Различие признаётся достоверным при уровне значимости $P < 0,05$.

Затем рассчитывается средняя длина и масса корешков растений для каждой пробы.

Если по сравнению с контрольными семена в исследуемых образцах не проросли или же длина корней в процентах от контрольного значения менее 70 %, то образец наноматериала считается токсичным.

При длине корней в опыте свыше 120 % от контроля предполагается, что исследуемый образец обладает стимулирующими свойствами.

6. Оценка безопасности наноматериалов с использованием интегральных тестов на лабораторных животных

6.1. Предварительные замечания

Цель биотестирования безопасности наноматериалов с использованием интегральных физиологических тестов заключается в проведении физиологического скрининга неблагоприятного действия наноматериалов на организм и оценки влияния наноматериалов на отдельные функциональные параметры организма и его жизненно важные системы. Основанием отбора моделей для включения в систему тестов является высокая чувствительность определяемых показателей к токсическим воздействиям различной природы, выявленная в ходе стандартных испытаний эффектов фармакологических препаратов.

Важным методологическим подходом к обоснованию подобного физиологического скрининга является следующее. Существует необходимость дополнения, а в лучшем случае – объединения методик, проведенных *in vitro* и *in vivo*, поскольку взятые по отдельности они дают ограниченную, а иногда и противоположную оценку ситуации, развивающейся в нативных условиях живого организма. Действительно, методы *in vitro* имеют дело с идеальной ситуацией работы ферментов или роста

клеток, тогда как в организме действует значительное число дополнительных механизмов, полностью меняющих картину функционального ответа. С другой стороны, взятые отдельно патоморфологические методики, тем более примененные в острых опытах, не дают представления о механизмах воздействия наночастиц и их физиологических эффектах в организме. Поэтому необходимо в комплексную оценку безопасности наночастиц и наноматериалов включать тесты и методики, позволяющие определить влияние наночастиц на функцию различных органов и систем организма, в особенности если планируется широкое применение этих материалов.

Физиологические методики используются в модификациях, определяемых спецификой введения тестируемых наночастиц и наноматериалов в организм животных. При проведении тестирования важно учитывать, что наноматериал, поступающий в организм животного, может оказывать как собственно специфический эффект, определяемый его высокой степенью дисперсности, так и эффекты, связанные с биологическими воздействиями матрикса (дисперсионной среды), а также эффекты, создаваемые химическими компонентами наночастиц при их частичном растворении в биологическом окружении. Помимо этого, сам процесс введения наноматериала в организм может сопровождаться стрессорными воздействиями, способными повлиять на изучаемые показатели. Ввиду этого проведение испытаний должно обязательно включать систему контрольных тестов, состоящих в воздействии на животного носителя наноматериала и его традиционного аналога в условиях, идентичных тем, в которых производится обработка наноматериалом.

Для эффективной оценки влияния наноматериалов на функциональные органы и системы, требуется применение ряда методик, ранее не применявшихся, но перспективных для системы нанобиобезопасности. С этой целью были отобраны методики, наиболее информативные в отношении оценки нанобиобезопасности, и проведена их оптимизация и проверка пригодности для системы нанобиобезопасности. Для части из отобранных методик оценки нанобиобезопасности на данном этапе проекта проведена проверка возможности использования методик для эффективной и информативной оценки влияния коллоидного серебра на функциональные параметры организма. Выявлена высокая информативность, доступность и воспроизводимость протестированных методик, что позволяет рекомендовать их как составную часть физиологического скрининга действия различных наноматериалов на организм.

Разработанная методология физиологического скрининга предполагает возможность расширения перечня конкретных методик в зависимости от вида наноматериалов, мишени воздействия и задач тестирования определенных жизненно важных систем. Проведенный экспериментальный и теоретический анализ позволит дать эффективные рекомендации для профилактических и защитных мероприятий, направленных на повышение биобезопасности производства и применения наноматериалов.

6.2. Методики измерения легочной функции

6.2.1. Методика измерения легочной функции *in vivo* – электроплетизмография

6.2.1.1. Принцип метода

Тест плетизмографии позволяет оценивать как аллерген-специфичную, так и неаллергическую бронхоконстрикцию у интактных животных. Этот тест предпочтителен для быстрого и повторного скрининга дыхательной функции. Принцип метода заключается в регистрации изменения давления при дыхании животного в ограниченном объёме окружающей его среды.

Для анализа влияния наноматериала на легочную функцию следует использовать одну из модификаций этого метода – плетизмографию всего тела. При этом животное целиком помещают в герметичную камеру, снабженную датчиками давления, и анализируют суммарный поток воздуха от носа и грудной клетки, которые приблизительно равны и разнонаправлены.

6.2.1.2. Животные, оборудование и материалы

6.2.1.2.1. Животные

Мелкие лабораторные животные (крысы и мыши), как линейные (крысы линий Wistar, Sprague-Dawley и др.; мыши линий CBA, C57B1/6 и др.), так и нелинейные. В случае использования линейных животных необходимо указать линию животных.

Количество животных в группе зависит от целей исследования, но не должно быть менее 10 особей в группе. Разброс по исходной массе тела животных в группе не должен превышать ±10 %. В течение всего эксперимента животные должны иметь свободный доступ к корму и питьевой воде (за исключением времени измерения физиологических параметров). Для унификации исследований животные на протяжении всего эксперимента получают полусинтетический рацион согласно МУ 1.2.2520—09 «Токсиколого-гигиеническая оценка безопасности наноматериалов».

6.2.1.2.2. Оборудование

Плетизмограф для всего объема тела (Buxco Research Systems, США), оснащённый пневмотахографом Halcyon (Buxco Research Systems, США, gost.e-ecolog.ru Компрессорный (струйный) небулайзер Comp AIR Pro (NE-C29-E) (Omron, Япония). Датчик давления (анализатор потоков) P23ID (Gould Statham Instruments, США) или аналогичный. Усилитель потенциалов по ГОСТ 26033—91 для выходного сигнала до 10В имеющий полосу частот от 10 Гц до 20 кГц. Аналого-цифровой преобразователь E14-440 (L-Card, Россия, внесен в Государственный реестр средств измерения под № 28131-04) или аналогичный (разрядность АЦП – 14 бит, максимальная частота преобразования – 400 кГц, диапазон входного сигнала: ± 10В; ± 2,5В; ± 0,625В; ± 0,156В). Частота опроса сигнала давления должна быть не менее 250—500 Гц. Компьютер IBM PC-совместимый по ГОСТ 27201—87. Регистрация и обработка экспериментальных данных проводятся с помощью специализированного программного обеспечения Powergraph (ООО «ДИСофт», Россия), MatLab (MathWorks, США) и SPSS 12 (SPSS Inc., США).

6.2.1.2.3. Материалы и реактивы

Физиологический раствор, приготовленный по ГОСТ 10444.1.

При получении аэрозоля наноматериала следует использовать физические методы диспергирования и дистиллированную воду в качестве носителя. Применение органических растворителей и детергентов не допускается. В исключительных случаях возможно введение наноматериала на носителе – дисперсионной среде, токсичность которой должна проверяться в отдельной серии тестов.

6.2.1.3. Метод введения животным наноматериалов

Поскольку метод плетизмографии позволяет оценить влияние наноматериалов на лёгкие и бронхи, предпочтительным является ингаляционный путь введения наноматериала.

Распыление наноматериала производится непосредственно в камере для проведения плетизмографии при помощи небулайзера.

Введение наноматериала животным может быть острым (однократная ингаляция в течение 1 ч), подострым (4 ч в день, 5 раз в неделю на протяжении 1—3 месяцев) и хроническим (4 ч в день, 5 раз в неделю на протяжении 6 месяцев). Концентрацию наночастиц в воздухе выражают в мг массы частиц в $м^3$ воздуха или $м^2$ суммарной поверхности частиц в $м^3$ воздуха. Диапазон доз наноматериала в ингалируемой воздушной смеси определяется задачами конкретного исследования и может варьировать при остром воздействии от минимальной токсической дозы до

1 LD_{50} (при возможности её определения), при подостром воздействии – от минимальной токсической дозы до $^1/_5$ LD_{50}, при хроническом воздействии от $^1/_{10}$ до $^1/_3$ части минимальной токсической дозы. Контрольным животным вводят физиологический раствор в том же объеме и тем же способом, что и коллоидный раствор или дисперсию наноматериала.

6.2.1.4. Проведение измерений

Измерения легочной функции методом плетизмографии проводят:

1) в режиме экспозиции, т. е. непосредственно после введения наноматериала;

2) ежедневно в течение 14 дней после введения наноматериала (при остром введении) на 7, 14, 28, 56 и 84-й дни (при подостром введении), на 210, 240, 270, 300, 330 и 360-й дни (при хроническом введении).

В ходе плетизмографии датчик давления (анализатор потоков) позволяет регистрировать периодические изменения давления, называемые респираторными волнами. Математическая обработка получаемых сигналов проводится с помощью программного обеспечения Powergraph и MatLab. Вычисляют следующие параметры:

1) частота дыхательных движений;

2) дыхательный объем;

3) общий объем вдыхаемого воздуха;

4) минутная вентиляция;

5) время вдоха;

6) время выдоха;

7) пиковая скорость вдоха;

8) пиковая скорость выдоха и т. д.

6.2.1.5. Анализ и интерпретация полученных данных

Статистический анализ данных проводят с помощью программного обеспечения SPSS 12. Предварительную оценку характера распределения данных осуществляют с помощью теста Shapiro-Wilk. В соответствии с полученным результатом при дальнейшей обработке применяют непараметрические критерии или критерии для нормально распределенных данных. Достоверность различий средних значений нескольких групп данных оценивают по критерию Friedman. При проведении обобщенной оценки достоверность различия средних значений для нескольких групп данных определяют по критерию Kruskal-Wallis, а для 2 групп данных – по критерию Mann-Whitney. Для анализа различий между двумя группами данных применяют парный t-критерий Student или непараметрический критерий Wilcoxon. Корреляционный анализ проводят с использованием статистики Spearman. Выводы считают до-

стоверными при допустимой вероятности ошибки менее 0,05. Данные представляют в виде среднего арифметического ± стандартное отклонение (SD). Расчёт LD_{50} и минимальной токсической дозы производится при предварительной оценке острой токсичности наноматериала согласно МУ 1.2.2520—09 «Токсиколого-гигиеническая оценка безопасности наноматериалов».

Наноматериал признаётся безопасным по результатам тестирования при выполнении следующих критериев:

1) если основные параметры дыхательной функции: частота дыхательных движений и дыхательный объем находятся в пределах физиологической нормы (для крыс 70—90 $мин^{-1}$ и 9—11 $см^3$ соответственно);

2) если параметры дыхательной функции (частота дыхательных движений, дыхательный объем, общий объем вдыхаемого воздуха, минутная вентиляция, время вдоха, время выдоха, пиковая скорость вдоха, пиковая скорость выдоха и т. д.) у животных, подвергшихся воздействию наноматериала, не отличается достоверно от соответствующих параметров животных в контрольной группе.

6.3. Методики измерения функций сердечно-сосудистой системы

6.3.1. Тестирование безопасности наноматериалов на инвазивной модели тромбогенеза

6.3.1.1. Принцип метода

Данный метод позволяет оценить влияние наноматериалов на процесс тромбообразования, изменение его скорости и величину тромба. Лабораторному животному внутривенно вводят краситель, затем хирургически выделяют правую бедренную вену и вызывают ее мягкое эндотелиальное повреждение. После этого наблюдают образование/исчезновение тромба под микроскопом.

6.3.1.2. Животные, оборудование и материалы

6.3.1.2.1. Животные

Мелкие лабораторные животные (крысы и мыши), как линейные (крысы линий Wistar, Sprague-Dawley и др.; мыши линий CBA, C57B1/6 и др.), так и нелинейные. В случае использования линейных животных необходимо указать линию животных.

Количество животных в группе зависит от целей исследования, но не должно быть менее 10 особей в группе. Разброс по исходной массе тела животных в группе не должен превышать ±10 %. В течение всего эксперимента животные должны иметь свободный доступ к корму и питьевой воде (за исключением времени измерения физиологических

параметров). Для унификации исследований животные на протяжении всего эксперимента получают полусинтетический рацион согласно МУ 1.2.2520—09 «Токсиколого-гигиеническая оценка безопасности наноматериалов».

6.3.1.2.2. Оборудование

Трансиллюминатор CTS 20L (UVItec Ltd, Англия). Нагревательный столик ML-1.5-4 (ООО Мила-Форм, Россия, или аналогичный). Микроскоп стереоскопический МС-2 ZOOM вар. 1TD-1 бинокуляр, рабочее расстояние 85 мм, универсальный штатив (BANDEQ, Китай) или аналогичный.

Компрессорный (струйный) небулайзер Comp AIR Pro (NE-C29-E) (Omron, Япония). Клетки для содержания животных «плексигласовый домик» (ООО «СПИ», Россия, или аналогичный). Затравочная камера. Компьютер IBM PC-совместимый по ГОСТ 27201—87. Обработка экспериментальных данных проводится с помощью программного обеспечения SPSS 12.

6.3.1.2.3. Материалы и реактивы

Полиэтиленовые катетеры 2-F (Balton, Польша) или аналогичные	
Хирургические инструменты (ПТО «Медтехника», Россия) или аналогичные:	ГОСТ 19126—79
Хирургические ножницы	ГОСТ 21239—89
Ножницы глазные	ТУ 64-1-64—78
Пинцет	ГОСТ 21241—89
Пинцет анатомический глазной прямой ПА 100 × 0,6	ТУ 64-1-3264—81Е
Крючки хирургические ручные (ГНПП «Мединструмент», Россия)	ТУ 64-1-3317—79
Иглы хирургические для сшивания кожи, мышц, сухожилий типоразмеры от 1В1-0.5 × 12 до1В1-1.5 × 85	ТУ 64-1-3798—84Е
Зонд-игла трупная 1В2 18 × 108 (ГНПП «Мединструмент», Россия, ПТО «Медтехника», АО «Казанский МИЗ») или аналогичные	
Нити хирургические лавсановые «Абактолат-Л», условных номеров 5/0; 4/0; 3/0; 2/0 (ООО «Волоть», Россия)	
Одноразовые пластиковые шприцы	ГОСТ 24861—91
Чашки Петри	ГОСТ 25336—82

Бенгальский Розовый натриевая соль R3877
(Sigma-Aldrich, США)
Этаминал натриевая соль P3761
(Sigma-Aldrich, США)
Физиологический раствор ГОСТ 10444.1
Гепарин 9041-08-1 (Sigma, США)
Сульфаниламид (стрептоцид) порошок (Нижфарм, Россия)

6.3.1.3. Метод введения наноматериалов животным

Рекомендуется острое внутривенное введение наноматериала (однократная инъекция) за 24 ч до проведения операции в дозах от минимальной токсической дозы до 1 LD_{50} (при возможности её определения). Возможно также острое ингаляционное введение (однократная ингаляция в течение 1 ч за 24 ч до проведения операции в дозах от минимальной токсической дозы до 1 LD_{50} (при возможности её определения). При ингаляционном способе введения крысу помещают в затравочную камеру, в которой при помощи небулайзера распыляют наноматериал.

Контрольным животным вводят физиологический раствор в том же объеме и тем же способом, что и коллоидный раствор или дисперсию наноматериала.

6.3.1.4. Проведение измерений

Растворы фармакологических веществ в организм животного вводят через катетер, имплантированный в яремную вену. Операцию по вживлению катетеров проводят за сутки или двое до опыта.

Имплантация катетеров. Перед операцией кататер заполняют физиологическим раствором, содержащим гепарин (500 ед./$см^3$) так, чтобы в нём не осталось пузырьков воздуха, широкий конец катетера плотно затыкают.

Животное анестезируют с помощью этаминал-натриевого наркоза (40 мг/кг, вводят внутрибрюшинно) и располагают брюшной стороной вверх на нагревательном столике, нагретом до температуры 37 °С. Над правой ключицей удаляют шерсть и делают разрез кожи длиной 0,5 см. Жировую ткань раздвигают пинцетами и крючками. Правую яремную вену отделяют от окружающих тканей на участке 5—6 мм и подводят под нее две лигатуры (шовные нити). Затем под вену подводят бранши глазного пинцета так, чтобы пинцет пережимал вену, но не растягивал ее. Одну из лигатур, расположенную дальше от сердца, плотно завязывают. На расстоянии 1—2 мм от завязанной лигатуры стенку вены надрезают и вводят через разрез кончик катетера. Вторую лигатуру завязывают на один узел, чтобы она слегка придерживала кончик катетера

и не давала вытекать крови (после того как из-под вены будет вынут пинцет). Затем вынимают пинцет и продвигают катетер на 2,0—2,5 см по направлению к сердцу. Фиксирующую лигатуру затягивают туже, после чего завязывают на ней второй узел. Рядом накладывают еще одну лигатуру.

После имплантации катетера животное переворачивают на брюшную сторону, удаляют шерсть в межлопаточной области и делают разрез кожи длиной 2—3 мм. Периферический конец катетера протаскивают под кожей с помощью зонда и выводят в кожный разрез. Разрез над ключицей зашивают прерывистым швом, а разрез в межлопаточной области – кисетным швом. Швы обрабатывают стрептоцидом.

После операции животных содержат в индивидуальных клетках (30 × 30 × 30 см) при свободном доступе к пище и воде.

Инвазивная модель тромбогенеза. Через 24 ч после введения наноматериала животному через катетер, вжившённый в ярёмную вену, вводят Бенгальский Розовый (в дозе). Затем хирургическим путём выделяют правую бедренную вену и помещают её в чашку Петри, заполненную физиологическим раствором. Путём надавливания на вену вызывают мягкое эндотелиальное повреждение бедренной вены. Чашку Петри с исследуемым образцом помещают на трансиллюминатор и в течение 40 мин наблюдают образование/исчезновение тромба с помощью бинокуляров с 40-кратным увеличением.

6.3.1.5. Анализ и интерпретация полученных данных

Размер тромба выражают в условных единицах, как общую площадь под кривой изменения размера тромба через 24 ч после воздействия введенного наноматериала.

Статистический анализ данных проводят, как указано в п. 6.2.1.5. Расчёт LD_{50} и минимальной токсической дозы производится при предварительной оценке острой токсичности наноматериала согласно МУ 1.2.2520—09 «Токсиколого-гигиеническая оценка безопасности наноматериалов».

Наноматериал признаётся безопасным по результатам тестирования, если размер тромба, скорость образования тромба и скорость исчезновения тромба у животных, подвергшихся воздействию наноматериала, не отличается достоверно по этим параметрам от животных в контрольной группе.

6.3.2. Методика электроплетизмографического измерения артериального давления в хвостовой артерии

6.3.2.1. Принцип метода

Электроплетизмографическое измерение артериального давления (АД) в хвостовой артерии («*tail-cuff*») основано на том же принципе, что и измерение артериального давления у человека по способу Рива–Роччи. Просвет крупной артерии пережимается манжетой и во время постепенного снижения давления воздуха в манжете отмечается уровень давления, при котором кровь начинает проталкиваться через сдавленную область. Этот уровень соответствует систолическому АД. У человека уровень систолического АД детектируется аускультативно (по появлению тонов Короткова). У крыс наиболее часто используют специальные устройства, регистрирующие изменения окружности хвоста при поступлении порций крови. Важным достоинством данного метода служит его неинвазивность: он позволяет многократно измерять АД у одного и того же животного в ходе длительного хронического эксперимента.

6.3.2.2. Животные, оборудование и материалы

6.3.2.2.1. Животные

Нелинейные и линейные крысы (линий Wistar, Sprague-Dawley и др.). В случае использования линейных крыс необходимо указать линию.

Количество животных в группе зависит от целей исследования, но не должно быть менее 10 особей. Разброс по исходной массе тела животных в группе не должен превышать ±10 %. В течение всего эксперимента животные должны иметь свободный доступ к корму и питьевой воде (за исключением времени измерения физиологических параметров). Для унификации исследований животные на протяжении всего эксперимента получают полусинтетический рацион согласно МУ 1.2.2520—09 «Токсиколого-гигиеническая оценка безопасности наноматериалов».

6.3.2.2.2. Оборудование

Система неинвазивного измерения кровяного давления и параметров сердечно-сосудистой системы у грызунов (ООО «СПИ», Россия, или *аналогичная*). В *состав входит тонометр* (*для определения артериального* давления у человека), хвостовая манжета, нагреватель, сканер и контейнер для животного. Прибор основан на регулируемом пневмоприводе, в котором текущее значение давления, полученное датчиком давления, отображается на цифровом дисплее по мере получения.

В качестве альтернативы система неинвазивного измерения кровяного давления может быть собрана из отдельных элементов. Электрома-

нометрический датчик давления P23ID (Gould Statham Instruments, США) или аналогичный (частота опроса сигнала давления должна быть не менее 250—500 Гц). Усилитель потенциалов по ГОСТ 26033—91 для выходного сигнала до 10В и имеющий полосу частот от 10 Гц до 20 кГц. Аналого-цифровой преобразователь E14-440 (L-Card, Россия, внесен в Государственный реестр средств измерения под № 28131-04) или аналогичный (разрядность АЦП – 14 бит, максимальная частота преобразования – 400 кГц, диапазон входного сигнала: ± 10В; ± 2,5В; ± 0,625В; ± 0,156В). Манометр и резиновая груша входят в состав механического тонометра, предназначенного для измерения давления у человека, модель AnD UA-100 (A&D, Япония), BP AG1-10 (Microlife AG, Швейцария) или аналогичный.

Нагревательный столик ML-1.5-4 (ООО «Мила-Форм», Россия, или аналогичный). Клетки для содержания животных, «плексигласовый домик» (ООО «СПИ», Россия, или аналогичный).

Компьютер IBM PC-совместимый по ГОСТ 27201—87 с установленным программным обеспечением Powergraph (ООО «ДИСофт», Россия) MatLab (MathWorks, США) и SPSS 12.

6.3.2.2.3. Материалы и реактивы

Манжета, надетая на хвост крысы	
Стеклянная колба, герметично	
закрытая пробкой (буферная емкость)	ГОСТ 10394—74
Физиологический раствор	ГОСТ 10444.1

6.3.2.3. Метод введения наноматериалов животным

Наноматериалы можно вводить: парентерально (внутривенно, внутримышечно, внутрибрюшинно), ингаляционно и перорально (в составе корма, питьевой воды или через зонд). Допустимо острое (однократное введение), подострое (ежедневное введение в течение 1—3 месяцев) и хроническое введение (ежедневное введение в течение 6 месяцев и более) наноматериала.

Доза вводимого наноматериала при остром воздействии может варьировать от минимальной токсической до 1 LD_{50} (при возможности её определения), при подостром воздействии – от минимальной токсической до $^1/_5$ LD_{50}, при хроническом воздействии – $^1/_3$—$^1/_{10}$ части минимальной токсической дозы. Контрольным животным вводят физиологический раствор в том же объеме и тем же способом, что и коллоидный раствор или дисперсию наноматериала.

6.3.2.4. Проведение измерений

При измерении АД животные подвергаются умеренному стрессированию, что сказывается на уровне АД. В связи с этим в течение 2—3

предшествующих эксперименту недель крыс необходимо приучать к процедуре измерения.

Электроплетизмографическое измерение артериального давления проводят:

1) в режиме экспозиции, т. е. во время или непосредственно после введения наноматериала;

2) ежедневно в течение 14 дней после введения наноматериала (при остром введении) на 7, 14, 28, 56 и 84-й дни (при подостром введении), на 210, 240, 270, 300, 330 и 360-й дни (при хроническом введении).

Принципиальная схема экспериментальной установки для измерения АД в хвостовой артерии крысы изображена на рис. 1.

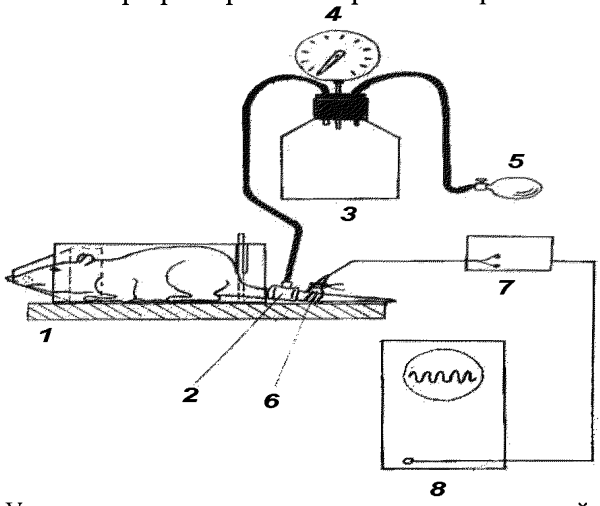

Рис. 1. Установка для измерения давления крови в хвостовой артерии у бодрствующих крыс. 1 – подогреваемый столик; 2 – манжета, надетая на хвост крысы; 3 – буферная емкость; 4 – манометр; 5 – резиновая груша; 6 –датчик, измеряющий окружность хвоста; 7 – усилитель; 8 – компьютер

Поскольку при комнатной температуре скорость кровотока в хвостовой артерии крысы настолько низкая, что измерение АД невозможно, животное помещают в плексигласовый домик, расположенный на подогреваемом столике, нагретом до температуры 37 °С. На основание хвоста надевают манжету, которую через буферную емкость соединяют с манометром и с резиновой грушей. С помощью манометра измеряют давление воздуха в манжете. Дистально от манжеты располагают датчик, регистрирующий изменение окружности хвоста при прохождении

пульсовой волны. Датчик представляет собой резиновую трубку, заполненную графитовым порошком.

В манжету нагнетают воздух до давления, при котором полностью прекращается кровоток в хвостовой артерии. Затем давление воздуха в манжете медленно снижают и отмечают уровень давления, при котором появляются пульсации крови в соответствии с рис. 2. Это значение давления в манжете соответствует систолическому артериальному давлению животного. Сигнал от датчика усиливается с помощью усилителя с последующей регистрацией на компьютере с помощью аналого-цифрового преобразователя и соответствующего программного обеспечения.

6.3.2.5. Анализ и интерпретация полученных данных

В день регистрации для каждого животного проводят как минимум три измерения АД; полученные значения усредняют.

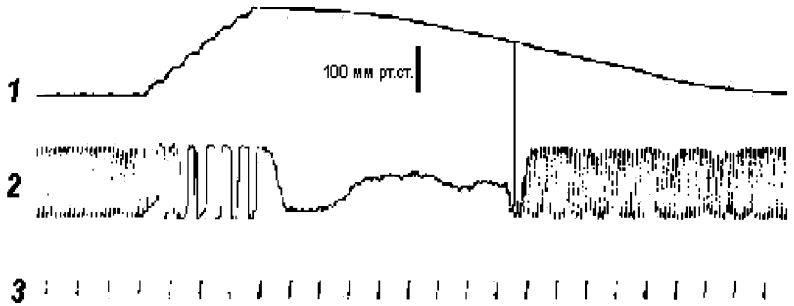

Рис. 2. Измерение артериального давления в хвостовой артерии крысы.
1 – давление воздуха в буферной емкости;
2 – сигнал от усилителя (ритмические изменения окружности хвоста);
3 – отметка времени 1 с

Статистический анализ данных проводят, как указано в п. 6.2.1.5. Данные представляют в виде среднего арифметического ± стандартное отклонение (SD). Расчёт LD_{50} и минимальной токсической дозы производится при предварительной оценке острой токсичности наноматериала согласно МУ 1.2.2520—09 «Токсикологогигиеническая оценка безопасности наноматериалов».

Наноматериал признаётся безопасным по результатам тестирования, если показатель среднего артериального давления остается в пределах физиологической нормы для крыс (90—110 мм рт.ст.).

6.3.3. Методика регистрации АД с использованием имплантируемых катетеров

6.3.3.1. Принцип метода

Методика регистрации артериального давления (АД) через внутриартериальный катетер («прямой» метод) позволяет измерять АД и частоту сердечных сокращений (ЧСС) непрерывно, что дает возможность вычислять величины, характеризующие вариабельность параметров гемодинамики. Этот метод практически не вызывает стрессирования животных в условиях адекватной экспериментальной обстановки: измерения необходимо проводить в тихом и затемненном помещении. После завершения подготовительных процедур следует адаптировать крысу к условиям эксперимента.

Модификацией метода является методика оценки влияния наноматериалов на изменения артериального давления и частоты сердцебиения при стрессе. Очень информативна модель, в которой стресс возникает под воздействием струи воздуха («*air-jet stress*»). В этой модели у крыс возникает ориентировочная реакция, сопровождающаяся умеренным повышением АД и ЧСС, а также характерным перераспределением кровотока между органами.

Другой модификацией метода является методика тестирования чувствительности кардиохронотропного компонента барорефлекса. При определении сердечного хронотропного компонента барорефлекса регистрируют изменения частоты сердцебиений, возникающие при введении фармакологических веществ, вызывающих умеренное повышение или снижение артериального давления. В качестве тест-препаратов, как правило, используют фенилэфрин, который суживает кровеносные сосуды, взаимодействуя с α_1-адренорецепторами, и нитропруссид натрия, который является донором оксида азота, расслабляющего гладкую мускулатуру сосудов. Эти вещества вызывают кратковременные изменения артериального давления. В дозах, используемых для тестирования чувствительности барорефлекса, нитропруссид натрия и фенилэфрин не оказывают прямого действия на сердце, так что наблюдаемые изменения частоты сердцебиений имеют почти исключительно нейрогенную рефлекторную природу. После хирургической денервации барорецепторов, блокирования проведения возбуждения в ганглиях автономной нервной системы или при блокаде симпатических и парасимпатических влияний на сердце изменения давления в ответ на введение тест-препаратов не сопровождаются изменениями сердечного ритма.

6.3.3.2. Животные, оборудование и материалы

6.3.3.2.1. Животные

Нелинейные и линейные крысы (линий Wistar, Sprague-Dawley и др.). В случае использования линейных крыс необходимо указать линию.

Количество животных в группе зависит от целей исследования, но не должно быть менее 10 особей. Разброс по исходной массе тела животных в группе не должен превышать ± 10 %. В течение всего эксперимента животные должны иметь свободный доступ к корму и питьевой воде (за исключением времени измерения физиологических параметров). Для унификации исследований животные на протяжении всего эксперимента получают полусинтетический рацион согласно МУ 1.2.2520—09 «Токсиколого-гигиеническая оценка безопасности наноматериалов».

6.3.3.2.2. Оборудование

Электроманометрический датчик давления P23ID (Gould Statham Instruments, США) или аналогичный. Частота опроса сигнала давления должна быть не менее 250—500 Гц. Усилитель потенциалов по ГОСТ 26033—91 для выходного сигнала до 10В и имеющий полосу частот от 10 Гц до 20 кГц. Аналого-цифровой преобразователь E14-440 (L-Card, Россия, внесен в Государственный реестр средств измерения под № 28131—04) или аналогичный (разрядность АЦП – 14 бит, максимальная частота преобразования – 400 кГц, диапазон входного сигнала: ± 10В; ± 2,5В; ± 0,625В; ± 0,156В). Манометр и резиновая груша входят в состав механического тонометра, предназначенного для измерения давления у человека, модель AnD UA-100 (A&D, Япония), BP AG1-10 (Microlife AG, Швейцария) или аналогичный.

Компьютер IBM PC-совместимый по ГОСТ 27201—87 с установленным программным обеспечением Powergraph (ООО «ДИСофт», Россия), MatLab (MathWorks, США) и SPSS 12 (SPSS Inc., США), или с аналогичными параметрами.

Нагревательный столик ML-1.5-4 (ООО «Мила-Форм», Россия, или аналогичный). Клетки для содержания животных, «плексигласовый домик» (ООО «СПИ», Россия, или аналогичный).

Баллон со сжатым воздухом 5 л ГОСТ 949—73 (пневматический нанос). Стеклянная колба по по ГОСТ 10394—74, герметично закрытая пробкой (буферная емкость). Камера, инфузор для промывки катетера и два крана.

6.3.3.2.3. Материалы и реактивы

Полиэтиленовые трубки PE-10 (Portex, Великобритания), PE-50 (Portex, Великобритания) или аналогичные (толстая – наружный диаметр ~1 мм,

внутренний диаметр ~0,6 мм и тонкая – наружный диаметр ~0,6 мм, внутренний диаметр ~0,3 мм)	
Трубка пластиковая (поливинилхлорид с внутренним диаметром 7 мм (ВТМ-2000, Россия)	
Стальная проволока общего назначения диаметр от 0,2 мм (Мегапром, Россия)	
Горелка газовая Phoenix (Schuett, Германия)	ГОСТ 3282—74
Хирургические инструменты (ГНПП «Мединструмент», Россия)	ГОСТ 19126—79
Хирургические ножницы	ГОСТ 21239—89
Ножницы глазные	ТУ 64-1-64—78
Пинцет	ГОСТ 21241—89
Пинцет анатомический глазной прямой ПА 100 × 0,6	ТУ 64-1-3264—81Е
Крючки хирургические ручные	ТУ 64-1-3317—79
Зонд-игла трупная 1В2 18 × 108, Иглы хирургические для сшивания кожи, мышц и сухожилий (типоразмеры от 1В1-0,5 × 12 до1В1-1,5 × 85) (ГНПП «Мединструмент», Россия, ПТО «Медтехника», АО «Казанский МИЗ») или аналогичные	ТУ 64-1-3798—84Е
Нити хирургические лавсановые «Абактолат-Л», условных номеров 5/0; 4/0; 3/0; 2/0 (ООО «Волоть», Россия)	
Этаминал натриевая соль Р3761 (Sigma-Aldrich, США)	
Физиологический раствор	ГОСТ 10444.1
Гепарин 9041-08-1 (Sigma, США)	
Сульфаниламид (стрептоцид) порошок (Нижфарм, Россия)	
Нитропруссид натрия 71778 (Sigma, США)	
Фенилэфрин Р6126 (Sigma, США)	

6.3.3.3. Метод введения наноматериалов животным

Рекомендуется проводить острое (однократное) введение наноматериала, т. к. регистрация АД данным методом может проводиться в течение не более 7 дней. Возможно также подострое (ежедневное в течение 1—3 месяцев) и хроническое (ежедневное в течение 6 месяцев и более) введение наноматериала. В этих случаях регистрацию АД прово-

дят однократно на определенном сроке. При остром воздействии ведение наноматериала проводят после имплантации катетеров, при подостром и хроническом воздействии введение наноматериала проводят за 1 ч до имплантации катетеров. При остром введении измерения АД означенным методом проводят сначала в режиме экспозиции, т. е. во время и непосредственно после введения наноматериала, а затем каждый день в течение 7 дней (или пока существует возможность регистрации). При подостром и хроническом введении наноматериала измерение АД проводят на 10, 30, 60 и 90-е сутки и на 30 и 180-е сутки и более соответственно.

Доза вводимого наноматериала при остром воздействии может варьировать от минимальной токсической до 1 LD_{50} (при возможности её определения), при подостром воздействии – от минимальной токсической до $^1/_5$ LD_{50}, при хроническом воздействии – $^1/_3$—$^1/_{10}$ части минимальной токсической дозы.

В случае внутривенного введения коллоидный раствор или водную дисперсию наноматериала вводят через тонкую трубочку длиной 50—60 см, которая соединена с катетером в яремной или бедренной вене. В этом случае крыса не видит манипуляций экспериментатора. Суммарный объем катетера и трубки не должен превышать 100 $мм^3$.

Контрольным животным вводят физиологический раствор в том же объеме и тем же способом, что и коллоидный раствор или дисперсию наноматериала.

6.3.3.4. Проведение измерений

6.3.3.4.1. Подготовка к регистрации АД. Изготовление и имплантация катетеров

Операцию по вживлению катетеров проводят за сутки или двое до опыта под наркозом. Катетер, служащий для регистрации АД, вводят в бедренную артерию. Растворы фармакологических веществ в организм крысы вводят через катетер, имплантированный либо в бедренную, либо в яремную вену. В экспериментах с введением нескольких препаратов крысе имплантируют несколько венозных катетеров или же используют 2-канальные катетеры.

Катетеры изготавливают из полиэтиленовых трубок: толстой PE-50 (наружный диаметр ~1 мм, внутренний диаметр ~0,6 мм) и более тонкой PE-10 (наружный диаметр ~0,6 мм, внутренний диаметр ~0,3 мм). Для соединения двух трубок их надевают на металлическую проволоку, место стыка нагревают в струе горячего воздуха от газовой горелки, а затем осторожно сдвигают трубки по направлению друг к другу. Поскольку

полиэтилен при нагревании плавится, концы трубок «слипаются» и получается герметичное соединение. Внешний вид катетеров приведен на рис. 3. Их размеры зависят от размеров крысы. На катетерах, имплантируемых в бедренную артерию и в бедренную вену, делают спираль, которая предотвращает пережатие трубок при движении животного. Чтобы сделать спираль, трубку обматывают вокруг металлического предмета, погружают на 5—10 с в кипящую воду, а затем быстро охлаждают.

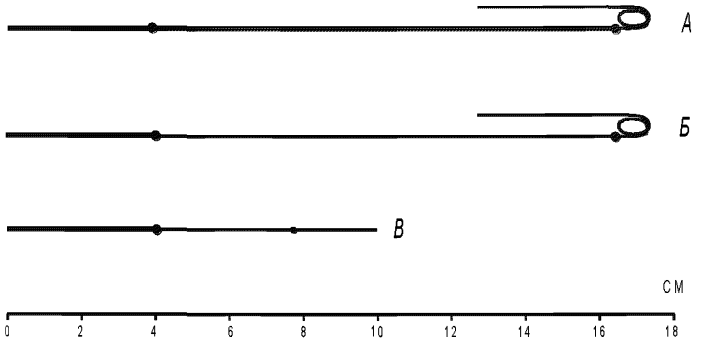

Рис. 3. Катетеры, используемые в экспериментах на крысах (изображены катетеры, предназначенные для имплантации крысе с массой тела 350—400 г).
А – катетер, имплантируемый в бедренную артерию;
Б – катетер, имплантируемый в бедренную вену;
В – катетер, имплантируемый в яремную вену.
Участки, изготовленные из толстой трубки, изображены толстыми линиями, участки, изготовленные из тонкой трубки, – тонкими

Перед операцией кататер заполняют физиологическим раствором, содержащим гепарин (500 ед./см^3) так, чтобы в нём не осталось пузырьков воздуха, широкий конец катетера плотно затыкают.

Животное анестезируют с помощью этаминал-натриевого наркоза (40 мг/кг, вводят внутрибрюшинно) и располагают брюшной стороной вверх на нагревательном столике, нагретом до температуры 37 °С. Операцию начинают с катетеризации яремной вены. Над правой ключицей удаляют шерсть и делают разрез кожи длиной 0,5 см. Жировую ткань раздвигают пинцетами и крючками. Правую яремную вену отделяют от окружающих тканей на участке 5—6 мм и подводят под нее две лигатуры (шовные нити). Затем под вену подводят бранши глазного пинцета так, чтобы пинцет пережимал вену, но не растягивал ее. Одну из лигатур, расположенную дальше от сердца, плотно завязывают. На расстоя-

нии 1—2 мм от завязанной лигатуры стенку вены надрезают и вводят через разрез кончик катетера. Вторую лигатуру завязывают на один узел, чтобы она слегка придерживала кончик катетера и не давала вытекать крови (после того как из-под вены будет вынут пинцет). Затем вынимают пинцет и продвигают катетер на 2,0—2,5 см по направлению к сердцу. Фиксирующую лигатуру затягивают туже, после чего завязывают на ней второй узел. Рядом накладывают еще одну лигатуру.

Затем приступают к катетеризации сосудов, расположенных на бедре. На внутренней стороне бедра удаляют шерсть, затем делают разрез кожи длиной 5—6 мм (разрез следует делать над самым началом бедренной артерии). Раздвигают жировую ткань и находят нервно-сосудистый пучок, состоящий из бедренной вены, бедренной артерии и бедренного нерва. Из пучка осторожно выделяют артерию и вену и подводят под них лигатуры. Сначала проводят катетеризацию вены, затем – артерии. В бедренную вену катетер вставляют так же, как в яремную, за исключением того, что кончик катетера продвигают на большее расстояние (до спирали).

Основные этапы вставления катетера в артерию такие же, как в вену, однако следует помнить, что артериальное давление значительно выше венозного, что может привести к большой кровопотере. Перед разрезанием стенки сосуда необходимо убедиться, что подведенный под артерию пинцет хорошо пережимает ее. После вставления катетера вынимать пинцет следует осторожно, в месте наложения лигатуры кончик катетера в сосуде придерживают пинцетом. Этот катетер также продвигают по сосуду до спирали.

После имплантации всех катетеров животное переворачивают на брюшную сторону, удаляют шерсть в межлопаточной области и делают разрез кожи длиной 2—3 мм. Периферические концы катетеров протаскивают под кожей с помощью зонда и выводят в кожный разрез. Разрез над ключицей зашивают прерывистым швом, а разрез в межлопаточной области – кисетным швом. Швы обрабатывают стрептоцидом.

После операции животных содержат в индивидуальных клетках (30 × 30 × 30 см) при свободном доступе к пище и воде.

6.3.3.4.2. Регистрация сигнала артериального давления

Установка для регистрации давления крови прямым способом изображена на рис. 4. Она состоит из электроманометрического датчика давления, который преобразует механические колебания давления в электрические сигналы; усилителя потенциалов и компьютера типа IBM PC с встроенным аналого-цифровым преобразователем (АЦП).

Требования к усилителю определяются типом АЦП, используемым для регистрации. Например, можно использовать 12-разрядный АЦП, позволяющий оцифровывать сигналы с амплитудой до 5 В. Регистрацию и обработку экспериментальных данных проводят с помощью специализированного программного обеспечения. Частота опроса сигнала давления должна быть не менее 250—500 Гц.

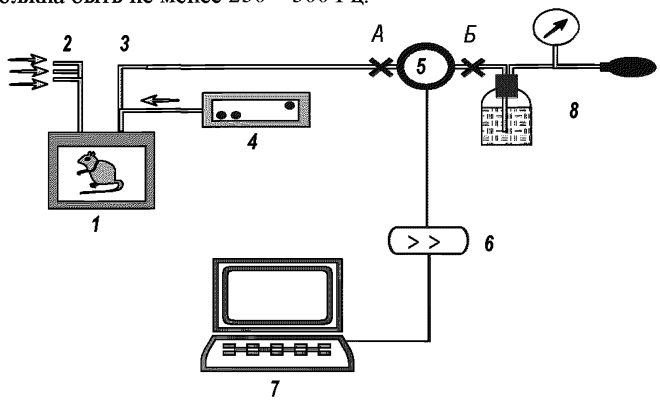

Рис. 4. Схема установки для регистрации артериального давления у бодрствующих крыс.
1 – клетка с крысой; 2 – катетеры для внутривенного введения веществ; 3 – артериальный катетер; 4 – инфузор для промывки артериального катетера гепаринизированным раствором; 5 – датчик давления; 6 – усилитель; 7 – компьютер со встроенным АЦП; 8 – система для калибровки датчика; А и Б – краны, от положения которых зависит режим работы датчика (калибровка или измерение)

Для калибровки датчика используют систему, которая состоит из буферной ёмкости, резиновой груши, с помощью которой в этой ёмкости нагнетают давление, и манометра для измерения давления. В систему крыса–датчик–буферная ёмкость встроены два крана (на рис. 5 они обозначены буквами А и Б). Когда датчик работает в режиме регистрации артериального давления, кран А должен быть открыт, а кран Б – закрыт. Во время калибровки положение кранов обратное: закрыт кран А и открыт кран Б.

В течение всего эксперимента для предотвращения тромбообразования катетер в бедренной артерии непрерывно промывают гепаринизированным физиологическим раствором (50 ед./см^3) со скоростью

0,2 $см^3$/ч. Такая инфузия не влияет на уровень артериального давления, но позволяет в течение длительного времени регистрировать стабильный сигнал.

Эксперимент должен проводиться в тихой затемненной комнате. После присоединения катетеров к датчику давления и инфузионным трубкам в течение часа крысу адаптируют к условиям эксперимента, при этом она успокаивается, и параметры гемодинамики стабилизируются. В течение всего эксперимента животное может свободно перемещаться по клетке и имеет свободный доступ к пище и воде. Одновременная регистрация параметров гемодинамики и поведения животных показало, что в таких условиях проведения эксперимента преобладает «пассивное поведение» животных (80—85 % времени), длительность «активных форм поведения» (локомоции, груминг, потребление воды и пищи) значительно меньше.

6.3.3.4.3. Методики оценки влияния наноматериалов на изменения артериального давления и частоты сердцебиений при стрессе

Стресс моделируют струей воздуха, которая подается через трубку, помещенную в угол клетки, как показано на рис. 5.

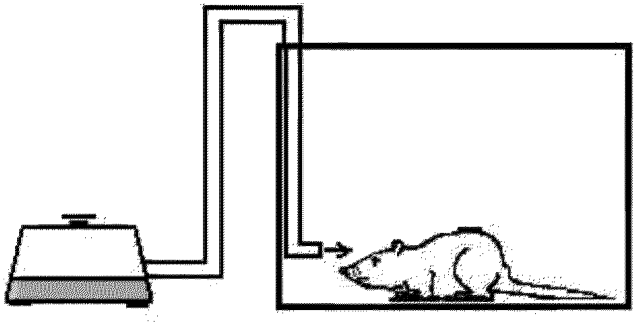

Рис. 5. Схема установки для моделирования *air-jet* стресса у крыс. Крыса находится в экспериментальной клетке, по трубке к ней поступает струя воздуха, что вызывает ориентировочную реакцию животного

Внутренний диаметр трубки составляет 7 мм, отверстие трубки должно находиться на высоте 4 см от пола клетки. Воздух в трубку нагнетается при помощи пневматического насоса, в качестве которого может выступать баллон со сжатым воздухом. Мощность потока воздуха подбирают так, чтобы он производил легкое шипение.

Длительность стрессирующего воздействия составляет 1—5 мин, в зависимости от поставленной задачи. При коротком воздействии реак-

цию на стресс можно воспроизводить многократно в течение одного эксперимента.

6.3.3.4.4. Методика тестирования чувствительности кардиохронотропного компонента барорефлекса

Для тестирования чувствительности кардиохронотропного компонента барорефлекса вводят фенилэфрин в дозе 2 мкг/кг, или нитропруссид натрия – в дозе 10 мкг/кг через тонкую трубочку длиной 50—60 см, соединённую с катетером в яремной или бедренной вене. В этом случае крыса не видит манипуляций экспериментатора. Суммарный объем катетера и трубки не должен превышать 100 мм^3.

Изменения артериального давления при введении тест-препаратов должны быть достаточно заметными (не менее 20 мм рт.ст.), но не превышать 40 мм рт.ст. Если эффекты слишком большие или слишком маленькие, вводимые дозы тест-препаратов следует изменить. Во время введения тест-препаратов крыса должна быть спокойной (если она ходит по клетке, умывается, ест или пьет – подождать, пока не успокоится).

Примеры записей АД и длительности пульсового интервала представлены на рис. 6.

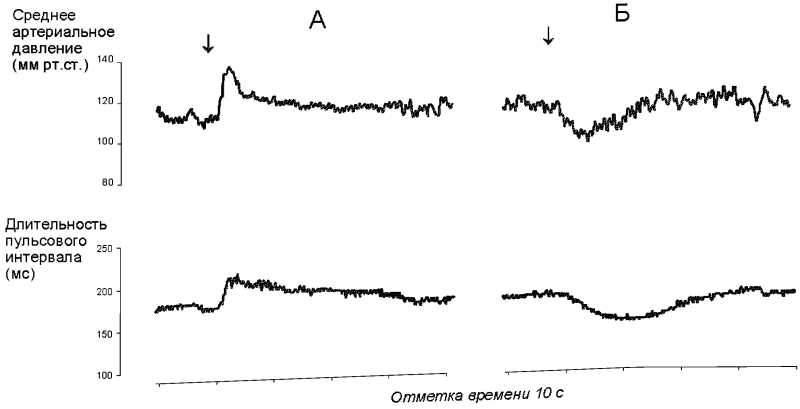

Рис. 6. Изменения среднего артериального давления (вверху) и длительности пульсового интервала (внизу) в опыте по тестированию барорефлекса у бодрствующей крысы. *А* – при введении фенилэфрина; *Б* – при введении нитропруссида натрия. Моменты введения веществ отмечены стрелками

6.3.3.5. Анализ и интерпретация полученных данных

6.3.3.5.1. Обработка результатов оценки влияния наноматериалов на параметры гемодинамики и их вариабельности у бодрствующих крыс

Принцип методик анализа

Для оценки влияния наноматериалов используют методики оценки вариабельности параметров гемодинамики. Во-первых, динамические характеристики параметров во многих случаях более адекватно отражают эффективность работы регуляторных механизмов, чем статические, т. е. есть являются более информативными. Например, регистрация динамики системного артериального давления позволяет выявить нарушение функционирования барорефлекса даже при неизменном среднем уровне давления. Во-вторых, повышение вариабельности системного артериального давления, характерное для многих заболеваний сердечно-сосудистой системы, усугубляет гипертрофию стенки артериальных сосудов, провоцирует атеросклеротическое поражение сосудов и нарушения микроциркуляции.

Вариабельность параметров гемодинамики можно оценивать:

- путем вычисления статистических характеристик – при анализе «суммарной» вариабельности параметров;
- с использованием метода спектрального анализа – для определения колебаний параметров гемодинамики, характеризующихся разными частотами; спектральный анализ используют при оценке вариабельности гемодинамических показателей в стационарном состоянии;
- с использованием метода вэйвлет-анализа – для определения изменений вариабельности в различных частотных диапазонах во время переходных процессов (например, при переходе от спокойного состояния организма к условиям стресса).

Известно, что колебания АД, характеризующиеся разными частотами, имеют различное происхождение. Традиционно различают высокочастотные, среднечастотные и низкочастотные колебания; иногда их обозначают соответственно как очень низкочастотные, низкочастные и высокочастотные.

Высокочастотные колебания АД (волны 2-го порядка) синхронны с дыхательными движениями, у крыс их частота в среднем равна 1 Гц. Такие колебания возникают в результате регулярных изменений давления в грудной полости, которые могут непосредственно влиять на давление крови в крупных артериях. Кроме того, изменение давления в грудной полости приводит к изменению просвета вен и тем самым влияет на приток крови к сердцу.

Нервные влияния на сердечно-сосудистую систему проявляются в виде *среднечастотных колебаний АД*. Как правило, в среднечастотной области спектра артериального давления наблюдается хорошо выраженный пик. Частота этих колебаний, называемых волнами Майера, различается у разных видов животных: 0,4 Гц у крыс, 0,3 Гц у кроликов и 0,1 Гц у собак и людей.

Природа *низкочастотных* колебаний АД (у крыс – менее 0,2 Гц) наименее ясна. На спектре системного артериального давления в низкочастотной области обычно не наблюдается четко выраженных пиков. Это свидетельствует о том, что такие колебания могут быть обусловлены активностью нескольких осцилляторов с близкими частотами. В этой частотной области проявляется действие ренин-ангиотензиновой системы и миогенная активность сосудов, характерная прежде всего для сосудов почек и брыжейки.

Методика поцикловой обработки первичных сигналов

Обработку данных проводят с помощью программного обеспечения Powergraph. Определение значений параметров для каждого из последовательных сердечных циклов (под сердечным циклом понимают совокупность процессов, происходящих за одно сокращение сердца и его последующее расслабление) является наиболее информативным подходом к обработке зарегистрированных сигналов параметров гемодинамики. Вычисление проводят с использованием программного обеспечения Powergraph.

На записи кривой пульсовой волны определяют длительность индивидуальных сердечных циклов (пульсовые интервалы – ПИ). За длительность ПИ принимают промежутки времени между двумя пограничными точками. При анализе сигнала артериального давления для каждого сердечного цикла вычисляют систолическое, диастолическое и среднее значение артериального давления, а также его длительность (рис. 7). Для этого путем последовательного дифференцирования кривой находят точки, в которых первая производная принимает нулевые значения (максимумы и минимумы, соответствующие систолическим и диастолическим значениям давления). Границами индивидуальных сердечных циклов считают точки, в которых первая производная функции артериального давления принимает максимальные значения (такие точки расположены на участках, соответствующих фазе быстрого нарастания давления во время систолы). Значения среднего АД для каждого сердечного цикла вычисляют как среднее арифметическое для всех точек, лежащих в пределах данного цикла.

Затем рассчитывают значения частоты сердечных сокращений (ЧСС) для периодов наблюдения заданной длительности.

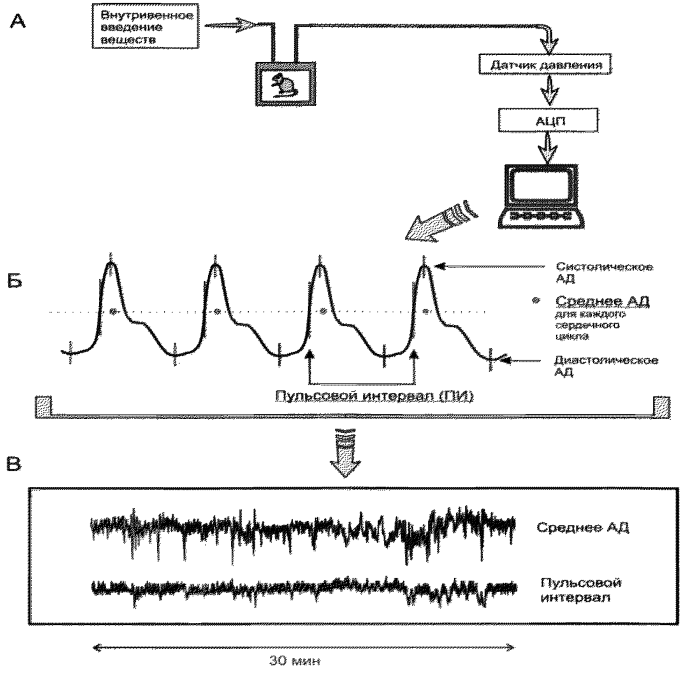

Рис. 7. Анализ кривой артериального давления. *А* – регистрация сигнала артериального давления (АД) в эксперименте; *Б* – обработка сигнала: вычисление систолического, диастолического и среднего значений АД, длительности пульсового интервала (ПИ) в каждом сердечном цикле; *В* – пример 30-минутной записи параметров – представлены вычисленные значения среднего АД и ПИ для последовательных сердечных циклов

Методика вычисления статистических показателей вариабельности

Статистические характеристики артериального давления или сердечного ритма вычисляют для сравнительно длительных периодов регистрации (от 5 до 30 мин и более).

Часто вариабельность параметров оценивают по *стандартному отклонению (СО)*, вычисленному для выборки значений, соответствующих индивидуальным сердечным циклам:

$$CO = \sqrt{\frac{\sum (x_i - M)^2}{n-1}}, \text{ где} \quad (3)$$

x_i – значение параметра для данного сердечного цикла;

M – среднее значение параметра, вычисленное для выбранного временного интервала;

n – количество сердечных циклов, зарегистрированных в течение этого времени.

Еще одной статистической характеристикой сигнала служит *коэффициент вариабельности* (КВ). Он рассчитывается как:

$$КВ = \frac{CO}{M} \times 100\ \% \quad (4)$$

Вычисление коэффициента вариабельности позволяет учесть различия в среднем значении АД и ПИ между экспериментальными группами животных, индивидуальные различия между животными в пределах экспериментальной группы, а также изменения параметров при экспериментальных воздействиях наноматериалов.

Методика проведения спектрального анализа

Обработку данных проводят с помощью программного обеспечения MatLab. Принцип спектрального анализа предполагает, что любой апериодический сигнал может быть представлен как совокупность синусоидальных колебаний, различающихся между собой по амплитуде, частоте и фазовому сдвигу. Спектральный анализ обычно выполняется с использованием математической процедуры быстрого Фурье преобразования временного ряда. Отдельные частоты могут быть сгруппированы в полосы для статистически более надежного оценивания.

Из-за нерегулярности сердечного ритма вычисленные значения пульсового интервала, систолического, диастолического и среднего АД неравномерно распределены во времени. Поскольку для вычисления спектра мощности необходимы значения, разделенные равными временными интервалами, по экспериментальным данным путем линейной интерполяции вычисляют значения параметров, отстоящие друг от друга на 0,1 с. Далее весь исследуемый интервал (например, 30 мин) разбивают на неперекрывающиеся отрезки длительностью 51,2 с (512 точек). При такой длине анализируемых отрезков времени нижняя граница исследуемых частот составляет около 0,02 Гц, а верхняя – 5 Гц.

На кривой давления, как правило, присутствуют линейные тренды, обусловленные колебаниями, период которых больше 51,2 с. Чтобы они не проявлялись на спектре мощности, полученные ряды интерполированных значений (51,2 с) приводят к нулевому среднему путем вычита-

ния линейного дрейфа. Затем для каждого отрезка (51,2 сек) вычисляют спектр мощности с использованием быстрого преобразования Фурье. Отрезки, содержащие артефакты, связанные с резкими движениями животного, исключают из анализа. Полученные спектры усредняют для всего интервала наблюдения.

Суммарную интенсивность колебаний пульсового интервала в различных частотных диапазонах вычисляют интегрированием найденной спектральной плотности. Диапазоны для анализа выбирают в соответствии с данными литературы о временных характеристиках кардиотропных регуляторных механизмов (табл. 5).

Таблица 5

Связь колебаний сердечного ритма крыс с регуляторными механизмами

Частотные диапазоны	Границы	Регуляторные влияния
Низкочастотный	0,02—0,2 Гц	Симпатические
Среднечастотный	0,2—0,6 Гц	Симпатические и парасимпатические
Высокочастотный	1,0—2,5 Гц	Парасимпатические

Методика проведения Вэйвлет-анализа

Обработку данных проводят с помощью программного обеспечения MatLab.

Основная идея вэйвлет-анализа заключается в вычислении корреляции исследуемого сигнала с некоторой функцией (анализирующим вэйвлетом) в каждой точке *t*. Таким образом, вэйвлет-анализ сводится к вычислению преобразования, определяемого формулой (6):

$$W_{\psi}(t,a) = \frac{1}{a}\int_{-\infty}^{+\infty} s(\tau)\psi(\frac{\tau - t}{a})d\tau \text{, где} \qquad (6)$$

центр анализирующего вэйвлета ψ находится в точке t, а его ширина определяется масштабным фактором a. В качестве анализирующего вейвлета можно использовать достаточно широкий класс функций, основным свойством которых является масштабируемость.

При проведении вэйвлет-анализа параметров гемодинамики выполняют следующие процедуры:

- для каждого сердечного цикла вычисляют интересующий параметр (пульсовой интервал, систолическое, диастолическое и среднее давление и т. д.);
- полученный временной ряд с помощью линейной интерполяции приводят к ряду равноотстоящих по шкале времени значений;
- вычисляют вэйлет-преобразование полученного временного ряда, используя в качестве анализирующего вэйвлета различные вэйвлетные

функции (см. описание пакета для вэйвлет-анализа в составе программного обеспечения MatLab), при этом масштабирующие коэффициенты *a* подбирают таким образом, чтобы обеспечить необходимый частотный диапазон;

• коэффициенты вэйвлет-преобразования представляют в форме аналитического сигнала:

$$S_a(t) = A(t)e^{i\phi(t)} \equiv W_a(t) + i\widetilde{W}_a(t), \text{ где} \qquad (7)$$

$\widetilde{W}_a(t)$ – преобразование Гильберта от вэйвлет-трансформанты с масштабирующим коэффициентом *a*. Вычисленные таким образом амплитуды характеризуют интенсивность осцилляций сигнала на данной частоте в данный момент времени;

• изменения во времени амплитуд $A(t)$ для различных временных масштабов представляют в виде двумерного графика, величину амплитуды отображают цветом.

Вследствие усреднения большого количества спектров, вычисленных для последовательных отрезков сердечного цикла, происходит нивелирование случайных флуктуаций пульсового интервала и акцентирование колебаний, обусловленных активностью регуляторных механизмов.

Анализ чувствительности кардиохронотропного барорецепторного рефлекса

Чувствительность кардиохронотропного барорецепторного рефлекса (ЧБР) рассчитывают как отношение изменения ПИ или ЧСС к вызвавшему его изменению АД:

$$ЧБР = \frac{ПИ_э - ПИ_ф}{АД_э - АД_ф} \text{ или } ЧБР = \frac{ЧСС_э - ЧСС_ф}{АД_э - АД_ф}, \text{ где} \qquad (8)$$

индексами «э» («эффект») обозначены значения параметров на максимуме развития реакции; а индексами «*ф*» («фон») – усредненные значения параметров для 10-секундного отрезка времени, предшествующего введению тест-препарата.

Чувствительность барорефлекса можно оценивать, используя в качестве независимой переменной систолическое, диастолическое или среднее значения АД, а в качестве зависимой переменной – либо ЧСС, либо ПИ. Как показывает опыт, для вычислений лучше использовать среднее АД (поскольку этот параметр меньше зависит от частотной передаточной функции измерительной системы) и ЧСС (поскольку в этом

случае регистрируемые значения с большей вероятностью попадают в квазилинейный участок кривой – рис. 8).

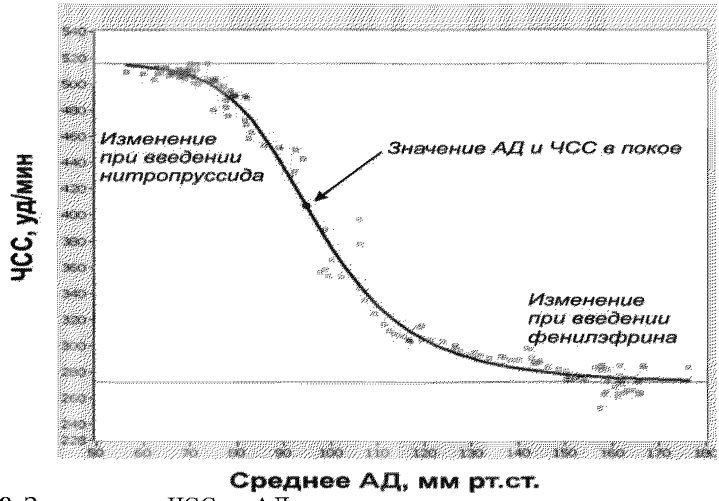

Рис. 8. Зависимость ЧСС от АД, полученная в эксперименте с многократным внутривенным введением разных доз фенилэфрина и нитропруссида натрия

Экспериментальные точки аппроксимируются S-образной кривой, по которой вычисляют:

- максимальное значение АД и минимальное значение ЧСС при введении ФЭ;
- минимальное значение АД и максимальное значение ЧСС при введении НП;
- диапазон изменений ЧСС;
- чувствительность хронотропного компонента барорефлекса – по минимуму первой производной зависимости ЧСС от АД.

При построении S-образной кривой можно использовать разные алгоритмы аппроксимации, основанные на том, что плечи кривой могут иметь одинаковую или разную кривизну.

Статистическая обработка и интерпретация полученных данных

Статистический анализ данных проводят, как указано в п. 6.2.1.5. Расчёт LD_{50} и минимальной токсической дозы производится при предварительной оценке острой токсичности наноматериала согласно МУ 1.2.2520—09 «Токсиколого-гигиеническая оценка безопасности наноматериалов».

Наноматериал признаётся безопасным по результатам тестирования при выполнении следующих критериев:

1) если показатель среднего АД и ЧСС остается в пределах физиологической нормы (для крыс: среднее АД – 85—115 мм рт. ст., ЧСС – 350—420 уд./мин);

2) если интегральные параметры (коэффициент вариабельности, усредненные спектры спектрального или вэйвлет-анализа, ЧБР) в опытных группах животных, подвергшихся воздействию наноматериалов, не отличаются достоверно от контроля.

6.3.4. Методика регистрации ЭКГ у бодрствующих крыс в покое и при стрессирующем воздействии

6.3.4.1. Принцип метода

Электрокардиография – методика регистрации и исследования электрических полей, образующихся при работе сердца. Прямым результатом электрокардиографии является получение электрокардиограммы (ЭКГ) – графического представления разности потенциалов, возникающих в результате работы сердца и проводящихся на поверхность тела. На ЭКГ отражается усреднение всех векторов потенциалов действия, возникающих в определённый момент работы сердца. Регистрация ЭКГ может проводиться у бодрствующих крыс в покое и при стрессирующем воздействии с последующим вычислением средней длительности ПИ и показателей вариабельности сердечного ритма с использованием вэйвлет-анализа. Для создания модельных условий стресса на крысу воздействуют струёй воздуха («*air-jet stress*»), при которой у животных возникает ориентировочная реакция, сопровождающаяся умеренным повышением АД и ЧСС, а также характерным перераспределением кровотока между органами.

6.3.4.2. Животные, оборудование и материалы

6.3.4.2.1. Животные

Нелинейные и линейные крысы (линий Wistar, Sprague-Dawley и др.). В случае использования линейных крыс необходимо указать линию.

Количество животных в группе зависит от целей исследования, но не должно быть менее 10 особей. Разброс по исходной массе тела животных в группе не должен превышать ± 10 %. В течение всего эксперимента животные должны иметь свободный доступ к корму и питьевой воде (за исключением времени измерения физиологических параметров). Для унификации исследований животные на протяжении все-

го эксперимента получают полусинтетический рацион согласно МУ 1.2.2520—09 «Токсиколого-гигиеническая оценка безопасности наноматериалов».

6.3.4.2.2. Оборудование

Усилитель потенциалов по ГОСТ 26033—91 для выходного сигнала до 10В, имеющий полосу частот от 10 Гц до 20 кГц. Аналого-цифровой преобразователь E14-440 (L-Card, Россия, внесен в Государственный реестр средств измерения под № 28131-04) или аналогичный (разрядность АЦП – 14 бит, максимальная частота преобразования – 400 кГц, диапазон входного сигнала: ± 10В; ± 2,5В; ± 0,625В; ± 0,156В). Компьютер IBM PC-совместимый по ГОСТ 27201—87 с установленным программным обеспечением Powergraph (ООО «ДИСофт», Россия), MatLab (MathWorks, США) и SPSS 12 (SPSS Inc., США).

Клетки для содержания животных, «плексигласовый домик» (ООО «СПИ», Россия, или аналогичный). Баллон со сжатым воздухом 5 л ГОСТ 949—73 (пневматический нанос).

6.3.4.2.3. Материалы и реактивы

Одноразовые электроды, предназначенные для регистрации ЭКГ у новорожденных Sensi-Prema (Unomedical Ltd, Великобритания)	
Стальная проволока общего назначения, диаметр от 0,2 мм (Мегапром, Россия)	ГОСТ 3282—74
Трубка пластиковая (поливинилхлорид) с внутренним диаметром 7 мм (ВТМ-2000, Россия).	
Спирт этиловый технический (чда)	ГОСТ 17299—78

6.3.4.3. Метод введения наноматериалов животным

Наноматериалы можно вводить: парентерально (внутривенно, внутримышечно, внутрибрюшинно), ингаляционно и перорально (в составе корма, питьевой воды или через зонд). Допустимо острое (однократное введение), подострое (ежедневное введение в течение 1—3 месяцев) и хроническое введение (ежедневное введение в течение 6 месяцев и более) наноматериала.

При остром воздействии введение наноматериала проводят после наложения электродов, при подостром и хроническом воздействии введение наноматериала проводят за 1 ч до наложения электродов. Регистрацию ЭКГ проводят сначала в режиме экспозиции, т. е. во время и непосредственно после или через 1 ч после введения наноматериала, а затем каждый день в течение 14 дней (при остром введении), на 210, 240, 270, 300, 330 и 360-й дни и более (при хроническом введении).

Доза вводимого наноматериала при остром воздействии может варьировать от минимальной токсической до 1 LD_{50} (при возможности её определения), при подостром воздействии – от минимальной токсической до $^1/_5$ LD_{50}, при хроническом воздействии – $^1/_3$—$^1/_{10}$ части минимальной токсической дозы. Контрольным животным вводят физиологический раствор в том же объеме и тем же способом, что и коллоидный раствор или дисперсию наноматериала.

6.3.4.4. Проведение измерений

Регистрация ЭКГ проводится с помощью накожных электродов, закрепленных на вентролатеральной поверхности грудной клетки крысы. На этих участках тела сбривается шерсть, кожа обезжиривается спиртом и наклеиваются ЭКГ-электроды так, чтобы их расположение соответствовало II стандартному отведению. Рекомендуется использовать одноразовые электроды, предназначенных для регистрации ЭКГ у новорожденных детей.

Для надёжной фиксации электродов на крысу надевается шлейка. Сигнал от электродов поступает на усилитель потенциалов, имеющий полосу частот от 10 Гц до 20 кГц. От усилителя сигнал поступает на аналого-цифровой преобразователь, который через usb-порт соединяют с персональным компьютером. Частота опроса ЭКГ-сигнала должна быть не менее 1 000 гц.

ЭКГ может регистрироваться одновременно у четырех крыс, что обеспечивает высокую пропускную способность установки и эффективность тестирования.

Air-jet-стресс моделируют струей воздуха, которая подается через трубку, помещенную в угол клетки, как показано на рис. 5. Внутренний диаметр трубки составляет 7 мм, отверстие трубки должно находиться на высоте 4 см от пола клетки. Воздух в трубку нагнетается при помощи баллона со сжатым воздухом. Мощность потока воздуха подбирают так, чтобы он производил легкое шипение. Длительность стрессирующего воздействия составляет 1—5 мин, в зависимости от поставленной задачи. При коротком воздействии реакцию на стресс можно воспроизводить многократно в течение одного эксперимента. После окончания воздействия регистрируют ЭКГ еще в течение 30 мин.

6.3.4.5. Анализ и интерпретация полученных данных

6.3.4.5.1. Поцикловый анализ сигнала ЭКГ

Проводят поцикловую обработку полученного сигнала: на записи ЭКГ идентифицируют QRS-комплексы, соответствующие индивидуаль-

ным сердечным циклам. Анализ полученных результатов проводят с помощью программного обеспечения Powergraph.

6.3.4.5.2. Спектральный анализ сердечного ритма

Из-за нерегулярности сердечного ритма вычисленные значения R-R интервала неравномерно распределены во времени. Поскольку для вычисления спектра мощности необходимы значения, разделенные равными временными интервалами, по экспериментальным данным путем линейной интерполяции вычисляют значения R-R интервала, отстоящие друг от друга на 0,1 с. Далее весь исследуемый интервал (30 мин) разбивают на неперекрывающиеся отрезки длительностью 51,2 с (512 точек). При такой длине анализируемых отрезков времени нижняя граница исследуемых частот составляет около 0,02 Гц, а верхняя – 5 Гц.

На регистрируемой кривой, как правило, присутствуют линейные тренды, обусловленные колебаниями, период которых больше 51,2 с. Чтобы они не проявлялись на спектре мощности, полученные ряды интерполированных значений (51,2 с) приводят к нулевому среднему путем вычитания линейного дрейфа. Затем для каждого отрезка (51,2 с) вычисляют спектр мощности с использованием быстрого преобразования Фурье. Отрезки, содержащие артефакты, связанные с резкими движениями животного, исключают из анализа. Полученные спектры усредняют для всего 30-минутного интервала.

Суммарную интенсивность колебаний R-R интервала в различных частотных диапазонах вычисляют интегрированием вычисленной спектральной плотности.

6.3.4.5.3. Вэйвлет-анализ

Обработку данных проводят с помощью программного обеспечения MatLab.

Для локализации динамических изменений сердечного ритма во времени используют метод вэйвлет-анализа. Основная идея вэйвлет-анализа заключается в вычислении корреляции исследуемого сигнала с некоторой функцией (анализирующим вэйвлетом) в каждой точке t. Таким образом, вэйвлет-анализ сводится к вычислению преобразования, определяемого формулой (9):

$$W_{\psi}(t,a) = \frac{1}{a}\int_{-\infty}^{+\infty} s(\tau)\psi\left(\frac{\tau - t}{a}\right)d\tau \text{ , где} \qquad (9)$$

центр анализирующего вэйвлета ψ находится в точке t, а его ширина определяется масштабным фактором a. В качестве анализирующего вейвлета можно использовать достаточно широкий класс функций, ос-

новным свойством которых является масштабируемость. Таким образом, вэйвлет-преобразование можно рассматривать как своеобразный «математический микроскоп», который дает возможность следить за поведением сигнала на различных временных масштабах. Величину, обратную временному масштабу, можно рассматривать как частоту, поэтому вэйвлет-анализ, так же как и спектральный анализ, позволяет определить частотно-временные характеристики сигнала. В некотором смысле эти два подхода дополняют друг друга. Спектральный анализ обладает хорошим разрешением по частоте, однако плохой временной локализацией. Напротив, вэйвлет-анализ позволяет точно локализовать точку, в которой происходит изменение частотных характеристик сигнала, однако обладает худшим частотным разрешением. Таким образом, спектральный анализ особенно эффективен при изучении частотных характеристик стационарных сигналов, тогда как вэйвлет-анализ более пригоден для изучения нестационарных процессов, для точной локализации изменений спектральных характеристик сигналов (оценка переходных процессов, происходящих, например, при быстром изменении внешних условий, при стрессе и т. д.). Следует отметить, что метод вэйвлет-анализа широко применяется для тестирования кардиодинамики в условиях патологии.

При проведении вэйвлет-анализа R-R интервала выполняют следующие процедуры:

- временной ряд R-R интервалов с помощью линейной интерполяции приводят к ряду равноотстоящих по шкале времени значений;
- вычисляют вэйлет-преобразование полученного временного ряда, при этом масштабирующие коэффициенты a выбирают таким образом, чтобы обеспечить необходимый частотный диапазон;
- коэффициенты вэйвлет-преобразования представляют в форме аналитического сигнала:

$$S_a(t) = A(t)e^{i\phi(t)} \equiv W_a(t) + i\widetilde{W}_a(t), \text{ где} \qquad (10)$$

$\widetilde{W}_a(t)$ – преобразование Гильберта от вэйвлет-трансформанты с масштабирующим коэффициентом a. Вычисленные таким образом амплитуды характеризуют интенсивность осцилляций сигнала на данной частоте в данный момент времени.

На рис. 9 представлен пример обработки данных методом вэйвлет-анализа. Видно, что после стресса у крыс происходит незначительное

увеличение амплитуды колебаний с частотами ~1 Гц и ~0,5 Гц, которое сохраняется в течение длительного времени.

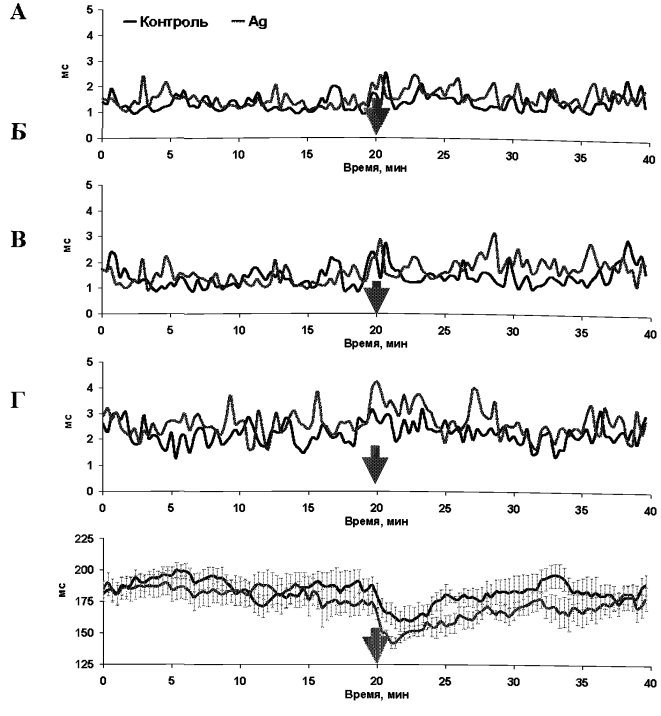

Рис. 9. Пример вэйвлет-анализа динамики R-R интервала в различных частотных диапазонах: ~1 Гц (А), ~0,4 Гц (Б), ~0,1 Гц (В), а также сглаженный сигнал (Г) у крыс контрольной группы и у крыс, получавших препарат коллоидного серебра. Представлены усредненные данные для каждой группы крыс. Стрелкой отмечено начало стрессирующего воздействия (длительность воздействия – 1 мин)

Результаты вэйвлет-анализа позволяют заключить, что как до, так и после стресса динамику R-R интервала можно рассматривать как стационарную. Это дает основание применять для исследования вариабельности R-R интервала метод спектрального анализа, который обладает лучшим разрешением по частоте по сравнению с вэйвлет-анализом.

Вследствие усреднения большого количества спектров, вычисленных для последовательных отрезков записи ЭКГ, происходит нивелиро-

вание случайных флуктуаций R-R интервала и акцентирование колебаний, обусловленных активностью регуляторных механизмов.

6.3.4.5.4. Статистическая обработка и интерпретация полученных данных

Статистический анализ данных проводят, как указано в п. 6.2.1.5. Расчёт LD_{50} и минимальной токсической дозы производится при предварительной оценке острой токсичности наноматериала согласно МУ 1.2.2520—09 «Токсиколого-гигиеническая оценка безопасности наноматериалов».

Наноматериал признаётся безопасным по результатам тестирования при выполнении следующих критериев:

1) если показатель ЧСС остается в пределах физиологической нормы (для крыс: 350—420 уд/мин);

2) если интегральные параметры (коэффициент вариабельности, усредненные спектры спектрального или вэйвлет-анализа) в опытных группах животных, подвергшихся воздействию наноматериалов, не отличаются достоверно от контроля.

6.4. Тестирование безопасности наноматериалов на основе определения гематологических показателей лабораторных животных

6.4.1. Определение кинетики агрегации и дезагрегации эритроцитов

6.4.1.1. Принцип метода

Метод основан на том, что интенсивность обратного светорассеяния (*I*) пропорциональна количеству центров рассеяния. По мере агрегации эритроцитов (объединения их в характерные структуры, называемые «монетными столбиками»), количество центров рассеяния уменьшается и, соответственно, значение *I* снижается. В случае когда агрегация эритроцитов в суспензии не происходит (количество центров рассеяния максимально), *I* принимает максимальное значение. Таким образом, данный метод позволяет оценивать усредненную динамику спонтанной агрегации-дезагрегации эритроцитов.

6.4.1.2. Животные, оборудование и материалы

6.4.1.2.1. Животные

Мелкие лабораторные животные (крысы и мыши) линейные (крысы линий Wistar, Sprague-Dawley и др.; мыши линий CBA, C57B1/6 и др.), так и нелинейные. В случае использования линейных животных необходимо указать линию животных.

Количество животных в группе зависит от целей исследования, но не должно быть менее 10 особей в группе. Разброс по исходной массе тела животных в группе не должен превышать ± 10 %. В течение всего эксперимента животные должны иметь свободный доступ к корму и питьевой воде (за исключением времени измерения физиологических параметров). Для унификации исследований животные на протяжении всего эксперимента получают полусинтетический рацион согласно МУ 1.2.2520—09 «Токсиколого-гигиеническая оценка безопасности наноматериалов».

6.4.1.2.2. Оборудование

Автоматический коаксиально-цилиндрический лазерный агрегометр-деформометр «LADE» («РеоМедЛаб», Россия; реологический зазор – 0,9 мм). Компьютер IBM PC-совместимый по ГОСТ 27201—87 с установленным программным обеспечением Powergraph (ООО «ДИСофт», Россия), SPSS 12 (SPSS Inc., США).

6.4.1.2.3. Материалы и реактивы

Одноразовые пластиковые пробирки	ТУ 64-2-30—80
Дозаторы пипеточные с диапазоном объема доз 20—200 мм^3 и 200—1 000 мм^3 и дискретности установки доз 1 и 5 мм^3 (соответственно) с наконечниками по	ТУ 64-16-55—90
Глицерин	ГОСТ 6824—96

6.4.1.3. Метод введения наноматериалов животным

Образцы крови лабораторных крыс разделить на несколько равных по объёму проб для определения фоновых значений регистрируемых показателей, а также значений, получаемых после замещения части плазмы на коллоидный раствор, водную дисперсию наноматериала или контрольный 18 %-й раствор глицерина. Тестирование осуществляют через (2 ± 1) ч после забора крови и через 2—5 мин после замещения плазмы при температуре 25 °С. Используют наноматериал в концентрациях – от $^1/_{100}$ до 1 IC_{50}.

6.4.1.4. Проведение измерений

Кровь у мелких лабораторных животных (мыши, крысы) можно отбирать из хвоста или из сердца (в случае вскрытия животных). Оптимальный объём сыворотки крови – не менее 30 мм^3. Забор крови производят в одноразовые пластиковые пробирки.

Реологические свойства эритроцитов изучают оптическим методом с помощью автоматического коаксиально-цилиндрического лазерного агрегометра-деформометра.

Кинетику агрегации и дезагрегации эритроцитов исследуют путем измерения интенсивности обратного светорассеяния (I) в пробе крови с гематокритным показателем (Ht), равным 40 % (часть объёма крови, приходящаяся на форменные элементы, в %).

Спонтанную агрегацию (a) эритроцитов изучают после остановки потока крови путем регистрации изменения I_a со временем (t).

Процесс дезагрегации (d) (распада эритроцитарных агрегатов) исследуют в условиях сдвигового потока. Для этого по окончании процесса агрегации пошагово увеличивают скорость сдвига от ~2 $с^{-1}$ до ~130 $с^{-1}$ и регистрируют зависимость величины I_d от скорости сдвига (γ).

Зависимости $I_a(t)$ и $I_d(\gamma)$ регистрируют в исходных образцах крови (фоновые показатели), в образцах крови с замещением части плазмы на раствор глицерина (контрольные показатели) и на препарат тестируемого наноматериала.

6.4.1.5. Анализ и интерпретация полученных данных

Спонтанная агрегация. Начальную, экспотенциальную часть кривой зависимости I_a от t спрямляют в полулогарифмических координатах. Определяют характерное время образования «монетных столбиков» (T), как тангенс угла наклона прямой $\ln I_a(t)$, т. е. с помощью отношения $T = t / \ln I_a$.

Для того чтобы охарактеризовать время процесса агрегации эритроцитов в целом, зависимость $I_a(t)$ аппроксимируют гиперболой. Спрямление кривой $I_a(t)$ при этом производят в полуобратных координатах. Параметр kT, характеризующий время процесса агрегации в целом, находят как, тангенс угла наклона прямой $1/I_a(t)$.

Разность между начальным и конечным значениями I_a – (A), так называемая «амплитуда» кривой $I_a(t)$, является показателем того, насколько сильно уменьшилось количество центров рассеяния, т. е. отражает степень агрегации эритроцитов и является величиной, характеризующей размер эритроцитарных агрегатов.

Процесс дезагрегации. Полученную существенно нелинейную кривую зависимости I_d от скорости сдвига (γ) спрямляют в полулогарифмических координатах. Показателем гидродинамической прочности основной массы агрегатов служит параметр β, вычисляемый по формуле $\beta = \gamma / \ln(I_d)$.

Оценку прочности особо крупных агрегатов осуществляют с помощью параметра $I_{2.5} = \frac{I_0 - I_{2.5}}{I_0} \cdot 100\,\%$ (где I_0 – разность между исходным значением I_d в условиях максимальной агрегации эритроцитов и конечным I_d, характеризующим конечный результат дезагрегации эритроцитов в сдвиговом потоке, а $I_{2,5}$ – интенсивность обратного светорассеяния,

соответствующая скорости сдвига 2,5 $с^{-1}$). Чем меньше прочность агрегатов, тем большая их доля распадается при минимальной скорости сдвига, тем больше значение $I_{2,5}$. Таким образом, $I_{2,5}$ отражает процент эритроцитарных агрегатов, способных распасться при минимальной скорости сдвига.

Результаты измерений для опытной и контрольной проб фиксируют в виде таблицы:

Таблица 6

Порядок регистрации результатов тестирования безопасности наноматериалов методом определения кинетики агрегации и дезагрегации эритроцитов

	kT, у.е.	A, у.е.	$I_{2,5}$, %	β, $с^{-1}$
Фон				
Нано (различные концентрации)				
К (различные концентрации)				

Примечание. Параметры: (kT) – характеризует время спонтанной агрегации эритроцитов; (A) – размер эритроцитарных агрегатов; ($I_{2,5}$) – гидродинамическую прочность наиболее крупных агрегатов; (β) – гидродинамическую прочность основной массы агрегатов. Образцы крови: (Фон) – исходные; (Нано) – с замещением части плазмы на препарат наноматериала; (К) – с замещением части плазмы на раствор глицерина.

Статистический анализ данных проводят по плану, представленному в п. 6.2.1.5. Предварительную оценку характера распределения данных осуществляют с помощью теста Shapiro-Wilk. В соответствии с полученным результатом при дальнейшей обработке применяют непараметрические критерии или критерии для нормально распределенных данных. Достоверность различий средних значений нескольких групп данных оценивают по критерию Friedman. При проведении обобщенной оценки достоверность различия средних значений для нескольких групп данных определяют по критерию Kruskal-Wallis, а для 2 групп данных – по критерию Mann-Whitney. Для анализа различий между двумя группами данных применяют парный t-критерий Student или непараметрический критерий Wilcoxon. Корреляционный анализ проводят с использованием статистики Spearman. Выводы считают достоверными при допустимой вероятности ошибки менее 0,05. Данные представляют в виде

среднего арифметического ± стандартное отклонение (SD). IC_{50} определяют предварительно согласно «Руководству по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ»/Под общей ред. Хабриева Р.У. 2-е изд. М.: ОАО «Издательство Медицина». 2005. 832 с.

Наноматериал признаётся безопасным по результатам тестирования, если интегральные параметры (спонтанная агрегация (a), дезагрегация (d)) в опытных группах животных, подвергшихся воздействию наноматериала, не отличаются достоверно от контроля.

6.4.2. Оценка деформационных свойств эритроцитов и вязкости крови

6.4.2.1. Принцип метода

Оценку деформационных свойств отдельных эритроцитов проводят методом эктацитометрии. При этом на сильно разбавленную суспензию эритроцитов падает лазерный луч, создающий дифракционную картину на отдельных клетках. Дифракционная картина соответствует контурам эритроцита, которые по мере пошагового возрастания скорости сдвига приобретают вид все более уплощающегося овала. Изменение соотношения длины и ширины овала с изменением скорости сдвига позволяет оценить способность клеток к деформации в сдвиговом потоке. В отличие от метода втягивания мембраны эритроцита в микропипетку, метод эктацитометрии позволяет судить о деформируемости, связанной не только с мембраной, но и с внутренним содержимым эритроцита. В отличие от метода фильтрации клеток через узкие (для человека – через 5-микронные) отверстия, метод эктацитометрии позволяет избегать неточностей, связанных с особенностями фильтрационных измерений (закупоркой отверстий) и с математической обработкой данных.

Вязкость крови в целом оценивают на основании вышеописанных измерений гидродинамической прочности эритроциторных агрегатов. Параметр, характеризующий эффективную вязкость крови (k_1) находят на основании параметров, отражающих размер агрегатов эритроцитов и их прочности в сдвиговом потоке. Так как в соответствии с формулой Сиско характерный размер агрегатов эритроцитов пропорционален показателю вязкости крови, наблюдений за кинетикой распада эритроцитарных агрегатов достаточно для оценки эффективной вязкости крови (k_1).

Оценки вязкости крови с помощью параметра k_1 хорошо согласуются с оценками, получаемыми с помощью классических вискозиметри-

ческих измерений. Таким образом, использование параметра k_1 позволяет избежать дополнительного тестирования образцов крови в вискозиметре, существенно облегчая экспериментальную процедуру комплексного гемореологического обследования.

6.4.2.2. Животные, оборудование и материалы

6.4.2.2.1. Животные

Мелкие лабораторные животные (крысы и мыши), как линейные (крысы линий Wistar, Sprague-Dawley и др.; мыши линий СВА, С57В1/6 и др.), так и нелинейные. В случае использования линейных животных необходимо указать линию животных.

Количество животных в группе зависит от целей исследования, но не должно быть менее 10 особей в группе. Разброс по исходной массе тела животных в группе не должен превышать ± 10 %. В течение всего эксперимента животные должны иметь свободный доступ к корму и питьевой воде (за исключением времени измерения физиологических параметров). Для унификации исследований животные на протяжении всего эксперимента получают полусинтетический рацион согласно МУ 1.2.2520—09 «Токсиколого-гигиеническая оценка безопасности наноматериалов».

6.4.2.2.2. Оборудование

Автоматический коаксиально-цилиндрический лазерный агрегометр-деформометр «LADE» («РеоМедЛаб», Россия; реологический зазор – 0,9 мм). Компьютер IBM PC-совместимый по ГОСТ 27201—87 с установленным программным обеспечением SPSS 12 (SPSS Inc., США). Микроскоп с 40-кратным увеличением класса I по ГОСТ 12.2.007.0—75.

6.4.2.2.3. Материалы и реактивы

Одноразовые пластиковые пробирки	ТУ 64-2-30—80
Дозаторы пипеточные с диапазоном объема доз 20—200 мм^3, 200—1 000 мм^3 и дискретностью установки доз 1 и 5 мм^3 соответственно, с наконечниками	ТУ 64-16-55—90
Глицерин	ГОСТ 6824—96
Полиэтиленоксид Polyox WSR-301 (Union Carbide, США; средняя молекулярная масса — $4 \cdot 10^6$)	

6.4.2.3. Подготовка образцов крови

Образцы крови лабораторных крыс разделяют на несколько равных по объёму проб для определения фоновых значений регистрируемых показателей, а также значений, получаемых после замещения части

плазмы на коллоидный раствор, водную дисперсию наноматериала или контрольный 18 %-й раствор глицерина. Тестирование осуществляют через (2 ± 1) ч после забора крови и через 2—5 мин после замещения плазмы при температуре 25 °С. Используют наноматериал в концентрациях – от $^{1}/_{100}$ до 1 IC_{50}.

Приготовление разбавленной (в 500 раз) суспензии производят с использованием 1,5 %-го раствора высокомолекулярного полиэтиленоксида для увеличения вязкости среды и, следовательно, возможности более дифференцированного воздействия на клетки.

Кровь у мелких лабораторных животных (мыши, крысы) отбирают из хвоста или из сердца (в случае вскрытия животных). Оптимальный объём сыворотки крови – не менее 30 $мм^3$. Забор крови производят в одноразовые пластиковые пробирки.

6.4.2.4. Проведение измерений

Форму эритроцитов контролируют под микроскопом с сорокакратным увеличением. Микрореологические свойства эритроцитов исследуют оптическим методом с помощью автоматического коаксиально-цилиндрического лазерного агрегометра-деформометра «LADE».

Анализируют исходные образцы крови (фоновые показатели), образцы крови с замещением части плазмы на раствор глицерина (контрольные показатели) и на препарат тестируемого наноматериала.

6.4.2.5. Анализ и интерпретация полученных данных

Анализируют контуры дифракционной картины, соответствующие контурам эритроцита. Определяют индекс эллиптичности (*IE*) по формуле $IE = (L-H)/(L+H)$, где L — длина, H — ширина овала. Регистрируют зависимость *IE* от скорости сдвига (γ; от ~3 $с^{-1}$ до ~1 300 $с^{-1}$). Кривую зависимости *IE* от (γ) спрямляют в полулогарифмических координатах, то есть обрабатывают как экспоненту. Рассчитывают тангенс угла наклона прямой $IE(\ln(\gamma))$ — $tg\alpha$, который является показателем степени изменения формы эритроцита при ступенчатом увеличении скорости сдвига. Максимально возможная деформация эритроцитов характеризуется индексом ID_{max}, который равен значению *IE* при максимальной скорости сдвига (~2 500 $с^{-1}$).

Вязкость крови в целом оценивают на основании вышеописанных измерений гидродинамической прочности эритроцитарных агрегатов. Эффективную вязкость крови (k_1) оценивают на основании параметров, отражающих прочность и размер агрегатов эритроцитов в сдвиговом потоке. Эти измерения позволяют оценить динамику изменения размера агрегатов эритроцитов с изменением скорости сдвига.

Результаты измерений для опытной и контрольной групп фиксируются в виде таблицы:

Таблица 7

Порядок регистрации результатов тестирования безопасности наноматериалов методом эктацитометрии

	tgα	ID_{max}
Фон		
Нано (различные концентрации)		
К (различные концентрации)		
Примечание: (tgα) интенсивность деформации эритроцитов в сдвиговом потоке; (ID_{max}) – максимальная растяжимость эритроцитов в сдвиговом потоке. Образцы крови: (Фон) – исходные; (Нано) – с замещением части плазмы на препарат наноматериала; (К) – с замещением части плазмы на раствор глицерина.		

Статистический анализ данных проводят как указано в п. 6.4.1.5. IC_{50} определяют предварительно согласно «Руководству по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ» /Под общей ред. Хабриева Р.У. 2-е изд. М.: ОАО «Издательство Медицина». 2005. 832 с.

Наноматериал признаётся безопасным по результатам тестирования при выполнении следующих критериев: если интегральные параметры (индексы ID_{max} и tgα, а также эффективная вязкость крови k_1) в опытных группах животных, подвергшихся воздействию наноматериала, не отличаются достоверно от контроля.

6.5. Оценка безопасности наноматериалов по интегральным показателям системы детоксикации ксенобиотиков

6.5.1. Метод гексеналовой пробы

6.5.1.1. Принцип метода

По продолжительности сна мышей и крыс после внутрибрюшинного введения гексеналового наркоза можно оценить скорость метаболизма гексенала, осуществляемого цитохромом Р-450-зависимой монооксигеназной системой гепатоцитов, которая характеризует состояние антитоксической функции печени.

6.5.1.2. Животные, оборудование и материалы

6.5.1.2.1. Животные

Мелкие лабораторные животные (крысы и мыши), как линейные (крысы линий Wistar, Sprague-Dawley и др.; мыши линий СВА, С57В1/6

и др.), так и нелинейные. В случае использования линейных животных необходимо указать линию животных.

Количество животных в группе зависит от целей исследования, но не должно быть менее 10 особей в группе. Разброс по исходной массе тела животных в группе не должен превышать ± 10 %. В течение всего эксперимента животные должны иметь свободный доступ к корму и питьевой воде (за исключением времени измерения физиологических параметров). Для унификации исследований животные на протяжении всего эксперимента получают полусинтетический рацион согласно МУ 1.2.2520—09 «Токсиколого-гигиеническая оценка безопасности наноматериалов».

6.5.1.2.2. Оборудование

Нагревательный столик ML-1.5-4 (ООО «Мила-Форм», Россия, или аналогичный). Компьютер IBM PC-совместимый по ГОСТ 27201—87 с установленным программным обеспечением SPSS 12 (SPSS Inc., США).

6.5.1.2.3. Материалы и реактивы

Одноразовые пластиковые шприцы ГОСТ 24861—91

Гексенал (кат. № W256102, Sigma-Aldrich)

6.5.1.3. Метод введения наноматериалов животным

Наноматериалы можно вводить: парентерально (внутривенно, внутримышечно, внутрибрюшинно), ингаляционно и перорально (в составе корма, питьевой воды или через зонд). Рекомендуется проводить подострое (ежедневное введение в течение 3 месяцев) и хроническое введение (ежедневное введение в течение 6 месяцев и более) наноматериала. Введение наноматериала проводят за 1 ч до проведения наркоза. При подостром и хроническом введении наноматериала гексеналовую пробу осуществляют на 10, 30, 60 и 90-е сут. и на 30 и 180-е сут. и более соответственно. Дозы введения наноматериала при подостром воздействии – от минимальной токсической дозы до $^1/_5$ LD_{50}, при хроническом воздействии – от $^1/_3$ до $^1/_{10}$ части минимальной токсической дозы.

6.5.1.4. Проведение измерений

Осуществляют наркотизирование лабораторных животных с помощью гексеналового наркоза. Гексенал вводят мышам – в дозе 80 мг/кг, крысам – в дозе 60 мг/кг внутрибрюшинно.

Животных помещают на столик, нагретый до 37 °С, и измеряют продолжительность состояния наркоза.

6.5.1.5. Анализ и интерпретация полученных данных

Статистический анализ данных проводят, как указано в п. 6.2.1.5. Расчёт LD_{50}, минимальной токсической дозы производят при

предварительной оценке острой токсичности наноматериала согласно МУ 1.2.2520—09 «Токсиколого-гигиеническая оценка безопасности наноматериалов».

Наноматериал признаётся безопасным по результатам тестирования, если продолжительность наркоза в опытных группах животных, подвергшихся воздействию наноматериала, не отличается достоверно от контроля.

6.5.2. Метод пробы с бромсульфалеином

6.5.2.1. Принцип метода

Бромсульфалеиновая проба относится к числу наиболее информативных и чувствительных методов исследования поглотительно-выделительной функции печени. Скорость элиминации бромсульфалеина (БСФ) (в виде конъюгатов с цистеином и глутатионом) является показателем состояния экскреторной и антитоксической функции печени. БСФ-проба становится положительной при любых поражениях паренхимы органа (острые и хронические гепатиты, жировой гепатоз, цирроз печени, доброкачественная гипербилирубинемия и др.) даже на самых ранних стадиях развития заболевания и хорошо коррелирует с тяжестью патологического процесса.

6.5.2.2. Животные, оборудование и материалы

6.5.2.2.1. Животные

Мелкие лабораторные животные (крысы и мыши), как линейные (крысы линий Wistar, Sprague-Dawley и др.; мыши линий СВА, С57В1/6 и др.), так и нелинейные. В случае использования линейных животных необходимо указать линию животных.

Количество животных в группе зависит от целей исследования, но не должно быть менее 10 особей в группе. Разброс по исходной массе тела животных в группе не должен превышать ± 10 %. В течение всего эксперимента животные должны иметь свободный доступ к корму и питьевой воде (за исключением времени измерения физиологических параметров). Для унификации исследований животные на протяжении всего эксперимента получают полусинтетический рацион согласно МУ 1.2.2520—09 «Токсиколого-гигиеническая оценка безопасности наноматериалов».

6.5.2.2.2. Оборудование

Нагревательный столик ML-1.5-4 (ООО «Мила-Форм», Россия, или аналогичный). Лабораторная центрифуга с охлаждением, рассчитанная на ускорение до 10 000g. СМ 6.03 ELMI (Латвия) или аналогичная.

Клетки для содержания животных «плексигласовый домик» (ООО «СПИ», Россия, или аналогичный). Палочка (лопаточка) глазная (Апекслаб, Россия, или аналогичная).

Компьютер IBM PC-совместимый по ГОСТ 27201—87 с установленным программным обеспечением SPSS 12 (SPSS Inc., США) или с аналогичными параметрами.

6.5.1.2.3. Материалы и реактивы

Одноразовые пластиковые пробирки	ТУ 64-2-30—80
Дозаторы пипеточные с диапазоном объема доз 20—200 мм^3 и 200—1 000 мм^3 и дискретностью установки доз 1 и 5 мм^3 соответственно, с наконечниками	ТУ 64-16-55—90
Одноразовые пластиковые шприцы	ГОСТ 24861—91
Бромсульфалеин фирмы «Sigma», США или аналогичный	

6.5.1.3. Метод введения наноматериалов животным

Наноматериалы можно вводить: парентерально (внутривенно, внутримышечно, внутрибрюшинно), ингаляционно и перорально (в составе корма, питьевой воды или через зонд). Рекомендуется проводить подострое (ежедневное введение в течение 3 месяцев) и хроническое введение (ежедневное введение в течение 6 месяцев) наноматериала.

Введение наноматериала проводят за 1 ч до проведения анализа. При подостром и хроническом введении наноматериала анализ проводят на 10, 30, 60 и 90-е сут. и на 30 и 180-е сут. соответственно. Дозы введения наноматериала при подостром воздействии – от минимальной токсической дозы до $^1/_5$ LD_{50}, при хроническом воздействии – от $^1/_3$ до $^1/_{10}$ части минимальной токсической дозы.

6.5.1.4. Проведение измерений

БСФ вводят в хвостовую вену животного в дозе 1—5 мг/кг. Через 1, 5, 15 и 45 мин после введения красителя спектрофотометрическим методом определяют содержание БСФ в крови животного. Вычисляют коэффициент ретенции БСФ, элиминируемого в виде конъюгатов с цистеином и глутатионом.

Кровь у мелких лабораторных животных (мыши, крысы) можно отбирать из хвоста или из сердца (в случае вскрытия животных). Оптимальный объём сыворотки крови – не менее 30 мм^3. Забор крови производят в одноразовые пластиковые пробирки.

После забора крови пластиковые пробирки закрывают крышками и центрифугируют от 10 сек до 1 мин при скорости до 2 000 g, чтобы сбро-

сить капельки крови, осевшие на стенки пробирок, не дав им высохнуть. Для получения плазмы кровь отбирают в пробирки, куда предварительно внесен раствор гепарина (10 ед/см^3). Пробирки центрифугируют в течение 10 мин на скорости 2 000 g. Отбирают плазму, не задевая клеток, в отдельную пробирку, которую маркируют (например, П – плазма).

6.5.1.5. Анализ и интерпретация полученных данных

Статистический анализ данных проводят, как указано в п. 6.2.1.5. Расчёт LD_{50}, минимальной токсической дозы производят при предварительной оценке острой токсичности наноматериала согласно МУ 1.2.2520—09 «Токсиколого-гигиеническая оценка безопасности наноматериалов».

Наноматериал признаётся безопасным по результатам тестирования, если через 45 мин содержание БСФ не превышает 5 % от первоначального уровня в крови, взятой через 3 мин после введения красителя.

6.6. Оценка безопасности наноматериалов по интенсивности местных воспалительных реакций

6.6.1. Методика накожных аппликаций

6.6.1.1. Принцип метода

Метод позволяет оценить местное раздражающее и аллергизирующее действие наноматериала.

6.6.1.2. Животные, оборудование и материалы

6.6.1.2.1. Животные

Исследования проводят на следующих видах лабораторных животных: морские свинки (масса тела 250—300 г), белые крысы популяции Wistar (масса тела 200—225 г), мыши линии Balb/c, C57Bl/6, CBA (масса тела 18—20 г). В некоторых случаях (в зависимости от задач эксперимента) возможно применение беспородных мышей и кроликов. В случае использования линейных животных необходимо указать линию животных.

Наиболее чувствительным в видовом отношении животным является морская свинка. В опытах используют морских свинок-альбиносов или животных, имеющих достаточно большие участки белой кожи. Чувствительность самцов и самок к одному и тому же препарату может быть неодинакова, поэтому желательно проведение эксперимента на животных обоих полов. Опыты проводят на молодых, здоровых и половозрелых животных.

Количество животных в группе зависит от целей исследования, но не должно быть менее 10 особей. Разброс по массе тела животных в

группе не должен превышать ± 10 %. В течение всего эксперимента животные должны иметь свободный доступ к корму и питьевой воде (за исключением времени измерения физиологических параметров). Для унификации исследований животные на протяжении всего эксперимента получают полусинтетический рацион согласно МУ 1.2.2520—09 «Токсиколого-гигиеническая оценка безопасности наноматериалов».

6.6.1.2.2. Материалы и реактивы

Дозаторы пипеточные с диапазоном объема доз 20—200 мм^3, 200—1 000 мм^3 и дискретностью установки доз 1 и 5 мм^3 соответственно, с наконечниками ТУ 64-16-55—90

Глазная стеклянная лопаточка

6.6.1.3. Метод введения наноматериалов животным

Рекомендуется в качестве растворителя наноматериала использовать дистиллированную воду и изотонический раствор натрия хлорида. Возможно использование 1 %-го этилового спирта, ацетона, 1 %-го раствора крахмала. При накожных аппликациях применяют ланолин, вазелиновое или растительное масло.

Используют аппликационный путь введения наноматериалов – нанесение на кожу.

На выстриженный участок белой кожи боковой поверхности туловища животного, ближе к середине туловища, наносят по 3 капли раствора тестируемого наноматериала, приготовленного на дистиллированной воде или других растворителях (ацетон, этиловый спирт, вазелиновое масло). Если вещество нерастворимо, то наносят по 0,5 г мази, приготовленной на вазелине или ланолине. Для оценки раздражения кожи аппликации проводят не менее 7 дней.

Исследование сенсибилизирующего действия вещества проводят путем 20 повторных накожных аппликаций на участок боковой поверхности туловища размером 2 × 2 см по 5 раз в неделю. Если наносят жидкость, то ее дозируют пипеткой и берут по 3 капли (1 см^3 водного раствора – 60 капель, ацетона – 40, вазелинового масла – 51). Если применяют мазь, то ее наносят равномерным слоем на весь участок аппликации с помощью глазной стеклянной лопаточки. Более 20 накожных аппликаций проводить не следует, т. к. они могут оказать гипосенсибилизирующее действие, особенно если фармакологическое средство является слабым аллергеном.

Первое тестирование проводят после 10 аппликаций и в случае выявления аллергии дальнейшее нанесение вещества можно прекратить.

При отрицательном или сомнительном результате число аппликаций обязательно доводят до 20, после чего животных тестируют повторно.

Для сенсибилизации животных можно использовать дозы, последовательно на порядок меньше, чем $ЛД_{50}$ (при возможности ее определения) ($^1/_{10}$, $^1/_{100}$, $^1/_{1\,000}$ от $ЛД_{50}$).

6.6.1.4. Проведение измерений

Реакцию кожи учитывают ежедневно по шкале оценки кожных проб (табл. 8). В качестве отрицательного контроля используют дистиллированную воду и изотонический раствор натрия хлорида. Для оценки реактивности экспериментальных животных можно использовать позитивный контроль, т. е. животных, которым вводят какой-либо эталонный аллерген (например 2,4,6-тринитрофенилсульфокислота, 2,4,6-тринитрохлорбензол, 2,4-динитрохлорбензол, пикрилсульфокислота и др.).

Таблица 8

Шкала оценки аппликационных кожных тестов

Результат реакции	Условное обозначение	Описание реакции
Отрицательный	–	Изменения кожи отсутствуют
Сомнительный	+–	Небольшая эритема без отека
Слабоположительный	+	Наличие эритемы без отека
Положительный	++	Эритема и отек в месте аппликации
Резко положительный	+++	В месте аппликации эритема, отек, папулы, изолированные везикулы
Очень резко положительный	++++	В месте аппликации гиперемия, отек, папулы, сливающиеся везикулы

6.6.1.5. Анализ и интерпретация полученных данных

Наноматериал признаётся безопасным по результатам тестирования, если реакция отсутствует.

6.6.2. Методика конъюнктивальной пробы

6.6.2.1. Принцип метода

Метод позволяет оценить местное раздражающее и аллергизирующее действие наноматериала.

6.6.2.2. Животные, оборудование и материалы

6.6.2.2.1. Животные

Исследования проводят на следующих видах лабораторных животных: морские свинки (масса тела 250—300 г), кролики. В случае использования линейных животных необходимо указать линию животных.

Наиболее чувствительным в видовом отношении животным является морская свинка. Разброс в экспериментальных группах по исходной массе не должен превышать ±10 %. Чувствительность самцов и самок к одному и тому же препарату может быть неодинакова, поэтому желательно проведение эксперимента на животных обоих полов. Опыты проводят на молодых, здоровых и половозрелых животных.

Количество животных в группе зависит от целей исследования, но не должно быть менее 10 особей в группе. Разброс по исходной массе тела животных в группе не должен превышать ± 10 %. В течение всего эксперимента животные должны иметь свободный доступ к корму и питьевой воде (за исключением времени измерения физиологических параметров). Для унификации исследований животные на протяжении всего эксперимента получают полусинтетический рацион согласно МУ 1.2.2520—09 «Токсиколого-гигиеническая оценка безопасности наноматериалов».

6.6.2.2.2. Материалы и реактивы

Дозаторы пипеточные с диапазоном объема доз 20—200 мм^3, 200—1 000 мм^3 и дискретностью установки доз 1 и 5 мм^3 соответственно, с наконечниками — ТУ 64-16-55—90

6.6.2.3. Метод введения наноматериалов животным

Рекомендуется в качестве растворителя наноматериала использовать дистиллированную воду и изотонический раствор натрия хлорида.

Для постановки пробы одну каплю водного раствора испытуемого вещества вводят глазной пипеткой с вытянутым тонким концом под верхнее веко морским свинкам или кроликам, во второй глаз (контрольный) вводят 1 каплю воды. Закапывание удобнее производить при положении животного лежа головой вниз. Используется острое (однократное введение), подострое (ежедневное введение в течение 3 месяцев) и хроническое введение (ежедневное введение в течение 6 месяцев) наноматериала.

Для сенсибилизации животных можно использовать дозы наноматериала, последовательно на порядок меньше, чем $ЛД_{50}$ (при возможности ее определения) ($^1/_{10}$, $^1/_{100}$, $^1/_{1\,000}$ от $ЛД_{50}$).

6.6.2.4. Проведение измерений

Реакции конъюнктивной пробы учитывают через 15 мин (быстрая реакция) и через 24—48 ч (гиперчувствительность замедленного типа). Степень раздражения и воспаления оценивают через различные периоды времени после воздействия: при остром введении – в течение 14 дней, при подостром – в течение 90 дней, при хроническом – в течение 180 дней.

6.6.2.5. Анализ и интерпретация полученных данных

Реакции конъюнктивной пробы оценивают по следующей шкале (в баллах):

1 – легкое покраснение слезного протока;

2 – покраснение слезного протока и склеры в направлении к роговице;

3 – покраснение всей конъюнктивы и склеры.

Наноматериал признаётся безопасным по результатам тестирования, если реакция отсутствует.

6.7. Тестирование безопасности наноматериалов по поведенческим реакциям животных

6.7.1. Методика теста «открытое поле»

6.7.1.1. Принцип метода

«Открытое поле» – классическая модель исследования поведения, основанная на конфликте двух мотиваций – инстинктивной тенденции к исследованию нового окружения и тенденции минимизировать возможную опасность со стороны такового. Тест «открытое поле» является информативной методикой, позволяющей адекватно оценивать нейротропные эффекты повреждающих факторов окружающей среды. В этом тесте оцениваются двигательная и ориентировочно-исследовательская активность.

Снижение общей подвижности животных в данном тесте является следствием повышения уровня их стрессированности, поскольку крысы реагируют замиранием на новые, потенциально опасные стимулы. В тесте «открытое поле» потенциально опасная ситуация имитируется помещением животного в камеру, которая значительно больше, чем клетка, в которой живет крыса. Тестирование можно проводить либо при ярком свете (в стерессогенной обстановке), либо при свете красной лампы. В последнем случае уровень стрессированности животных меньше.

6.7.1.2. Животные, оборудование и материалы

6.7.1.2.1. Животные

Исследования проводят на линейных (линий Wistar, Sprague-Dawley и др.) или нелинейных крысах. В случае использования линейных животных необходимо указать линию. Количество животных в группе зависит от целей исследования, но не должно быть менее 10 особей. Разброс по исходной массе тела в группе не должен превышать ± 10 %. В течение всего эксперимента животные должны иметь свободный доступ к корму и питьевой воде (за исключением времени измерения физиологических параметров). Для унификации исследований животные на протяжении всего эксперимента получают полусинтетический рацион согласно МУ 1.2.2520—09 «Токсиколого-гигиеническая оценка безопасности наноматериалов».

6.7.1.2.2. Оборудование

Установка для проведения методики «открытое поле». Видеокамера. Компьютер IBM PC-совместимый по ГОСТ 27201—87 с установленным программным обеспечением EasyTrack, разработанной в НИИ Нормальной физиологии РАМН и программным обеспечением SPSS 12 (SPSS Inc., США).

6.7.1.3. Метод введения наноматериалов животным

Наноматериалы можно вводить: парентерально (внутривенно, внутримышечно, внутрибрюшинно), ингаляционно и перорально (в составе корма, питьевой воды или через зонд). Используется острое (однократное введение), подострое (ежедневное введение в течение 3 месяцев) и хроническое введение (ежедневное введение в течение 6 месяцев) наноматериала.

Тест проводят сначала в режиме экспозиции, т. е. через 1 ч после введения наноматериала, а затем каждый день в течение 14 дней (при остром введении), на 210, 240, 270, 300, 330 и 360-й дни (при хроническом введении). Дозы введения наноматериала при остром воздействии – от минимальной токсической дозы до 1 LD_{50}, при подостром воздействии – от минимальной токсической дозы до $^1/_5$ LD_{50}, при хроническом воздействии – $^1/_3$—$^1/_{10}$ части минимальной токсической дозы.

6.7.1.4. Проведение измерений

Установка представляет собой круглую арену диаметром 90 см с боковыми стенками высотой 50 см. Арена освещается неярким светом красной лампы мощностью 40 Вт, которая расположена на высоте 2 м. В начале тестирования крысу помещают в центр арены. За поведением животного наблюдают в течение 10 мин.

Параметры поведения регистрируют визуально, а также ведется видеозапись поведения крыс для анализа с использованием программы EasyTrack, разработанной в НИИ Нормальной физиологии РАМН.

6.7.1.5. Анализ и интерпретация полученных данных

Помещение животного в новое окружение ведет к возникновению исследовательского поведения, которому в то же время препятствуют условия, вызывающие страх. Две антагонистические тенденции характеризуются разным временным ходом.

При анализе поведения животного в тесте «открытое поле» выделяют центральную зону арены с диаметром 35 см. Выпущенное животное начинает двигаться вдоль стен камеры. Первоначально исследовательское поведение ограничивается периферическим сектором, а внутренние области посещаются редко. Исследовательское поведение животных наиболее выражено в течение первой минуты, затем оно постепенно ослабевает. При тестировании в свете красной лампы в течение 10 мин животное адаптируется к экспериментальной обстановке и начинает исследовать окружение, что проявляется в виде вторичного подъема активности.

Для периферического сектора визуально регистрируют:

- количество стоек;
- количество и продолжительность актов груминга;
- количество дефекаций.

Для анализа динамики исследовательской активности крысы в течение тестирования скорость движения животного и количество стоек усредняют для последовательных интервалов длительностью 1 мин.

При помощи программы EasyTrack анализируют изображение, определяя положение тела животного в арене, что позволяет регистрировать следующие параметры:

- общий пробег (в см);
- время движения (при скорости более 15 см/с);
- время неподвижности (при скорости менее 2 см/с);
- среднюю скорость движения;
- количество и продолжительность двигательной активности и замирания.

Такой же набор параметров, а также латентный период и длительность пребывания регистрируется для центрального сектора.

Замирание крысы в «открытом поле» рассматривают как симптом страха. Лучшим отражением уменьшения страха у животных является исследование ими внутреннего сектора. Смена эмоционального состоя-

ния сопровождается изменением работы внутренних органов. Вегетативная функция, которую удобно учитывать вместе с измерением активности, – это дефекация. Обнаружена отрицательная корреляция между дефекацией и исследованием центральной части открытого поля. Стойки рассматриваются как индекс исследовательской активности, чувствительный к уровню тревожности или действию анксиолитиков (транквилизаторов). Груминг трактуется как «смешанное» поведение.

Те животные, которые меньше передвигаются и у которых наблюдается большая дефекация в ситуации «открытого поля», считаются более эмоциональными, чем те, которые много передвигаются, но имеют низкий уровень дефекации.

Статистический анализ данных проводят, как указано в п. 7.2.1.5. Расчёт LD_{50}, минимальной токсической дозы производят при предварительной оценке острой токсичности наноматериала согласно МУ 1.2.2520—09 «Токсиколого-гигиеническая оценка безопасности наноматериалов».

Наноматериал признаётся безопасным по результатам тестирования при выполнении следующих критериев: если основные параметры (количество стоек, количество и продолжительность актов груминга, количество дефекаций, общий пробег, время движения, время неподвижности, средняя скорость движения, количество и продолжительность двигательной активности и замирания) у животных из опытной группы не отличаются достоверно от контроля.

6.7.2. Методика теста «приподнятый крестообразный лабиринт»

6.7.2.1. Принцип метода

Тест «приподнятый крестообразный лабиринт» является информативной методикой, позволяющей адекватно оценивать нейротропные эффекты повреждающих факторов окружающей среды, и позиционируется как одна из наиболее чувствительных моделей для исследования тревожности животного. В этом тесте оценивают: двигательную активность, скорость ориентировочных реакций, степень выраженности эмоциональной реакции страха и тревоги.

6.7.2.2. Животные, оборудование и материалы

6.7.2.2.1. Животные

Исследования проводятся как на линейных (крысы линий Wistar, Sprague-Dawley и др.), так и нелинейных крысах. В случае использования линейных животных необходимо указать линию животных. Количество животных в группе зависит от целей исследования, но не должно

быть менее 10 особей в группе. Разброс по исходной массе тела животных в группе не должен превышать ± 10 %. В течение всего эксперимента животные должны иметь свободный доступ к корму и питьевой воде (за исключением времени измерения физиологических параметров). Для унификации исследований животные на протяжении всего эксперимента получают полусинтетический рацион согласно МУ 1.2.2520—09 «Токсиколого-гигиеническая оценка безопасности наноматериалов».

6.7.2.2.2. Оборудование

«Крестообразный лабиринт» – конструкция, состоящая из центральной площадки и четырех лучей, два из которых снабжены боковыми стенками. Длина луча составляет 45 см, ширина – 10 см, высота боковых стенок закрытых лучей – 20 см. Вся установка приподнята на 70 см над уровнем пола.

Компьютер IBM PC-совместимый по ГОСТ 27201—87 с установленным программным обеспечением SPSS 12 (SPSS Inc., США).

6.7.2.3. Метод введения наноматериалов животным

Наноматериалы можно вводить: парентерально (внутривенно, внутримышечно, внутрибрюшинно), ингаляционно и перорально (в составе корма, питьевой воды или через зонд). Используют острое (однократное введение), подострое (ежедневное введение в течение 3 месяцев) и хроническое введение (ежедневное введение в течение 6 месяцев) наноматериала.

Тест проводят сначала в режиме экспозиции, т. е. через 1 ч после введения наноматериала, а затем каждый день в течение 14 дней (при остром введении), на 210, 240, 270, 300, 330 и 360-й дни (при хроническом введении). Дозы введения наноматериала при остром воздействии – от минимальной токсической дозы до 1 LD_{50}, при подостром воздействии - от минимальной токсической дозы до 1/5 LD_{50} , при хроническом воздействии – $^1/_3$—$^1/_{10}$ части минимальной токсической дозы.

6.7.2.4. Проведение измерений

Во время эксперимента лабиринт освещается ярким белым светом. В начале тестирования, длительность которого составляет 5 мин, крысу помещают в центр лабиринта головой к открытому лучу. Визуально регистрируют следующие параметры:

- латентный период ухода с центральной площадки;
- количество посещений и время пребывания на открытых и в закрытых лучах;
- количество выходов и время пребывания на центральной площадке;

• количество «выглядываний» на открытые лучи (эпизоды, когда крыса осматривала открытые лучи, но опиралась на них только передними лапами);

• количество «свешиваний» (эпизодов, когда животное перегибалось через край открытых лучей);

• количество и продолжительность актов груминга, стоек.

6.7.2.5. Анализ и интерпретация полученных данных

К регистрируемым в «приподнятом крестообразном лабиринте» показателям уровня тревожности относят число выходов и длительность пребывания животных в открытых рукавах («открытые» выходы), а также соотношение времени и количества выходов в открытые и закрытые рукава. Чем меньше у животного выражена реакция тревоги и фобический компонент эмоционального статуса, тем больший период времени наблюдения оно проводит в открытых рукавах и реже посещает закрытые.

Статистический анализ данных проводят с помощью программного обеспечения SPSS 12. Предварительную оценку характера распределения данных осуществляют с помощью теста Shapiro-Wilk. В соответствии с полученным результатом при дальнейшей обработке применяют непараметрические критерии или критерии для нормально распределенных данных. Достоверность различий средних значений нескольких групп данных оценивают по критерию Friedman. При проведении обобщенной оценки достоверность различия средних значений для нескольких групп данных определяют по критерию Kruskal-Wallis, а для 2 групп данных – по критерию Mann-Whitney. Для анализа различий между двумя группами данных применяют парный t-критерий Student или непараметрический критерий Wilcoxon. Корреляционный анализ проводят с использованием статистики Spearman. Выводы считают достоверными при допустимой вероятности ошибки менее 0,05. Данные представляют в виде среднего арифметического ± стандартное отклонение (SD). Расчёт LD_{50}, минимальной токсической дозы производят при предварительной оценке острой токсичности наноматериала согласно МУ 1.2.2520—09 «Токсиколого-гигиеническая оценка безопасности наноматериалов».

Наноматериал признаётся безопасным по результатам тестирования при выполнении следующих критериев: если основные параметры (латентный период ухода с центральной площадки; количество посещений и время пребывания на открытых и в закрытых лучах; количество выходов и время пребывания на центральной площадке; количество «выгля-

дываний» на открытые лучи; количество «свешиваний»; количество и продолжительность актов груминга, стоек) у животных из опытной группы не отличаются достоверно от контроля.

6.7.3. Методика условного рефлекса пассивного избегания

6.7.3.1. Принцип метода

Методика условного рефлекса пассивного избегания (УРПИ) является базисной моделью для оценки влияния токсических веществ на формирование и воспроизведение памятного следа в норме и в условиях амнезии. Основные преимущества – быстрота выработки рефлекса (обучение с одной пробы) и возможность дифференцированно воздействовать на различные фазы памяти.

6.7.3.2. Животные, оборудование и материалы

6.7.3.2.1. Животные

Исследования проводятся как на линейных (крысы линий Wistar, Sprague-Dawley и др.), так и нелинейных крысах. В случае использования линейных животных необходимо указать линию животных. Количество животных в группе зависит от целей исследования, но не должно быть менее 10 особей в группе. Разброс по исходной массе тела животных в группе не должен превышать ± 10 %. В течение всего эксперимента животные должны иметь свободный доступ к корму и питьевой воде (за исключением времени измерения физиологических параметров). Для унификации исследований животные на протяжении всего эксперимента получают полусинтетический рацион согласно МУ 1.2.2520—09 «Токсиколого-гигиеническая оценка безопасности наноматериалов».

6.7.3.2.2. Оборудование

Установка для УРПИ, состоящая из 2 отсеков: затемненного и освещенного, соединенных дверцей.

Компьютер IBM PC-совместимый по ГОСТ 27201—87 с установленным программным обеспечением SPSS 12 (SPSS Inc., США).

6.7.3.3. Метод введения наноматериалов животным

Наноматериалы можно вводить: парентерально (внутривенно, внутримышечно, внутрибрюшинно), ингаляционно и перорально (в составе корма, питьевой воды или через зонд). Используют острое (однократное введение), подострое (ежедневное введение в течение 3 месяцев) и хроническое введение (ежедневное введение в течение 6 месяцев и более) наноматериала.

Тест проводят сначала в режиме экспозиции, т. е. через 1 ч после введения наноматериала, а затем каждый день в течение 14 дней (при

остром введении), на 210, 240, 270, 300, 330 и 360-й дни и более (при хроническом введении). Дозы введения наноматериала при остром воздействии – от минимальной токсической дозы до 1 LD_{50}, при подостром воздействии – от минимальной токсической дозы до $^1/_5$ LD_{50}, при хроническом воздействии – $^1/_3$—$^1/_{10}$ части минимальной токсической дозы.

6.7.3.4. Проведение измерений

Наиболее часто используемая модификация теста УРПИ – обучение животных в установке, состоящей из 2 отсеков: затемненного и освещенного, соединенных дверцей. Помещенное в светлый отсек (хвостом к дверце) животное довольно быстро переходит через дверь в затемненный отсек (норковый рефлекс) и затем получает там электрокожное раздражение через электродный пол. Параметры электроболевого раздражения, наносимого через электродный пол, во всех модификациях УРПИ составляют 0,3—0,6 мА.

Животное должно обучиться не заходить в темную камеру, где оно получило болевое раздражение, и пассивно избегать неприятную ситуацию, находясь в светлом отсеке. Проверка сохранения УРПИ (воспроизведения рефлекса) состоит в повторном помещении животного в освещенный отсек и т. д. через различные интервалы времени. Наиболее часто используется интервал 24 ч. Для оценки степени обучения через эти интервалы регистрируют латентное время первого захода в темный отсек камеры, где ранее с использованием болевого раздражения проводилось обучение, и времени, проведенного в светлом и темном отсеке за фиксированный интервал (2, 3, 5 мин).

Для проверки влияния вещества на фазы памяти вещество вводят в различные фазы формирования памятного следа. Для получения данных о влиянии вещества на процесс ввода и первоначальной обработки информации вещество вводят непосредственно перед процедурой обучения, а проверка осуществляется через 24 ч.

6.7.3.5. Анализ и интерпретация полученных данных

Статистический анализ данных проводят, как указано в п. 7.2.1.5. Расчёт LD_{50}, минимальной токсической дозы производят при предварительной оценке острой токсичности наноматериала согласно МУ 1.2.2520—09 «Токсиколого-гигиеническая оценка безопасности наноматериалов».

Наноматериал признаётся безопасным по результатам тестирования при выполнении следующих критериев: если основные параметры УРПИ (латентное время первого захода в темный отсек камеры; время,

проведенное в светлом и темном отсеках) у животных из опытной группы не отличаются достоверно от контроля.

6.8. Тестирование безопасности наноматериалов на основе определения физической выносливости животных

6.8.1. Метод истощающего плавания

6.8.1.1. Принцип метода

Среди методик изучения физической выносливости организма при работе с животными наиболее широко распространены методики истощающих физических нагрузок либо с помощью бега на тредбане до отказа, либо в тестах истощающего острого плавания. Важно, что по сравнению с методиками истощающего бега, методики истощающего плавания для сухопутных животных, к которым относятся крысы, являются тестированием физической выносливости в условиях стресса, т. е. в условиях, позволяющих максимально проявить незначительные нарушения функционирования органов и систем (стрессорные и гипоксические воздействия различной природы, при нарушениях функционирования ЦНС и в других случаях). Именно поэтому для оценки действия малотоксичных или инертных препаратов, к которым можно отнести и значительное количество наноматериалов, был выбран способ тестирования физической выносливости с помощью методики истощающего плавания.

Высокая чувствительность, воспроизводимость и относительная простота исполнения методики «истощающего плавания» при измерении выносливости организма являются основой введения ее в комплекс методик физиологического скрининга для оценки влияния наноматериалов на жизненно важные системы организма.

6.8.1.2. Животные, оборудование и материалы

6.8.1.2.1 Животные

Мелкие лабораторные животные (крысы и мыши), как линейные (крысы линий Wistar, Sprague-Dawley и др.; мыши линий СВА, С57В1/6 и др.), так и нелинейные. В случае использования линейных животных необходимо указать линию животных.

Количество животных в группе зависит от целей исследования, но не должно быть менее 10 особей в группе. Разброс по исходной массе тела животных в группе не должен превышать ± 10 %. В течение всего эксперимента животные должны иметь свободный доступ к корму и питьевой воде (за исключением времени измерения физиологических

параметров). Для унификации исследований животные на протяжении всего эксперимента получают полусинтетический рацион согласно МУ 1.2.2520—09 «Токсиколого-гигиеническая оценка безопасности наноматериалов».

6.8.1.2.2. Оборудование

Ведро эмалированное по ГОСТ 10503—71. Гири по ГОСТ 7328—2001. Компьютер IBM PC-совместимый по ГОСТ 27201—87 с установленным программным обеспечением SPSS 12 (SPSS Inc., США) или с аналогичными параметрами.

6.8.1.3. Метод введения наноматериалов животным

Наноматериалы можно вводить: парентерально (внутривенно, внутримышечно, внутрибрюшинно), ингаляционно и перорально (в составе корма, питьевой воды или через зонд). Используют острое (однократное введение), подострое (ежедневное введение в течение 3 месяцев) и хроническое введение (ежедневное введение в течение 6 месяцев) наноматериала.

Тест проводят сначала в режиме экспозиции, т. е. через 1 ч после введения наноматериала, а затем каждый день в течение 14 дней (при остром введении), на 210, 240, 270, 300, 330 и 360-й дни (при хроническом введении). Дозы введения наноматериала при остром воздействии – от минимальной токсической дозы до 1 LD_{50}, при подостром воздействии – от минимальной токсической дозы до $^1/_5$ LD_{50} , при хроническом воздействии – $^1/_3$—$^1/_{10}$ части минимальной токсической дозы.

6.8.1.4. Проведение измерений

Животное помещают в ведро с водой и следят за тем, чтобы оно не могло уцепиться за стенки или выступы ведра. Добиваются того, чтобы животное находилось в состоянии активного плавания постоянно. Тест продолжается вплоть до момента истощения, который выражается в том, что животное начинает тонуть.

Для усиления стрессорной составляющей истощающего плавания и для стандартизации методики часто применяют плавание с грузом, составляющим 3—7 % от массы тела животного. Поэтому немаловажным стандартным параметром проведения методики является фиксирование веса животных на протяжении всего эксперимента, особенно при хроническом способе введения наночастиц. Известно, что при многократных, пролонгированных введениях даже малотоксичных препаратов снижение веса тела является часто встречаемым ответом. Кроме того, снижение этого параметра может быть опосредованным, т. е. регистрируемое снижение веса может быть вызвано не самим препаратом, а способом

его введения или вызванным и развившимся впоследствии хроническим стрессом, как показано на множестве подобных моделей.

В ходе теста оценивают ряд параметров: время непрерывного плавания до момента истощения, скорость движений передними и задними лапами, расстояние, проплываемое животным за единицу времени, количество касаний стенки ведра.

6.8.1.5. Анализ и интерпретация полученных данных

Статистический анализ данных проводят, как указано в п. 7.2.1.5. Расчёт LD_{50}, минимальной токсической дозы производят при предварительной оценке острой токсичности наноматериала согласно МУ 1.2.2520—09 «Токсиколого-гигиеническая оценка безопасности наноматериалов».

Наноматериал признаётся безопасным по результатам тестирования, если основные параметры (время непрерывного плавания до момента истощения, скорость движений передними и задними лапами, расстояние, проплываемое животным за единицу времени, количество касаний стенки ведра) у животных из опытной группы не отличаются достоверно от контроля.

6.8.2. Методика динамометрического измерения произвольной силы скелетных мышц передних конечностей

6.8.2.1. Принцип метода

Методика динамометрического измерения произвольной силы скелетных мышц была разработана для тестирования эффектов повреждающих токсических воздействий и обеспечивает комплексную оценку нейромоторной функции. Этим обусловлена его информативность при тестировании изменений физической работоспособности вследствие токсического воздействия наноматериалов.

Методика основана на безусловной реакции животных цепляться за единственно доступную опору и удерживаться на ней с максимальным усилием. С помощью данного теста можно объективно оценивать произвольное усилие, которое способны развивать животные. Методика входит в перечень методов, рекомендуемых национальной токсикологической программой США для оценки нейротропных эффектов различных повреждающих воздействий («The neurobehavioral test battery»).

Под влиянием психотропных препаратов (фенобарбитала и хлордиазепоксида – соединения диазепинового ряда) наблюдается заметное снижение силы мышц передних конечностей, что свидетельствует о том, что данная методика является перспективным подходом для оценки

нейромоторных эффектов психотропных фармакологических агентов, а также нейротропных воздействий окружающей среды.

Величина регистрируемой произвольной силы зависит от многих факторов. Величина развиваемого усилия зависит от функционирования центральных механизмов управления движением, в т. ч. структур головного мозга, ответственных за формирование центральной управляющей команды. Наконец, она зависит от состояния периферического нервно-мышечного аппарата.

Кроме того, величина регистрируемого этим методом параметра зависит от функциональных характеристик органа-исполнителя – скелетной мышцы. Так, уменьшение массы тела вследствие частичной пищевой депривации сопровождается выраженным снижением произвольной силы мышц.

6.8.2.2. Животные, оборудование и материалы

6.8.2.2.1. Животные

Мелкие лабораторные животные (крысы и мыши), как линейные (крысы линий Wistar, Sprague-Dawley и др.; мыши линий CBA, C57B1/6 и др.), так и нелинейные. В случае использования линейных животных необходимо указать линию животных.

Количество животных в группе зависит от целей исследования, но не должно быть менее 10 особей в группе. Разброс по исходной массе тела животных в группе не должен превышать ± 10 %. В течение всего эксперимента животные должны иметь свободный доступ к корму и питьевой воде (за исключением времени измерения физиологических параметров). Для унификации исследований животные на протяжении всего эксперимента получают полусинтетический рацион согласно МУ 1.2.2520—09 «Токсиколого-гигиеническая оценка безопасности наноматериалов».

6.8.2.2.2. Оборудование

Система динамометрического измерения силы GripStrength Meter (TSE Instuments, Германия). Компьютер IBM PC-совместимый по ГОСТ 27201—87 с установленным программным обеспечением SPSS 12 (SPSS Inc., США) или с аналогичными параметрами.

6.8.2.3. Метод введения наноматериалов животным

Наноматериалы можно вводить: парентерально (внутривенно, внутримышечно, внутрибрюшинно), ингаляционно и перорально (в составе корма, питьевой воды или через зонд). Используют острое (однократное введение), подострое (ежедневное введение в течение 3 меся-

цев) и хроническое введение (ежедневное введение в течение 6 месяцев и более) наноматериала.

Тест проводят сначала в режиме экспозиции, т. е. через 1 ч после введения наноматериала, а затем каждый день в течение 14 дней (при остром введении), на 210, 240, 270, 300, 330 и 360-й дни и более (при хроническом введении). Дозы введения наноматериала при остром воздействии – от минимальной токсической дозы до 1 LD_{50}, при подостром воздействии – от минимальной токсической дозы до $^1/_5$ LD_{50}, при хроническом воздействии – $^1/_3$—$^1/_{10}$ части минимальной токсической дозы.

6.8.2.4. Проведение измерений

Тестирование физической силы мышц проводится с использованием системы динамометрического измерения силы GripStrength Meter. Во время тестирования животное помещают в установку и, держа его за хвост, дают ухватиться за рычаг, соединенный с тензометрическим датчиком. Равномерным движением крысу тянут за хвост и регистрируют максимальное значение силы в момент отрыва от рычага.

6.8.2.5. Анализ и интерпретация полученных данных

Статистический анализ данных проводят, как указано в п. 7.2.1.5. Расчёт LD_{50}, минимальной токсической дозы производят при предварительной оценке острой токсичности наноматериала согласно МУ 1.2.2520—09 «Токсиколого-гигиеническая оценка безопасности наноматериалов».

Наноматериал признаётся безопасным по результатам тестирования, если максимальное значение силы в момент отрыва у животных из опытной группы не отличается достоверно от контроля.

Приложение 1
(справочное)

Нормативные ссылки

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

2.2. Федеральный закон Российской Федерации от 02 января 2000 г. № 29-ФЗ «О качестве и безопасности пищевых продуктов».

2.3. Закон Российской Федерации от 26 июня 2008 г. № 102-ФЗ «Об обеспечении единства измерений».

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

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

2.6. Постановление Правительства Российской Федерации от 21 декабря 2000 г. № 987 «О государственном надзоре и контроле в области обеспечения качества и безопасности пищевых продуктов».

2.7. Постановление Правительства Российской Федерации от 21 декабря 2000 г. № 988 «О государственной регистрации новых пищевых продуктов, материалов и изделий».

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

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

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

2.11. Приказ Министерства здравоохранения СССР от 12 августа 1977 г. № 755 «О мерах по дальнейшему совершенствованию организационных форм работы с использованием экспериментальных животных».

2.12. Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 19 июня 2003 г. № 267 «Об утверждении Правил лабораторной практики» (Зарегистрирован Минюстом России 25.06.2003 № 4809).

2.13. Приказ Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека от 19 июля 2007 г. № 224 «О санитарно-эпидемиологических экспертизах, обследованиях, исследованиях, испытаниях и токсикологических, гигиенических и иных видах оценок» (Зарегистрирован Минюстом России 20.07.2007 № 9866).

2.14. Межотраслевые правила по охране труда при использовании химических веществ. ПОТ Р М-004—07. Утверждены Министерством труда и социального развития Российской Федерации, постановление от 17 сентября 1997 г., № 44. Согласованы с Федерацией независимых профсоюзов России, письмо от 9 января 1997 г., № 109/5. Введены в действие с 1 апреля 1998 г.

2.15. СП 2.2.2.1327—03 «Гигиенические требования к организации технологических процессов, производственному оборудованию и рабочему инструменту». Утв. Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации, первым заместителем министра здравоохранения Российской Федерации Г. Г. Онищенко 23 мая 2003 г. Дата введения: 25 июня 2003 г. М.: Федеральный центр Госсанэпиднадзора Минздрава России, 2003. 52 с.

2.16. Гигиенические нормативы ГН 2.3.3.972—00 «Предельно допустимые количества химических веществ, выделяющихся из материалов, контактирующих с пищевыми продуктами» (Утв. постановлением Главного государственного санитарного врача Российской Федерации, 2000 г.).

2.17. СанПиН 2.1.7.1322—03 «Гигиенические требования к размещению и обезвреживанию отходов производства и потребления».

2.18. «Методические рекомендации по организации хранения, учета и применения химических реактивов в лабораториях санэпидстанций», № 2674-83, Минздрав СССР.

2.19. СанПиН 2.6.1.2523—09 «Нормы радиационной безопасности (НРБ-99/2009)», утв. постановлением Главного государственного санитарного врача Российской Федерации 07.07.2009 г. № 47.

gost.e-ecolog.ru