

2.3.2. ГИГИЕНА. ГИГИЕНА ПИТАНИЯ.
ПРОДОВОЛЬСТВЕННОЕ СЫРЬЕ И ПИЩЕВЫЕ ПРОДУКТЫ

**Медико-биологическая оценка
безопасности генно-инженерно-
модифицированных организмов
растительного происхождения
с комбинированными признаками**

Методические указания
МУ 2.3.2.3388—16

Издание официальное

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

**2.3.2. ГИГИЕНА. ГИГИЕНА ПИТАНИЯ.
ПРОДОВОЛЬСТВЕННОЕ СЫРЬЕ И ПИЩЕВЫЕ ПРОДУКТЫ**

**Медико-биологическая оценка безопасности
генно-инженерно-модифицированных
организмов растительного происхождения
с комбинированными признаками**

**Методические указания
МУ 2.3.2.3388—16**

БКБ 51.23
М42

М42 **Медико-биологическая оценка безопасности генно-инженерно-модифицированных организмов растительного происхождения с комбинированными признаками: Методические указания.—М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2016.—30 с.**

ISBN 978—5—7508—1501—2

1. Разработаны ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии» (Н. В. Тышко, Э. О. Садыкова, А. К. Голомидова, И. В. Гмошинский, А. А. Кочеткова, В. А. Саркисян, В. А. Тутельян); Федеральной службой по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (А. Ю. Попова, И. В. Брагина); Российской академией наук (Г. Г. Онищенко); Институтом биоинженерии, ФГУ «ФИЦ Биотехнологии» РАН (К. Г. Скрябин, И. В. Яковлева, Б. Б. Кузнецов); МГУ им. М. В. Ломоносова (М. П. Кирпичников).

2. Утверждены руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации А. Ю. Поповой 3 августа 2016 г.

3. Введены впервые.

БКБ 51.23

ISBN 978—5—7508—1501—2

© Роспотребнадзор, 2016
© Федеральный центр гигиены и
эпидемиологии Роспотребнадзора, 2016

Содержание

| | |
|---|----|
| I. Общие положения и область применения | 5 |
| II. Проведение оценки безопасности ГМО с комбинированными признаками | 5 |
| III. Экспертный анализ и оценка данных, характеризующих ГМО с комбинированными признаками | 7 |
| IV. Методы обнаружения, идентификации и количественного определения ГМО с комбинированными признаками в пищевых продуктах | 11 |
| V. Медико-генетическая оценка ГМО с комбинированными признаками | 12 |
| VI. Оценка функционально-технологических свойств ГМО с комбинированными признаками | 12 |
| VII. Медико-биологическая оценка безопасности ГМО с комбинированными признаками | 13 |
| Список литературы | 28 |

УТВЕРЖДАЮ

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

А. Ю. Попова

26 июля 2016 г.

**2.3.2. ГИГИЕНА. ГИГИЕНА ПИТАНИЯ.
ПРОДОВОЛЬСТВЕННОЕ СЫРЬЕ И ПИЩЕВЫЕ ПРОДУКТЫ**

**Медико-биологическая оценка безопасности
генно-инженерно-модифицированных организмов
растительного происхождения
с комбинированными признаками**

**Методические указания
МУ 2.3.2.3388—16**

Появление генно-инженерно-модифицированных организмов растительного происхождения (ГМО) второго поколения, в том числе ГМО с комбинированными признаками, привело к необходимости формирования новых подходов к оценке безопасности и процедуры государственной регистрации таких ГМО в Российской Федерации. Анализ мирового опыта в данной области свидетельствует о необходимости дифференцирования набора исследований в зависимости от метода получения ГМО с комбинированными признаками: 1-й метод – «трансформационный» – новый ген (гены) методом генной инженерии вводят в геном уже существующего и зарегистрированного ранее ГМО; 2-й метод – «молекулярный» – геном растения-донора методом генной инженерии трансформируют с помощью вектора, содержащего два или более генов, отвечающих за новые признаки, или с помощью множественных векторов; 3-й метод – «гибридизационный» – два уже существующих ГМО используют в качестве родительских форм для получения гибрида методами традиционной селекции. Линии, полученные с помощью трансформационного и молекулярного методов, считаются новыми ГМО и подлежат регистрационным испытаниям в полном объеме. Линии, полученные с помощью гибридизации, рассматриваются в разных юрисдикциях по-разному: в США, Канаде, Австралии и Новой Зеландии – как

продукт обычной селекции, не требующий регистрации при условии, что исходные ГМ-линии уже зарегистрированы; в странах Европейского Союза требуется регистрация каждого нового ГМО, полученного с использованием уже зарегистрированных родительских ГМ линий, однако, с точки зрения безопасности рассматриваются только возможные эффекты взаимодействия двух белков (генов), обеспечивающих проявление новых признаков. При регистрации ГМО с комбинированными признаками, полученных гибридизацией трех и более родительских линий (ГМО высокого порядка), автоматически считаются зарегистрированными все возможные комбинации, сформировавшиеся в результате генетической сегрегации таких ГМО (расщепления признаков в поколениях F1 и выше, в соответствии с законами Менделя). Например, при регистрации ГМО, полученного гибридизацией шести родительских линий, должны быть зарегистрированы все 63 возможных гибрида поколения F1, содержащие рекомбинантную ДНК. Подобный подход применяется в Европейском Союзе, Аргентине, Бразилии, Филиппинах, Парагвае, Уругвае и Японии.

На основании анализа отечественного и международного опыта были разработаны требования к оценке безопасности ГМО с комбинированными признаками, соответствующие принципам регулирования использования ГМО для пищевых целей.

I. Общие положения и область применения

1.1. Методические указания устанавливают требования к проведению оценки безопасности ГМО с комбинированными признаками.

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

1.3. Методические указания разработаны с целью обеспечения единой, научно обоснованной системы оценки безопасности ГМО с комбинированными признаками и учитывают новые методические подходы, как используемые в России, так и рекомендованные международными организациями.

II. Проведение оценки безопасности ГМО с комбинированными признаками

2.1. Перечень и объем исследований при оценке безопасности ГМО с комбинированными признаками определяются с учетом следующих факторов:

- метода получения ГМО (трансформационный метод, молекулярный метод, гибридизационный метод);
- наличия государственной регистрации исходных ГМ-линий на территории Таможенного Союза – для ГМО, полученных гибридизационным методом.

2.2. В случае если ГМО с комбинированными признаками получен трансформационным или молекулярным методом, оценка его безопасности проводится в соответствии с разделами III—VII данных Методических указаний и включает в себя следующие этапы:

- экспертный анализ и оценку данных, представленных заявителем, содержащих сравнение химического состава ГМО и его традиционного аналога (композиционная эквивалентность), результаты токсикологических, аллергологических и других исследований, результаты пострегистрационного мониторинга в стране-заявителе и других странах;
- экспертную оценку методов обнаружения, идентификации и количественного определения ГМО;
- медико-генетическую оценку ГМО;
- оценку функционально-технологических свойств ГМО;
- медико-биологическую оценку безопасности ГМО.

2.3. В случае если ГМО с комбинированными признаками получен гибридизационным методом и исходные ГМ-линии имеют свидетельства о государственной регистрации на территории Таможенного Союза, оценка его безопасности проводится в соответствии с разделами III—IV данных Методических указаний и включает в себя следующие этапы:

- экспертный анализ и оценку данных, представленных заявителем или представленных на этапе регистрации исходных ГМ-линий (для ГМО, полученных гибридизационным методом, в случае, если все исходные ГМ-линии имеют свидетельства о государственной регистрации на территории Таможенного Союза), включающих: сравнение химического состава исходных ГМ-линий с химическим составом их традиционных аналогов (композиционная эквивалентность), результаты токсикологических, аллергологических и других исследований, результаты пострегистрационного мониторинга, осуществляемого в странах, где ГМО с комбинированными признаками был зарегистрирован ранее, в случае, если в процессе мониторинга были получены данные о незаданных эффектах генетической модификации;
- экспертная оценка методов обнаружения, идентификации и количественного определения ГМО;

- подтверждение соответствия показателей качества и безопасности ГМО (содержание токсичных элементов, микотоксинов, радионуклидов, пестицидов и др.) требованиям Технических регламентов Таможенного Союза (ТР ТС 021/2011 «О безопасности пищевой продукции» и/или соответствующих Технических регламентов, устанавливающих обязательные требования к отдельным видам пищевой продукции);

- заключение о результатах оценки безопасности ГМО с комбинированными признаками, оформленное в виде отчета в соответствии с требованиями Межгосударственного стандарта ГОСТ 7.32—2001. При формировании отчета должны быть соблюдены требования к конфиденциальности информации, предоставленной на этапе регистрации исходных ГМ-линий.

2.4. Регистрация ГМО с комбинированными признаками, полученного методом гибридизации трех и более линий, уже зарегистрированных на территории Таможенного союза, означает регистрацию и всех возможных комбинаций этих линий, сформировавшихся в результате генетической сегрегации (расщепления признаков в поколениях F1 и выше, в соответствии с законами Менделя).

2.5. В случае если ГМО с комбинированными признаками получен гибридизационным методом и одна или несколько исходных ГМ-линий не имеют свидетельства о государственной регистрации на территории Таможенного Союза, оценка безопасности такого ГМО проводится в полном объеме, в соответствии с п. 2.2 данных Методических указаний.

2.6. Для проведения исследований, предусмотренных п. 2.2 и 2.3 настоящих Методических указаний, заявитель представляет в аккредитованную лабораторию образцы ГМО и их традиционных аналогов в количестве, достаточном для выполнения полного объема исследований.

III. Экспертный анализ и оценка данных, характеризующих ГМО с комбинированными признаками

3.1. Общая характеристика ГМО с комбинированными признаками включает экспертный анализ данных, представленных заявителем или представленными на этапе регистрации исходных ГМ-линий (для ГМО, полученных гибридизационным методом, в случае, если все исходные ГМ-линии имеют свидетельства о государственной регистрации на территории Таможенного Союза), включающих:

- информацию, позволяющую идентифицировать ГМО (вид, сорт, событие, исходные ГМ-линии, характеристика отличий от немодифицированного организма);

- информацию об исходном организме (таксономическая характеристика, описание способа размножения и распространения, данные о токсических, аллергенных и других неблагоприятных свойствах);

- информацию об организмах-донорах вносимых генов (таксономическая характеристика, история использования);

- информацию о методах генетических модификаций и способах получения ГМО и исходных ГМ-линий (описание методов модификаций, структур векторов, структур вставок);

- информацию о ГМО и исходных ГМ-линиях (описание свойств, приобретенных растениями в результате модификаций, описание структур встроенных генетических конструкций и мест их локализации, характеристику экспрессии встроенных генов (экспрессия в процессе онтогенеза растения, экспрессия в структурных компонентах растения и др.);

- информацию о потенциально возможном взаимодействии встроенных генетических элементов и белков-продуктов генов (при наличии такой информации), а также результатах их взаимодействия.

3.1.1. Для ГМО, полученных молекулярным, трансформационным или гибридным (если одна или несколько исходных ГМ-линий не имеют свидетельства о государственной регистрации на территории Таможенного Союза) методами, дополнительно должны быть проанализированы данные о генетической и фенотипической стабильности (должны быть представлены данные, полученные в результате исследований нескольких поколений ГМО).

3.2. Оценка композиционной эквивалентности проводится на основании информации о результатах сравнения химического состава ГМО с химическим составом его традиционного аналога, представленной заявителем. Для ГМО, полученных гибридным методом (если все исходные ГМ-линии имеют свидетельства о государственной регистрации на территории Таможенного Союза), оценка композиционной эквивалентности производится на основании информации о результатах сравнения химического состава исходных ГМ-линий с химическим составом их традиционных аналогов, представленной на этапе регистрации исходных ГМ-линий.

3.2.1. Оценка композиционной эквивалентности проводится по следующим параметрам:

- содержание белка;
- аминокислотный состав;
- содержание жира;

- жирнокислотный состав;
- содержание углеводов;
- содержание макро- и микроэлементов;
- содержание биологически активных веществ;
- содержание аллергенов, характерных для исходного вида (сорта);
- содержание антропогенных и природных контаминантов (токсичных элементов, микотоксинов, пестицидов, радионуклидов, вредных примесей и др.);
- содержание антинутриентов и других веществ, характерных для растительных организмов исходного вида (сорта).

3.2.2. Перечень показателей варьируется в зависимости от свойств изучаемого растительного организма.

3.2.3. Оценка композиционной эквивалентности ГМО и его традиционного аналога проводится с учетом биологических колебаний значений показателей, характерных для растений данного вида, и справочных данных о химическом составе исходного вида (сорта) растения.

3.2.4. В случае если целью генетической модификации является изменение нутриентного состава растения или его частей (листьев, плодов и др.), этот фактор необходимо учитывать при оценке композиционной эквивалентности.

3.3. Анализ результатов токсикологических исследований проводится на основании сведений, представленных заявителем или представленных на этапе регистрации исходных ГМ-линий (для ГМО, полученных гибридизационным методом, в случае, если все исходные ГМ-линии имеют свидетельства о государственной регистрации на территории Таможенного Союза), включающих:

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

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

- результаты других токсикологических исследований.

3.4. Анализ результатов аллергологических исследований проводится на основании сведений, представленных заявителем или представленных на этапе регистрации исходных ГМ-линий (для ГМО, полученных гибридизационным методом, в случае, если все исходные ГМ-линии имеют свидетельства о государственной регистрации на территории Таможенного Союза), включающих:

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

- результаты аллергологических исследований нативного продукта (сравнение набора аллергенов исследуемого ГМО с набором аллергенов его традиционного аналога и др.) в случае, если такие исследования проводились;

- результаты других аллергологических исследований.

3.5. Анализ результатов других исследований (в случае, если такие исследования были выполнены) проводится на основании сведений, представленных заявителем, или представленных на этапе регистрации исходных ГМ-линий, включая результаты применения новейших аналитических методов, таких как профильные технологии и др.

3.6. Анализ результатов пострегистрационного мониторинга, осуществляемого в странах, где ГМО был зарегистрирован ранее, проводится в случае, если в процессе мониторинга были получены данные о незадаанных эффектах генетической модификации.

3.7. Анализ научных данных о ГМО с комбинированными признаками, представленных в научной литературе за весь период его использования; анализ научных данных об исходных ГМ-линиях за период, прошедший после их первичной регистрации.

IV. Методы обнаружения, идентификации и количественного определения ГМО с комбинированными признаками в пищевых продуктах

4.1. Основным методом, используемым для обнаружения, идентификации и количественного определения ГМО, является полимеразная цепная реакция (ПЦР) и ее модификации. Также для обнаружения ГМО в пищевых продуктах и продовольственном сырье, не подвергавшихся технологической переработке, могут быть использованы иммунологические методы детекции специфичных для ГМО белков.

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

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

- метод идентификации одного или нескольких трансформационных событий (событие-специфичные тест-системы);
- метод количественного определения одного или нескольких трансформационных событий (событие-специфичные тест-системы);
- протоколы проведения анализов;
- описание праймеров, ДНК-зондов и других необходимых реактивов;
- стандартные образцы состава и свойств.

4.4. Экспертная оценка методов обнаружения, идентификации и количественного определения ГМО, полученных гибридным методом (если все исходные ГМ-линии имеют свидетельства о государственной регистрации на территории Таможенного Союза) производится только в случае, если методы обнаружения, идентификации и количественного определения зарегистрированных исходных ГМ-линий с момента их регистрации были модифицированы, усовершенствованы или разработаны вновь.

4.4.1. Идентификация ГМО с комбинированными признаками, полученных гибридным методом, сложна по сравнению с идентификацией ГМО, полученных молекулярным и трансформационным методами, поскольку вставки рекомбинантной ДНК и их локализация в геноме гибридного события идентичны исходным ГМ-линиям.

Результаты ПЦР-анализа таких ГМО укажут на присутствие в образце родительских линий ГМО, как если бы образец содержал их смесь, что делает возможной идентификацию ГМО, полученных гибридизационным методом, только на основании экспертизы документации.

V. Медико-генетическая оценка ГМО с комбинированными признаками

5.1. Медико-генетическая оценка ГМО с комбинированными признаками включает проверку присутствия всех заявленных генетических конструкций методом ПЦР.

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

- описание молекулярной структуры всех заявленных генетических конструкций (нуклеотидная последовательность);
- метод идентификации и количественного определения одного или нескольких трансформационных событий;
- протокол проведения анализа;
- описание праймеров, ДНК-зондов и других необходимых реактивов;
- стандартные образцы состава и свойств.

5.3. Заключение о результатах медико-генетической оценки ГМО с комбинированными признаками оформляется в виде отчета в соответствии с требованиями Межгосударственного стандарта ГОСТ 7.32—2001.

VI. Оценка функционально-технологических свойств ГМО с комбинированными признаками

6.1. Перечень и объем исследований по разделу VI определяются экспертными (учеными) советами соответствующих аккредитованных испытательных центров Российской Федерации на основании анализа представленных материалов, индивидуально для каждого вида исследуемых продуктов.

6.2. Проводится сравнение функционально-технологических свойств ГМО со свойствами его традиционного аналога. Для ГМО, полученного гибридизационным методом, проводится сравнение его функционально-технологических свойств со свойствами традиционных аналогов исходных ГМ-линий.

6.3. Изучаемые функционально-технологические свойства (в соответствии со стандартами на конкретный вид исследуемых продуктов):

- сравнительная органолептическая оценка;
- сравнительная характеристика реологических свойств исследуемого продукта и/или его отдельных фракций;

• сравнительная оценка физико-химических свойств исследуемого продукта и/или его отдельных фракций.

6.4. Заключение о результатах оценки функционально-технологических свойств ГМО с комбинированными признаками оформляется в виде отчета в соответствии с требованиями Межгосударственного стандарта ГОСТ 7.32—2001.

VII. Медико-биологическая оценка безопасности ГМО с комбинированными признаками

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

7.2. Гигиенические исследования ГМО с комбинированными признаками включают определение показателей качества и безопасности:

7.2.1. Перечень показателей безопасности формируется на основании требований Технических регламентов Таможенного Союза (ТР ТС 021/2011 «О безопасности пищевой продукции») и/или соответствующих Технических регламентов, устанавливающих обязательные требования к отдельным видам пищевой продукции).

Изучаемые показатели:

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

7.2.2. Перечень показателей качества формируется на основании свойств соответствующего растительного организма, а также анализа представленных заявителем материалов. В случае если заявителем представлены исчерпывающие данные по оценке композиционной эквивалентности ГМО (содержание белка, аминокислотный состав, содержание жира, жирнокислотный состав, углеводный состав, содержание витаминов, макро- и микроэлементов, специфических компонентов, биологически активных веществ, антинутриентов и других веществ, характерных для растений данного вида), исследования могут быть ограничены определением влажности, золы, содержания белка, жира, углеводов, пищевых волокон.

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

7.3. Изучение репродуктивной токсичности и токсичности ГМО с комбинированными признаками проводится в эксперименте на крысах линии Вистар. Токсикологические исследования включают изучение репродуктивной функции крыс поколения F_0 , пре- и постнатальное развитие потомства поколения F_1 , а также оценку физиолого-биохимических показателей крыс поколения F_0 (на основании данных о динамике массы тела, об абсолютной и относительной массе внутренних органов; данных гематологических, морфологических и биохимических исследований, состояния антиоксидантного статуса и функционального состояния систем, осуществляющих защиту организма от воздействия токсичных соединений экзо- и эндогенного происхождения).

7.3.1. Схема проведения эксперимента.

| | |
|---|--|
| Вид животных | Крысы линии Вистар |
| Пол | Самцы, самки |
| Возраст | 25—30 дней |
| Исходная масса тела | 70—80 г |
| Количество животных в группе в начале эксперимента | Не менее 80 особей в каждой группе: 55 ♀, 25 ♂ Все животные должны быть выбраны из пометов со сходной численностью и выживаемостью потомства. При невозможности такой стандартизации количество животных в группах должно быть увеличено не менее чем в 2 раза: 110 ♀, 50 ♂ |
| Распределение по группам | Животных делят на 2 группы: группа «контроль» получает рацион с включением традиционного аналога исследуемого ГМО; группа «опыт» получает рацион с включением исследуемого ГМО |
| Рацион | Пищевая и биологическая ценность рациона полностью удовлетворяет физиологические потребности животных |
| Карантин | Не менее 7 дней |
| Условия содержания | Животные получают свободный доступ к корму и воде; содержатся в отопляемом, вентилируемом помещении |
| Отбор материала для гематологических, биохимических, морфологических исследований | У самцов поколения F_0 не ранее чем на 100-й день эксперимента. Количество животных, взятых на исследование, должно составлять не менее 20 на группу |

7.3.2. На протяжении эксперимента животные получают полусинтетический казеиновый рацион (ПКР). Исследуемый ГМО и его традиционный аналог включают в состав корма в максимально возможном количестве, не нарушающем баланс основных пищевых веществ. Замена ингредиентов рациона должна быть проведена с учетом содержания белков, жиров и углеводов во вводимом продукте при соблюдении принципа изокалорийности.

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

7.3.2.1. В случае исследования ГМО, полученного гибридизационным методом, в рационе лабораторных животных в качестве традиционного аналога используется смесь традиционных аналогов исходных ГМ-линий.

Таблица 1

Состав базового полусинтетического казеинового рациона

| Ингредиенты | Кол-во, г | Белок, г | Жиры, г | Углеводы, г | Калорийность | |
|-------------------------------------|--------------|--------------|-------------|----------------|---------------|------------|
| | | | | | ккал | % |
| Казеин | 23,949 | 20,21 | 0,36 | — | 84,08 | 23,46 |
| Крахмал маисовый | 59,0 | 0,59 | — | 51,07 | 206,64 | 57,65 |
| Масло подсолнечное нерафинированное | 5,0 | — | 4,99 | — | 44,91 | 12,53 |
| Лярд | 2,0 | — | 1,99 | — | 17,91 | 5,00 |
| Солевая смесь ¹ | 3,5 | — | — | — | — | — |
| Смесь в/р витаминов ² | 1,0 | — | — | 1,0 | 4,00 | 1,11 |
| Смесь ж/р витаминов ³ | 0,1 | — | 0,1 | — | 0,9 | 0,25 |
| L-цистеин | 0,2 | — | — | — | — | — |
| Холин | 0,25 | — | — | — | — | — |
| Трет-бутилгидрохинон | 0,001 | — | — | — | — | — |
| Микрокристаллическая целлюлоза | 5,0 | — | — | — | — | — |
| ИТОГО | 100,0 | 20,80 | 7,44 | 52,07 | 358,44 | 100 |

¹ состав солевой смеси представлен в табл. 2.

² 1 г содержит: тиамина (B1) — 0,6 мг, рибофлавина (B2) — 0,6 мг, пиридоксина (B6) — 0,7 мг, никотиновой кислоты — 3,0 мг, пантотената кальция — 1,6 мг, фолиевой кислоты — 0,2 мг, биотина — 0,02 мг, цианокобаламина (B12) — 0,0025 мг, викасола — 0,075 мг, L-метионина — 50 мг, глюкозы — до 1 г.

³ 0,1 мл содержит: ретинола ацетата — 400 МЕ, эргокальциферола — 100 МЕ, α-токоферола ацетата — 7,5 мг, подсолнечного масла — до 0,1 мл

Состав солевой смеси

| № | Название соли | Химическая формула | Количество, г |
|----|---------------------------------------|---|---------------|
| 1 | Кальций углекислый | CaCO_3 | 357,00 |
| 2 | Калий фосфорнокислый, одно-замещенный | KH_2PO_4 | 196,00 |
| 3 | Калий сернокислый | K_2SO_4 | 46,60 |
| 4 | Калий лимоннокислый, моно-гидрат | $\text{HOC}(\text{COOK})(\text{CH}_2\text{COOK})_2 \times \text{H}_2\text{O}$ | 70,78 |
| 5 | Натрий хлористый | NaCl | 74,00 |
| 6 | Магния окись | MgO | 24,00 |
| 7 | Железо лимоннокислое | $\text{C}_6\text{H}_5\text{FeO}_7$ | 6,06 |
| 8 | Цинк углекислый | ZnCO_3 | 1,65 |
| 9 | Марганец углекислый | MnCO_3 | 0,63 |
| 10 | Медь углекислая | $\text{CuCO}_3 \times \text{Cu}(\text{OH})_2$ | 0,30 |
| 11 | Калия йодат | KIO_3 | 0,01 |
| 12 | Натрия селенат | Na_2SeO_4 | 0,01025 |
| 13 | Парамолибдат аммония | $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \times 4\text{H}_2\text{O}$ | 0,00795 |
| 14 | Натрия метасиликат | $\text{Na}_2\text{O}_3\text{Si} \times 9\text{H}_2\text{O}$ | 1,45 |
| 15 | Хромовокалиевые квасцы | $\text{CrK}(\text{SO}_4)_2 \times 12\text{H}_2\text{O}$ | 0,275 |
| 16 | Борная кислота | H_3BO_3 | 0,0815 |
| 17 | Натрий фтористый | NaF | 0,0635 |
| 18 | Никель углекислый | $2\text{NiCO}_3 \cdot 3\text{Ni}(\text{OH})_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$ | 0,0318 |
| 19 | Аммоний ванадиевокислый | NH_4VO_3 | 0,0066 |
| 20 | Сахароза | $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$ | 221,0434 |
| | ИТОГО | | 1000 |

7.3.3. Исследуемые показатели.

7.3.3.1. Интегральные показатели.

| Изучаемые показатели | Сроки и периодичность сбора данных |
|--|--|
| 1 | 2 |
| Общее состояние животных (внешний вид, двигательная активность, состояние шерстного покрова) | ежедневно |
| Поедаемость корма | ежедневно |
| Масса тела | каждые 7 дней |
| Масса тела самок во время беременности | С 1-го по 20-й дни беременности – у самок, предназначенных для изучения пренатального развития потомства – каждые 5 дней |

Продолжение

| 1 | 2 |
|--|--|
| | С 1-го дня беременности до момента родов – у самок, предназначенных для изучения постнатального развития потомства – каждые 5 дней |
| Масса внутренних органов (головной мозг, сердце, селезенка, легкие, тимус, гипофиз, печень, почки, простата, надпочечники, семенники) у самцов поколения F_0 | Не ранее чем на 100-й день эксперимента. Количество самцов, взятых на исследование, должно составлять не менее 20 на группу |
| Масса внутренних органов (головной мозг, сердце, селезенка, легкие, тимус, гипофиз, печень, почки, надпочечники, яичники) у беременных самок поколения F_0 – на 20-й день беременности | Количество самок, взятых на исследование, должно составлять не менее 15 на группу |

7.3.3.2. Репродуктивную функцию оценивают по генеративной и эндокринной функции гонад родительских животных поколения F_0 , пренатальному и постнатальному развитию потомства поколения F_1 .

Показатели, характеризующие генеративную функцию.

| Изучаемые показатели [1, 2] | Сроки сбора данных |
|---|--|
| 1 | 2 |
| Эффективность спаривания самцов и самок. Оценивают по способности к оплодотворению самок и самцов, выраженную в процентном соотношении забеременевших самок/оплодотворивших самцов к общему количеству ссаженных самок/самцов. Для получения потомства F_1 самок F_0 ссаживают с самцами F_0 в соотношении 2 : 1 не менее чем на 7 дней | В период ссаживания половозрелых крыс поколения F_0 (возраст не менее 100 дней) с целью получения потомства F_1 для оценки постнатального развития. Количество самок, взятых на исследование, должно составлять не менее 30 на группу |
| Эндокринная функция яичников и семенников. Оценивают по содержанию эстрадиола, прогестерона и тестостерона в сыворотке крови | У беременных самок поколения F_0 – на 20-й день беременности. Количество самок, взятых на исследование, должно составлять не менее 15 на группу. У самцов поколения F_0 не ранее чем на 100-й день эксперимента. Количество самцов, взятых на исследование, должно составлять не менее 15 на группу |
| <i>Дополнительные исследования</i> | |
| Спермограмма. Оценивают макроскопические параметры эякулята – pH, объем спермы, цвет, время разжижения и вязкость эякулята, а также характеристики клеточных элементов спермы – количество, подвижность, жизнеспособность, морфологию сперматозоидов, количество и типы лейкоцитов, количество и типы незрелых клеток сперматогенеза и пр. | У половозрелых самцов поколения F_0 или F_1 (возраст не менее 100 дней). Количество самцов, взятых на исследование, должно составлять не менее 15 на группу |

Продолжение

| 1 | 2 |
|--|--|
| Морфологические исследования семенников (определяют индекс сперматогенеза, среднее количество нормальных сперматогоний в каждом канальце, относительное количество канальцев с 12-й стадией мейоза) | У самцов поколения F_0 не ранее чем на 100-й день эксперимента. Количество самцов, взятых на исследование, должно составлять не менее 20 на группу |
| Морфологические исследования яичников (примордиальные фолликулы, фолликулы с двумя и более слоями фолликулярных клеток, третичные фолликулы, атретические тела, желтые тела, общее количество генеративных форм) | У беременных самок поколения F_0 — на 20-й день беременности. Количество самок, взятых на исследование, должно составлять не менее 15 на группу |

Показатели, характеризующие пренатальное развитие потомства.

| Исследуемые показатели | Сроки сбора данных |
|---|------------------------|
| Эвтаназия и вскрытие не менее 15 беременных самок на группу | 20-й день беременности |
| Визуальное исследование матки, плаценты, плодов: выявление живых и мертвых плодов, подсчет количества желтых тел, мест имплантации, количество резорбций по правому и левому рогу матки (с последующим вычислением пред- и постимплантационной гибели) | |
| Оценка развития плодов: макроскопический осмотр, определение массы и краниокаудального размера плодов. После осмотра, измерения и взвешивания плоды каждого помета необходимо разделить на три равные группы: одна группа предназначена для вскрытия, выделения и взвешивания внутренних органов (печени, почек, сердца, легких); плоды второй группы фиксируют в жидкости Буэна и используют для изучения внутренних органов по методу Wilson J.G.; плоды третьей группы фиксируют в 96° этаноле и используют для изучения состояния скелета по методу Dawson A.B. | |

Показатели, характеризующие постнатальное развитие потомства.

| Исследуемые показатели | Сроки сбора данных |
|--|--|
| 1 | 2 |
| Контроль рождения потомства | Самки поколения F_0 , 22—25-й дни беременности |
| Определение средней величины помета, подсчет количества живых и мертвых крысят, подсчет особей разного пола, выявление внешних уродств | 1-й день жизни крысят поколения F_1 |
| Измерение массы тела и роста (краниокаудального размера) крысят поколения F_1 | 2, 5, 10, 15, 20 и 25 дни жизни крысят поколения F_1 |
| Учет показателей физиологического развития крысят: срок отлипания ушных раковин, появление первичного волосяного покрова, прорезывание резцов, открытие глаз, опускание семенников, открытие влагалища | 1—35 дни жизни крысят поколения F_1 |

Продолжение

| 1 | 2 |
|---|---------------------------------------|
| Вычисление выживаемости потомства с 1-го по 5-й день жизни (отношение числа крысят, доживших до 5-го дня, к числу родившихся живыми) и с 6-го по 25-й день жизни (отношение числа крысят, доживших до 25-го дня, к числу доживших до 6-го дня), выраженное в процентах. | 1—25 дни жизни крысят поколения F_1 |
| Определение соотношения самцов и самок в пометах | 1—10 дни жизни крысят поколения F_1 |

7.3.3.2.1. Раздел отчета по результатам оценки репродуктивной функции крыс должен включать цифровые данные в форме таблиц, содержащих основные сведения, необходимые для суждения о наличии или отсутствии у исследуемого ГМО неблагоприятного действия на репродуктивную функцию и развитие потомства.

7.3.3.3. Физиолого-биохимические показатели состояния здоровья крыс поколения F_0 оценивают на основании данных о динамике массы тела, об абсолютной и относительной массе внутренних органов; данных гематологических, морфологических и биохимических исследований, состояния антиоксидантного статуса и функционального состояния систем, осуществляющих защиту организма от воздействия токсичных соединений экзо- и эндогенного происхождения.

7.3.3.3.1. Общий клинический анализ крови.

| Изучаемые показатели | Сроки отбора материала |
|---|--|
| <ul style="list-style-type: none"> – Концентрация гемоглобина; – Гематокрит; – Общее количество эритроцитов; – Средний объем эритроцита; – Среднее содержание гемоглобина в эритроците; – Средняя концентрация гемоглобина в эритроците (СКЭ); – Общее количество тромбоцитов; – Тромбокрит; – Средний объем тромбоцита; – Общее количество лейкоцитов; – Дифференцированный подсчет лейкоцитарной формулы (нейтрофилы, лимфоциты, эозинофилы, моноциты, базофилы) | <p>У самцов поколения F_0 не ранее чем на 100-й день эксперимента. Количество самцов, взятых на исследование, должно составлять не менее 20 на группу</p> |

7.3.3.3.2. Общий биохимический анализ сыворотки крови

| Изучаемые показатели | Сроки отбора материала |
|--|---|
| <ul style="list-style-type: none"> – Общий белок; – Альбумин; – Глобулин; – Триглицериды; – Общий билирубин; – Прямой билирубин; – Мочевина; – Мочевая кислота; – Креатинин; – Глюкоза; – Холестерин; – Лактатдегидрогеназа; – Альфа-амилаза; – Креатинфосфокиназа; – Щелочная фосфатаза; – Аланинаминотрансфераза; – Аспаргатаминотрансфераза; – Кальций; – Магний; – Железо; – Натрий; – Калий; – Фосфор; – Хлор | <p>У самцов поколения F₀ не ранее чем на 100-й день эксперимента. Количество самцов, взятых на исследование, должно составлять не менее 20 на группу</p> |

7.3.3.3.3. Общий и биохимический анализ мочи.

| Изучаемые показатели | Сроки отбора материала |
|---|---|
| <ul style="list-style-type: none"> – Суточный диурез; – Цвет и прозрачность; – Относительная плотность; – pH; – Белок; – Глюкоза; – Креатинин; – Мочевина; – Мочевая кислота; – Кальций; – Магний; – Фосфор | <p>У самцов поколения F₀ не ранее чем на 100-й день эксперимента. Количество самцов, взятых на исследование, должно составлять не менее 20 на группу</p> |

7.3.3.4. Системные биомаркеры.
Система антиоксидантной защиты.

| Изучаемые показатели | Сроки отбора материала |
|---|---|
| <p><i>Активность ферментов антиоксидантной защиты. Материал для исследований: эритроциты [3—8]</i></p> <ul style="list-style-type: none"> – Глутатионредуктаза; – Глутатионпероксидаза; – Супероксиддисмутаза; – Каталаза | <p>У самцов поколения F₀ не ранее чем на 100-й день эксперимента. Количество самцов, взятых на исследование, должно составлять не менее 20 на группу</p> |
| <p><i>Содержание продуктов перекисного окисления липидов. Материал для исследований: кровь, печень [9—11]</i></p> <ul style="list-style-type: none"> – Малоновый диальдегид | |

Система ферментов метаболизма ксенобиотиков.

| Изучаемые показатели | Сроки отбора материала |
|--|---|
| <p><i>Активность ферментов 1-й и 2-й фазы метаболизма ксенобиотиков [12—16]</i></p> <p><i>Материал для исследований: печень</i></p> <ul style="list-style-type: none"> – Общее содержание цитохрома P-450; – Этоксирезорифиндеалкилаза; – Пентоксирезорифиндеалкилаза; – УДФ-глюкуронозилтрансфераза; – ХДНБ-глутатионтрансфераза | <p>У самцов поколения F₀ не ранее чем на 100-й день эксперимента. Количество самцов, взятых на исследование, должно составлять не менее 10 на группу</p> |

Стабильность мембран лизосом.

| Изучаемые показатели | Сроки отбора материала |
|--|---|
| <p><i>Общая и неседиментируемая активность ферментов лизосом [17]</i></p> <p><i>Материал для исследований: печень</i></p> <ul style="list-style-type: none"> – β-Галактозидаза; – β-Глюкуронидаза; – Арилсульфатазы А и В | <p>У самцов поколения F₀ не ранее чем на 100-й день эксперимента. Количество самцов, взятых на исследование, должно составлять не менее 20 на группу</p> |

Интенсивность процессов апоптоза.

| Изучаемые показатели | Сроки отбора материала |
|---|---|
| <p>Щелочной гель-электрофорез изолированных клеток (метод «ДНК-комет»)</p> <p><i>Материал для исследований: печень, тимус, почки</i></p> <ul style="list-style-type: none"> – Индекс апоптоза; – Степень фрагментации ДНК | <p>У самцов поколения F₀ не ранее чем на 100-й день эксперимента. Количество самцов, взятых на исследование, должно составлять не менее 20 на группу</p> |

7.3.3.3.5. Морфологические исследования

| Исследуемые органы | Методы исследований [18—28] |
|---|--|
| Головной мозг; Гипофиз; Сердце; Тимус; Легкие; Печень; Селезенка; Почки; Надпочечники; ЖКТ: желудок, тонкая и толстая кишки; Яичники; Семенники; Простата | <p><i>Отбор материала у самцов поколения F₀ не ранее чем на 100-й день эксперимента. Количество самцов, взятых на исследование, должно составлять не менее 20 на группу.</i></p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Макроскопические исследования 2. Микроскопические исследования: <ol style="list-style-type: none"> а) обзорные гистологические исследования 3. Морфометрический анализ <p><i>Вскрытие погибших в течение эксперимента животных (внеплановый отбор)</i></p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Макроскопические исследования 2. Микроскопические исследования (перечень исследуемых органов может быть сокращен до минимально необходимого для установления причины смерти): <ol style="list-style-type: none"> а) обзорные гистологические исследования. <p><i>Дополнительные исследования</i></p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Микроскопические исследования: <ol style="list-style-type: none"> а) гистохимические исследования; б) иммуногистохимические исследования клеточных популяций и их производных. 2. Электронно-микроскопические исследования |

7.3.3.3.6. Другие исследования.

7.4. Иммунологические исследования ГМО проводятся в эксперименте на мышах линий СВА и С57В1/6 и включают изучение его иммуномодулирующих и сенсибилизирующих свойств по четырем тестам:

- действие на гуморальное звено иммунитета – в тесте определения уровня гемагглютининов к эритроцитам барана;
- действие на клеточное звено иммунитета – в реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) к эритроцитам барана;
- действие как сенсибилизирующего агента – в тесте чувствительности к гистамину;
- действие на естественную резистентность мышей к *Salmonella typhimurium* (сальмонеллы мышинного тифа).

В табл. 3 представлены сравнительные характеристики мышей линий СВА и С57В1/6.

Таблица 3

Характеристики мышей линий СВА и С57В1/6

| Действующий фактор | Линия мышей | |
|-------------------------------|---------------------|--------------------|
| | СВА | С57В1/6 |
| Эритроциты барана | высокочувствительны | низкочувствительны |
| Гистамин | не чувствительны | чувствительны |
| <i>Salmonella typhimurium</i> | не чувствительны | чувствительны |

7.4.1. Схема проведения эксперимента.

| | |
|--|---|
| Вид животных | Мыши линий СВА и С57В1/6 |
| Пол | самцы |
| Возраст | половозрелые |
| Исходная масса тела | 18—20 г |
| Количество животных в группе в начале эксперимента | Не менее 120 мышей линий СВА в каждой группе Не менее 120 мышей линий С57В1/6 в каждой группе |
| Распределение по группам | Животных каждой линии делят на 2 группы: Группа «контроль» получает рацион с включением традиционного аналога исследуемого ГМО; Группа «опыт» получает рацион с включением исследуемого ГМО |
| Рацион* | Пищевая и биологическая ценность рациона полностью удовлетворяет физиологические потребности животных |
| Карантин | не менее 7 дней |
| Условия содержания | Животные получают свободный доступ к корму и воде; содержатся в отапливаемом, вентилируемом помещении. |
| * состав базового рациона приведен в п. 7.3.2 | |

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

7.4.2. Исследуемые показатели.

7.4.2.1. Влияние ГМО на гуморальный иммунный ответ оценивают на основании титров антител после иммунизации эритроцитами барана мышей высокоотвечающей (СВА) и низкоотвечающей (С57В1/6) линий. Для иммунизации животных следует использовать минимальные дозы (5×10^6) антигена.

Через 21 день эксперимента мышам контрольной (не менее 45 животных) и опытной (не менее 45 животных) групп обеих линий внутрибрюшинно вводят 0,5 мл эритроцитов барана (10 млн клеток/мл). Отбор крови для исследований проводят на 7-й, 10-й и 14-й день после введения эритроцитов барана. Сыворотку крови титруют общепринятым методом в реакции геагглютинации [17]. Реакция основана на способности антител, содержащихся в сыворотке крови иммунизированных животных, склеивать (агглютинировать) эритроциты барана. В 96-луночных плоскодонных планшетах готовят двукратные разведения иссле-

дуемой сыворотки в объеме 0,5 мл, начиная с разведения 1 : 10. В контрольную лунку вносят 0,5 мл физиологического раствора. Ко всем лункам добавляют 0,5 мл 1 % эритроцитов барана. Учет реакции ведется после инкубации планшетов в термостате в течение 2 ч при 37 °С. При положительном результате эритроциты оседают на дне лунки планшета в виде зонтика, при отрицательном – в виде пуговки. За титр принимают то последнее разведение исследуемой сыворотки, при которой еще наблюдается положительный результат. Контрольная лунка должна быть отрицательной. Полученные данные обрабатывают методами вариационной статистики с использованием *t*-критерия Стьюдента. Результаты приводятся в виде $M \pm m$, где M – выборочное среднее измеряемых величин, m – стандартная ошибка.

7.4.2.2. Влияние ГМО на клеточный иммунный ответ оценивают на основании реакции гиперчувствительности замедленного типа. При выполнении теста антиген вводят двукратно: для сенсибилизации и для разрешения.

Через 21 день эксперимента мышам контрольной (не менее 15 животных) и опытной (не менее 15 животных) групп обеих линий подкожно в межлопаточную область вводят 0,5 мл эритроцитов барана (20 млн клеток/мл). Через пять дней всем мышам в подушечку одной задней лапы вводят разрешающую дозу эритроцитов барана – 0,02 мл (100 млн клеток/мышь); в контрлатеральную лапу – 0,02 мл 0,95 %-го раствора хлорида натрия. Местную воспалительную реакцию оценивают через 18—20 часов путем определения массы опытной и контрольной лапок. Интенсивность местной реакции определяют по индексу реакции (ИР) [17].

7.4.2.3. Действие ГМО как сенсибилизирующего агента оценивают в тесте чувствительности к гистамину.

Через 21 день эксперимента мышам контрольной (не менее 15 животных) и опытной (не менее 15 животных) групп обеих линий внутрибрюшинно вводят гистамин гидрохлорид (2,5 мг/мышь в 0,5 мл физиологического раствора). Реакцию учитывают через 24 часа по проценту гибели мышей [34].

7.4.2.4. Влияние ГМО на естественную резистентность мышей к *S. typhimurium* оценивают на модели внутрибрюшинного заражения мышей десятикратно отличающимися дозами *S. typhimurium* штамм 415. Через 21 день эксперимента мышей контрольной (не менее 45 животных) и опытной (не менее 45 животных) групп обеих линий заражают тремя дозами культуры: 1 000, 100, 10 микробных клеток/мышь. После заражения за животными наблюдают в течение 21 дня. Вычисляют LD_{50} ,

а также процент гибели животных по каждой дозе, затем проводят сравнительный анализ результатов [18].

7.5. Аллергологические исследования ГМО с комбинированными признаками проводятся в эксперименте на лабораторных животных: потенциальную аллергенность оценивают, определяя тяжесть протекания системной анафилаксии и уровень циркулирующих сенсибилизирующих антител (субклассов IgG1 + IgG4) у крыс, получающих в составе рациона исследуемый ГМО (группа «опыт») и его традиционный аналог (группа «контроль»). В случае исследования ГМО, полученных гибридным методом, в рационе лабораторных животных в качестве традиционного аналога используется смесь традиционных аналогов исходных ГМ-линий. Метод основан на количественной сравнительной оценке тяжести реакции системной анафилаксии, возникающей при внутрибрюшинной (в/б) сенсибилизации взрослых крыс пищевым антигеном – овальбумином куриного яйца (ОВА) с последующим внутривенным (в/в) введением сенсибилизированным животным разрешающей дозы того же белка [35].

7.5.1. Схема проведения эксперимента

| | |
|--|--|
| Вид животных | Крысы линии Вистар |
| Пол | Самцы |
| Возраст | Половозрелые |
| Исходная масса тела | 150—180 г |
| Количество животных в группе в начале эксперимента | Не менее 25 особей в каждой группе |
| Распределение по группам | Животных делят на 2 группы: группа «контроль» получает рацион с включением традиционного аналога исследуемого ГМО; группа «опыт» получает рацион с включением исследуемого ГМО |
| Рацион (состав базового рациона представлен в табл. 4) | Пищевая и биологическая ценность рациона полностью удовлетворяет физиологические потребности животных. Рацион не содержит яичного белка |
| Карантин | Не менее 7-ми дней |
| Условия содержания | Животные получают свободный доступ к корму и воде; содержатся в отапливаемом, вентилируемом помещении |
| Продолжительность эксперимента | 29 дней |
| Отбор материала для исследований | На 29-й день эксперимента |

Стандартный рацион вивария

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

7.5.2. Исследуемые показатели.

На 1-й, 3-й, 5-й день опыта крыс в/б сенсибилизируют ОВА, а на 21-й день эксперимента вводят дополнительную («бустерную») дозу антигена, уменьшенную в 10 раз в сравнении с первоначальной. Кормление рационами продолжают до утра 29-го дня эксперимента и затем вводят раствор ОВА в/в, после чего оценивают на протяжении 24 ч тяжесть развивающейся реакции анафилаксии по показателям числа летальных реакций, общего числа судорожных реакций и величины анафилактического индекса [36]. Непосредственно перед введением разрешающей дозы у крыс отбирают 0,1—0,2 мл крови из хвостовой вены для определения уровня специфических антител.

Иммуноферментное определение уровней циркулирующих специфических антител к ОВА проводят согласно [19]. Статистическую обработку результатов проводят согласно U-критерию Фишера для долевых показателей, непараметрическим критериям хи-квадрат и Манна-Уитни.

7.6. Генотоксикологические исследования ГМО с комбинированными признаками проводятся в эксперименте на лабораторных животных. Оценка потенциальной генотоксичности ГМО включает выявление

повреждений ДНК и выявление мутагенной активности в эксперименте *in vivo*. Метод выявления мутагенной активности основан на учете хромосомных aberrаций в метафазных клетках пролиферирующих тканей [20]. Регистрация повреждений ДНК предусматривает оценку целостности структуры ДНК методом щелочного гель-электрофореза изолированных клеток (метод ДНК-комет) [21].

7.6.1. Схема проведения эксперимента.

| | |
|--|--|
| Вид животных | Мыши линии C57Bl/6 |
| Пол | Самцы |
| Возраст | Половозрелые |
| Исходная масса тела | 18—20 г |
| Количество животных в группе в начале эксперимента | Не менее 15 особей в каждой группе |
| Распределение по группам | Животных делят на 2 группы: группа «контроль» получает рацион с включением традиционного аналога исследуемого ГМО; группа «опыт» получает рацион с включением исследуемого ГМО |
| Рацион* | Пищевая и биологическая ценность рациона полностью удовлетворяет физиологические потребности животных |
| Карантин | Не менее 7-ми дней |
| Условия содержания | Животные получают свободный доступ к корму и воде; содержатся в отопляемом, вентилируемом помещении. |
| Продолжительность эксперимента | 30 дней |
| Забор материала для исследований | На 30-й день эксперимента |
| * состав базового рациона приведен в п. 7.3.2 | |

7.6.2. Исследуемые показатели:

- в основе метода выявления мутагенной активности лежит регистрация видимых структурных нарушений хромосом в клетках костного мозга на стадии метафазы. Анализируют 100 метафаз от каждого животного. Учитывают число одиночных и парных фрагментов, хроматидных и хромосомных обменов, ахроматических пробелов (гепов) и разрывов по центромере, число клеток с множественными повреждениями и клеток с полной деструкцией хромосом. Оценку результатов цитогенетиче-

ского анализа проводят путем сопоставления долей клеток с хромосомными aberrациями в контрольной и опытной группах;

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

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

7.7. Заключение о результатах медико-биологической оценки безопасности ГМО с комбинированными признаками оформляется в виде отчета в соответствии с требованиями Межгосударственного стандарта ГОСТ 7.32-2001.

Список литературы

1. Меньшиков В.В. (Ред.) Лабораторные методы исследования в клинике. М.: Медицина, 1987. 368 с.
2. Мальцев Г.Ю., Васильев А.В. // Вопр. мед. химии. 1994. № 2. С. 56—58.
3. Мальцев Г.Ю., Орлова Л.А. // Вопр. мед. химии. 1994. № 2. С. 59—61.
4. Костюк В.А., Потапович А.И. // Вопр. мед. химии. 1987. № 3. С. 115—118.
5. Дингл Дж. Лизосомы. Методы исследования. М.: Мир, 1980. 344 с.
6. Автандилов Г.Г. Медицинская морфометрия. Руководство. М.: Медицина, 1990. 384 с.
7. Западнюк И.П. и др. Лабораторные животные. Разведение, содержание, использование в эксперименте. 3-е изд. Киев: Вища школа, 1983. 383 с.
8. Киселева А.Ф. и др. Морфофункциональные методы исследования в норме и при патологии. К.: Здоров'я, 1983. 163 с.

9. Лакин Г.Ф. Биометрия: Учеб. пособие для биол. спец. вузов. 4-е изд., перераб. и доп. М.: Высш. шк., 1990. 352 с.
10. Лойда З., Госсрау Р., Шиблер Т. Гистохимия ферментов. Лабораторные методы. М.: Мир, 1982. 272 с.
11. Луппа Х. Основы гистохимии. М.: Мир, 1980. 343 с.
12. Микроскопическая техника: Руководство / Под ред. Д.С Саркисова, Ю.Л. Перова М.: Медицина, 1996. 544 с.
13. Ноздрачев А.Д., Поляков Е.Л. Анатомия крысы. С.-Пб.: Лань, 2001. 464 с.
14. Пальцев М.А., Аничков Н.М. Патологическая анатомия. В 2-х т. М.: Медицина, 2000. 1944 с.
15. Полак Д., Норден С.В. Введение в иммуноцитохимию: современные методы и проблемы. М.: Мир, 1987. 74 с.
16. Струков А.И., Серов В.В. Патологическая анатомия. М.: Медицина, 1993. 688 с.
17. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств / Под ред. Миронова А.Н. Ч. 1. М.: Гриф и К, 2012. 944 с.
18. Ведомости фармакологического комитета. 1999. №1. С. 31—36.
19. Гмошинский И.В., Кржечковская В.В., Пятницкий Н.Н. // Вопросы питания. 1994. № 1, 2. С. 30—33.
20. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / Под ред. Хабриева Р.У. 2-е изд., перераб. и доп. М.: ОАО «Издательство «Медицина», 2005. 832 с.
21. Применение метода щелочного гель-электрофореза изолированных клеток для оценки генотоксических свойств природных и синтетических соединений: Методические рекомендации. М., 2006. 27 с.
22. Weingard K., Brown G., Hall R. et al. // *Fundamental and applied toxicology*. 1996. Vol. 29. P. 198—201.
23. Mills G.C. // *J. Biol. Chem.* 1959. Vol. 234. №3. P. 502—506.
24. Niashikimi M., Rao N., Jagi K. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1972. Vol. 46. P. 849—854.
25. Oshino N., Chance B. // *Arch. Biochem. Biophys.* 1973. Vol. 154. № 1. P. 117—131.
26. Tillotson J.A., Sauberlich H.E. // *J. Nutrition*. 1971. Vol. 101. P. 1459—1466.
27. Ernster L., Nordenbrandt K. // *In Methods in Enzymology. Oxidation and phosphorylation*. Estabrook R.W., Pullman M.E., eds., Ac. Press N.Y. 1967. Vol. 10. P. 574—580.

28. Michara, M., Uchiyama, M., Fukuzawa, K. 1980. // *Biochem. Med.* Vol. 23, Issue 3, P. 302—311.
29. Burchell B., Weatherill P. // *Methods Enzymol.* 1981. Vol. 77. P. 169—176.
30. Burke M.D., Mayer R.T. // *Chem.-Biol. Interact.* 1983. Vol. 45. P. 243—258.
31. Habig W.H., Pabst M.J., Jacoby W.B. // *J. Biol. Chem.* 1974. Vol. 294. P. 7130—7139.
32. Omura T., Sato R. // *Biol. Chem.* 1964. Vol. 239. P. 2370-2378.
33. Umegaki K., Saito K., Kubota Y. et al. // *Jpn. J. Pharmacol.* 2002. Vol. 90. P. 345—351.
34. 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.
35. Stokes C.R., Miller B.G., Bourne F.J. Animal models of food sensitivity. Food allergy and intolerance. London. 1987. P. 286—300.
36. Weigle W., Cochrane C., Dixon F. // *J. Immunology.* 1960. Vol. 85. P. 469—477.

Медико-биологическая оценка безопасности генно-инженерно-модифицированных организмов растительного происхождения с комбинированными признаками

**Методические указания
МУ 2.3.2.3388—16**

Ответственный за выпуск Н. В. Митрохина
Редакторы К. В. Шмат
Компьютерная верстка Е. В. Ломановой

Подписано в печать 27.12.16

Формат 60x90/16

Тираж 125 экз.

Печ. л. 2,0
Заказ 90

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

Оригинал-макет подготовлен к печати и тиражирован
отделением издательского обеспечения отдела научно-методического обеспечения
Федерального центра гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора
117105, Москва, Варшавское ш., 19а
Реализация печатных изданий, тел./факс: 8 (495) 952-50-89