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

Государственная система
санитарно–эпидемиологического
нормирования Российской Федерации

БЮЛЛЕТЕНЬ

НОРМАТИВНЫХ И МЕТОДИЧЕСКИХ ДОКУМЕНТОВ

ГОССАНЭПИДНАДЗОРА

ИЗДАНИЕ ОФИЦИАЛЬНОЕ

МОСКВА — 2009

Год издания 10-й

Выпуск 4 (38)
Декабрь

gost.e-ecolog.ru

ISBN 5—7508—0247—7

УЧРЕДИТЕЛИ

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

Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

Главный редактор Г. Г. Онищенко

Е. Н. Беляев,
А. И. Верещагин,
Л. П. Гульченко,
С. И. Иванов,
Г. Ф. Лазикова,
С. С. Перель,
Г. С. Перминова,
М.П. Шевырева,
Н. В. Шестопалов

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

А. Х. Агиров (Майкоп),
Г. В. Айдинов (Ростов-на-Дону),
В. А. Алешкин (Москва),
А. А. Баранов (Москва),
Н. Н. Верещагин (Оренбург),
А. Л. Гинцбург (Москва),
В. В. Губернаторова (Иваново),
В. И. Евдокимов (Белгород),
Н. А. Забродин (Ижевск),
А. И. Заиченко (Москва),
Н. Ф. Измеров (Москва),
О. Л. Гавриленко (Московская область),
И. В. Корабельников (Сыктывкар),
С. В. Куркатов (Красноярск),
Г. И. Куценко (Москва),
В. Р. Кучма (Москва),
Б. В. Лимин (Вологда),
Г. Д. Минин (Уфа),
Б. И. Никонов (Екатеринбург),
В. И. Покровский (Москва),
А. И. Потапов (Москва),
Ю.А. Рахманин (Москва),
С. И. Савельев (Липецк),
И. П. Салдан (Барнаул),
В. Р. Саухат (Магадан),
В. П. Сергиев (Москва),
В. А. Тутельян (Москва),
Н. Н. Филатов (Москва),
В. П. Чащин (Санкт-Петербург),
М. И. Чубирко (Воронеж),
М. Г. Шандала (Москва)

Подписка на *Бюллетень нормативных и методических документов госсанэпиднадзора* принимается во всех почтовых отделениях России.
Подписной индекс в каталоге *Газеты и журналы* – **79682**;
годовой – **79683**

Адрес редакции:

117105, Москва, Варшавское ш., 19а
Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора

БЮЛЛЕТЕНЬ НОРМАТИВНЫХ И МЕТОДИЧЕСКИХ ДОКУМЕНТОВ ГОССАНЭПИДНАДЗОРА

Выпуск 4 (38), декабрь 2009
Издается с 2000 г.

ПРИКАЗЫ
ПОСТАНОВЛЕНИЯ
НОРМАТИВНЫЕ ПРАВОВЫЕ АКТЫ
МЕТОДИЧЕСКИЕ ДОКУМЕНТЫ

Зарегистрирован Министерством Российской Федерации по делам печати, телерадиовещания и средств массовых коммуникаций

Номер регистрационного свидетельства 77—1525

Подписано в печать 10.12.09.

Формат 60x88/8, печ. л. 18,0, заказ № 992, тираж 1400 экз.

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
отделом издательского обеспечения
Федерального центра гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора
117105 Москва, Варшавское ш., 19а

Отпечатано с готовых диапозитивов
в ОАО "Орехово-Зуевская типография"
г. Орехово-Зуево, Моск. обл., ул. Дзержинского, д. 1
E-mail:ti gost.e-ecolog.ru

Отделение реализации, тел. 952-5089, e-mail: gost.e-ecolog.ru

© Роспотребнадзор, 2009
© Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2009

СОДЕРЖАНИЕ

ПРИКАЗЫ И ПОСТАНОВЛЕНИЯ

Приказ Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека от 24.09.2009 № 621 «Об организации приема и учета уведомлений о начале осуществления отдельных видов предпринимательской деятельности» 4

Постановление Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 04.08.2009 № 50 «О мерах по реализации полномочий единой федеральной централизованной системы государственного санитарно-эпидемиологического надзора в области обеспечения биологической и химической безопасности» 6

НОРМАТИВНЫЕ ПРАВОВЫЕ АКТЫ

Безопасность работы с микроорганизмами III—IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней: СП 1.3.2322—08 13

Безопасность работы с микроорганизмами III—IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней. Дополнения и изменения 1 к СП 1.3.2322—08: СП 1.3.2518—09 67

Гигиенические требования к организации химической чистки изделий: СанПиН 2.2.2506—09 73

Профилактика холеры. Общие требования к эпидемиологическому надзору за холерой на территории Российской Федерации: СП 3.1.1.2521—09 91

МЕТОДИЧЕСКИЕ ДОКУМЕНТЫ

Токсиколого-гигиеническая оценка безопасности наноматериалов: МУ 1.2.2520—09 117

1.2. ГИГИЕНА, ТОКСИКОЛОГИЯ, САНИТАРИЯ

Токсиколого-гигиеническая оценка безопасности наноматериалов

Методические указания
МУ 1.2.2520—09

1. Разработаны Федеральной службой по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Г. Г. Онищенко); ГУ НИИ питания РАМН (В. А. Тутельян, С. А. Хотимченко, И. В. Гмошинский, И. В. Аксенов, Е. А. Арианова, В. В. Бессонов, В. М. Верников, М. М. Гаппаров, О. И. Передеряев); ГУ НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Почетного академика Н. Ф. Гамалеи РАМН (А. Л. Гинцбург, Б. С. Народицкий, М. М. Шмаров, Д. Ю. Логунов); Московским государственным университетом им. М. В. Ломоносова (М. П. Кирпичников, К. В. Шайтан, А. П. Бонарцев, А. В. Феофанов, В. В. Воинова); Федеральным научным центром гигиены им. Ф. Ф. Эрисмана Роспотребнадзора (А. И. Потапов, В. Н. Ракитский, А. В. Тулакин, Т. В. Юдина, Л. А. Луценко, Т. К. Татянюк, Г. В. Цыплакова, Л. П. Терешкова, О. В. Жигайло, Н. С. Белоедова, К. Б. Лохин, Н. И. Николаева, И. П. Громова, Е. В. Сарафанюк); Институтом биохимии им. А. Н. Баха РАН (В. О. Попов, Б. Б. Дзантиев, А. В. Жердев); ООО «Интерлаб» (А. Н. Веденин, Г. В. Казыдуб).

2. Рекомендованы к утверждению Комиссией по государственному санитарно-эпидемиологическому нормированию при Федеральной службе по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (протокол от 24 марта 2009 г. № 1).

3. Утверждены Руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным санитарным врачом Российской Федерации Г Г. Онищенко 05 июня 2009 г.

4. Введены в действие с 05 июня 2009 г.

5. Введены впервые.

Содержание

1. Область применения 120

2. Нормативные ссылки 120

3. Общие положения 121

4. Экспертный анализ и оценка данных, характеризующих заявленные свойства наноматериалов 124

5. Токсиколого-гигиеническая оценка безопасности наноматериалов 125

6. Схема проведения экспериментов по изучению общетоксического действия наноматериалов 128

7. Проведение исследований по изучению отдаленных эффектов действия наноматериалов 138

8. Иммунологические исследования и оценка потенциальной аллергенности наноматериалов 141

УТВЕРЖДАЮ
Руководитель Федеральной службы
по надзору в сфере защиты прав
потребителей и благополучия человека,
Главный государственный санитарный врач
Российской Федерации
Г. Г. Онищенко
05 июня 2009 г.
Дата введения: 05 июня 2009 г.

1.2. ГИГИЕНА, ТОКСИКОЛОГИЯ, САНИТАРИЯ

Токсиколого-гигиеническая оценка безопасности наноматериалов

Методические указания
МУ 1.2.2520—09

1. Область применения

1.1. Настоящие методические указания устанавливают требования к проведению токсиколого-гигиенических исследований по оценке безопасности наноматериалов.

1.2. Требования, изложенные в настоящих методических указаниях, применяются при осуществлении государственной регистрации продукции, полученной с использованием нанотехнологий или содержащей наноматериалы, впервые разрабатываемой и внедряемой для промышленного изготовления на территории Российской Федерации на этапе ее подготовки к производству, а также впервые ввозимой и ранее не реализовывавшейся – до ее ввоза на территорию Российской Федерации.

1.3. Методические указания разработаны с целью обеспечения единой, научно обоснованной системы токсиколого-гигиенической оценки безопасности наноматериалов.

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 и учреждениями, аккредитованными в установленном порядке.

2. Нормативные ссылки

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

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

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

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

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

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

2.7. Постановление Правительства Российской Федерации от 18 мая 2002 г. № 320 «О подписании Российской Федерацией Стокгольмской конвенции о стойких органических загрязнителях».

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

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

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

2.11. Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 19 июня 2003 г. № 267 «Об утверждении Правил лабораторной практики» (зарегистрирован Минюстом России 25 июня 2003 г. № 4809).

2.12. Приказ Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека от 19 июля 2007 г. № 224 «О санитарно-эпидемиологических экспертизах, обследованиях, исследованиях, испытаниях и токсикологических, гигиенических и иных видах оценок» (зарегистрирован Минюстом России 20 июля 2007 г. № 9866).

3. Общие положения

3.1. Проведение настоящих исследований определяется правилами надлежащей лабораторной практики.

3.2. Требования к исследуемым наноматериалам.

3.2.1. Комплект документов на исследуемый наноматериал представляется заказчиком в соответствии с п. 4.1 настоящих методических указаний с обозначением условий и сроков хранения, данных по стабильности, информации о мерах по обеспечению безопасности работы с исследуемым наноматериалом, растворителей и процедуры растворения или диспергирования.

3.2.2. Наноматериалы для проведения токсиколого-гигиенических исследований представляются заказчиком.

3.2.3. Исследуемый наноматериал должен быть упакован для защиты при транспортировании от загрязнения или порчи.

3.2.4. Метод обнаружения, идентификации и количественного определения наноматериалов, позволяющий отличить их от аналогичных веществ в традиционной форме, представляется изготовителем.

3.2.5. Хранение исследуемых образцов наноматериалов осуществляется отдельно от веществ, реактивов, препаратов сравнения в соответствии с рекомендациями заказчика, с соблюдением условий хранения, указанных изготовителем на весь период срока годности.

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

3.3. Требования к лабораторным животным и уходу за ними.

3.3.1. Все токсикологические исследования проводятся только на здоровых животных, прошедших карантин.

3.3.2. Все процедуры, связанные с уходом за лабораторными животными, подробно описываются в стандартных операционных процедурах в п. 3.9 настоящих методических указаний.

3.3.3. Поступающих животных необходимо изолировать для оценки состояния здоровья. Источники их поступления, условия и дата поступления должны быть документально оформлены. Все мероприятия, принимаемые в случае ухудшения состояния здоровья животных и их гибели, не связанной с проведением исследования, осуществляются в соответствии с утвержденным протоколом исследования и должны быть документированы.

3.3.4. Для обеспечения индивидуального наблюдения в процессе выполнения исследования животные должны быть идентифицированы путем их маркировки. Все клетки, вольеры, контейнеры, предназначенные для содержания животных, также подлежат маркировке. Животные, предназначенные для исследования различных наноматериалов, изолируются друг от друга.

3.3.5. Места содержания животных и производственные помещения подвергаются периодической санитарной обработке, за исключением указанных в утвержденном протоколе исследования средств, способных оказать влияние на результаты исследования.

3.4. Требования к помещениям, кормам и инвентарю должны соответствовать правилам лабораторной практики.

3.4.1. Помещения, предназначенные для проведения токсиколого-гигиенических исследований наноматериалов, должны располагаться таким образом, чтобы обеспечить возможность выполнения проводимых исследований в полном объеме в соответствии с утвержденным протоколом исследования.

3.4.2. Помещения для лабораторных животных должны:

- обеспечивать изоляцию (карантин) поступающих животных, больных животных и животных, подозреваемых в носительстве инфекций;
- позволять осуществлять раздельное содержание различных видов животных и животных одного вида, являющихся объектом исследования различных наноматериалов;
- соответствовать санитарно-эпидемиологическим и ветеринарным требованиям.

3.4.3. Корма, оборудование и инвентарь для ухода за животными необходимо хранить в помещениях, изолированных от мест содержания животных. Помещения для проведения исследований наноматериалов, в т. ч. для работы с опасными для здоровья и жизни человека объектами исследования, должны соответствовать установленным санитарно-эпидемиологическим требованиям.

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

3.5. Требования к используемому оборудованию.

3.5.1. Организации, проводящие токсиколого-гигиенические исследования наноматериалов, должны быть оснащены необходимым оборудованием, прошедшим метрологический контроль и калибровку в установленном порядке.

3.5.2. Эксплуатация оборудования проводится в соответствии с техническим паспортом и инструкцией по применению. Результаты проведения калибровки и текущего ремонта оборудования фиксируются в специальном журнале, доступном в любое

время сотрудникам, эксплуатирующим оборудование или обеспечивающим его обслуживание.

3.6. Планирование и проведение исследований.

3.6.1. Токсиколого-гигиенические исследования наноматериалов проводятся по утвержденному плану с ведением протокола и составлением отчета, в который заносятся все результаты исследований.

3.6.2. Токсикологические исследования наноматериалов на животных проводятся в соответствии с установленными правилами. Исполнителем должен быть обеспечен контроль за соблюдением правовых и этических норм использования лабораторных животных при проведении исследований наноматериалов в соответствии с утвержденным протоколом.

3.6.3. Токсиколого-гигиенические исследования по оценке безопасности наноматериалов проводятся в соответствии с утвержденным протоколом. Протокол исследования утверждается руководителем организации, проводящей исследования, и включает: цель и задачи исследования, имеющиеся сведения об исследуемом наноматериале (физические, химические, биологические, токсикологические свойства), условия хранения и использования исследуемых наноматериалов, сведения о контрольном материале традиционной степени дисперсности (если таковой имеется), схему исследования и обоснование избранной схемы исследования, методы исследования, способы и пути введения исследуемого и контрольного образцов, критерии оценки безопасности исследуемого наноматериала, результаты исследований, статистическую обработку результатов исследования, заключение, список используемой литературы.

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

3.7. Требования к оформлению отчета.

3.7.1. По окончании проведенных токсиколого-гигиенических исследований оформляется отчет, в котором должны быть представлены: название, адрес организации-исполнителя, даты начала и завершения исследований, цель и задачи исследования; описание исследуемого наноматериала, включая имеющиеся сведения о физических, химических, биологических, токсикологических свойствах; вид, возраст, количество животных в каждой группе, пол, показатели массы тела, источник питания; режим дозирования, форма, кратность и путь введения исследуемого наноматериала; схема проведения исследования наноматериала; описание методов статистической обработки результатов, результаты исследования, представленные в виде обобщающих таблиц, рисунков с соответствующей статистической обработкой, и комментариев к ним, обсуждение результатов, выводы, список использованной литературы.

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

3.8. Система обеспечения качества токсиколого-гигиенических исследований по оценке безопасности наноматериалов.

3.8.1. Контроль за качеством проведения токсиколого-гигиенических исследований наноматериалов включает в себя оформление перечня исследований, проводимых в организации, с указанием для каждого исследования руководителя и заказчика, названия исследуемого наноматериала, даты начала и состояния каждого исследования на текущий момент времени, оценку протоколов и методов исследования на соответствие

правилам лабораторной практики, мониторинг текущих исследований, отчет о проведенных проверках и рекомендации по устранению недостатков.

3.8.2. Для осуществления контроля качества руководство организации, проводящей токсиколого-гигиенические исследования по оценке безопасности наноматериалов, назначает в соответствии с правилами надлежащей лабораторной практики ответственных лиц за мониторинг исследования из числа сотрудников, не участвующих в исследовании.

3.9. Стандартные операционные процедуры.

3.9.1. Стандартные операционные процедуры разрабатываются организацией, проводящей исследования наноматериалов, на все производственные операции, в т. ч. поступление, идентификацию, маркировку, обработку, отбор проб, использование и хранение исследуемых веществ; обслуживание и калибровку измерительных приборов и оборудования для контроля окружающей среды; приготовление реактивов, кормов; ведение записей, отчетов и их хранение; обслуживание помещений; при необходимости обезвреживание или утилизацию наноматериалов; осуществление программы по обеспечению качества, и утверждаются руководителем организации.

3.9.2. Соблюдение стандартных операционных процедур осуществляется в целях обеспечения качества, достоверности и воспроизводимости результатов исследования.

3.9.3. Отклонения от стандартных операционных процедур должны быть документально оформлены и согласованы с руководителем исследования.

3.9.4. Организация, проводящая исследование наноматериалов, должна:

- иметь утвержденный порядок приема и учета поступления наноматериалов;
- проводить учет наноматериалов при поступлении, расходовании, возврате заказчику или их утилизации;
- принимать меры по обеспечению идентификации исследуемых веществ (указание на упаковке названия, химической формулы, номера серии, даты выпуска, условий хранения и сроков годности) и их стабильности на протяжении всего исследования.

3.10. Меры конфиденциальности.

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

3.10.2. Организация, проводящая исследования наноматериалов, должна обеспечить конфиденциальность результатов исследований в рамках принятых ею обязательств и в соответствии с законодательством Российской Федерации.

4. Экспертный анализ и оценка данных, характеризующих заявленные свойства наноматериалов

4.1. Общая характеристика наноматериалов включает анализ информации, представленной заявителем:

- область применения и рекомендуемые уровни внесения;
- торговое, химическое наименование наноматериала;
- точное название, адрес, реквизиты изготовителя;
- метод получения;
- состав наноматериала (название и формула(ы) вещества или веществ, входящих в его состав, его (их) молекулярная масса);
- сведения об идентичности представленного образца выпускаемой продукции;
- нормативно-техническая документация на отечественную продукцию, включая все конструкционные элементы;

• протоколы отдельных разделов токсиколого-гигиенических испытаний на безопасность продукции (если таковые имеются), выполненных в аккредитованных лабораториях;

• специфический метод определения наноматериалов в продукции;

• подробная рецептура композиции для оценки многокомпонентных материалов, если наноматериал находится в растворителе или на носителе;

• реквизиты импортной продукции дополнительно должны содержать: сертификаты фирмы-производителя о безопасности продукции, протоколы испытаний в аккредитованных лабораториях (центрах) зарубежных стран;

• физические характеристики наноматериалов (размер и распределение по размеру частиц, форма частиц, площадь поверхности, пористость, агрегатное состояние);

• физико-химические характеристики наноматериалов (растворимость в воде и биологических жидкостях, заряд частиц, кристаллическая структура, адсорбционная емкость, устойчивость к агрегации, гидрофобность, адгезия наночастиц к поверхности, химическая активность (в т. ч. способность генерировать свободные радикалы), способность к биодеструкции;

• молекулярно-биологические характеристики (взаимодействие с ДНК, РНК, клеточными мембранами, белками);

• цитологические характеристики (цитотоксичность, способность к накоплению в клетках, влияние на протеомный и метаболомный профиль);

• токсикологические характеристики (потенциальные пути проникновения в организм, острая токсичность, подострая токсичность, хроническая токсичность, кумулятивное действие, местнораздражающее действие, отдаленные эффекты (мутагенность, эмбриотоксичность, тератогенность, канцерогенность), иммунотоксичность, аллергенность, накопление в органах и тканях, проницаемость барьеров организма для токсикантов, проникновение через барьеры организма);

• разрешение уполномоченных органов страны-изготовителя на использование наноматериалов в странах-импортерах.

Все данные должны быть представлены на русском языке, а сведения о химическом составе материала – в соответствии с систематической номенклатурой IUPAC.

4.2. Анализ результатов оценки безопасности наноматериалов проводится на основании данных ранее проведенных исследований (если такие исследования проводились) и литературных данных, представленных заявителем.

4.3. Предварительная оценка степени потенциальной опасности наноматериалов проводится в зависимости от класса их опасности.

4.4. Объем проводимых исследований наноматериалов определяется в зависимости от степени их потенциальной опасности.

5. Токсиколого-гигиеническая оценка безопасности наноматериалов

5.1. Перечень и объем токсиколого-гигиенических исследований определяются экспертными (учеными) советами соответствующих аккредитованных испытательных центров Российской Федерации на основании анализа представленных материалов и оценки степени потенциальной опасности наноматериалов.

5.2. Гигиенические исследования наноматериалов включают определение показателей качества и безопасности:

• содержание основного вещества;

• содержание примесей;

• содержание растворителей или носителей (если они использовались);

• при необходимости содержание токсичных элементов, пестицидов, радионуклидов, микробиологические и другие показатели.

5.3. Токсикологические исследования наноматериалов проводятся в эксперименте на здоровых половозрелых животных, прошедших карантин в течение не менее 10 дней.

5.4. Токсикологические исследования можно проводить как на линейных (крысы линий Wistar, Sprague-Dawley и др.; мыши линий СВА, С57В1/6 и др.), так и нелинейных животных. В случае использования линейных животных необходимо указать линию животных.

5.5. Количество животных в группе зависит от целей исследования, но не должно быть менее 10 особей в группе.

5.6. Разброс по исходной массе тела животных в группе не должен превышать ± 10 %.

5.7. В течение всего эксперимента животные должны иметь свободный доступ к корму и питьевой воде.

5.8. Для унификации исследований животные на протяжении всего эксперимента получают полусинтетический рацион. Продуктовый набор рациона представлен в таблицах 1—4.

Таблица 1

Состав полусинтетического рациона

Компоненты	Масса ингредиентов (г на 100 г диеты)
Казеин	20,0
Крахмал маисовый	63,5
Масло растительное (подсолнечное)	5,0
Лярд	5,0
Солевая смесь	3,5
Сухая смесь водорастворимых витаминов	0,9
Смесь жирорастворимых витаминов (масляный раствор)	0,1
Микрокристаллическая целлюлоза	2,0

Таблица 2

Смесь жирорастворимых витаминов

Витамины	Объем (мл на 100 мл смеси)
Витамин Е (токоферол 50 мг/мл)	10
Витамин А (ретинол 100 000 и.е./мл)	1,4
Витамин D (эргокальциферол 50 000 и.е./мл)	1,4
Рыбий жир	87,2

Таблица 3

Смесь водорастворимых витаминов

Витамины	Содержание (мг на 100 г смеси)
Тиамин гидрохлорид	500
Рибофлавин	500
Пиридоксин гидрохлорид	500
Никотинамид	2 000
Кальция пантотенат	2 000
Фолиевая кислота	200
Биотин	10
Викасол, 1 %	100
Цианокобаламин	1,5
Сахароза	до 100 г

Таблица 4

Смесь минеральных солей

Минеральные соли	Содержание, (г на 100 г смеси)
Кальций фосфорнокислый, $Ca_3(PO_4)_2$	50,0
Натрий хлористый, NaCl	7,4
Калий лимонно-кислый моногидрат, $C_6H_5O_7K_3 \times H_2O$	22,0
Калий серно-кислый, K_2SO_4	5,2
Магний окись, MgO	2,4
Марганец углекислый, (Mn 43—48%)	0,35
Железо лимонно-кислое, $C_6H_5O_7Fe$ (Fe 16—17 %)	0,6
Цинк углекислый, $ZnCO_3$ (Zn 70 %)	0,16
Медь углекислая, (Cu 53—55 %)	0,03
Йодисто-кислый калий, KIO_3	0,001
Селенисто-кислый натрий, Na_2SeO_3	0,001
Хромовокалиевые квасцы, $CrK(SO_4)_2 \times 12H_2O$	0,058
Сахароза (высокоочищенная)	11,8

5.9. Данные исследования проводятся с целью установления уровней воздействия, при которых не наблюдаются вредные эффекты (NOAEL или NOEL), которые могут быть использованы для обоснования допустимого суточного поступления, допустимых пределов содержания наноматериалов в пищевых продуктах, воде и воздухе.

6. Схема проведения экспериментов по изучению общетоксического действия наноматериалов

6.1. Определение острой токсичности.

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

6.1.1. Количество мелких лабораторных животных в группе должно обеспечить возможность вычисления LD_{50}, CL_{50} и кожно-резорбтивного действия (не менее 10 особей в группе).

6.1.2. Введение наноматериалов лабораторным животным осуществляется путем, который предполагается при использовании наноматериалов в дальнейшем или при котором наноматериал воздействует на человека: наноматериалы для приема внутрь вводятся в составе корма или зондом; для местного применения – наносят на кожу; при ингаляционном введении лабораторных животных помещают в затравочные камеры, снабженные специальными затравочными устройствами, или применяют внутритрахеальное, внутриглоточное или внутригортанное ингаляционное введение с использованием специальных устройств. Количество наноматериала рассчитывают на единицу массы тела животного или на площадь поверхности при нанесении на кожу или в мг/м^3 при ингаляционном воздействии. Для выражения количества наноматериала используют единицы массы наноматериала (мг). Дополнительно для выражения количества наноматериала можно использовать такие параметры, как отношение количества частиц к массе наноматериала (10^{12}мг$^{-1}$) и отношение площади поверхности частиц к массе наноматериала (см^2/мг).

6.1.3. Если наноматериалы находятся в растворителе или на носителе, то заказчиком исследования представляются токсикологические характеристики этого растворителя или носителя. При необходимости проводятся исследования острой токсичности самого растворителя (носителя), который вводится перорально, ингаляционно или наносится на кожу (в зависимости от предполагаемого пути поступления исследуемого наноматериала) в той же дозировке, что и в составе исследуемого образца наноматериала.

6.1.4. Для изучения острой токсичности используют белых крыс с исходной массой тела 180—240 г или мышей с исходной массой тела 18—24 г (отдельно самцов и самок).

6.1.5. Общая продолжительность наблюдения составляет 14 дней, при этом фиксируются общее состояние животных, клиническая картина интоксикации и гибели, характер двигательной активности и походки, наличие и характер судорог, тонус скелетных мышц, реакция на различные раздражители, частота и глубина дыхательных движений, ритм сердечных сокращений, состояние волосяного и кожного покрова, положение хвоста, частота мочеиспускания и окраска мочи, потребление корма и воды, изменения массы тела. Регистрируется время гибели животных, при этом у всех погибших животных проводятся макроскопическое и микроскопическое исследование внутренних органов.

6.1.6. Основные параметры острой токсичности могут быть вычислены с помощью любых статистических методов, например, методом Линфилда и Уилкоксона.

6.1.7. При определении острой токсичности вычисляются LD_{16}, LD_{50} и LD_{84} (при введении в желудок) или CL_{16}, CL_{50} и CL_{84} (при ингаляционном введении) отдельно для самцов и самок.

6.1.8. Параметры острой токсичности выражают в мг/кг массы тела при пероральном пути введения или в мг/м^3 при ингаляционном пути введения.

6.1.9. Если из-за низкой токсичности испытуемого наноматериала нельзя определить LD_{50}, то указывается максимальная доза, которая была введена животным.

6.2. Изучение кумуляции.

6.2.1. Изучение кумуляции проводится на взрослых белых крысах или мышах в течение (24 ± 4) дней по Лиму или в течение 2-х мес. по Кагану Ю. С., Станкевичу В. В.

6.2.2. Для изучения кумуляции используют белых крыс с исходной массой тела 180—240 г или мышей с исходной массой тела 18—24 г. Интегральный показатель – смертность животных. При использовании метода Кагана Ю. С., Станкевича В. В. кроме смертности оцениваются физиологические, биохимические, гематологические и другие показатели.

6.2.3. Схема проведения исследования.

В первые 4 дня вводится доза, равная 0,1 от установленной LD_{50}. В следующие 4 дня доза увеличивается в 1,5 раза, в следующие 4 дня – еще в 1,5 раза и т. д. При использовании метода Кагана Ю. С., Станкевича В. В. – исследуемый наноматериал вводят в дозе 0,1 LD_{50} в течение 2-х мес.

6.2.4. Коэффициент кумуляции вычисляется как отношение средней смертельной дозы при n-кратном введении к средней смертельной дозе при однократном введении.

6.2.5. Величина коэффициента менее 1 свидетельствует о наличии кумулятивных свойств, а более 1 – об эффекте привыкания при использовании метода Лима. В случае использования метода Кагана Ю. С., Станкевича В. В. используется следующая классификация опасности:

- 1 класс (чрезвычайно опасные) – < 1;
- 2 класс (высоко опасные) – 1—3;
- 3 класс (умеренно опасные) – 1—5;
- 4 класс (мало опасные) – > 5.

6.3. Определение подострой токсичности.

Целью является получение информации об основных токсических эффектах наноматериалов, поражаемых органах-мишенях, латентном периоде развития эффектов в зависимости от дозы и обратимости эффектов. Подострый эксперимент является дополнительным (вспомогательным). Полученные в ходе этих исследований данные используются в дальнейшем для планирования тестов на хроническую токсичность. В случае использования метода Кагана Ю. С., Станкевича В. В. определение подострой токсичности может не проводиться.

6.3.1. Введение наноматериалов лабораторным животным осуществляют таким путем, который предполагается при использовании наноматериалов в дальнейшем или при котором наноматериал воздействует на человека.

Изучаемые наноматериалы должны вводиться ежедневно на протяжении всего периода эксперимента. Количество наноматериала рассчитывают на единицу массы тела животного при пероральном введении или на площадь поверхности при нанесении на кожу или в мг/м^3 при ингаляционном воздействии.

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

6.3.2. Для изучения подострой токсичности используют белых крыс с исходной массой тела 40—50 г.

6.3.3. Общая продолжительность исследования составляет 90 дней для крыс, при этом фиксируются общее состояние животных, характер двигательной активности, состояние волосяного и кожного покрова, потребление корма и воды, диурез, изменения массы тела.

В случае гибели животных во время проведения эксперимента у всех погибших животных проводятся макроскопическое и микроскопическое исследования внутренних органов с целью установления причин гибели.

6.3.4. При выборе доз учитывается доза, установленная в остром опыте, выраженность кумулятивного действия и литературные данные о наноматериалах, аналогичных исследуемым. Чаще всего испытываются $^1/_5$—$^1/_{20}$ от установленной в исследованиях LD_{50}.

6.3.5. Изучаются 2—3 дозы исследуемого наноматериала. Самая высокая доза должна вызывать достоверный токсический эффект, а самая низкая – не вызывать токсического эффекта.

6.3.6. Схемы проведения экспериментов по определению подострой токсичности при различных путях введения наноматериала.

6.3.6.1. Схема проведения эксперимента при пероральном введении.

Вид животных	Линейные или беспородные белые крысы-самцы (при необходимости дополнительно – крысы-самки)
Продолжительность эксперимента	90 дней для крыс
Карантин	Не менее 10 дней
Исходная масса тела	40—50 г
Рацион	Пищевая и биологическая ценность рациона полностью удовлетворяет физиологические потребности животных
Количество животных в группе в начале эксперимента	Ориентировочно с учетом возможной гибели не менее 60
Описание экспериментальных групп	*Группа 1 (контроль)* – крысы на протяжении эксперимента находятся на контрольном полусинтетическом рационе и не экспонируются наноматериалами
	Группа 2 – крысы получают с кормом или зондом внутрижелудочно высокую дозу изучаемого наноматериала
	Группа 3 – крысы получают с кормом или зондом внутрижелудочно среднюю дозу изучаемого наноматериала
	Группа 4 – крысы получают с кормом или зондом внутрижелудочно низкую дозу изучаемого наноматериала
	Группа 5 – крысы получают с кормом или зондом внутрижелудочно высокую дозу вещества, аналогичного по составу изучаемому наноматериалу, но полученного традиционным способом (контроль к группе 2)

Продолжение схемы

	Группа 6 – крысы получают с кормом или зондом внутрижелудочно среднюю дозу вещества, аналогичного по составу изучаемому наноматериалу, но полученного традиционным способом (контроль к группе 3)
	Группа 7 – крысы получают с кормом или зондом внутрижелудочно низкую дозу вещества, аналогичного по составу изучаемому наноматериалу, но полученного традиционным способом (контроль к группе 4)
	Примечания. 1. Группы 5, 6, 7 формируются в том случае, если имеются вещества, аналогичные исследуемым наноматериалам, но полученные традиционным способом. 2. Если в составе вводимого препарата наноматериала присутствует растворитель или носитель, имеющий определенную токсикологическую характеристику, то дополнительно формируются группы животных, которым вводится этот растворитель или носитель в той же дозировке, что и в составе вводимого препарата наноматериала.
Условия содержания	Животные получают свободный доступ к корму и воде и содержатся в отапливаемом, вентилируемом помещении в соответствии с установленными требованиями
Содержание животных	Не более чем по 5 крыс в клетке
Забор материалов для исследований	На 10, 30, 60 и 90-й дни эксперимента
Количество животных в группе, взятых на исследование на забое	Не менее 10 крыс в группе

6.3.6.2. Схема проведения эксперимента при ингаляционном введении

Вид животных	Линейные или беспородные белые крысы-самцы (при необходимости дополнительно – крысы-самки).
Экспозиция и продолжительность эксперимента	4 ч в день, 5 раз в неделю на протяжении 4 мес.
Карантин	Не менее 10 дней
Исходная масса тела	150—175 г
Рацион	Пищевая и биологическая ценность рациона полностью удовлетворяет физиологические потребности животных
Количество крыс в группе в начале эксперимента	Ориентировочно с учетом возможной гибели не менее 50

Продолжение схемы

Описание экспериментальных групп	*Группа 1 (контроль)* – крысы находятся в затравочных камерах с ингалированием чистым воздухом
	Группа 2 – крысы подвергаются ингаляции аэрозоля наноматериала высокой дозы
	Группа 3 – крысы подвергаются ингаляции аэрозоля наноматериала средней дозы
	Группа 4 – крысы подвергаются ингаляции аэрозоля наноматериала низкой дозы
	Группа 5 – крысы подвергаются ингаляции аэрозоля вещества, аналогичного по составу изучаемому наноматериалу, но полученного традиционным способом, высокой дозы (контроль к группе 2)
	Группа 6 – крысы подвергаются ингаляции аэрозоля вещества, аналогичного по составу изучаемому наноматериалу, но полученного традиционным способом, средней дозы (контроль к группе 3)
	Группа 7 – крысы подвергаются ингаляции аэрозоля вещества, аналогичного по составу изучаемому наноматериалу, но полученного традиционным способом, низкой дозы (контроль к группе 4)
	Примечание. Группы 5, 6, 7 формируются в том случае, если имеются вещества, аналогичные исследуемым наноматериалам, но полученные традиционным способом.
Условия содержания	Животные получают свободный доступ к корму и воде и содержатся в отапливаемом, вентилируемом помещении в соответствии с установленными требованиями
Содержание животных	Не более чем по 5 крыс в клетке
Забор материалов для исследований	На 10-й, 30-й, 60-й и 90-й дни эксперимента
Количество крыс в группе, взятых на исследование на забое	Не менее 10 крыс в группе

6.3.7. В качестве исследуемых показателей используются показатели, изложенные в п. 6.4.7.3 настоящих методических указаний.

6.4. Изучение токсичности наноматериалов в долгосрочных исследованиях.

6.4.1. Целью проведения длительного токсикологического эксперимента является характеристика степени повреждающего действия изучаемых наноматериалов при их длительном введении, выявление наиболее чувствительных органов и систем организма, определение степени обратимости вызываемых наноматериалами повреждений для выявления характера зависимости доза-ответ и уровней воздействия, при которых не наблюдаются вредные эффекты.

6.4.2. Для изучения токсичности в долгосрочных исследованиях используют белых крыс с исходной массой тела 180—240 г или мышей с исходной массой тела 18—24 г. Можно использовать также кроликов, морских свинок, собак, свиней и обезьян.

6.4.3. При выборе доз учитывается доза, установленная в остром опыте, выраженность кумулятивного действия и данные литературы о веществах, сходных с исследуемыми. Чаще всего испытываются $^1/_3$—$^1/_{10}$ части минимальной токсической дозы, но в ряде случаев возможно уменьшение количества исследуемого вещества.

6.4.4. Изучаются 2—3 дозы исследуемого наноматериала. Самая высокая доза должна вызывать некоторые признаки токсичности, граничащие с физиологической нормой, а наименьшая доза не должна давать проявления признаков токсичности.

6.4.5. Продолжительность исследований зависит от поставленных в утвержденном протоколе исследования целей и задач с учетом продолжительности жизни животных.

Если исследованию подвергаются наноматериалы, которые будут долгое время соприкасаться с организмом человека, то длительность эксперимента должна быть не меньше 6—10 мес. для различных лабораторных животных. При наличии способности наноматериала к кумуляции или отнесении его к высокотоксичным по LD_{50} срок эксперимента может быть увеличен.

6.4.6. Способ введения.

Путь введения вещества должен быть таким же, какой предполагается при использовании наноматериалов в дальнейшем, или таким, при котором наноматериал воздействует на человека.

При пероральном пути введения предпочтение отдается введению наноматериала с кормом, однако при этом необходимо убедиться в стабильности наноматериалов и отсутствии их изменений в составе корма. Концентрацию наноматериалов в корме необходимо периодически контролировать, чтобы убедиться в равномерности их распределения для уточнения дозы, вводимой каждому животному.

В случае если ожидается изменение наноматериалов в составе корма или неравномерное их распределение в корме, изучаемые наноматериалы вводят зондом в желудок.

Изучаемые наноматериалы должны вводиться ежедневно на протяжении всего периода эксперимента.

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

6.4.7. Схемы проведения долгосрочного токсикологического эксперимента при различных путях введения исследуемого наноматериала.

6.4.7.1. Схема проведения эксперимента при пероральном введении.

Вид животных	Линейные или беспородные белые крысы-самцы (при необходимости дополнительно – крысы-самки)
Продолжительность эксперимента	Не менее 6 месяцев (180 дней)
Возраст	40—50 дней
Карантин	Не менее 10 дней
Исходная масса тела	70—80 г
Рацион	Пищевая и биологическая ценность рациона полностью удовлетворяет физиологические потребности животных
Количество животных в группе в начале эксперимента	Ориентировочно с учетом возможной гибели – 36 особей

Продолжение схемы

Описание экспериментальных групп	*Группа 1* (контроль) – крысы на протяжении эксперимента находятся на контрольном полусинтетическом рационе и не экспонируются наноматериалами
	Группа 2 – крысы получают с кормом или зондом внутрижелудочно высокую дозу изучаемого наноматериала
	Группа 3 – крысы получают с кормом или зондом внутрижелудочно среднюю дозу изучаемого наноматериала
	Группа 4 – крысы получают с кормом или зондом внутрижелудочно низкую дозу изучаемого наноматериала
	Группа 5 – крысы получают с кормом или зондом внутрижелудочно высокую дозу вещества, аналогичного по составу изучаемому наноматериалу, но полученного традиционным способом (контроль к группе 2)
	Группа 6 – крысы получают с кормом или зондом внутрижелудочно среднюю дозу вещества, аналогичного по составу изучаемому наноматериалу, но полученного традиционным способом (контроль к группе 3)
	Группа 7 – крысы получают с кормом или зондом внутрижелудочно низкую дозу вещества, аналогичного по составу изучаемому наноматериалу, но полученного традиционным способом (контроль к группе 4)
	Примечания. 1. Группы 5,6,7 формируются в том случае, если имеются вещества, аналогичные исследуемым наноматериалам, но полученные традиционным способом. 2. Если в составе препарата исследуемого наноматериала присутствует растворитель или носитель, имеющий определенную токсикологическую характеристику, то дополнительно формируются группы животных, которым вводится этот растворитель или носитель в той же дозировке, что и в составе препарата исследуемого наноматериала
Условия содержания	Животные получают свободный доступ к корму и воде и содержатся в отапливаемом, вентилируемом помещении в соответствии с установленными требованиями
Содержание животных	Не более чем по 5 крыс в клетке
Забор материалов для исследований	На 30-й и 180-й дни эксперимента
Количество животных в группе, взятых на исследование на забое	Не менее 10 крыс в группе

6.4.7.2. Схема проведения эксперимента при ингаляционном введении.

Вид животных	Линейные или беспородные белые крысы-самцы (при необходимости дополнительно – крысы-самки)
Экспозиция и продолжительность эксперимента	Ингаляция по 4 ч в день, 5 раз в неделю на протяжении 6 мес. + 6 мес. наблюдения
Карантин	Не менее 10 дней
Исходная масса тела	36—40 г
Рацион	Пищевая и биологическая ценность рациона полностью удовлетворяет физиологические потребности животных
Количество крыс в группе в начале эксперимента	Ориентировочно с учетом возможной гибели не менее 50
Описание экспериментальных групп	*Группа 1 (контроль)* – крысы находятся в затравочных камерах с ингалированием чистым воздухом
	Группа 2 – крысы подвергаются ингаляции аэрозоля наноматериала высокой дозы
	Группа 3 – крысы подвергаются ингаляции аэрозоля наноматериала средней дозы
	Группа 4 – крысы подвергаются ингаляции аэрозоля наноматериала низкой дозы
	Группа 5 – крысы подвергаются ингаляции аэрозоля вещества, аналогичного по составу изучаемому наноматериалу, но полученного традиционным способом, высокой дозы (контроль к группе 2)
	Группа 6 – крысы подвергаются ингаляции аэрозоля вещества, аналогичного по составу изучаемому наноматериалу, но полученного традиционным способом, средней дозы (контроль к группе 3)
	Группа 7 – крысы подвергаются ингаляции аэрозоля вещества, аналогичного по составу изучаемому наноматериалу, но полученного традиционным способом, низкой дозы (контроль к группе 4)
	Примечание. Группы 5, 6, 7 формируются в том случае, если имеются вещества, аналогичные исследуемым наноматериалам, но полученные традиционным способом.
Условия содержания	Животные получают свободный доступ к корму и воде и содержатся в отапливаемом, вентилируемом помещении в соответствии с установленными требованиями
Содержание животных	Не более чем по 5 крыс в клетке
Забор материалов для исследований	На 30-й, 180-й дни ингаляции и через 6 мес. наблюдения
Количество крыс в группе, взятых на исследование на забое	Не менее 10 крыс в группе

Для оценки реакции легочной ткани наноматериалы вводятся однократно интратрахеально. Сроки наблюдения 1, 4, 6, 12 мес. Методы контроля: масса сухих и сырых легких, региональных лимфатических узлов, содержание в тканях общих липидов и оксипролина.

6.4.7.3. Исследуемые показатели.

При выборе показателей исходят из физико-химических свойств наноматериалов, данных литературы о токсичности, опасности, характере биологического действия, наличии структур и органов мишеней для данного класса соединений.

6.4.7.3.1. Примерный перечень изучаемых показателей, который может изменяться в зависимости от имеющейся информации как в сторону расширения, так и в сторону его сокращения.

Исследуемые показатели	Периодичность сбора данных
1	2
1. Интегральные показатели	
– общее состояние животных (внешний вид, поведение, двигательная активность, состояние шерстного покрова)	Каждые 2 дня
– поедаемость корма	Ежедневно
– масса тела	1 раз в неделю
– абсолютная и относительная масса внутренних органов (печень, почки, надпочечники, селезенка, сердце, легкие, тимус, гипофиз, головной мозг, семенники, простата и другие при необходимости)	На 30-й и 180-й дни эксперимента
2. Гематологические показатели	
– концентрация гемоглобина в крови, гематокрит, общее количество эритроцитов, средний объем эритроцита, среднее содержание гемоглобина в эритроците, средняя концентрация гемоглобина в эритроците, общее количество лейкоцитов, лейкоцитарная формула (базофилы, нейтрофилы, лимфоциты, эозинофилы, моноциты), общее количество тромбоцитов, скорость оседания эритроцитов	На 30-й и 180-й дни эксперимента
3. Биохимические показатели сыворотки крови	
– общий белок, альбумин, глобулины, глюкоза, креатин, мочевина, общие липиды, холестерин, триглицериды, желчные кислоты, билирубин общий и прямой, минеральный состав (натрий, калий, фосфор, хлориды), аланинаминотрансфераза, аспартатаминотрансфераза, щелочная фосфатаза, альфа-амилаза, липаза, лактатдегидрогеназа, холинэстераза	На 30-й и 180-й дни эксперимента
4. Общий анализ мочи	
– суточный диурез, цвет и прозрачность, относительная плотность, pH, белок, глюкоза, креатинин	На 30-й и 180-й дни эксперимента

Продолжение схемы

1	2
5. Система ферментов метаболизма ксенобиотиков	
– активность ферментов 1 и 2 фазы метаболизма ксенобиотиков (общее содержание цитохромов Р-450 и b_5, N-деметилирование амидопирина, О-деметилирование р-нитроанизола, гидроксилирование 3,4-бенз(а)пирена, О-деэтилирование 7-этоксикумарина, О-деэтилирование 7-этоксирезоруфина, О-деэтилирование 7-пентоксирезоруфина, эпоксидгидролаза, UDP-глюкуронозилтрансфераза, глутатионтрансфераза)	На 30-й и 180-й дни эксперимента
6. Стабильность мембран лизосом клеток печени	
– общая и неседиментируемая активность β-галактозидазы, β-глюкуронидазы, арилсульфатазы А и В	На 30-й и 180-й дни эксперимента
7. Система регуляции апоптоза	
– активность каспазы 3 в гомогенатах ткани печени и головного мозга	На 30-й и 180-й дни эксперимента
8. Система антиоксидантной защиты	
– активность ферментов антиоксидантной защиты в эритроцитах (глутатионредуктаза, глутатионпероксидаза, супероксиддисмутаза, каталаза)	На 30-й и 180-й дни эксперимента
– содержание продуктов перекисного окисления липидов в крови и печени (малоновый диальдегид, диеновые конъюгаты)	На 30-й и 180-й дни эксперимента
– продукция активных форм кислорода и их метаболитов (концентрация нитратов и нитритов в плазме крови и печени)	На 30-й и 180-й дни эксперимента
– концентрация антиоксидантов: восстановленный глутатион печени, общая антиоксидантная активность плазмы крови	На 30-й и 180-й дни эксперимента
9. Воспалительная реакция	
– измерение концентрации маркеров воспаления (фактора некроза опухоли альфа, фактора роста опухоли бета-1, интерлейкина 1-бета) в сыворотке крови	На 30-й и 180-й дни эксперимента
10. Морфологические исследования	
– макроскопические, микроскопические исследования, морфометрический анализ (легкие, сердце, аорта, желудок, тонкая и толстая кишка, печень, поджелудочная железа, почки, семенники, простата, селезенка, лимфатические узлы, тимус, щитовидная железа, надпочечники, гипофиз, головной мозг, кожа	На 30-й и 180-й дни эксперимента
– макроскопические, микроскопические исследования внутренних органов в случае гибели животных в течение эксперимента для установления причины смерти	В течение эксперимента

Продолжение схемы

1	2
– дополнительные исследования: гистохимические исследования, иммуногистохимические исследования клеточных популяций, электронно-микроскопические исследования	На 30-й и 180-й дни эксперимента
11. Изучение распределения	
– изучение распределения наночастиц в различных органах (легкие, сердце, желудок, тонкая и толстая кишка, печень, поджелудочная железа, почки, семенники, простата, селезенка, лимфатические узлы, тимус, щитовидная железа, надпочечники, головной мозг) соответствующими методами при их наличии	На 30-й и 180-й дни эксперимента
12. Исследование бронхоальвеолярного лаважа при ингаляционном пути введения	
– активность лактатдегидрогеназы, j-глутамилтранспептидазы, щелочной фосфатазы, содержание общего белка лаважной жидкости	На 30-й и 180-й дни эксперимента

7. Проведение исследований по изучению отдаленных эффектов действия наноматериалов

7.1. Изучение мутагенных свойств наноматериалов.

7.1.1. Изучение мутагенных свойств наноматериалов проводят в тесте учета аберраций хромосом в клетках костного мозга, тесте учета микроядер в клетках, тесте учета доминантных летальных мутаций в зародышевых клетках мышей и тесте выявления повреждений ДНК.

7.1.2. Метод учета аберраций хромосом в клетках костного мозга (основан на регистрации видимых структурных нарушений хромосом в клетках костного мозга на стадии метафазы).

7.1.2.1. Лабораторные животные – мыши линии С57В1/6 с исходной массой тела 18—20 г. Количество животных в группе – не менее 10 особей. Карантин – 10 дней.

7.1.2.2. Животные находятся на полусинтетическом рационе, указанном в пункте 5.8 настоящих методических указаний.

7.1.2.3. Испытуемые наноматериалы вводятся ежедневно на протяжении 4—5 сут. Фиксацию клеточного материала осуществляют через 6 и 24 ч после последнего введения. Контрольную группу составляют мыши, которым не вводили испытуемых наноматериалов.

В случае необходимости, когда отсутствуют данные по аналогичным материалам, полученным традиционными методами, и растворителям или носителям наноматериалов, отдельно формируют группы животных для проведения исследований на этих наноматериалах.

7.1.2.4. Анализируют 100 метафаз от каждого животного; при этом учитывается 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.

7.1.2.5. Оценку результатов цитогенетического анализа проводят путем сопоставления долей клеток с хромосомными аберрациями в контрольной и опытной группах.

7.1.3. Метод учета микроядер в клетках (основан на регистрации клеток с микроядрами).

7.1.3.1. Лабораторные животные – мыши линии С57В1/6 с исходной массой тела 18—20 г. Количество животных в группе – не менее 10 особей. Карантин – 10 дней.

7.1.3.2. Животные находятся на полусинтетическом рационе, указанном в пункте 5.8 настоящих методических указаний.

7.1.3.3. Испытуемые наноматериалы вводятся ежедневно на протяжении 4—5 сут. Фиксацию клеточного материала осуществляют через 6 и 24 ч после последнего введения. Контрольную группу составляют мыши, которым не вводили испытуемых наноматериалов.

В случае необходимости, когда отсутствуют данные по аналогичным материалам, полученным традиционными методами, и растворителям или носителям наноматериалов, отдельно формируют группы животных для проведения исследований на этих наноматериалах.

7.1.3.4. Анализируют 2 000 полихроматофильных эритроцитов костного мозга от каждого животного, соотношение нормо- и полихроматофильных эритроцитов определяют при подсчете 500 эритроцитов.

7.1.3.5. При оценке результатов следует ориентироваться на статистически достоверное, по сравнению с контролем, увеличение числа полихроматофильных эритроцитов с микроядрами.

7.1.4. Метод учета доминантных летальных мутаций в зародышевых клетках мышей (основан на учете постимплантационной смертности).

7.1.4.1. Лабораторные животные – мыши линии С57В1/6 с исходной массой тела 18—20 г. Количество животных в группе – не менее 10 особей. Карантин – 10 дней.

7.1.4.2. Животные находятся на полусинтетическом рационе, указанном в пункте 5.8 настоящих методических указаний.

7.1.4.3. Для выявления возможного отрицательного эффекта исследования проводятся в течение 3 нед. На каждую исследованную дозу берут не менее 15 самцов. После введения исследуемого наноматериала или контрольного вещества к каждому самцу подсаживают по 3 виргинные самки. Подсадка самок к подопытным самцам производится еженедельно на протяжении 3 нед., что дает возможность оценить действие наноматериалов на половые клетки в постмейотическом периоде – зрелые сперматозоиды, поздние и ранние сперматиды. Отсаженных беременных самок вскрывают на 15—17 день беременности и подсчитывают число желтых тел, количество живых и мертвых эмбрионов. По этим данным рассчитывают постимплантационную смертность.

7.1.4.4. В случае необходимости, когда отсутствуют данные по аналогичным материалам, полученным традиционными методами, и растворителям или носителям наноматериалов, отдельно формируют группы животных для проведения исследований на этих веществах.

7.1.5. Тест на выявление повреждений ДНК, предусматривающий оценку целостности структуры ДНК методом щелочного гель-электрофореза изолированных клеток (метод ДНК-комет), проводится в соответствии с методическими рекомендациями «Применение метода щелочного гель-электрофореза изолированных клеток для оценки генотоксических свойств природных и синтетических соединений» (утверждены РАМН и РАСХН, Москва, 2006).

7.2. Изучение репродуктивной токсичности наноматериалов.

7.2.1. Изучение репродуктивной токсичности наноматериалов проводится в эксперименте на лабораторных животных и включает исследования генеративной функ-

ции, эмбриотоксического и тератогенного действия в пренатальном и постнатальном периоде развития, а также при необходимости изучение плодовитости и общей репродуктивной функции.

7.2.2. Исследования проводятся на крысах линии Вистар с исходной массой тела 100—120 г. Карантин – 10 дней. Животные находятся на полусинтетическом рационе, указанном в пункте 5.8 настоящих методических указаний.

7.2.3. Количество животных в группе – не менее 50 особей (из них 30 самок и 20 самцов).

Распределение по группам: 1 группа – контрольная группа крыс (самцы и самки) получает на протяжении всего эксперимента полусинтетический рацион; 2 группа (самцы и самки) получает полусинтетический рацион с включением аналога наноматериала, полученного традиционным способом (если таковой имеется); 3 группа крыс (самцы и самки) получает полусинтетический рацион с включением исследуемого наноматериала в том же количестве, что и крысы 2 группы. Животные находятся на этих рационах не менее 30 дней до спаривания, во время спаривания, беременности, лактации. Полученное потомство находится на этих рационах до момента половой зрелости.

7.2.4. В период всего эксперимента регистрируется общее состояние животных (внешний вид, двигательная активность, состояние шерсти), поедаемость корма (ежедневно), масса тела (1 раз в нед.).

7.2.5. Показатели, характеризующие генеративную функцию:

• половозрелые самцы – морфологические исследования семенников (индекс сперматогенеза, среднее количество нормальных сперматогоний в каждом канальце, относительное количество канальцев с 12-й стадией мейоза);

• половозрелые самки: морфологические исследования яичников (примордиальные фолликулы, фолликулы с двумя и более слоями фолликулярных клеток, третичные фолликулы, атретические тела, желтые тела, общее количество генеративных форм).

7.2.6. Эмбриотоксическое и тератогенное действие наноматериалов в пренатальном периоде.

Для спаривания в клетку к двум самкам подсаживают вечером одного самца, утром осуществляют микроскопирование влагалищных мазков. Первый день беременности определяют по наличию сперматозоидов во влагалищных мазках. По 10 беременных самок из каждой группы забивают на 19—20 день беременности. Плоды извлекают из рогов матки и обследуют визуально для обнаружения видимых аномалий развития, после этого плоды взвешивают. После наружного осмотра плоды каждого помета делят на 2 группы. Одну группу используют для изучения внутренних органов, а вторую группу используют для изучения состояния скелета. Подсчитывают количество желтых тел, количество мест имплантаций, количество резорбций, количество живых и мертвых плодов с расчетом пред- и постимплантационной эмбриональной смертности, краниокаудальный размер, количество обследованных плодов (из них с аномалиями развития).

7.2.7. Эмбриотоксическое и тератогенное действие наноматериалов в постнатальном периоде.

По 15 беременных самок в каждой группе оставляют до родов и проводят изучение потомства: количество живых и мертвых крысят, подсчет особей разного пола, их внешний вид, установление внешних уродств, измерение массы тела и краниокаудального размера. Потомство взвешивают при рождении, затем еженедельно. Учитывают следующие показатели физиологического развития крысят: сроки отлипания ушных раковин, появление первичного волосяного покрова, открытие глаз, прорезывание резцов, опускание семенников, открытие влагалища, выживаемость потомства. Наблюде-

ния за потомством осуществляют ежедневно в течение 30 дней и рассчитывают выживаемость на 30-й день.

7.2.8. Изучение плодовитости и общей репродуктивной функции в эксперименте на двух поколениях животных (при необходимости).

7.2.8.1. Исходное количество животных в группе должно составлять 10 самцов и 20 самок. F_0 родительское поколение получает исследуемый наноматериал в течение экспозиционного периода (70 дней), периода беременности и до окончания вскармливания F_1 поколения. После достижения животными F_1 зрелости (≈ 3 мес.) их спаривают и получают потомство F_2. Как в опытной, так и в контрольной группах F_1 и F_2 должно быть получено потомство не менее, чем от 10 самок. При изучении физического развития потомства F_1 и F_2 регистрируют размер помета, число живых и мертворожденных плодов, число особей разного пола, динамику массы и выживаемость молодняка на 4-й, 7-й, 14-й, 21-й и 30-й дни после рождения, а также сроки отлипания ушной раковины, появление первичного волосяного покрова, прорезывание резцов, открытие глаз, переход к самостоятельному питанию, опускание семенников, открытие влагалища.

7.2.8.2. В возрасте 30 дней у потомства изучают эмоционально-двигательное поведение с использованием теста «открытое поле», определяют суммационно-пороговый показатель, статическую работоспособность.

7.2.8.3. За единицу наблюдения принимают помет. Полученные данные обрабатывают статистически, сравнивают с контролем и регистрируют в таблицах.

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

8. Иммунологические исследования и оценка потенциальной аллергенности наноматериалов

8.1. Иммунологические исследования наноматериалов проводят в эксперименте на мышах линий СВА и С57Bl/6 и включают исследование иммуномодулирующего действия наноматериалов на гуморальное звено иммунитета, изучение иммуномодулирующего действия наноматериалов на клеточное звено иммунитета, изучение наноматериалов в тесте чувствительности мышей к гистамину и изучение влияния наноматериалов на естественную резистентность мышей к Salmonella typhimurium (сальмонеллам мышиного тифа).

8.2. Введение наноматериалов лабораторным животным осуществляют путем, который предполагается при использовании наноматериалов в дальнейшем.

Изучаемые наноматериалы должны вводиться ежедневно на протяжении всего периода эксперимента. Время введения составляет 21 день. Количество наноматериала рассчитывают на единицу массы тела животного по данным ежедневного взвешивания.

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

8.3. Для изучения возможных иммунотоксических свойств наноматериалов используют мышей линий СВА и С57Bl/6 с исходной массой тела 18—20 г, прошедших карантин в течение 10 дней. Все экспериментальные животные находятся на полноценном полусинтетическом рационе (п. 5.8).

8.4. Изучаются 2—3 дозы исследуемого наноматериала.

8.5. В течение всего эксперимента фиксируются общее состояние животных, характер двигательной активности, состояние волосяного и кожного покрова, потребление корма и воды, изменения массы тела.

В случае гибели животных во время проведения эксперимента у всех погибших животных проводятся макроскопическое и микроскопическое исследование внутренних органов с целью установления причин гибели.

8.6. Распределение по группам. Животных каждой линии разделяют на следующие группы: 1 группа – контрольная (животные находятся на полусинтетическом рационе); 2—4 группы находятся на полусинтетическом рационе и получают изучаемые наноматериалы в различных концентрациях; животные 5—7 групп находятся на полусинтетическом рационе и получают вещество, аналогичное по составу изучаемому наноматериалу, но полученное традиционным способом (если такое имеется).

Если в составе препарата исследуемого наноматериала присутствует растворитель или носитель, имеющий определенную токсикологическую характеристику, то дополнительно формируются группы животных, которым вводится этот растворитель или носитель в той же дозировке, что и в составе препарата исследуемого наноматериала.

8.7. Исследование иммуномодулирующего действия наноматериалов на гуморальное звено иммунитета.

В каждой группе должно быть не менее 20 особей. Изучаемый наноматериал вводится мышам в течение 21 дня, после чего животным опытных и контрольных групп вводится внутрибрюшинно 0,5 мл дисперсии эритроцитов барана (концентрация 20 млн клеток/мл). Забор крови проводится на 7-й, 14-й и 21-й день после введения эритроцитов барана. Сыворотку крови титруют в реакции гемагглютинации общепринятым методом. Подсчитывают среднее арифметическое титров гемагглютининов в каждой группе мышей.

8.8. Изучение иммуномодулирующего действия наноматериалов на клеточное звено иммунитета.

В каждой группе должно быть не менее 15 особей. Изучаемый наноматериал вводится мышам обеих линий в течение 21 дня, после чего животным опытных и контрольных групп подкожно в межлопаточную область вводят эритроциты барана в дозе 1 млн клеток на мышь в объеме 0,1 мл. На пятый день всем мышам в подушечку одной задней лапы вводят разрешающую дозу эритроцитов барана в концентрации 10^9 клеток на мышь в объеме 0,02 мл. В контрлатеральную подушечку лапы в том же объеме – 0,95 %-й раствор натрия хлорида. Местную воспалительную реакцию оценивают через 18—20 ч путем определения веса опытной и контрольной лапок. Интенсивность местной реакции определяют по индексу реакции.

8.9. Изучение наноматериалов в тесте чувствительности мышей к гистамину.

В каждой группе должно быть не менее 15 особей. Изучаемый наноматериал вводится мышам линии C57B1/6 в течение 21 дня, после чего животным опытных и контрольных групп внутрибрюшинно вводят раствор гистамина гидрохлорида в дозе 2,5 мг на мышь в объеме 0,5 мл физиологического раствора. Реакцию учитывают через 24 ч по проценту гибели мышей.

8.10. Изучение влияния наноматериалов на естественную резистентность мышей к Salmonella typhimurium (сальмонеллам мышиного тифа).

Изучение влияния продукта на естественную резистентность мышей к сальмонеллам мышиного тифа проводят на модели внутрибрюшинного заражения мышей линии C57BL1/6 десятикратно отличающимися дозами S. typhimurium штамм 415. В каждой группе должно быть не менее 30 мышей. Изучаемый наноматериал вводится в течение 21 дня, после чего животных опытных и контрольных групп заражают тремя дозами

культуры: 1 000; 100 и 10 микробных клеток на мышь. Наблюдение за животными производится в течение 14 дней. Рассчитывают LD_{50} в опытной и контрольной группе, процент гибели животных по каждой дозе и проводят сравнительный анализ результатов.

8.11. Оценку потенциальной аллергенности наноматериалов проводят в эксперименте на лабораторных животных. Потенциальную аллергенность оценивают, определяя тяжесть протекания системной анафилаксии и уровня циркулирующих сенсибилизирующих антител субклассов $IgG_1 + IgG_4$ у крыс контрольных и опытных групп.

Метод основан на количественной оценке тяжести реакции системной анафилаксии, возникающей при внутрибрюшинной сенсибилизации взрослых крыс пищевым антигеном – овальбумином куриного яйца с последующим внутривенным введением сенсибилизированным животным разрешающей дозы того же белка.

8.11.1. Исследования проводятся на крысах линии Вистар с исходной массой тела 150—180 г. Карантин в течение 10 дней. Все животные находятся на полусинтетическом рационе, указанном в п. 5.8 настоящих методических указаний. ***В составе корма не должно содержаться яичного белка!***

8.11.2. Путь введения наноматериала должен быть таким же, как и предполагаемый путь его воздействия на человека. Изучаемые наноматериалы должны вводиться ежедневно на протяжении всего периода эксперимента. В течение всего эксперимента должны использоваться образцы наноматериалов одной и той же партии.

8.11.3. Количество животных в группе – не менее 25 особей. Формируют 3 группы экспериментальных животных: 1 группа – контрольная, получающая полусинтетический рацион; 2 группа – животные находятся на полусинтетическом рационе и подвергаются воздействию изучаемого наноматериала; 3 группа – животные находятся на полусинтетическом рационе и подвергаются воздействию аналога исследуемого наноматериала (если таковой имеется), полученного в традиционной форме.

8.11.4. Продолжительность эксперимента – 29 дней.

8.11.5. На 1-й, 3-й и 5-й день эксперимента крыс внутрибрюшинно сенсибилизируют овальбумином куриного яйца в дозе 100 мкг вместе с дисперсией гидроксида алюминия, вводимой в дозе, эквивалентной 0,5 мг алюмокалиевых квасцов, а на 21-й день эксперимента вводят в тех же условиях дополнительную («бустерную») дозу антигена, уменьшенную в 10 раз по сравнению с первоначальной дозой. Кормление рационами и введение наноматериала и его аналога продолжают до утра 29 дня эксперимента, после чего внутривенно вводят раствор овальбумина куриного яйца в дозе 5—30 мг/кг массы тела (вводимая доза должна обеспечивать летальность животных контрольной группы в пределах 30—50 %) и на протяжении 24 ч оценивают тяжесть реакции анафилаксии по следующим показателям: вялость, озноб, одышка, атаксия, цианоз, парез задних конечностей, судороги, паралич, летальный исход и рассчитывают анафилактический индекс как среднее арифметическое балльных оценок тяжести реакций по группе.

8.11.6. Тяжесть реакции оценивают в соответствии со шкалой:

Проявления	Тяжесть реакции (балл)
Нет реакции	0
Вялость, кожный зуд, озноб, одышка	1
Атаксия, цианоз кожных покровов, парез задних конечностей	2
Судороги, паралич	3
Летальный исход	4

8.11.7. Непосредственно перед введением разрешающей дозы у крыс из хвостовой вены отбирают 0,2—0,3 мл крови для определения уровня специфических антител. Концентрацию или титр антител определяют методом непрямого твёрдофазного иммуноферментного теста на полистирольных планшетах.

8.11.8. Достоверность различий тяжести анафилаксии определяют в соответствии с U-тестом углового преображения Фишера для долевых показателей. Достоверность различий дополнительно проверяют с помощью непараметрического рангового теста Мана-Уитни и многомерного непараметрического критерия хи-квадрат.

8.11.9. Достоверность различий средних значений и дисперсий концентраций или титров антител к овальбумину куриного яйца определяют с использованием критерия Стьюдента и F-теста на остаточную дисперсию Фишера. Дополнительно проверяют достоверность различий распределения в сравниваемых группах с использованием непараметрического рангового критерия Мана-Уитни.

gost.e-ecolog.ru