2.3.2. ПИЩЕВЫЕ ПРОДУКТЫ
И ПИЩЕВЫЕ ДОБАВКИ

Медико-биологическая оценка пищевой продукции, полученной из генетически модифицированных источников

Методические указания
МУК 2.3.2.970—00

gost.e-ecolog.ru

1. Разработаны Институтом питания РАМН (Тутельян В. А. – руководитель, Аксюк И. Н., Васильев А. В., Воробьева Л. Ш., Высоцкий В. Г., Волгарев М. Н., Королев А. А., Кравченко Л. В., Маганова Н. Б., Мазо В. К., Покровская Г. Р., Сокольников А. А., Сорокина Е. Ю., Тышко Н. В.); Институтом вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова РАМН (Семенов Б. Ф., Брицина М. В., Захарова Н. С.); Министерством здравоохранения РФ (Департамент госсанэпиднадзора) (Онищенко Г. Г., Петухов А. И.); Московской медицинской академией им. И. М. Сеченова Минздрава России (Бочков Н. П., Суханов Б. П.); Центром «Биоинженерия» РАН (Скрябин К. Г., Кузнецов Б. Б., Дорохов Д. Б., Асадова Ю. Е.); Медико-генетическим центром РАМН (Шишкин С. С.); Московским государственным университетом прикладной биотехнологии Министерства общего и профессионального образования Российской Федерации (Рогов И. А., Кроха Н. Г., Гурова Н. В., Сучков В. В.).

2. Утверждены Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации 24 апреля 2000 г., введены в действие 1 июля 2000 г.

3. Введены впервые.

СОДЕРЖАНИЕ

1. Общие положения и область применения 108

2. Нормативные ссылки 108

3. Термины и определения 109

4. Порядок гигиенической экспертизы и государственной регистрации пищевой продукции, полученной из генетически модифицированных источников 109

5. Медико-генетическая оценка пищевой продукции, полученной из генетически модифицированных источников 110

6. Оценка пищевой продукции, полученной из генетически модифицированных источников, по функционально-технологическим свойствам 126

7. Медико-биологическая оценка пищевой продукции, полученной из генетически модифицированных источников 129

8. Клинические испытания новых видов пищевой продукции, полученной из генетически модифицированных источников 145

Список литературы 148

Приложения 155

УТВЕРЖДАЮ
Главный государственный санитарный врач Российской Федерации, Первый заместитель министра здравоохранения Российской Федерации
Г. Г. Онищенко
24 апреля 2000 г.
Дата введения: 1 июля 2000 г.

2.3.2. ПИЩЕВЫЕ ПРОДУКТЫ И ПИЩЕВЫЕ ДОБАВКИ

Медико-биологическая оценка пищевой продукции, полученной из генетически модифицированных источников

Методические указания
МУК 2.3.2.970—00

1. Общие положения и область применения

1.1. Методические указания устанавливают требования к проведению медико-биологических исследований пищевой продукции, полученной из генетически модифицированных источников.

1.2. Методические указания предназначены для учреждений санитарно-эпидемиологической службы Российской Федерации, осуществляющих государственный санитарно-эпидемиологический надзор, а также для других учреждений, аккредитованных на проведение работ в этой области.

1.3. Требования, изложенные в настоящих методических указаниях в отношении продукции, полученной из генетически модифицированных источников, применяются на этапах постановки на производство, гигиенической экспертизы, государственной регистрации, закупки, ввоза в страну и реализации.

1.4. Методические указания разработаны с целью обеспечения единого, научно-обоснованного подхода к оценке качества и безопасности пищевой продукции, полученной из генетически модифицированных источников, на этапах разработки, экспертизы и государственной регистрации этой продукции.

1.5. Производитель новой пищевой продукции, полученной из генетически модифицированных источников, предназначенной для реализации на территории Российской Федерации, должен выпускать ее маркированной в соответствии с установленным порядком.

2. Нормативные ссылки

2.1. Федеральный закон «О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения» от 30 марта 1999 г.

2.2. «Основы законодательства Российской Федерации об охране здоровья граждан» от 22 июля 1993 г.

2.3. Федеральный закон «О внесении изменений и дополнений в закон Российской Федерации «О защите прав потребителей» и Кодекс РСФСР об административных правонарушениях» от 9 января 1996 г.

2.4. Положение о государственном санитарно-эпидемиологическом нормировании, утвержденное Постановлением Правительства Российской Федерации от 5 июня 1994 г. № 625.

Издание официальное

Настоящие методические указания не могут быть полностью или частично воспроизведены, тиражированы и распространены без разрешения Департамента госсанэпиднадзора Минздрава России.

2.5. Положение о Государственной санитарно-эпидемиологической службе Российской Федерации, утвержденное Постановлением Правительства Российской Федерации от 30 июля 1998 г. № 680.

2.6. Постановление Главного государственного санитарного врача Российской Федерации № 7 от 6 апреля 1999 г. «О порядке гигиенической оценки и регистрации пищевой продукции, полученной из генетически модифицированных источников».

3. Термины и определения

Пищевая продукция – продовольственное сырье, пищевые продукты и их компоненты.

Продовольственное сырье – объекты биологического, органического и неорганического происхождения, используемые для производства пищевых продуктов.

Пищевой продукт – продукт животного, растительного, минерального или биосинтетического происхождения, предназначенный для употребления в пищу человеком как в натуральном, так и в переработанном виде.

Компонент – вещество животного, растительного, микробного или минерального происхождения, а также природные или синтезированные пищевые добавки, используемые при подготовке или производстве пищевого продукта или присутствующие в готовом продукте в исходном или измененном виде.

Качество пищевой продукции – совокупность характеристик, которые обусловливают потребительские свойства, качество и безопасность пищевой продукции.

Безопасность пищевой продукции – отсутствие опасности для жизни и здоровья людей нынешнего и будущих поколений.

Генная инженерия – раздел молекулярной генетики, связанный с целенаправленным созданием in vitro новых комбинаций генетического материала (рекомбинантной ДНК), способного к воспроизводству и функционированию в клетке-хозяине.

Генетически модифицированный организм – организм или несколько организмов, любые неклеточные, одноклеточные или многоклеточные образования, способные к воспроизводству или передаче наследственного генетического материала, отличные от природных организмов, полученные с применением методов генной инженерии и содержащие генно-инженерный материал, в т. ч. гены, их фрагменты или комбинацию генов.

4. Порядок гигиенической экспертизы и государственной регистрации пищевой продукции, полученной из генетически модифицированных источников

4.1. Вся пищевая продукция, полученная из генетически модифицированных источников, проходит гигиеническую экспертизу в установленном порядке.

4.2. Проведение гигиенической экспертизы и государственной регистрации пищевой продукции, полученной из генетически модифицированных источников, осуществляется в соответствии с порядком, установленным Постановлением Главного государственного санитарного врача Российской Федерации № 7 от 06.04.99 «О порядке гигиенической оценки и регистрации пищевой продукции, полученной из генетически модифицированных источников».

4.3. Организация, фирма представляют в центр санитарно-эпидемиологического нормирования, гигиенической сертификации и экспертизы Министерства здравоохранения Российской Федерации комплект документов и материалов, включающий:

• заявку (письмо) на проведение гигиенической оценки и государственной регистрации пищевой продукции, полученной из генетически модифицированных источников;

• материалы, отражающие медико-генетическую оценку пищевой продукции, полученной из генетически модифицированных источников;

• материалы, отражающие технологические свойства пищевой продукции, полученной из генетически модифицированных источников;

• материалы, отражающие медико-биологическую оценку пищевой продукции, полученной из генетически модифицированных источников.

4.4. Объем и программа проведения работ по оценке качества и безопасности пищевой продукции, полученной из генетически модифицированных источников, определяются по результатам экспертизы представленных материалов.

4.5. Для проведения работ по оценке качества и безопасности пищевых продуктов, полученных из генетически модифицированных источников, фирма-изготовитель поставляет образцы продукции, в количестве, необходимом для проведения полного объема исследований.

4.6. На основании экспертизы представленных документов и материалов и результатов проведенных медико-генетических, технологических и медико-биологических исследований продукции центр санитарно-эпидемиологического нормирования, гигиенической сертификации и экспертизы Минздрава России оформляет бланк регистрационного удостоверения (или мотивированное заключение об отказе) и передает его на подпись в Департамент госсанэпиднадзора Минздрава России. Регистрационное удостоверение подписывается Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации, а в его отсутствие – начальником Департамента госсанэпиднадзора, заместителем Главного государственного санитарного врача Российской Федерации.

5. Медико-генетическая оценка пищевой продукции, полученной из генетически модифицированных источников

Необходимость проведения тех или иных исследований по данному разделу и для каждого конкретного вида пищевой продукции, полученной из генетически модифицированных источников, определяется экспертом центра «Биоинженерия» РАН. Методы, описанные в пунктах 5.1—5.3, являются обязательными при проведении медико-генетической оценки пищевой продукции, полученной из генетически модифицированных источников; методы, представленные в пункте 5.4, могут рекомендоваться как дополнительные.

5.1. Rapd-анализ генотипов

Необходимое оборудование и реактивы

Оборудование и принадлежности

Микроцентрифужные пробирки типа Eppendorf на 1,5 и 0,5 мл (свободные от ДНК-аз и РНК-аз, фирма Alpha)

Тефлоновый пестик и/или стеклянная палочка под размер микроцентрифужной пробирки на 1,5 мл *

Настольная микроцентрифуга типа Eppendorf (ТЭТА-20, 200000 об/мин)*

Автоматические микропипетки переменного объема (классик/студент 0,5—10 мкл; 5—40 мкл; 200—10000 мкл)

Наконечники для микропипеток (наконечники «микро» и обычные)

Холодильник (охладитель проб)*

Плавающий штатив-«плотик» для микроцентрифужных пробирок
Весы до 0,5 кг
Микроанклав-«скороварка»
Бидистиллятор
ДНК-амплификатор («Ампли-4»)
Электрофоретическое оборудование для разделения фрагментов ДНК в агарозном геле: источник напряжения для электрофореза (НИП 300)* и прибор для горизонтального миниэлектрофореза (миникамера)*
УФ-осветитель для визуализации результатов электрофореза ДНК (трансиллюминатор-UVT)*
Зеркальная фотокамера типа «Зенит» с оранжевым светофильтром
Фотопленка типа «Микрат-200»
Термостат («Темо 24—15»)
Шейкер (3D)
Микровстряхиватель пробирок типа Vortex (ТЭТА-2 или 4)*
РН-метр
Фитотрон для выращивания растений (Фитотрон-99)
Настольный ламинарный бокс (ЛБ-1)

*** обозначение продукции, которая изготавливается на ООО «Biokom», Москва, Россия**

Необходимые реактивы и растворы

Реактивы

Трис (hydroxymethyl) aminometane
HCl конц.
ЭДТА
NaCl
SDS
Ацетат калия
Этиловый спирт 96 %
Агароза для электрофореза
Бромистый этидий
Борная кислота
Бромфеноловый синий
Глицерин
Набор для амплификации ДНК (Biomaster-S.r.l.-Italy-Russia, Москва)

Приготовление основных растворов

1 М Трис pH 7,5. Растворить 121,1 г Трис в 800 мл воды. Довести pH до необходимого значения добавлением концентрированной HCl и довести объем до 1 л. Раствор простерилизовать.

0,5 М ЭДТА pH 8,0. К 186,1 г ЭДТА добавить 800 мл воды. Довести pH до 8,0 NaOH.

5 М NaCl (х. ч. или ч. д. а.). 29,22 г NaCl растворить в 80 мл воды и довести объем до 100 мл, простерилизовать.

10 %-ный SDS. 10 г SDS растворить в 90 мл воды, чтобы ускорить растворение, можно нагреть раствор до 60 °С. Довести pH до 7,2 добавлением нескольких капель концентрированной HCl и довести до 100 мл. **Внимание!** *При взвешивании SDS наденьте на лицо маску, т. к. при попадании на слизистую оболочку носоглотки этот летучий порошок вызывает сильное раздражение.*

Экстракционный буфер (200 мМ Трис-HCl pH 7,5, 250 мМ NaCl, 25 мМ ЭДТА, 0,5 %-ный SDS). Для приготовления 100 мл экстракционного буфера необ-

ходимо: 20 мл 1 М Трис-HCl (pH 7,5), 5 мл М NaCl, 5 мл 0,5 М ЭДТА, 5 мл 10 %-ного SDS. Довести водой объем раствора до 100 мл.

5 М ацетат калия. 49,1 г ацетата калия растворить в 80 мл воды и довести объем до 100 мл.

70 %-ный этанол. Для приготовления 100 мл раствора требуется 73 мл 96 %-ного этанола и 27 мл воды.

TBE 5X буфер (0,089 М Трис-основание, 0,089 М борная кислота, 0,002 М ЭДТА pH-8,0). На 1 л раствора требуется: 54 г Трис, 27,5 г борной кислоты (ч. д. а.), 4,6 г $Na_2EDTA \cdot 2H_2O$. Для приготовления электродного буфера TBE-0,5X необходимо стоковый буфер разбавить в 10 раз дистиллированной водой.

Буфер для нанесения образца-6X (0,25 %-ный бромфеноловый синий, 30 %-ный глицерин, 10 мМ Трис-HCl, 1 мМ ЭДТА). Для приготовления 10 г буфера для нанесения требуется: 2,5 мг бромфенолового синего, 3 г глицерина, 0,1 мл Трис, 0,02 мл 0,5 М ЭДТА pH 8,0.

Раствор бромистого этидия (10 мг/мл). Растворить 1 г бромистого этидия в 100 мл воды. Для визуализации ДНК в агарозном геле используется раствор в концентрации 5 мкг/мл. **Внимание!** *Все манипуляции с бромистым этидием и его растворами проводить в перчатках.*

Выделение ДНК из растительной ткани

Для получения растительной ткани семена, клубни или другой растительный материал проращивают в контролируемых условиях до получения листьев или свежей растительной ткани.

- Высечку листа, полученную при закрытии крышки пробирки типа Eppendorf объемом 1,5 мл или 10—14 мг ткани (когда высечку получить сложно), интенсивно гомогенизируют в 400 мл экстракционного буфера (*см. Необходимые реактивы и растворы*) с помощью тефлонового пестика.

Примечание. *Для выделения ДНК лучше брать молодые листья с мягкими тканями, без видимых следов поражения. Тефлоновый пестик должен плотно прилегать к стенкам пробирки. Стараться максимально минимизировать время гомогенизации. Гомогенизацию вести до интенсивного окрашивания в зеленый цвет экстракционного буфера.*

- Пробирки с гомогенатом встряхивать 5 с на Vortex.
- Поместить пробирки в ультратермостат и инкубировать при 65 °С 15 мин, периодически перемешивая содержимое пробирки мягким покачиванием.
- Добавить в пробирки по 200 мкл 5 М ацетата калия (предварительно охлажденного в холодильнике) и тщательно перемешать содержимое пробирок легким встряхиванием.
- Инкубировать пробы на ледяной бане 15 мин.
- Центрифугировать пробы в настольной центрифуге при 16000 g 20 мин при комнатной температуре.
- Осторожно отобрать 400 мкл супернатанта в чистые пробирки и осадить двумя объемами 96 %-ного этанола (охлажденного), осторожно перемешивая. На этом этапе можно наблюдать образование маленькой «медузы» или мелко дисперсной взвеси. Оставить пробирки на столе на 5 мин.
- Центрифугировать пробы в настольной центрифуге при 16000 g 10 мин при комнатной температуре.
- Осадок ДНК промыть охлажденным при —20 °С 70 %-ным этанолом и центрифугировать, как это указано в предыдущем пункте. Рекомендуем повторить эту процедуру еще раз.
- Слить надосадочную жидкость и с помощью микропипетки максимально удалить остатки жидкости из пробирки.

• Осадки ДНК подсушить, открыв крышки пробирок.

Примечание. *Старайтесь не пересушить осадки ДНК, т. к. пересыхание ДНК приводит к плохой растворимости в воде.*

• Растворить ДНК в 100 мкл стерильной бидистиллированной и деионизированной воды.

• Измерить концентрацию ДНК.

Амплификация геномной ДНК

Амплификацию геномной ДНК проводят в 25 мкл реакционной смеси (67 мМ Трис-HCl pH 8,8; 16 мМ $(NH_4)_2SO_4$; 2 mM $MgCl_2$; 0,01 % Tween-20; по 200 мМ каждого dNTP; 10 pM/мл праймера; 25 мкг геномной ДНК и 0,5 ед. Taq-полимеразы). Все компоненты, кроме ДНК, входят в набор для амплификации фирмы Biomaster.

• Стерильные пробирки типа Eppendorf на 0,5 мл поместить в штатив и подписать.

• В одной из пробирок сформировать реакционную смесь, последовательно добавляя компоненты, как это указано в примере.

Пример составления реакционной смеси

Ингредиенты	На одну пробу, мкл	На 7 проб, мкл
H_2O	16,8	117,6
Реакционный буфер без $MgCl_2$ (10X)	2,5	17,5
$MgCl_2$	1	7
Смесь dNTP's	2	14
Праймер (4 ОЕ/мл)	0,5	3,5
Термостабильная ДНК полимераза (4Е/мл)	0,2	1,4
ДНК	2	–

• Развести реакционную смесь по соответствующим пробиркам.

• Внести в пробирки геномную ДНК и тщательно пипетировать для перемешивания пробы.

• Поверх реакционной смеси наслоить несколько капель минерального масла (около 17 мкл).

• Для удаления пузырьков воздуха пробирки центрифугировать в течение нескольких секунд в настольной центрифуге и перенести пробы в штатив амплификатора ДНК.

• Установить и запустить следующую программу амплификации ДНК:

I – 1 цикл: 94 °С – 3 мин; 36 °С – 1,5 мин; 72 °С – 1,5 мин;

II – 33 цикла: 94 °С – 0,3 мин; 36 °С – 1,5 мин; 72 °С – 1,5 мин;

III – 1 цикл: 94 °С – 0,3 мин; 36 °С – 1,5 мин; 72 °С – 10 мин.

Примечание. *Ввиду большой чувствительности RAPD-анализа, рекомендуем пользоваться только одним амплификатором и только одним выбранным набором реактивов для амплификации ДНК. Все реактивы для амплификации и препараты ДНК необходимо хранить в морозильной камере при 20 °С. Замораживание (ниже –20 °С) препарата термостабильной ДНК-полимеразы приводит к потере ее активности.*

Электрофорез в агарозном геле и визуализация продуктов амплификации

• Для приготовления 2 %-ной агарозы необходимо к 1 г агарозы добавить 0,5X TBE буфер до 50 мл и тщательно перемешать. Колбу закрыть фольгой.

• Колбу с агарозой поместить в миниавтоклав или скороварку и автоклавировать 15 мин.

• Расплавленную агарозу охладить до 50 °С и залить в подготовленную форму для геля, избегая образования пузырьков в геле. Толщина геля должна быть 0,5—0,7 см.

• Через 30—40 мин, когда гель сформируется, удалить гребенку и перенести его в камеру для электрофореза, предварительно заполненную буфером TBE 0,5X. Гель должен быть полностью покрыт буфером на 1—2 мм.

• К 2 мкл буфера для нанесения добавить 10—13 мкл реакционной смеси, содержащей продукты амплификации ДНК, тщательно перемешать пипетированием и нанести в лунки агарозного геля. В крайнюю лунку нанести маркер молекулярной массы.

Примечание. *Обычно в качестве маркера молекулярной массы используют ДНК фага λ, обработанную рестриктазой Hind III и EcoR I или Pst I.*

• Электрофорез проводят при 50 В (5В/см) пока бромфеноловый синий не дойдет до отметки 1 см от края геля. Обычно электрофорез длится 3—3,5 ч.

• Для визуализации фрагментов амплифицированной ДНК гель помещают в раствор бромистого этидия (5 мкг/мл) и проводят окрашивание в течение 20 мин на качалке.

Примечание. *С раствором бромистого этидия и окрашенным гелем необходимо работать в перчатках.*

• Чтобы снизить фоновую флюоресценцию, вызываемую бромистым этидием, гель отмывают дважды дистиллированной водой при постоянном покачивании.

Примечание. *Длительная отмывка геля может привести к исчезновению слабых зон и размыванию спектров из-за диффузии.*

• Гель поместить на фильтр трансиллюминатора и просмотреть в проходящем УФ свете через защитный экран и специальные защитные очки. При необходимости RAPD-спектры фотографируют через оранжевый или красный светофильтр на пленку типа «Микрат». Фрагменты амплифицированной ДНК после обработки этидиум бромидом будут флюоресцировать под УФ оранжевым цветом.

Примеры использования RAPD-анализа для идентификации генотипов картофеля

В работе использованы 19 декамерных праймеров. Спектры амплифицированной ДНК картофеля имели большое количество фрагментов различной длины. Анализ RAPD-спектров сортов картофеля с использованием праймера PtA-19 выявил значительный полиморфизм между видами (рис. 1). Полученные данные свидетельствуют о существенной внутрисортовой вариабельности некоторых старинных отечественных сортов. С использованием ограниченного числа праймеров на различных сортах получены RAPD-спектры, специфичные для отдельного сорта. Анализ спектров ДНК позволяет выявить незначительные различия между близкородственными сортами, даже те что были получены как сомаклональные варианты одних и тех же родителей.

Основанная на ДНК анализе идентификация может использоваться в тех случаях, когда сорта не могут быть надежно различены по результатам белкового электрофореза, включая анализ во всех стадиях развития растения.

Разработанный быстрый метод для изоляции ДНК из глазков картофеля и RAPD-методика помогают сократить время и стоимость анализа. Идентификация сортов по анализу ДНК может быть сделана менее чем за 24 ч.

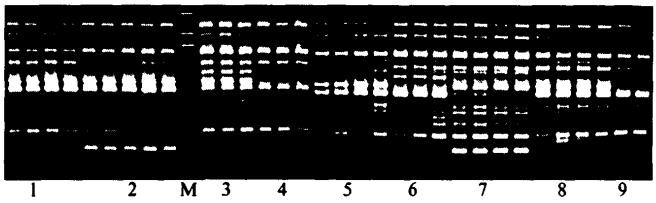

Рис. 1. RAPD-спектры ДНК сортов картофеля.
1 – Рождественский, 2 – Жуковский ранний, 3 – Невский, 4 – Голубизна, 5 – Луговской, 6 – Удача, 7 – Елизавета, 8 – Ресурс, 9 – Пушкинец. М – маркер 1kb Ladder Plus DNA.

Контроль соматических модификаций в геноме размножаемого in vitro и трансформированного картофеля по тем же праймерам доказал высокую эффективность анализа ДНК при идентификации генотипов растений (рис. 2).

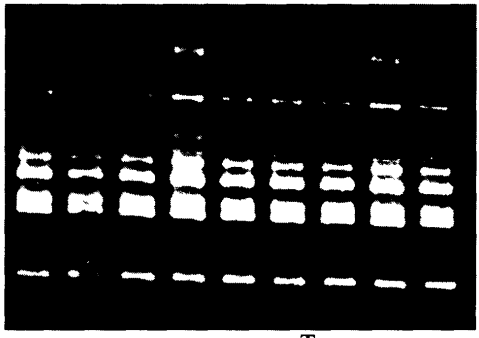

Рис. 2. RAPD-спектры ДНК модифицированных и контрольных растений картофеля сорта Russet Burbank, полученных с помощью праймера D-27.

Заключение. Предлагаемый микрометод выделения геномной ДНК из растительного материала для RAPD-анализа является быстрым, экономичным, т. к. не требует дорогостоящего оборудования и реактивов, по сравнению с другими молекулярными методами оценки растительных генотипов, а также простым в исполнении. Растительный материал может быть взят как из поля, теплицы, так и выращен в лабораторных условиях. Данный микрометод не требует больших количеств растительной ткани (1—20 мг), что является большим преимуществом, в сравнении с другими методами, т. к. позволяет сохранить растение для дальнейшей работы. Перечисленные достоинства этого метода делают его очень удобным при работе с большим количеством проб при массовом анализе, а также при изучении отдельных генотипов растений.

5.2. Определение наличия трансгенной ДНК в готовых продуктах питания

Стандартно принятыми методами для определения наличия чужеродного генетического материала и его продуктов являются иммунологический анализ и выявление трансгенной ДНК при помощи полимеразной цепной реакции (ПЦР). В случае исследования пищевых продуктов, при изготовлении которых исходное

сельскохозяйственное сырье подвергается температурной обработке, иммунологический анализ может давать нестабильные и плохо воспроизводимые результаты, поскольку денатурированные белки часто не способны вступать в специфические реакции с антителами к нативному белку.

Полимеразно-цепная реакция в этом смысле обладает тем преимуществом, что температурная обработка сырья не влияет на качество ДНК как матрицы и поэтому содержащаяся в продуктах питания и полуфабрикатах остаточная ДНК исходного сырья при проведении ПЦР дает такие же результаты, как и нативная ДНК. Вторым критерием в пользу выбора ПЦР как метода анализа является высокая чувствительность метода, превосходящая, как минимум, на два порядка чувствительность известных иммунологических методов. Помимо этого, ПЦР является гораздо менее дорогим и более стабильным методом, чем другие методы анализа. Еще одним немаловажным достоинством ПЦР является то, что используемые в реакции синтетические олигонуклеотиды при правильном их выборе могут быть применены для проведения анализов различных трансгенов, что в случае иммунологических методов невозможно.

Методы определения наличия трансгенной ДНК в готовых продуктах питания при помощи полимеразной цепной реакции

Выделение ДНК из тестируемого продукта

В выборе метода выделения ДНК определяющую роль играет содержание масла в продуктах питания. При повышенном содержании масла (шоколад, нерафинированное растительное масло и пр.) проводится дополнительная экстракция суспензией неполярных растворителей с водой. Это позволяет перевести содержащуюся в пищевом продукте ДНК в водную фазу, в которой и производится дальнейшая очистка. Для окончательной очистки используется оригинальная методика, разработанная в центре «Биоинженерия».

Обычная длина ПЦР-фрагмента при выявлении трансгенной ДНК не превышает 1000 пар оснований, поэтому в основу нижеследующих методик легли процедуры выделения и очистки, позволяющие получить достаточно чистые препараты ДНК для проведения ПЦР. Вторым критерием отбора методик явилось требование минимизации времени, затрачиваемого на выделение одного препарата ДНК.

Методика

1. 0,5 г образца пищевого продукта гомогенизируют при помощи стеклянного или тефлонового пестика в 0,5 мл буфера А (100 mM Tris-HCl, pH 8,0, 50 mM EDTA, 500 mM NaCl, 10 mM β-меркаптоэтанола).

2. После гомогенизации добавляют 100 мкл 20 % SDS. Смесь тщательно перемешивают и инкубируют 20—30 мин при 65 °С.

3. Охлаждают до 4 °С, добавляют 0,3 мл 5 М ацетата калия, перемешивают в вортексе и центрифугируют 10 мин при 15000 об/мин на микрофуге при комнатной температуре.

4. К надосадку добавляют 1 мл смолы Wizard MaxiPreps (Promega, США) и инкубируют смесь 10 мин при 25 °С.

5. Затем прокачивают полученную смесь сквозь миниколонку Wizard (Promega, США), промывают 2 мл 80 %-ного изопропанола, отжимают оставшийся в миниколонке изопропанол центрифугированием на микрофуге (15000 об/мин, 2 мин).

6. Добавляют в микроколонку 50 мкл дистиллированной воды, подогретой до 65 °С.

7. Инкубируют миниколонку с водой 10 мин при 65 °С, и отжимают раствор ДНК в чистую стерильную микроцентрифужную пробирку центрифугированием на микрофуге (15000 об/мин, 2 мин).

В зависимости от содержания ДНК в конкретном пищевом продукте на проведение единичной полимеразно-цепной реакции в объеме 50 мкл требуется от 2 до 20 мкл полученного препарата ДНК.

Образцы пищевых продуктов с повышенным содержанием масла перед выделением ДНК требуется подвергнуть дополнительной экстракции эмульсией хлороформа в воде.

Для этого 0,5 г исследуемого продукта гомогенизируют в смеси 0,5 мл буфера А и 0,5 мл хлороформа и инкубируют гомогенат 20 мин при 56 °С. Затем охлаждают его до 4 °С и центрифугируют 10 мин при 15000 об/мин на микрофуге при комнатной температуре. Водную фазу собирают и переносят в чистую пробирку. Далее продолжают, начиная с пункта 2 вышеизложенной методики.

Выбор праймеров для проведения ПЦР

Для точного определения наличия трансгенной ДНК фирмой-поставщиком должна быть представлена информация о молекулярной структуре трансгенной вставки, а именно ее нуклеотидная последовательность. Это требование вводится для того, чтобы можно было точно идентифицировать наличие конкретной генетической конструкции. В таком случае синтетические олигонуклеотиды для проведения ПЦР будут синтезированы таким образом, чтобы выявить факт наличия кодирующей области трансгена. Длина используемых при анализе специфических праймеров должна составлять не менее 25 пар нуклеотидов с целью избежания появления в результате ПЦР неспецифических продуктов реакции.

В случае, когда подобная информация по каким-то причинам не может быть представлена (к примеру, фирма-производитель продуктов питания является только переработчиком производимого другой организацией трансгенного сырья), необходимо проводить проверку на присутствие в выделяемой из тестируемой продукции ДНК набора стандартных кассет экспрессии, применяемых в мировой практике для получения трансгенных растений. К таковым относятся праймеры для выявления генов маркеров селективной устойчивости (гены устойчивости к неомицину npt II и к гигромицину hph), а также стандартно применяемых промотерных областей (промотер вируса цветной капусты E35S и проч.).

Выбор условий проведения ПЦР

Для анализа при помощи стандартных праймеров используют общепринятые в мировой практике условия проведения ПЦР.

Для случаев специфических праймеров подбор условий проведения ПЦР осуществляется для каждого конкретного случая отдельно.

Аппаратура, применяемая при проведении ПЦР и анализе ее результатов

Анализ наличия трансгенной вставки в ДНК, содержащейся в продуктах питания, осуществляется на ДНК-амплификаторах «АМПЛИ-4» производства фирмы «Биоком», Москва. Термостатирование образцов осуществляется на сухих термостатах «Термо 24—15» производства фирмы «Биоком», Москва. Для проведения ПЦР используется термополимераза Taq производства фирмы «Биоком», Москва. Анализ продуктов ПЦР производится при помощи рестрикционного анализа этих продуктов путем электрофореза в агарозном геле и последующего фотографирования полученной картины на трансиллюминаторе UVTI производства фирмы «Биоком», Москва, на фотопленку «Микрат-Изопан» при помощи фотоап-

парата «Зенит» или в цифровом виде при помощи цифрового фотоаппарата «Кодак-ДС 120».

Фотоотпечатки или оттиски, выполненные на лазерном принтере с разрешением не менее 600 точек на дюйм, должны быть приложены к протоколу проведения испытаний.

5.3. ПЦР – идентификация близкородственных штаммов бактерий

В настоящее время методы молекулярной биологии, основанные на применении полимеразной цепной реакции (ПЦР), находят все более широкое применение в целях диагностики и экспресс-анализа разнообразного биологического материала. Интенсивное развитие подобных методик обусловлено очень высокой чувствительностью ПЦР, возможностью быстрого получения результатов (в течение одного рабочего дня), низкой стоимостью получаемых результатов (по сравнению с другими методиками) и технологичностью (возможностью организации действующей рабочей группы практически в любых условиях, вплоть до передвижной экспресс-лаборатории).

Другие молекулярно-биологические методы либо требуют для своей реализации организации специально оборудованных дорогостоящих лабораторий, либо дают результаты с низкой достоверностью. Типичный пример невозможности достоверной идентификации – филогенетический анализ близкородственных видов по нуклеотидной последовательности гена 16SpPHK. Такой анализ является общепринятым для полного описания новооткрытых видов бактерий, но дает результаты низкой надежности при попытке различить близкородственные виды, как это имеет место в случае идентификации промышленных штаммов Streptomyces или бацилл из группы B. anthracis.

Метод идентификации бактерий при помощи ПЦР

Выбор метода

Среди основанных на применении ПЦР молекулярно-биологических методов исследования биоразнообразия наиболее подходящим для целей идентификации бактерий является метод так называемого DAF-PCR, разработанный Caetano-Annoles (Caetano-Annoles G., Bassam B. J., Gresshoff P. M. (1991) DNA amplification fingerprinting using very short arbitrary oligonucleotide primers. Bio/Technology 9 : 553—556). Что касается других методов, то они либо требуют слишком обширной информации о строении генома конкретного микроорганизма (прямое выявление штамм-специфичных генов), либо дают неполную для идентификации близкородственных видов информацию (RAPD-PCR, DALP-PCR), либо слишком сложны и дорогостоящи и не могут быть рекомендованы для широкомасштабного применения (AFLP-PCR). Единственным узким местом в DAF-PCR является выбор приемлемых для точной идентификации коротких олигонуклеотидных праймеров.

Выбор праймеров

Разработанное в Центре «Биоинженерия» РАН программное обеспечение для анализа нуклеотидной последовательности полных геномных бактерий позволяет провести выбор олигонуклеотидных праймеров для DAF-PCR, обеспечивающих уверенную идентификацию бактерий на уровне штамма, что соответствует индивидуальным различиям для человека и других высших эукариотов. Подобная работа проведена для идентификации близкородственных бактерий из группы B. anthracis, для которых идентификация при помощи стандартных методов (филогенетический анализ нуклеотидной последовательности гена 16 Sp PHK) оказалась безуспешной.

Выбор условий проведения ПЦР

Условия проведения реакции определяют степень точности и воспроизводимости результатов и должны проводиться для конкретной группы бактерий.

Создание электронной базы данных

Для полной и надежной идентификации конкретного микроорганизма необходимо создать электронную базу данных о конкретной группе бактерий, в которую включаются сведения о максимально возможном числе различных имеющихся в виде чистых культур или коллекции типовых штаммов бактерий.

Выделение ДНК

Наиболее надежные результаты в ПЦР дает ДНК, выделенная непосредственно перед постановкой реакции из замороженной бактериальной пасты с применением смолы фирмы Promega (США) по модифицированному нами методу Бирнобойма и Доли:

20—40 мкл оттаявшей бактериальной массы суспендируют в 100 мкл буфера I (50 mM Tris HCL, pH 8,0, 5 mM EDTA, 50 mkg/ml RNAse). К суспензии добавляют 120 мкл лизирующего буфера (0,2 M NaOH, 1 % SDS) и ожидают лизиса бактерий, видимого по возрастанию вязкости суспензии. После этого комплекс бактериальных белков и обломков клеточной стенки осаждают добавлением 100 мкл 2,55 M ацетата калия при энергичном встряхивании на вортексе в течение 5 мин. Жесткое встряхивание на вортексе необходимо для того, чтобы порвать длинную бактериальную ДНК, которая, будучи прикреплена в нескольких точках к мембране, в противном случае выпадает в осадок вместе с комплексом SDS-белок. Затем смесь центрифугируют на микрофуге в течение 5—10 мин. Надосадок переносят в пробирку (1,5 мл) для микрофуги, содержащую 0,75 мл смолы «Wizard PCR-Prep» или «Wizard Mini Prep» фирмы Promega. Смесь тщательно перемешивают и прокачивают сквозь миниколонку, промывают осадок смолы в миниколонке 2 мл 80 % изопропанола, центрифугируют в микрофуге 1 мин при максимальных оборотах для удаления остаточной жидкости, и миниколонку помещают в стерильную пробирку (1,5 мл) для микрофуги, наносят в миниколонку 50 мкл стерильной бидистиллированной или деионизованной воды и прогревают пробирку с колонкой 5 мин при 70 °С. Затем миниколонку в пробирке помещают в микрофугу и центрифугируют 1 мин при максимальной скорости для переноса раствора ДНК в пробирку. Описанным способом получают порядка 5 мкг ДНК. Размер полученной ДНК – от 3 до 15 т. п. н., что вполне достаточно для выделения 16S РНК, бактерий (около 1500 п. н. при использовании пары праймеров 11F/1492R). При условии использования стерильных растворов и посуды получаемая ДНК может храниться при 4 °С в течение полугода. Срок хранения препаратов ДНК при –20 °С превышает 2 года.

Используемые реактивы и оборудование

ПЦР осуществляется на ДНК-амплификаторах «АМПЛИ-4» производства фирмы «Биоком», Москва. Термостатирование образцов осуществляется на сухих термостатах «Термо 24—15» производства фирмы «Биоком», Москва. Для проведения ПЦР используется термополимераза Taq производства фирмы «Биоком», Москва. Анализ продуктов ПЦР производится при помощи рестрикционного анализа этих продуктов путем электрофореза в агарозном геле и последующего фотографирования полученной картины на трансиллюминаторе UVT1 производства фирмы «Биоком», Москва, на фотопленку «Микрат-«Изопан» при помощи фотоаппарата «Зенит» или в цифровом виде при помощи цифрового фотоаппарата «Кодак-ДС 120». Фотоотпечатки или оттиски, выполненные на лазерном принтере

с разрешением не менее 600 точек на дюйм, должны быть приложены к протоколу проведения испытаний. Олигонуклеотидные праймеры синтезируются в центре «Биоинженерия» РАН.

5.4. Методы определения общих свойств генетической вставки

5.4.1. Выделение геномной ДНК и проведение полимеразной цепной реакции. Для выделения геномной ДНК из пробы продукта может применяться фенол-хлороформный или другой адекватный метод [124]. Полученные препараты ДНК сохраняются при минус 70 °С и используются для анализа методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). Олигонуклеотидные праймеры для ПЦР могут быть предоставлены фирмой-изготовителем продукции или могут синтезироваться по заказу в соответствии с данными о структуре вставки.

5.4.2. При проведении ПЦР используется Taq-ДНК-полимераза производства ИБХ РАН. В типичных экспериментах полимеризационную смесь объемом 50 мкл составляют так, чтобы она содержала 350 нг геномной ДНК, 1,5 мМ каждого из четырех дезоксирибонуклеотидтрифосфатов (фирма MBI Fermentas Lithuania), 1 ед. Taq-полимеразы. Затем к полимеризационной смеси добавляют 30 пкМ пары олигонуклеотидных праймеров в буферном растворе следующего состава: 67 мМ Трис-HCl буфер (pH 8,0 при 25° С), содержащий 16,6 мМ сульфат аммония, 67 мМ $MgCl_2$, 10 мМ 2-меркаптоэтанол, 6,7 мкМ ЭДТА и бычий сывороточный альбумин в концентрации 170 мкг/мл . Далее на каждую пробу наслаивают по 50 мкл минерального масла и реакцию проводят по программам, специально адаптированным для конкретных участков гена в многоканальном амплификаторе ДНК «Термцик» производства АО «ДНК-технология» (Москва).

При необходимости возможно проведение мультиплексной ПЦР для анализа нескольких важных фрагментов вставки.

Продукты амплификации анализируют с помощью электрофореза в пластине 6 %-ного полиакриламидного геля (2,5 ч при 200 в). ДНК-маркерами служит стандартный набор фрагментов ДНК плазмиды pBR322, полученный под действием рестриктазы Alu 1 (фирма MBI Fermentas). Окрашивание фрагментов ДНК осуществляется этидиум бромидом. Анализ результатов и фотографирование электрофореграммы осуществляют в условиях ультрафиолетовой подсветки на трансиллюминаторе.

5.5. Методы оценки функционирования вставки

5.5.1. Определение мРНК, продуцируемой вставкой, которая введена в геном растения с помощью гнездовой ПЦР.

Выделение препаратов суммарной мРНК из образцов продукта гуанидинтиоцианат-фенол-хлороформным методом [125] и проведение последующих гнездовых ПЦР с декларированными праймерами [126,125]. Детектирование синтезированных кДНК электрофорезом в полиакриламидном геле с окрашиванием этидиум бромидом [126].

5.5.2. Двумерный электрофоретический анализ белков.

В работе используются следующие реактивы: акриламид, метиленбисакриламид, агароза, трис, глицин, додецилсульфат натрия, персульфат аммония, тритон X-100, дитиотриэтол, Амберлит МВ-1, 2-меркаптоэтанол, кумасси бриллиантовый голубой R-250, кумасси бриллиантовый голубой G-250, Tween-20, 4-хлор-1-нафтол, бычий сывороточный альбумин – фирмы «Serva» (Германия); ТВИН-20 – фирмы «Merk» (Германия) амфолины pH 3—10, pH 5—7, pH 5—8, фирмы «LKB» (Швеция).

В качестве расходных материалов применяются также: нитроцеллюлозные фильтры – фирмы «Schleicher and Schull» (Германия).

Белковые экстракты из всех изучающихся биологических материалов готовят сходным образом, используя для обеспечения максимальной солюбилизации белков лизирующий раствор (ЛР), с высоким содержанием денатурирующих агентов – мочевины, меркаптоэтанола (дитиотриэтола), и тритона Х-100. ЛР – раствор 9 М мочевины, содержащий 5 % 2-меркаптоэтанола, 2 % тритон Х-100, 2 % амфолины 3,5—10.

При приготовлении ЛР сначала мочевину растворяют в деионизованной воде и дополнительно очищают добавлением Амберлит МВ-1. После 10 мин инкубации амберлит отделяют, и к раствору мочевины добавляют Тритон Х-100, дитиотриэтол (или 2-меркаптоэтанол), амфолины pH 3—10 до указанных концентраций.

При экстракции белков образцы тканей измельчают ножницами и несколько раз промывают холодным физиологическим раствором. Затем измельченную ткань гомогенизируют в стеклянном гомогенизаторе с тефлоновым пестиком в ЛР в соотношении 100 мг ткани на 2 мл ЛР и центрифугируют при 700 g в течение 10 мин. Надосадочную фракцию, содержащую солюбилизированные белки (экстракт), используют для дальнейшей работы.

Для анализа белков используют двумерный электрофорез по О'Фарреллу – метод, сочетающий фракционирование белков изоэлектрофокусированием (первое направление) с гель-электрофорезом в присутствии SDS [128, 129].

Изоэлектрофокусирование проводят в стеклянных трубках длиной 150 мм и внутренним диаметром 3,5 мм. Трубки устанавливают в штатив, герметизируют нижние отверстия пленкой Parafilm и заливают полимеризационной смесью. Для составления полимеризационной смеси готовят следующие реактивы:

1.1. 30 %-ный акриламид, 1,6 % метиленбисакриламид;

1.2. 20 %-ный тритон Х-100;

1.3. 10 %-ный персульфат аммония;

1.4. Анодный буфер для изоэлектрофокусирования: 0,01 М фосфорная кислота;

1.5. Катодный буфер для изоэлектрофокусирования: 0,02 М NaOH;

1.6. Защитный раствор: 4,5 М раствор мочевины, содержащий 1 % Тритона Х-100; 2,5 % меркаптоэтанола, 1 % амфолинов pH 3,5—10.

1.7. Переводный буфер для геля первого направления – белковый буфер (см. п. 2.2.).

Растворы 1.1; 1.2; 1.6; 1.7 хранят при температуре 4 °С в течение 2—3 недель. Остальные используют свежеприготовленными.

Приготовление 20 мл полимеризационной смеси, необходимой для заполнения 12 трубок, осуществляют, смешивая 12 г мочевины, 6,75 мл дистиллированной воды, 3 мл раствора 1.1, 2,25 мл раствора Тритона Х-100 (20 %). Эту смесь обрабатывают ионообменной смолой амберлит МБ-1, отфильтровывают и добавляют к ней 225 мкл амфолинов pH 3,5—10 и 900 мкл амфолинов pH 5—7. Смесь дегазируют, а непосредственно перед заливкой в трубки к ней добавляют 22,5 мкл ТЕМЕД и 32,5 мкл 10 %-ного раствора ПСА.

Полимеризационную смесь в трубки вносят шприцем, заполняя трубки снизу вверх до одного уровня – на 2—3 см ниже верхнего края (высота колонки геля 11 см). Сверху наслаивают воду.

После окончания полимеризации геля воду над его поверхностью удаляют и трубки устанавливают в гельэлектрофоретическую камеру «Bio-Rad», модель 175 (США). В нижний резервуар камеры наливают раствор катодный буфер. В трубки наносят анализируемые образцы, в объеме 50—150 мкл (100 мкг белка). В полупрепаративном варианте фракционирования объем наносимого образца увеличи-

вают до 250—350 мкл. Сверху, по краям трубки, наслаивают защитный раствор 1.7 и верхнюю камеру прибора заполняют анодным буфером.

Изоэлектрофокусирование до равновесного состояния проводят при напряжении, начиная с 400 В до 200 В · ч, и затем при напряжении 1000 В до суммарного значения 5400 В · ч, или (ночной режим), при напряжении 210 В двадцать часов и затем один час 1000 В до того же суммарного значения 5400 В · ч. Неравновесный вариант изоэлектрофокусирования проводят при напряжении, начиная с 400 В до 200 В · ч, и затем при напряжении 1000 В · ч до суммарного значения 1000—2500 В · ч.

По окончании изоэлектрофокусирования колонки геля вымачивают в 5 мл переводного буфера (раствор 1.7) 10 мин при комнатной температуре. Затем гели, не предназначенные для немедленного фракционирования во втором направлении, быстро замораживают и хранят при температуре –20 °С до нескольких недель.

Для фракционирования во втором направлении используют модифицированный метод Леммли [130] в пластинах с градиентом ПААГ 7,5—25 % в присутствии SDS.

Для этой цели готовят следующие растворы, из которых затем составляют полимеризационные смеси для формирования пластин ПААГ:

2.1. 60 %-ный акриламид, 0,8 %-ный метиленбисакриламид;

2.2. Буфер для разделяющего геля: 1 М Трис-HCl (pH 8,8);

2.3. Буфер для концентрирующего геля: 0,5 М Трис-HCl (pH 6,8);

2.4. 10 %-ный додецилсульфат натрия;

2.5. 10 %-ный персульфат аммония;

2.6. Электродный буфер для электрофореза: 0,025 М Трис, 0,192 М глицин, 0,1 %-ный SDS (pH 8,3);

2.7. Агарозный гель: 1 % агароза в растворе 2.6 с добавлением 0,125 % бромфенолового синего. После приготовления раствор необходимо прокипятить в течение 5 мин, а перед каждым использованием гель необходимо растопить.

Раствор 2.5 готовят непосредственно перед употреблением, остальные хранят при температуре 4 °С.

Фракционирование во втором направлении осуществляют в пластинах ПААГ размером 160 × 160 × 1 мм с линейным градиентом концентрации акриламида 7,5—25 %, в приборе для вертикального электрофореза. Пластины геля готовят в стандартных стеклянных кассетах. Пример с подробным описанием использования этого оборудования опубликован ранее [131].

Обычно для параллельного формирования 6 гелевых пластин с градиентом концентрации акриламида (разделяющий гель) готовят 2 раствора: легкий (концентрация АА 7,5 %) и тяжелый (концентрация АА 25 %), по 100 мл каждого. Полный состав этих растворов приведен в таблице.

Таблица

Составы разделяющего и концентрирующего гелей

Компоненты	Разделяющий гель		Концентрирующий гель
	25 %	6,5 %	
АА-МБА 60—0,8 %, мл	41,8	12,5	3,3
1М TRIS pH 8,8, мл	36	36	–
0,5М TRIS pH 6,8, мл	–	–	12,7
10 % SDS, мл	1	1	0,5
H_2O, мл	20,4	49,3	33,3
TEMED, мкл	53	53	20
10 % ПСА, мкл	240	240	400

Тяжелый и легкий растворы смешивают, используя смеситель Gradient former Model 395 («Bio—Rad», США) или аналогичное отечественное оборудование с тем, чтобы получить линейный градиент концентрации акриламида в кассетах, которые постепенно заполняются с помощью перистальтического насоса. Обычно одномоментно заполняется 6 пластин, что обеспечивает идентичность их изготовления и высокую воспроизводимость полученных результатов. После заполнения на полимеризационную смесь наслаивают воду. Полимеризация продолжается 30—40 мин. Затем воду удаляют, поверхность геля промокают фильтровальной бумагой и заливают раствор, формирующий концентрирующий гель.

Для приготовления 50 мл раствора концентрирующего геля необходимо смешать компоненты, указанные в таблице, причем катализаторы (TEMED и ПСА) добавляют непосредственно перед заливкой геля. Полимеризация заканчивается через 30—40 мин.

Удалив воду, на поверхность концентрирующего геля накладывают гель первого направления и заливают расплавленным агарозным гелем (раствор 2.7). С края каждой пластины формируют «карман» для нанесения белков-маркеров. В течение 5 мин агарозный гель затвердевает, обеспечивая полный контакт геля первого направления с гелевой пластиной, и кассету помещают в прибор для электрофореза.

Электрофорез проводят при следующем режиме:

сила тока	30 мА на одну пластину;
максимальное напряжение	200 В;
максимальная мощность	50 Вт.

Электрофорез заканчивают, когда лидирующий краситель доходит до нижнего края разделяющего геля.

После завершения фракционирования для детекции белков на гелевых пластинах используют окрашивание кумасси R-250 и азотно-кислым серебром.

Окрашивание белков кумасси R-250 проводится по методу Fairbanks [132] в растворе: 10 %-ная уксусная кислота, 25 %-ный изопропанол, 0,05 %-ный кумасси R-250.

Окрашивание осуществляют на водяной бане в течение 15 мин с последующей отмывкой не связавшегося красителя 10 %-ной уксусной кислотой.

Окраску азотнокислым серебром проводят в модификации Blum [133] с использованием следующих реактивов:

раствор гипосульфита натрия ($Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$) – 0,2 г/л;

раствор азотно-кислого серебра на 200 мл – 0,4 г азотно-кислого серебра, 150 мкл формалина;

проявляющий раствор на 200 мл: Na_2CO_3 – 8 г, 4 мл раствора гипосульфита натрия, 100 мкл формалина.

Все процессы при серебрении проводятся на шейкере и в пластиковых емкостях. Гель после окрашивания кумасси R-250 отмывают от краски 10 %-ной уксусной кислотой до светлого фона. Затем три раза по 20 мин выдерживают в 25 %-ном изопропаноле для удаления из геля SDS, после чего промывают дистиллированной водой (20 с). Далее в течение 1 мин гель инкубируют в растворе гипосульфита и два раза по 20 с, отмывают в дистиллированной воде. На следующей стадии гель выдерживают в растворе азотнокислого серебра 15 мин, после чего трижды по 20 с промывают дистиллированной водой.

На завершающем этапе гель помещают в проявляющий раствор, и окрашивание прекращают промывкой большим количеством воды, когда на геле перестают появляться новые пятна.

Фотографирование гелей проводится во влажном состоянии на пленку высокой чувствительности (например, Микрат 300). Гели для хранения высушиваются. Для этого их дегидратируют в растворе, содержащем 3 % глицерина и 50 % этанола в течение 30 мин, затем плотно фиксируют между двумя слоями целлофана и высушивают в натянутом виде при комнатной температуре.

5.5.3. Определение продукта экспрессии включенной вставки методом иммуноблоттинга.

Для проведения иммуноблоттинга необходимо располагать соответствующими мышиными антителами против кодируемого вставкой полипептида.

Для детектирования белкового продукта функционирования вставки рекомендуется использовать коньюгат против иммуноглобулинов мыши «Sigma» в разведении 1 : 1500 или коньюгат против иммуноглобулинов мыши «Amersham» в разведении 1 : 600.

На первом этапе анализа проводят электроперенос белков из ПААГ на нитроцеллюлозный фильтр фирмы «Schleicher and Schull» (Германия) по методу Towbin [135] с использованием буферного раствора, включающего 20 мМ Трис, 0,192 М глицин, 20 %-ный метанол, 0,1 % SDS (pH 8,3—8,4). Электроперенос проводят в специальной камере для вертикального электроблоттинга фирмы «Bio-Rad» (США) [или на другом аналогичном оборудовании] при величине напряжения 15—16 В и силе тока 120—160 мА в течение ночи (12—14 ч).

После окончания электропереноса нитроцеллюлозный фильтр промывают в трех сменах 0,01М PBS (натрий-фосфатный буфер, pH 7,4) по 5 мин.

Для детекции перенесенных на мембрану белков фильтр в течение 5—10 мин инкубируют в растворе красителя (0,25 % понсо-с, 40 % уксусной кислоты, 15 % метанола). Фоновую окраску отмывают 0,01М PBS.

На заключительном этапе, перед связыванием моноклональных антител, фильтр промывают в 0,1М PBS, содержащем 30 % изопропанола (для удаления SDS), 3 раза по 20 мин, затем пятикратно в 0,01М PBS и 0,01М PBS-0,05 % tween-20. Возможную неспецифическую сорбцию антител подавляют инкубацией фильтра в растворе 1 % БСА на 0,01М PBS в течение 1 ч при 37 °С (или в течение ночи при 4 °С). Фильтр промывают 0,01М PBS пятикратно, затем 0,1М PBS-0,05 % твин-20 пятикратно. Наконец, проводится его инкубация в растворе соответствующих антител в 0,1М PBS (разведение подбирается в каждом случае). После инкубации с МКАТ фильтр отмывают 5 раз 0,1М PBS и 5 раз 0,1 PBS-0,05 % твин-20 и инкубируют с пероксидазным коньюгатом против IgG мыши 2 ч при 37 °С. После пятикратных промывок 0,1М PBS и 0,1М PBS-твин-20 фильтр заливают буфером для окрашивания (12 мг 4-хлор-1-нафтола растворяют в 4 мл этанола, объем доводят до 20 мл 0,1М PBS и непосредственно перед применением добавляют 12 мкл 30 %-ной перекиси водорода) и выдерживают до четкого проявления окрашенных зон.

5.5.4. Оценка биологических эффектов от продукта(ов) функционирования вставки.

5.5.4.1. Полупрепаративное выделение препаратов белков после фракционирования белковых экстрактов двумерным электрофорезом.

Для получения отдельных очищенных белковых препаратов двумерным электрофорезом фракционируют суммарные белковые экстракты в стандартных, описанных выше условиях. Затем детекцию белковых фракций проводят в нефиксирующих условиях 4М раствором ацетата калия. Одноименные фракции вырезают из 20—40 гелевых пластин и собранные кусочки гелей до момента выделения хранят при –20 °С.

Некоторые белки удается элюировать за счет диффузии. В этих случаях полученные кусочки гелей, содержащие одноименный белок, измельчают и гомоге-

низируют в деионизованной воде, после чего белок элюируют в течение 15—20 мин из гомогената геля встряхиванием на магнитной мешалке. После центрифугирования в течение 20 мин при 700 g супернатант собирают, и процедура с осадком повторяется еще два раза. Объединенный супернатант (объем около 50 мл) лиофилизируют, осадок перерастворяют в 1—2 мл деионизованной воды и на холоде производят освобождение от избытка додецилсульфата натрия. Выпавший осадок отделяют центрифугированием (15 мин при 3000 g), что обеспечивает понижение концентрации SDS в супернатанте до 0,25 % [134]. Затем от остатка солей и SDS избавляются диализом против дистиллированной воды в течение 12 ч при температуре 4 °С.

Неэлюирующиеся прямо белки получают электроэлюцией. Электроэлюцию проводят в приборе для фирмы «Bio-Rad» (США) или аналогичном оборудовании. При первом употреблении диализной мембраны (поставляемой в комплекте с прибором) ее инкубируют в течение 30 мин в электродном буфере для электрофореза (раствор 2.6) при температуре 60 °С. Фрагменты геля, содержащие искомую фракцию, укладывают в стеклянную трубку, соединенную с диализной мембраной и заполненную электродным буфером для электрофореза. Трубку устанавливают в прибор, в верхнюю и нижнюю камеру заливают буфер для электрофореза, подключают электроды и процесс проводят в течение ночи при постоянной силе тока из расчета 5 мА на каждую трубку и ограничении по напряжению. Белок концентрируется в объеме около 400 мкл буфера, этот раствор собирают, мембрану промывают и эту порцию раствора прибавляют к основной. В дальнейшем раствор белка подвергают диализу, измеряют концентрацию белка по методу Бредфорд и лиофилизируют.

В работе для определения концентрации белка в различных растворах используют методику Бредфорд [136]. В основе метода лежит связывание красителя кумасси бриллиантового голубого G-250 с белком в растворе.

Для анализа отбирают образцы (разбавленные в случае необходимости), содержащие 1—10 мкг белка в 0,1 мл. К 25 мкл образца добавляют 25 мкл раствора красителя, содержащего 0,05 % кумасси бриллиантового синего G-250, 5 % этанола, 10 % ортофосфорной кислоты и измеряют поглощение при 594 нм. Концентрацию белка определяют по калибровочной кривой, построенной для раствора бычьего сывороточного альбумина («Serva»).

5.5.4.2. Проверка биологических свойств продукта функционирования вставки на культурах клеток человека.

Для проверки биологических свойств продукта функционирования вставки используют тест-системы на основе культур постнатальных диплоидных фибробластов человека, полученных как описано ранее [137].

Культивирование клеток проводят в питательной среде DMEM (фирмы «ПанЭко», РФ) с добавлением 5 % сыворотки крупного рогатого скота и 5 % сыворотки пуповинной крови человека (фирма «ПанЭко», РФ), используя или стеклянные флаконы Карреля, или пластиковые одноразовые матрасы фирмы «Costar» (Нидерланды), или 96-луночные планшеты фирм «Nunc» (Дания). В качестве органических красителей применяют витальный краситель метиленовый синий [138] и краситель Гимза [139] (фирма «Merck», Германия).

На первом этапе устанавливают зависимости между количеством клеток в лунке и интенсивностью окраски метиленовым синим, для чего клетки высевают с различной плотностью в 96-луночные планшеты и культивируют в течение 1 суток при 37 °С. Далее клетки прижизненно окрашивают в течение 1 ч метиленовым синим, добавляя в каждую лунку 25 мкл раствора красителя. Затем окрашенные клетки дважды споласкивают водой и высушивают на воздухе. Измерение оптической плотности материала лунок проводят на электрофотометре «ЭФОС 9305»

(фирма «ЭФОС», РФ) при 594 нм. Результаты определения оптической плотности и количества посеянных в лунку клеток обрабатывают с помощью компьютерной программы «SigmaPlot» или аналогичных компьютерных программ.

При изучении влияния продукта функционирования вставки на пролиферативную способность фибробластов человека к клеткам, растущим в 96-луночных платах, добавляют разные количества препарата этого белка и после 4 суток культивирования пробы окрашивают метиленовым синим, как описано выше. Параллельно все пробы микроскопируют (МБИ-3, ЛОМО, адаптированный как инвертированный микроскоп с помощью специальной насадки) для оценки морфологического состояния растущих клеток.

Перед окрашиванием красителем Гимза клеточную суспензию разной плотности в среде DMEM с 10 % эмбриональной телячьей сыворотки в объеме 200 мкл вносят в лунки 96-луночной платы. При этом первый вертикальный ряд лунок служит контролем, его не заполняют клеточной суспензией. Платы инкубируют в атмосфере 5 %-ного углекислого газа при температуре 37 °С. Через сутки клетки фиксируют добавлением в каждую лунку 50 мкл холодного свежеприготовленного 2,5 %-ного глютарового альдегида. Через 30 мин фиксации при 4 °С фиксатор из лунок удаляют, лунки дважды промывают холодным раствором Хенкса и заполняют 100 мкл красителя Гимза, специфически связывающегося с хроматином, разведенного 1 : 50 непосредственно перед использованием. Клетки инкубируют с красителем 3 ч при 37 °С. Затем краситель удаляют, лунки дважды промывают раствором Хенкса, заполняют 100 мкл элюирующего раствора (0,1 М NaH_2PO_4: C_2H_5OH – 1 : 1) и инкубируют при комнатной температуре 15 мин при непрерывном перемешивании. Измерение оптической плотности элюирующего раствора проводят на фотометре «ЭФОС 9305» при длине волны 620 нм.

6. Оценка пищевой продукции, полученной из генетически модифицированных источников, по функционально-технологическим свойствам

6.1. Необходимость провёдения тех или иных исследований по разделу 6 определяется экспертом Московского государственного университета прикладной биотехнологии министерства общего и профессионального образования Российской Федерации.

6.2. В жизнедеятельности человеческого организма главенствующую роль играет белок, поэтому представляется важным проследить, не претерпевает ли он каких-либо изменений в процессе генетической модификации, поскольку генная инженерия может привести к изменению структуры и функции белков, в частности ферментов.

Свойства белка однозначно связаны с его структурой. Основным методом исследования структуры белка является метод рентгено-структурного анализа его кристаллов. Однако для большинства белков, используемых в питании, данные об их структуре по ряду причин неизвестны. С другой стороны, известно, что структура белков также определяет их термодинамические свойства, которые, в свою очередь, влияют на их функциональные свойства.

Существует ряд методов измерения термодинамических свойств, среди которых предпочтительным методом является калориметрия. Этот метод позволяет измерять температурную зависимость теплоемкости. Из полученной зависимости можно вычислить теплоемкость для нативной и денатурированной форм белка, энтальпию и температуру денатурации белка. Вычисленные термодинамические параметры позволяют определить интегральную гидрофобность и конформацион-

ную стабильность белков [38—40]. Указанные характеристики тесно связаны с главными функциональными свойствами [41—44].

Метод ионопарной высокоэффективной жидкостной хроматографии в обращенных фазах позволяет идентифицировать единичные замены аминокислотных остатков в белковой макромолекуле и незаменим при сравнительном исследовании белков [44].

В процессе изменения генома организма в нем накапливаются компоненты, обеспечивающие его устойчивость к внешним неблагоприятным факторам-заболеваниям, насекомым-вредителям или гербицидам и т. д. В определенных концентрациях эти компоненты могут быть опасными для здоровья человека, употребляющего в пищу продукты, полученные с применением методов генной инженерии. Поэтому в процессе промышленной переработки такого сырья могут потребоваться изменения в существующих технологиях, обеспечивающие минимальное остаточное содержание опасных для здоровья компонентов. Такие изменения в технологии могут сказаться на качественных показателях (функционально-технологических свойствах) белковых препаратов, вырабатываемых из генетически модифицированного сырья. Кроме этого, предполагается целенаправленное изменение аминокислотного состава белков, выделяемых из генетически модифицированной пищевой продукции (например, имеющих сбалансированный АКС), для повышения их пищевой ценности. Это неизбежно повлечет изменение функционально-технологических свойств коммерческих белковых препаратов и отразится на качестве пищевых продуктов, в которых они используются. Это, в свою очередь, может привести к необходимости внесения изменений в технологические процессы, использующие эти препараты. Поэтому необходим непрерывный контроль (мониторинг) свойств белковых препаратов, вырабатываемых из генетически модифицированного пищевого сырья при, безусловно, безопасном содержании компонентов вредных для здоровья человека.

Микро- и макростабильность белковой молекулы определяет ряд наиболее важных функциональных свойств белка, таких как растворимость, способность стабилизировать эмульсии и пены, образовывать гели, удерживать жир и влагу [9—13].

Эти функциональные свойства напрямую связаны с характеристиками готовых пищевых продуктов.

Функциональное свойство	Влияние на характеристики готового продукта
pH водной суспензии	характеристика белковых препаратов; определяет принципиальную возможность использования белкового препарата в конкретном виде продукции
Растворимость	используют в качестве первичного показателя качества белковых препаратов; обусловливает реологические свойства белоксодержащих пищевых систем, устойчивость эмульсий, стабилизированных белком, жироудерживающую способность белковых препаратов
Реологические свойства водных дисперсий	определяют уровень введения препаратов в продукт, обеспечивающий требуемый комплекс реологических свойств готового продукта, влияет на режимы материальных потоков в технологическом процессе
Водоудерживающая и жироудерживающая способность	влияют на уровень введения в продукт белковых препаратов, обеспечивающий снижение потерь при технологической обработке (варке и жаренье), однородную консистенцию изделий, снижение брака в результате отделения воды и жира, сокращения объема изделий
Критическая концентрация гелеобразования	определяет уровень введения в продукт белковых препаратов, обеспечивающий требуемый комплекс структурно-механических характеристик готового продукта
Эмульсионная стабильность	определяет уровень введения в продукт белковых препаратов, обеспечивающий получение устойчивых жировых эмульсий, препятствующий отделению жира в процессе технологической обработки

В настоящее время отсутствуют стандартизованные методы определения функциональных свойств, и результаты измерений должны носить сравнительный характер по отношению к препаратам или коммерческим продуктам, произведенным из немодифицированного пищевого сырья.

Основные методы определения функциональных свойств препаратов приведены в следующей таблице.

Показатель	Метод определения	Литературный источник
1	2	3
Идентификация состава продуктов	Гистологический метод	51
Растворимость	Спектрофотометрия	50
Водоудерживающая способность	Метод центрифугирования	46
Эмульсионная стабильность	Метод центрифугирования	47
Критическая концентрация гелеобразования	Метод термотропного гелеобразования	48
Жироудерживающая способность	Метод центрифугирования	49
Конформационная стабильность	Микрокалориметрия	38—40
Идентификация аминокислотных остатков	Метод ионопарной ВЖХ	45
Термодинамические свойства	Метод дифференциальной сканирующей микрокалориметрии	39
Интегральная гидрофобность	Микрокалориметрия	40, 41, 42, 43, 44
Реологические свойства водных дисперсий	Вискозиметрия	52
Аминокислотный состав	ВЖХ	45
Органолептические свойства жиров: цвет, запах, прозрачность	Квалиметрия	53
Показатель преломления	Рефрактометрия	53
Плотность жиров	Денситометрия, гравиметрия	53
Вязкость жиров	Вискозиметрия	53
Жирно-кислотный состав	ГЖХ	53
Иодное число	Волюмометрия	53
Кислотное число	Волюмометрия	53
Число омыления	Волюмометрия	53
Температура клейстеризации крахмала	Вискозиметрия	54
Размер крахмальных зерен	Оптическая микроскопия	54
Водоудерживающая способность крахмала	Гравиметрия	54
Реологические свойства водных дисперсий крахмала	Вискозиметрия	54
Набухание крахмальных зерен	Оптическая микроскопия	54
Критическая концентрация гелеобразования крахмала	Метод термотропного гелеобразования	54
Содержание амилозы и амилопектина	Спектрофотометрия	54

7. Медико-биологическая оценка пищевой продукции, полученной из генетически модифицированных источников

7.1. Санитарно-химические показатели

Необходимость проведения тех или иных санитарно-химических исследований для каждого вида пищевой продукции, полученной из генетически модифицированных источников, определяется экспертом на основании требований, изложенных в «Гигиенических требованиях к качеству и безопасности продовольственного сырья и пищевых продуктов» СанПиН 2.3.2.560—96 (Москва, 1997) и с учетом химического состава исходной аналогичной продукции, полученной традиционным способом без использования генной инженерии [1, 2].

7.1.1. Показатели безопасности

Показатель	Метод определения	Предел обнаружения	Литературный источник
1	2	3	4
Цинк, медь, свинец, кадмий, олово, железо	Атомно-абсорбционный	1 мкг /кг	3
Ртуть	Колориметрический	10 мкг/кг	4
Мышьяк	Колориметрический	100 мкг/кг	5
Пестициды	Газожидкостная хроматография	1 мкг/кг	6
Углеводороды	Оптические и хроматографические методы (ГЖХ, ВЭЖХ, ХМС)	100 мкг/кг	7
Патулин	Хроматографический (ТСХ)	10 мкг/кг	8
Афлатоксин М 1	Хроматографические ТСХ, ВЭЖХ	0,3 мкг/кг 0,02 мкг/кг	9
Афлатоксин В 1	Хроматографические ТСХ, ВЭЖХ	1 мкг/кг 0,15 мкг/кг	9
Зеараленон	Хроматографические ТСХ, ВЭЖХ	100 мкг/кг 5 мкг/кг	10
Дезоксиниваленол	Хроматографические ТСХ, ВЭЖХ	200 мкг/кг 50 мкг/кг	10
Т-2 токсин	Хроматографический ГЖХ	50 мкг/кг	11
Нитриты	Титрометрический	10 мг/кг	12
Нитрозамины	Флюориметрический хемилюминисцентный	1 мкг/кг 0,1 мкг/кг	13
Остаточные количества антибиотиков	Микробиологический	0,01—0,5 ЕД/г	14

7.1.2. Показатели качества

Показатель	Метод	Литературный источник
1	2	3
Общий белок	Определение азота по Кьельдалю с пересчетом на белок	15, 16
Фракционный состав белков	Молекулярно-ситовая хроматография	15
Аминокислотный состав белков	Аминокислотный анализатор	17
Общие липиды	Гравиметрический	15, 18
Жирно-кислотный состав общих липидов и фракций	ГЖХ жирных кислот	19

9-6982

Продолжение

1	2	3
Фосфолипиды	ВЭЖХ	20
Стерины и эфиры стеринов	Хромато-масс-спектрометрическое	21
Углеводы	ВЭЖХ	22
Крахмал	Поляриметрический ферментативный	15, 16
Гемицеллюлоза, клетчатка, пектин	ВЭЖХ	15, 16, 22
Витамин А и каротиноиды	ВЭЖХ	23
Витамин Е	ВЭЖХ	23
Витамин Д	ВЭЖХ	23
Витамин С (аскорбиновая кислота)	Метод визуального титрования 2,6 дихлорфенолиндофенолом	24
Витамин B_1	Флуориметрический тиохромный метод	24
Витамин B_2	Флуориметрический (титрование рибофлавинсвязывающим апобелком)	25
Витамин РР	Флуориметрический метод	24
Витамин B_6	ВЭЖХ	23
Витамин B_{12}	Радиоиммунологический	24
Фолиевая кислота	Радиоиммунологический метод конкурентного связывания	24
Кальций	Визуальное титрование с кальцеином	24
Фосфор неорганический	Колориметрический	24
Натрий, калий, магний, железо, цинк, медь, хром, молибден	Атомно-абсорбционный	15
Селен	Спектрофлюориметрический	26
Нуклеиновые кислоты	Спектрофотометрический	27
Флаваноиды	ВЭЖХ хроматофотометрический	28, 29, 30, 31
Эфирные масла	ГЖХ, ВЭЖХ	32, 33
Соланин	Спектрофотометрический	34
Биогенные амины	ВЭЖХ	35
Дубильные вещества	Титрометрический, колориметрический	36, 32
Цианогенные гликозиды	Титрометрический	37
Фенолкарбоновые кислоты	Спектрофотометрический	36, 30

7.2. Радиологические показатели безопасности

Согласно «Гигиеническим требованиям к качеству и безопасности продовольственного сырья и пищевых продуктов» (СанПиН 2.3.2.560—96) для продуктов, в состав которых входит растительное сырье, определяются радиологические показатели безопасности.

Показатель	Допустимый уровень (не более)	Литературный источник
Цезий-137	200 Бк/кг	55
Стронций-90	100 Бк/кг	56

Радиационная безопасность БАД к пище, загрязненной другими радионуклидами, определяется соответствием ее нормативам ГН 2.6.1.054—96 «Нормы радиационной безопасности (НРБ—96)».

7.3. Оценка безопасности пищевой продукции, полученной из генетически модифицированных источников, на лабораторных животных

7.3.1. Схема проведения эксперимента

Вид животных	Линейные или беспородные белые крысы самцы (дополнительно – крысы самки)
Продолжительность эксперимента	не менее 6 месяцев для крыс
Количество групп животных	3
Описание экспериментальных групп	**1-ая (контроль-1)** –крысы на протяжении эксперимента находятся на общевиварном или полусинтетическом рационе **2-ая (контроль-2)** – крысам в рацион включается в аггравированном количестве изучаемая продукция, полученная традиционным способом **3-я (опыт)** – крысам в рацион включается в аггравированном количестве изучаемая продукция, полученная из генно-модифицированного источника
Содержание животных	по 5 в клетке
Количество забоев	2 (через 1 и 6 месяцев от начала эксперимента)
Количество крыс в группе на начало эксперимента	ориентировочно с учетом возможной гибели 36
Исходная масса крыс	60—80 г при формировании групп разница средней массы крыс не должна превышать 3 г
Количество крыс в группе, взятых на исследование на забое	8

7.3.2. Экспериментальные рационы

Питание и поение животных вволю.

Общевиварный рацион крыс (на 1 крысу массой 130—240 г)
(Приказ министра здравоохранения СССР № 1179 от 10.10.83)

Ингредиент	Масса, г	Белок, г	Жир, г	Углеводы, г	Ккал
подсолнечник (семена) овес	3,7 10,3	0,76 1,03	1,9 0,63	0,114 4,9	22,1 25,8
хлеб 2 сорта пшеничный	4	0,34	0,05	1,83	9,32
каша пшенная	2,5	0,27	0,34	1,56	10,5
творог нежирный	2	0,36	0,012	0,036	1,76
рыбная мука	0,5	0,23	0,027	0	1,17
мясо 2 кат.	4	0,8	0,39	0	6,72
морковь	8	0,104	0,008	0,67	2,4
зелень (салат)	8	0,12	0,016	0,25	1,36
рыбий жир	0,1	0	0,099	0	0,9
дрожжи	0,1	0,05	0,01	0,083	0,085
NaCl	0,15				
ИТОГО	43,35	4,06	3,48	9,44	82,12

Рацион, рекомендованный институтом питания РАМН

Продукты	Вес продуктов, г на 100 г смеси	Вес крыс в граммах						
		40—60	60—90	90—120	120—200	200—280	280—330	свыше
казеин	24	2,4	3,15	3,58	4,8	5,1	6,0	7,0
дрожжи*	6	0,6	0,78	0,89	1,2	1,27	1,5	1,5
крахмал	56	5,6	7,38	8,35	11,2	11,9	14,0	16,0
масло раст.	5	0,5	0,65	0,74	1,0	1,0	1,2	1,5
лярд	5	0,5	0,65	0,74	1,0	1,0	1,2	1,5
солевая смесь**	4	0,4	0,52	0,59	0,8	0,8	1,0	1,0
витамины ж/р***	1	0,1	0,1	0,12	0,15	0,18	0,19	0,19
целлюлоза	2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
отруби	8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8

Вместо дрожжей можно использовать витаминную смесь (см. следующую табл.).

***Состав витаминной смеси на 100 г смеси**

Витамины	Количество
B_1 (тиамид-бромид)	500 мг
B_2 (рибофлавин)	500 мг
B_6 (пиродоксин)	500 мг
Пантотенат кальция	2 г 800 мг
Никотиновая кислота	2 г
Фолиевая кислота	20 мг
B_{12} (на кончике скальпеля)	4 мг
Викасол	100 мг
Глюкоза (или сахароза, или фруктоза)	93,600 мг (до 100 г)

Водорастворимые витамины 0,1 % от количества сухих веществ рациона.

****Состав солевой смеси**

№ пп	Название солей	Формула	г
1	Хлористый натрий	NaCl	58,5
2	Фосфорнокислый калий однозамещенный	$KHPO_4$	163,3
3	Серно-кислый магний	$Mg\ SO_4 \cdot 7H_2O$	24,1
4	Углекислый кальций	$CaCO_3$	160,2
5	Серно-кислое железо (закисное)	$FeSO4 \cdot H_2O$	11,1
6	Йодистый калий	KJ	0,322
7	Серно-кислый марганец	$MnSO_4 \cdot 2H_2O$	1,87
8	Серно-кислый цинк	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0,230
9	Серно-кислая медь	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0,200
10	Хлористый кобальт	$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0,010
11	Фтористый натрий	NaF	0,210
12	Алюмокалиевые квасцы	$KAl(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$	0,047
		Итого:	420,089

*****Приготовление жирорастворимых витаминов**

Витамины	На 100 мл	На 500 мл
Е (токоферол 50 мг/мл)	10 мл	50 мл
А (ретинол – 100000 и. е./мл)	0,8 мл	4 мл
(оргокальциферол – 50000 и. е./мл)	1,4 мл	7 мл
Подсолнечное масло довести	87,8 мл	439 мл

7.3.3. Исследуемые показатели

Интегральные показатели

- Общее состояние животных (ежедневные наблюдения).
- Для контроля за массой тела животных взвешивают в первый месяц опыта – 1 раз в неделю, в дальнейшем 1—2 раза в месяц и перед забоем.
- На забое определяют абсолютную массу внутренних органов и рассчитывают относительную массу внутренних органов [57].

Биохимические показатели

Биохимические показатели определяются при забое животных.

Показатель	Метод	Литературный источник
1	2	3
Сыворотка крови		
Общий белок	Унифицированный метод по биуретовой реакции	58
Альбумин	Унифицированный метод по реакции с бромкрезоловым зеленым	59
Белковые фракции	Унифицированный метод электрофоретического разделения	60
Глюкоза	Глюкозооксидазные методы	61
Мочевина	Унифицированный метод по цветной реакции с диацетилмонооксимом	62—63
Креатинин	Унифицированный метод по цветной реакции Яффе	63—64
Общие липиды	Турбидиметрический	65
Холестерин	Унифицированные методы по реакции с уксусным ангидридом или с хлорным железом	66—67
Триглицериды	Спектрофотометрические	68—69
Минеральный состав	Атомно-абсорбционный	70
Аланинаминотрансфераза	Спектрофотометрические	71—72
Аспартатаминотрансфераза	Спектрофотометрические	71—72
Щелочная Фосфатаза	Спектрофотометрические	73—74
Глутатионредуктаза, глутатионпероксидаза, супероксиддисмутаза, каталаза	Спектрофотометрические	75, 150—155
Продукты ПОЛ (малоновый диальдегид, диеновые коньюгаты)	Спектрофотометрические	76, 146—149
α-амилаза	Спектрофотометрические	77—78
Моча		
pH, относительная плотность, суточный диурез	Общепринятые	79
Белок	Биуретовый метод	80
Глюкоза	Унифицированные методы обнаружения глюкозы в моче	81
Креатинин	Унифицированный метод по цветной реакции Яффе	63—64

Продолжение

1	2	3
Печень		
Цитохром Р-450	Спектрофотометрический	82
Цитохром b_5	Спектрофотометрический	82
N-деметилирование амидопирина	Спектрофотометрический	84
О-деметилирования р-нитроанизола	Спектрофотометрический	85
Гидроксилирование 3,4 бензпирена	Спектрофлюориметрический	86
О-деэтилирование 7-этоксикумарина	Спектрофлюориметрический	87
О-деэтилирование 7-этоксирезофурина	Спектрофлюориметрический	88
β-галактозидаза, β-глюкуронидаза, арилсульфатазы А и В, α-маннозидаза, β-N-ацетилглюкозаминидаза	Спектрофотометрический, спектрофлюориметрический	89
Эпоксидгидролаза	Спектрофлюориметрический	90
УДР-глюкуронозилтрансфераза	Спектрофотометрический и спектрофлюориметрический	91

Гематологические показатели

Показатель	Метод	Литературный источник
1	2	3
концентрация гемоглобина	гемиглобинцианидный	92
общее количество эритроцитов	унифицированный метод подсчета в счетной камере	93
гематокритная величина	унифицированный микрометод (модификация Й. Тодорова)	94
среднее содержание гемоглобина в эритроците (ССЭ) (пг)	расчетный $ССЭ = \frac{конц.\ гемоглобина\ г\% \times 10}{эритроциты\ в\ млн.}$	94
средняя концентрация гемоглобина в эритроците (СКЭ) (%)	расчетный $СКЭ = \frac{конц.\ гемоглобина\ г\%}{гематокритн.\ величина\ об\%} \times 100$	94
средний объем одного эритроцита (СОЭ) (мю)	расчетный $СОЭ = \frac{гематокритн.\ величина \times 10}{эритроциты\ в\ млн.}$	94
общее количество лейкоцитов, лейкоцитарная формула	• унифицированный метод подсчета в счетной камере; • унифицированный метод морфологического исследования форменных элементов крови с дифференцированным подсчетом лейкоцитарной формулы; • приготовление мазков крови унифицированным методом, фиксация и окраска мазков унифицированным методом	94

Морфологические исследования

Все животные, погибшие в ходе эксперимента, вскрываются и составляется протокол вскрытия. На забое проводятся морфологические исследования, изложенные в таблице.

Исследуемые органы	Методы	Литературный источник
1	2	3
все внутренние органы	макроскопические исследования при вскрытии на забое	
печень почки селезенка желудок тонкий кишечник семенники поджелудочная железа сердце	1. Обзорные гистологические исследования, окраска срезов органов, полученных с парафиновых блоков, гематоксилином и эозином 2. Дополнительные специальные морфологические исследования: • изучение жировых включений в клетке, окраска суданом; • выявление жирных кислот с помощью сульфата нильского голубого; • выявление холестерина; • выявление в клетках РНК окрашиванием пиронином и метиловым зеленым; • выявление липофусцина в клетках; • выявление коллагеновых волокон в соединительной ткани; • выявление эластических волокон в соединительной ткани; • морфометрический метод исследований размеров площади гистологических структур и их колебаний в патологии	95, 96, 97

7.4. Специальные методы исследования

Необходимость проведения тех или иных специальных методов исследования определяется экспертом Института питания РАМН.

7.4.1. Изучение влияния продуктов, полученных из генетически модифицированных источников, на функцию воспроизводства с выявлением возможного эмбриотоксического, гонадотоксического и тератогенного действия

Условия проведения эксперимента

Исследования проводятся на белых линейных крысах. Животные разбиваются на 3 группы, в каждой группе 10 самцов и 25 самок. Исходная масса самок не менее 180 г, исходная масса самцов не менее 200 г. Первая контрольная группа крыс (самцы и самки) получает на протяжении всего эксперимента общевиварный или полусинтетический рацион (см. п. 7.3); вторая контрольная группа (самцы и самки) получает общевиварный или полусинтетический рацион с включением исследуемого продукта, полученного традиционным способом в аграрированном количестве; опытная группа крыс (самцы и самки) получает общевиварный или полусинтетический рацион с включением аналогичного продукта, полученного из генетически модифицированных источников в том же количестве, что и крысы второй контрольной группы. Животные находятся на этих рационах 30 дней до спаривания, во время спаривания, беременности, лактации. Полученное потомство находится на этих рационах до момента половой зрелости. Исследуются 5 поколений крыс.

Изучение влияния продукта, полученного из генетически модифицированных источников на пренатальное развитие потомства

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 20-й 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 фиксируют в жидкости Буэна и используют для изучения внутренних органов. Другую фиксируют в 96 %-ном этаноле и используют для изучения состояния скелета (2—3 плода от приплода) [98]. Подсчитывают количество желтых тел, количество живых эмбрионов, количество погибших эмбрионов (мест резорбции). Вычисляют общую эмбриональную смертность, смертность эмбрионов до и после имплантации [99].

Изучение влияния продукта, полученного из генетически модифицированных источников, на постнатальное развитие потомства

По 15 беременных самок в каждой группе оставляют до родов и проводят изучение потомства: количество крысят, родившихся у одной самки, их внешний вид, фиксируют количество мертворожденных животных, потомство взвешивают при рождении, затем еженедельно. Учитывают следующие показатели физиологического развития крысят: сроки отлипания ушных раковин, открытия глаз, прорезывания резцов, покрытия шерстью, пол животных [100]. Наблюдения за потомством осуществляют ежедневно. Рассчитывают выживаемость потомства на 30-й день.

7.4.2. Исследование возможного мутагенного действия

Выявление мутагенного действия испытуемых продуктов на соматических и половых клетках проводится на лабораторных животных, а изучение генных мутаций на микроорганизмах или дрозофиле.

Продукт скармливается лабораторным животным в различных количествах в качестве составной части диеты в разные сроки в зависимости от характера опыта.

На подопытных и контрольных животных проводятся исследования:

- цитогенетические исследования метафазным методом в соматических клетках (костный мозг, лимфоциты крови животных);
- изучение генетических изменений в половых клетках методом выявления доминантных летальных мутаций;
- изучение генных мутаций производится по выбору на микроорганизмах или дрозофиле; микробиологические методы используются для первичной оценки на мутагенность. Для этих целей чаще всего используют штаммы микроорганизмов Salmonella thyphimurium [140—142].

В зависимости от характера опыта используются следующие животные:

- линейные мыши (С57 Bl/6 или другие чувствительные к мутагенам), самцы, вес 18—20 г;
- гибридные мыши, самки, вес 18—20 г.

Для оценки мутагенного действия испытуемого продукта изучают хромосомные аберрации в клетках костного мозга и доминантные летальные мутации (ДЛМ) в половых клетках подопытных и контрольных животных. Цитогенетические исследования проводят метафазным методом. Согласно методу, животных, получавших испытуемый и контрольный продукт, через 24 ч после последнего скармливания забивают (предварительно за 2 ч до забоя вводят внутрибрюшинно колхицин для накопления метафаз) и берут костный мозг из 2-х бедренных костей.

После гипотенизации клеток в термостате с помощью 0,5 %-ного раствора KCl и фиксации смесью этанол + уксусная кислота готовят цитогенетические препараты. От каждого животного анализируют 70—100 клеток на стадии метафазы деления ядра. В опытах используют мышей-самцов линии C57 Bl/6 в возрасте двух месяцев, весом около 20 г. Считается, что животные этой линии наиболее чувствительны к мутагенам [101].

Генетические изменения в половых клетках изучают методом выявления доминантных летальных мутаций у мышей-самцов C57 Bl/6 [101—102]. Проведение эксперимента сводится к следующему: подопытным и контрольным животным скармливают испытуемый продукт в течение 30 дней. После периода скармливания 15 подопытных и 13 контрольных самцов ссаживают с интактными виргинными самками линии CBA в соотношении 1 : 2 с целью их скрещивания. Подсадка самок к подопытным самцам производится еженедельно на протяжении 3-х недель, что дает возможность оценить действие испытуемого продукта на половые клетки в постмейотическом периоде – сперматиды и зрелые спермии. Отсаженных беременных самок убивают методом смещения шейных позвонков на 15—17 день беременности, вскрывают, подсчитывают число желтых тел, количество живых и мертвых эмбрионов. По этим данным рассчитывают индексы мутагенности: доимплантационную, постимплантационную смертность, индуцированную летальность.

В случае необходимости рекомендуется проводить исследования на генные мутации на дрозофиле или микроорганизмах.

- Метод исследования генных мутаций в зародышевых клетках дрозофилы, основанный на определении в х-хромосоме самцов дикого типа (Д 32) рецессивных летальных мутаций, передающихся через дочерей самкам второго поколения [103—104].
- Метод выявления на микроорганизмах мутагенной активности трансгенного продукта, подвергнутого метаболическим процессам в организме млекопитающих (тест Эймса и метод промежуточного хозяина) [105—106].

7.4.3. Оценка потенциальной аллергенности пищевых продуктов, получаемых из генетически модифицированных источников

Для оценки потенциальной аллергенности продукции, получаемой из генетически модифицированных источников в Институте питания РАМН разработана экспериментальная модель системной анафилаксии, возникающей у лабораторных животных (крыс) при их внутрибрюшинной сенсибилизации с последующим введением разрешающей дозы гомологичного белкового антигена внутривенно.

Метод исследования заключается в количественной оценке изменений тяжести протекания системной анафилаксии и уровня циркулирующих сенсибилизирующих антител (субклассов $IgG_1 + IgG_4$) у крыс, получающих в составе рациона тестируемый продукт, полученный из генетически модифицированных источников, в сравнении с животными, получающими аналогичный продукт, изготовленный из традиционных источников.

Принцип метода

Метод основан на количественной оценке тяжести реакции системной анафилаксии, возникающей при внутрибрюшинной (в/б) сенсибилизации взрослых крыс самцов линии ВИСТАР пищевым антигеном-овальбумином куриного яйца (ОВА) с последующим внутривенным (в/в) введением сенсибилизированным животным разрешающей дозы того же белка.

Определение включает следующие этапы:

- в/б сенсибилизация крыс антигеном-ОВА, адсорбированном на корпускулярном носителе – гидроксиде алюминия;
- одновременное с процессом сенсибилизации кормление животных рационами, содержащими тестируемый и контрольный продукт;
- взятие крови для определения антител и в/в введение разрешающей дозы ОВА, количественная оценка тяжести развивающегося анафилактического шока;
- иммуноферментное определение уровней циркулирующих специфических антител к ОВА;
- математическая обработка результатов исследования и составление заключения о потенциальной аллергенности исследуемого продукта.

Животные

Исследования выполняют на крысах самцах линии ВИСТАР с исходной массой 150—180 г. Животных содержат на стандартном рационе вивария, не содержащем яичного белка, в течение 7—10 дней перед началом эксперимента по 5—6 животных в клетке. Контролируют массу тела крыс, отстающих в приросте массы тела в течение периода адаптации удаляют.

В течение периода кормления экспериментальным рационом (всего 29 дней) животные получают в составе рациона тестируемый и контрольный продукт в квоте, не превышающей 20 % общей калорийности рациона.

Формируют 2 группы крыс по 25 животных в каждой. Животные 1-й группы получают тестируемый продукт, а животные 2-й группы – контрольный продукт в составе своих рационов. На 1-й, 3-й, 5-й день опыта крыс в/б сенсибилизируют ОВА, а на 21-й день эксперимента вводят дополнительную («бустерную») дозу антигена, уменьшенную в 10 раз в сравнении с первоначальной. Кормление рационами продолжают до утра 29-го дня эксперимента. Далее крыс помещают в домики для в/в манипуляций и вводят раствор ОВА в/в, после чего оценивают на протяжении 24 ч тяжесть развивающейся реакции анафилаксии. Непосредственно перед введением разрешающей дозы у крыс отбирают 0,1—0,2 мл крови из хвостовой вены для определения уровня специфических антител.

***Примечание**: В случае если тестируемые продукты имеют жидкую консистенцию (молочные продукты, напитки), вместо добавления в диету допускается вводить их животным ежедневно внутрижелудочно через зонд, снабженный гладкой оливой диаметром не более 2 мм.*

Материалы и оборудование

- Овальбумин куриного яйца (ОВА), 5-кратно перекристаллизованный лиофилизированный препарат.
- Раствор хлорида натрия 0,15 моль/л (физиологический раствор).
- Шприц инъекционный «Рекорд» на 1,0 мл с иглой для в/б инъекций.
- Шприц инъекционный «Рекорд» на 20 мл с зондом для в/ж введения.
- Алюмокалиевые квасцы $K[Al(SO_4)_2] \cdot 12H_2O$, препарат квалификации, ч. д. а.
- Гидроксид натрия NaOH, препарат квалификации, ч. д. а.
- Центрифуга лабораторная с горизонтальным ротором ОПН-3.
- Универсальный индикатор.
- Домики для в/в манипуляций на крысах, из оргстекла или дерева.
- Шприц инъекционный «туберкулиновый» с иглой для в/в введений.
- Комплект реактивов и оборудования для иммуноферментного анализа.

Приготовление антигена и сенсибилизация

Навеску 10 мг ОВА растворяют в 1,0 мл физиологического раствора (ФР) и добавляют 1,0 мл 10 %-ного водного раствора алюмокалиевых квасцов. На этой стадии раствор должен оставаться прозрачным. После этого добавляют по каплям при перемешивании 0,6 мл водного раствора NaOH 1 моль/л до образования плотного белого осадка. Проверяют pH по универсальному индикатору: pH = 5 ± 1. Осадок отделяют центрифугированием 5 мин при 3000 об/мин. Супернатант декантируют, а осадок промывают 10 мл ФР. Центрифугирование и промывку повторяют 3 раза. Окончательно осадок гидроксида алюминия с адсорбированным ОВА диспергируют в 20 мл ФР.

Полученную дисперсию антигена вводят крысам строго внутрибрюшинно в количестве 0,2 мл (по 100 мкг ОВА в 1 дозе).

Для проведения «бустерной» инъекции готовят антиген по той же схеме, за исключением того, что исходная навеска ОВА уменьшается в 10 раз (1,0 мг).

Введение разрешающей дозы и оценка тяжести реакции системной анафилаксии

Перед введением разрешающей дозы ОВА крыс помещают в домики для в/в манипуляций. Хвост животного погружают на 10—15 мин в воду с температурой 37 ± 1 °С.

С помощью иглы для в/в введений и шприца типа «туберкулиновый» отбирают 0,2—0,3 мл крови для определения антител. После этого строго в/в вводят разрешающую дозу 5 мг ОВА в 0,5 мл ФР (10 мг /мл ОВА). **Внимание!** *Подкожное попадание раствора белка не допускается!*

Симптомы системной анафилаксии развиваются у крыс, обычно, на протяжении первых 2—5 мин после введения разрешающей дозы. Тяжесть реакции оценивают в баллах в соответствии со шкалой (см. таблицу).

Тяжесть реакции (баллы)	Симптоматика
0	отсутствует
1	вялость, озноб, одышка
2	атаксия, цианоз, парез задних конечностей
3	судороги, паралич
4	летальный исход

Окончательный подсчет числа летальных исходов осуществляют на протяжении первых 24 ч после введения разрешающей дозы.

Иммуноферментное определение специфических антител

В основу метода анализа антител к ОВА у крыс положен принцип непрямого твердофазного иммуноферментного теста на полистероле (indirect ELISA).

В лунки полистерольных планшет вносят по 1,0 мкг ОВА в 0,1 М Na-бикарбонатном буфере pH 9,7 ± 0,1 и оставляют на 16 ч в холодильнике. По окончании адсорбции антигена буфер удаляют путем промывки 0,01 М Na-фосфатным буфером pH 7,3 ± 0,1 с 0,15 М NaCl и 0,1 % Твин-20 (Твин-PBS). В лунки на 30 мин вносят по 200 мкл 1 %-ного раствора желатины в Твин-PBS. Отмывку повторяют, после чего вносят в лунки по 100 мкл стандартов крысиных антител к ОВА, очищенных методом аффинной хроматографии, или исследуемых сывороток крови крыс в разведении 1 : 2000. Разведения выполняют на PBS с 0,2 %-ного бычьего сывороточного альбумина (DSA-PBS). Планшеты инкубируют 90 мин при 22 °С со встряхиванием, после чего 5-кратно отмывают Твин-PBS и вносят по 100 мкл кроличьих антител к JgG крысы, коньюгированных с пероксидазой, в разведении

1 : 1000 в BSA-PBS. Инкубацию и отмывку повторяют, после чего проводят реакцию со 100 мкл субстрата 0,04 %-ного о-фенилендиамина и 0,04 %-ного H_2O_2 в 0,1 М Na-цитрат-фосфатном буфере pH 6,00 ± 0,05 в течение 10 мин при 37 °С. Реакцию останавливают добавлением 100 мкл 1 М H_2SO_4 Оптическую плотность измеряют при длине волны 492 нм на фотометре АКИ-Ц-01.

Концентрацию антител определяют по стандартному графику в полулогарифмических координатах методом линейной интерполяции на ЭВМ.

Математическая обработка результатов эксперимента и оценка результата

Тяжесть реакции анафилактического шока в каждой из групп животных оценивают следующими показателями:

- процентом летальных реакций анафилаксии;
- анафилактическим индексом, рассчитанным по формуле:

$$АИ = (1/N) \cdot \sum^{N} ri, \text{ где}$$

N – число крыс в группе;

i – номер крысы;

r – тяжесть реакции анафилаксии в баллах.

Достоверность различия тяжести реакции анафилаксии между двумя группами определяют в соответствии с U-тестом углового преображения Фишера. Для этого для каждого из указанных безразмерных показателей (выраженных в долях единицы) рассчитывают преобразованную долю выработки по формуле:

$$\varphi = 2 \cdot arcsin \sqrt{p}, \text{ где}$$

p – долевой показатель;

arcsin – определяется в радианах.

Далее для двух сравниваемых групп №№ 1 и 2 рассчитывают величину U-критерия по формуле:

$$U = |\varphi_1 - \varphi_2| \cdot \sqrt{N_1 \cdot N_2 / (N_1 + N_2)}$$

Различие по данному показателю признается достоверным (нуль гипотеза отклоняется, $P < 0{,}04$), если $U \geq 1{,}96$.

Различие в тяжести реакции анафилаксии между двумя группами в целом признается достоверным, если достоверно различие хотя бы по одному из двух вышеуказанных показателей.

Достоверность различий средних значений и дисперсий уровней антител к ОВА в двух группах определяют, соответственно, с использованием Т-теста Стьюдента и F-теста на остаточную дисперсию Фишера. Анализу подвергают показатели оптической плотности (D492) концентрации антител (мг/мл) и десятичного логарифма концентрации антител.

Все расчеты выполняют на ЭВМ с использованием стандартного пакета программ EXCEL5.0a.

7.4.4. Иммунологические исследования

7.4.4.1. Исследования на крысах

Исследования проводятся по схеме хронического эксперимента при тех же условиях кормления и содержания. Через 1 месяц и через 6 месяцев от начала эксперимента определяют следующие показатели:

Изучаемые показатели		Литературный источник
Показатели гуморального иммунитета	Суммарный уровень иммуноглобулинов и количество иммуноглобулинов различных классов	107—109
Показатели клеточного иммунитета	Реакция бласттрансформации лимфоцитов in vitro Реакция торможения миграции лейкоцитов	110—111
Неспецифические факторы иммунитета	Система комплемента белки острой фазы лизоцим	107, 112

7.4.4.2. Исследования на мышах

Исследование иммуномодулирующего действия продукта на гуморальное звено иммунитета

Изучение иммуномодулирующего действия продукта на гуморальное звено иммунитета оценивается в тесте определения уровня гемаглютининов к эритроцитам барана. Испытываемый продукт скармливают мышам в течение 21 дня (опытная группа – 10 мышей). Контролем служат 2 группы мышей (20 мышей). Используются мыши 2-х оппозитных линий: C57 BL/6 и CBA. После курса вскармливания опытной и одной контрольной группе мышей вводят внутрибрюшинно 0,5 мл эритроцитов барана (концентрация 20 млн. клеток/мл), вторая контрольная группа остается интактной. Кровопускание проводится на 7-й, 14-й и 21-й день. Сыворотку крови титруют в реакции гемагглютинации общепринятым методом [113]. Подсчитывают среднюю арифметическую титра гемагглютининов в каждой группе мышей.

Изучение иммуномодулирующего действия продукта на клеточное звено иммунитета

Изучение иммуномодулирующего действия продукта на клеточное звено иммунитета определяют в реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) к эритроцитам барана. Используются мыши двух оппозитных линий. Испытываемый продукт скармливают мышам в течение 21 дня (опытная группа мышей – 10). После курса скармливания опытной и одной контрольной группе вводят подкожно в межлопаточную область эритроциты барана в дозе 1 млн клеток на мышь в объеме 0,1 мл. Вторая контрольная группа остается интактной. На пятый день всем мышам в подушечку одной задней лапы вводят разрешающую дозу эритроцитов барана в концентрации 1 млрд. клеток на мышь в объеме 0,02 мл. В контрлатеральную подушечку лапы в том же объеме – 0,95%-ный 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 [114].

Изучение продукта как сенсибилизирующего агента к продуктам метаболизма организма

Изучение продукта как сенсибилизирующего агента к продуктам метаболизма организма изучают в тесте чувствительности мышей к гистамину [115].

Используются мыши линии C57 BL/6. Испытываемый продукт скармливают опытной группе (10 мышей) в течение 21 дня. Контрольная группа – 10 мышей. После курса скармливания опытной и контрольной группам мышей вводят внутрибрюшинно гистамин гидрохлорид в дозе 2,5 мг на мышь в объеме 0,5 мл физиологического раствора. Реакцию учитывают через 24 ч по проценту гибели мышей.

Изучение влияния продукта на естественную резистентность мышей к сальмонеллам мышиного тифа

Изучение влияния продукта на естественную резистентность мышей к сальмонеллам мышиного тифа проводят на модели внутрибрюшинного заражения мышей линии C57BL/6 десятикратно отличающимися дозами S. typhimurium штамм 415. Испытываемый продукт скармливают мышам в течение 21 дня (опытная группа – 30 мышей). Контрольная группа – 30 мышей. После курса скармливания мышей заражают тремя дозами культуры: от 1000 до 10 микробных клеток на мышь (соблюдая 10-кратный интервал). Наблюдение за животными производится в течение 14 дней. Подсчитывают $ЛД_{50}$ в опытной и контрольной группе, процент гибели животных по каждой дозе и проводят сравнительный анализ результатов.

7.4.5. Определение биологической ценности и усвояемости

Биологическую ценность белков определяют химическими и биологическими методами, а усвояемость – только биологическим.

7.4.5.1. Химический метод

В соответствии с рекомендациями ФАО/ВОЗ [116] для определения биологической ценности белков химическим методом используют метод расчета аминокислотного скора с коррекцией на усвояемость, основанный на анализе и сопоставлении содержания незаменимых аминокислот в исследуемых белках относительно их уровня в справочной аминокислотной шкале с последующей коррекцией полученных величин на коэффициент усвояемости.

Для изучения аминокислотного состава белков проводят их гидролиз с последующим определением содержания аминокислот на автоматических анализаторах. Для большей точности определения рекомендовано [117] использовать пять типов гидролиза каждого белка, в т. ч. три кислотных гидролиза, отличающихся лишь по продолжительности (24, 48, 72 ч), специальный кислотный гидролиз с предварительным окислением надмуравьиной кислотой для определения серосодержащих аминокислот в виде цистеиновой кислоты и метионинсульфона и щелочной гидролиз для определения триптофана. При этом, для всех незаменимых аминокислот, исключая серосодержащие и триптофан, строится кривая их содержания в зависимости от вышеуказанной продолжительности кислотного гидролиза и по максимальному значению на ней оценивают уровень аминокислоты.

Методы гидролиза белков

- высокобелковые концентраты с продолжительностью гидролиза 24, 48, 72 ч [117];
- низкобелковые продукты, содержащие углеводы и /или липиды, с продолжительностью гидролиза 24, 48, 72 ч [117];
- для определения серосодержащих аминокислот [117];
- для определения триптофана [117].

Определение содержания аминокислот

Определение содержания свободных аминокислот осуществляют на автоматических анализаторах аминокислот в пяти видах гидролиза каждого исследуемого белка в соответствии с инструкцией для конкретного вида анализатора.

Расчет аминокислотного скора

Аминокислотный скор (АС) белков рассчитывают для каждой незаменимой аминокислоты путем соотношения ее содержания в 100 г исследуемого белка к ее же содержанию в справочной аминокислотной шкале [116].

$$AC = \frac{\text{содержание незаменимой аминокислоты в г /100 г исследуемого белка}}{\text{содержание этой же аминокислоты в справочной аминокислотной шкале}}$$

Для расчета АС используют справочную аминокислотную шкалу, предложенную экспертами ФАО/ВОЗ:

Аминокислота	Содержание в справочной аминокислотной шкале
Валин	3,5
Изолейцин	2,8
Лейцин	6,6
Лизин	5,8
Метионин + цистин	2,5
Треонин	3,4
Триптофан	1,1
Фенилаланин + тирозин	6,3

За величину АС исследуемого белка принимают наименьшее из полученных значений.

Расчет биологической ценности

Биологическую ценность белка определяют путем коррекции установленной величины АС на коэффициент усвояемости (У) данного белка. Значения У в виде величин истинной усвояемости для различных белков, полученных в исследованиях с участием человека, составляют:

Продукт	Коэффициент усвояемости белков
Яйцо	0,97
Молоко, сыр, казеин	0,95
Мясо, мясопродукты, рыба	0,94
Кукуруза	0,85
Рис	0,88
Хлопчатник	0,90
Подсолнечник	0,90
Пшеничная мука грубого помола	0,86
Пшеничная мука рафинированная	0,96
Пшеничный глютен	0,99
Овсяная крупа	0,86
Пшено	0,79
Горох	0,88
Арахис, мука	0,94
Картофель	0,89
Соевая мука	0,90
Изолят соевого белка	0,95
Американская смешанная диета	0,96

Формула расчета аминокислотного скора с коррекцией на коэффициент усвояемости (АСУ), т. е. биологической ценности, является следующей:

$$АСУ = АС \cdot У$$

При этом, если получаемая величина превышает единицу, то значение биологической ценности приравнивается к единице и белок считается полноценным; если расчетная величина меньше единицы, то она отражает конкретное значение биологической ценности и тип лимитирующей белок незаменимой аминокислоты.

7.4.5.2. Биологический метод

Для определения биологической ценности и усвояемости белков на экспериментальных животных (для этого чаще всего применяют линейных белых крыс) возможно использование двух подходов: одноуровневые по содержанию белка в корме животных эксперименты с целью сравнительного изучения биологической ценности и усвояемости одновременно нескольких образцов белков и многоуровневые исследования для получения более объективной информации о качестве белков. Во всех случаях используют полусинтетические диеты [117].

Схема экспериментов

1. Животные – линейные белые крысы одного пола с исходной массой тела около 50 г.

2. Длительность эксперимента – 4 недели: последние 5 дней – обменный период.

3. Содержание животных – индивидуальное в обменных клетках.

4. Опытный (опытные) или контрольный (казеин) белки являются единственным источником азота в корме животных. В случае исследования белка, содержащегося в многокомпонентных пищевых продуктах, при составлении корма учитывается содержание в этих продуктах других пищевых веществ.

5. Корм приготовляют ежедневно; его потребление и потребление воды не ограничивают.

6. Одноуровневые исследования:

- количество групп животных – одна контрольная (казеин) и опытная или опытные в зависимости от количества испытуемых образцов белка;
- число животных в каждой группе – 10;
- содержание белка в корме 9 % (по калорийности);
- в случае необходимости расчета истинных значений аминокислотной ценности и усвояемости белков вводится дополнительная группа крыс (10—15 животных), которых содержат в индивидуальных обменных клетках на безбелковой, но энергетически эквивалентной другим диете в течение всего эксперимента.

7. Многоуровневые исследования:

- количество групп животных – 5 опытных (для каждого исследуемого белка) и 5 контрольных (для казеина);
- число животных в каждой группе – 10;
- содержание белка (опытного или контрольного) в корме – 3, 6, 9, 12 и 18 % (по калорийности). Вводится дополнительная группа животных на безбелковой диете.

8. Критерии оценки: масса тела ежедневно (в обменном периоде взвешивание не производится); поедаемость корма (ежедневно, за обменный период отдельно), экскреция азота с калом (за обменный период).

9. Рассчитывают для каждого уровня белка в корме кажущиеся или истинные значения биологической ценности (коэффициент эффективности белка – КЭБ) и усвояемости (У) по следующим формулам.

$$КЭБ_{каж.} = \frac{МТ}{Б_э};\ КЭБ_{ист.} = \frac{МТ + МТ_{бб}}{Б_э},\ \text{где}$$

$МТ$ – привес массы тела за экспериментальный период;

$МТ_{бб}$ – потеря массы тела за экспериментальный период крысами, потреблявшими безбелковую диету;

$Б_э$ – количество потребленного белка за экспериментальный период.

$$У_{каж.} = \frac{Б_о - К}{Б_о};\ У_{ист.} = \frac{Б_о - (К - К_{бб})}{Б_о},$$ где

$Б_о$ – количество потребленного белка за обменный период;

$К$ – количество белка, экскретированного с калом за обменный период;

$К_{бб}$ – количество белка, экскретированного с калом за обменный период крысами, потреблявшими безбелковую диету.

10. В многоуровневом варианте исследований на графике зависимости величины любого из этих показателей.

7.4.6. Исследование возможной канцерогенности и влияние на продолжительность жизни

Исследования по разделу 7.4.6 проводятся в соответствии с действующими нормативными документами и в установленном порядке.

7.4.7. При необходимости в зависимости от характера изучаемой генетической модификации могут проводиться дополнительные исследования.

8. Клинические испытания новых видов пищевой продукции, полученной из генетически модифицированных источников

В клинических исследованиях на добровольцах следует использовать **три уровня дозировок.**

1. Нормальный диетический уровень – количество пищевого продукта, которое типично потребляется человеком.

2. Максимальный диетический уровень – максимальное количество пищевого продукта, которое может быть использовано для ежедневного потребления в течение длительного срока совместно с другой пищей.

3. Максимально выполнимое введение – максимальное количество пищевого продукта, которое можно употребить в течение короткого срока (обычно ограничивается физиологической вместимостью желудочно-кишечного тракта).

Условия проведения клинических испытаний

Испытания проводятся на 2-х группах здоровых добровольцев по 10—20 человек в каждой группе в условиях стационара. Испытуемая группа получает продукт, полученный из генетически модифицированного источника, контрольная группа – аналогичный продукт из традиционного источника. Сначала постепенно доводят количество потребляемого продукта питания до максимально возможного введения. Если не наблюдается проявлений непереносимости или других проявлений, то потребление на этом уровне сохраняют в течение 48 ч, контролируя общее состояние добровольцев, физиологические параметры, биохимические показатели крови и т. д. Инструментальные и лабораторные методы исследования используются на усмотрение врача. В случае обнаружения серьезных отрицательных проявлений испытание заканчивается до выяснения причин.

Если не наблюдались отрицательные проявления, то дозировка понижается до максимального диетического уровня и испытание продолжается 90 дней с проведением следующих видов исследований.

Оценка органолептических свойств продуктов и их переносимости

Изучение органолептических свойств осуществляется с использованием анкетно-опросного метода. Оценивается вкус, запах, консистенция.

Переносимость оценивается путем клинического наблюдения по субъективным и объективным признакам. Исследуется состояние:

10-6982

- кожных покровов;
- системы пищеварения;
- сердечно-сосудистой системы и других органов и систем организма.

Рекомендуемые биохимические показатели

Показатель	Литературный источник
1	2
Сыворотка крови	
Общий белок	117
Белковые фракции	59—60
Креатинин	63—64
Азот мочевины	62—63
Мочевая кислота	62—64
Тимоловая проба	143
Сулемовая проба	143
Физические свойства мочи	144
Микроскопия осадка мочи	145
Малоновый диальдегид (плазма крови)	146
Малоновый диальдегид (эритроциты)	147
Диеновые коньюгаты (плазма крови)	148
Диеновые коньюгаты (эритроциты)	149
Глутатионредуктаза	150, 151
Глутатионпероксидаза	152
Каталаза	153, 154
Супероксиддисмутаза	155
Отдельные аминокислоты (по показаниям)	75
Общий холестерин	66—67
Триглицериды	68—69
Липопротеиды высокой плотности (по показаниям)	118—119
Липопротеиды низкой и очень низкой плотности (по показаниям)	118—119
Аполипопротеины A_1 B (по показаниям)	75
Содержание витаминов (по показаниям) Витамин А и каротиноиды Витамин Е Витамин С Витамин РР Витамины группы В	23—24 121
Глюкоза	61
Щелочная фосфатаза	73—74
Аланинаминотрансфераза Аспартатаминотрансфераза	71—72
Амилаза	77—78
Минеральный состав (по показаниям)	15
Моча	
Суточный диурез, pH, относительная плотность	79
Креатинин	63—64
Азот мочевины	62—63
Белок (по показаниям)	80
Глюкоза (по показаниям)	81
Реакция на ацетон (по показаниям)	122

Продолжение

1	2

Рекомендуемые гематологические показатели периферической крови

Показатель	Литературный источник
Гемоглобин	92
Количество эритроцитов	93
Цветной показатель	94
Содержание лейкоцитов и лейкоцитарная формула	94
Фибриноген	156
Фибринолитическая активность	157
Протромбиновое время	158

Рекомендуемые иммунологические показатели

Показатели гуморального иммунитета
Количество В клеток, (СД $_{19}$, СД $_{20}$) (123)
Иммуноглобулины основных классов (123)

Показатели клеточного иммунитета
Фенотипирование Т-клеток (123)

Неспецифический иммунный ответ
Компоненты системы комплемента
Определение числа фагоцитирующих клеток и фагоцитарного индекса.
Генерация супероксидного аниона нейтрофилами (123).

В качестве дополнительных можно рекомендовать:

1) проведение исследований на протяжении 6-ти месяцев. В этих исследованиях наблюдают от 100 до 500 добровольцев, потребляющих новый продукт на максимальном диетическом уровне. Контролируют общее состояние добровольцев, физиологические параметры, биохимические показатели крови и т. д.;

2) проведение длительных популяционных исследований, которые позволят оценить долговременные последствия влияния потребления новых продуктов питания на большое количество людей и идентифицировать маленькие субпопуляции (менее чем 0,1 % населения), которые могут иметь особые проблемы с новыми продуктами питания. В зависимости от природы (характера) продукта питания испытания проводят на 1000—3000 добровольцах, получающих новые продукты питания на нормальных диетических уровнях в течение 1,5—2 лет. В дополнение к контролю жизненно важных признаков, физиологических параметров, биохимических показателей крови и т. д. также необходимо обеспечить сбор информации относительно влияния этой продукции на деторождение и количество онкологических заболеваний.

Список литературы

1. Гигиенические требования к качеству и безопасности продовольственного сырья и пищевых продуктов: Санитарные правила и нормы СанПиН 2.3.2.560—96.—М., 1997.

2. Химический состав пищевых продуктов: Справочник. Кн. 1: Справочные таблицы содержания основных пищевых веществ и энергетической ценности пищевых продуктов.—М.: ВО «Агропромиздат», 1987.

3. Руководство по методам анализа качества и безопасности пищевых продуктов/ Под ред. И. М. Скурихина и В. А. Тутельяна.—М.: «Брандес-Медицина», 1998.

4. Методические указания по обнаружению и определению содержания общей ртути в пищевых продуктах методом беспламенной атомной абсорбции (№ 5178—90).

5. Сырье и продукты пищевые. Метод определения мышьяка: ГОСТ 26930—86.

6. Методические указания по определению микроколичеств пестицидов в продуктах питания, кормах, внешней среде: Сб. 5—18 ч.—М.: МЗ СССР, 1976, 1991.

7. Методические указания по выделению, идентификации и количественному определению насыщенных и моно-, би-, триряда полициклических ароматических углеводородов в пищевых продуктах. № 4721—88, 1988.

8. Продукты переработки плодов и овощей. Метод определения микотоксина патулина: ГОСТ 28038—89.

9. Афлатоксины В и М. Методические указания по обнаружению, идентификации и определению содержания в продовольственном сырье и пищевых продуктах с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии. № 408286, 1986.

10. Методические указания по обнаружению, идентификации и определению содержания дезоксиниваленола и зеараленона. № 5177—90, МЗ СССР.

11. Методические указания по обнаружению, идентификации и определению содержания Т-2 токсина в пищевых продуктах и продовольственном сырье. № 3184—84, МЗ СССР, 1984.

12. Методические указания по определению нитратов и нитритов в зерне и зернопродуктах. МЗ СССР, 1990.

13. Методические рекомендации по определению нитратов и нитритов в молоке и молочных продуктах. МЗ СССР, 1990.

14. Методические указания по определению остаточных количеств антибиотиков в продуктах животноводства. Утв. МЗ СССР 29.06.84 № 3049/84.—М., 1985.

15. Руководство по методам анализа качества и безопасности пищевых продуктов/ Под ред. И. М. Скуририна и В. А. Тутельяна.—М.: «Брандес-Медицина», 1998.

16. AOAC Official methods of analysis, AOAC Internatioonal, 1996.—V. 2, chapter 33, 45, 48.

17. Lim F. Determination of choline in feeds // J. Assoc.Of.Agr. Chem.—1964.—V. 47.—P. 501.

18. Кейтс М. Техника липидологии.—М.: Химия, 1975.

19. Iupac. Standart metods for the analysis of oil, fats and derivatives. 2.302. Pergamot press, 1979.

20. Fox J. M. In phosphatidilcholine. Peeters/ ed/ Springer Berlin, 1976.—P. 3—7.

21. Левачев М. М., Медведев Ф. А., Гарбузов А. Г. и др. // Прикладная биохимия и микробиология. —1988.—№ 3.—С. 24.

22. Cheetman N. W. et.al. J. of Chromatography, v. 207.—p. 439—444, 1981.

23. Якушина Л. М., Бендер Е. Д., Харитончик Л. А. // Вопросы питания.—1993.—№ 1.—С. 43—47.

24. Теоретические и клинические аспекты науки о питании / Под ред. Волгарева М. Н.—Т. 8, 1987.—210 с.

25. Коденцова В. М., Вржесинская О. А., Рисник В. В. // Прикладная биохимия и микробиология.—1994.—№ 4—5.—С. 603—609.

26. Методы контроля. Химические факторы. Определение селена в продуктах питания: Методические указания МУК 4.1.033—95.—М., 1995.

27. Спирин А. С. / Спектрофотометрическое определение суммарного содержания нуклеиновых кислот // Биохимия, 1958.—Т. 23. № 5.—С. 656.

28. Pettersson H., Kiesseling K. H / (1984) Liquid chromatographic determination of the plant estrogeens coumestrol and isoflavones in animal feed // J.Assoc. Off Anal/ Che 67: 503—506.

29. Marine D. Balestrieri F. / Ital. J. Food Sci/ 1995—7.— № 3—С. 255—261.

30. Георгиевский Н. Ф., Комисаренко С. Е., Дмитрук / Биологически активные вещества лекарственных растений.—Новосибирск: Наука, 1990.—333 с.

31. Госфармакопея СССР ГФ.—Т. 2, 1990.

32. Chamblet T. S. at al / Quantatitative Analysis of volative constitutnts of lemon Peel Oil // J Agric. Food Chem.—1991.—№ 339.—P. 162.

33. Ляпков Б. Г., Воробьева Л. Ш., Медведев Ф. А., Киселева Т. В. и др. Экстракционное концентрирование и хромато-масс-спектрометрическое определение d-лимонена в маслах цитрусовых и других биологических образцах // ЖАХ.—1996.—Т. 51.—№ 4.—С. 451—454.

34. Ляпков Б. Г. Киселева Т. В. Характеристика липидов микробного происхождения по триацилглицеридному составу и их сравнение с растительными маслами // Прикладная биохимия и микробиология.—1993.—№ 1.—С. 155.

35. Development Food Analysis Techniques L.: Apl. Sci. Publ, 1978—1980.—V. 1—2.— P. 125.

36. Церевитинов Ф. В. Химия и товароведение свежих плодов и овощей.—М.: Госторгиздат, 1949.—Т. 2.—225 с.

37. Сборник международных методов анализа и оценки вин и сусел.—М.: Пищевая промышленность, 1993.—269 с.

38. Privalov P. L., Potekhin S. A. In: Methods in enzimology., Eds: C.H.W. Hirs S.N. Timasheff., Ecad.Press. INC., NY., 131, 1986; 4—51.

39. V. Grinberg, A. Danilenko. Conformation stability 11, S Globulins from seeds. J. Sci.Food Agric.1989; 49: 235—248.

40. Danilenko A. N. Dianova V.T.Braudo, T. Henning R.Mothes and K.D. Schwenke. A novel approach to the evalution of hydrophobicity of food.In. Nahrung 42 1998; 3—4: 179—182.

41. Nakai S., Li-Chan., Hydrophobic interactions in Food systems., CRC press. Inc.,Boca Ration, Florida, 1988.

42. Kato A., Nakai.S, Biohim.Diophys.Acta. 1980; 624: 13—20.

43. Shimizu.V., Saito V, Yamauchi.K., Agric. Biol. Chem. 50, 1986.—P. 791—792.

44. Kato A. Genetic Engenering Approaches to relationships between Structure and Functionalitry of Hen Egg-White Lysozyme in Food Proteins, ed. K.D. Schwenke and R.Mothes. New York, 1992.—P. 3—16.

45. Остерман Л. А. Хроматография белков и нуклеиновых кислот.—М.: Наука, 1985.—P. 168—218.

46. Гурова Н. В., Попело И. А., Сучков В. В. О роли нативности соевых белков при оценке функционально-технологических свойств белковых препаратов // Мясная индустрия.—1999.—№ 1.—С. 23—25.

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

48. Метод определения критической концентрации термотропного гелеобразования. Материалы 3-ей Международной научно-технической конференции «Пища. Экология. Человек».—М., 1999.— №1.— 40 с.

49. Взаимодействие белков и липидов в растительных продуктах. В кн.: Растительный белок / Пер. с фр. В. Г. Долгополова; Под ред. Т. П. Микулович.—М.: Агропромиздат, 1991.— 684 с.

50. Попело И. А., Сучков В. В., Гринберг В. Я., Толстогузов В. Б. Выделение и очистка 11S глобулинов из семян кормовых бобов и гороха // Прикладная биохимия и микробиология.—1988.—24.— С. 50—55.

51. Пищевое законодательство Германии (№ 35). Официальный метод 06.00.13. «Определение тканевого состава мяса, мясопродуктов и колбасных изделий – традиционные методы количественных и качественных гистологических исследований».

52. Suchkov V. V., Popello I. A., Grinberg V. Y, Tolstoguzov V. B. Shear effects on phase behaviour of the legumin-salt-water system. Modelling protein recovery. Food Hydrocolloids.1997; 11.— P.135—144.

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

54. Химия и технология крахмала.—М.: Пищепромиздат, 1956.— 579 с.

55. Цезий-137. Определение в пищевых продуктах: Методические указания 5779—91.—М., 1991; Свидетельство МА МВИ ИБФ № 15.— С. 1—89.

56. Стронций-90. Определение в пищевых продуктах: Методические указания 5778—91.—М., 1991; Свидетельство МА МБФ № 14.— С.1—89.

57. Трахтенберг И. М., Сова Р. Е., Шефтель В. О., Оникиенко Ф. А. Показатели нормы у лабораторных животных в токсикологическом эксперименте.—М.: Медицина, 1978.

58. Лабораторные методы исследования в клинике: Справочник / Под редакцией Меньшикова В. В.—М.: Медицина, 1987.—С. 174—175.

59. Лабораторные методы исследования в клинике: Справочник / Под редакцией Меньшикова В. В.—М.: Медицина, 1987.— С. 176.

60. Лабораторные методы исследования в клинике: Справочник / Под редакцией Меньшикова В. В.—М.: Медицина, 1987.—С. 177—179.

61. Лабораторные методы исследования в клинике: Справочник / Под редакцией Меньшикова В. В.—М.: Медицина, 1987.—С. 230—234.

62. Лабораторные методы исследования в клинике: Справочник / Под редакцией Меньшикова В. В.—М.: Медицина, 1987.—С. 216.

63. Биохимические методы исследования в клинике / Под редакцией Покровского А. А.—М.: Медицина, 1969.—С. 103.

64. Лабораторные методы исследования в клинике: Справочник / Под редакцией Меньшикова В. В.—М.: Медицина, 1987.—С. 220—221.

65. Биохимические методы исследования в клинике / Под редакцией Покровского А. А.—М.: Медицина, 1969.—С. 289.

66. Биохимические методы исследования в клинике / Под редакцией Покровского А. А.—М.: Медицина, 1969.—С. 300.

67. Лабораторные методы исследования в клинике: Справочник / Под редакцией Меньшикова В. В.—М.: Медицина, 1987.—С. 242—243.

68. Биохимические методы исследования в клинике / Под редакцией Покровского А. А.—М.: Медицина, 1969.—С. 294.

69. Лабораторные методы исследования в клинике: Справочник / Под редакцией Меньшикова В. В.—М.: Медицина, 1987.—С. 246—247.

70. Методические указания по атомно-абсорбционным методам определения токсичных элементов в пищевых продуктах и пищевом сырье: ГКСЭН РФ № 02.19/47—11.

71. Лабораторные методы исследования в клинике: Справочник / Под редакцией Меньшикова В. В.—М.: Медицина, 1987.—С. 186—190.

72. Биохимические методы исследования в клинике / Под редакцией Покровского А. А.—М.: Медицина, 1969.—С. 111—114.

73. Лабораторные методы исследования в клинике: Справочник / Под редакцией Меньшикова В. В.—М.: Медицина, 1987.—С. 205—208.

74. Биохимические методы исследования в клинике / Под редакцией Покровского А. А.—М.: Медицина, 1969.—С. 158—162.

75. Тиц Н. Энциклопедия клинических лабораторных тестов.— М.: Лабинформ, 1997.

76. Иргашев Ш. Б., Юлдашев Н. М., Гурнев С. Б., Хадиметова Ш. А., Эльмуратова М. Т. Процессы гидроксилирования и интенсивность ПОЛ в микросомах печени при экспериментальном инфаркте миокарда // Патологическая физиология и экспериментальная терапия.—1993.—№ 3.—С. 19—20.

77. Биохимические методы исследования в клинике / Под редакцией Покровского А. А.—М.: Медицина, 1969.—С. 131—138.

78. Лабораторные методы исследования в клинике: Справочник / Под редакцией Меньшикова В. В.—М.: Медицина, 1987.—С. 191—192.

79. Лабораторные методы исследования в клинике: Справочник / Под редакцией Меньшикова В. В.—М.: Медицина, 1987.—С. 47—48.

80. Лабораторные методы исследования в клинике: Справочник / Под редакцией Меньшикова В. В.—М.: Медицина, 1987.—С. 49—50.

81. Лабораторные методы исследования в клинике: Справочник / Под редакцией Меньшикова В. В.—М.: Медицина, 1987.—51 с.

82. Omura T., Sato R. Biol Chem, 1964.—№ 239.—P. 2370—2377.

83. Карузина И. И., Арчаков А. И. Современные методы в биохимии.—М.: Медицина, 1977.—С. 49—62.

84. Fuov F., Azyrv U. Kamattaki T. et al J.Pharmac, 1979.—№ 29.—P. 191—201.

85. Dehnen W.et al Anal.Bioch.1977.—№ 53.—P. 373—383.

86. Lake B. Y. Biochem.Toxicol, 1987.—P. 207—209.

87. Lake B. Y. Biochem.Toxicol, 1987.—P. 209—211.

88. Лингл Д. Лизосомы. Методы исследования, 1980.

89. Кравченко Л. В., Соболев В. С. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.—1988.—№ 8.—С. 179—181.

90. Book K. W. et al. Biochem. Pharmac.—1980.—№ 29.—P. 495—500.

91. Лабораторные методы исследования в клинике: Справочник / Под редакцией Меньшикова В. В.—М.: Медицина, 1987.—С. 107—108.

92. Лабораторные методы исследования в клинике: Справочник / Под редакцией Меньшикова В. В.—М.: Медицина, 1987.—С. 110.

93. Лабораторные методы исследования в клинике: Справочник / Под редакцией Меньшикова В. В.—М.: Медицина, 1987.—С. 115—124.

94. Роскин Г. И., Левинсон Л. Б. Микроскопическая техника.—М.: Советская наука, 1957.

95. Р. Лилли. Патогистологическая техника и практическая гистохимия.—М.: Мир, 1969.

96. Автандидов Г. Г. Морфометрия в патологии.—М.: Медицина, 1973.

97. Методические указания по изучению эмбриотоксического действия фармакологических веществ и влияния их на репродуктивную функцию.—М.: Фармакологический Комитет, 1982.

98. Саноцкий И. В., Фоменко В. И. Отдаленные последствия влияния химических соединений на организм.—М.: Медицина, 1979.—231 с.

99. Транхтенберг И. М., Сова Р. Е., Шефтель В. О., Оникиенко Ф. А. Показатели нормы у лабораторных животных.—М.: Медицина, 1978.

100. Малашенко А. М., Суркова Н. И.— Генетика, 1973.—Т. 9.— № 4.—С. 147.

101. Qakbers— Am.J.Anat., 1956.—V. 99.—P. 507.

102. Медведев Н. Н. Практическая генетика.—М.: Наука, 1968.—294 с.

103. Белецкий Г. А., Шарупич Е. Г., Хованская Е. М. Методические рекомендации по применению соматического мутагенеза у Dr. melanogaster в качестве тест-системы для ускоренного определения канцерогенов.—М.: МЗ СССР, 1982.

104. Ames B. N., Durston W. E. Ymasaki E, Lee E. D. Carcinogens are mutagens:a simple test system combining liver homogenates for activation and Bacteria for detection-Proc.Nat.Acad. Sci.USA, 1973.—V. 70.—P. 2281.

105. Фонштейн Л. М., Абилев С. К., Бобринев Е. Ф. и др. Методы первичного выявления генетической активности загрязнителей среды с помощью бактериальных тест-систем: Методические указания.—М., 1985.—34 с.

106. Dona V. Papagni M V. Tarenghy V. et.al J.Ital. Chim.Clin 1987.—V. 12.—P. 205—214.

107. Keller S., Schieter S., Vc. Kednee F. J. Immunology Meth, 1981.—V. 51.—P. 287—291.

108. Логинский В. Е. Лабораторное дело, 1976.—№ 3.—182 с.

109. Фримель Г. Иммунологические методы.—М.: Медицина, 1987.

110. Чередеев А. Н. Общие вопросы патологии, 1976.—Т. 4.—130 с.

111. Бухарин О. В., Васильев Н. В. «Лизоцим и его роль в биологии и медицине».—Томск, 1974.—37 с.

112. Лабораторная иммунология. Лабораторные методы исследования в неинфекционной иммунологии.—М., 1967.—356 с.

113. Иммуномодулирование: Сборник трудов.—М., 1987.—С. 3—25.

114. Preston N. W. «Path.Bact.», 1959.—V. 78.—№ 1.—P. 217—224.

115. FAO/WHO Protein quality evaluation, Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation Held in Bethesda, Md, USA, 4—8 December, 1989, FAO Rome.— 2 p.

116. Pellet P. U. and Joung V. R. Nutritional Evaluation of Protein Foods eds., Food and Nutrition Bulletin Suppl.—Tokyo, 1980.— 10 p.

117. Лабораторные методы исследования в клинике: Справочник / Под ред. Меньшикова В. В—М.: Медицина, 1987.—248 с.

118. Фенотипирование гиперлипидемий: Методические рекомендации / Под ред. Климова А. Н.—М., 1975.

119. Wendel A Glutation peroxidase. Method in Ensymol, 1989.—V. 77.—P. 325—333.

120. Якушина Л. М., Таранова А. Г. // Ж. Физ. хим.—1994.—№ 10.—С. 1826—1828.

121. Лабораторные методы исследования в клинике: Справочник / Под редакцией Меньшикова В. В.—М.: Медицина, 1987.—С. 47—59.

122. Методы исследования в иммунологии / Под ред. Лефковиц И., Пернис Б.—М.: Мир, 1981.—Т. 1, 2.

123. Kaufman P. B., Wu W., Kim D., Cseke L.J. Handbook of Molecular and Cellular Methods in Biology and Medicine: CRC Press, 1995.—P. 1—25.

124. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование.—М.: Мир, 1984.—С. 186—204.

125. Wang A. M., Doyle M. V., Mark D. F. // Proc. Nat. Acad. Sci., 1989.—V. 86.—P. 9717—9722.

126. Kaufman P. B., Wu W., Kim D., Cseke L. J. Handbook of Molecular and Cellular Methods in Biology and Medicine: CRC Press, 1995.—P. 243—262.

127. O'Farrell P. H. Hight resolution two-dimensional electrophoresis of proteins // J.Biol.Chem., 1975.—V. 250.—№ 10.—P. 4007—4021.

128. O'Farrell P. H., Goodman H. M., O'Farrell P. Z. Hight resolution two-dimensional electrophoresis of basic as well as acidic proteins. // Cell, 1977.—V. 12.—P. 1133—1142.

129. Laemmly U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T. 4. // Nature, 1970.—V. 227, P. 680—685.

130. Шишкин С. С., Ильинский Р. В., Ковалев Л. И., Борисенко В. И., Громов П. С., Чесалин Л. С. Анализ результатов двумерного электрофоретического фракционирования на комплексе цифровой обработки видеоинформации (СВИТ) // Вопросы медицинской химии.—1988.—№ 2.—С. 131—135.

131. Fairbanks G., Steck T. L.,Wallach D. F. H. Electrophoretic analysis of the major peptides of the erytrocyte membrane // Biochemistry, 1971.—V. 10.—P. 2607—2617.

132. Blum H., Beir H., Cross H. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels // Electrophoresis, 1987.—V. 8.—P. 126—129.

133. Ohnashi T. et al. Preparative hight-yield electroelution of proteins offer separation by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis and its application to analysis of aminoacid sequences and to rise antibodyes // J.Chromatogr., 1991.—V. 585.—P. 153—159.

134. Towbin H., Staehelin T., Gordon J., Jordan J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: prosedure and some applications // Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1979.—V. 79.—P. 4350—4354.

135. Bredford M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of micrograme quantities of protein utilising the principle of protein- dye binding // Anal.Biochem., 1976.—V. 72.—P. 248—254.

136. Гринберг К. Н., Кухаренко В. И., Ляшко В. Н., Терехов С. М., Пичугина Е. М., Фрейдин М. И., Черников В. Г. В кн.: Методы культивирования клеток.—Л.: Наука, 1988.—С. 250—257.

137. Ромейс Б. Микроскопическая техника.—М.: ИЛ, 1953.—С. 471—473.

138. Тестирование лекарственных препаратов наружного применения в культуре клеток кожи человека: Методические рекомендации № 96/247.—М.: Минздрав, 1996.

139. Ames B. N In: Chemical Mutagens Principles and Methods or their Detection.—New York, 1971.—V. 1.— 267 p.

140. Ames B. N, Whitfield H. Y.-Hlth.Plespectives, 1973.—V. 6.—115 p.

141. Ames B. N, Zee F., Durstonw-Proc.nat. Acad.Sci: (USA), 1973.—V. 70.— 782 p.

142. Лабораторные методы исследования в клинике: Справочник / Под редакцией Меньшикова В. В.—М.: Медицина, 1987.—С. 179—180.

143. Лабораторные методы исследования в клинике: Справочник / Под редакцией Меньшикова В. В.—М.: Медицина, 1987.—С. 47—48.

144. Лабораторные методы исследования в клинике: Справочник / Под редакцией Меньшикова В. В.—М.: Медицина, 1987.—С. 59—60.

145. Michara M., Uchiyama. Biochem. Med, 1980.—P. 23, 32.

146. Ernster L., Nordenbrandt K. Meth. Enzymology, 1967.—10.—P. 575.

147. Placer Z. Nahrung 1968, 12 679 в модификации Гаврилов В. Б., Мишкорудная М. И. // Лабораторное дело.—1983.—V. 3.—P. 33—35.

148. Placer Z. Nahrung, 1968.—V. 12.— 679 p.

149. Tilbotsen J. A., Sauberlich H. S. J. Nutr., 1971.—V. 101.—P. 1459.

150. Мальцев Г. Ю., Орлова Л. А. Вопросы медицинской химии, 1994.—Т. 2.—С. 59—61.

151. Mille G. J. Biol. Chem., 1959.—V. 244.—P. 502—506.

152. Osino N., Chance B / Arch. Biochem., 1973.—V. 154.—117 p.

153. Мальцев Г. Ю. Васильев А. В. Вопросы медицинской химии, 1994.—Т. 2.—С. 56—58.

154. Niashikimi M / Rao N.A. Jagi K. Biochem. Biophys. Res. Commun, 1972.—V. 46.—P. 849—854.

155. Лабораторные методы исследования в клинике: Справочник / Под редакцией Меньшикова В. В.—М.: Медицина, 1987.—С. 168.

156. Лабораторные методы исследования в клинике: Справочник / Под редакцией Меньшикова В. В.—М.: Медицина, 1987.—С. 171.

157. Лабораторные методы исследования в клинике: Справочник / Под редакцией Меньшикова В. В.—М.: Медицина, 1987.—С. 158—159.

Приложение 1

Протокол клинических испытаний

Наименование продукта _____
_____

Фамилия, И., О. наблюдаемого пациента _____

№ ист. б-ни _____ Дата госпитализации _____

Возраст _____ Пол _____ Рост _____ Вес _____

Диагноз _____
_____

Жалобы

До испытаний	После испытаний

Данные объективного обследования

До испытаний	После испытаний

Оценка органолептических свойств (по 4-балльной системе)

Внешний вид _____
Цвет _____
Запах _____
Вкус _____
Примечание _____
_____

Переносимость

Результаты биохимических исследовании

	До испытаний	После испытаний	
Холестерин			ммоль/л
Триглицериды			ммоль/л
Холестерин ЛПВП			ммоль/л
Общий белок			г/л
Альбумин			г/л
Глобулины			г/л
Альбумин/глобулины			усл. ед
Креатинин			мкмоль/л
Мочевина			ммоль/л
Мочевая кислота			мкмоль/л
Билирубин общий			мкмоль/л
Билирубин прямой			мкмоль/л
Глюкоза			ммоль/л
АСТ			МЕ/л
АЛТ			МЕ/л
Щелочная фосфатаза			МЕ/л
∝-амилаза			МЕ/л
Кальций			ммоль/л
Фосфор			ммоль/л
Магний			ммоль/л
Калий			ммоль/л
Натрий			ммоль/л
Хлор			ммоль/л

Результаты других исследований

Зав. отделением _____
Лечащий врач _____

Приложение 2

Правила проведения клинических испытаний продуктов питания из/от трансгенных организмов

Настоящие правила представляют собой свод нормативов, которые обеспечивают гарантию достоверности полученных результатов и одновременно защиту прав субъектов исследования.

Независимая оценка достоверности результатов исследования возможна благодаря жестким требованиям к ведению документации, в то время как добровольное согласие и постоянный контроль за выполнением обязательств договора надежно защищают права субъектов исследования.

С принятием правил врач-исследователь, наряду с ответственностью лечащего врача по отношению к субъекту, должен гарантировать наличие документации о получении информированного согласия пациента, а также точность и правильность регистрируемых данных.

Юридической основой настоящих правил являются законодательные и нормативные акты РФ, регулирующие вопросы биомедицинских исследований на людях.

1. Основы законодательства РФ об охране здоровья граждан (приняты Верховным Советом РФ 22.07.93 № 5487—1).

2. Инструкция МЗ и МП РФ от 15.05.96 «Порядок экспертизы, клинических испытаний, регистрации зарубежных лекарственных средств и субстанций».

3. Инструкция МЗ и МП РФ от 28.05.96 «Порядок экспертизы клинических испытаний, регистрации отечественных лекарственных средств (субстанций)».

1. Принципы

1.1. Клинические исследования продуктов питания из/от трансгенных организмов должны проводиться в соответствии с этическими принципами, изложенными в Хельсинской декларации ПКИ, а также с законодательными и нормативными актами РФ.

1.2. При проведении клинических исследований права безопасность и состояние человека, принимающего в нем участие (субъекта исследования), должны превалировать над интересами науки и общества.

1.3. Исследование должно быть научно обоснованным, этически оправданным и спланировано так, чтобы были достигнуты поставленные цели.

1.4. Ответственность за состояние субъекта лежит на враче-исследователе.

1.5. Каждый специалист, принимающий участие в исследовании, должен иметь: соответствующее образование, квалификацию и опыт, необходимые для выполнения своей задачи в полном объеме.

1.6. Методология клинического исследования должна быть по-научному четко и подробно описана в протоколе.

1.7. Клиническое исследование проводится строго в соответствии с протоколом, одобренным Межведомственной комиссией по проблемам генно-инженерной деятельности (МКГИД).

1.8. От каждого субъекта, желающего участвовать в клиническом исследовании, необходимо получить добровольное информированное согласие в письменном виде.

1.9. Вся информация по каждому клиническому исследованию продуктов питания из/от трансгенных организмов должна быть записана, обработана и сохранена таким образом, чтобы обеспечить возможность его правильной интерпретации и составления отчета о полученных результатах, а также доступность соответствующей системы проверок.

1.10. Необходимо строгое соблюдение конфиденциальности записей, касающихся субъекта исследования.

1.11. Применение исследуемых продуктов питания из/от трансгенных организмов осуществляется согласно предписанию, касающемуся данного продукта, строго по принятому протоколу.

2. Исследователь

2.1. Квалификация исследователя и договоры

2.1.1. Исследователь должен иметь определенную теоретическую и практическую квалификацию, а также достаточный опыт работы для того, чтобы полностью выполнять свои обязанности по правильному проведению исследования, должен отвечать всем квалификационным требованиям, определенным в соответствующих документах.

2.1.2. Исследователь должен быть хорошо знаком с правилами использования исследуемых продуктов питания из/от трансгенных организмов согласно протоколу, информационным материалам, прилагаемым к исследуемым продуктам, и другим источникам информации, предоставленных спонсором.

2.1.3. Исследователь должен быть хорошо знаком с правилами и соблюдать их.

2.1.4. Исследователь или организация, проводящая исследование, должны допускать мониторинг и аудирование со стороны спонсора, а также инспекции соответствующих регулирующих инстанций.

2.1.5. Исследователь должен составить список соответствующих по квалификации специалистов, которым он может доверять ответственные обязанности при работе.

2.2. Необходимые ресурсы для проведения исследования

2.2.1. Исследователь должен быть способен продемонстрировать, опираясь на ретроспективные данные, возможность для набора необходимого числа добровольцев в течение определенного периода времени.

2.2.2. Исследователь должен иметь в подчинении необходимое число квалифицированных сотрудников и необходимые условия для правильного и успешного исследования в установленные сроки.

2.2.3. Исследователь должен убедиться в том, что все специалисты правильно информированы о содержании протокола, об исследуемых продуктах питания из/от трансгенных организмов, а также о своих обязанностях и функциях.

2.3. Медицинское обслуживание субъектов исследования

2.3.1. Квалифицированный врач, являющийся исследователем или его заместителем, должен отвечать за все медицинские решения.

2.3.2. Во время участия субъекта исследователь или организация, проводящая исследование, следят за тем, чтобы субъекту оказывалась необходимая медицинская помощь в случае любых нежелательных явлений, включая клинически важные лабораторные анализы, относящиеся к исследованию. Исследователь или организация, проводящая исследование, должны информировать субъекта о том, что ему необходима медицинская помощь в связи с возникающими заболеваниями и недомоганиями.

2.3.3. Несмотря на то что субъект не обязан давать объяснения причин, по которым он прекращает участвовать в исследовании, исследователь обязан приложить определенные усилия для выяснения данных причин, соблюдая при этом полностью права субъекта.

2.4. Соответствие протоколу

2.4.1. Исследователь или организация, проводящая исследование, обязаны проводить его в строгом соответствии с протоколом, одобренным спонсором и утвержденным регулирующими инстанциями. Протокол или альтернативный дого-

вор, подтверждающий согласие сторон в их намерениях, должен быть подписан исследователем или организацией, проводящей исследование, и спонсором.

2.4.2. Исследователь не должен допускать никаких отклонений или изменений протокола без согласия спонсора. Исключение составляют только экстренные случаи и необходимость немедленного устранения неблагоприятного воздействия на субъекты исследования, а также изменения, связанные только с материально-техническим обеспечением, административными и организационными вопросами.

2.4.3. Исследователь должен оформить документально и объяснить любое отклонение от принятого протокола.

2.5. Исследуемые продукты питания из/от трансгенных организмов

2.5.1. Ответственность за учет используемых продуктов питания из/от трансгенных организмов лежит на исследователе или организации, проводящей исследование.

2.5.2. Исследователь или организация, проводящая исследование, обязаны вести записи по поставкам продуктов питания из/от трансгенных организмов на место исследования, его потреблению каждым субъектом. Исследователи должны вести записи, подтверждающие, что субъектам выдано количество продукта, обусловленное протоколом.

2.5.3. Исследуемые продукты питания из/от трансгенных организмов должны храниться так, как указано спонсором, согласно соответствующим требованиям регулирующих инстанций.

2.5.4. Исследователь должен следить за тем, чтобы продукты питания из/от трансгенных организмов использовались только в соответствии с утвержденным протоколом.

2.5.5. Исследователь или лицо, назначенное им или организацией, проводящей исследование, должен объяснить каждому субъекту, как применять продукты питания из/от трансгенных организмов. Через определенные периоды времени он проверяет правильность выполнения инструкции по применению этих продуктов.

2.6. Метод слепого отбора и дешифровка

Исследователь должен следовать методу слепого отбора (если таковой предусмотрен) и следить за тем, чтобы коды были распределены в соответствии с протоколом. Если исследование проводится по методу слепого отбора, он должен правильно документально оформить и объяснить спонсору любую преждевременную дешифровку (т. е. случайную или необходимую для предотвращения серьезных нежелательных явлений) исследуемого продукта питания из/от трансгенных организмов.

2.7. Информированное согласие субъектов исследования

2.7.1. Для получения и документирования информированного согласия исследователь должен следовать принятым требованиям регулирующих инстанций и твердо придерживаться правил ПКИ. Перед началом исследования он должен получить положительную оценку Межведомственной комиссии формы информированного согласия субъекта исследования и любой другой письменной информации, предоставляемой субъекту.

2.7.2. Письменное информированное согласие субъекта исследования и любая другая письменная информация, предоставляемая ему, должны быть пересмотрены в случае появления дополнительной информации, которая может иметь отношение или влиять на его согласие. Прежде чем применять измененную форму информированного согласия, данная форма должна получить одобрение Межведомственной комиссии. То же касается и любой другой измененной письменной информации, предоставляемой субъекту. Субъект исследования должен быть проинформирован заблаговременно о появлении новой информации, которая может

повлиять на желание субъекта продолжать участие в исследовании. Все описанные выше действия должны быть оформлены документально.

2.7.3. Исследователь или специалисты, участвующие в проведении исследования, не имеют права убеждать, а также косвенно влиять на решение субъекта участвовать либо продолжать участие в исследовании.

2.7.4. Письменная или устная информация относительно исследования, включая форму письменного информированного согласия, должна быть понятна, чтобы не повлечь отказ субъекта исследования (опекуна) от его юридических прав, либо не освободить исследователя или организацию, проводящую исследование, спонсора или их представителей от ответственности за небрежность.

2.7.5. Исследователь или назначенный им представитель должен полностью проинформировать субъекта исследования или его юридического представителя, если сам субъект не способен дать информированное согласие, обо всех относящихся к исследованию аспектах.

2.7.6. Язык, используемый при предоставлении письменной и устной информации по исследованию, включая информацию по информированному согласию, должен быть доходчив, не содержать специфических профессиональных терминов и быть понятным для субъекта исследования, его опекуна и незаинтересованных лиц (если таковые требуются).

2.7.7. Перед началом исследования письменное информированное согласие субъекта (опекуна) должно быть лично им подписано с проставленной датой. В случае дачи устного информированного согласия оно должно быть подписано свидетелем. Информированное согласие подписывается также лицом, проводящим разъяснительную беседу.

2.7.8. Как обсуждение информированного согласия, так и формы письменного информированного согласия и любой другой информации, которая должна быть предоставлена субъекту, должна включать объяснение следующих фактов:

1) предполагается научное исследование;

2) цель исследования;

3) продукты питания из/от трансгенных организмов, используемые при исследовании и возможность получения плацебо;

4) все предписания исследования должны выполняться четко, включая все инвазивные процедуры;

5) обязанности субъекта исследования;

6) экспериментальные аспекты исследования;

7) планируемые выплаты, если таковые должны быть, за участие субъекта в исследовании;

8) субъект имеет право прекратить свое участие в исследовании, т. к. его участие является добровольным, в любое время без каких-либо потерь и с выплатой запланированных компенсаций за то время, которое он участвовал в исследовании;

9) наблюдатель (лицо, осуществляющее мониторинг), аудитор и регулирующие инстанции могут иметь доступ к истории болезни субъекта для проверки правильности процедур, назначенных в ходе исследования, без нарушения конфиденциальности данных документов и в рамках дозволенных законодательством действий подобного рода. Субъект исследования или его опекун, подписывая информированное согласие, автоматически разрешают подобные действия;

10) документация, содержащая данные о субъекте исследования, является конфиденциальной и не подвержена разглашению; работа с информацией подобного рода должна вестись в рамках действующего и применяемого к данной ситуации законодательства;

11) возможные обстоятельства или причины, в результате которых участие субъекта в исследовании может быть прекращено;

12) ожидаемые сроки участия субъекта в исследовании;

13) планируемое число субъектов для участия в исследовании;

14) перед участием в исследовании субъект или его опекун должны получить копию подписанного и датированного письменного информированного согласия и другую необходимую письменную информацию. В ходе исследования, он или его опекун должны получить копии подписанных и датированных дополнений и изменений информированного согласия, а также и любой другой письменной информации, предназначенной для субъекта исследования.

2.8. Ведение записей и отчеты

2.8.1. Исследователь должен аккуратно, точно, полно, разборчиво и вовремя вести все записи в индивидуальной регистрационной форме (ИРФ) для последующего представления их спонсору в виде отчета по проведению исследования.

2.8.2. Любые изменения либо исправления в ИРФ должны быть датированы, помечены инициалами исправляющего и объяснены (при необходимости) и не должны противоречить предыдущей и исходной информации (в противном случае необходимо привлечение аудитора).

2.8.3. Исследователь или организация, проводящая исследование, должны вести документацию в соответствии с требованиями регулирующих инстанций. Исследователь отвечает за сохранность данных документов.

2.8.4. Необходимые документы должны храниться по меньшей мере два года после формального прекращения клинической разработки исследуемого продукта питания из/от трансгенных организмов. Однако документы хранятся дольше, если того требуют нормативные документы или договор со спонсором. Спонсор обязан сообщить исследователю, когда эти документы больше не должны подлежать хранению.

2.8.5. Финансовые аспекты исследования должны быть документально оформлены в договоре между спонсором и исследователем или организацией, проводящей исследование.

2.8.6. Исследователь или организация, проводящая исследование, должны обеспечить прямой доступ к документам, имеющим отношение к исследованию по требованию наблюдателя, аудитора или регулирующих инстанций.

2.9. Отчеты по ходу исследования

2.9.1. Исследователь должен представлять на рассмотрение письменные заключения по ходу исследования ежегодно либо чаще.

2.9.2. Исследователь должен немедленно предоставлять письменные отчеты по любым изменениям, заметно влияющим на ход исследования спонсору.

2.10. Отчеты по безопасности проведения исследования

2.10.1. Информация обо всех серьезных нежелательных явлениях должна немедленно предоставляться в виде отчетов спонсору. Данные срочные отчеты должны быть оформлены по определенной форме, детально и в письменном виде. В них должны быть указаны личные коды пациентов вместо их имен, их личные идентификационные номера и/или адреса.

2.10.2. О нежелательных реакциях и/или лабораторных аномалиях, упомянутых в протоколе как критические проявления, необходимо сообщить спонсору в соответствии с нормативными документами регулирующих инстанций в течение времени, указанного спонсором в протоколе.

2.11. Приостановка и/или прекращение исследования

2.11.1. Если исследователь останавливает или откладывает дальнейшее проведение исследования без предварительного на то согласия спонсора, он должен информировать об этом регулирующие инстанции и предоставить в указанные организации подробные письменные объяснения.

2.11.2. Если спонсор отменяет или приостанавливает работу, исследователь должен в установленном порядке информировать контролирующую организацию, если таковая предусмотрена, а также уведомить в установленном порядке спонсора и предоставить в указанные организации подробные письменные объяснения.

2.12. Заключительный отчет исследователя

2.12.1. По завершении работы исследователь должен предоставить регулирующим инстанциям краткий отчет о полученных результатах, если это необходимо.

3. Спонсор

3.1. Гарантия и контроль качества

3.1.1. Спонсор ответственен за осуществление и поддержание систем гарантии и контроля качества согласно письменным стандартным методикам выполнения с тем, чтобы исследования проводились с правильным получением результатов, записи и документация велись согласно принятым требованиям протокола, ПКИ и требованиям регулирующих инстанций.

3.1.2. Спонсор отвечает за подписание договоров со всеми участвующими в исследовании сторонами для того, чтобы обеспечить прямой доступ ко всем относящимся к исследованию помещениям, источникам данных, документам, отчетам с целью мониторинга и аудиторских проверок со стороны спонсора, а также отечественным и иностранным регулирующим инстанциям.

3.1.3. Контроль качества должен проводиться на каждом этапе исследования для того, чтобы прослеживать правильность получения данных.

3.1.4. Договоры, заключенные спонсором с исследователем или организацией, проводящей исследование, а также с другими участвующими в исследовании сторонами, должны быть оформлены письменно и представлять собой неотъемлемую часть протокола либо отдельный договор.

3.2. Квалифицированный медицинский персонал

Спонсор должен назначать квалифицированный медицинский персонал, который должен быть готов к предоставлению своих рекомендаций по вопросам исследования. В случае необходимости специалисты могут быть приглашены из других организаций.

3.3. Структура проведения исследования

3.3.1. Спонсор должен использовать квалифицированных специалистов по мере необходимости, на протяжении всех стадий исследования: с момента подготовки протокола и планирования проведения исследования до практических действий и подготовки заключительных отчетов.

3.3.2. Указаниями к дальнейшим действиям служат следующие документы: протокол клинического исследования и приложения к нему, требования к структуре и содержанию отчетов, а также другие рекомендации и указания по структуре проведения исследования, протоколу и т. д.

3.4. Управление исследованием, сбор и обработка результатов и ведение записей

3.4.1. Спонсор обязан использовать соответствующих квалифицированных специалистов для контроля за проведением исследования, сбора и обработки полу-

чаемых данных, их проверок, проведения статистического анализа и составления Отчета по исследованию.

3.4.2. Если данные подверглись изменениям в процессе обработки, всегда должна существовать возможность их сравнения с исходными данными.

3.4.3. Спонсор должен хранить все предназначенные для него важные документы в соответствии с применяемыми требованиями страны, одобрившей исследуемый продукт питания из/от трансгенных организмов, либо страны, в которой спонсор планирует получить одобрение продукта питания из/от трансгенных организмов.

3.4.4. Если спонсор прерывает клиническую разработку исследуемого продукта питания из/от трансгенных организмов, то спонсор сохраняет все документы в течение, как минимум, двух лет после официальной остановки исследования или действует в соответствии с применяемыми требованиями регулирующих инстанций.

3.4.5. Если спонсор останавливает клиническую разработку исследуемого продукта питания из/от трансгенных организмов, то он должен уведомить об этом все стороны – исследователя или организацию, проводящую исследования, а также регулирующие инстанции.

3.4.6. Документы должны храниться, по меньшей мере, два года после официального прекращения клинической разработки исследуемого продукта питания из/от трансгенных организмов. Однако данные документы хранятся дольше, если этого требуют нормативные документы или договор со спонсором.

3.4.7. Спонсор обязан письменно сообщить исследователю или организации, проводящей исследование, о необходимости хранения документов, а также о прекращении их хранения.

3.5. Выбор исследователя

3.5.1. Спонсор несет ответственность за подбор исследователя или организации, проводящей исследование. Каждый исследователь должен иметь квалификацию в соответствии с образованием и опытом практической деятельности, а также обладать необходимыми ресурсами для правильного проведения данного исследования. В обязанности спонсора входит также подбор исследователей и координационных комитетов для проведения многоцентровых исследований.

3.5.2. До подписания договора с исследователем или организацией, проводящей исследование, спонсор должен предоставить им для ознакомления протокол и действующую Брошюру исследователя, а также отвести достаточное время для ознакомления с этими материалами.

3.5.3. Спонсор должен получить согласие исследователя по следующим пунктам:

1) проводить исследования в соответствии с требованиями ПКИ, нормативными документами Минздрава РФ и протоколом, принятым спонсором и утвержденным регулирующими инстанциями;

2) действовать в соответствии с требованиями по порядку ведения записи (отчетности) по данным исследованиям;

3) не препятствовать проведению мониторинга, аудиторских проверок и инспекции;

4) спонсор и исследователь или организация, проводящая исследование, должны подписать протокол либо альтернативный документ в подтверждение достигнутой договоренности.

3.6. Распределение обязанностей и функций

До начала исследования спонсор должен определить, установить и распределить все обязанности и функции.

3.7. Выплаты исследователям и субъектам исследования

3.7.1. Согласно применяемым нормативным требованиям спонсор должен обеспечить либо определить (с юридической и финансовой стороны) страхование исследователя или организации, проводящей исследование, от претензий, возникающих в связи с проведением исследования, за исключением претензий, связанных с преступной небрежностью медицинских работников.

3.7.2. В своей деятельности спонсор должен учитывать возможные расходы на лечение субъектов в случае возникновения неблагоприятных последствий, связанных с исследованием, в соответствии с нормативными документами Минздрава РФ.

3.7.3. Методы и действия по выплате компенсации субъектам исследования должны соответствовать установленным нормативным требованиям Минздрава РФ.

3.8. Финансирование

Финансовые вопросы исследования должны быть оформлены документально в форме договора между спонсором и исследователем или организацией, проводящей исследование.

3.9. Уведомление (подчинение) руководящему органу Минздрава РФ

До начала клинического исследования спонсор (спонсор и исследователь, если данное условие оговорено в нормативных документах) должен предоставлять на рассмотрение определенным руководящим органам любую необходимую им документацию, а также одобрение и/или разрешение в соответствии с нормативными документами на начало проведения исследования. Любое уведомление должно быть датировано и содержать достаточную информацию, соответствующую подписанному протоколу.

3.10. Информация по исследуемому продукту питания из/от трансгенных организмов

Во время планирования проведения исследования спонсор должен учитывать то, что должны быть подготовлены данные, полученные в ходе неклинических и/или клинических исследований по соответствующей безопасности и эффективности для подтверждения проведения установленного курса, дозировок, продолжительности и числа субъектов, достаточных для проведения исследования.

3.11. Производство, упаковка и маркировка продукта питания из/от трансгенных организмов, предназначенного для исследования

3.11.1. Спонсор обязан следить за тем, чтобы исследуемые продукты питания из/от трансгенных организмов (включая продукты питания из/от трансгенных организмов и плацебо, если таковые предусмотрены) были охарактеризованы должным образом на момент производства, производились в соответствии с установленными требованиями и были закодированы, промаркированы во избежание возможных ошибок.

3.11.2. Спонсор должен определить соответствующие условия и продолжительность хранения исследуемых продуктов питания из/от трансгенных организмов. Спонсор должен поставить в известность все участвующие стороны, т. е. наблюдателей, исследователей, менеджеров по хранению, о данных требованиях.

3.11.3. Продукты питания из/от трансгенных организмов, предназначенные для исследования, должны быть упакованы так, чтобы избежать их повреждения и порчи при транспортировании.

3.11.4. При исследованиях, проводимых с применением слепого метода, система кодирования исследуемых продуктов питания из/от трансгенных организмов должна включать механизм, позволяющий срочное их распознание в случае экс-

тренной ситуации и в то же время предотвращающей нарушение процедуры слепого метода.

3.12. Обеспечение исследуемым продуктом питания из/от трансгенных организмов и обращение с ним

3.12.1. Спонсор отвечает за обеспечение исследователя или организации, проводящей исследование, исследуемым продуктом питания из/от трансгенных организмов.

3.12.2. Спонсор должен проследить за тем, чтобы описание проведения исследования включало инструкции по обращению и хранению исследуемого продукта питания из/от трансгенных организмов и ведению соответствующей документации. Данные рекомендации должны также включать указания по обращению, хранению, распределению, возвращению неиспользованного продукта питания из/от трансгенных организмов от субъектов исследования спонсору в соответствии с нормативными документами Минздрава России.

3.12.3. Спонсор обязан:

1) поставить исследователю продукт питания из/от трансгенных организмов в установленный срок;

2) хранить документацию по транспортированию, получению, распределению, возвращению и уничтожению продукта питания из/от трансгенных организмов, предназначенного для исследования;

3) определить систему возвращения продукта питания из/от трансгенных организмов и следить за ее выполнением с ведением соответствующей документации;

4) определить систему распределения неиспользованного исследуемого продукта питания из/от трансгенных организмов и следить за ее выполнением и документальным оформлением такого распределения.

3.12.4. Спонсор обязан:

1) предпринимать меры по проверке стабильности исследуемого медицинского продукта на протяжении всего периода использования;

2) следить за необходимым количеством продуктов питания из/от трансгенных организмов, предназначенных для исследования, для подтверждения спецификаций при возникновении такой необходимости, а также вести записи анализа проб партии и их характеристик. Данные образцы проб, в соответствии со сроком их стабильности, должны храниться до окончания проведения анализа данных исследования или в течение срока, определяемого нормативными документами Минздрава России, в зависимости от того, какой период времени такого хранения является наиболее продолжительным.

3.13. Доступ к записям

3.13.1. Спонсор должен проследить за тем, чтобы в протоколе либо в другом письменном соглашении было определено, что исследователь или организация, проводящая исследование, обеспечивают прямой доступ к исходным данным (документации) для наблюдателей, аудиторов, инспекций Минздрава России.

3.13.2. Спонсор должен убедиться, что от всех субъектов исследования получено письменное согласие на прямой доступ к их историям болезни для наблюдателей, аудиторов, инспекций Минздрава России.

3.14. Информация по безопасности

3.14.1. Спонсор несет ответственность за оценку степени безопасности исследуемых продуктов питания из/от трансгенных организмов.

3.14.2. Спонсор должен вовремя уведомить всех исследователей или организации, проводящие исследование, а также руководящие инстанции о данных, ко-

торые могут в значительной степени повлиять на безопасность субъектов, на ход исследования, изменить продолжительность исследования.

3.15. Сообщение о нежелательной реакции на продукты питания из/от трансгенных организмов

3.15.1. Спонсор должен срочно сообщить всем исследователям или организациям, проводящим исследования, в руководящие инстанции обо всех серьезных и неожиданных нежелательных реакциях на продукты питания из/от трансгенных организмов.

3.15.2. Данные срочные сообщения должны соответствовать форме, установленной нормативными документами регулирующих инстанций и ПКИ.

3.15.3. Спонсор должен предоставить на рассмотрение регулирующих инстанций все разработки по безопасности и периодические отчеты в соответствии с нормативными документами.

3.16. Мониторинг

3.16.1. Цель мониторинга

Целью мониторинга является проверка следующих фактов:

1) защита прав и нормального физического состояния субъектов исследования;

2) предоставляемые для отчета данные по исследованию должны быть достоверными, полными, подтверждены исходными данными;

3) соответствие исследования с одобренным и утвержденным протоколом, ПКИ и требованиями регулирующих инстанций.

3.16.2. Выбор и квалификация наблюдателей:

1) наблюдатели назначаются спонсором;

2) наблюдатели должны пройти соответствующую подготовку, а также должны владеть определенными знаниями, необходимыми для корректного проведения мониторинга. Их квалификация должна быть подтверждена документально;

3) наблюдатели должны быть хорошо знакомы с исследуемыми продуктами питания из/от трансгенных организмов, протоколом, формой информированного согласия, письменной информацией для субъектов исследования, ПКИ и требованиями регулирующих инстанций.

3.16.3. Объем проведения мониторинга

Спонсор ответственен за проведение адекватных мониторингов клинических исследований. Спонсор определяет объем проведения мониторинга. Определение объема должно формироваться с учетом цели, задачи, сложности, величины и ожидаемых конечных результатов исследования. Как правило, существует потребность в постоянном мониторинге до, во время и после проведения исследования; тем не менее, при исключительных обстоятельствах спонсор может назначить центральный мониторинг в сочетании с такими мероприятиями, как обучение исследователя и семинары в соответствии с ПКИ. Статистически контролируемые пробы могут быть приемлемым методом для отбора данных для проверки.

3.16.4. Обязанности наблюдателя

В соответствии с требованиями спонсора, наблюдатель должен следить за правильным проведением исследования и ведением документации следующим путем:

1) действовать как главное связующее звено между спонсором и исследователем;

2) проверять на протяжении всего срока исследования, обладает ли исследователь соответствующей классификацией и ресурсами, действует ли согласно всем требованиям, а также такими ресурсами как лаборатории, оборудование, персонал и соответствующие требования безопасного и правильного проведения исследования;

3) для исследуемых продуктов питания из/от трансгенных организмов необходимо:

• следить за соблюдением сроков и условий хранения;

• исследуемые продукты выдавать только пациентам, которым они предписаны, в обозначенных в протоколе количествах;

• субъекты исследования обеспечить необходимыми инструкциями по правильному использованию, обращению, хранению и возврату оставшихся после окончания исследования продуктов;

• получение, использование и возврат исследуемых продуктов контролировать и документировать соответствующим образом;

• неблагоприятные эффекты, сопутствующие заболевания и медикаменты, используемые для лечения в процессе исследования, отражать в документации в соответствии с протоколом в ИРФ;

• невыполненные визиты к врачу, тесты и медицинские осмотры четко фиксировать в ИРФ;

• случаи исключения субъектов из исследования документально фиксировать, и объяснения представлять в ИРФ;

4) информировать исследователя о любых зафиксированных ошибках, неточностях и упущениях при заполнении ИРФ. Наблюдатель должен следить за тем, чтобы необходимые исправления, дополнения и пояснения были внесены в ИРФ, датированы и подписаны исследователем или ответственным лицом, имеющим на то полномочия, что должно быть оформлено документально;

5) определять, все ли нежелательные явления корректно отражены в течение периода времени, определенного ПКИ, протоколом, спонсором и требованиями регулирующих инстанций;

6) следить, чтобы исследователь вел все необходимые документы;

7) следить за отклонениями от протокола ПКИ, требований регулирующих инстанций.

3.16.5. Процедура мониторинга

Наблюдатель должен руководствоваться установленными спонсором письменными СМВ и действиями для конкретного исследования.

3.16.6. Отчет по мониторингу:

1) наблюдатель представляет спонсору письменный отчет после каждого посещения места проведения исследования или любого общения по поводу хода исследования;

2) в отчетах должна быть проставлена дата, указано место проведения исследования, фамилия наблюдателя, фамилия исследователя или другого лица, с которым проходила беседа;

3) отчеты должны включать общую информацию по проведенному исследованию, выводы и мнения наблюдателя о данных, фактах, нарушениях и отклонениях, а также действиях, предпринятых или рекомендуемых для улучшения проведения исследования;

4) обзор и наблюдения, содержащиеся в отчете наблюдателя, сделанные спонсором, должны быть документально оформлены представителем, спонсором.

3.17. Аудит

Проводимые спонсором аудиторские проверки, являющиеся частью программы обеспечения качества исследования, должны отвечать следующим условиям:

3.17.1. Цель аудита

Целью аудиторских проверок, проводимых спонсором и являющихся независимыми и не связанными с регулярным контролем качества исследования путем мониторинга, оценка проведения исследования в соответствии с протоколом, СМВ, ПКИ.

3.17.2. Подбор и квалификация специалистов для аудиторской проверки:

а) для проведения аудита спонсор назначает специалистов, не зависящих от проведения и системы клинического исследования;

б) спонсор должен следить за тем, чтобы аудиторы обладали соответствующей квалификацией по образованию и опыту работы, при этом должны быть соответствующие документы.

3.17.3. Процедура проведения аудита:

1) спонсор следит за тем, чтобы аудиторские проверки клинического исследования проводились в соответствии с его письменными указаниями по предмету аудирования, способам и частоте их проведения, а также по форме и содержанию;

2) план и процедура проведения спонсорского аудита должны определяться требованиями регулирующих инстанции, числом привлекаемых к исследованию пациентов, типом и степенью сложности исследования, а также степенью риска для субъектов;

3) наблюдения и выводы аудиторов должны быть документально оформлены;

4) для соблюдения принципов независимости и объективности аудиторских функций, регулирующие инстанции не должны требовать аудиторских отчетов слишком часто. Они могут затребовать доступ к аудиторскому отчету по мере обнаружения серьезных отклонений исследования от требований ПКИ или в соответствии с нормативными требованиями.

3.18. Несоответствия

3.18.1. Несоответствие действий исследователя или организации, проводящей исследование, протоколу, СМВ, ПКИ и/или нормативным документам регулирующих инстанций, должно повлечь за собой соответствующие действия спонсора по обеспечению надлежащего соответствия.

3.18.2. Если в ходе мониторинга и/или аудиторской проверки были обнаружены серьезные и/или постоянные несоответствия со стороны исследователя или организации, проводящей исследование, спонсор должен отстранить их от участия в исследовании и сообщить об этом в регулирующие инстанции.

3.19. Преждевременное закрытие или приостановка исследования

Если исследование преждевременно закрыто либо приостановлено, спонсор должен информировать об этом исследователя или организацию, проводящую исследование, а также регулирующие инстанции с сообщением причин.

3.20. Отчет по клиническому исследованию

Независимо от того, завершено или преждевременно остановлено исследование, спонсор обязан проследить за тем, чтобы отчет по клиническому исследованию был подготовлен и предоставлен в регулирующую инстанцию, согласно существующим требованиям.

gost.e-ecolog.ru