Государственное санитарно-эпидемиологическое нормирование Российской Федерации

1.2. ГИГИЕНА, ТОКСИКОЛОГИЯ, САНИТАРИЯ

Выявление методами электронной микроскопии структурных изменений, вызываемых искусственными наночастицами в клетках животных и растений

Методические рекомендации
МР 1.2.0047—11

Издание официальное

Москва • 2012

gost.e-ecolog.ru

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

1.2. ГИГИЕНА, ТОКСИКОЛОГИЯ, САНИТАРИЯ

Выявление методами электронной микроскопии структурных изменений, вызываемых искусственными наночастицами в клетках животных и растений

Методические рекомендации
МР 1.2.0047—11

ББК 51.2
В92

В92 **Выявление** методами электронной микроскопии структурных изменений, вызываемых искусственными наночастицами в клетках животных и растений: Методические рекомендации.— М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2012.—46 с.

ISBN 978—5—7508—1081—9

1. Разработаны: Государственным учебно-научным учреждением Биологический факультет Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова (М. П. Кирпичников, Г. Е. Онищенко, Е. А. Смирнова, К. В. Шайтан, М. В. Ерохина, А. С. Шебанова); Учреждением Российской Академии наук Институт биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН (А. В. Феофанов, А. А. Игнатова); Учреждением Российской академии медицинских наук Научно-исследовательский институт питания РАМН (В. А. Тутельян, И. В. Гмошинский, С. А. Хотимченко, М. М. Гапшаров); Федеральным государственным унитарным предприятием «Всероссийский научно-исследовательский институт метрологической службы» (С. А. Кононогов, С. С. Голубев); Учреждением Российской академии наук Центр «Биоинженерия» РАН (К. Г. Скрябин).

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

3. Утверждены Руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации Г. Г. Онищенко 11 ноября 2011 г.

4. Введены в действие 11 ноября 2011 г.

5. Введены впервые.

ББК 51.2

ISBN 978—5—7508—1081—9

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

Содержание

I. Область применения 4
II. Введение 5
III. Нормативные ссылки 6
IV. Общие положения 10
V. Методика подготовки проб для выявления методами электронной микроскопии структурных изменений, вызываемых искусственными наночастицами в клетках и тканях животных и растений 13
5.1. Реактивы, материалы и оборудование, применяемые для отбора и подготовки проб к анализу структурных изменений методом ПЭМ 13
5.2. Подготовка проб для анализа структурных изменений методом ПЭМ 19
5.3. Подготовка проб к анализу методом ПЭМ 23
VI. Порядок проведения измерений 30
6.1. Оборудование, необходимое для регистрации структурных изменений в ультратонких срезах тканей и органов 30
6.2. Порядок регистрации структурных изменений, вызываемых искусственными наночастицами в клетках, тканях и органах методом ПЭМ 31
6.3. Получение изображений структурных изменений на ультратонких срезах тканей и органов 32
VII. Порядок анализа данных и представление результатов 42
7.1. Анализ данных 42
7.2. Предоставление заключения 44
Приложение 1. Обозначения и сокращения 45
Приложение 2. Морфологические признаки основных видов гибели клеток 46

УТВЕРЖДАЮ
Руководитель Федеральной службы
по надзору в сфере защиты прав
потребителей и благополучия человека,
Главный государственный санитарный
врач Российской Федерации

Г. Г. Онищенко
11 ноября 2011 г.
Дата введения: с момента утверждения

1.2. ГИГИЕНА, ТОКСИКОЛОГИЯ, САНИТАРИЯ

Выявление методами электронной микроскопии структурных изменений, вызываемых искусственными наночастицами в клетках животных и растений

Методические рекомендации МР 1.2.0047—11

I. Область применения

1.1. Настоящие методические рекомендации определяют порядок выявления структурных изменений, вызываемых искусственными наночастицами в срезах тканей животных и растений методом просвечивающей электронной микроскопии (далее – ПЭМ) на тканевом, клеточном и субклеточном уровнях организации.

1.2. Настоящие методические рекомендации могут использоваться:

- при оценке безопасности разрабатываемых и уже используемых наноматериалов;
- в целях принятия решений по оценке рисков, связанных с процессами производства и оборота наноматериалов;
- при проведении экспертизы продукции сельского хозяйства, пищевых продуктов, фармацевтической промышленности, биотехнологического производства.

1.3. Методические рекомендации разработаны с целью обеспечения единства процедур подготовки образцов, проведения измерений и представления результатов при оценке структурных изменений в срезах тканей животных и растений, вызываемых искусственными наночастицами

на тканевом, клеточном и субклеточном уровнях организации методами аналитической электронной микроскопии.

1.4. Методические рекомендации предназначены для специалистов органов и организаций Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, научно-исследовательских организаций гигиенического профиля и медицинских учебных заведений, а также иных организаций и учреждений, занимающихся вопросами оценки безопасности наноматериалов.

II. Введение

Широкое использование техногенных наноразмерных частиц в промышленном производстве, в быту, в косметических средствах, средствах гигиены полости рта и лекарственных препаратах поставило вопрос об оценке безопасности данных частиц для человека, животного и растительного мира и для окружающей среды. Различные по своей структуре техногенные наночастицы могут оказывать разное действие на живые организмы, в т. ч. и на организм человека. Данная проблема становится всё более острой и обсуждаемой в мире в связи с возможностью загрязнения воздуха, почвы и питьевой воды техногенными наноразмерными частицами. Такие частицы способны проникать в организм человека через лёгкие при дыхании, через кожу, через желудок с пищей и через кровь при парентеральных инъекциях. Вопросы биобезопасности касаются, безусловно, и мира животных организмов, в первую очередь, с позиций поддержания жизнеспособности обитающих на земле различных видов животных и обеспечения их биоразнообразия. Кроме этого, животные, и прежде всего, сельскохозяйственные, являются элементами пищевой цепи для человека. Следовательно, попадание в организм животных техногенных наночастиц может представлять потенциальную угрозу для здоровья человека. Более того, возникает вопрос о том, не вызывают ли структурные изменения в клетках и тканях животных, связанные с присутствием в них наночастиц, такие физиологические изменения, которые могут оказаться небезопасными для человека. Пищевая цепь также связывает человека и животных с растительными организмами. Взаимодействие растений с наночастицами может происходить в почве (корневая система), в воздухе (стебли, листья, плоды) и при контакте с водой (корни, стебли, листья, плоды).

Одним из приоритетных направлений в изучении токсичности наночастиц является исследование структурных изменений, которые возникают в клетках и тканях живых организмов при контакте с контаминированной наночастицами средой. В ряде случаев при воздействии на-

номатериалов отмечаются нарушения в функциональной активности органов животных и растений, происходит индукция клеточной гибели, изменяется пролиферативная активность клеток и выявляются структурные изменения внутриклеточных органелл. При этом некоторые виды наночастиц не оказывают заметного влияния на физиологическое состояние многоклеточных организмов. Однако отсутствие регистрируемого токсического эффекта не исключает того, что на клеточном уровне наночастицы вызывают структурные изменения, которые первоначально не проявляются на физиологическом уровне, но в процессе жизнедеятельности организма или в последующих поколениях могут приводить к развитию патологических процессов. Поэтому исследование влияния техногенных наноразмерных частиц на живые организмы становится приоритетным вопросом оценки безопасности наноматериалов и используемых нанотехнологий.

Метод ПЭМ-анализа ультратонких срезов оптимален для определения структурных изменений, вызываемых искусственными наночастицами на тканевом, клеточном и субклеточном уровнях организации.

III. Нормативные ссылки

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

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

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

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

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

3.6. Постановление Правительства Российской Федерации от 30 июня 2004 г. № 322 «Об утверждении Положения о Федеральной службе 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 содержащей 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. СанПиН 2.6.1.2523—09 «Нормы радиационной безопасности (НРБ–99/2009)».

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

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

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

3.19. МУ 1.2. 2636—10 «Проведение санитарно-эпидемиологической экспертизы продукции, полученной с использованием нанотехнологий и наноматериалов».

3.20. МУ 1.2. 2741—10 «Порядок отбора проб для выявления и идентификации наноматериалов в лабораторных животных».

3.21. МУ 1.2.2742—10 «Порядок отбора проб для выявления и идентификации наноматериалов в растениях».

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

3.23. МУ 1.2.2873—11 «Порядок выявления и идентификации наноматериалов в водных беспозвоночных».

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

3.25. МУ 1.2.2875—11 «Порядок выявления и идентификации наноматериалов в водоемах».

3.26. МУ 1.2.2876—11 «Порядок выявления и идентификации наноматериалов в растениях».

3.27. МУ 1.2.2877—11 «Порядок выявления и идентификации наноматериалов в рыбах».

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

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

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

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

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

3.33. МР 1.2.2640—10 «Методы отбора проб, выявления и определения содержания наночастиц и наноматериалов в составе сельскохозяйственной, пищевой продукции и упаковочных материалов».

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

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

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

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

3.38. ГОСТ 2603—79 «Реактивы. Ацетон. Технические условия».

3.39. ГОСТ 4328—77 «Реактивы. Натрия гидроокись. Технические условия».

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

3.41. ГОСТ 1942—86 «1,2-Дихлорэтан технический. Технические условия».

3.42. ГОСТ 4198—75 «Реактивы. Калий фосфорнокислый однозамещенный. Технические условия».

3.43. ГОСТ 3118—77 «Реактивы. Кислота соляная. Технические условия».

3.44. ГОСТ 4172—76 «Реактивы. Натрий фосфорнокислый двузамещенный 12-водный. Технические условия».

3.45. ГОСТ 5833—75 «Реактивы. Сахароза. Технические условия».

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

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

3.48. ГОСТ 27987—88 «Анализаторы жидкости потенциометрические ГСП. Общие технические условия».

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

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

3.51. ГОСТ 29227—91 «Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки градуированные. Часть 1. Общие требования».

3.52. ГОСТ 21240—89 «Скальпели и ножи медицинские. Общие технические требования и методы испытаний».

3.53. ГОСТ 21241—89 «Пинцеты медицинские. Общие технические требования и методы испытаний».

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

3.55. ГОСТ 3—88 «Перчатки хирургические резиновые. Технические условия».

3.56. ГОСТ 2493—75 «Реактивы. Калий фосфорнокислый двузамещенный 3-водный. Технические условия».

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

3.58. ГОСТ 4233—77 «Реактивы. Натрий хлористый. Технические условия».

3.59. ГОСТ 8429—77 «Бура. Технические условия».

3.60. ГОСТ 1625—89 «Формалин технический. Технические условия».

3.61. ГОСТ 4517—87 «Реактивы. Методы приготовления вспомогательных реактивов и растворов, применяемых при анализе».

3.62. ГОСТ 20015—88 «Хлороформ. Технические условия».

3.63. ГОСТ 21239—89 «Инструменты хирургические. Ножницы. Общие требования и методы испытаний».

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

IV. Общие положения

4.1. Целью выявления структурных изменений, вызываемых искусственными наночастицами в клетках животных и растений методами электронной микроскопии является:

- выявление органов-мишеней воздействия искусственных наноматериалов;
- установление наличия эффектов кумуляции наночастиц в организмах животных и растениях;
- выявление механизмов токсического действия наночастиц на организм;
- исследования по токсиколого-гигиенической и медико-биологической оценке наноматериалов и продукции, их содержащей;
- санитарно-гигиеническое нормирование содержания наноматериалов в объектах окружающей среды и потребительской продукции;
- экспертиза продукции наноиндустрии, производимой на территории Российской Федерации или ввозимой на территорию Российской Федерации;
- оценка риска для здоровья населения при поступлении наноматериалов с воздухом, водой, пищевыми продуктами и другими видами потребительской продукции;
- разработка мероприятий по охране окружающей среды от воздействия наночастиц и наноматериалов.

4.2. Отбор проб, их упаковка, маркировка и транспортирование в лабораторию, проводящую исследования, осуществляется в соответствии с МУ 1.2.2741—10 «Порядок отбора проб для выявления и идентификации наноматериалов в лабораторных животных», МУ 1.2.2742—10 «Порядок отбора проб для выявления и идентификации наноматериалов в растениях», МУ 1.2.2745—10 «Порядок отбора проб для характеристики действия наноматериалов на лабораторных животных», МР 1.2.2640—10 «Методы отбора проб, выявления и определения содержания наночастиц и наноматериалов в составе сельскохозяйственной, пищевой продукции и упаковочных материалах», МР 1.2.0022—11 «Порядок отбора проб для контроля за наноматериалами», МУ 1.2.2740—10 «Порядок отбора проб для выявления, идентификации и характеристики действия наноматериалов в водных беспозвоночных», МУ 1.2.2744—10 «Порядок отбора проб для выявления, идентификации и характеристики действия наноматериалов в рыбах», МУ 1.2.2873—11 «Порядок выявления и идентификации наноматериалов в водных беспозвоночных».

4.3. Технические характеристики электронных микроскопов и вспомогательного лабораторного оборудования представлены в МР 1.2.2639—10 «Использование методов количественного определения наноматериалов на предприятиях наноиндустрии» и МР 1.2.2641—10 «Определение приоритетных видов наноматериалов в объектах окружающей среды, живых организмах и пищевых продуктах».

4.4. Методом ПЭМ возможно решение следующих задач:

• достоверное выявление присутствия искусственных наночастиц в изучаемых образцах органов и тканей;

• анализ структурных изменений на клеточных и субклеточных уровнях, возникающих в результате воздействия экзогенных наночастиц;

• анализ присутствия экзогенных наночастиц в областях со структурными изменениями.

Протоколы подготовки проб к изучению методом ПЭМ выбирают в зависимости от решаемых задач.

4.5. Подготовка проб для выявления наночастиц в изучаемых образцах проводится в соответствии с МР 1.2.2641—10 «Определение приоритетных видов наноматериалов в объектах окружающей среды, пищевых продуктах и живых организмах» (раздел 5.1.5.4.1).

Подготовка проб для анализа структурных изменений в изучаемых образцах выполняется с контрастированием клеточных и тканевых структур тетраоксидом осмия, уранилацетатом и цитратом свинца.

Подготовка проб для анализа присутствия экзогенных наночастиц в областях со структурными изменениями выполняется с контрастированием клеточных и тканевых структур тетраоксидом осмия.

Пробоподготовка образцов, взятых из изучаемой и контрольной групп, должна выполняться идентично.

4.6. Лаборатория (организация), проводящая работы по выявлению структурных изменений, вызываемых искусственными наночастицами в клетках животных и растений методами электронной микроскопии, должна быть аккредитована на проведение таких работ.

В лаборатории должны соблюдаться правила надлежащей лабораторной практики в соответствии с приказом Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации от 23 августа 2010 г. № 708 н «Об утверждении Правил лабораторной практики».

4.7. В организации (лаборатории), проводящей настоящие исследования, 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 выявлению структурных изменений, вызываемых искусственными наночастицами в клетках животных и растений методами электронной микроскопии, 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 выявлению структурных изменений, вызываемых искусственными наночастицами в клетках животных и растений методами электронной микроскопии, должны иметь оборудованные помещения для работы с биологическим материалом (препарирование, пробоподготовка, анализ). Для обработки материала должны быть установлены ламинарные шкафы, обеспечивающие горизонтальный поток воздуха, а также возможность работы без ламинарного потока и длительную экспозицию облучения внутренних поверхностей ультрафиолетовым светом.

4.10. Организации (лаборатории) 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.

4.11. Организации (лаборатории), проводящие исследования по выявлению структурных изменений, вызываемых искусственными наночастицами в клетках животных и растений методами электронной микроскопии, должны иметь помещения для содержания и работы с лабораторными животными (виварии, клиники лабораторных животных), требования к которым изложены в МУ 1.2.2869—11 «Порядок оценки токсического действия наноматериалов на лабораторных животных».

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; перечень

исследованных образцов и применяемых стандартов; для животных – вид, линию, пол и возраст используемых животных, состав применяемых рационов, условия содержания животных, метод введения наноматериалов животным, применяемые дозы, длительность и кратность введения, схема проведения исследования; для растений – вид, линию используемых растений, условия выращивания или сбора, методы введения наноматериалов, применяемые дозы, длительность 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, должна обеспечить конфиденциальность результатов исследований в рамках принятых ею обязательств и в соответствии с законодательством Российской Федерации.

Сотрудники, принимающие участие в проведении исследований, обязаны соблюдать конфиденциальность в отношении любых данных, полученных в ходе исследования, в соответствии с законодательством Российской Федерации.

V. Методика подготовки проб для выявления методами электронной микроскопии структурных изменений, вызываемых искусственными наночастицами в клетках и тканях животных и растений

5.1. Реактивы, материалы и оборудование, применяемые для отбора и подготовки проб к анализу структурных изменений методом ПЭМ

5.1.1. Реактивы

Хлороформ, чда	ГОСТ 20015—88
Диэтиловый эфир (эфир для наркоза стабилизированный), чда	ТУ 2600-001-43852015—05

Спирт этиловый ректификированный, 96 % первого сорта или высшей очистки	ГОСТ 51652—2000
Деионизованная вода	ГОСТ 6709—79
Дистиллированная вода, «вода для инъекций»	ФС 42-2620-97
Глутаровый альдегид (25 %-й водный раствор), Grade I, специальной очистки для использования в электронной микроскопии	ТУ 6-02-1273—89
Нейтральный формалин, чда, или приготовленный в соответствии с ГОСТ 4517—87, подраздел 2.158	ГОСТ 1625—75
Дигидрофосфат калия водный ($KH_2PO_4 \times H_2O$), хч	ГОСТ 4198—75
Гидрофосфат калия 3-водный ($K_2HPO_4 \times 3H_2O$), хч	ГОСТ 2493—75
Гидрофосфат натрия 12-водный ($Na_2HPO_4 \times 12H_2O$), хч	ГОСТ 4172—76
Калия хлорид KCl, хч	ГОСТ 4568—95
Натрия хлорид NaCl, хч	ГОСТ 4233—77
Натрия тетраборат $Na_2B_4O_7$ (бура), хч	ГОСТ 8429—77
Кислота соляная HCl, хч	ГОСТ 3118—77
Ацетон, чда	ГОСТ 2603—79
Натрия гидроксид NaOH, хч	ГОСТ 4328—77
Толуидиновый синий, синонимы: основной голубой 17, метилен голубой Т50 или Т экстра, толониум хлорид, чда	
Тетраоксид осмия (OsO_4) ACS фирмы «Sigma-Aldrich» (США) или аналогичный (раствор 2 %-й или 4 %-й)	
Уранилацетат ACS фирмы «Sigma-Aldrich» (США) или аналогичный	
Цитрат свинца purum фирмы «Sigma-Aldrich» (США) или аналогичный	
Нитрат свинца ACS фирмы «Sigma-Aldrich» (США) или аналогичный (для приготовления цитрата свинца)	
Цитрат натрия FG фирмы «Sigma-Aldrich» (США) или аналогичный (для приготовления цитрата свинца)	
Формвар (Formvar® solution) для микроскопии фирмы «Sigma-Aldrich» (США) или аналогичный	
Дихлорэтан (для приготовления раствора формвара)	ГОСТ 1942—86

Эпон 812 (Epoxy Embedding Medium) фирмы «Sigma-Aldrich» (США) или аналогичный	
Додецил янтарный ангидрид фирмы «Sigma-Aldrich» (США) или аналогичный	
Метилэндиковый ангидрид МЭА-610 фирмы «Sigma-Aldrich» (США) или аналогичный	
Тридиметиламинофенол (катализатор DMP-30) фирмы «Sigma-Aldrich» (США) или аналогичный	
Сахароза ($C_{12}H_{22}O_{11}$), хч (для растений)	

5.1.2. Материалы

Материалы, необходимые для отбора проб растений, согласно МУ 1.2.2742—10 и 1.2.2876—11	
Материалы, необходимые для отбора проб животных, согласно МУ 1.2.2741—10, 1.2.2745—10; 1.2.2740—10; 1.2.2744—10 и 1.2.2869—11	
Булавки или прямые препаровальные иглы для фиксации животных на препаровальном столике	
Препаровальный столик (из пробки или пенопласта)	
Штативы для пробирок	
Пинцет медицинский	ГОСТ 21241—89
Ножницы медицинские	ГОСТ 21239—89
Ножницы глазные	ГОСТ 21239—89
Скальпель	ГОСТ 21240—89
Бритва фирмы «Ted Pella, Inc.» (США), кат. № 121-1 или аналогичная	
Пинцет для электронно-микроскопических работ 110 мм тип 5 кончик (0,05 × 0,01) мм (или 115 мм тип 7 кончик (0,10 × 0,06) мм) ненамагничивающийся фирмы «Ted Pella»	
Чашки Петри стеклянные нестерильные, диаметром 12 см	ГОСТ 25336—82
Флаконы стеклянные из темного стекла вместимостью 10 $см^3$ с завинчивающейся крышкой	
Пенициллиновые флаконы стеклянные вместимостью 10 $см^3$	
Посуда мерная лабораторная стеклянная	ГОСТ 1770—74
и посуда лабораторная стеклянная	ГОСТ 25336—82
Колбы (стеклянные без крышки) вместимостью 100, 250 $см^3$	

Пробирки (стеклянные с крышкой) вместимостью 20 $см^3$	
Мерный цилиндр (стеклянный, с делениями 1 $см^3$) вместимостью 100 $см^3$	
Мерная колба (стеклянная, с делениями от 1 $см^3$) с притертой крышкой (250 $см^3$)	
Пипетки (стеклянные нестерильные или стерильные, с делением 0,1 $см^3$) вместимостью 5 $см^3$	
Наконечники полипропиленовые нестерильные пластиковые объемом 1—200 и 200—1 000 $мм^3$	
Полипропиленовые пробирки для микропроб однократного применения типа «Эппендорф» вместимостью 1,5 и 2,0 $см^3$	ТУ 64-2-30—80
Полиэтиленовые капсулы с плоским или коническим дном для заливки образцов, диаметр от 6 мм, выдерживающие нагрев до 75 °С или полипропиленовые аналогичные капсулы, выдерживающие нагрев до 100 °С фирмы «BEEM® Embedding Capsule» или аналогичные	
Плоские полипропиленовые капсулы диаметром 26 мм и толщиной 10 мм для заливки образцов на покровных стеклах фирмы «BEEM® Embedding Capsule» или аналогичные	
Тефлоновые контейнеры для заливки образцов в эпоксидную смолу	
Пластиковые одноразовые ванночки для сбора срезов для стеклянных или алмазных ножей фирмы «TedPella» или аналогичные производства LKB	
Электронно-микроскопические бленды (медные), отверстие круглое 1 мм, 3 мм или овальное (1 × 2) мм, или сетки медные круглые с размером отверстий 200—450 мкм	
Специальное стекло для изготовления стеклянных ножей ширина 25 мм, длина 400 или 200 мм, толщина 6 или 10 мм фирмы «TedPella, Agar Scientific» или аналогичное	
Палочки для чистки алмазного ножа из сердцевины пробкового дерева фирмы «TedPella, Agar Scientific» или аналогичные	

Перчатки хирургические резиновые	ГОСТ 3—88
Парафильм (пластичная парафиновая пленка с отделяемой бумажной основой)	
Полиэтиленовые или стеклянные флаконы с плотно закрывающейся крышкой для фиксации материала, объем 8—10 $см^3$	
Стеклянная палочка длиной до 20 см и диаметром 0,3—0,5 см	
Предметные стекла (76 × 26) мм, толщина 1 мм	
Одноразовые фильтры для стерилизации растворов с диаметром пор 0,22 мкм	
Система для фильтрации растворов стеклянная вместимостью 1,0 $дм^3$ с вакуумным насосом	
Специальный стеклянный стакан для приготовления и хранения раствора формвара	
Химически чистое отшлифованное стекло для получения формваровой плёнки	
Наклейки для маркировки	
Фильтровальная бумага	
Медицинский шприц объёмом 50—100 $см^3$ (для удаления воздуха из растений)	

5.1.3. Оборудование

Холодильник бытовой электрический	ГОСТ 16317—87
Центрифуга со скоростью вращения ротора до 12 000 об./мин и охлаждением для пробирок вместимостью 1,5 $см^3$ (5415 R «Eppendorf», ФРГ или аналогичная)	
Центрифуга мультифункциональная со скоростью вращения ротора до 5 000 об./мин (с бакет-ротором) и 14 000 об./мин (с угловым ротором) с охлаждением для пробирок вместимостью 20 $см^3$ (5804 R «Eppendorf», ФРГ или аналогичная) (для суспензионных образцов)	
Встряхиватель вибрационный типа «Вортекс» со скоростью вращения до 3 000 об./мин (V3 «Elmi Ltd», Латвия или аналогичный)	
Весы лабораторные общего назначения 2-го класса точности с погрешностью взвешивания не более 0,1 мг по ГОСТ 24104–2001 от 0,1 мг до 200 г	

pH-метр или аналогичный, диапазон измерения pH, ед. pH от 0,0 до 14, дискретность измерения pH, ед. pH 0,01, диапазон измерения температуры, от 10 до 100 °С, дискретность измерения температуры, 0,1 °С, предел допускаемой основной абсолютной погрешности измерения pH 0,01, предел допускаемой основной абсолютной погрешности измерения температуры ± 1 °С	ГОСТ 27987—88
Ультрамикротом, обеспечивающий получение ультратонких и полутонких срезов биологических и физических образцов толщиной 30—100 нм, скорость резания 0,4—1,0 мм/с, термоподача или пьезоподача 40—60 нм; основные параметры: минимальная толщина среза до 5 нм; максимальная толщина среза до 5 микрон; ход ножа 15 мм; диапазон скорости резки 0,1—49,9 мм/с; автоматизированная подача – 200 микрон; ручная подача – 50 мм; многоуровневая система защиты от вибраций; механическая система привода для изготовления срезов и подачи образца; полностью регулируемый стереомикроскоп; изменяемое положение освещения с задней подсветкой СИД и трансиллюминацией образца	
Прибор для изготовления стеклянных ножей для ультрамикротомов LKB 7800 или аналогичный	
Стеклянные или алмазные ножи для ультрамикротома	
Термостат суховоздушный с диапазоном регулируемых температур, включающим 37 и 60 °С, с точностью ± 0,4 °С	
Магнитная мешалка, максимальный объем перемешиваемой жидкости 2 $дм^3$, частота вращения мешальника: 250—1 250 об./мин, с подогревом или без	
Электромешалка со спиральной насадкой, низкоскоростная (до 250 об./мин) для перемешивания смесей с высокой вязкостью	
Бинокулярный оптический микроскоп, увеличение микроскопа крат 40×—1 000×, объективы категории планахромат (крат/апертура) 4×/0,1,	

10×/0,25, 20×/0,4, 40×/0,65, 60×/0,85, маслоиммерсионный 100×/1,25, окуляры (крат/поле) 10×/22, центрируемый конденсор Аббе с числовой апертурой больше 0,5, источник света галогеновая лампа 20 Вт, наличие режима наблюдения в проходящем свете

Вытяжной шкаф, оборудованный фильтром для улавливания наночастиц

Ламинарный бокс биологической безопасности класс IIA

Дистиллятор объем от 4 $дм^3$, производительность от 1 $дм^3/ч$

Бинокулярная лупа с диапазоном увеличений ×0,6, ×1, ×2, ×4, ×8

Механические или электронные одноканальные дозаторы с переменным объёмом дозирования
1) 2—20 $мм^3$ с шагом 0,01 $мм^3$, с точностью ± 0,8 %;
2) 20—200 $мм^3$ с шагом 0,1 $мм^3$, с точностью ± 0,6 %;
3) 100—1 000 $мм^3$ с шагом 1 $мм^3$, с точностью ± 3 %;
4) 1—10 $см^3$ с шагом 0,1 $см^3$, с точностью ± 0,5 %

Держатели для прямоугольных и круглых блоков, совместимые с используемым ультрамикротомом, фирма «TedPella, Agar Scientific» или аналогичные

Лобзик ручной механический для обработки залитых в эпоксидную смолу образцов

5.2. Подготовка проб для анализа структурных изменений методом ПЭМ

5.2.1. Подготовка растворов для процедуры отбора и фиксации проб

5.2.1.1. Для организмов животных.

Рабочие растворы готовят в соответствии с правилами надлежащей лабораторной практики. Если иное не указано, то растворы готовят, как описано в МР 1.2.2641—10 «Определение приоритетных видов наноматериалов в объектах окружающей среды, пищевых продуктах и живых организмах» (раздел 5.1.3.3):

• 0,1 моль/$дм^3$ раствор фосфатно-солевого буфера состава 0,02 моль/$дм^3$ KH_2PO_4, 0,08 М K_2HPO_4, pH 7,2—7,4, 0,88 % (масса/объем) KCl;

• раствор для фиксации состава 2,5 % глутарового альдегида, 2 % формалина в фосфатно-солевом буфере (0,1 моль/$дм^3$, pH 7,2—7,4).

При помощи pH-метра контролируют pH растворов.

Приготовленные растворы фильтруют через мембранные фильтры с диаметром пор 0,22 мкм в том случае, если необходимо использование стерильных растворов, например, при введении этих растворов животным в виде инъекции на длительный срок.

Используемые инструменты должны быть подготовлены в соответствии с требованиями асептики, а также дополнительно подвергнуты тщательной обработке в ультразвуковой ванне во избежание перекрестной контаминации образцов наночастицами.

5.2.1.2. Для растительных организмов.

Следует приготовить следующие растворы:

- 0,1 моль/дм^3 буфер Соренсена (pH = 7,2—7,4):
  раствор А – 0,1 М KH_2PO_4 – 13,6 г на 1 дм^3 дистиллированной H_2O;
  раствор Б – 0,1 М Na_2HPO_4 – 14,2 г на 1 дм^3 дистиллированной H_2O;
  смешать 3 части раствора А с 7 частями раствора Б;
  добавить 15 г/дм^3 сахарозы;
- 2,5 % глутарового альдегида, 15 г/дм^3 сахарозы в буфере Соренсена (0,1 моль/дм^3).

5.2.2. Процедура отбора и фиксации проб

Отбор проб осуществляется как у животных (растений), исследуемых на наличие патологий, вызванных наночастицами, так и у контрольной группы животных (растений), не контактировавших с искусственными наночастицами. Каждая (исследуемая и контрольная) группа животных (растений) должна включать не менее 5 особей (растений). Отбор проб следует начинать с контрольной группы животных (растений).

5.2.2.1. Животные организмы.

Вскрытие или взятие биопсии у животного осуществляют согласно стандартным операционным процедурам, принятым в учреждении, проводящем пробоотбор.

Если применяют метод вскрытия, вначале максимально полно отбирают кровь из нижней полой вены, чтобы избежать внутриполостного перераспределения наночастиц с потоком крови. Затем последовательно выделяют:

- органы шеи (трахею, надгортанник, щитовидную железу, паратрахеальные, бифуркационные лимфатические узлы);
- органы грудной клетки (пищевод, легкие, сердце);
- органы брюшной полости (печень, селезенку, желудок, поджелудочную железу, кишечник, надпочечники, почки), при необходимости также мочевой пузырь, семенники или матку с придатками;

• после вскрытия черепной коробки животного извлекают головной мозг и гипофиз.

Выделенный орган помещают в чашку Петри с фосфатно-солевым буфером pH 7,2—7,4, температура 37 °С и промывают от крови. Желудок и кишечник освобождают от содержимого и тщательно промывают фосфатно-солевым буфером pH 7,2—7,4, температура 37 °С. Промывку органов следует осуществлять по возможности очень быстро.

На данном этапе необходимо дать макроскопическую характеристику изымаемых органов, описав их состояние по следующим параметрам: размеры (для всех органов), вес (для всех органов), форма (указать типичная или описать наблюдаемые отклонения от нормы), цвет (указать типичный или описать наблюдаемые отклонения от нормы), структура органа (указать «без патологий» или отметить наличие отклонений от нормы, описав их). Данный анализ проводит специалист, обладающий соответствующей квалификацией.

Для приготовления срезов тканей для электронной микроскопии из органа острой бритвой вырезают фрагменты размером 1 × 1 × 1 мм (по шесть фрагментов от каждого органа одного животного). Из таких тканей и органов, как мышцы, печень и других железистых органов, фрагменты могут быть вырезаны произвольно. Из таких органов, как сердце, мозг, почка, фрагменты отбирают с учетом анатомии и гистоморфологии каждого органа, например, отдельно из областей коркового и мозгового вещества почки, из областей предсердий или желудочков сердца и так далее. Образцы кожи и определенных отделов желудочно-кишечного тракта требуют ориентации при фиксации. Для этого поперечные срезы длиной 1—2 мм, извлеченные из этих органов, прикладывают на небольшие кусочки бумаги и в таком виде помещают в фиксатор.

Фрагменты органов и тканей пинцетом переносят во флаконы (стеклянные или полиэтиленовые, объем 8—12 $см^3$) с фиксирующим раствором (2,5 % глутарового альдегида, 2 % формалина в фосфатно-солевом буфере pH 7,2—7,4). Однотипные пробы из одного органа от одного животного помещают в один флакон. Фиксирующий раствор должен полностью покрывать фрагменты органов. Рекомендуемое отношение объема фиксатора к погруженной в него ткани – не менее 10/1. Фрагменты органов и тканей должны находиться в фиксирующем растворе не менее 1,5—2,0 ч. Допускается длительное (до 2—6 месяцев) хранение проб в фиксирующем растворе при температуре 4 °С. Нельзя допускать замораживания раствора с образцами, так как образующиеся кристаллы льда повреждают нормальную структуру ткани. Точное соблюдение протокола фиксации помогает избежать артефактных измене-

ний структуры тканей и неверной интерпретации данных, получаемых методом ПЭМ.

5.2.2.2. Растительные организмы.

При отборе растений в природных условиях их необходимо выкопать из почвы с корнем, желательно с минимальными повреждениями, тщательно отмыть от земли, пронумеровать и поместить в контейнер (каждый вид растений в отдельный контейнер). По возможности следует отбирать молодые растения. У старых растений выделяют наиболее молодые органы.

Затем у каждого растения нужно отрезать лезвием или скальпелем следующие участки:

• у корней отрезать кончики основного и боковых корней (1 см), а также зоны основания каждого корня (участки структурного перехода корня в стебель – около 1 см);

• у листьев отрезать зону эпикотиля, то есть основание колеоптиля, первого листа и стебля.

Отрезанные образцы перенести в чашки Петри, еще раз отмыть в воде. При отборе лабораторных растений (проростков) выделенные органы проростков ополаскивают в воде и помещают непосредственно в фиксатор.

На данном этапе необходимо провести первое описание состояния изымаемых частей растений, обращая внимание на изменения макроскопических характеристик: размеры и форма корней и листьев, наличие в них макроскопических изменений (указать отсутствие изменений или описать наблюдаемые изменения), цвет отдельных частей растений (указать отсутствие отклонений от нормы или описать наблюдаемые изменения цвета).

Каждую пробу, взятую у растения, рекомендуется дополнительно разрезать на части для лучшего проникновения фиксатора. Пробы пинцетом переносят в стеклянные или полиэтиленовые флаконы объемом 8—12 $см^3$ с плотно закрывающейся крышкой. Однотипные пробы из одного органа от одного растения помещают в один флакон.

Чтобы минимизировать проникновение в ткани растений пузырьков воздуха, препятствующих эффективному проникновению фиксатора и снижающих качество получаемых образцов, при помощи медицинского шприца вручную откачивают воздух из вырезанных участков. Для этого образцы тканей помещают в медицинский шприц, наполовину заполняют шприц фиксирующим раствором, отверстие шприца зажимают пальцем и, оттягивая поршень вверх, откачивают воздух из образцов. Эту процедуру повторяют несколько раз, и ее цель заключается в

устранении пузырей воздуха из тканей растений. Воздушные пузыри препятствуют равномерной пропитке ткани фиксирующим раствором и вызывают формирование полостей, из-за чего ультратонкие срезы крошатся при изготовлении. После этой процедуры образцы каждого вида от одной объединенной пробы снова помещают в отдельный пенициллиновый флакон или контейнер с фиксирующим раствором.

Пробы заливают десятикратным объемом фиксирующего раствора (2,5 % глутарового альдегида, 15 г/дм^3 сахарозы в 0,1 моль/дм^3 буфере Соренсена, pH = 7,2—7,4). Продолжительность фиксации должна быть не менее 24 ч. Допускается длительное (до 12 месяцев) хранение проб в фиксирующем растворе при температуре 4 °С.

5.3. Подготовка проб к анализу методом ПЭМ

Подготовка проб для анализа структурных изменений в изучаемых образцах выполняется с контрастированием клеточных и тканевых структур тетраоксидом осмия, уранилацетатом и цитратом свинца, как описано ниже (пункт 5.3.3).

Подготовка проб для анализа присутствия экзогенных наночастиц в областях со структурными изменениями выполняется с контрастированием клеточных и тканевых структур тетраоксидом осмия, как описано ниже (пункт 5.3.2).

Пробоподготовка образцов, взятых из изучаемой и контрольной групп, должна выполняться идентично.

5.3.1. Подготовка реактивов и материалов к использованию в процедуре пробоподготовки

В связи с применением агрессивных растворителей на всех этапах процедуры пробоподготовки следует использовать стеклянную лабораторную посуду. Работы необходимо проводить в вытяжном шкафу, соблюдая технику безопасности при работе с токсическими веществами. Если иное не указано, то растворы готовят, как описано в МР 1.2.2641—10 «Определение приоритетных видов наноматериалов в объектах окружающей среды, пищевых продуктах и живых организмах» (раздел 5.1.3.3).

Для проб животного происхождения готовят:

- 0,1 моль/дм^3 раствор фосфорно-солевого буфера состава 0,02 моль/дм^3 KH_2PO_4, 0,08 моль/дм^3 K_2HPO_4, pH 7,2—7,4, 0,88 % (масса/объем) KCl;
- водные растворы этанола с концентрациями 50, 60, 70, 80 %.

Для проб растительного происхождения готовят:

- 0,1 моль/дм^3 буфер Соренсена с сахарозой (15 г/дм^3);

• водные растворы этанола с концентрациями 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 %.

Для проб животного и растительного происхождения готовят также:

• 1 %-й раствор OsO_4 в 0,1 моль/дм^3 фосфатно-солевом буфере pH 7,2—7,4;

• смеси ацетона и эпоксидной смолы (Эпон 812 или его аналог) в объемных соотношениях 3 : 1, 1 : 1, 1 : 3;

• водный раствор цитрата свинца по Рейнольдсу (2,66 % нитрата свинца ($Pb(NO_3)_2$) и 3,52 % цитрата натрия ($Na_3C_6H_5O_7$), pH 12 ± 1) или используют готовый раствор цитрата свинца;

• 2 %-й раствор уранилацетата в 70 %-м этаноле;

• заливочную эпоксидную смесь согласно рекомендациям производителя или следующим образом. Смешивают эпоксидную смолу (Эпон 812 или его аналог), додецилянтарный ангидрид и метилэндиковый ангидрид в объемном соотношении 13 : 8 : 7. В качестве катализатора полимеризации к смеси добавляют тридиметиламинофенол в концентрации порядка 1 % по весу. Следует учесть, что оптимизация твердости полимерного блока может потребовать экспериментального подбора точных пропорций смолы и катализатора. В качестве заливочных контейнеров допускается использовать специальные полипропиленовые или полиэтиленовые капсулы, тефлоновые платы с лунками или фармацевтические блистеры для таблеток;

• бленды или сеточки, покрытые формваровой пленкой. Процедура их приготовления описана в МР 1.2.2641—10 «Определение приоритетных видов наноматериалов в объектах окружающей среды, пищевых продуктах и живых организмах» (разделы 5.1.3.3.12, 5.1.5.4).

5.3.2. Методика подготовки проб с контрастированием тетраоксидом осмия

5.3.2.1. Животные организмы

Каждую пробу отмывают от фиксатора, погружая в 2 см^3 0,1 М фосфатного солевого раствора pH 7,2—7,4 (три раза по 5 мин при комнатной температуре).

Образцы контрастируют и дополнительно фиксируют 1 % раствором тетраоксида осмия (OsO_4) в 0,1 М фосфатном буфере pH 7,2—7,4 в течение 2 ч.

Образцы промывают в 0,1 М фосфатном солевом растворе pH 7,2—7,4 2—4 раза до получения прозрачного смыва.

Проводят обезвоживание образцов в серии растворов этанола возрастающих концентраций. Для этого пробы обрабатывают 2 $см^3$ каждого из спиртовых растворов в следующем порядке:

- 50 %-м этанолом в течение 15 мин при 4 °С (процедуру повторяют 3—4 раза по 5 мин до получения визуально прозрачного водно-спиртового смыва);
- 60 %-м этанолом в течение 20 мин при 4 °С (2 раза);
- 70 %-м этанолом в течение 12 ч при 4 °С (оставляют на ночь в холодильнике);
- 80 %-м этанолом в течение 20 мин при комнатной температуре;
- 96 %-м этанолом в течение 20 мин при комнатной температуре.

Пробы обрабатывают 100 % ацетоном для полного вытеснения этанола (3 раза по 45 мин при комнатной температуре).

Последовательно пропитывают образцы в смесях ацетона и эпоксидной смеси, взятых в следующих соотношениях:

- 3 : 1 (2 ч при комнатной температуре);
- 1 : 1 (2 ч при комнатной температуре);
- 1 : 3 (12 ч при комнатной температуре);
- 100 %-я эпоксидная смесь (2 ч при комнатной температуре).

Из последней смеси образцы стеклянной палочкой переносят в заливочные контейнеры с чистой эпоксидной смесью с добавленным катализатором и ставят на полимеризацию. Эпоксидные блоки с образцами полимеризуют в два этапа в течение:

- 24 ч при 37 °С;
- 48 ч при 60 °С.

Далее необходимо приготовить:

- эпоксидные блоки с образцами, как описано в разделе 5.3.4;
- срезы, как описано в разделе 5.3.5.

5.3.2.2. Растительные организмы.

Каждую пробу отмывают от фиксатора, погружая в 2 $см^3$ 0,1 $моль/дм^3$ раствора Соренсена pH 7,2—7,4 (однократно в течение 20—30 мин при комнатной температуре).

Образцы контрастируют и дополнительно фиксируют 1 %-м раствором тетраоксида осмия (OsO_4) в фосфатном буфере pH 7,2—7,4 в течение 2 ч.

Проводят обезвоживание образцов в серии растворов этанола возрастающих концентраций. Для этого пробы обрабатывают 2 $см^3$ каждого из спиртовых растворов в следующем порядке:

• 10 %-м этанолом в течение 30 мин при 4 °С (процедуру повторяют 3—4 раза до получения визуально прозрачного водно-спиртового смыва);

• 20 %-м этанолом в течение 30 мин при 4 °С;

• 30 %-м этанолом в течение 30 мин при 4 °С;

• 40 %-м этанолом в течение 30 мин при 4 °С;

• 50 %-м этанолом в течение 30 мин при 4 °С;

• 60 %-м этанолом в течение 30 мин при 4 °С;

• 80 %-м этанолом в течение 30 мин при комнатной температуре;

• 96 %-м этанолом в течение 30 мин при комнатной температуре.

Пробы обрабатывают 100 % ацетоном для полного вытеснения этанола (3 раза по 45 мин при комнатной температуре).

Последовательно пропитывают образцы в смесях ацетона и эпоксидной смеси, взятых в следующих соотношениях:

• 3 : 1 (24 ч при комнатной температуре);

• 1 : 1 (24 ч при комнатной температуре);

• 1 : 3 (24 ч при комнатной температуре);

• 100 %-я эпоксидная смесь (2 ч при комнатной температуре).

Из последней смеси образцы стеклянной палочкой переносят в заливочные контейнеры с чистой эпоксидной смесью и ставят на полимеризацию. Эпоксидные блоки с образцами полимеризуют в два этапа в течение:

• 24 ч при 37 °С;

• 48 ч при 60 °С.

Далее необходимо приготовить:

• эпоксидные блоки с образцами, как описано в разделе 5.3.4;

• срезы, как описано в разделе 5.3.6.

5.3.3. Подготовка проб, контрастированных тетраоксидом осмия, уранилацетатом и цитратом свинца

5.3.3.1. Подготовка проб животного происхождения

Каждую пробу отмывают от фиксатора, погружая в 2 $см^3$ 0,1 М фосфатного солевого раствора pH 7,2—7,4 (три раза по 5 мин при комнатной температуре).

Образцы контрастируют и дополнительно фиксируют 1 %-м раствором тетраоксида осмия (OsO_4) в 0,1 М фосфатном буфере pH 7,2—7,4 в течение 2 ч.

Образцы промывают в 0,1 М фосфатном солевом растворе pH 7,2—7,4 2—4 раза до получения прозрачного смыва.

Проводят обезвоживание образцов в серии растворов этанола возрастающих концентраций. Для этого пробы обрабатывают 2 $см^3$ каждого из спиртовых растворов в следующем порядке:

- 50 %-м этанолом в течение 15 мин при 4 °С (процедуру повторяют 3—4 раза по 5 мин до получения визуально прозрачного водно-спиртового смыва);
- 60 %-м этанолом в течение 20 мин при 4 °С (2 раза);
- 2 %-м раствором уранилацетата в 70 %-м этаноле в течение 12 ч при 4 °С;
- 80 %-м этанолом в течение 20 мин при 4 °С;
- 96 %-м этанолом в течение 20 мин при комнатной температуре.

Пробы обрабатывают 100 %-м ацетоном для полного вытеснения этанола (3 раза по 45 мин при комнатной температуре).

Последовательно пропитывают образцы в смесях ацетона и эпоксидной смеси, взятых в следующих соотношениях:

- 3 : 1 (2 ч при комнатной температуре);
- 1 : 1 (2 ч при комнатной температуре);
- 1 : 3 (12 ч при комнатной температуре);
- 100 %-я эпоксидная смесь (2 ч при комнатной температуре).

Из последней смеси образцы стеклянной палочкой переносят в заливочные контейнеры с чистой эпоксидной смесью и ставят на полимеризацию. Эпоксидные блоки с образцами полимеризуют в два этапа в течение:

- 24 ч при 37 °С;
- 48 ч при 60 °С.

Далее необходимо приготовить:

- эпоксидные блоки с образцами, как описано в разделе 5.3.4;
- срезы, как описано в разделе 5.3.6;
- провести дополнительное контрастирование срезов уранилацетатом и цитратом свинца, как описано в разделе 5.3.7.

5.3.3.2. Подготовка проб растительного происхождения.

Каждую пробу отмывают от фиксатора, погружая в 2 $см^3$ 0,1 М раствора Соренсена pH 7,2—7,4 (однократно в течение 20—30 мин при комнатной температуре).

Образцы контрастируют и дополнительно фиксируют 1 %-м раствором тетраоксида осмия (OsO_4) в фосфатном буфере pH 7,2—7,4 в течение 2 ч.

Проводят обезвоживание образцов в серии растворов этанола возрастающих концентраций. Для этого пробы обрабатывают 2 $см^3$ каждого из спиртовых растворов в следующем порядке:

- 10 %-м этанолом в течение 30 мин при 4 °С (процедуру повторяют 3—4 раза, до получения визуально прозрачного водно-спиртового смыва);
- 20 %-м этанолом в течение 30 мин при 4 °С;
- 30 %-м этанолом в течение 30 мин при 4 °С;
- 40 %-м этанолом в течение 30 мин при 4 °С;
- 50 %-м этанолом в течение 30 мин при 4 °С;
- 60 %-м этанолом в течение 30 мин при 4 °С;
- 2 %-м раствором уранилацетата в 70 % этаноле в течение 12 ч при 4 °С;
- 80 %-м этанолом в течение 30 мин при 4 °С;
- 96 %-м этанолом в течение 30 мин при комнатной температуре.

Пробы обрабатывают 100 %-м ацетоном для полного вытеснения этанола (3 раза по 45 мин при комнатной температуре).

Последовательно пропитывают образцы в смесях смолы и ацетона, взятых в следующих соотношениях:

- 1 : 3 (24 ч при комнатной температуре);
- 1 : 1 (24 ч при комнатной температуре);
- 3 : 1 (24 ч при комнатной температуре);
- 100 %-м эпоксидная смесь (2 ч при комнатной температуре).

Из последней смеси образцы стеклянной палочкой переносят в заливочные контейнеры с чистой эпоксидной смесью с добавлением катализатора полимеризации и ставят на полимеризацию. Эпоксидные блоки с образцами полимеризуют в два этапа в течение:

- 24 ч при 37 °С;
- 48 ч при 60 °С.

Далее необходимо приготовить:

- эпоксидные блоки с образцами, как описано в разделе 5.3.4;
- срезы, как описано в разделе 5.3.6;
- провести дополнительное контрастирование срезов уранилацетатом и цитратом свинца, как описано в разделе 5.3.7.

5.3.4. Формирование эпоксидных блоков

Из полимеризованных эпоксидных заливок лобзиком выпиливают прямоугольный участок сечением 2 × 2 мм и высотой 5 мм. При использовании капсул для заливки выпиливание блока не требуется. Полученные блоки закрепляют в специальном держателе и острой бритвой зата-

чивают со стороны биоматериала в форме усеченной пирамиды. Все манипуляции контролируют визуально, используя бинокулярный микроскоп.

5.3.5. Приготовление полутонких срезов из эпоксидных блоков

Для оценки выраженности структурных изменений тканей и органов животных можно рекомендовать предварительный анализ залитого в эпон материала на полутонких срезах (до получения ультратонких срезов). При изготовлении ультратонких срезов таких органов, как кишка может возникнуть необходимость провести ориентацию среза. Полутонкие срезы (толщиной 1—2 мкм) изготавливают на ультрамикротоме, оборудованном стеклянным (реже алмазным) ножом.

Полутонкие срезы окрашивают толуидиновым синим по следующей методике:

• срезы переносят на каплю воды или 10 %-го ацетона, помещенную на предметное стекло;

• срез приклеивают к стеклу, быстро проведя стекло через пламя газовой горелки (спиртовки). Срез должен хорошо расправиться и прочно прикрепиться на стекле, если жидкость, в которую он помещен, не испаряется слишком быстро;

• на срез наносят 2 капли 1 %-го водного раствора толуидинового синего и 2 капли 1 %-го водного раствора буры (тетраборнокислого натрия). Бура повышает величину pH раствора до 9;

• стекло проводят 10—12 раз над пламенем газовой горелки, не допуская закипания раствора красителя;

• стекло осторожно промывают под струей горячей водопроводной воды (если промывать холодной водой – стекло лопнет).

Можно также опустить препарат на 30 мин—2 ч в раствор, составленный из равных частей 1 %-х растворов толуидинового синего и буры. Качество окрашивания зависит от партии применяемого красителя и заливочного материала. Толуидиновый синий в приведенной прописи может быть заменен другими красителями – метиленовым синим, сафранином О или тионином. Полутонкие срезы исследуют с помощью светового микроскопа с увеличением 400× или 1 000×.

5.3.6. Приготовление ультратонких срезов из эпоксидных блоков

С помощью ультрамикротома, оборудованного стеклянным или алмазным ножом, получают срезы толщиной 40—80 нм. Для повышения статистической значимости результатов анализа из каждой пробы гото-

вят 4—6 серий срезов, отстоящих друг от друга не менее чем на 100 мкм.

Случайно выбранные срезы (по 1—2 из каждой серии) вылавливают на бленды (или сетки), покрытые формваровой пленкой, и высушивают не менее 1 ч. С помощью электронного микроскопа необходимо удостовериться, что на отобранных срезах присутствует ткань.

5.3.7. Дополнительное контрастирование срезов уранилацетатом и цитратом свинца

Ультратонкие срезы дополнительно контрастируют уранилацетатом. Для этого бленды помещают срезами вниз на каплю (30—40 мм^3) 5 %-го водного раствора уранилацетата, нанесенную на кусочек парафильма в чашке Петри, и инкубируют 40 мин в темноте при температуре 37 °С. Затем образец тщательно промывают дистиллированной водой и обязательно высушивают.

Контрастирование цитратом свинца проводят в течение 10—15 мин при комнатной температуре, нанеся срез на каплю (30—40 мм^3) водного раствора цитрата свинца по Рейнольдсу. Для предотвращения выпадения в осадок солей свинца в чашку Петри необходимо поместить гранулированный NaOH, избегая его прямого контакта с блендами (сетками). После окрашивания цитратом свинца срезы тщательно промывают и высушивают.

Процедуры контрастирования растворами уранилацетата и цитратом свинца проводят во влажной камере. Недостаточная влажность является причиной испарения растворов, выпадения в осадок солей металлов и, как следствие, загрязнения срезов и искажения результатов анализа.

VI. Порядок проведения измерений

6.1. Оборудование, необходимое для регистрации структурных изменений в ультратонких срезах тканей и органов

Для проведения анализа структурных изменений используют просвечивающий электронный микроскоп с компьютерным управлением. Параметры микроскопа, критические для обеспечения необходимой чувствительности, приведены в МР 1.2.2641—10 «Определение приоритетных видов наноматериалов в объектах окружающей среды, живых организмах и пищевых продуктах» (пункт 5.1.2). Наличие аналитических модулей, перечисленных в МР 1.2.2641—10 «Определение приоритетных видов наноматериалов в объектах окружающей среды, живых организмах и пищевых продуктах» (пункт 5.1.2), для анализа структурных изменений не требуется.

Предпочтительно использование для регистрации результатов измерений ПЗС-камеры, обеспечивающей запись изображений в цифровом виде, однако, возможно использование плёночной камеры. В случае регистрации результатов с помощью плёночной камеры необходим также фотосканер, позволяющий получать оцифрованные изображения с негативов.

Если необходимо дополнительно провести достоверное выявление и идентификацию искусственных наночастиц в органах и тканях с выраженной патологией, то электронный микроскоп должен быть оборудован специальными модулями для аналитической электронной микроскопии, как описано в МР 1.2.2641—10 «Определение приоритетных видов наноматериалов в объектах окружающей среды, живых организмах и пищевых продуктах» (пункт 5.1.2).

6.2. Порядок регистрации структурных изменений, вызываемых искусственными наночастицами в клетках, тканях и органах методом ПЭМ

Если необходимо проанализировать только структурные изменения, вызываемые искусственными наночастицами, то необходимо проводить полное контрастирование всего биологического материала.

Если предполагается одновременно проанализировать структурное состояние клеток и тканей (на уровне грубых изменений, без анализа особенностей состояния отдельных органелл) и оценить присутствие и локализацию экзогенных наночастиц (как правило, достаточно крупных агрегатов или скоплений, размером не менее 200—500 нм), то проводится контрастирование только тетраоксидом осмия в проводке всего биологического материала. При необходимости эти же ультратонкие срезы могут быть докрашены уранилацетатом и цитратом свинца и подвергнуты повторному ПЭМ-анализу.

Если необходимо одновременно провести подробный ПЭМ-анализ структурных изменений на уровне организации ткани, клеток и отдельных клеточных органелл, а также достоверно определить наличие экзогенных наночастиц, то с этой целью формируют две равноценные в качественном и количественном отношении группы органов. Одну группу обрабатывают без применения контрастирующих агентов (для анализа присутствия наночастиц), тогда как для пробоподготовки второй группы используют тетраоксид осмия, уранилацетат и цитрат свинца (для регистрации патологических изменений). Помимо того, вводят две контрольные группы препаратов, которые обрабатывают аналогично опытным пробам. Анализ контрольных образцов является необходимым ус-

ловием исключения ложноположительных результатов, связанных с артефактами пробоподготовки. Такой подход необходимо применять при работе как с животными, так и с растительными объектами.

6.3. Получение изображений структурных изменений на ультратонких срезах тканей и органов

Прежде чем проводить анализ образцов тканей и органов на предмет наличия структурных изменений, необходимо получить характерные изображения контрольных образцов тканей и органов или иметь атлас соответствующих ПЭМ-изображений. Оператору необходимо визуально ознакомиться с морфологией нормальной структуры клеток и тканей анализируемого органа животных и растений путем просмотра самих контрольных образцов или их репрезентативных микрофотографий. В последнем случае принципиально важно, чтобы изображения были получены с аналогичных мест пробоотбора и на оборудовании, которое используется для анализа, или идентичном. Для составления обоснованного заключения о наличии и характере структурных изменений в срезах тканей и органов необходимо анализировать ультраструктурные срезы образцов:

- подготовленных с применением контрастирования биологического материала солями тяжелых металлов,
- контрольной группы, не подвергавшейся воздействию экзогенных искусственных наночастиц.

Для ультраструктурного анализа ПЭМ-методом необходимо, в первую очередь, использовать срезы тех органов, которые отличаются изменениями на макроскопическом или светооптическом уровнях, зафиксированными при проведения забора образцов или при выявлении структурных изменений на полутонких срезах. Имеющиеся макроскопические изменения уже свидетельствуют о присутствии в данных органах искусственных наночастиц и/или структурных изменений.

Также выбор первоочередных органов для проведения ПЭМ-анализа на выявление ультраструктурных изменений должен определяться способом введения искусственных наночастиц, частотой и временем их введения (острый или хронический эксперимент). При работе с животными организмами при краткосрочном пероральном введении наночастиц с питьевой водой или рационом следует анализировать, прежде всего, кишечник. В кишечнике анализируют ультраструктуру энтероцитов, в которых обращают особое внимание на микроворсинки и апикальную область цитоплазмы. В анализ также должны быть включены лимфатические узлы брыжейки и селезенка. В случаях однократного

или многократного перорального введения наночастиц на длительный срок анализируются структурные изменения во всех основных органах жизнеобеспечения.

При введении искусственных наночастиц через дыхательные пути необходимо анализировать, в первую очередь, лёгкие.

При внутрибрюшинном краткосрочном введении необходимо анализировать органы брюшной полости: печень, селезёнку, внутрибрюшные лимфатические узлы, почки, кишечник.

Головной мозг анализируется отдельно, независимо от способа введения искусственных наночастиц, так как проблема проницаемости гемато-энцефалического барьера представляет особый интерес.

Взаимодействие растений с наночастицами может происходить в почве (корневая система), в воздухе (стебли, листья, плоды) и при контакте с водой (корни, стебли, листья, плоды).

При работе с растительными организмами в экспериментальных условиях анализируются те органы растений, которые подвергались воздействию наночастиц. Так, при проращивании корешков в присутствии искусственных наночастиц следует первоначально анализировать корневую систему, а при нанесении наночастиц в виде спрея на листья необходимо проанализировать именно эти органы растения.

Чтобы сократить время для проведения ПЭМ, рекомендуется провести предварительный анализ полутонких срезов, приготовленных из залитого в эпон материала и окрашенных толуидиновым синим. При работе с тканями животных на таких срезах анализируют:

- нарушение общей структуры ткани;
- нарушение соотношения между площадью, занимаемой клетками, и внеклеточным матриксом;
- появление очагов воспаления в виде скоплений лейкоцитов;
- нарушение целости сосудистой стенки и инфильтрация окружающей ткани эритроцитами и лейкоцитами;
- присутствие зон некроза (набухание клеток и ядер, нарушение их целостности);
- присутствие апоптотических клеток, в которых наблюдается характерная для таких клеток конденсация хроматина в виде полулуний на периферии ядра;
- сжатие клеток и ядер;
- вакуолизацию цитоплазмы клеток;
- присутствие в клетках и тканях крупных скоплений наночастиц;

• присутствие ядерной патологии в виде пикноза ядер, полиморфных ядер, микроядер, многоядерности. При этом следует учитывать, что для мегакариоцитов костного мозга полиморфность ядра является нормой. Также нормой является двуядерность клеток печени, слюнных желез, кардиомиоцитов.

Те органы и ткани, в которых на полутонких срезах обнаруживаются выраженные структурные нарушения, следует анализировать на ультратонких срезах методом ПЭМ в первую очередь.

При проведении ПЭМ-анализа необходимо вначале оценить состояние объекта на обзорных увеличениях электронного микроскопа (3 000—10 000) количество и качество срезов, наличие в составе эпона ткани, дать описание анализируемого материала (какой орган, раздел органа, его однородность, какие клетки присутствуют на срезах ткани), оценить качество фиксации и масштабность имеющихся очагов деструктивных изменений. Оператор получает серию репрезентативных ПЭМ-изображений, дающих представление об общем состоянии объекта. По результатам предварительного анализа имеющихся ультратонких срезов оператор выделяет те места, которые требуют детального анализа.

Затем срезы просматривают на средних увеличениях (10 000—20 000), проводя анализ на уровне крупных тканевых и клеточных компартментов (цитоплазма, ядро, межклеточный материал). Выбор полей зрения осуществляют целенаправленно, фокусируя микроскоп на тех участках среза, на которых, по оценке оператора, присутствуют изменения.

6.3.1. Животные организмы

6.3.1.1. При исследовании образцов ткани животного происхождения анализируют следующие ультраструктурные изменения:

• дезорганизацию общей архитектуры ткани (изменение соотношения между клеточным компонентом и внеклеточным матриксом, изменение в расположении этих элементов ткани);

• появление в большом количестве эритроцитов и лейкоцитов;

• нарушение целостности эндотелиальной стенки сосудов, свидетельствующее о развитии воспалительного процесса;

• дезорганизацию или гипертрофию коллагеновых и эластических волокон;

• уменьшение или увеличение выраженности гликозамингликанов, что свидетельствует о нарушении работы клеточных систем, обеспечивающих гомеостаз внеклеточного матрикса;

• увеличение или уменьшение числа стромальных элементов;

• появление избытка жировых клеток, что может говорить о нарушении процессов дифференцировки, характерных для клеток данной ткани и органа.

6.3.1.2. При исследовании аномалий в интерфазных клетках анализируют следующие изменения:

• набухание, сморщивание, резкое изменение формы клеток, нарушение целости плазматической мембраны;

• в состоянии цитоплазмы и ядра оценивают признаки, свидетельствующие о развивающейся гибели клеток (апоптоза, некроза, аутофагической гибели, онкоза, пироптоза, параптоза, постнекротического апоптоза, энтоза); описание основных морфологических признаков этих состояний приведено в прилож. 2;

• в состоянии плазматической мембраны анализируют: наличие нарушений в целости мембраны; присутствие межклеточных простых и специализированных контактов (оценивают нарушение межклеточных взаимодействий, гипертрофию специализированных контактов); изменение поверхности клетки, которое может выражаться в появлении многочисленных филоподий, псевдоподий, так называемых нанотубул. Следует учитывать, что возможно ошаривание клетки, сглаживание клеточной поверхности, арборизация – изменение морфологии клетки, связанное с появлением сложнооформленных выростов цитоплазмы;

• в состоянии митохондрий анализируют: наличие изменений в организации митохондрий (набухание, конденсация матрикса, исчезновение или гипертрофическое развитие крист), нарушение целостности наружной и внутренней мембран (может говорить об изменении уровня синтеза АТФ); наличие фрагментации или слияния митохондрий, появление гигантских митохондрий, исчезновение митохондрий в периферической области цитоплазмы и их концентрирование в околоядерной области; скопление митохондрий в одной из областей цитоплазмы, появление деградирующих митохондрий внутри гигантской вакуоли, локализация митохондрий внутри аутофагосом, появление внутри митохондрий кристаллических или фибриллярных структур. При анализе следует учитывать тканеспецифическую организацию митохондрий. Так, в кардиомиоцитах в структуре митохондрий присутствует множество крист, а в митохондриях гепатоцита крист сравнительно немного. Появление многочисленных крист в митохондриях гепатоцита может свидетельствовать о структурных изменениях этого компонента клетки. В то же время в кардиомиоцитах свидетельством изменений в митохондриях будет дезорганизация или деградация крист;

• в состоянии эндоплазматического ретикулума анализируют набухание, гипертрофическое развитие, деградацию, появление электроноплотного содержимого в просвете цистерн, отделение рибосом от мембран;

• в состоянии гладкого эндоплазматического ретикулума анализируют наличие гипертрофического развития цистерн или их деградацию до везикул;

• в состоянии аппарата Гольджи анализируют наличие распада на отдельные диктиосомы, набухание цистерн, их деградацию или гипертрофию, появление электроноплотного содержимого, изменение локализации и так далее. При анализе следует учесть тканеспецифические особенности строения аппарата Гольджи. В энтероцитах аппарат Гольджи присутствует в виде единого комплекса диктиосом в апикальной части цитоплазмы. В то же время в гепатоцитах многочисленные стопки цистерн аппарата Гольджи располагаются как в апикальной части клетки, обращенной к желчному капилляру, так и в базальной части, обращенной к пространству Диссе. Поэтому рассыпание аппарата Гольджи на отдельные диктиосомы в энтероцитах свидетельствует о нарушении структуры клеток, а в гепатоцитах таким нарушением может оказаться возникновение единого комплекса в одной из зон цитоплазмы или распад аппарата Гольджи на отдельные везикулы;

• в состоянии лизосомного компартмента анализируют: наличие гипертрофии или деградации лизосом; изменение локализации лизосом (например, перераспределение из области клеточного центра на периферию клетки или в клеточные отростки); появление большого числа вторичных лизосом, аутофаголизосом, гигантских лизосом, содержащих компоненты цитоплазмы (диктиосомы аппарата Гольджи, цистерны эндоплазматического ретикулума, полисомы, митохондрии), а также миелиноподобные структуры и электроноплотные компоненты;

• в состоянии пероксисом анализируют наличие признаков деградации или резкое увеличение их числа;

• анализируют появление усиленной вакуолизации цитоплазмы, сопровождающееся формированием небольшого числа очень крупных вакуолей или появлением множества мелких вакуолей;

• в состоянии элементов цитоскелета анализируют: изменение локализации; разборку отдельных элементов цитоскелета; коллапс элементов цитоскелета (промежуточных филаментов); появление дополнительных цитоскелетных структур, например, дополнительных центросом и так далее. При анализе следует учесть тканеспецифическую организа-

цию элементов цитоскелета. В энтероцитах крипты кишки можно видеть центросому, локализованную в околоядерной области апикальной части клетки. Центросома такой клетки служит центром организации микротрубочек и в ней присутствуют две центриоли. Но в энтероцитах вершины ворсинки кишки центросома деградирует и можно увидеть единичные центриоли, расположенные случайным образом в апикальной части цитошлазмы. Микротрубочки при этом отходят от апикальной части плазматической мембраны. Это указывает на то, что деградация центриолей свидетельствует о нарушении структуры энтероцитов крипты кишки, но является нормой для энтероцитов вершины ворсинки;

• в состоянии ядра анализируют: изменение степени конденсированности хроматина, а именно, появление избыточного количества конденсированного хроматина или деконденсация хроматина, нарушение характерного для каждого типа клеток рисунка общей конденсации ядра, что в любом случае свидетельствует об изменении уровня транскрипции; присутствие или отсутствие ядрышек; изменение размеров и ультраструктуры ядрышек (выраженность отдельных компонентов, таких, как гранулярный и фибриллярный компоненты, фибриллярные центры); появление так называемых кольцевых ядрышек; нарушение целостности ядерной оболочки; наличие инвагинаций ядерной оболочки; изменение правильной структуры ядерной оболочки (структурные изменения в наружной и внутренней мембранах); присутствие или отсутствие поровых комплексов; нарушение контактирования ядерной оболочки с хроматином и т. д. При анализе следует учесть, что в ядрах таких дифференцированных клеток, как гепатоциты, хроматин умеренно конденсирован. В плазматических клетках или в лимфоцитах степень конденсации хроматина ярко выражена, а в нейронах хроматин в основном деконденсирован. Поэтому для каждого из этих вариантов клеток признаками структурных изменений могут служить противоположные явления: для плазматических клеток - деконденсация хроматина, а для нейронов – его конденсация. Двуядерность характерна для гепатоцитов или для кардиомиоцитов, но является структурным нарушением для энтероцитов или кератиноцитов.

6.3.1.3. При исследовании митотических аномалий на разных стадиях митоза анализируют следующие структурные изменения:

• деконденсированное или гиперконденсированное состояния хромосом;

• неравномерность конденсации хромосом. Если на одних и тех же стадиях митоза (например, в метафазе) в клетках одной и той же ткани эти параметры отличаются, то можно утверждать, что в эксперимен-

тальных образцах регистрируются структурные изменения состояния хромосом, которые выражаются в нарушении их компактизации;

• нарушение в локализации хромосом в разных фазах митоза, например, формирование К-митотического варианта в промета- и метафазах, отставание отдельных хромосом в анафазе, появление межхромосомных мостов в анафазе;

• нарушение ультраструктуры полюсов веретена, которое может выражаться в изменении числа центриолей, в изменении их размеров, ориентации относительно друг друга, в изменении локализации центриолей; в появлении бесцентриолярных полюсов; в изменении выраженности перицентриолярного гало, в гипертрофическом увеличении или разборке астральных микротрубочек;

• нарушение в структуре кинетохоров хромосом, что может выражаться в дезорганизации кинетохора, в разборке кинетохорных микротрубочек;

• нарушение в локализации и числе разных категорий микротрубочек веретена;

• нарушение в структуре и локализации контрактильного кольца микрофиламентов, которое обеспечивает цитокинез;

• появление в постмитотической фазе многоядерных клеток и клеток с микроядрами. Такого рода нарушения свидетельствуют об изменениях генетического компонента клеток, т.е. указывают на полиплоидизацию клеток, на развитие хромосомной и генетической нестабильности.

6.3.2. Растительные организмы

6.3.2.1. Для того чтобы установить, вызывают ли наноматериалы структурные изменения в клетках растений, необходимо провести сравнительный анализ состояния клеток в исследуемой и контрольной группах растений. Сравнительный анализ, нацеленный на выявление структурных изменений в клетках и клеточных органеллах, необходимо проводить при исследовании клеток, входящих в состав одних и тех же органов и составляющих одну и ту же ткань растений.

Так, например, определяя структурные изменения, которые могли возникнуть при воздействии наночастиц в клетках корней, необходимо иметь в виду разнообразие тканей, составляющих корневую систему. Например, нельзя сравнивать активно секретирующие клетки корневого чехлика растений из контрольной группы с клетками проводящего пучка исследуемой группы, потому что для клеток этих тканей характерна разная морфология аппарата Гольджи и вакуолярной системы. Следовательно, для определения структурных изменений в исследуемых образ-

цах необходимо хорошо знать ультраструктурные особенности организации тех клеток, с которыми будет проводиться сравнение. Большинство клеток в составе органов и тканей растений находятся на стадии интерфазы, но в молодых растениях встречаются и митотически делящиеся клетки, на которые следует обращать особое внимание.

6.3.2.2. При исследовании интерфазных клеток анализируют следующие изменения:

• неравномерное или избыточное утолщение, истончение, искривление и перфорации клеточной стенки, обращая особое внимание на нехарактерные включения (это могут быть искусственные наночастицы, влияние которых определяется);

• морфологические проявления плазмолиза клеток, то есть отделение плазматической мембраны от клеточной стенки, сжатие цитоплазмы и вакуолей;

• изменение состояния матрикса митохондрий, которое может выражаться в сжатии (конденсации) или разрыхлении и набухании;

• исчезновение в митохондриях крист, расширение пространства между наружной и внутренней мембраной, нарушение целости наружной и внутренней мембран и целости самих митохондрий;

• набухание или сжатие стромы хлоропластов, набухание или деградацию гранн, расширение межмембранного пространства, нарушение целости всех мембран хлоропластов;

• фрагментацию цистерн, тотальное или локальное расширение цистерн ЭПР, отделение рибосом от поверхности ЭПР;

• следует учитывать, что в клетках растений нет лизосом, и их функции выполняют вакуоли, которые присутствуют во всех клетках, но их количество и размер значительно варьирует в зависимости от типа ткани. В клетках, для которых характерно незначительное количество мелких вакуолей (например, в клетках меристемы или эпидермиса корня), избыточное появление вакуолей в цитоплазме, повышение вакуолизации цитоплазмы (похоже на вспенивание цитоплазмы), замещение всего объема цитоплазмы вакуолями, указывает на нарушения структуры вакуолярной системы. В вакуолизированных клетках (например, в клетках мезенхимы листа) признаками структурных нарушений являются изменения состояния вакуолей, такие как редукция или сжатие вакуолей, конденсация содержимого вакуолей, появление в вакуолях остатков клеточных органелл, электронно-плотных включений, кристаллов и гранул. Размер, число, расположение и форма вакуолей в цитоплазме вакуолизированных клеток растений является вариабельным признаком,

который следует учитывать при выявлении структурных изменений. Эти параметры зависят не только от органа (корень или лист), но и от типа составляющих его клеток. Так, например, в клетках эпидермиса корня немногочисленные мелкие вакуоли неупорядоченно располагаются в цитоплазме, а в клетках колумеллы вакуоли крупные и, как правило, располагаются группами. Поэтому при анализе потенциальных структурных изменений, вызванных наночастицами, принципиально важно сравнивать состояние вакуолярной системы в клетках из одной и той же зоны органа;

• при анализе структуры аппарата Гольджи исследуют его размер, а именно, уменьшение или увеличение протяженности цистерн в составе диктиосом, уменьшение или увеличение расстояния между цистернами, размер и количество везикулярных элементов вокруг диктиосом. Следует учитывать, что состояние аппарата Гольджи варьирует в разных клетках растений, и зависит от их функциональной нагрузки. Так, например, в клетках корневого чехлика аппарат Гольджи будет выглядеть гипертрофированным по сравнению с аппаратом Гольджи клеток проводящих пучков корня. Если типичный для клеток чехлика аппарат Гольджи выявляется в клетках проводящих пучков растений, которые подвергались воздействию наночастиц, это указывает на нарушения морфологии аппарата Гольджи для клеток данного типа;

• в цитоплазме клеток анализируют появление специфических образований, которые называют мультивезикулярными и парамуральными тельцами. Эти структуры располагаются вблизи клеточной стенки и представляют собой скопления мелких пузырьков внутри более крупных мембранных структур, и их появление связывают с реакцией растительных клеток на стресс;

• при анализе состояния пероксисом регистрируют увеличение числа пероксисом, увеличение объема пероксисом, появление в пероксисомах кристаллов и гранул;

• в цитоплазме и в пероксисомах, хлоропластах, митохондриях анализируют появление стресс-гранул – электроноплотных гранулярных образований, состоящих из мРНК и белков;

• в ядре анализируют изменение соотношения между конденсированным и деконденсированным хроматином, нарушение целостности ядерной оболочки, степень выраженности инвагинаций ядерной оболочки, разрывы ядерной оболочки, нарушение контакта ядерной оболочки с хроматином;

• в состоянии ядрышка анализируют изменения в соотношении между разными структурными компонентами ядрышка (плотным фибриллярным компонентом, гранулярным компонентом, фибриллярными центрами), появление кольцевых ядрышек;

• появление нетипичных для нормальных клеток элементов цитоскелета, например, макротрубочек, гетерогенных паракристаллических тяжей и пучков, скоплений фибриллярного материала.

6.3.2.3. При исследовании митотически делящихся клеток анализируют следующие изменения:

• деконденсированное или гиперконденсированное состояние хромосом, неравномерность конденсации хромосом;

• хромосомные аномалии, а именно – фрагментация хромосом, хромосомные мосты, слипшиеся плечи хромосом;

• нарушение в локализации хромосом на разных фазах митоза, например, формирование К-митотического варианта в промета- и метафазах, отставание отдельных хромосом в анафазе, появление межхромосомных мостов в анафазе;

• нарушения в формировании фрагмопласта и клеточной пластинки при цитокинезе, а именно, фрагментация и искривление клеточной пластинки, неполная клеточная пластинка, отсутствие контакта новообразованной клеточной пластинки со стенкой материнской клетки и так далее;

• появление в постмитотической фазе полиплоидных ядер, микроядер и полиморфных ядер. Такого рода нарушения свидетельствуют об изменениях генетического компонента клеток, включая развитие хромосомной и генетической нестабильности;

• следует учитывать, что в митотических клетках активно функционируют ЭПР и аппарат Гольджи, поэтому на разных фазах митоза в клетках выявляются цистерны гранулярного ЭПР и диктиосомы аппарата Гольджи. По этому признаку растительные клетки отличаются от большинства животных клеток, для которых характерны разборка в митозе эндоплазматического ретикулума и аппарата Гольджи до везикул.

6.3.2.4. Для регистрации ПЭМ-изображений выбирают области, репрезентативные с точки зрения выраженности структурных изменений на уровне клеток и органелл. Изображения регистрируют при увеличениях, которые обеспечивают максимальную информативность при определении структуры анализируемой ткани, а также при анализе взаимного расположения внутриклеточных компонентов и их структурного состояния.

Любые признаки нарушения структуры должны быть зафиксированы, независимо от присутствия или отсутствия в данной области искусственных наночастиц.

Массив измеренных данных должен быть достаточным для оценки степени выраженности деструктивных изменений. Рекомендуется получить не менее 50 ПЭМ-изображений со всей совокупности срезов одного образца.

Для получения статистически достоверных результатов необходимо применение морфометрического анализа изображений.

По окончании измерений следует конвертировать файлы с полученными изображениями из внутреннего формата программного обеспечения к прибору в общедоступные форматы (.jpeg или .tiff, 8-битный), не допуская изменения исходного динамического диапазона в результате автоматического нормирования интенсивности на максимум.

VII. Порядок анализа данных и представление результатов

7.1. Анализ данных

Полученные ПЭМ-изображения обрабатывают в программе, предназначенной для редактирования микроскопических изображений. В частности, могут быть рекомендованы свободно распространяемая программа ImageJ (Национальный институт здравоохранения США, rsb.info.nih.gov/ij/), либо коммерчески доступный пакет программ Adobe Photoshop. Также для обработки изображений можно использовать программы, входящие в программное обеспечение электронного микроскопа.

Предварительно отмечают качество:

- ультратонких срезов и наличие в них биологического материала;
- фиксации материала.

Распознавание структурных изменений (на уровне ткани, клеток, отдельных органелл) на полученных ПЭМ-изображениях ультратонких срезов основано на сравнении их с референтными изображениями, полученными со срезов контрольных проб органов или из соответствующего атласа ПЭМ-изображений.

Отмечают наличие или отсутствие в тканях и клетках структурных изменений любой этиологии. По возможности, результаты систематизируют и представляют в виде сводной таблицы (табл. 1), содержащей описание признаков патологического процесса и оценку степени их выраженности (например, «единичный», «слабо выраженный», «умеренно выраженный», «распространенный», «генерализованный»).

Таблица 1

Результаты анализа структурных изменений в ткани почки мыши после введения наночастиц

№ образца и название органа	Качество фиксации	Степень выраженности деструктивных изменений	Структурные изменения			Наличие дополнительных электронно-плотных включений
			ткани	клеток	органелл	

После проведения морфометрического анализа обнаруженных структурных изменений количественные показатели обрабатывают статистически, включая в выборку все измеренные значения по данному признаку. Для выборки строят гистограмму распределения по значениям, проводят проверку на нормальность распределения, вычисляют среднее и среднее квадратичное отклонение.

Описания органов, полученные при проведении забора проб, также необходимо оформить в виде соответствующей таблицы (табл. 2).

Таблица 2 (пример)

Результаты анализа макроскопических изменений в почке мыши после введения наночастиц

№ образца и название органа	Размер	Цвет	Форма	Внешние структурные изменения

Если был проведён анализ на полутонких срезах, то данные такого анализа также желательно оформить в виде таблицы (табл. 3).

Таблица 3 (пример)

Результаты анализа микроскопических изменений в почке мыши после введения наночастиц

№ образца и название органа	Структурные изменения, регистрируемые на полутонких срезах органа			

В случае обнаружения структурных изменений в отрицательном контроле необходимо предположить, что были нарушены условия содержания животных (растений) или что в исследование были взяты больные животные (растения).

В случае обнаружения включений экзогенных наночастиц в отрицательном контроле необходимо предположить, что были нарушены условия проведения эксперимента, произошла контаминация растворов искусственными наночастицами или иные нарушения технологии пробоподготовки.

В любом из перечисленных случаев данные эксперимента считаются недостоверными.

7.2. Предоставление заключения

По итогам анализа составляют заключение о наличии структурных изменений в органах и тканях животного, оформленное в печатном виде. Если патологические изменения в образцах достоверно установлены, в отчёте должны быть представлены следующие данные (отдельно по каждому типу образца, извлеченного при аутопсии животного или вырезанного из органов растений):

- данные макроскопического анализа;
- данные ультраструктурного анализа:
- степень выраженности деструктивных изменений;
- характер деструктивных изменений;
- наличие или отсутствие искусственных наночастиц, если проводился специальный анализ на их присутствие по МР 1.2.2641—10 «Определение приоритетных видов наноматериалов в объектах окружающей среды, живых организмах и пищевых продуктах».

Для каждого органа формируется свой раздел заключения, сделанного на основе всех проб, взятых из данного органа при заборе материала.

В конце заключения суммируется общая картина патологических поражений в организме животного, вызываемых введением искусственных наночастиц. Если это возможно, то формулируются предположения о возможных механизмах токсического воздействия искусственных наночастиц на клетки, ткани и организм в целом.

Результат считается отрицательным, если структурные изменения не выявлены в образце и контроле. В этом случае должны быть представлены репрезентативные микрофотографии, демонстрирующие отсутствие специфических изменений.

Обозначения и сокращения

ПЭМ – просвечивающая электронная микроскопия;
ХПЭЭ – характеристические потери энергии электронов;
СХПЭЭ – спектр характеристических потерь энергии электронов.

Приложение 2

Морфологические признаки основных видов гибели клеток

1) Признаками некроза являются: набухание клетки, набухание ядра, разрыхление и неспецифическая конденсация хроматина, разрыхление содержимого цитоплазмы, набухание мембранных органелл (митохондрий, эндоплазматического ретикулума, аппарата Гольджи), распад полисом, разрывы в мембранах органелл, разрывы плазматической мембраны, появление в межклеточном пространстве клеточного дебриса, массовая гибель клеток, присутствие множества фагоцитирующих клеток.

2) Признаками апоптоза являются: отделение клетки от соседних клеток; нарушение межклеточных взаимодействий; появление широколопастных выростов цитоплазмы – блеббинг цитоплазмы; конденсация хроматина на периферии ядра в виде полулуний; отделение ядерной оболочки от хроматина и формирование сферических структур, ограниченных ядерной оболочкой; уплотнение гиалоплазмы; фрагментация митохондрий и уплотнение митохондриального матрикса; распад гранулярного эндоплазматического ретикулума и аппарата Гольджи до везикул; исчезновение стресс-фибрилл и реорганизация актинового цитоскелета; деградация микротрубочек и промежуточных филаментов; распад центросомы. На поздних стадиях наблюдается деградация всех органелл и появление везикулярных структур неясной природы; фрагментация клетки на апоптотические тельца; присутствие апоптотических телец в составе соседних клеток.

3) Признаками аутофагической гибели являются: изменение формы клетки – появление широколопастных выростов цитоплазмы (блеббинг); разрыхление и неспецифическая конденсация хроматина (частое появление конденсированных глыбок хроматина в центральной части ядра); вакуолизация цитоплазмы, появление большого числа лизосом, и прежде всего вторичных лизосом, заполненных электронно-плотным содержимым и миелиноподобными образованиями; наличие в клетке множества двумембранных везикул, содержащих фрагменты клетки – аутофагосом.

Выявление методами электронной микроскопии структурных изменений, вызываемых искусственными наночастицами в клетках животных и растений

Методические рекомендации
МР 1.2.0047—11

Редактор Н. В. Кожока
Технический редактор Е. В. Ломанова

Подписано в печать 01.06.12

Формат 60x88/16 Печ. л. 3,0
Тираж 200 экз. Заказ 42

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

Оригинал-макет подготовлен к печати и тиражирован
отделом издательского обеспечения
Федерального центра гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора
117105, Москва, Варшавское ш., 19а
Отделение реализации, тел./факс 952-50-89

gost.e-ecolog.ru