Государственное санитарно-эпидемиологическое нормирование Российской Федерации

1.2. ГИГИЕНА, ТОКСИКОЛОГИЯ, САНИТАРИЯ

Порядок оценки токсического действия наноматериалов на лабораторных животных

Методические указания
МУ 1.2.2869—11

Издание официальное

Москва • 2011

gost.e-ecolog.ru

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

1.2. ГИГИЕНА, ТОКСИКОЛОГИЯ, САНИТАРИЯ

Порядок оценки токсического действия наноматериалов на лабораторных животных

Методические указания
МУ 1.2.2869—11

ББК 51.2
П59

П59 **Порядок** оценки токсического действия наноматериалов на лабораторных животных: Методические указания.—М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2011.—23 с.

ISBN 978—5—7508—1024—6

1. Разработаны Федеральной службой по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Г. Г. Онищенко, И. В. Брагина, О. И. Аксенова, Т. Ю. Завистяева, А. Л. Мишина); НИИ питания РАМН (В. А. Тутельян, И. В. Гмошинский, С. А. Хотимченко, С. А. Шевелева, Н. Р. Ефимочкина, И. В. Аксенов, Е. А. Арианова, В. В. Бессонов, М. М. Гаппаров, Р. В. Распопов, В. В. Смирнова, О. Н. Тананова, А. А. Шумакова, О. И. Передеряев, А. А. Казак); ФБГУ НИИ эпидемиологии и микробиологии им. почетного академика Н. Ф. Гамалеи Минздравсоцразвития России (А. Л. Гинцбург, Б. С. Народицкий, М. М. Шмаров, Д. Ю. Логунов, Л. В. Верховская); Биологическим факультетом Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова (М. П. Кирпичников, К. В. Шайтан, А. П. Бонарцев, А. В. Феофанов, Д. В. Багров, В. В. Воинова, О. В. Самсонова); Центром «Биоинженерия» РАН (К. Г. Скрябин, О. А. Зейналов, Н. В. Равин, С. П. Комбарова); Всероссийским научно-исследовательским институтом метрологической службы (С. А. Кононогов, С. С. Голубев); Институтом биохимии им. А. Н. Баха РАН (В. О. Попов, Б. Б. Дзантиев, А. В. Жердев, О. Д. Гендриксон); ФБУЗ «Федеральный центр гигиены и эпидемиологии» Роспотребнадзора (А. И. Верещагин, А. А. Катуркина); ООО «Интерлаб» (А. Н. Веденин, Г. В. Казыдуб); разработаны в рамках Федеральной целевой программы «Развитие инфраструктуры наноиндустрии в Российской Федерации на 2008—2010 гг.».

2. Утверждены Руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации Г. Г. Онищенко и введены в действие 24 мая 2011 г.

3. Введены впервые.

ББК 51.2

ISBN 978—5—7508—1024—6

© Роспотребнадзор, 2011
© Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2011

Содержание

Введение 4
I. Область применения 5
II. Нормативные ссылки 6
III. Общие положения 8
IV. Порядок проведения эксперимента по изучению токсического действия наноматериалов на лабораторных животных 12
Приложение 1. Типовой протокол эксперимента по изучению токсического действия наноматериалов на лабораторных животных 21
Приложение 2. Обозначения и сокращения 23

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

1.2. ГИГИЕНА, ТОКСИКОЛОГИЯ, САНИТАРИЯ

Порядок оценки токсического действия наноматериалов на лабораторных животных

Методические указания МУ 1.2.2869—11

Введение

Целью токсикологических исследований является установление характера и выраженности повреждающего действия наноматериала на экспериментальных животных.

Токсикологических исследования наноматериалов подразделяются:

а) на изучение общетоксического действия;

б) на исследование специфических видов токсичности (органотоксичность, аллергенность, иммунотоксичность, эмбриотоксичность, тератогенность, мутагенность, канцерогенность).

Токсикологические исследования наноматериалов на животных проводятся в соответствии с МУ 1.2.2520—09 «Токсиколого-гигиеническая оценка безопасности наноматериалов», МУ 1.2.2634—10 «Микробиологическая и молекулярно-генетическая оценка воздействия наноматериалов на представителей микробиоценоза» и МР 1.2.2566—09 «Оценка безопасности наноматериалов *in vitro* и в модельных системах *in vivo*».

В ходе изучения общетоксического действия наноматериалов решаются следующие задачи:

• определение безопасных (переносимых) и токсических доз (концентраций) наноматериалов при различных путях их введения в организм животного;

• выявление наиболее чувствительных к изучаемому наноматериалу органов и систем организма, установление характера и степени патологических изменений в них, обратимости вызываемых повреждений;

• изучение зависимости токсических эффектов от дозы и длительности воздействия веществ в форме наночастиц и наноматериалов на животных.

Исследование общетоксического действия подразделяется на три этапа:

• изучение острой токсичности при однократном или дробном введении наноматериала животным через короткие (не более 3—6 ч) интервалы в течение суток;

• изучение подострой токсичности при повторном длительном введении наноматериала животным на протяжении 30—90 дней;

• изучение хронической токсичности в условиях воздействия наноматериала на животных на протяжении большей части естественной длительности их жизни (для мелких грызунов – до 2 лет).

В результате оценки общетоксического действия наноматериалов устанавливаются уровни их воздействия, при которых не наблюдаются вредные эффекты (NOAEL или NOEL), которые могут быть использованы для обоснования допустимого суточного поступления (условно переносимого недельного поступления, условно переносимого месячного поступления) и допустимых пределов содержания наноматериалов в организме.

I. Область применения

1.1. Настоящие методические указания устанавливают порядок оценки токсического действия наноматериалов на лабораторных животных в ходе оценки безопасности новых видов наноматериалов.

1.2. Требования, изложенные в настоящих методических указаниях, применяются в ходе проведения исследований безопасности наноматериалов в целях принятия решений по оценке рисков, связанных с воздействием наночастиц и наноматериалов на организм человека.

1.3. Методические указания разработаны с целью установления единого порядка оценки токсического действия наноматериалов в ходе оценки безопасности наноматериалов для здоровья человека.

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

II. Нормативные ссылки

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

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

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

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

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

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

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

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

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

2.10. СанПиН 2.1.4.1074—01 «Питьевая вода. Гигиенические требования к качеству воды централизованных систем питьевого водоснабжения. Контроль качества».

2.11. СП 1.3.2322—08 «Безопасность работы с микроорганизмами III—IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных инфекций».

2.12. СП 1.3.1285—03 «Безопасность работы с микроорганизмами I—II групп патогенности (опасности)».

2.13. СП 1045—73 «Санитарные правил по устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)».

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

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

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

2.17. «Временные рекомендации (Правила) по охране труда при работе в лабораториях (отделениях, отделах) санитарно-эпидемиологических учреждений системы Минздрава России» (утв. Минздравом России 11.04.2002).

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

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

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

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

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

2.23. ГОСТ 30333—2007 «Паспорт безопасности химической продукции. Общие требования».

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

2.25. ГОСТ 8.207—76 «Государственная система обеспечения единства измерений. Прямые измерения с многократными наблюдениями. Методы обработки результатов наблюдений. Основные положения».

2.26 ГОСТ 12.1.007—76 «Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности».

2.27. ГОСТ 12.0.003—74 «Опасные и вредные производственные факторы. Классификация».

2.28. ГОСТ Р ИСО 10993.1—2009 «Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 1. Оценка и исследования».

III. Общие положения

3.1. Целью проведения исследований по изучению острой токсичности является определение класса опасности новых наноматериалов в соответствии с ГОСТ 12.1.007—76 и установление LD_{16}, LD_{50} и LD_{84} (при парентеральном или энтеральном введении) или CL_{16}, CL_{50} и CL_{84} (при ингаляционном введении) для обоснования доз, необходимых для использования при изучении подострой, хронической токсичности и отдаленных эффектов.

3.2. При проведении исследований по подострой и хронической токсичности при подборе доз следует руководствоваться результатами, полученными при исследовании острой токсичности наноматериала, имеющимися данными о его способности вызывать кумулятивный эффект, а также максимальными суточными дозами, в которых наноматериал может поступать в организм в процессах его производства, использования или утилизации.

3.3. Введение наноматериалов животным в ходе проведения долгосрочных экспериментов проводят в трёх дозах:

- высшая доза, предполагающая наличие токсических эффектов, рассчитываемая с учётом LD_{xx}, определённых в остром опыте для данного вида лабораторных животных, а также возможного кумулятивного действия;
- минимальная доза, близкая к величине расчётного поступления наноматериала в организм, оценённой для конкретных условий его производства, использования или утилизации;
- доза, промежуточная между минимальной и максимальной.

3.4. При постановке экспериментов обязательно наличие контрольных групп животных, содержащихся в таких же условиях, как и подопытные: контрольная группа животных, которая находится только на полусинтетическом корме; контрольные группы, получающие вспомогательные ингредиенты (дисперсионная среда, стабилизатор), входящие в

состав исследуемого наноматериала и вводимые тем же путём, что и тестируемые наноматериалы.

3.5. При наличии у вещества, входящего в состав наноматериала, собственных токсических свойств в макродисперсной («традиционной») форме (как, например, у наночастиц, содержащих мышьяк, свинец, кадмий, теллур, селен и другие токсичные элементы) необходимо наличие дополнительной контрольной группы животных, получающей в эквивалентных дозах химический аналог наноматериала «традиционной» степени дисперсности (т. е. в форме макроскопической дисперсии или молекулярного (ионного) раствора).

3.6. Путь (способ) введения наноматериала животным определяется его природой и областью его применения (использования). Пероральное и ингаляционное введение наноматериалов животным осуществляют, как указано в МУ 1.2.2520—09, п. 6.4.7. Для наноматериалов, действующих преимущественно через кожу (например, входящих в состав косметической продукции, текстильных изделий и т. д.), применяют эпикутаный способ нанесения наноматериала в виде аппликаций его дисперсии в подходящем носителе на выбритый участок кожи спины животного ежедневно на протяжении всего периода эксперимента.

3.7. В ходе подострого и хронического эксперимента животных подвергают пероральному или эпикутанному воздействию наноматериалов 7 дней в неделю. При использовании ингаляционного пути введения допускается экспонирование животных на протяжении 5-дневных периодов с 2-дневными перерывами (т. е. на протяжении стандартной рабочей недели).

3.8. Определение критических органов – мишеней воздействия наноматериалов – проводится путем изучения накопления наночастиц в различных органах методами, изложенными в МР 1.2.2641—10 «Определение приоритетных видов наноматериалов в объектах окружающей среды, живых организмах и пищевых продуктах» и МУ 1.2.2520—09 «Токсиколого-гигиеническая оценка безопасности наноматериалов».

3.9. При выборе тестируемых органов исходят из физико-химических свойств наноматериалов, известных данных литературы о токсичности, опасности, характере биологического действия наноматериала, наличии структур и органов-мишеней для данных соединений в форме традиционной дисперсности.

3.10. При выборе тестируемых органов можно ориентироваться также на следующий перечень критических органов: легкие, сердце, желудок, тонкая и толстая кишка, печень, поджелудочная железа, почки,

семенники, простата, селезенка, лимфатические узлы, тимус, щитовидная железа, надпочечники, головной мозг.

3.11. Исследования органов проводят при забое животных по окончании эксперимента, а также у всех животных, погибших на протяжении эксперимента, в целях установления причины смерти.

3.12. В зависимости от локализации патологического процесса интоксикация животного наноматериалом может быть местной и общей.

3.13. Если какой-либо орган или система имеют низкий порог чувствительности к наноматериалу в сравнении с другими органами, то при определенных дозовых воздействиях возможно избирательное поражение этого органа или системы. Наноматериалы, к которым порог чувствительности того или иного органа или системы значительно ниже, чем других органов, обозначают как избирательно действующие (оказывающие психомиметическое, нефротоксическое, гепатотоксическое, кардиотоксическое, гемотоксическое или другое действие).

3.14. В зависимости от интенсивности воздействия интоксикация животного наноматериалом может быть охарактеризована как тяжелая, средней степени тяжести и легкая.

3.15. Лаборатория, проводящая исследование, должна быть аккредитована в установленном порядке на соответствие ГОСТ Р ИСО/МЭК 17025—2006 «Общие требования к компетентности испытательных и калибровочных лабораторий».

3.16. Проведение исследований по изучению токсического действия наноматериалов определяется правилами надлежащей лабораторной практики в соответствии с приказом Министерства здравоохранения Российской Федерации от 23 августа 2010 г. № 798н «Об утверждении Правил лабораторной практики».

3.17. В организации, проводящей исследования по токсическому действию наноматериалов на лабораторных животных, должна осуществляться программа по обеспечению качества проводимых исследований. Для этого все производственные операции проводятся в соответствии со стандартными операционными процедурами (далее – СОП). Соблюдение СОП осуществляется в целях обеспечения качества, достоверности и воспроизводимости результатов исследования.

3.18. Исследования токсического действия наноматериалов на лабораторных животных выполняются с использованием средств измерений, прошедших метрологический контроль в установленном порядке и имеющих соответственный сертификат. Эксплуатация средств измерений и вспомогательного оборудования проводится в соответствии с тех-

ническим паспортом и инструкцией по применению. Результаты проведения поверки средств измерений, профилактических осмотров и текущего ремонта фиксируются в специальном журнале, доступном в любое время сотрудникам, эксплуатирующим средства измерений и оборудование или обеспечивающим их обслуживание.

3.19. Лаборатория (организация), проводящая исследование токсического действия наноматериалов на лабораторных животных, должна иметь виварий (клинику лабораторных животных). Условия содержания и использования лабораторных животных должны соответствовать требования СП 1045—73, СП 1.3.2322—08, СП 1.3.1285—03.

3.20. Для обеспечения индивидуального наблюдения в процессе выполнения исследования животные должны быть идентифицированы. Способ идентификации животного документируется. Все клетки, вольеры, контейнеры, предназначенные для содержания животных, также подлежат маркировке. Животные, предназначенные для исследования различных наноматериалов, пространственно изолируются друг от друга.

3.21. Корма и вода для животных должны обеспечивать пищевые потребности в соответствии с протоколом исследования, быть свободными от патогенных микроорганизмов и вредных примесей и не должны влиять на результаты исследования.

3.22. Снабжение лабораторных животных питьевой водой производится из водопровода, если иное не предусмотрено требованиями СОП. Качество воды должно соответствовать требованиям СанПиН 2.1.4.1074—01 «Питьевая вода. Гигиенические требования к качеству воды централизованных систем питьевого водоснабжения. Контроль качества».

3.23. Решение вопросов гуманного обращения с лабораторными животными осуществляется комиссией по биоэтике, создаваемой в организации, проводящей работы по изучению токсичности наноматериалов. Комиссия по биоэтике проводит экспертизу протоколов предстоящих экспериментов *in vivo* и принимает решение о возможности проведения исследований.

3.24. Основным документом, подтверждающим результаты проведённых исследований наноматериалов, является отчёт о проведённом исследовании.

Отчет должен в обязательном порядке содержать следующие сведения: название исследования; адрес организации; даты начала и завершения исследований; цель и задачи исследования; характеристики тестируемого наноматериала; перечень исследованных образцов и приме-

няемых стандартов; вид, линию, пол и возраст используемых лабораторных животных; состав применяемых кормов; условия содержания животных; метод введения наноматериала; применяемые дозы; длительность и кратность введения; сведения о контрольной группе (группах) животных; схему 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».

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

3.27. Организация, проводящая исследования по определению токсического действия наноматериалов на животных, должна обеспечить конфиденциальность результатов исследований в рамках принятых ею обязательств и в соответствии с законодательством Российской Федерации.

3.28. Сотрудники, принимающие участие в проведении исследований по изучению токсического действия наноматериалов, обязаны соблюдать конфиденциальность в отношении любых данных, полученных в ходе исследования, в соответствии с законодательством Российской Федерации.

IV. Порядок проведения эксперимента по изучению токсического действия наноматериалов на лабораторных животных

4.1. Схема проведения токсикологических исследований новых видов наноматериалов

Схема проведения токсикологических исследований новых видов наноматериалов предусматривает: определение острой токсичности; определение подострой токсичности; определение хронической токсичности; кумулятивное действие; раздражающее действие; определение параметров отдаленных эффектов; органотоксичность; иммунотоксичность; аллергенность.

4.2. Выбор вида и линии лабораторных животных

4.2.1. Исследования токсичности наноматериалов проводятся как на линейных (крысы линий *Wistar, Sprague-Dawley* и др.; мыши линий СВА, С57В1/6 и др.), так и нелинейных животных. Кроме грызунов, исследования могут проводиться и на других видах животных, при этом их использование обосновывается задачами исследований и это вносится в СОП. В случае использования линейных животных необходимо указать линию животных.

4.2.2. Число животных в группе зависит от целей исследования, набора проводимых тестов, их совместимости (возможности одновременного проведения на одном и том же животном), ожидаемой дисперсии результатов измерений, но не должно быть менее 10 особей в группе.

4.2.3. В течение всего эксперимента животные получают полусинтетический рацион согласно МУ 1.2.2520—09 «Токсиколого-гигиеническая оценка безопасности наноматериалов» и имеют свободный доступ к воде.

4.2.4. Для изучения острой токсичности, подострой токсичности, хронической токсичности, кумуляции, раздражающего действия, отдаленных эффектов, репродуктивной токсичности, органотоксичности, иммунотоксичности, аллергенности используют лабораторных животных согласно МУ 1.2.2520—09 «Токсиколого-гигиеническая оценка безопасности наноматериалов».

4.3. Определение способа (метода) введения наноматериалов

4.3.1. Путь введения наноматериала должен быть таким же, как и предполагаемый путь его попадания в организм человека: наноматериалы, входящие в состав инъекционных форм и растворов вводят парентерально (внутрибрюшинно, если они не растворимы в воде, внутривенно и подкожно, если они растворимы), наноматериалы для приема внутрь вводятся в составе корма или внутрижелудочно через зонд; для местного применения – наносят на кожу; наноматериалы, экспонирующие человека через формируемый аэрозоль, исследуются при ингаляционном введении.

4.3.2. Количество наноматериала рассчитывают:

- на единицу массы тела животного при парентеральном или энтеральном пути введения;
- на площадь поверхности при нанесении на кожу;
- через объёмную концентрацию в $м^3$ при ингаляционном воздействии.

Для выражения количества наноматериала используют единицы массы наноматериала (мг). Дополнительно для выражения количества наноматериала можно использовать такие параметры, как число частиц или их общую площадь поверхности, выражаемая в $см^2$.

4.3.3. В течение всего эксперимента должны использоваться образцы наноматериалов одной и той же партии.

4.4. Подготовка проб наноматериалов для введения животным

4.4.1. Примерный перечень дисперсионных сред (носителей, растворителей), обладающих низкой собственной токсичностью, использование которых при исследовании наноматериалов представляется предпочтительным:

- физиологический раствор;
- фосфатно-солевой буферный раствор;
- среда для культивирования клеток.

4.4.2. При получении дисперсий наноматериалов следует применять физические методы (встряхивание, перемешивание, обработка ультразвуком). Степень диспергирования наноматериала в дисперсионной среде должна проверяться методом ПЭМ согласно МР 1.2.2641—10 «Определение приоритетных видов наноматериалов в объектах окружающей среды, живых организмах и пищевых продуктах». Применение химических агентов, стабилизирующих дисперсию наноматериала (ПАВ, растворы полимеров, электролиты), является нежелательным; в тех случаях когда получение стабильной дисперсии наноматериала без помощи этих агентов невозможно, их токсическое действие на животных должно проверяться в дополнительных к приведённым в п. 4.4 контрольных группах животных.

4.5. Порядок проведения эксперимента по установлению острой токсичности

4.5.1. Целью исследования является определение переносимых, токсических и летальных доз наноматериалов и причин гибели животных после однократного введения исследуемого наноматериала.

4.5.2. Объектом исследования являются новые виды наноматериалов.

4.5.3. Введение наноматериала животным производится однократно или дробно на протяжении суток одним из способов, приведенных в п. 3.6. Животные опытных групп получают наноматериал не менее чем в трёх последовательно возрастающих дозах. Диапазон изменения доз тестируемого образца наноматериала должен распространяться от предположительно токсической (или при невозможности её оценки – макси-

мально возможной по условиям введения препарата) дозы до предположительно безопасной. Животные контрольной группы (групп) получают носитель наноматериала (дисперсионную среду) и его химический аналог традиционной степени дисперсности при его наличии в эквивалентных количествах с использованием идентичного метода введения.

4.5.4. После введения наноматериала животных помещают в клетки. В последующий период времени (14 дней) доступ к пище (рекомендуется использование стандартного полусинтетического рациона согласно МУ 1.2.2520—09 «Токсиколого-гигиеническая оценка безопасности наноматериалов») и воде не ограничивают. На протяжении всего периода эксперимента осуществляют наблюдение за животными и фиксацию интегральных физиологических и поведенческих реакций согласно МУ 1.2.2520—09 «Токсиколого-гигиеническая оценка безопасности наноматериалов».

4.5.5. Ежедневно определяют число погибших животных в каждой группе. Погибших животных в день гибели подвергают вскрытию в целях установления непосредственной причины смерти и выявления развившихся посмертных патологических изменений.

4.5.6. Выживших животных на 15-й день эксперимента подвергают эвтаназии путём ингаляции CO_2 в специальных камерах. Приемлемость других возможных методов эвтаназии определяется этическими соображениями безопасности персонала и окружающей среды. К неприемлемым для эвтаназии методам относятся: декомпрессия, переохлаждение, перегревание, потопление, перелом шеи (птицы), удушение, закись азота, циклопропан, метоксифлуран, трихлорэтилен, газообразный цианистый водород, 2-феноксиэтиловый спирт, уретан, нервно-мышечные блокаторы, кетамин, магния сульфат и др.

4.5.7. У павших в период наблюдения и подвергнутых эвтаназии животных производится изучение макроскопических и микроскопических показателей морфологии внутренних органов. Перечень исследуемых органов определяется данными об органотропных свойствах наноматериала (при их наличии). При отсутствии таких данных следует руководствоваться в качестве минимального списком органов, представленных в п. 3.1.15.

4.5.8. Расчёт LD_{16}, LD_{50} и LD_{84} (при парентеральном или энтеральном введении) или CL_{16}, CL_{50} и CL_{84} (при ингаляционном введении) производится отдельно для групп самцов и самок методом пробит-анализа с использованием специализированного профессионального программного обеспечения.

4.5.9. Изучение кумуляции токсического действия наноматериалов проводят путём дробного (многократного) введения наноматериала животным в дозе, соответствующей 0,1*LD_{50}. Регистрируемым интегральным показателем является летальность животных. Расчёт коэффициента кумуляции проводят в соответствии с МУ 1.2.2520—09 «Токсикологогигиеническая оценка безопасности наноматериалов».

4.5.10. Оценка местного раздражающего действия наноматериалов на кожу и слизистые оболочки проводят с использованием системы тестов согласно МУ 1.2.2635—10 «Медико-биологическая оценка безопасности наноматериалов».

4.6. Порядок проведения эксперимента по установлению подострой и хронической токсичности

4.6.1. Целью исследования является получение информации об основных токсических эффектах наноматериалов, поражаемых органах-мишенях, латентном периоде развития эффектов в зависимости от дозы и обратимости эффектов.

4.6.2. Объектом исследования являются новые виды наноматериалов.

4.6.3. Высокую, низкую и среднюю дозу ежедневно вводимого наноматериала устанавливают на основе результатов предварительной характеристики острой токсичности.

4.6.4. На протяжении всего эксперимента животные получают стандартный корм согласно МУ 1.2.2520—09 «Токсикологогигиеническая оценка безопасности наноматериалов» в режиме свободного доступа. Доступ к воде также не ограничивают.

4.6.5. На протяжении всего периода эксперимента осуществляют введение препарата наноматериала одной серии (лота) одного производителя. При введении наноматериала и контрольных материалов (препаратов) применяют идентичные методы введения на протяжении всего эксперимента.

4.6.6. На протяжении всего эксперимента ежедневно взвешивают животных на технических весах с точностью ± 1 г. Определяют абсолютный и относительный прирост массы тела животных за каждую неделю и за весь период эксперимента в целом.

4.6.7. Ежедневно проверяют наличие погибших животных в каждой из групп. Погибших животных в день выявления подвергают вскрытию в целях установления причины смерти и выявления посмертных изменений в морфологии внутренних органов.

4.6.8. По окончании периода введения наноматериалов и контрольных препаратов животных всех групп подвергают эвтаназии. Животных

взвешивают, вскрывают, удаляют внутренние органы и определяют их массу на лабораторных весах с точностью ± 0,01 г. Биоптаты органов отбирают для морфологического исследования согласно плану эксперимента.

4.6.9. Набор отбираемых у животных биосубстратов и перечень применяемых при их анализе лабораторных тестов устанавливаются МУ 1.2.2520—09 «Токсиколого-гигиеническая оценка безопасности наноматериалов».

4.6.10. Отбор и хранение проб биосубстратов для определения токсического действия наноматериалов осуществляют согласно МУ 1.2.2745—10 «Порядок отбора проб для характеристики действия наноматериалов на лабораторных животных» с использованием методик, утверждённых в установленном порядке. При хранении и консервации проб не допускается использование консервирующих добавок, способных повлиять на результаты определения тестируемых биохимических, гематологических, физиологических и иммунологических показателей. Отбор всех проб протоколируется в лабораторном журнале в установленном порядке. Копии протоколов отбора проб направляются в подразделения организации, производящей исследование, вместе с предназначенными к анализу образцами.

4.6.11. Результаты лабораторных анализов проб, отобранных от животных, подвергнутых воздействию наноматериалов, подвергают статистической обработке с целью установления различий в показателях между экспериментальными группами.

4.6.12. Статистическую обработку результатов измерений биохимических, физиологических, гематологических, иммунологических и других показателей животных проводят по единому плану, включающему следующие пункты.

4.6.12.1. Описательную статистику: расчёт выборочного среднего (M), выборочного стандартного отклонения (S), выборочной ошибки среднего (m), медианы распределения (Med), 10-го и 90-го перцентиля (для групп численностью не менее 10 животных), максимального и минимального значения выборки.

4.6.12.2. Проверку однородности распределения изучаемого показателя между экспериментальными группами животных с использованием одностороннего теста ANOVA и критерия Краскалла-Уоллеса.

4.6.12.3. Проверку достоверности различия между контрольной группой и группами, получавшими наноматериалы, с использованием критериев непараметрической статистики – тестов Манна-Уитни и Колмогорова-Смирнова.

4.6.12.4. Проверку достоверности различия между группами животных, получавших наноматериал, и группами, получавшими носитель наноматериала, и группами, получавшими в эквивалентных количествах химический аналог наноматериала традиционной степени дисперсности (при его наличии).

4.6.12.5 Факторный анализ распределения изучаемого показателя с помощью одностороннего теста ANOVA (в качестве факторов рассматриваются: наличие наноматериала, наличие его химического аналога безотносительно степени дисперсности, наличие носителя).

4.6.13. Эффект наноматериала (воздействие на выбранный показатель организма животного) считается выявленным при достоверности различия контрольной и опытной групп (вероятности принятия нуль-гипотезы) на уровне P = 0,05 и менее.

4.6.14. Эффект (воздействие) наноматериала на изучаемый показатель жизнедеятельности животного рассматривается как специфический, если: а) он не проявляется при воздействии на организм носителя наноматериала или его химического аналога традиционной степени дисперсности или б) он проявляется при сравнении групп животных, получавших в эквивалентных количествах наноматериал и его традиционный аналог.

4.6.15. Эффект (воздействие) наноматериала на изучаемый показатель жизнедеятельности животного рассматривается как дозозависимый, если он: а) не проявляется при меньших дозах наноматериала, но может быть выявлен при максимальной дозе или б) достоверно более выражен при больших дозах вводимого наноматериала по сравнению с меньшими.

4.6.16. Перечень выявленных специфических эффектов наноматериала при его подостром или хроническом введении животным с указанием изучаемых показателей, использованных тест-систем и выявленной зависимости от дозы приводится в заключении отчёта по результатам проведённого токсиколого-гигиенического исследования.

4.7. Порядок проведения специальных исследований по изучению токсического действия наноматериала

4.7.1. Целью проводимых исследований является выявление у наноматериалов специальных видов токсичности, проявляемых через отдалённые по времени воздействия на организм, таких как аллергенность, иммунотоксичность, репродуктивная токсичность, эмбриотоксичность, тератогенность, мутагенность, канцерогенность. К специальным видам исследования относится также выявление токсических эффектов, прояв-

ляющихся системно при тестировании интегральных физиологических показателей и поведенческих реакций животного.

4.7.2. Объектом специальных исследований являются новые виды наноматериалов.

4.7.3. Изучение мутагенных свойств, репродуктивной токсичности, эмбриотоксического и тератогенного действия, иммунотоксического действия, потенциальной аллергенности наноматериала проводят согласно МУ 1.2.2520—09 «Токсиколого-гигиеническая оценка безопасности наноматериалов».

4.7.4. Канцерогенное действие наноматериалов изучают в соответствии с ГОСТ Р ИСО 10993 п. 5.3.3.

4.7.5. Воздействие наноматериалов на интегральные физиологические показатели животных оценивают согласно МУ 1.2.2635—10 «Медико-биологическая оценка безопасности наноматериалов».

4.8. Обеспечение биологической безопасности при оценке токсичности наноматериалов на лабораторных животных

4.8.1. Наноматериалы, проходящие исследования, выделения животных, подвергнутых воздействию наноматериалов, биологические образцы, полученные от животных, обработанных наноматериалами, должны рассматриваться как потенциально опасные. Допускается их утилизация только в порядке, предусмотренном СОП, разработанными для лаборатории, проводящей исследования токсичности наноматериалов.

4.8.2. Не допускается утилизация наноматериалов и загрязнённых ими биологических образцов с бытовым мусором и канализационными стоками.

4.8.3. Персонал, проводящий введение наноматериалов животным, должен пользоваться спецодеждой (лабораторный халат, лабораторная обувь) и СИЗ (марлевая повязка, респиратор с HEPA-фильтром, перчатки из полимера или латекса, защитные очки или щиток для лица). Следует избегать попадания дисперсий наноматериалов, вводимых животным, на незащищённую кожу и слизистые оболочки. В случае попадания наноматериала на незащищённую кожу и слизистые он должен быть удалён путём промывки большим объёмом водопроводной воды, после чего необходимо обратиться к врачу.

4.8.4. Манипуляции с сухими (порошкообразными) наноматериалами – дозирование, приготовление дисперсий, заправка генераторов аэрозоля – должны проводиться в перчаточных боксах, изолированных

от атмосферы производственного помещения и снабжённых шлюзами для транспортирования образцов.

4.8.5. Воздух, загрязнённый аэрозолями наноматериала, поступающий из затравочных камер, следует сбрасывать в атмосферу производственных помещений и во внешнюю среду после очистки, состоящей в пропускании через HEPA-фильтр и последовательно подсоединённые склянки с поглощающими жидкостями (концентрированной серной кислотой, 1N раствором NaOH).

4.8.6. Утилизация трупов животных, обработанных наноматериалами, допускается только в установленном порядке специализированными организациями, имеющими лицензию на данный вид деятельности.

4.8.7. При работе с наноматериалами биогенного происхождения следует придерживаться требований безопасности при работе с биологическими объектами, включенными в группу опасных и вредных производственных факторов согласно ГОСТ 12.0.003—74, а также требований к исследованию и контролю биологических образцов, основой или продуцентами которых являются микроорганизмы, биологические жидкости, ткани и органы, культуры клеток и тканей согласно СП 1.3.2322—08 и СП 1.3.1285—03.

4.8.8. Персонал, проводящий исследования токсического действия наноматериалов, проходит регулярное плановое обучение технике безопасной работы с наноматериалами и находится под руководством специалиста, имеющего опыт подобной работы. План проведения занятий по правилам техники безопасности составляется руководителем подразделения, проводящего исследования, и утверждается руководителем организации (испытательной лаборатории).

4.8.9. Транспортирование биологических проб, полученных от животных, обработанных наноматериалами, допускается только в специальных контейнерах, которые должны быть опечатаны, промаркированы и размещены внутри специальной тары для транспортирования. Эта тара должна иметь крышку, быть небьющейся и иметь маркировку биологически опасного материала, например:



Наноопасность



биоопасность

Приложение 1

Типовой протокол эксперимента по изучению токсического действия наноматериалов на лабораторных животных

Протокол эксперимента по выявлению и идентификации наноматериалов в биологических образцах, органах и тканях, полученных в эксперименте на лабораторных животных

от «____» _____20 ____ г.

Наименование и адрес заявителя: _____

Наименование и адрес организации, которая производила отбор проб (образцов) _____

Наименование и адрес организации, проводящей изучение токсического действия наноматериалов _____

Наличие информации, представленной заявителем _____

Наличие сведений о свойствах наноматериала _____

Наличие сведений о традиционном аналоге _____

Наличие растворителя, разбавителя, эмульгатора и т. д. _____

- концентрация;
- стабильность;
- объем.

Используемые животные:

- вид, линия, пол;
- число животных в группе;
- перечень групп и контролей.

Дата введения наноматериала _____

Наименование вводимого наноматериала _____

- доза введения;
- способ введения;
- схема введения;
- время между введениями.

Наименование традиционного аналога наноматериала _____

- доза;
- способ введения;
- время между введениями.

Дата отбора проб на исследование _____

Наименование исследуемого материала (пробы) _____

Единица измерений проб (объем, масса) _____

Размер партии _____
Метод отбора _____
Способ консервации пробы _____
Количество отобранных образцов _____
- из них контрольных;
- лабораторных.

Дата исследования материала от животных _____
Метод исследования пробы _____

_____

Метод статистической обработки результатов:

Результаты исследований в виде данных:

Сводная таблица результатов исследования

№ пробы	Наименование исследуемого материала проба\объем (масса)	Метод изучения токсического действия наноматериалов	Результаты оценки токсического действия наноматериалов

Подписи:
От организации, проводившей отбор проб _____

От организации, проводившей исследование проб _____

Приложение 2

Обозначения и сокращения

МР – методические рекомендации
МУ – методические указания
СИЗ – средства индивидуальной защиты
СОП – стандартные операционные процедуры
СП – санитарные правила
CL_{xx} – концентрация, отвечающая XX %-й летальности
LD_{xx} – доза, отвечающая XX %-й летальности

Порядок оценки токсического действия наноматериалов на лабораторных животных

Методические указания
МУ 1.2.2869—11

Редактор Е. В. Николаева
Технический редактор Г. И. Климова

Подписано в печать 20.07.11

Формат 60x88/16 Печ. л. 1,5
Тираж 200 экз. Заказ 99

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