2.3.2. ПРОДОВОЛЬСТВЕННОЕ СЫРЬЕ И ПИЩЕВЫЕ ПРОДУКТЫ

Медико-биологическая оценка безопасности генно-инженерно-модифицированных организмов растительного происхождения

Методические указания
МУ 2.3.2.2306—07

gost.e-ecolog.ru

1. Разработаны: Государственным учреждением НИИ питания Российской академии медицинских наук (В. А. Тутельян, И. Н. Аксюк, А. В. Васильев, М. М. Г. Гаппаров, И. В. Гмошинский, В. М. Жминченко, Л. В. Кравченко, В. К. Мазо, В. П. Сапрыкин, Е. Ю. Сорокина, Н. В. Тышко, С. А. Хотимченко); Государственным учреждением НИИ вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова Российской академии медицинских наук (Б. Ф. Семенов, М. В. Брицина, Н. С. Захарова); Федеральной службой по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Г. Г. Онищенко, Л. П. Гульченко, Г. Е. Иванов); Государственным образовательным учреждением высшего профессионального образования Московской медицинской академией им. И. М. Сеченова Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию (Б. П. Суханов); Центром «Биоинженерия» Российской академии наук (К. Г. Скрябин, Б. Б. Кузнецов); Государственным образовательным учреждением высшего профессионального образования Московским государственным университетом прикладной биотехнологии Министерства образования и науки Российской Федерации (И. А. Рогов, Н. В. Гурова, В. В. Сучков).

2. Утверждены постановлением Главного государственного санитарного врача Российской Федерации Г. Г. Онищенко 30.11.2007 № 80.

3. Введены в действие с 30.11.2007.

4. Зарегистрированы в Министерстве юстиции Российской Федерации 06 февраля 2008 г., регистрационный номер 11117.

5. Введены взамен МУК 2.3.2.970—00 «Медико-биологическая оценка пищевой продукции, полученной из генетически модифицированных источников».

УТВЕРЖДЕНО
Постановлением Главного
государственного санитарного врача
Российской Федерации
от 30 ноября 2007 г. № 80

2.3.2. ПРОДОВОЛЬСТВЕННОЕ СЫРЬЕ И ПИЩЕВЫЕ ПРОДУКТЫ

Медико-биологическая оценка безопасности генно-инженерно-модифицированных организмов растительного происхождения

Методические указания МУ 2.3.2.2306—07

1. Общие положения и область применения

1.1. Методические указания устанавливают требования к проведению оценки безопасности генно-инженерно-модифицированных организмов растительного происхождения (ГМО).

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

1.3. Методические указания разработаны с целью обеспечения единой, научно обоснованной системы оценки безопасности ГМО, и учитывают новые методические подходы как разработанные в России, так и рекомендованные международными организациями (ВОЗ, ФАО и др.) [24, 30, 31, 37, 46, 47].

2. Экспертный анализ и оценка данных, характеризующих заявленные генно-инженерно-модифицированные организмы

2.1. Общая характеристика ГМО включает анализ информации, представленной заявителем:

- позволяющей идентифицировать ГМО (вид, сорт, трансформационное событие);
- об исходном родительском организме (таксономическая характеристика, описание способа размножения и распространения; данные о токсических, аллергенных и других неблагоприятных свойствах);
- об организмах-донорах вносимых генов (таксономическая характеристика, история использования);

• о методе генетической модификации (описание метода модификации, структуры вектора, структуры вставки);

• о ГМО (описание свойств, приобретенных растением в результате модификации, описание структуры генетической конструкции (внесенной или удаленной) и места ее локализации, характеристику экспрессии встроенных генов (экспрессия в процессе онтогенеза растения, интенсивность экспрессии в структурных компонентах растения и др.), характеристику различий с родительским организмом (способ размножения, способность к перекрестному опылению, устойчивость к стрессовым воздействиям и др.), характеристику генетической и фенотипической стабильности (должны быть представлены данные, полученные в результате исследований нескольких поколений ГМО), характеристику способности к переносу генов в другие организмы (растения, микроорганизмы).

2.2. Оценка композиционной эквивалентности проводится на основании сведений, представленных заявителем, о результатах сравнения химического состава ГМО с химическим составом его традиционного аналога по следующим параметрам:

• содержание белка;

• аминокислотный состав;

• содержание жира;

• жирно-кислотный состав;

• углеводный состав;

• содержание витаминов;

• содержание макро- и микроэлементов;

• содержание биологически активных веществ;

• содержание аллергенов;

• содержание антропогенных и природных контаминантов (токсичных элементов, микотоксинов, пестицидов, радионуклидов, вредных примесей и др.);

• содержание антинутриентов и других веществ, характерных для растительных организмов данного вида.

Перечень показателей варьируется в зависимости от свойств изучаемого растительного организма.

2.3. Оценка композиционной эквивалентности ГМО и его традиционного аналога проводится с учетом биологических колебаний значений показателей, характерных для растений данного вида.

2.4. Анализ результатов токсикологических исследований проводится на основании сведений, представленных заявителем, включающих:

• результаты оценки безопасности одного или нескольких белков, определяющих проявление заданных признаков у ГМО (молекулярная и

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

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

• результаты других токсикологических исследований.

2.5. Анализ результатов аллергологических исследований проводится на основании сведений, представленных заявителем, включающих:

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

• результаты аллергологических исследований нативного продукта (сравнение набора аллергенов исследуемого ГМО с набором аллергенов его традиционного аналога и др.) должны быть проведены в случае, если имеются данные об аллергенных свойствах организма-донора.

2.6. Анализ результатов других исследований (в случае, если такие исследования были выполнены) проводится на основании сведений, представленных заявителем, включающих результаты:

• определения пищевой ценности (так как заданные и незаданные эффекты генетической модификации могут являться причиной изменения баланса макро- и микронутриентов, и, следовательно, вести к изменению пищевой ценности продукта);

• применения новейших аналитических методов, таких как профильные технологии и др.

2.7. Анализ результатов пострегистрационного мониторинга в стране-заявителе и других странах, осуществляемого с целью выявления незаданных эффектов генетической модификации, которые не могли быть обнаружены на стадии регистрационных исследований, проводится на основании сведений, представленных заявителем.

3. Методы обнаружения, идентификации и количественного определения генно-инженерно-модифицированных организмов в пищевых продуктах

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

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

- метод идентификации одного или нескольких трансформационных событий;
- метод количественного определения одного или нескольких трансформационных событий;
- протоколы проведения анализов;
- описание праймеров;
- стандартные образцы состава и свойств.

4. Медико-генетическая оценка генно-инженерно-модифицированных организмов

4.1. Медико-генетическая оценка ГМО включает проверку присутствия одной или нескольких синтетических генетических конструкций методом полимеразной цепной реакции (ПЦР).

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

- описание молекулярной структуры одной или нескольких синтетических генетических конструкций (нуклеотидная последовательность);
- метод идентификации и количественного определения одного или нескольких трансформационных событий;
- протокол проведения анализа;
- описание праймеров;
- стандартные образцы состава и свойств.

5. Оценка функционально-технологических свойств генно-инженерно-модифицированных организмов

5.1. Перечень и объем исследований по разделу 5 определяются экспертными (учеными) советами соответствующих аккредитованных испытательных центров Российской Федерации на основании анализа представленных материалов.

5.2. Изучаемые функциональные свойства:

- pH водной суспензии;
- растворимость;
- реологические свойства водных дисперсий;
- водоудерживающая и жироудерживающая способность;
- критическая концентрация гелеобразования;
- эмульсионная стабильность и др.

Исследования проводят в соответствии с [4, 5, 18, 25]

6. Медико-биологическая оценка безопасности генно-инженерно-модифицированных организмов

6.1. Перечень и объем исследований по разделу 6 определяются экспертными (учеными) советами соответствующих аккредитованных испытательных центров Российской Федерации на основании анализа представленных материалов.

6.2. Гигиенические исследования ГМО включают определение показателей качества и безопасности.

6.2.1. Перечень показателей безопасности определяется на основании требований СанПиН 2.3.2.1078—01 «Гигиенические требования безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов» для соответствующей группы продуктов.

Изучаемые показатели:

- содержание токсичных элементов;
- содержание микотоксинов;
- содержание пестицидов;
- содержание радионуклидов;
- содержание вредных примесей;
- микробиологические показатели;
- другие показатели (в случае необходимости).

6.2.2. Перечень показателей качества определяется на основании свойств соответствующего растительного организма, а также анализа представленных заявителем материалов. В случае если заявителем пред-

ставлены исчерпывающие данные по оценке композиционной эквивалентности ГМО (содержание белка, аминокислотный состав, содержание жира, жирно-кислотный состав, углеводный состав, содержание витаминов, макро- и микроэлементов, специфических компонентов, биологически активных веществ, антинутриентов и других веществ, характерных для растений данного вида), исследования могут быть ограничены определением влажности, золы, содержания белка, жира, углеводов, пищевых волокон.

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

6.3. Токсикологические исследования ГМО проводятся в эксперименте на лабораторных животных.

6.3.1. Схема проведения эксперимента

Вид животных	Крысы линии Вистар
Пол	Самцы
Возраст	40—50 дней
Исходная масса тела	70—80 г
Количество животных в группе в начале эксперимента	Не менее 50 особей в каждой группе
Распределение по группам	Животных делят на 2 группы: группа «контроль» получает рацион с включением традиционного аналога исследуемого ГМО; группа «опыт» получает рацион с включением исследуемого ГМО
Рацион	Пищевая и биологическая ценность рациона полностью удовлетворяет физиологические потребности животных
Карантин	Не менее 7 дней
Условия содержания	Животные получают свободный доступ к корму и воде; содержатся в отапливаемом, вентилируемом помещении
Продолжительность эксперимента	180 дней
Забор материала для гематологических, биохимических, морфологических исследований	На 30-й и 180-й дни эксперимента
Количество животных, взятых на исследование	Не менее 10/группу

6.3.2. На протяжении эксперимента животные получают полусинтетический казеиновый рацион (ПКР). Исследуемый ГМО и его тради-

ционный аналог включают в состав корма в максимально возможном количестве, не нарушающем баланс основных пищевых веществ. Замена ингредиентов рациона должна быть проведена с учетом содержания белков, жиров и углеводов во вводимом продукте при соблюдении принципа изокалорийности.

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

Таблица 1

Состав базового полусинтетического казеинового рациона

Ингредиенты	Кол-во	Белок	Жиры	Углеводы	Калорийность	
	г	г	г	г	ккал	%
Казеин	25,0	20,20	0,38	–	84,22	22,1
Крахмал маисовый	58,0	0,58	–	50,2	203,12	53,3
Масло подсолнечное нерафинированное	5,0	–	4,99	–	44,91	11,8
Лярд	5,0	–	4,98	–	44,82	11,8
Солевая смесь*	4,0	–	–	–	–	–
Смесь в/р витаминов**	1,0	–	–	1,0	4,00	1,0
Смесь ж/р витаминов***	0,1	–	0,10	–	–	–
Микрокристаллическая целлюлоза	2,0	–	–	–	–	–
Итого	100,1	20,78	10,45	51,2	381,07	100,0

* состав солевой смеси представлен в табл. 2

** 1 г содержит: тиамина (B1) – 0,4 мг, рибофлавина (B2) – 0,6 мг, пиридоксина (B6) – 0,4 мг, никотиновой кислоты – 3,0 мг, пантотената кальция – 1,5 мг, фолиевой кислоты – 0,2 мг, цианкобаламина (B12) – 0,003 мг, викасола – 0,1 мг, L-метионина – 50 мг, глюкозы – до 1 г

*** 0,1 мл содержит: ретинола ацетата 800 МЕ, эргокальциферола – 70 МЕ, α-токоферола ацетата – 5 мг, подсолнечного масла – до 0,1 мл

Таблица 2

Состав солевой смеси

№	Название соли	Химическая формула	Количество, г
1	2	3	4
1	Хлористый натрий	$NaCl$	139,3
2	Калий фосфорно-кислый, однозамещенный	KH_2PO_4	388,8
3	Магний серно-кислый	$MgSO_4$	57,4
4	Кальций углекислый	$CaCO_3$	380,4
5	Железо серно-кислое	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	26,4

Продолжение табл. 2

1	2	3	4
6	Калий йодистый	KI	0,77
7	Марганец серно-кислый	$MnSO_4 \cdot 7H_20$	4,55
8	Цинк серно-кислый	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0,53
9	Медь серно-кислая	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0,48
10	Кобальт хлористый	$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0,024
11	Натрий фтористый	NaF	0,50
12	Алюмокалиевые квасцы	$K_2SO_4Al_2(SO_4)_3 \cdot 24H_2O$	0,11
	Итого		1000

6.3.3. Исследуемые показатели:

6.3.3.1. Интегральные показатели.

Изучаемые показатели	Периодичность сбора данных
Общее состояние животных (внешний вид, двигательная активность, состояние шерстного покрова)	Каждые 2 дня
Поедаемость корма	Ежедневно
Масса тела	Каждые 7 дней
Масса внутренних органов (головной мозг, сердце, селезенка, легкие, тимус, гипофиз, печень, почки, надпочечники, семенники)	На 30-й и 180-й дни эксперимента

6.3.3.2. Гематологические показатели.

Изучаемые показатели [17, 45]	Периодичность сбора данных
- концентрация гемоглобина; - гематокрит; - общее количество эритроцитов; - средний объем эритроцита (СОЭ); - среднее содержание гемоглобина в эритроците (ССЭ); - средняя концентрация гемоглобина в эритроците (СКЭ); - общее количество тромбоцитов; - общее количество лейкоцитов; - дифференцированный подсчет лейкоцитов (нейтрофилы, лимфоциты, эозинофилы, моноциты, базофилы)	На 30-й и 180-й дни эксперимента

6.3.3.3. Биохимические показатели.

6.3.3.3.1. Общий биохимический анализ крови.

Материал для исследований: сыворотка крови.

Изучаемые показатели [17, 45]	Периодичность сбора данных
- аланинаминотрансфераза (АЛТ); - аспартатаминотрансфераза (АСТ); - желчные кислоты; - фосфатаза щелочная; - билирубин общий; - билирубин прямой; - белок общий; - альбумин; - глобулин; - креатинин; - глюкоза; - альфа-амилаза; - липаза; - лактатдегидрогеназа; - общие липиды; - триглицериды; - холестерин; - холинэстераза; - мочевина; - хлориды; - натрий; - фосфор; - калий	На 30-й и 180-й дни эксперимента

6.3.3.3.2. Общий анализ мочи.

Материал для исследований: моча.

Изучаемые показатели [17, 45]	Периодичность сбора данных
- суточный диурез; - цвет и прозрачность; - относительная плотность; - pH; - белок; - глюкоза; - креатинин	На 30-й и 180-й дни эксперимента

6.3.3.3.3. Системные биомаркеры.

6.3.3.3.3.1. Система антиоксидантной защиты.

Изучаемые показатели	Периодичность сбора данных
Активность ферментов антиоксидантной защиты. Материал для исследований: эритроциты [15, 16, 35, 36, 39, 42] - глутатионредуктаза; - глутатионпероксидаза; - супероксиддисмутаза; - каталаза	На 30-й и 180-й дни эксперимента
Содержание продуктов перекисного окисления липидов. Материал для исследований: кровь, печень [10, 32, 34] - малоновый диальдегид	

6.3.3.3.3.2. Система ферментов метаболизма ксенобиотиков. Материал для исследований: печень.

Изучаемые показатели	Периодичность сбора данных
Активность ферментов 1-й и 2-й фазы метаболизма ксенобиотиков [28, 29, 33, 38, 43] - общее содержание цитохрома Р-450; - 7-этоксирезоруфин-О-деэтилаза; - 7-пентоксирезоруфин-О-деэтилаза; - UDP-глюкуронозилтрансфераза; - глутатионтрансфераза	На 30-й и 180-й дни эксперимента

6.3.3.3.3.3. Система регуляции апоптоза.

1) Стабильность мембран лизосом.

Материал для исследований: печень.

Изучаемые показатели	Периодичность сбора данных
Общая и неседиментируемая активность ферментов лизосом [6] - β-галактозидаза; - β-глюкуронидаза; - арилсульфатазы А и В	На 30-й и 180-й дни эксперимента

2) Другие методы.

6.3.3.4. Морфологические исследования

Исследуемые органы	Методы исследований [1, 7, 9, 12—14,19—22, 27]
- кожа; - головной мозг; - сердце; - аорта; - селезенка; - легкие; - лимфатические узлы; - тимус; - щитовидная железа; - гипофиз; - ЖКТ: желудок, тонкая и толстая кишки; - печень; - поджелудочная железа; - почки; - семенники	*На 30-й и 180-й дни эксперимента (плановый забор)* 1. Макроскопические исследования 2. Микроскопические исследования: а) обзорные гистологические исследования 3. Морфометрический анализ
	Вскрытие погибших в течение эксперимента животных (внеплановый забор) 1. Макроскопические исследования 2. Микроскопические исследования (перечень исследуемых органов может быть сокращен до минимально необходимого для установления причины смерти): а) обзорные гистологические исследования
	Дополнительные исследования 1. Микроскопические исследования: а) гистохимические исследования; б) иммуногистохимические исследования клеточных популяций и их производных. 2. Электронно-микроскопические исследования

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

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

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

3) действие как сенсибилизирующего агента – в тесте чувствительности к гистамину;

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

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

Таблица 3

Характеристики мышей линий СВА и С57Bl/6

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

6.4.1. Схема проведения эксперимента.

Вид животных	Мыши линий СВА и С57Bl/6
Пол	Самцы
Возраст	Половозрелые
Исходная масса тела	18—20 г
Распределение по группам	Животных каждой линии делят на 2 группы: группа «контроль» получает рацион с включением традиционного аналога исследуемого ГМО; группа «опыт» получает рацион с включением исследуемого ГМО
Рацион*	Пищевая и биологическая ценность рациона полностью удовлетворяет физиологические потребности животных
Карантин	не менее 7 дней
Условия содержания	Животные получают свободный доступ к корму и воде; содержатся в отапливаемом, вентилируемом помещении
* состав базового рациона приведен в п. 6.3.2	

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

6.4.2. Исследуемые показатели.

1) Действие ГМО на гуморальное звено иммунитета.

Через 21 день эксперимента мышам контрольной (не менее 20 животных) и опытной (не менее 20 животных) групп обеих линий внутрибрюшинно вводят 0,5 мл эритроцитов барана (20 млн клеток/мл). Забор крови для исследований проводится на 7-й, 14-й и 21-й день после введения эритроцитов барана. Сыворотку крови титруют в реакции гемагглютинации общепринятым методом [11]. Полученные данные обрабатывают методами вариационной статистики с использованием t-критерия Стьюдента. Результаты приводятся в виде $M \pm m$, где M – выборочное среднее измеряемых величин, m – стандартная ошибка.

2) Действие ГМО на клеточное звено иммунитета.

Через 21 день эксперимента мышам контрольной (не менее 15 животных) и опытной (не менее 15 животных) групп обеих линий подкожно в межлопаточную область вводят 0,5 мл эритроцитов барана (2 млн клеток/мл). Через пять дней всем мышам в подушечку одной задней лапы вводят разрешающую дозу эритроцитов барана – 0,02 мл (1 млрд клеток/мышь); в контрлатеральную лапу – 0,02 мл 0,95 %-го раствора хлорида натрия. Местную воспалительную реакцию оценивают

через 18—20 ч путем определения массы опытной и контрольной лапок. Интенсивность местной реакции определяют по индексу реакции (ИР) [8].

3) Действие ГМО как сенсибилизирующего агента к гистамину.

Через 21 день эксперимента мышам контрольной (не менее 15 животных) и опытной (не менее 15 животных) групп обеих линий внутрибрюшинно вводят гистамин гидрохлорид (2,5 мг/мышь в 0,5 мл физиологического раствора). Реакцию учитывают через 24 ч по проценту гибели мышей [40].

4) Действие ГМО на естественную резистентность мышей к *S. typhimurium* изучают на модели внутрибрюшинного заражения мышей десятикратно отличающимися дозами *S. typhimurium* штамм 415. Через 21 день эксперимента мышей контрольной (не менее 30 животных) и опытной (не менее 30 животных) групп обеих линий заражают тремя дозами культуры: 1 000, 100, 10 микробных клеток/мышь. После заражения за животными наблюдают в течение 21 дня. Вычисляют $ЛД_{50}$, а также процент гибели животных по каждой дозе, затем проводят сравнительный анализ результатов[2].

6.5. Аллергологические исследования ГМО проводятся в эксперименте на лабораторных животных: потенциальную аллергенность оценивают, определяя тяжесть протекания системной анафилаксии и уровня циркулирующих сенсибилизирующих антител (субклассов IgG1 + IgG4) у крыс, получающих в составе рациона исследуемый ГМО (группа «опыт») и его традиционный аналог (группа «контроль»). Метод основан на количественной сравнительной оценке тяжести реакции системной анафилаксии, возникающей при внутрибрюшинной (в/б) сенсибилизации взрослых крыс пищевым антигеном – овальбумином куриного яйца (ОВА) – с последующим внутривенным (в/в) введением сенсибилизированным животным разрешающей дозы того же белка [41].

6.5.1. Схема проведения эксперимента.

Вид животных	Крысы линии Вистар
1	2
Пол	Самцы
Возраст	Половозрелые
Исходная масса тела	150—180 г
Количество животных в группе в начале эксперимента	Не менее 25 особей в каждой группе
Распределение по группам	Животных делят на 2 группы: группа «контроль» получает рацион с включением традиционного аналога исследуемого ГМО; группа «опыт» получает рацион с включением исследуемого ГМО

Продолжение

1	2
Рацион (табл. 4)	Пищевая и биологическая ценность рациона полностью удовлетворяет физиологические потребности животных. Рацион не содержит яичного белка
Карантин	Не менее 7 дней
Условия содержания	Животные получают свободный доступ к корму и воде; содержатся в отапливаемом, вентилируемом помещении
Продолжительность эксперимента	29 дней
Забор материала для исследований	На 29-й день эксперимента

Таблица 4

Стандартный рацион вивария

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

6.5.2. Исследуемые показатели.

На 1-й, 3-й, 5-й день опыта крыс в/б сенсибилизируют ОВА, а на 21-й день эксперимента вводят дополнительную («бустерную») дозу антигена, уменьшенную в 10 раз в сравнении с первоначальной. Кормление рационами продолжают до утра 29-го дня эксперимента и затем вводят раствор ОВА в/в, после чего оценивают на протяжении 24 ч тяжесть развивающейся реакции анафилаксии по показателям числа летальных реакций, общего числа судорожных реакций и величины анафилактического индекса [44]. Непосредственно перед введением разрешающей дозы у

крыс отбирают 0,1—0,2 мл крови из хвостовой вены для определения уровня специфических антител.

Иммуноферментное определение уровней циркулирующих специфических антител к ОВА проводят согласно [3]. Статистическую обработку результатов проводят согласно U-критерию Фишера для долевых показателей, непараметрическим критериям хи-квадрат и Мана-Уитни с использованием пакетов программ Excel и SPSS 11.5.

6.6. Генотоксикологические исследования ГМО проводятся в эксперименте на лабораторных животных. Оценка потенциальной генотоксичности ГМО включает выявление повреждений ДНК и выявление мутагенной активности в эксперименте *in vivo*. Метод выявления мутагенной активности основан на учете хромосомных аберраций в метафазных клетках пролиферирующих тканей [26]. Регистрация повреждений ДНК предусматривает оценку целостности структуры ДНК методом щелочного гель-электрофореза изолированных клеток (метод ДНК-комет) [23].

6.6.1. Схема проведения эксперимента.

Вид животных	Мыши линии C57Bl/6
Пол	Самцы
Возраст	Половозрелые
Исходная масса тела	18—20 г
Количество животных в группе в начале эксперимента	Не менее 15 особей в каждой группе
Распределение по группам	Животных делят на 2 группы: группа «контроль» получает рацион с включением традиционного аналога исследуемого ГМО; группа «опыт» получает рацион с включением исследуемого ГМО
Рацион*	Пищевая и биологическая ценность рациона полностью удовлетворяет физиологические потребности животных
Карантин	Не менее 7 дней
Условия содержания	Животные получают свободный доступ к корму и воде; содержатся в отапливаемом, вентилируемом помещении.
Продолжительность эксперимента	30 дней
Забор материала для исследований	На 30-й день эксперимента
* состав базового рациона приведен в п. 6.3.2	

6.6.2. Исследуемые показатели:

1) в основе метода выявления мутагенной активности лежит регистрация видимых структурных нарушений хромосом в клетках костного мозга на стадии метафазы. Анализируют 100 метафаз от каждого живот-

ного. Учитывают число одиночных и парных фрагментов, хроматидных и хромосомных обменов, ахроматических пробелов (гепов) и разрывов по центромере, число клеток с множественными повреждениями и клеток с полной деструкцией хромосом. Оценку результатов цитогенетического анализа проводят путем сопоставления долей клеток с хромосомными аберрациями в контрольной и опытной группах;

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

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

6.7. Исследования репродуктивной токсичности ГМО проводятся в эксперименте на лабораторных животных и включают:

1) изучение влияния на генеративную функцию;

2) изучение эмбриотоксического и тератогенного действий, регистрируемых в пренатальном и постнатальном периодах развития.

6.7.1. Схема проведения эксперимента.

Вид животных	Крысы линии Вистар
1	2
Пол	Самцы, самки
Возраст	40—50 дней
Исходная масса тела	70—80 г
Количество животных в группе в начале эксперимента	не менее 50 особей в каждой группе 30 ♀, 20 ♂
Распределение по группам	Животных делят на 2 группы: группа «контроль» получает рацион с включением традиционного аналога исследуемого ГМО; группа «опыт» получает рацион с включением исследуемого ГМО

Продолжение

1	2
Рацион*	Пищевая и биологическая ценность рациона полностью удовлетворяет физиологические потребности животных
Карантин	Не менее 7 дней
Начало опытного вскармливания	За 45—50 дней перед первым спариванием
Условия содержания	Животные получают свободный доступ к корму и воде; содержатся в отапливаемом, вентилируемом помещении
* состав базового рациона приведен в п. 6.3.2.	

6.7.2. Исследуемые показатели:

6.7.2.1. Интегральные показатели.

Изучаемые показатели	Периодичность сбора данных
Общее состояние животных (внешний вид, двигательная активность, состояние шерстного покрова)	каждые 2 дня
Поедаемость корма	ежедневно
Масса тела	каждые 7 дней

6.7.2.2. Показатели, характеризующие генеративную функцию.

Изучаемые показатели [26]	Сроки сбора данных
Морфологические исследования семенников (определяют индекс сперматогенеза, среднее количество нормальных сперматогоний в каждом канальце, относительное количество канальцев с 12-й стадией мейоза)	половозрелые особи
Морфологические исследования яичников (примордиальные фолликулы, фолликулы с двумя и более слоями фолликулярных клеток, третичные фолликулы, атретические тела, желтые тела, общее количество генеративных форм)	

6.7.2.3. Показатели, характеризующие пренатальное развитие потомства.

Изучаемые показатели [26]	Сроки сбора данных
1. Забой и вскрытие не менее 7 беременных самок на группу	19—20-й день беременности
2. Визуальное исследование матки, плаценты, плодов: выявление живых и мертвых плодов, подсчет количества желтых тел, мест имплантации, количество резорбций по правому и левому рогу матки (с последующим вычислением пред- и постимплантационной эмбриональной смертности)	
3. Анализ эмбрионального материала (не менее 5 плодов от каждой крысы)	

6.7.2.4. Показатели, характеризующие постнатальное развитие потомства.

Изучаемые показатели [26]	Сроки сбора данных
1. Контроль рождения потомства	20—22-й дни беременности
2. Учет величины помета в день родов, подсчет количества живых и мертвых крысят, подсчет особей разного пола, установление внешних уродств, измерение массы тела, определение краниокаудального размера	1-й день жизни
3. Учет показателей физиологического развития крысят: срок отлипания ушных раковин, появление первичного волосяного покрова, прорезывание резцов, открытие глаз, опускание семенников, открытие влагалища; выживаемость потомства	1—30 дни жизни
4. Измерение массы тела и роста крысят	1, 4, 7, 14, 21 и 25 дни жизни

6.7.3. Отчет по результатам исследований репродуктивной токсичности ГМО должен включать цифровые данные в форме таблиц, содержащих основные сведения, необходимые для суждения о наличии или отсутствии у исследуемого ГМО неблагоприятного действия на внутриутробное развитие и процессы репродукции.

Список литературы

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

2. Ведомости Фармакологического комитета. 1999. № 1. С. 31—36.

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

4. Гурова Н.В., Попело И.А., Сучков В.В. //Мясная индустрия. 1999. Т. 1. С. 23—25.

5. Гурова Н.В., Токаев Э.С., Гуров А.Н. Метод определения эмульсионных свойств белков. М.: Сб.АгроНИИТЭИ Мясомолпром, 1994.

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

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

8. Иммуномодулирование. Сборник трудов. М., 1987. С. 3—25.

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

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

11. Лабораторная иммунология. Лабораторные методы исследования в неинфекционной иммунологии. М.: Медицина, 1967. 356 с.

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

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

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

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

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

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

18. Метод определения критической концентрации термотропного гелеобразования. В кн.: Материалы III Международной научно-технической конференции «Пища. Экология. Человек». М., 1999. Т. 1. С. 40.

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

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

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

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

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

24. Принципы оценки безопасности пищевых добавок и контаминантов в продуктах питания. Гигиенические критерии состояния окружающей среды 70. Совместное издание Программы ООН по окружающей среде, Международной организации труда, ВОЗ при содействии Продовольственной и сельскохозяйственной организации Объединенных Наций. Женева: ВОЗ, 1991. 159 с.

25. Руководство по методам исследования, химико-технологическому контролю и учету производства в масло-жировой промышленности /Под ред. Ржехина В.П., Сергеева А.Г. Л.: ВНИИЖ, 1967. Т. 1. 1050 с.

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

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

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

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

30. Codex Alimentarius. Foods derived from biotechnology. Rome: FAO/WHO, 2004. 51 p.

31. Codex Alimentarius. Food hygiene basic texts. Third edition. Rome: FAO/WHO, 2003. 68 p.

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

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

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

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

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

37. OECD (Organisation for Economic Cooperation and Development). Report of the Task Force for the Safety of Novel Foods and Feeds for the G8 Summit (Okinawa). Paris: OECD, 2000. C(2000)86/ADD1.

38. Omura T., Sato R. //Biol. Chem. 1964. Vol. 239. P. 2370—2378.

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

40. Preston N.W. //Path. Bact. 1959. Vol. 78. № 1. P. 217—224.

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

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

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

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

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

46. WHO/FAO. Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation on foods derived from biotechnology: Safety aspects of genetically modified foods of plant origin. WHO: 2000. 35 p.

47. WHO/FAO. Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation on Allergenicity of foods derived from biotechnology: Evaluation of Allergenicity of genetically modified foods. WHO: 2001. 27 p.

gost.e-ecolog.ru