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

1.2. ГИГИЕНА, ТОКСИКОЛОГИЯ, САНИТАРИЯ

Порядок и методы оценки воздействия искусственных наночастиц и наноматериалов на токсическое действие химических веществ

Методические рекомендации
МР 1.2.0054—11

gost.e-ecolog.ru

ББК 51.2
П59

П59 **Порядок** и методы оценки воздействия искусственных наночастиц и наноматериалов на токсическое действие химических веществ: Методические рекомендации.—М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2012.—42 с.

1. Разработаны Федеральной службой по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Г. Г. Онищенко); Учреждением Российской Академии медицинских наук «Научно-исследовательский институт питания РАМН» (В. А. Тутельян, И. В. Гмошинский, С. А. Хотимченко, М. М. Гаппаров, В. В. Бессонов, Д. Б. Никитюк, Л. В. Кравченко, Э. Н. Трушина, Е. А. Арианова, О. Н.Тананова, А. А. Шумакова, Р. В. Распопов, В. А. Шипелин, И. В. Аксенов, Л. И. Авреньева, Г. В. Гусева, О. И. Передеряев, О. К. Мустафина, Л. В. Шевякова, Н. Н. Махова); Учреждением Российской академии наук «Институт биохимии имени А. Н. Баха» РАН (В. О. Попов, Б. Б. Дзантиев, А. В. Жердев); Учреждением Российской академии наук «Центр «Биоинженерия»РАН (К. Г. Скрябин).

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

2. Утверждены Руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации Г. Г. Онищенко 29 декабря 2011 г.

3. Введены в действие 29 декабря 2011 г.

4. Введены впервые.

ББК 51.2

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

Содержание

I. Область применения 4
II. Введение 5
III. Нормативные ссылки 7
IV. Общие положения 10
V. Порядок изучения воздействия искусственных наночастиц и наноматериалов на токсическое действие химических веществ . 14
5.1. Воздействие наночастиц и наноматериалов на показатели токсического действия солей свинца при пероральном введении 14
5.2. Воздействие наночастиц и наноматериалов на показатели острого гепатотоксического действия четыреххлористого углерода 18
VI. Показатели и методы оценки влияния искусственных наночастиц и наноматериалов на токсическое действие веществ химической природы 21
6.1. Оценка влияния наночастиц и наноматериалов на токсичность и бионакопление ионов свинца 21
6.2. Оценка влияния наночастиц и наноматериалов на острую гепатотоксичность четыреххлористого углерода 23
Приложение 1 Метод определения общего содержания небелковых тиолов в ткани печени 25
Приложение 2 Метод определения 5-аминолевуленовой кислоты в моче 29
Приложение 3 Метод анализа биораспределения свинца с использованием атомно-абсорбционной спектрометрии .. 32
Приложение 4 Рекомендуемая литература по методам определения функционального состояния ферментов I и II стадии метаболизма ксенобиотиков и стабильности биологических мембран в печени 38
Приложение 5 Методы определения активности ферментов антиоксидантной защиты печени 39
Приложение 6 Обозначения и сокращения 42

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

1.2. ГИГИЕНА, ТОКСИКОЛОГИЯ, САНИТАРИЯ

Порядок и методы оценки воздействия искусственных наночастиц и наноматериалов на токсическое действие химических веществ

Методические рекомендации
МР 1.2.0054—11

I. Область применения

1.1. Настоящие методические рекомендации определяют порядок и методы оценки безопасности искусственных наноматериалов по их влиянию на действие токсичных веществ химической природы обычной (традиционной) дисперсности, являющихся контаминантами окружающей среды.

1.2. Настоящие методические рекомендации могут применяться:

– при ьзуемых наноматериалов;

– при оценке кумулятивного и интегрального рисков для здоровья населения, связанных с процессами производства и оборота наноматериалов в условиях многофакторного воздействия;

– оценке безопасности разрабатываемых новых и уже испол-при проведении экспертизы продукции сельского хозяйства, пищевых продуктов, фармацевтической промышленности, биотехнологического производства, содержащих наночастицы и наноматериалы совместно с другими веществами химической природы, являющимися контаминантами окружающей среды.

1.3. Методические рекомендации разработаны с целью обеспечения единства методов проведения биологических тестов, измерений и представления результатов при оценке одновременного действия наноматериалов и химических токсикантов.

1.4. Методические рекомендации предназначены для специалистов органов и организаций Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, а так-

же могут быть использованы научно-исследовательскими организациями гигиенического профиля, медицинскими учебными заведениями и иными организациями и учреждениями, проводящими исследования по оценке безопасности наноматериалов и продукции наноиндустрии.

II. Введение

В связи с быстрым развитием нанотехнологий в последнее время искусственные наночастицы и наноматериалы могут быть значимыми контаминантами объектов окружающей среды (атмосферный воздух, вода, почва и т. д.) и пищевых продуктов. При этом важно иметь в виду, что в большинстве случаев в условиях массированной антропогенной нагрузки на экосистемы наноматериалы воздействуют на организм человека не изолированно, а в сочетании с большим числом различных веществ химической и биологической природы, являющихся контаминантами объектов окружающей среды и имеющих традиционную степень дисперсности. Задача оценки интегрального риска, т. е. обусловленного совокупным действием на организм разных по механизму воздействия вредных факторов при разных путях их поступления, требует при своей корректной постановке учёта их возможного взаимодействия, приводящего либо к усилению токсического эффекта (синергизм), либо, напротив, к его ослаблению (антагонизм).

В рамках Федеральной целевой программы «Развитие инфраструктуры наноиндустрии на 2008—2011 гг.» был разработан и утвержден в установленном порядке Федеральной службой по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека ряд методических документов, включающих порядок и методы тестирования эффектов наночастиц и наноматериалов в биологических системах различного уровня организации. Это МУ 1.2.2520—09 «Токсиколого-гигиеническая оценка безопасности наноматериалов», МУ 1.2.2634—10 «Микробиологическая и молекулярно генетическая оценка воздействия наноматериалов на представителей микробиоценоза», МУ 1.2.2635—10 «Медико-биологическая оценка безопасности наноматериалов», МУ 1.2.2741—10 «Порядок отбора проб для выявления и идентификации наноматериалов в лабораторных животных», МУ 1.2.2745—10 «Порядок отбора проб для характеристики действия наноматериалов на лабораторных животных», МУ 1.2.2869—11 «Порядок оценки токсического действия наноматериалов на лабораторных животных», МУ 1.2.2874—11 «Порядок выявления и идентификации наноматериалов в лабораторных животных», МР 1.2.2522—09 «Выявление наноматериалов, представ-

ляющих потенциальную опасность для здоровья человека», МР 1.2.2566—09 «Оценка безопасности наноматериалов *in vitro* и в модельных системах *in vivo*». Рассматриваемый комплекс методик позволяет проводить оценку безопасности наночастиц и наноматериалов на иерархически организованной системе биологических объектов *in vitro* и *in vivo*, включая культуры микроорганизмов, клеточные культуры, гидробионты (беспозвоночные и рыбы), высшие растения, организмы лабораторных животных с использованием комплекса морфологических, биохимических, токсикологических, микробиологических, физиологических и иных методов. Вместе с тем, вопрос об учёте в рамках указанной методологии совместных эффектов наночастиц и токсикантов «традиционной» природы сохраняет свою актуальность.

Принципиальная возможность усиления токсического действия химических веществ под действием наночастиц связана с двумя основными группами факторов.

Во-первых, согласно имеющимся в настоящее время данным, наночастицы в силу своих малых размеров способны относительно беспрепятственно проникать через физиологические барьеры организма и далее через биологические мембраны в клетки. При этом наночастицы многих видов (в первую очередь металлооксидные), вследствие своей высокой удельной площади поверхности и наличия нескомпенсированных валентных связей на межфазных границах высокой кривизны, обладают способностью к адсорбции больших количеств традиционных токсикантов (таких, как ионы тяжелых металлов, молекулы хлорорганических соединений и другие). Результатом такой суперпозиции свойств может быть транспорт дополнительных количеств токсикантов, связанных на наночастицах, в клетки организма (т. н. эффект «троянского коня»).

Во-вторых, способность наночастиц различных видов проникать в клетки и взаимодействовать с ДНК, РНК и другими биополимерами может приводить к изменениям в экспрессии генов, транскрипции и трансляции белка. В результате возможны изменения в активности ряда ферментных систем, в том числе ферментов системы I и II фазы детоксикации ксенобиотиков и антиоксидантной защиты, что, в свою очередь, может приводить к аккумуляции дополнительных количеств химических токсикантов и не менее токсичных продуктов их неполного метаболизма в организме.

Методические подходы, позволяющие оценивать эти эффекты в условиях экспозиции наноматериалами, состоят в оценке показателей (биологических маркеров) токсического действия химических веществ на фоне поступления наноматериалов в сравне-

нии с контрольной группой животных, получающих носитель наноматериала (дисперсионную среду) в соответствии с МУ 1.2.2520—09 «Токсиколого-гигиеническая оценка безопасности наноматериалов». В качестве наиболее удобных моделей при этом рекомендуется использовать:

а) вариант воздействия на транспорт через барьеры организма, биораспределение и бионакопление химических токсикантов: оценка влияния наночастиц/наноматериалов на показатели интоксикации солями свинца при их введении через желудочно-кишечный тракт (совместно с тестируемым наноматериалом);

б) вариант воздействия наноматериалов на ферменты системы детоксикации ксенобиотиков и антиоксидантной защиты организма: оценка влияния наночастиц/наноматериалов на показатели острой интоксикации четыреххлористым углеродом при его однократном парентеральном введении.

В результате проведения указанных тестов возможно установление действующих доз наночастиц и наноматериалов, оказывающих значимое усиление токсичности химических веществ и выявление возможных синергических/антагонистических отношений наноматериалов и традиционных токсикантов, что является основой для разработки сценариев оценки интегрального риска для здоровья населения.

III. Нормативные ссылки

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

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

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

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

3.5. Федеральный закон от 2 января 2000 г. № 29-ФЗ «О качестве и безопасности пищевых продуктов».

3.6. Постановление Правительства Российской Федерации от 30 июня 2004 г. № 322 «Об утверждении Положения о Федеральной службе по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека».

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

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

3.9. Постановление Правительства Российской Федерации от 2 февраля 2006 г. № 60 «Об утверждении Положения о проведении социально-гигиенического мониторинга».

3.10. Постановление Правительства Российской Федерации от 15 сентября 2005 г. № 569 «О Положении об осуществлении государственного санитарно-эпидемиологического надзора в Российской Федерации».

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

3.12. Приказ Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации от 23 августа 2010 г. № 708н «Об утверждении Правил лабораторной практики».

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

3.14. 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».

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

3.16. СанПиН 2.3.2.1078—01 «Гигиенические требования безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов».

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

3.18. МУ 1.2.2636—10 «Проведение санитарно-эпидемиологической экспертизы продукции, полученной с использованием нанотехнологий и наноматериалов».

3.19. МУ 1.2.2741—10 «Порядок отбора проб для выявления и идентификации наноматериалов в лабораторных животных».

3.20. МУ 1.2.2745—10 «Порядок отбора проб для характеристики действия наноматериалов на лабораторных животных».

3.21. МУ 1.2.2874—11 «Порядок выявления и идентификации наноматериалов в лабораторных животных».

3.22. МУ 1.2.2634—10 «Микробиологическая и молекулярно генетическая оценка воздействия наноматериалов на представителей микробиоценоза».

3.23. МУ 1.2.2635—10 «Медико-биологическая оценка безопасности наноматериалов».

3.24. МУ 1.2.2869—11 «Порядок оценки токсического действия наноматериалов на лабораторных животных».

3.25. МР 1.2.2522—09 «Выявление наноматериалов, представляющих потенциальную опасность для здоровья человека».

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

3.27. МР 1.2.0022—11 «Порядок отбора проб для контроля за наноматериалами».

3.28. МР 1.2.0023—11 «Контроль наноматериалов в пищевой продукции».

3.29. МР 1.2.0024—11 «Контроль наноматериалов, применяемых в химической промышленности».

3.30. МР 1.2.2639—10 «Использование методов количественного определения наноматериалов на предприятиях наноиндустрии и в контролирующих организациях».

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

3.32. Р 2.1.10.1920—04 «Руководство по оценке риска для здоровья населения при воздействии химических веществ, загрязняющих окружающую среду».

3.33. ГОСТ 20288—74 «Реактивы. Углерод четыреххлористый. Технические условия».

3.34. ГОСТ 25336—82 «Посуда и оборудование лабораторные стеклянные. Типы, основные параметры и размеры».

3.41. ГОСТ 26678—85 «Холодильники и морозильники бытовые электрические компрессионные параметрического ряда. Общие технические условия».

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

3.43. ГОСТ 30178—96 «Сырье и продукты пищевые. Атомно-абсорбционный метод определения тяжелых металлов».

3.44. ГОСТ 26929—94 «Сырье и продукты пищевые. Подготовка проб. Минерализация для определения содержания токсичных элементов».

3.45. ГОСТ 24104—2001 «Весы лабораторные. Общие технические требования».

3.46. ГОСТ 1770—74 «Посуда мерная лабораторная стеклянная. Цилиндры, мензурки, колбы, пробирки. Общие технические условия».

3.47. ГОСТ 4568—95 «Калий хлористый. Технические условия».

3.48 ГОСТ 14919 «Электроплиты, электроплитки и жарочные электрошкафы бытовые. Общие технические условия».

3.49. ГОСТ 9147—80 «Посуда и оборудование лабораторные фарфоровые. Технические условия».

3.50. ГОСТ 19908—90 «Тигли, чаши, стаканы, колбы, воронки, пробирки и наконечники из прозрачного кварцевого стекла. Общие технические условия».

3.51. ГОСТ 5457—75 «Ацетилен растворенный и газообразный технический. Технические условия».

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

3.53. ГОСТ 11125—84 «Кислота азотная особой чистоты. Технические условия».

3.54. ГОСТ 14261—77 «Кислота соляная особой чистоты. Технические условия».

3.55. ГОСТ 18300—87 «Спирт этиловый ректификованный технический. Технические условия».

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

3.57. ГОСТ Р ИСО/МЭК 17025—2006 «Общие требования к компетентности испытательных и калибровочных лабораторий».

IV. Общие положения

4.1. Целью оценки воздействия наноматериалов на показатели токсичности химических веществ является:

– установление возможного синергического/антагонистического взаимодействия наночастиц и наноматериалов с химическими токсикантами традиционной природы в условиях их сочетанного воздействия через объекты окружающей среды (атмосферный воздух, вода и другие) и пищевые продукты;

– выявление ферментных, биохимических и физиологических процессов, являющихся мишенями сочетанного токсического действия наноматериалов и химических токсикантов;

– установление зависимости доза-эффект, возможных эффектов кумуляции наночастиц в организмах животных на фоне интоксикации химическими веществами;

– токсиколого-гигиеническая и медико-биологическая оценка безопасности наноматериалов и продукции, их содержащей;

– гигиеническое нормирование содержания наноматериалов в объектах окружающей среды и потребительской продукции;

– экспертиза продукции, содержащей наночастицы и наноматериалы, производимой на территории Российской Федерации или ввозимой на территорию Российской Федерации;

– оценка интегрального риска для здоровья населения при сочетанном поступлении наноматериалов и химических токсикантов в организм с пищей, водой, атмосферным воздухом и иными путями;

– разработка мероприятий по охране окружающей среды от сочетанного воздействия наноматериалов и химических токсикантов.

4.2. Оценка воздействия наноматериалов на показатели токсичности химических веществ, являющихся контаминантами окружающей среды, проводится в модельных экспериментах *in vivo*, при путях поступления наночастиц и наноматериалов, максимально приближенных к условиям экспонирования ими через объекты окружающей среды в обстановке реального воздействия.

4.3. Объектами оценки воздействия наноматериалов на показатели токсичности химических веществ являются интегральные, морфологические, биохимические и функциональные (физиологические) показатели, являющиеся наиболее чувствительными маркерами интоксикации химическими веществами.

4.4. Выбор биологического объекта воздействия наночастиц и наноматериалов (вида, линии лабораторных животных), принципы выбора действующих доз, пути, длительность и кратность введения наночастиц и наноматериалов, состав опытных и контрольных групп тестируемых организмов устанавливаются для отдельных тест-систем в соответствии с МУ 1.2.2520—09 «Токсиколого-гигиеническая оценка безопасности наноматериалов», МР 1.2.2566—09 «Оценка безопасности наноматериалов *in vitro* и в модельных системах *in vivo*», МУ 1.2.2634—10 «Микробиологическая и молекулярно генетическая оценка воздействия наноматериалов на представителей микробиоценоза», МУ 1.2.2635—10 «Медико-биологическая оценка безопасности наноматериалов», МУ 1.2.2869—11 «Порядок оценки токсического действия наноматериалов на лабораторных животных».

4.5. При выборе наноматериалов и химических токсикантов традиционной природы при оценке их токсического действия необходимо принимать во внимание:

– наличие сценариев возможного сочетанного воздействия на организм наноматериалов и контаминантов химической природы на данной территории, в условиях промышленного производства или при потреблении продукции определённого типа;

– данные литературы из источников, отвечающих критериям научной полноты и достоверности о наличии у тестируемых нано-

материалов способности к связыванию и транспорту контаминантов химической природы и/или эффектов в отношении систем организма, ответственных за их биотрансформацию и/или выведение (клиренс);

– степень потенциальной опасности наноматериалов для здоровья человека в соответствии с МР 1.2.2522—09 «Выявление наноматериалов, представляющих потенциальную опасность для здоровья человека».

4.6. Организация (лаборатория), проводящая исследования по влиянию наночастиц и наноматериалов на токсическое действие контаминантов окружающей среды химической природы, должна быть аккредитована на проведение работ в соответствующей области. В лаборатории должны соблюдаться правила надлежащей лабораторной практики в соответствии с приказом Министерства здравоохранения и социально развития Российской Федерации от 23 августа 2010 г. № 708н «Об утверждении Правил лабораторной практики».

4.7. В организации (лаборатории), проводящей исследования по влиянию наночастиц и наноматериалов на токсическое действие контаминантов окружающей среды химической природы, должна быть разработана программа по обеспечению качества проводимых исследований. Все производственные операции проводятся в соответствии со стандартными операционными процедурами (СОП), осуществляемыми в целях обеспечения качества, достоверности и воспроизводимости результатов исследования.

4.8. Организации (лаборатории), проводящие исследования по влиянию наночастиц и наноматериалов на токсическое действие контаминантов окружающей среды химической природы, должны быть укомплектованы необходимым оборудованием и средствами измерений, прошедшими поверку (калибровку) в установленном порядке. Эксплуатация оборудования и средств измерений проводится в соответствии с техническим паспортом и инструкцией по применению. Результаты проведения поверки (калибровки) и текущего ремонта оборудования фиксируются в специальном журнале, доступном в любое время сотрудникам, эксплуатирующим оборудование или обеспечивающим его обслуживание. Применяются средства измерений, имеющие сертификат и зарегистрированные в Государственном реестре средств измерений.

4.9. Организации (лаборатории), проводящие исследования по влиянию наночастиц и наноматериалов на токсическое действие контаминантов окружающей среды химической природы, должны иметь помещения для содержания и работы с лабораторными животными (виварий, клиники лабораторных животных), требования к которым изложены в МУ 1.2.2869—11 «Порядок

оценки токсического действия наноматериалов на лабораторных животных».

4.10. Организации (лаборатории) проводящие исследования по влиянию наночастиц и наноматериалов на токсическое действие контаминантов окружающей среды химической природы, должны иметь специально оборудованные помещения для работы с биологическим материалом (препарирование, пробоподготовка). Для обработки материала, содержащего наноматериалы, должны быть установлены ламинарные шкафы, обеспечивающие вертикальный поток воздуха, а также возможность работы без ламинарного потока и длительную экспозицию облучения внутренних поверхностей ультрафиолетовым светом.

4.11. Организации (лаборатории), проводящие исследования по влиянию наночастиц и наноматериалов на токсическое действие контаминантов окружающей среды химической природы, должны иметь оборудование, обеспечивающее безопасность работы с наноматериалами неорганического и биогенного происхождения: ламинарные вытяжные шкафы, перчаточные боксы, снабжённые системой вентиляции (HEPA-фильтры), препятствующие поступлению аэрозоля наноматериалов в воздух производственных помещений и в окружающую среду.

4.12. Документом, подтверждающим результаты проведённых исследований наноматериалов, является отчёт о проведённом исследовании. Отчет содержит следующие сведения:

– название исследования;

– адрес организации;

– даты начала и завершения исследований;

– цель и задачи исследования;

– характеристика тестируемого наноматериала (химический состав, CAS-номер, средний, минимальный и максимальный размеры частиц, форма частиц, наличие примесей, состав дисперсионной среды (носителя) в соответствии с МУ 1.2.2636—10 «Проведение санитарно-эпидемиологической экспертизы продукции, полученной с использованием нанотехнологий и наноматериалов»;

– характеристика применяемого модельного химического токсиканта (химический состав, номер CAS, степень чистоты, наличие токсичных примесей, фирма-производитель, токсикологическая характеристика (в т. ч. LD_{50}));

– перечень исследованных биологических образцов и применяемых стандартных образцов;

– вид, линию, пол и возраст используемых лабораторных животных;

– состав применяемых рационов, условия содержания животных;

– метод введения наночастиц/наноматериалов и контаминантов окружающей среды химической природы, применяемые дозы, длительность и кратность введения;

– схема проведения исследования;

– перечень использованных средств измерений и вспомогательного оборудования и режимы их работы;

– методы статистической обработки результатов;

– результаты исследования, представленные в виде обобщающих таблиц, рисунков с соответствующей статистической обработкой и комментариев к ним;

– заключение; выводы; список использованных источников.

Оформление отчёта о результатах исследования должно соответствовать требованиям ГОСТ 7.32—2001 «Отчёт о научно-исследовательской работе. Структура и правила оформления».

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

4.13. Организация (лаборатория), проводящая исследования по влиянию наночастиц и наноматериалов на токсическое действие контаминантов окружающей среды химической природы, должна обеспечить конфиденциальность результатов исследований в рамках принятых ею обязательств и в соответствии с законодательством Российской Федерации.

V. Порядок изучения воздействия искусственных наночастиц и наноматериалов на токсическое действие химических веществ

5.1. Воздействие наночастиц и наноматериалов на показатели токсического действия солей свинца при пероральном введении

5.1.1. Модель системного токсического воздействия водорастворимой соли свинца (II) (ацетата свинца) на лабораторных животных воспроизводится при многократном внутрижелудочном введении этого вещества в дозе 20 мг/кг массы тела (по свинцу) на протяжении не менее 21 дня. Цель использования данной модели – установить возможность усиления проникновения токсиканта традиционной степени дисперсности (ионов свинца) через барьеры организма (барьер желудочно-кишечного тракта, гемоэнцефалический барьер) под воздействием наночастиц (т. н. эффект «троянского коня»).

5.1.2. Тестирование проводится на лабораторных крысах самцах (линии Вистар или нелинейных) исходной массой тела

80—100 г. Животные, получаемые из питомника, должны быть здоровыми и свободными от специфических патогенов вирусной, бактериальной, грибковой и паразитарной природы.

Возможно использование при проведении тестирования животных других видов и линий (в частности, линейных мышей). Вводимые дозы наноматериалов и свинца при этом должны быть модифицированы в соответствии с видовыми особенностями чувствительности этих животных к изучаемым токсическим воздействиям.

5.1.3. Крыс содержат в клетках из ударопрочной пластмассы группами по 3—4 особи. Рацион и воду животным предоставляют в режиме неограниченного доступа. Условия содержания и работы с животными соответствуют требованиям МУ 1.2.2520—09 «Токсиколого-гигиеническая оценка безопасности наноматериалов» и МУ 1.2.2869—11 «Порядок оценки токсического действия наноматериалов на лабораторных животных».

5.1.4. В течение всего эксперимента животные получают полусинтетический рацион согласно МУ 1.2.2520—09 «Токсиколого-гигиеническая оценка безопасности наноматериалов». При составлении рационов используют:

а) основные пищевые ингредиенты (крахмал кукурузный, казеин, масло подсолнечное, лярд, отруби), удовлетворяющие требованиям качества и безопасности пищевой продукции по химическим и микробиологическим показателям (СанПиН 2.3.2.1078—01);

б) ингредиенты витаминной смеси (витамины) отвечающие требованиям Государственной фармакопеи;

в) ингредиенты солевой смеси (минеральные соли) отечественного производства квалификации х.ч. или ч.д.а. или импортные аналоги, удовлетворяющие требованиям ГОСТ на соответствующие реактивы.

В процессе эксперимента содержание свинца в ингредиентах рациона контролируют методом атомно-абсорбционной спектрометрии.

5.1.5. Для проведения тестирования формируют три группы животных численностью на менее 8 (предпочтительно 9—10) особей. Исходные средние массы животных трёх групп не должны различаться в пределах более ± 5 %. Перед началом введения тестируемых препаратов животные проходят 7-дневный период адаптации к рациону и условиям содержания. По окончании периода адаптации массу тела животных повторно контролируют; животных, отстающих в приросте массы, а также имеющих внешние признаки патологии, выбраковывают.

5.1.6. При воспроизведении модели токсического действия используют ацетат свинца (II) тригидрат $Pb[CH_3COO]2 \times 3H_2O$, CAS No 6080-56-4, химический реактив квалификации х.ч. или импортный аналог («Analytical grade»).

Примечание.

1. Ацетат свинца гигроскопичен и при хранении в неплотно закрытой упаковке поглощает дополнительные количества воды, что приводит к снижению процентного содержания свинца. При необходимости содержание свинца в препарате может быть проверено методом атомно-абсорбционной спектрофотометрии.

2. Использование нитрата свинца при тестировании не рекомендуется ввиду наличия у нитрат-иона собственных токсических свойств.

5.1.7. Тестируемые наночастицы и наноматериалы диспергируют в дистиллированной воде и дополнительно обрабатывают ультразвуком (частота 44 кГц, время и мощность обработки устанавливаются опытным путём) во избежание процессов агрегации. При необходимости степень диспергирования наноматериала проверяют методом электронной микроскопии согласно МР 1.2.2641—10 «Определение приоритетных видов наноматериалов в объектах окружающей среды, живых организмах и пищевых продуктах». Немедленно после приготовления дисперсии наноматериала в неё добавляют ацетат свинца в виде водного раствора.

5.1.8. Тестируемые препараты вводят животным ежедневно внутрижелудочно через зонд на протяжении не менее 21 дня (предпочтительно 23—24 дня) эксперимента.

Используют следующие группы животных приблизительно равной численности:

группа 1 – введение ацетата свинца в дозе 20 мг/кг массы тела/день (в пересчете на свинец) – контроль токсического действия;

группа 2 – введение ацетата свинца в дозе 20 мг/кг массы тела/день (в пересчете на свинец) в смеси с дисперсией наночастиц в дозе «А»;

группа 3 – введение ацетата свинца в дозе 20 мг/кг массы тела/день (в пересчете на свинец), в смеси с дисперсией наночастиц в дозе «Б».

Примечание.

1. Величину дозы «А» наноматериала устанавливают на основе анализа возможных сценариев пероральной экспозиции наноматериалом человека в условиях контаминации пищевых продуктов и воды отходами деятельности нанотехнологических производств и (или) возможного поступления наноматериала, входящего в состав потребительской продукции, с учётом возможной неопределённости и 10-кратного коэффициента запаса, определяемого биологической природой используемой модели (тестирование на грызунах).

2. Доза «Б» является 10—100-кратно аггравированной (увеличенной) в сравнении с дозой «А».

3. При выборе доз наноматериала следует учитывать данные о его собственных токсических свойствах (в т. ч. LD_{50}) – при наличии таковых.

5.1.9. Не более чем за 3 суток до завершения введения тестируемых препаратов возможно проведение тестирования сочетанного нейротоксического действия наночастиц по поведенческим реакциям животных (МУ 1.2.2635—10 «Медико-биологическая оценка безопасности наноматериалов», пп. 6.7.1—6.7.3). Продолжительность поведенческих тестов составляет в разных вариантах от 1 до 25 ч. После этого, но не более чем за 1—2 суток до окончания тестирования, животных помещают на 16—18 ч в обменные клетки, обеспечивающие раздельный сбор кала и мочи. Мочу животных собирают для определения уровней экскреции 5-аминолевуленовой кислоты (АЛК) и её метаболитов.

5.1.10. За 12 ч до забоя у животных забирают всю пищу. Умерщвление животных проводят одним из способов согласно МУ 1.2.2869—11 «Порядок оценки токсического действия наноматериалов на лабораторных животных».

Перечень отбираемых проб включает: цельную кровь, отбираемую на антикоагулянт (трикалиевая соль ЭДТА); сыворотку крови; внутренние органы (печень, почки, селезёнка, сердце, семенники, тимус, лёгкие, надпочечники, головной мозг).

Отбор биологических образцов для исследования осуществляют в соответствии с МУ 1.2.2745—10 «Порядок отбора проб для характеристики действия наноматериалов на лабораторных животных».

5.1.11. Перечень интегральных и биохимических показателей токсического действия ионов свинца (II) на организм животных представлен в п. 6.1 настоящих методических рекомендаций.

5.1.12. Оценку воздействия наночастиц/наноматериалов на показатели токсического действия ионов свинца проводят на основании результатов статистической обработки результатов исследований в соответствии со следующими критериями:

а) критерий однородности распределения показателя в трёх группах животных; используется параметрический тест на остаточную дисперсию ANOVA;

б) факторный анализ с использованием параметрического теста на остаточную дисперсию ANOVA по фактору воздействия наночастиц;

в) парное сравнение животных 1-й группы с животными 2-й и 3-й группы с использованием критериев непараметрической статистики (тесты Манна-Уитни или Колмогорова-Смирнова).

При проведении статистической обработки рекомендуется использовать профессиональные пакеты статистических про-

грамм «Statistica» (версия от 6.0 и выше), «SPSS» (версия от 11.5 и выше) или их аналоги.

Воздействие наночастиц/наноматериалов на показатели токсического действия ионов свинца считается выявленным при достоверности различия на уровне значимости $P = 0,05$ и менее.

5.2. Воздействие наночастиц и наноматериалов на показатели острого гепатотоксического действия четыреххлористого углерода

5.2.1. Модель острого гепатотоксического воздействия четыреххлористого углерода (CCl_4) на лабораторных животных воспроизводится путём однократного парентерального введения CCl_4 в подходящем носителе на фоне введения животным исследуемых наночастиц и наноматериалов. Цель использования данной модели – установить возможные воздействия наноматериала на показатели системы детоксикации ксенобиотиков и антиоксидантной защиты, являющиеся мишенями острого токсического воздействия хлорорганического соединения, что определяет возможность синергических токсических эффектов наноматериалов и химических токсикантов традиционной природы.

5.2.2. Тестирование проводят на крысах самцах (линии Вистар или нелинейных) исходной массой 80 ± 10 г. Животных делят на 7 групп равной численности. Численность групп не должна быть менее 8 особей (предпочтительно 9—10). При формировании групп животных учитывают положения, содержащиеся в п. 5.1.5 настоящих методических рекомендаций. Животные всех групп получают на протяжении всего периода тестирования полусинтетический рацион согласно МР 1.2.2520—09 «Токсиколого-гигиеническая оценка безопасности наноматериалов». Характеристики ингредиентов, применяемых при составлении рациона, представлены в п. 5.1.4 настоящих методических рекомендаций.

Возможно использование при проведении тестирования животных других видов и линий (в частности, линейных мышей). Вводимые дозы наноматериалов и CCl_4 при этом должны быть модифицированы в соответствии с видовыми особенностями чувствительности этих животных к изучаемым токсическим воздействиям.

5.2.3. Условия содержания животных соответствуют требованиям МУ 1.2.2520—09 «Токсиколого-гигиеническая оценка безопасности наноматериалов» и МУ 1.2.2869—11 «Порядок оценки токсического действия наноматериалов на лабораторных животных», а также п. 5.1.3 настоящих методических рекомендаций.

5.2.4. Модель острого гепатотоксического действия CCl_4 воспроизводят путём внутрибрюшинного (в/б) введения за 24 ч до оконча-

ния тестирования раствора CCl_4 (реактив квалификации х.ч. или импортный аналог «Analytical grade» по ГОСТ 20288—74) в подходящем носителе (пищевом растительном масле, удовлетворяющем по показателям безопасности требованиям СанПиН 2.3.2.1078—01).

5.2.5. Формируемые для проведения тестирования группы животных включают:

• группа 1 – интактные, контрольные животные;

• группа 2 – в/б введение носителя (растительного масла) в дозе 2 $см^3$/кг массы тела (контроль носителя);

• группа 3 – в/б введение 25 % (об/об) CCl_4 в растительном масле в дозе 2 $см^3$/кг массы тела;

• группа 4 – введение животным исследуемых наночастиц или наноматериалов в режиме подострого эксперимента (МУ 1.2.2520—09 «Токсиколого-гигиеническая оценка безопасности наноматериалов») с использованием одного из возможных способов экспонирования (внутрижелудочное, ингаляционное, интратрахеальное, накожное, парентеральное) на протяжении не менее 28 дней (предпочтительно не менее 90 дней) в дозе «А»; в/б введение 25 % (об/об) CCl_4 в растительном масле в дозе 2 $см^3$/кг массы тела;

• группа 5 – введение животным исследуемых наночастиц или наноматериалов аналогично группе 4 в дозе «Б»; в/б введение 25 % (об/об) CCl_4 в растительном масле в дозе 2 $см^3$/кг массы тела;

• группа 6 – введение животным исследуемых наночастиц или наноматериалов аналогично группе 4 в дозе «А»; в/б введение носителя (растительного масла) в дозе 2 $см^3$/кг массы тела;

• группа 7 – введение животным исследуемых наночастиц или наноматериалов аналогично группе 4 в дозе «Б»; в/б введение носителя (растительного масла) в дозе 2 $см^3$/кг массы тела.

Примечание.

1. Величину дозы «А» наноматериала устанавливают на основе анализа возможных сценариев экспозиции наноматериалом человека при различных путях его поступления в организм (с атмосферным воздухом, пищей, водой, косметическими средствами, другими путями) с учётом возможной неопределённости и 10-кратного коэффициента запаса, определяемого биологической природой используемой модели (тестирование на грызунах).

2. Доза «Б» является 10—100-кратно аггравированной (увеличенной) в сравнении с дозой «А».

3. При выборе доз наноматериала следует учитывать данные о его собственных токсических свойствах (в т. ч. LD_{50}) – при наличии таковых.

5.2.6. Методы и кратность обработки животных наноматериалами при различных путях их поступления выбираются в зависимости от задач тестирования в соответствии с МУ 1.2.2869—11 «Порядок оценки токсического действия наноматериалов на лабораторных животных» (п. 4.3). Для ингаляционного и перорального

пути поступления наноматериалов следует придерживаться МУ 1.2.2520—09 «Токсиколого-гигиеническая оценка безопасности наноматериалов» (пп. 6.3.6, 6.3.7).

5.2.7. Подготовка препаратов наноматериалов для введения животным проводится в соответствии с МУ 1.2.2869—11 «Порядок оценки токсического действия наноматериалов на лабораторных животных» (п. 4.4). При диспергировании наноматериалов следует по возможности избегать использования токсичных ПАВ и других стабилизирующих добавок традиционной степени дисперсности.

5.2.8. Перечень интегральных и биохимических показателей токсического действия четыреххлористого углерода на организм животных представлен в п. 6.2 настоящих методических рекомендаций.

5.2.9. Оценку воздействия наночастиц/наноматериалов на показатели гепатотоксического действия CCl_4 проводят на основании результатов статистической обработки результатов исследований в соответствии со следующими критериями:

а) критерий однородности распределения показателя в семи группах животных, параметрический тест на остаточную дисперсию ANOVA;

б) факторный анализ с использованием параметрического теста на остаточную дисперсию ANOVA отдельно по факторам воздействия наночастиц и CCl_4;

в) парное сравнение животных 1-й группы с животными 2-й и 3-й групп с использованием критериев непараметрической статистики (тесты Манна-Уитни или Колмогорова-Смирнова) в целях оценки корректности использования модели острой гепатотоксичности);

в) парное сравнение животных 3-й группы с животными 4-й и 5-й групп в целях выявления эффектов наноматериала, в том числе дозозависимых;

г) парное сравнение животных 4-й группы с животными 6-й группы и животных 5-й группы с животными 7-й группы в целях оценки специфичности эффекта, обусловленного в/б введением CCl_4 на фоне действия носителя.

При проведении статистической обработки рекомендуется использовать профессиональные пакеты статистических программ согласно п. 5.1.12 настоящих методических рекомендаций.

Воздействие наночастиц/наноматериалов на показатели острого гепатотоксического CCl_4 считается выявленным при достоверности различия на уровне значимости $P = 0,05$ и менее.

VI. Показатели и методы оценки влияния искусственных наночастиц и наноматериалов на токсическое действие веществ химической природы

6.1. Оценка влияния наночастиц и наноматериалов на токсичность и бионакопление ионов свинца

6.1.1. Интегральные показатели: общее состояние животных (летальность на протяжении тестирования, внешний вид, поведение, двигательная активность, состояние шерстного покрова), поедаемость корма, масса тела, абсолютная и относительная масса внутренних органов (печень, почки, надпочечники, селезенка, сердце, легкие, тимус, гипофиз, головной мозг, семенники) оценивают в соответствии с МУ 1.2.2520—09 «Токсиколого-гигиеническая оценка безопасности наноматериалов» (п. 6.4.7.3).

6.1.2. Оценку морфологических показателей (гистологическое исследование тканей на светооптическом уровне) проводят в печени, почках, селезенке, гонадах, головном мозге согласно общепринятым методикам (МУ 1.2.2520—09 «Токсиколого-гигиеническая оценка безопасности наноматериалов», п. 6.4.7.3).

6.1.3. Гематологические показатели, определяемые в цельной крови животных, включают: содержание общего гемоглобина, показателя гематокрита, содержание эритроцитов, среднее содержание гемоглобина в эритроците, средний объём эритроцита, средняя концентрация гемоглобина в эритроците, содержание лейкоцитов, нейтрофилов, эозинофилов, базофилов, лимфоцитов, моноцитов, содержание тромбоцитов, средний объём тромбоцита, относительный объём тромбоцита в цельной крови.

При определении гематологических показателей используют стандартные методики, применяемые при клиническом анализе крови[1]. При анализе возможно использование автоматических гематологических анализаторов, например, Coulter AC TTM 5 diff OV (производства «Beckman Coulter», США) или других с аналогичными параметрами. В этом случае подготовку и обработку биологического материала для анализа проводят в соответствии с инструкцией к применяемому оборудованию.

6.1.4. Биохимические показатели, определяемые в сыворотке крови животных, включают: общий белок, альбумин, глюкозу, креатинин, мочевину, мочевую кислоту; аланинаминотрансферазу (АЛТ), аспартатаминотрансферазу (АСТ), щелочную фосфатазу (ЩФ), небелковые тиолы. В зависимости от выраженности и характера действия тестируемого наноматериала возможна характе-

[1] Лабораторные методы исследования в клинике: Справочник / Под ред. В. В. Меньшикова. М.: Медицина, 1987.

ристика и ряда других биохимических показателей согласно МУ 1.2.2520—09 «Токсиколого-гигиеническая оценка безопасности наноматериалов» (п. 6.4.7.3).

6.1.5. Биохимические показатели, определяемые в печени животных, включают определение уровня небелковых тиолов (глутатиона). Методика анализа представлена в прилож. 1. В зависимости от выраженности и характера действия тестируемого наноматериала возможна характеристика и ряда других биохимических показателей в ткани печени согласно МУ 1.2.2520—09 «Токсиколого-гигиеническая оценка безопасности наноматериалов» (п. 6.4.7.3).

6.1.6. Показатели апоптоза клеток печени (гепатоцитов) характеризуют методом проточной цитофлуориметрии. Принцип метода основан на свойстве аннексина V связываться с фосфатидилсерином клеточной мембраны и способности 7-AAD (7-аминоактиномицин) встраиваться между цитозином и гуанином двухцепочечной ДНК клеток с нарушенной целостностью мембраны. Комбинированная окраска аннексин V-FITC и 7-AAD позволяет идентифицировать неапоптозные – живые клетки (при сочетании аннексин V-негативные/7 – AAD-негативные), ранние проапоптотические изменения (при сочетании аннексин V-позитивные/7-AAD-негативные), поздние варианты клеточной гибели (при сочетании аннексин V-позитивные /7-AAD-позитивные клетки) и мертвые клетки (аннексин V-негативные /7-AAD-позитивные клетки).

При проведении цитофлуориметрического исследования гепатоцитов следует использовать методы пробоподготовки и анализа, утверждённые в установленном порядке.

6.1.7. Специфический показатель тяжести свинцовой интоксикации – уровень экскреции 5-аминолевуленовой кислоты – определяют в моче животных в соответствии с методикой, приведенной в прилож. 2 к настоящим методическим рекомендациям.

6.1.8. Накопление свинца в органах и тканях животных (печень, почки, головной мозг, селезенка, гонады, сыворотка крови) определяют с использованием стандартных методов элементного (химического) анализа. Используют методы атомно-эмиссионной спектрофотометрии или масс-спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой в соответствии с МР 1.2.2641—10 «Определение приоритетных видов наноматериалов в объектах окружающей среды, живых организмах и пищевых продуктах» (пп. 6.1, 6.2). При этом возможно одновременное определение в образце накопления химических элементов, входящих в состав тестируемых наночастиц (при наличии подходящих маркерных элементов в соответствии с МР 1.2.2639—10 «Использование методов количественного определения наноматериалов на предприятиях наноиндустрии и в

контролирующих организациях» (п. 7.1), что является дополнительной характеристикой проникновения наноматериалов через физиологические барьеры организма и распределения по органам и тканям.

В качестве варианта при оценке накопления свинца в образцах органов и тканей можно использовать более простой и менее дорогостоящий метод атомно-абсорбционной спектрофотометрии. Методика пробоподготовки и проведения анализа этим методом приведена в прилож. 3 к настоящим методическим рекомендациям.

6.1.9. Оценка влияния наночастиц на нейротоксические эффекты свинца осуществляется с использованием методов анализа поведенческих реакций: тест «открытое поле», тест «приподнятый крестообразный лабиринт», тест «условного рефлекса пассивного избегания» в соответствии с МУ 1.2.2635—10 «Медико-биологическая оценка безопасности наноматериалов» (пп. 6.7.1—6.7.3).

6.2. Оценка влияния наночастиц и наноматериалов на острую гепатотоксичность четыреххлористого углерода

6.2.1. Интегральные показатели животных на протяжении периода введения наноматериала и при забое оценивают как указано в п. 6.1.1 настоящих методических рекомендаций.

6.2.2. Оценку морфологических показателей (макроскопическое обзорное исследование, гистологическое исследование тканей на светооптическом уровне) проводят в печени животных согласно общепринятым методикам (МУ 1.2.2520—09 «Токсиколого-гигиеническая оценка безопасности наноматериалов», п. 6.4.7.3).

6.2.3. Гематологические показатели, определяемые в цельной крови животных, и методы их определения представлены в п. 6.1.3 настоящих методических рекомендаций.

6.2.4. Биохимические показатели, определяемые в сыворотке крови животных, и методы их определения представлены в п. 6.1.4 настоящих методических рекомендаций.

6.2.5. В печени животных осуществляется определение следующих основных биохимических показателей.

6.2.5.1. Функциональное состояние ферментов I и II фазы метаболизма ксенобиотиков (общее содержание цитохромов Р-450 и b_5, активность этоксирезоруфиндеалкилазы, метоксирезоруфиндеалкилазы, пентоксирезоруфиндеалкилазы, глутатионтрансферазы, УДФ-глюкуронозилтрансферазы, хинонредуктазы). Определение содержания и активности ферментов осуществляют с использованием методик, изложенных в прилож. 4 к настоящим методическим рекомендациям.

6.2.5.2. Стабильность биологических мембран (общая и неседиментируемая активность лизосомальных ферментов: арилсульфатаз А и В, β-галактозидазы, β-глюкуронидазы). Определение активности ферментов осуществляют с использованием методик, изложенных в прилож. 4 к настоящим методическим рекомендациям.

6.2.5.3 Содержание небелковых тиолов печени определяют спектрофотометрическим методом как указано в прилож. 1 к настоящим методическим рекомендациям.

6.2.5.4. Активность ферментов системы антиоксидантной защиты в печени и показатели перекисного окисления липидов (ПОЛ) определяют методами, представленными в прилож. 5 к настоящим методическим рекомендациям.

6.2.6. Показатели апоптоза клеток печени (гепатоцитов) характеризуют методом проточной цитофлуориметрии, как указано в п. 6.1.6 настоящих методических рекомендаций.

Приложение 1

Метод определения общего содержания небелковых тиолов в ткани печени

1. Основное оборудование и материалы

Микроразмельчитель тканей POLYMIX PX-SR50E, производства «Kinematica AG», Германия или другой с аналогичными параметрами	
Центрифуга с охлаждением 3-18K, производства «Sigma», Германия или другая с аналогичными параметрами	
Спектрофотометр видимого света на длину волны 412 нм СФ-46 (Россия) или другой с аналогичными параметрами, прошедший метрологическую поверку в установленном порядке	
Кюветы кварцевые или стеклянные для спектрофотометрии с длиной хода луча 1 см	
Весы лабораторные аналитические (точность ± 0,1 мг)	ГОСТ 24104—2001
Весы лабораторные (точность ±1 мг)	ГОСТ 24104—2001
Бытовой холодильник с морозильной камерой на температуру до −18 °С	ГОСТ 26678—85
Дозаторы жидкости автоматические с одноразовыми наконечниками, емкостью 20—200 мм^3, 100—1 000 мм^3 и 1 000—5 000 мм^3, обеспечивающие суммарную погрешность дозирования на уровне ±1,0 %, производства «Eppendorf Research», Германия или другие с аналогичными параметрами	
Пробирки центрифужные полиэтиленовые или полипропиленовые объёмом 10 см^3	
Пробирки стеклянные объёмом 10—20 см^3	ГОСТ 25336—82
Колбы мерные объёмом 100, 500 и 1 000,0 см^3 со шлифом и пробкой	ГОСТ 1770—74
Одноразовые полиэтиленовые наконечники для лабораторных дозаторов объемом 10—200 мм^3, 100—1 000 мм^3 и 1 000—5 000 мм^3,	

производства «Eppendorf», Германия или другие с аналогичными параметрами

Штатив для пробирок

Дистиллятор электрический ДЭ-4-2, производства ОАО «Тюменский завод медицинского оборудования и инструментов», Россия или другой с аналогичными параметрами

2. Реактивы

Трис-гидроксиметиламинометан основание (Трис) 98,0 % чистоты, производства «Bio-Rad», США или другое с аналогичными параметрами

Реактив Эллмана (ДТНБ, 5,5'-дитиобис-2-нитробензойная кислота) квалификации «Analytical grade»

Восстановленный глутатион квалификации «Analytical grade»

Трихлоруксусная кислота (ТХУ) квалификации чда или хч или импортный квалификации «Analytical grade»

Спирт этиловый 96,0 % — ГОСТ Р 51652—2000

Хлорид калия (KCl) чда — ГОСТ 4568—95

3. Подготовка проб для анализа

Печень немедленно после получения от животных промывают и перфузируют охлажденным до 0—2 °С 1,15 %-м раствором KCl. Все последующие процедуры проводят при температуре не выше 4 °С в холодной комнате. Печень просушивают фильтровальной бумагой, измельчают ножницами и продавливают сквозь перфорированную фильеру из нержавеющей стали с отверстиями диаметром ~0,8 мм. Масса полученной при этом навески составляет 2,0 г. Помещают образец и жидкую среду (8 $см^3$ 0,154 М KCl на 0,05М Трис/HCl буфере pH 7,4) при соотношении 1 : 4 (масса : объем) в стеклянную ампулу микроразмельчителя тканей, снабженного тефлоновым пестиком, и ставят ампулу в контейнер. Гомогенизируют в течение 90 с при 1 200 об./мин. Жидкая среда в процессе размельчения тканей должна охлаждаться, поэтому пространство между стенками контейнера и ампулой гомогенизатора заполняют льдом. Полученные гомогенаты сливают в стеклянные пробирки и хранят до анализа не более 1 ч при температуре не выше 4 °С.

4. Проведение анализа

Содержание небелковых тиолов печени, представленных у крыс, главным образом, восстановленным глутатионом, определяли согласно с реактивом Эллмана. Аликвоту 1 см^3 цельного гомогената печени смешивают в центрифужных пробирках при температуре не выше 2 °С с 7 см^3 6 %-й ТХУ и через 10 мин центрифугируют при 3 000 g в течение 20 мин. Супернатант отбирают, тщательно контролируя отсутствие в нём частиц осадка. В случае их наличия центрифугирование повторяют.

Для получения стандартных проб готовят навеску 26,3 мг восстановленного глутатиона, растворяют в 4,5 %-й ТХУ и доводят этим раствором до метки в мерной колбе на 100 см^3. Приготовленный запасной раствор имеет концентрацию 1 ммоль/дм^3. Стандартные растворы для построения стандартного графика готовят из этого раствора согласно прописи:

№ п/п стандартного раствора	Концентрация, мкмоль/дм^3	Объём запасного раствора глутатиона, мм^3	Объём 4,5 %-й ТХУ, мм^3
0 (бланк)	0	0	2 000
1	20	40	1 960
2	40	80	1 920
3	80	160	1 840
4	100	200	1 800
5	200	400	1 600
6	400	800	1 200

Аликвоты 0,5 см^3 стандартных растворов и супернатантов смешивают в стеклянных пробирках с 2 см^3 0,4 М Трис-HCl буфера pH 8,9 и 0,05 см^3 0,4 %-го раствора ДТНБ в этиловом спирте и через 5 мин определяют оптическую плотность на спектрофотометре против пробы с нулевым стандартом (бланком) при длине волны 412 нм. Концентрацию в супернатанте небелковых тиолов в единицах мкмоль/дм^3 определяют по величине оптической плотности по стандартному графику в координатах: концентрация глутатиона в стандартных растворах, мкмоль/дм^3 (ось абсцисс) – оптическая плотность (ось ординат).

Примечание. Стандартный график должен быть линейным во всём интервале концентраций глутатиона, построение графика осуществляют по методу наименьших квадратов (линейная регрессия).

Общее содержание небелковых тиолов (в пересчёте на глутатион) в печени рассчитывают по формуле:

$$T = [GSN] \times f \times g \times \frac{M}{1\,000}, \quad \text{где}$$

T – содержание тиолов в печени, мкмоль;
$[GSH]$ – концентрация глутатиона в супенратанте, мкмоль/дм^3;
f – коэффициент разбавления гомогената раствором ТХУ, равный 8;
g – кратность гомогената, равная 5;
M – масса печени (г);
1 000 – коэффициент пересчёта от единиц мкмоль/дм^3 к единицам мкмоль/г ткани.

Приложение 2

Метод определения 5-аминолевуленовой кислоты в моче

Принцип метода: при воздействии ионов свинца в организме нарушается процесс превращения 5-аминолевуленовой кислоты (АЛК) в её метаболит – порфобилиноген (ПБГ). В результате этого, в зависимости от степени интоксикации, возрастает экскреция АЛК с мочой, а экскреция ПБГ, соответственно, снижается.

1. Основное и вспомогательное оборудование

Центрифуга с охлаждением 3-18K, производства «Sigma», Германия или другая с аналогичными параметрами	
Спектрофотометр видимого света на длину волны 555 нм СФ-46 (Россия) или другой с аналогичными параметрами, прошедший метрологическую поверку в установленном порядке	
Кюветы кварцевые или стеклянные для спектрофотометрии с длиной хода луча 1 см	
Водяная баня с электрическим подогревом на температуру до 95 °С	
Бытовой холодильник с морозильной камерой на температуру до –18 °С	ГОСТ 26678—85
Дозаторы жидкости автоматические с одноразовыми наконечниками емкостью 20—200 мм^3, 100—1 000 мм^3 и 1 000—5 000 мм^3, обеспечивающие суммарную погрешность дозирования на уровне ±1,0 %, производства «Eppendorf Research», Германия или другие с аналогичными параметрами	
Пробирки центрифужные полиэтиленовые или полипропиленовые объёмом 10 см^3	
Пробирки стеклянные объёмом 10—20 см^3	ГОСТ 25336—82
Пробирки стеклянные объёмом 10 см^3 со шлифом № 14 и пробками	ГОСТ 25336—82
Цилиндры мерные объёмом 50 и 100 см^3	ГОСТ 1770—74

Одноразовые полиэтиленовые наконечники для лабораторных дозаторов объемом 10—200 мм³, 100—1 000 мм³ и 1 000—5 000 мм³, производства «Eppendorf», Германия или другие с аналогичными параметрами

Штатив для пробирок

Дистиллятор электрический ДЭ-4-2, производства ОАО «Тюменский завод медицинского оборудования и инструментов», Россия или другой с аналогичными параметрами

2. Материалы и реактивы

Набор для определения 5-аминолевуленовой кислоты (АЛК) и порфобилиногена (ПБГ) хроматографическим-спектрофотометрическим методом (5-aminolevulenic acid (ALA)/porphobilinogen (PBG) chromatographic-spectrophotometric), производства «Biosystems S.A» (Испания) или аналогичный

Хлорная кислота 52 %-я хч или импортный аналог квалификации «Analytical grade»

3. Приготовление рабочих растворов (в соответствии с инструкцией к набору)

3.1.Раствор «В»: переносят раствор «В2» во флакон с реагентом «В1» и перемешивают до полного растворения. Раствор хранят в холодильнике при 2—4 °С в темноте.

3.2. Стандартный раствор АЛК: содержимое флакона «S» растворяют в 5 см³ дистиллированной воды. Раствор хранят в морозильной камере при –18 °С.

3.3. Реактив Эрлиха: 1,14 см³ хлорной кислоты смешивают с 6 см³ раствора «В». Готовить непосредственно перед использованием.

4. Проведение анализа (в соответствии с инструкцией к набору)

4.1. У колонок «АЛА» и «ПГБ» отламывают пластмассовые кончики-заглушки, опускают фильтры на поверхность геля стеклянной палочкой, дают стечь жидкости и промывают 10 см³ дистиллированной воды.

4.2. Образцы мочи размораживают и центрифугируют 20 мин при скорости 3 000 об./мин в центрифуге с охлаждением.

4.3. Колонку «ПГБ» помещают над колонкой «АЛА». Через колонки последовательно пропускают 1 см³ мочи и 20 см³ деионизованной воды; элюат отбрасывают.

4.4. Колонку «АЛА» помещают в пробирку на 10 см³ со шлифом, установленную в штативе. Пропускают через колонку 10 см³ раствора «1». Элюат собирают в пробирку и перемешивают.

4.5. К собранному элюату добавляют 0,2 см³ реагента «А» (ацетилацетон). Аналогично тот же объём реагента «А» добавляют к 10 см³ раствора «1» (бланк) и к смеси 0,2 см³ стандартного раствора АЛК с 9,8 см³ раствора «1». Все образцы тщательно перемешивают и помещают на кипящую водяную баню на 10 мин.

4.6. После охлаждения образцов из них отбирают по 1 см³ в стеклянные пробирки, добавляют 1 см³ «реактива Эрлиха», выдерживают 5 мин и фотометрируют при длине волны 555 нм против «бланка».

Концентрацию АЛК в моче рассчитывают по формуле:

$$[ALK] = \left(\frac{A_{sample}}{A_{standard}} \right) \times 188 , \quad \text{где}$$

$[ALK]$ – концентрация АЛК в единицах мкмоль/дм³;
A_{sample} – оптическая плотность пробы;
$A_{standard}$ – оптическая плотность стандартного образца.

4.7. Через колонки ПБГ пропускают по 4 см³ раствора «2». Элюат собирают и перемешивают. Отбирают 1 см³ элюата, смешивают с 1 см³ «реактива Эрлиха», выдерживают 5 мин и фотометрируют при длине волны 555 нм против «бланка», содержащего вместо элюата дистиллированную воду.

Концентрацию ПБГ в моче рассчитывают по формуле:

$$[PBG] = A_{sample} \times 196 , \quad \text{где}$$

A_{sample} – оптическая плотность пробы.

Приложение 3

Метод анализа биораспределения свинца с использованием атомно-абсорбционной спектрометрии

Принцип метода. Атомно-абсорбционная спектрометрия – это метод количественного элементного анализа по атомным спектрам поглощения (абсорбции). Через слой атомных паров пробы, получаемых с помощью атомизатора в пламени ацетилена, пропускают излучение в диапазоне 190—850 нм. В результате поглощения квантов света атомы переходят в возбужденные энергетические состояния. Этим переходам в атомных спектрах соответствуют так называемые резонансные линии, характерные для данного элемента. Согласно закону Бугера-Ламберта-Бера, мерой концентрации элемента служит оптическая плотность $A = \lg(I0/I)$, где I0 и I-интенсивности излучения от источника соответственно до и после прохождения через поглощающий слой. Источником линейчатого излучения в спектрометрах чаще всего служат одноэлементные лампы с полым катодом, заполняемые неоном.

Подготовка проб органов и тканей и аналитическое определение выполняют в соответствии с ГОСТ 30178—96 и 26929—94.

1. Средства измерений и оборудование

Атомно-абсорбционный спектрометр	
Компрессор воздушный, максимальное давление – 10 бар, соответствующий требованиям технической инструкции для спектрофотометра или сжатый воздух в баллонах	
Электропечь сопротивления камерная лабораторная СНОЛ 10/11 или аналогичная	
Электроплитка бытовая или горелка газовая	ГОСТ 14919
Дистиллятор электрический ДЭ-4-2, производства ОАО «Тюменский завод медицинского оборудования и инструментов», Россия или аналогичный	
Холодильник бытовой электрический	ГОСТ 26678—85
Весы аналитические электронные точность ± 0,1 мг	ГОСТ 24104—2001

2. Лабораторная посуда и вспомогательные материалы

Тигли кварцевые или тигли фарфоровые	ГОСТ 19908—90 ГОСТ 9147—80
Воронки лабораторные	ГОСТ 25336—82
Стекла часовые	
Пробирки со шлифом П-4-5-1423 или П-4-10-1423	ГОСТ 25336—82
Фильтры обеззоленные с синей лентой диаметром 7—10 см	ТУ 6-0901678
Колба мерная объёмом 50,0 см^3 со шлифом и пробкой	
Колба мерная объёмом 100,0 см^3 со шлифом и пробкой	
Колба мерная объёмом 500,0 см^3 со шлифом и пробкой	
Цилиндры с носиком объёмом 1 000,0 см^3	
Стакан лабораторный объёмом 1 000,0 см^3	
Стакан лабораторный объёмом 50,0 см^3	
Пипетки стеклянные	
Перчатки латексные или резиновые нестерильные	

3. Реактивы

Ацетилен растворенный и газообразный технический в баллонах	ГОСТ 5457
Вода дистиллированная	ГОСТ 6709—72
Кислота азотная, осч (или перегнанная другой квалификации)	ГОСТ 11125—84
Кислота соляная, осч (или перегнанная другой квалификации)	ГОСТ 14261—77
Спирт этиловый ректификованный	ГОСТ 18300—87
Государственный стандартный образец состава водного раствора ионов свинца № 7778-2000	

4. Подготовка проб методом сухой минерализации

Сухая минерализация основана на полном разложении органических веществ путем сжигания пробы в электропечи при контролируемом температурном режиме. Предназначена для всех видов биологических образцов, за исключением тех, в которых содержание жира составляет 60 % и более (в этом случае используют способ мокрой минерализации). Пробоподготовку проводят по ГОСТ 26929—94.

Предварительно новую и сильно загрязненную лабораторную посуду после обычной мойки в растворе любого моющего средства промывают водопроводной и ополаскивают дистиллированной водой. Процедура очистки лабораторной посуды непосредственно перед использованием включает следующие последовательные этапы: мойку посуды горячей азотной кислотой (1 : 1) по объему, ополаскивание дистиллированной водой 3—4 раза, сушку.

Готовят следующие рабочие растворы:

– раствор HNO_3 (1 : 1). В мерную колбу на 1 000 см^3 вносят 300 см^3 дистиллированной воды, с помощью мерного цилиндра добавляют 500 см^3 раствора HNO_3 (конц.) и доводят до метки дистиллированной водой;

– рабочий раствор (1 %-й HNO_3). В мерную колбу на 1 000 см^3 вносят 300 см^3 дистиллированной воды, с помощью стеклянной пипетки добавляют 10 см^3 раствора HNO_3 (конц.) и доводят до метки дистиллированной водой;

– раствор HCl (1 : 1). В мерную колбу на 1 000 см^3 вносят 300 см^3 дистиллированной воды, с помощью мерного цилиндра добавляют 500 см^3 раствора HCl (конц.) и доводят до метки дистиллированной водой.

В тиглях берут навеску исследуемых образцов ткани на аналитических весах с погрешностью 0,01 г при массе навески до 10 г и погрешностью 0,1 г при массе навески 10 г и более. Тигли с навесками покрывают часовыми стеклами и выдерживают при комнатной температуре в течение 1—2 ч, после чего переносят на электроплитку, постепенно увеличивая нагрев. Образцы выдерживают на плитке до начала обугливания. Тигли с высушенными образцами помещают в холодную электропечь. Минерализацию проб проводят, постепенно повышая температуру электропечи на 50 °С через каждые 30 мин и доводя ее до 450 °С. Продолжают минерализацию при этих условиях до получения серой золы.

Тигли с золой охлаждают до комнатной температуры, вынимают из электропечи. Серую золу смачивают 0,5—1,0 см^3 раствора HNO_3 (1 : 1), затем кислоту досуха выпаривают на электроплитке со слабым нагревом и снова помещают тигель с образцом в элек-

тропечь. Минерализацию считают оконченной, когда зола становится белого или слегла окрашенного цвета без обугленных частиц (при наличии обугленных частиц повторяют обработку золы раствором HNO_3 (1 : 1) с последующим озолением.

Белую золу растворяют в тигле при нагревании в азотной кислоте (1 : 1), постепенно добиваясь полного ее растворения, и фильтруют через обеззоленный фильтр. Объем добавляемой кислоты зависит от зольности продукта и составляет в среднем 5—15 см³. При неполном растворении золы, полученной согласно п. 5, азотнокислый раствор с осадком упаривают досуха и перерастворяют в минимальном (5—10 см³) объеме соляной кислоты (1 : 1), снова упаривают до влажных солей. Полученные соли растворяют в 1 %-й соляной кислоте и доводят до объема 15—20 см³. Если полученные таким образом растворы золы содержат нерастворимый осадок, объем растворителя доводят до 25—30 см³, подогревая пробу до растворения. Если и в этом случае полного растворения не наблюдается, раствор отфильтровывают через промытый растворителем фильтр и осадок (состоящий из нерастворимых в минеральных кислотах оксидах, таких, как оксид кремния) отбрасывают.

Одновременно готовят два контрольных образца минерализата без навесок образцов, проводя одни и те же стадии обработки с добавлением тех же количеств реактивов и использованием одинаковой посуды.

Готовят основной стандартный раствор ионов свинца (концентрация ионов свинца 100 мкг/см³). Для этого в мерную колбу на 100 см³ вносят небольшое количество дистиллированной воды, добавляют 5 см³ ГСО водного раствора ионов свинца и 1 см³ концентрированной HNO_3. Перемешивают, доводят до метки дистиллированной водой. Промежуточный стандартный раствор ионов свинца (концентрация ионов свинца 10 мкг/см³) готовят из основного стандартного раствора путём разведения его в 10 раз в мерной колбе разбавленной 1 : 100 концентрированной HNO_3. Стандартный раствор сравнения (концентрация ионов свинца 0,25 мкг/см³) готовят из промежуточного стандартного раствора свинца путём его разведения в мерной колбе в 40 раз разбавленной 1:100 концентрированной HNO_3. Аналогично готовят стандартные растворы сравнения с концентрацией ионов свинца 0,5 и 1,0 мкг/см$_3$.

Нулевой стандарт (бланк) представляет собой деионизованную воду.

5. Подготовка спектрофотометра к работе и условия измерения

Юстировку прибора проводят в соответствии с технической инструкцией завода (фирмы) изготовителя. В таблице представле-

ны условия атомно-абсорбционных измерений в воздушно-ацетиленовом пламени.

Условия атомно-абсорбционного определения свинца в биологических образцах

Элемент	Длина волны, нм	Щель, нм	Пламя	Высота горелки, мм	Оптимальный диапазон рабочих концентраций, мкг/см^3	Предел определения, мкг/см^3
Свинец	283,3	2,0	Стехиометрическое	7—8	0,1—2	0,02
	217,0	2,0		7—8	0,1—2	0,01

Подготовку прибора к работе, его включение и выведение на рабочий режим осуществляют по прилагаемым к спектрофотометру техническим инструкциям.

Распыляя в пламя нулевой стандарт, устанавливают показания прибора на нуль. Затем в порядке возрастания концентрации измеряют абсорбцию стандартных растворов сравнения. В конце градуировки отмечают положение нулевой линии при распылении нулевого стандарта.

Измеряют абсорбцию небольшого числа (5—10) испытуемых и контрольных растворов, промывая после каждого измерения систему распылителя и горелки дистиллированной водой или нулевым стандартом до возвращения сигнала к показаниям, близким к нулю. Повторяют точное измерение абсорбции нулевого стандарта и одного из стандартов сравнения, наиболее близкого по концентрации к испытуемым растворам. Если при этом не отмечается заметное смещение нулевой линии и изменение абсорбции стандарта, продолжают измерения абсорбции испытуемых растворов, периодически повторяя контроль дрейфа нуля и чувствительности и заканчивая измерения полной градуировкой. Измерение абсорбции каждого раствора проводят не менее чем в двух повторах. Если содержание элемента в испытуемом растворе при измерениях оказывается выше верхнего предела диапазона рабочих содержаний, то проводят разбавление испытуемого раствора нулевым стандартом. Коэффициент разбавления выбирают таким образом, чтобы содержание элемента в разбавленном растворе находилось в середине рабочего диапазона.

Расчёт концентрации элемента в образце проводят по формуле:

$$X = \frac{C \times Y \times K}{P}, \quad \text{где}$$

X – искомое содержание свинца в биопробе;
C – концентрация элемента, определённая по калибровочному графику, мкг/см^3, скорректированная на величину сигнала контрольной пробы (бланка), не содержащей образца;
K – коэффициент разбавления или концентрирования исходного раствора пробы;
Y – объем исходного раствора пробы, см^3;
P – навеска пробы, г.

6. Рекомендуемая литература

1. Руководство по методам анализа качества и безопасности пищевых продуктов /Под ред. И. М. Скурихина, В. А. Тутельяна. М.: Брандес Медицина, 1998. 340 с.

2. Хавезов И., Цалев Д. Атомно-абсорбционный анализ: Пер. с бол. Г. А. Шейниной /Под ред. С. З. Яковлевой. Л.: Химия, 1983. 144 с., ил. [София, 1980].

Приложение 4

Рекомендуемая литература
по методам определения функционального состояния ферментов I и II стадии метаболизма ксенобиотиков и стабильности биологических мембран в печени

Показатель	Литературный источник
Содержание цитохромов Р-450 и b5	Omura T., Sato R. //Biol. Chem, 1964. № 239. P. 2370—2378
Активность этоксирезоруфиндеалкилазы	Nakajima M., Nakamura S., Tokudome S. et al. //Drag Metabolism and Disposition. 1999. Vol. 27. P. 1381—1391
Активность метоксирезоруфиндеалкилазы	Burke M.D., Mayer R.T. //Chem.-Biol. Interact. 1983. Vol. 45. № 2. P. 243—258
Активность пентоксирезоруфиндеалкилазы	Burke M.D., Mayer R.T. //Chem.-Biol. Interact. 1983. Vol. 45. № 2. P. 243—258
Активность глутатионтрансферазы	Habig W.H., Pabst W.J., Jacoby W.B. // J. Biol. Chem. 1974. Vol. 249. № 22. P. 7130—7139
Активность УДФ-глюкуронозилтрансферазы	Burchell B., Weatherill P. //Methods Enzimol. 1981. Vol. 77. P. 169—177
Активность хинонредуктазы	Benson A.M., Hunkeler M.J., Talalay P. //Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1980. Vol. 77. № 9. P. 5216—5220
Общая и неседиментируемая активность арилсульфатаз А и В, β-галактозидазы, β-глюкуронидазы	Дингл Д. Лиосмы. Методы исследования. М., 1980. 344 с.

Приложение 5

Методы определения активности ферментов антиоксидантной защиты печени

Исследования активностей ферментов рекомендуется проводить на полуавтоматическом биохимическом анализаторе ФП-901, производства «Labsystems OY», Финляндия или другом с аналогичными параметрами. Исследование проводят в цельном гомогенате печени лабораторных животных.

1. Определение активности глутатионредуктазы осуществляют на основе метода Tilbotsen et al.(1971) в адаптации согласно [1].

Реагенты:

1) 50 мМ Трис-HCl (pH 7,6) (реагент 1);

2) 4 мМ НАДФН (реагент 2);

3) 3,7 мМ окисленный глутатион (реагент 3);

4) гомогенат печени (прилож. 1, п. 3) в 50 мМ трис-HCl (pH 7,6) в соотношении 1 : 20.

Приготовление растворов.

Раствор 1. Буферно-коферментная смесь: готовят перед измерением путем смешения 60 $см^3$ реагента 1 и 1 $см^3$ реагента 2.

Реакционная смесь: 0,45 $см^3$ раствора 1 смешивают с 50 $мм^3$ гомогената, реакцию запускают добавкой 100 $мм^3$ реагента 3.

Режимы измерения: время задержки – 15 с, время измерения – 120 с, кинетический режим, температура 37 °С, длина волны $\lambda = 340$ нм. Фоновая реакция – вместо гомогената аликвота H_2O.

Расчет: активность ГР (мкмоль/мин/$см^3$ эр) = $(dA_{оп} - dA_{фон}) \cdot k \cdot p$, где dA – скорость возрастания оптической плотности (ед о.п./с) соответственно для опытной пробы и бланка (без добавления гомогената), p – разведение пробы, k – коэффициент для анализатора используемого типа.

2. Определение активности глутатионпероксидазы в гомогенатах печени осуществляют на основе метода Mille (1959) в модификации [2].

Реагенты:

1) 67 мМ K,Na-фосфатный буфер (pH 7,0) с 3 мМ ЭДТА-Na_2, 0,1 %-м тритоном X-100, 0,01 %-м азидом натрия NaN_3;

2) 4 мМ НАДФН;

3) 8,3 мМ восстановленный глутатион;

4) глютатионредуктаза дрожжей Sigma (активность не менее 8 U/$см^3$);

5) трет-бутиловая перекись в этаноле (70 %-я) (готовый препарат) производства «Sigma», США или аналогичная;

6) гомогенат печени.

Приготовление растворов.

Раствор 1. 50 см³ реагента 1 смешивают с 1 см³ реагента 2 и 1 см³ реагента 4 непосредственно перед измерением.

Реакционная смесь: 0,49 см³ раствора 1 смешивают с 20 мм³ гомогената печени, добавляют 75 мм³ реагента 5, реакцию запускают добавлением 50 мм³ реагента 3.

Режимы измерения: время задержки – 20 с, время измерения – 120 с, кинетический режим, температура 37 °С, длина волны $\lambda = 340$ нм. Бланк – вместо гомогената аликвота H_2O.

Расчет: активность ГП (мкмоль/мин/см³ эр) = $(dA_{оп} - dA_{фон}) \cdot k \cdot p$, где dA – скорость возрастания оптической плотности (ед о.п./с) в опытной пробе и бланке соответственно; p – разведение пробы, k – коэффициент, подобранный для анализатора используемого типа.

3. Определение активности каталазы в гомогенатах печени осуществляют на основе метода Oshino et al. (1987) в модификации [3].

Принцип метода основан на использовании алкогольдегидрогеназной «ловушки» по следующей схеме:

$$H_2O_2 + C_2H_5OH > {}^{\text{каталаза}} > CH_3CHO + 2H_2O$$

$$CH_3CHO + НАДН < {}^{\text{алкогольдегидрогеназа}} > C_2H_5OH + НАД^+$$

Реагенты:

1) 67 мМ Na-фосфатный буфер (pH 7,4);

2) 36,8 мМ НАДН;

3) алкогольдегидрогеназа дрожжей, производства «Serva», Германия или аналогичная (активность не менее 36,8 ед/см³);

4) H_2O_2 в этаноле (0,3 % р-р H_2O_2 в 70 % этаноле);

5) гомогенат печени.

Приготовление растворов.

Раствор 1. 50 см³ реагента 1 смешивают с 1 см³ реагента 2 и 1 см³ реагента 3 непосредственно перед измерением.

Реакционная смесь: 0,49 см³ раствора 1 смешивают с 10 мм³ гомогената печени. Старт реакции осуществляют добавкой 50 мм³ реагента 4. Бланк – вместо гомогената аликвота H_2O.

Режимы измерения: время задержки – 20 с, время измерения –120 с, кинетический режим, температура 37 °С, длина волны $\lambda = 340$ нм.

Расчет для ФП-901: активность каталазы (кU/см³эр) = $(dA_{оп} - dA_{фон}) \cdot k \cdot p$, где dA – скорость изменения оптической плотности (ед.о.п./с) в опытной пробе и бланке соответственно; p – разведение пробы, k – коэффициент, подобранный для анализатора используемого типа.

4. Определение активности супероксиддисмутазы осуществляют на основе метода Niashikimi et al. (1972) в модификации [3].

Реагенты:
1) 2 мМ $Na_4P_2O_7 \cdot 10H_2O$ pH 8,3;
2) 0,05 мМ нитросиний тетразолий;
3) 2,5 мкМ НАДН;
4) 25 мкМ феназинметосульфат;
5) гомогенат ткани печени.

Примечание. Реагенты 1, 3 и 4 готовятся непосредственно перед измерением.

Приготовление растворов.

Раствор 1. 50 см^3 реагента 1 смешивают с 7,5 см^3 реагента 2 и 2 см^3 реагента 3 непосредственно перед измерением.

Реакционная смесь: 0,32 см^3 раствора 1 смешивают с 20 мм^3 гомогената. Старт реакции осуществляется добавкой 50 мм^3 реагента 4, разведенного в 10 раз.

Режимы измерения: время задержки – 10 с, время измерения – 180 с, кинетический режим, температура 25 °С, длина волны λ = 540 нм, параллельный режим для измерения опытной и фоновой проб. Фоновая проба (бланк) – вместо гомогената аликвота H_2O.

Расчет для ФП-901: активность СОД (усл. ед/мин) = $(1 - A_{оп}/A_{фон}) \cdot k \cdot p$, где A – оптическая плотность, соответственно в опытной пробе и бланке, p – разведение пробы, k – коэффициент, подобранный для анализатора используемого типа.

5. Содержание диеновых коньюгатов (ДК) в гомогенатах печени определяют с помощью классического спектрофотометрического метода Placer (1968) в модификации Гаврилова и др. [4].

0,2 см^3 гомогената вносят в пробирки с плотной крышкой и добавляют 2 см^3 чисто перегнанной смеси изопропанол: гептан (1 : 1), (v/v). Смесь встряхивают в течение 20–30 мин и добавляют 0,5 см^3 HCl (pH = 2), после чего еще раз встряхивают 2 мин и добавляют 1 см^3 чисто перегнанного гептана, после чего встряхивают еще 10—15 мин. Примерно через 1 ч верхнюю фазу отбирают и фотометрируют при 232 нм против контрольной пробы, где вместо пробы взято 0,2 см^3 H_2O. Коэффициент экстинкции $2{,}2 \times 10^5$ см$^{-1}$ М$^{-1}$.

6. Содержание ТБК-продуктов (малоновый диальдегид) в гомогенате печени определяют по методу Mihara et al. (1980). [5].

0,2 см^3 плазмы крови смешивают с 2 см^3 1,4 %-й (об/об) ортофосфорной кислоты и 1 см^3 0,5 %-й тиобарбитуровой кислоты. Смесь инкубируют в кипящей бане 45 мин, после чего охлаждают и добавляют 2 см^3 н-бутанола. Пробирки тщательно встряхивают до образования белой суспензии, после чего центрифугируют при 4 000 g 20 мин. Верхнюю фазу фотометрируют против контрольной пробы при 532 нм – 570 нм. Коэффициент экстинкции $1{,}56 \times 10^5$ см$^{-1}$ М$^{-1}$.

7. Рекомендуемая литература

1. Мальцев Г. Ю., Орлова Л. А. Оптимизация определения активности глутатионредуктазы эритроцитов человека на полуавтоматическом анализаторе //Вопр. мед. химии. 1994. № 2. С. 59—61.

2. Мальцев Г. Ю.,Тышко Н. В. Методы определения содержания глютатиона и активности глутатионпероксидазы в эритроцитах //Гигиена и санитария. 2002. № 2. С. 69—72.

3. Мальцев Г. Ю., Васильев А. В. Способ определения активности каталазы и супероксиддисмутазы эритроцитов на анализаторе открытого типа //Вопр. мед. химии. 1994. № 2. С. 56—58.

4. Гаврилов В. Б., Мишкорудная М. И. Спектрофотометрическое определение содержания гидроперекисей липидов в плазме крови //Лаб. дело, 1983. № 3 С. 33—35.

5. Mihara M., Uchiyama M., Fukuzaw K. Thiobarbituric acid value on fresh homogenate of rat as a parameter of lipid peroxidation in aging , CCl4 intoxication and vitamin E deficiency // Biochem.Med. 1980. V. 23. № 3. P. 302—311.

Приложение 6

Обозначения и сокращения

АЛК – 5-аминолевуленовая кислота
в/б – внутрибрюшинное (введение)
ГСО – государственный стандартный образец
ЖКТ – желудочно-кишечный тракт
НАДФН – никотинамидадениндинуклеотид фосфат восстановленный
ПАВ – поверхностно-активное вещество
ПБГ – порфобилиноген
ПОЛ – перекисное окисление липидов
Трис – трис-гидроксиметиламинометан (основание)
ТХУ – трихлоруксусная кислота
ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота
7-AAD – 7-аминоактиномицин D
CAS – идентификационный номер химического соединения
GSH – восстановленный глутатион
LD50 – концентрация, отвечающая 50 %-й летальности

gost.e-ecolog.ru