

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

«УТВЕРЖДАЮ»
Заместитель Министра
здравоохранения – Главный
государственный санитарный
врач Республики Беларусь



А.А. Тарасенко

01 2022 г.

Регистрационный № 013-1121

**МЕТОД ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ И ОЦЕНКИ
ТОКСИЧНОСТИ И ОПАСНОСТИ
НАНОРАЗМЕРНЫХ ОБЪЕКТОВ И СТРУКТУР**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК: Республиканское унитарное
предприятие «Научно-практический центр гигиены»

АВТОРЫ: канд.мед.наук Василькевич В.М., канд.мед.наук
Зиновкина В.Ю., канд.мед.наук Богданов Р.В., к.б.н. Эрм Г.И.,
к.б.н. Колеснева Е.В., Михайлова Н.Н.

Минск, 2021

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ
Заместитель министра
Главный государственный
санитарный врач
Республики Беларусь

_____ А. А. Тарасенко
28.01.2022
Регистрационный № 013-1121

**МЕТОД ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ И ОЦЕНКИ
ТОКСИЧНОСТИ И ОПАСНОСТИ НАНОРАЗМЕРНЫХ
ОБЪЕКТОВ И СТРУКТУР**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК: РУП «Научно-практический центр гигиены»

АВТОРЫ: канд. мед. наук В. М. Василькевич, канд. мед. наук В. Ю. Зиновкина,
канд. мед. наук Р. В. Богданов, канд. биол. наук Г. И. Эрм, канд. биол. наук
Е. В. Колеснева, Н. Н. Михайлова

Минск 2021

ГЛАВА 1

НАЗНАЧЕНИЕ И ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

1. В настоящей инструкции по применению (далее — инструкция) изложен метод токсикологических исследований и оценки токсичности и опасности наноразмерных объектов и структур (далее — наноматериалы) на лабораторных животных (*in vivo*) с целью получения сведений о токсичности и классифицирования наноматериалов по степени опасности для здоровья человека. Подробное описание некоторых токсикологических исследований наноматериалов может быть установлено отдельным стандартом/методикой и не включено в инструкцию.

3. Инструкция распространяется на новые виды технических и промышленных наноматериалов, полученных из неорганических, синтетических органических веществ или изготовленных из биополимеров с применением методов биотехнологии.

4. Инструкция не распространяется на побочные наноматериалы, непреднамеренно образующиеся в ходе технологических, биотехнологических и иных процессов, а также наноматериалы, являющиеся или входящие в состав лекарственных средств и подлежащие доклиническим исследованиям их безопасности.

5. Инструкция предназначена для организаций (учреждений), осуществляющих государственный санитарный надзор, государственных научных медицинских учреждений, занимающихся токсикологическими исследованиями и осуществляющих оценку безопасности и безвредности для человека наноматериалов.

6. Инструкция вступает в силу с даты утверждения.

ГЛАВА 2

ТЕРМИНЫ И ИХ ОПРЕДЕЛЕНИЯ

7. Для целей инструкции используются следующие термины и определения:
макроматериал — материал, имеющий такой же химический состав, как у наноматериала, и состоящий из объектов, размеры которых превышают нанодиапазон (1-100 нм);

минимальный уровень неблагоприятного воздействия (LOAEL) — установленная в эксперименте минимальная доза (количество) вещества, вызывающая неблагоприятные изменения морфологических характеристик, функциональных возможностей, роста, развития или продолжительности жизни организма, обнаруживаемых современными методами при определенных условиях экспозиции наноматериала;

наноразмерный материал (наноматериал) — материал, содержащий структурные элементы, геометрические размеры которых хотя бы в одном измерении не превышают 100 нм и обладающий качественно новыми свойствами, функциональными и эксплуатационными характеристиками в отличие от макроматериала или аналогичного материала;

наноразмерный объект (нанообъект) — материальный объект, линейные размеры которого по одному, двум или трем измерениям находятся в нанодиапазоне (приблизительно от 1 до 100 нм);

наноразмерная структура (наноструктура) — совокупность наноразмерных объектов искусственного или естественного происхождения, свойства которой определяются не только размером структурных элементов, но и их взаимным расположением в пространстве;

носитель наноматериала — вещество, используемое для смешивания, диспергирования или растворения исследуемого наноматериала и позволяющее облегчить его введение в организм лабораторных животных;

предельная доза — доза, являющаяся самой большой при исследовании наноматериала;

промышленный наноматериал — наноматериал с определенными свойствами или определенным составом, преднамеренно изготовленный для коммерческих целей;

среднесмертельная доза (DL_{50}) вещества (мг/кг) — статистически установленная однократная доза наноматериала, которая вызывает гибель 50 % лабораторных животных, подвергшихся воздействию (внутрижелудочно, накожно);

среднесмертельная концентрация (CL_{50}) вещества ($мг/м^3$) — статистически установленная концентрация наноматериала, которая вызывает гибель 50 % лабораторных животных, подвергшихся определенной экспозиции (например, в случае эксперимента на крысах составляет 4 ч);

СГС (GHS) — Согласованная на глобальном уровне система классификации опасности и маркировки химической продукции, выработанная в ходе совместной деятельности специалистов Организации экономического сотрудничества и развития (ОЭСР), Комитета экспертов ООН по перевозке опасных грузов и Международной организации труда (МОТ), в рамках выполнения Межорганизационной программы по рациональному регулированию химических веществ (МППРХВ);

технический наноматериал — наноматериал, изготовленный с конкретной целью или для реализации определенной функции;

уровень отсутствия наблюдаемого неблагоприятного воздействия (NOAEL) — установленная в эксперименте максимальная доза (количество) вещества, не вызывающая неблагоприятных изменений морфологических характеристик, функциональных возможностей, роста, развития или продолжительности жизни организма, обнаруживаемых современными методами при определенных условиях экспозиции наноматериала.

ГЛАВА 3 ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

7. Объем токсикологических исследований новых видов наноматериалов предусматривает изучение общетоксического действия (острая, подострая, субхроническая, хроническая токсичность, кожно-раздражающего, кожно-резорбтивного и ирритативного действия, а также специфических видов

токсичности (аллергенность, иммунотоксичность, генотоксичность, мутагенность, канцерогенность, репротоксичность)).

8. Объем токсикологических исследований может быть сокращен или расширен в зависимости от цели, которая стоит перед исследователем (изучение биологического действия, определение отдельных параметров токсикометрии, обоснование безопасных уровней воздействия, классификация наноматериалов по критериям СГС, оценка риска для здоровья человека), а также определяется физико-химической и токсикологической характеристикой наноматериалов.

Объем токсикологических исследований может быть сокращен с целью минимизации использования животных в случае наличия релевантных литературных данных о токсичности наноматериалов, результатов предыдущих испытаний.

9. На начальном этапе необходимо проанализировать имеющуюся информацию об исследуемом наноматериале, которая может помочь в выборе наиболее подходящего вида, линии и пола лабораторных животных, времени воздействия, дозы и/или соответствующей концентрации исследуемого наноматериала.

10. Требования к объекту исследований. Комплект документов на исследуемый наноматериал должен содержать его характеристику, условия и сроки хранения, рекомендации по осуществлению процедуры растворения и диспергирования, информацию о мерах по обеспечению безопасности работы с исследуемым наноматериалом. Комплект документов предоставляется производителем или уполномоченным им лицом, представителем производителя.

Общая характеристика наноматериалов включает:

химическое наименование наноматериала;

точное название, адрес, реквизиты изготовителя;

область применения;

метод получения;

состав наноматериала (название и формула(ы) вещества или веществ, входящих в его состав в соответствии с систематической номенклатурой IUPAC, его (их) молекулярная масса);

содержание растворителей или носителей (если они использовались);

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

физико-химические характеристики наноматериалов (растворимость в воде и биологических жидкостях, рекомендуемый состав среды для получения дисперсий наночастиц, заряд частиц, кристаллическая структура, адсорбционная емкость, стабильность наночастиц при хранении (устойчивость к агрегации), гидрофобность, адгезия наночастиц к поверхности, химическая активность (в т. ч. способность генерировать свободные радикалы), способность к биодеструкции;

специфический метод определения наноматериалов в различных средах обитания человека (атмосферный воздух, вода, почва, воздух рабочей зона), в продукции.

11. Токсикологическая характеристика наноматериалов (при их наличии) может включать следующие сведения: потенциальные пути проникновения в организм, острая токсичность, подострая токсичность, хроническая токсичность, кумулятивное действие, местно раздражающее действие, отдаленные эффекты (мутагенность, эмбриотоксичность, тератогенность, канцерогенность), иммунотоксичность, аллергенность, накопление в органах и тканях, проницаемость барьеров организма для токсикантов, проникновение через барьеры организма, молекулярно-биологические характеристики (взаимодействие с ДНК, РНК, клеточными мембранами, белками), цитотоксичность, способность к накоплению в клетках, влияние на протеомный и метаболомный профиль.

12. Подготовка образцов наноматериалов для исследований. Для наноматериала, представленного в виде раствора/суспензии/эмульсии, с целью предотвращения агрегации или агломерации рекомендуется проводить его ультразвуковую обработку непосредственно (не более чем за 1 ч) перед введением животным. Обработку наноматериала проводят при частоте ультразвука не менее 30 кГц, мощности не менее 0,5 Вт/см³ в течение 5 мин при температуре (2–4) °С (охлаждение в бане со льдом). Для предотвращения образования агрегатов или агломератов нанообъектов в процессе введения животным наноматериала допускается использование принудительного перемешивания подготовленного раствора/суспензии/эмульсии наноматериала в течение всего периода введения.

Для смешивания, диспергирования или растворения исследуемого наноматериала рекомендуется применять стерильный апиrogenный 0,9 %-й раствор хлорида натрия, допускается применять органические растворители и поверхностно-активные вещества (ПАВ). При наличии сведений о собственной токсичности растворителя или носителя наноматериала (известных значениях средней смертельной дозы (DL₅₀), средней смертельной концентрации (CL₅₀), уровня отсутствия наблюдаемого неблагоприятного воздействия (NOAEL) или минимального уровня неблагоприятного воздействия (LOAEL)) рекомендуется использовать такую его дозу, которая при однократном введении животным не оказывает на них токсического действия. В случае использования для смешивания, диспергирования или растворения наноматериала органических растворителей и ПАВ, обладающих собственной токсичностью, формируют дополнительную контрольную группу животных, получающих этот растворитель.

При необходимости проведения испытаний макроматериала или аналогичного материала, обладающего собственной токсичностью, формируют дополнительную группу животных. Доза макроматериала или аналогичного материала должна соответствовать дозе наноматериала.

13. Размещение, содержание и уход за лабораторными животными должны соответствовать принципам надлежащей лабораторной практики, изложенным в технических нормативных правовых актах Республики Беларусь.

14. Наиболее предпочтительным видом лабораторных животных для выполнения токсикологических исследований наноматериалов являются грызуны (крысы и мыши). При использовании других видов лабораторных животных должно быть представлено соответствующее обоснование. В эксперименте

используют здоровых молодых половозрелых животных, которые могут быть как линейными (крысы линий Wistar, Sprague-Dawley и др.; мыши линий CBA, G57B1/6 и др.), так и нелинейными с исходной массой тела 180–240 и 18–24 г соответственно, если иное не установлено в соответствующем стандарте/методике. Разброс по исходной массе тела животных в группе не должен превышать $\pm 10\%$.

15. Доза наноматериала рассчитывается на единицу массы тела животного (мг/кг), на площадь поверхности при нанесении на кожу ($\text{мг}/\text{см}^2$) или в $\text{мг}/\text{м}^3$ при ингаляционном поступлении. Дополнительно для выражения количества наноматериала можно использовать такие параметры, как отношение количества частиц к массе наноматериала (10^{12} мг^{-1}), отношение площади поверхности частиц к массе наноматериала ($\text{см}^2/\text{мг}$). При моделировании ингаляционной экспозиции в затравочных камерах также учитывается счетная концентрация частиц в воздухе камеры (10^6 см^3).

16. Путь введения наноматериала должен быть аналогичным пути попадания его в организм человека в соответствии с имеющимися сценариями. При внутрижелудочном пути введения рекомендуется вводить наноматериал с кормом или питьевой водой. При проведении исследования продолжительностью менее месяца допускается введение наноматериала в желудок через зонд способом, не травмирующим животное. В ходе эксперимента необходимо контролировать стабильность характеристик наноматериала (размер, форма, степень дисперсности, дзета-потенциал, массовая или объемная концентрация наночастиц в корме и питьевой воде (в мас. %, мг/л, ммоль/л)). Для анализа основных характеристик наноматериалов должны применяться современные аналитические методы (такие, как метод просвечивающей электронной микроскопии, масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой, лазерной гранулометрии, рентгенофазового анализа и др.), обладающие необходимыми метрологическими характеристиками. Для методического руководства при определении характеристик наночастиц можно следовать рекомендациям, изложенным в МР 1.2.2641-10 [1].

17. Класс опасности исследуемого наноматериала определяют согласно ГОСТ 12.1.007 [2] (например, для целей гигиенического нормирования/регламентирования), либо в соответствии с СГС (GHS) (например, при выпуске в коммерческое обращение и необходимости оценки соответствия, идентификации и маркировки).

ГЛАВА 4

ИЗУЧЕНИЕ ОСТРОЙ ТОКСИЧНОСТИ

18. Задачей данного этапа исследований является определение переносимых, токсических и летальных доз и причин гибели животных после однократного или дробного введения исследуемого наноматериала животным через короткие (не более 3–6 ч) интервалы в течение не более 24 ч.

19. Схема изучения острой токсичности наноматериала предполагает наблюдение за животным на протяжении 14 сут после введения, оценку массы тела в динамике, массовых коэффициентов органов после умерщвления и вскрытия животного. Клинический осмотр животных проводят на 1-е сут через

30 мин после введения наноматериала (или последней дозы дробного введения), затем периодически в течение первых 24 ч и ежедневно в течение 14 дней, если иное не установлено в стандарте/методике на конкретный метод испытаний. Регистрируются общее состояние животных, клиническая картина интоксикации и гибели, характер двигательной активности и походки, наличие и характер судорог, тонус скелетных мышц, реакция на различные раздражители, частота и глубина дыхательных движений, ритм сердечных сокращений, состояние волосяного и кожного покрова, положение хвоста, частота мочеиспускания и окраска мочи, потребление корма и воды, изменения массы тела. Необходимо фиксировать время гибели животных, при этом у всех погибших животных проводятся макроскопическое и микроскопическое исследование внутренних органов.

20. При определении тестируемой дозы наноматериала учитывают данные о токсичности макроматериала или аналогичных материалов.

21. Если неизвестна степень токсичности наноматериала, или он обладает токсичностью только в дозах, превышающих предельно допустимые уровни, проводят пороговое испытание предельной дозы с учетом вида, пола и возраста животного, технической возможности получения наноматериала в виде стабильного раствора/суспензии/эмульсии с заданной концентрацией, допустимого максимального разового объема наноматериала в жидком виде, вводимого животному, в соответствии с приложением 1.

22. В тех случаях, когда исследуемый наноматериал, вероятно, является токсичным проводят основное исследование.

23. Для основного исследования количество лабораторных животных в группе должно обеспечить возможность вычисления DL_{50} , CL_{50} с помощью общепринятых методов статистического анализа (не менее 6–10 особей каждого пола в группе при постановки эксперимента на крысах, мышах, если иное не установлено в соответствующем методе/стандарте).

24. При классификации наноматериала в соответствии с требованиями СГС (GHS) с целью минимизации использования животных количество подопытных особей в эксперименте следует выбирать в зависимости от имеющихся данных о наноматериале и предполагаемого пути поступления согласно требований следующих стандартов: внутрижелудочный ГОСТ 32296 [3] и ГОСТ 32644 [4], нанесение на кожу ГОСТ 32373 [5], ингаляционный ГОСТ 32542 [6].

25. Статистическая обработка результатов острого опыта проводится на основании данных о смертности животных. Для расчета DL_{50} при классификации наноматериала по ГОСТ 12.1.007-76 можно использовать метод пробит-анализа Литчфильда и Уилкоксона, методы Беренса и Шлоссера, метод Б. В. Прозоровского, лицензионные автоматизированные (компьютерные) программы. При классификации согласно СГС (GHS) следует руководствоваться рекомендациями, изложенными в соответствующих стандартах.

26. Если из-за низкой токсичности наноматериала нельзя определить DL_{50} , тогда указывается максимальная доза, которая была введена животным.

27. Информацию о токсичности наноматериала, полученную при изучении острой токсичности, используют как исходную для планирования исследования подострой, субхронической и хронической токсичности.

ГЛАВА 5

ИЗУЧЕНИЕ ПОДОСТРОЙ, СУБХРОНИЧЕСКОЙ И ХРОНИЧЕСКОЙ ТОКСИЧНОСТИ

28. Изучение подострой (повторное воздействие на протяжении до 30 дней), субхронической (повторное воздействие на протяжении 30–90 дней) и хронической (длительное воздействие на протяжении более 90 дней) токсичности проводят с целью получения информации об основных токсических эффектах наноматериала, выявления органов-мишеней и возможности накопления вещества, латентном периоде развития эффектов, их обратимости (при изучении суб- и хронической токсичности) и зависимости от дозы, определения NOAEL и LOAEL, на основе которых определяют безопасные уровни воздействия на организм человека.

29. Продолжительность хронических экспериментов устанавливают в соответствии со стандартом/методикой на конкретный метод испытания, но не более средней продолжительности жизни животных. Если требуется проведение испытания наноматериала, воздействующего на организм в течение длительного времени, то продолжительность эксперимента для мелких лабораторных животных (грызунов) составляет от 12 до 18 мес. При наличии у наноматериала свойства кумуляции или в случае его отнесения к высоко опасным веществам (I–II класс по ГОСТ 12.1.007-76) срок испытания может быть увеличен.

30. Животные опытных групп получают наноматериал не менее чем в трех последовательно возрастающих дозах (низкая, средняя и высокая дозы). Диапазон изменения доз тестируемого образца наноматериала должен распространяться от предположительно безопасной до предположительно токсической (или при невозможности ее оценки — максимально возможной по условиям введения препарата) дозы. Высокую, низкую и среднюю дозу ежедневно вводимого наноматериала устанавливают на основе результатов предварительной характеристики острой токсичности.

Животные контрольной группы (групп) получают растворитель или носитель наноматериала и его химический аналог традиционной степени дисперсности при его наличии в эквивалентных количествах с использованием идентичного метода введения.

31. В ходе эксперимента ежедневно проверяют наличие погибших животных в каждой из групп. Погибших животных в день выявления подвергают вскрытию в целях установления причины смерти и посмертных изменений в морфологии внутренних органов. На протяжении всего эксперимента ежедневно взвешивают животных на технических весах с точностью ± 1 г. Определяют абсолютный и относительный прирост массы тела животных за каждую неделю и за весь период эксперимента в целом. При проведении исследований и по окончании эксперимента у животных определяют показатели из перечня рекомендованных, указанные в приложении 2. При выборе показателей исходят

из физико-химических свойств наноматериалов, данных литературы о токсичности, характере биологического действия. Перечень изучаемых показателей может изменяться как в сторону расширения, так и в сторону его сокращения.

32. Статистическую обработку результатов измерений биохимических, физиологических, гематологических, иммунологических и других показателей животных проводят общепринятыми методами статистического анализа. Проверку статистической значимости различия между группами животных, получавших наноматериал, и группами, получавшими носитель наноматериала, и группами, получавшими в эквивалентных количествах химический аналог наноматериала традиционной степени дисперсности (при его наличии) проводят с использованием критериев непараметрической (Манна – Уитни и Колмогорова – Смирнова) и параметрической (Стьюдента) статистики. Эффект наноматериала (воздействие на выбранный показатель организма животного) считается выявленным при статистической значимости различия контрольной и опытной групп (вероятности принятия нулевой гипотезы) на уровне $p = 0,05$ и менее.

33. Изучение подострой (субхронической) токсичности наноматериала по схеме, представленной в п. 30 может не проводиться в том случае, если выполняется изучение кумулятивных свойств наноматериала методом Ю. С. Кагана и В. В. Станкевича. Метод Ю. С. Кагана и В. В. Станкевича (1964) позволяет оценить кумулятивные свойства наноматериала по смертельным эффектам и в динамике проследить изменения, возникающие в органах и системах в ответ на действие наноматериала. Опыты проводят на белых крысах, которым внутрижелудочно вводят испытуемый наноматериал в дозе $0,1 DL_{50}$ в течение 1,0–2,0 мес. (по 5 раз в неделю), контрольные животные получают в эквивалентных количествах растворитель или носитель. В случае если DL_{50} не установлена, то в подостром эксперименте следует использовать дозу, кратную 0,1 от максимально введенной в остром опыте. В ходе эксперимента регистрируют гибель животных, сроки ее наступления, клинические симптомы интоксикации и по летальным эффектам рассчитывают DL_{50} наноматериала при подостром (субхроническом) воздействии и коэффициент кумуляции по общепринятому методу. По степени выраженности кумулятивного эффекта — величине коэффициента кумуляции (Ккум.) — наноматериалы классифицируются на четыре группы:

сверхкумулятивные — $K_k < 1,0$;

с выраженной кумулятивной активностью — $1,1 < K_k < 3,0$;

со средней кумулятивной активностью — $3,1 < K_k < 5,0$;

со слабой кумулятивной активностью — $K_k > 5,1$.

34. Анализ кумулятивных свойств наноматериалов может осуществляться методом Лима (Lim P. [et.al.], 1961), который применяют на белых крысах или мышах (по 10–15 особей в группе). Суть метода заключается в моделировании режима постоянного увеличения в 1,5 раза через каждые 4 дня дозы вводимого в желудок наноматериала в течение 24–28 сут. Введение проводят ежедневно, без выходных, контрольные животные в адекватных объемах получают растворитель. Критерием оценки кумулятивной активности является коэффициент кумуляции.

Следует учитывать, что при оценке результатов изучения кумуляции по методу Лима (Lim P. [et.al.], 1961) коэффициент кумуляции менее 1 свидетельствует о наличии кумулятивных свойств, более 1 — о развитии повышенной резистентности к изучаемому веществу. Недостатком метода Лима является применение массивных доз наноматериала и оценка кумулятивного эффекта только с учетом альтернативного показателя — гибели животных без анализа токсикодинамики повторного воздействия и морфофункциональных изменений, происшедших в организме животных.

ГЛАВА 6

ИЗУЧЕНИЕ МЕСТНО-РАЗДРАЖАЮЩЕГО И КОЖНО-РЕЗОРБТИВНОГО ДЕЙСТВИЯ

35. На данном этапе исследований проводится изучение особенностей эпикутанного воздействия наноматериала и оценка степени проявления кожно-раздражающих свойств при нанесении на кожу и слизистые оболочки глаз (ирритативное действие) лабораторных животных, а также кожно-резорбтивных свойств при однократных и повторных аппликациях наноматериала на кожу лабораторным животным.

36. Определение местно-раздражающего действия наноматериала на кожные покровы проводят на белых крысах в жидком, предпочтительно нативном виде, а при наличии эффекта или твердом агрегатном состоянии в виде разведений/разбавлений. Доза составляет 20 мг/см². Время экспозиции — 4 ч. После опыта наноматериалы смывают водой. Состояние кожи регистрируется визуально ежедневно в течение 14 дней. Отмечают функционально-морфологические нарушения кожи (эритема, отек, трещины, некроз, шелушение, сухость, изъязвления). Объективным методом оценки отека кожи служит измерение толщины кожной складки (мм) при помощи инженерного микрометра.

37. Изучение местно-раздражающего действия наноматериала на слизистые глаз (ирритативное действие) проводят на кроликах при однократном воздействии. Один глаз служит для нанесения наноматериала, другой — в качестве контроля. Наноматериал вносят в конъюнктивный мешок в количестве 50 мкл (1–2 капли) в жидком, предпочтительно нативном виде, а при наличии эффекта или твердом агрегатном состоянии в виде рабочей концентрации. Отмечают выраженность гиперемии и отека конъюнктивы, инъекцию сосудов склеры, состояние роговицы и радужной оболочки, количество и качество выделений из глаза.

38. Оценку результатов местно-раздражающего действия наноматериалов на кожные покровы и слизистые оболочки глаз проводят в баллах согласно [7]. При необходимости классификации наноматериала по способности вызывать раздражение кожных покровов и слизистые глаз согласно СГС (GHS) при проведении и интерпретации результатов эксперимента следует руководствоваться рекомендациями, изложенными в ГОСТ 32436 [8] и ГОСТ 34658 [9] соответственно.

39. Изучение раздражающих и кожно-резорбтивных свойств наноматериалов проводят путем их повторных аппликаций на хвосты белых крыс. Количество животных в группе не менее 6–10 особей. Животные помещаются в специальные домики (изолированно друг от друга) с отверстиями для хвоста. Хвост погружается в нативное вещество или его раствор в индифферентных растворителях, который не оказывает раздражающего действия в однократных опытах при аппликациях на кожные покровы, на 2/3 длины в пробирку. Хвосты контрольных животных погружают в пробирки с дистиллированной водой в соответствующий растворитель. Функциональные нарушения кожи характеризуются появлением различной степени выраженности эритемы, отека, трещин, изъязвлений, изменением ее температуры и уменьшением нейтрализующей способности. Оценка в баллах функционального состояния кожи по выраженности эритемы и величине отека и классификация степени раздражающих свойств исследуемого наноматериала проводится по алгоритму, изложенному в инструкции 1.1.11-12-35-2004 [10]. Оценка резорбтивного эффекта наноматериала проводится после 20-кратных повторных аппликаций (по 5 раз в неделю). Ежедневная экспозиция составляет 4 ч. При этом регистрируют смертельные эффекты, клинические симптомы интоксикации и признаки раздражения кожи хвостов, проводится оценка (физиологическая, общеклиническая, биохимическая, патоморфологическая и пр.) общего состояния животных.

40. При необходимости классификации наноматериала по способности оказывать кожно-резорбтивное действие согласно СГС (GHS) следует руководствоваться рекомендациями, изложенными в ГОСТ 32371 [11].

ГЛАВА 7

ИЗУЧЕНИЕ АЛЛЕРГЕННЫХ (СЕНСИБИЛИЗИРУЮЩИХ) СВОЙСТВ

41. Сенсibiliзирующие свойства наноматериала определяют на модели воспроизведения гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) на белых мышах. В опытную и контрольную группы берут по 10–12 беспородных белых мышей. Животных сенсibiliзируют 100 мкл наноматериала однократно внутрикожно в основание хвоста туберкулиновым или микрошприцем. Нативный наноматериал растворяют в растворе Хэнкса (рН = 7,5) или стерильном физиологическом растворе таким образом, чтобы сенсibiliзирующая доза на одно животное содержалась в 30 мкл (целесообразно использовать 0,35 % рабочую концентрацию). Для водонерастворимых наноматериалов в качестве растворителей используют диметилсульфоксид, этиловый спирт, ацетон в конечной концентрации не более 20 %, а также автоклавированное вазелиновое или растительное масло. Из рабочей концентрации наноматериала готовится в соотношении 1:1 смесь с иммуностимулятором – полным адьювантом Фрейнда (далее — ПАФ) при их тщательном совместном эмульгировании (интенсивном перемешивании на магнитной мешалке). Опытным животным вводится по 60 мкл сенсibiliзирующей дозы в ПАФ, контрольным — 60 мкл смеси ПАФ с растворителем (без изучаемого наноматериала). Сенсibiliзацию выявляют на 6-е сут опыта провокационными пробами — по тесту опухания лапы мыши

(ТОЛМ) и /или тесту опухания уха (ТОУМ) согласно [10], а также с использованием лабораторных методик аллергодиагностики, из которых наиболее технически проста в постановке и воспроизводима реакция специфического лейколизиса. При оценке сенсibiliзирующей способности наноматериала следует учитывать, что экспериментальная модель воспроизведения сенсibiliзации на мышах недостаточно чувствительна даже при использовании ПАФ, поэтому при сомнительных результатах аллергологического тестирования и затруднения их оценки следует провести исследования на модели внутрикожной сенсibiliзации либо путем длительного (20-кратного) эпикутанного воздействия тестируемого наноматериала на морских свинках-альбиносах.

42. При необходимости классификации наноматериала по способности оказывать аллергенное действие согласно СГС (GHS) следует руководствоваться рекомендациями, изложенными в ГОСТ 32375 [12] и/или ГОСТ 34556 [13].

ГЛАВА 8

ИЗУЧЕНИЕ ГЕНОТОКСИЧЕСКИХ (МУТАГЕННЫХ) СВОЙСТВ

43. Исследования генотоксических (мутагенных) свойств проводят с целью получения данных о токсическом воздействии наноматериала на генетический механизм репродуктивных клеток животного, проявляющемся в повреждении ДНК и возникновении новых, потенциально вредных наследуемых признаков (мутаций).

44. Генотоксические (мутагенные) свойства наноматериала на лабораторных животных определяют методами учета аберраций хромосом в клетках костного мозга, учета микроядер в соматических клетках, выявления повреждения ДНК в соматических клетках, щелочного гель-электрофореза отдельных клеток (метод «ДНК-комет»).

45. Для эксперимента предпочтительно использование линейных лабораторных животных (крысы, мыши). Количество животных в группе — не менее 10 особей. Карантин — 10 дней. Контрольную группу составляют животные, которым не вводили испытуемых наноматериалов. В случае необходимости, когда отсутствуют данные по аналогичным материалам, полученным традиционными методами, и растворителям или носителям наноматериалов, отдельно формируют дополнительные группы животных для проведения исследований этих веществ.

46. Класс опасности наноматериала по результатам изучения мутагенных свойств определяют в соответствии с критериями СГС (GHS).

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

Наноматериалы вводятся ежедневно на протяжении 4–5 сут. Фиксацию клеточного материала осуществляют через 6 и 24 ч после последнего введения. Анализируют 100 метафаз от каждого животного, при этом учитывается число одиночных и парных фрагментов, хроматидных и хромосомных обменов, ахроматических пробелов (гепов) и разрывов по центромере, число клеток с множественными повреждениями и клеток с полной деструкцией хромосом.

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

Подробное методическое описание и рекомендации по интерпретации результатов приведены в ГОСТ 34659 [14].

48. Метод учета микроядер в соматических клетках (на примере эритроцитов) основан на регистрации клеток с микроядрами.

Наноматериалы вводятся ежедневно на протяжении 4–5 сут. Фиксацию клеточного материала осуществляют через 6 и 24 ч после последнего введения. Анализируют 2000 полихроматофильных эритроцитов костного мозга от каждого животного, соотношение нормо- и полихроматофильных эритроцитов определяют при подсчете 500 эритроцитов. При оценке результатов следует ориентироваться на статистически достоверное, по сравнению с контролем, увеличение числа полихроматофильных эритроцитов с микроядрами.

Подробное методическое описание и рекомендации по интерпретации результатов приведены в ГОСТ 34660 [15].

49. Метод выявления повреждений ДНК, предусматривающий оценку целостности структуры ДНК методом щелочного гель-электрофореза отдельных клеток (метод ДНК-комет).

Принцип метода заключается в проведении электрофореза в микрогеле для детекции повреждений ДНК в клетках. Для испытаний используют клетки костного мозга, лимфоциты периферической крови, гепатоциты, полученные от лабораторных животных после экспозиции наноматериалами. Изучаемые клетки помещают в агарозный гель на предметное стекло, затем при 4 °С обрабатывают буферным раствором с хлоридом натрия и детергентом (10 мМ трис-HCl (pH 10); 2,5 М NaCl; 100 мМ EDTA-Na; 1 % Тритон X-100; 10 % диметилсульфоксид) для лизиса клеточной оболочки и высвобождения из нее ДНК. В процессе лизиса происходит диссоциация клеточных структур, депротенинизированная ДНК заполняет образованную клеткой полость в агарозе. Далее следует этап щелочной денатурации ДНК (буфер — 300 мМ NaOH и 1 мл EDTA-Na (pH <13) и этап электрофореза в том же буфере, в ходе которого ДНК мигрирует по направлению к аноду, образуя кометообразный след, который фиксируется на предметном стекле с помощью флуоресцентных красителей. Оценка результатов проводится микроскопически визуально с соответствующими красителю фильтрами при 200–400-кратном увеличении в зависимости от типа клеток или с использованием компьютерных программ. При визуальном способе анализа ДНК-кометы ранжируют на пять категорий с соответствующим для каждого числовым значением от 0 до 4. Оснащение микроскопа высокочувствительной камерой и специального программного обеспечения позволяет проводить регистрацию и обработку параметров ДНК-комет, которые характеризуют степень повреждения ДНК клетки. К таким параметрам относят: длину ДНК-комет, длину хвоста, диаметр головы, процентное содержание ДНК в голове или хвосте.

Подробное методическое описание и рекомендации по интерпретации результатов приведены в МР 4.2.0014-10 [16].

ГЛАВА 9 ИЗУЧЕНИЕ РЕПРОДУКТИВНОЙ ТОКСИЧНОСТИ

50. Изучение репродуктивной токсичности наноматериалов проводится в эксперименте на лабораторных животных и включает исследования генеративной функции, эмбриотоксического и тератогенного действия в пренатальном и постнатальном периоде развития, а также при необходимости изучение плодовитости и общей репродуктивной функции.

51. Исследование влияния наноматериалов на генеративную функцию лабораторных животных.

Для эксперимента предпочтительно использование линейных лабораторных животных (крысы, мыши). Количество животных в группе — не менее 50 особей (из них 30 самок и 20 самцов).

Распределение по группам: 1-я группа — контрольная группа крыс (самцы и самки) получает на протяжении всего эксперимента полусинтетический рацион; 2-я группа (самцы и самки) получает полусинтетический рацион с включением аналога наноматериала, полученного традиционным способом (если таковой имеется); 3-я группа крыс (самцы и самки) получает полусинтетический рацион с включением исследуемого наноматериала в том же количестве, что и крысы 2-й группы. Животные находятся на рационах вивария не менее 30 дней до спаривания, во время спаривания, беременности, лактации. Полученное потомство находится на этих рационах до момента половой зрелости. В период всего эксперимента регистрируется общее состояние животных (внешний вид, двигательная активность, состояние шерсти), поедаемость корма (ежедневно), масса тела (1 раз в неделю).

Показатели, характеризующие генеративную функцию:

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

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

52. Изучение эмбриотоксического и тератогенного действия наноматериалов в пренатальном периоде.

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

краниокаудальный размер, количество обследованных плодов (из них с аномалиями развития).

53. Изучение эмбриотоксического и тератогенного действия наноматериалов в постнатальном периоде.

По 15 беременных самок в каждой группе оставляют до родов и проводят изучение потомства: количество живых и мертвых крысят, подсчет особей разного пола, их внешний вид, установление внешних уродств, измерение массы тела и краниокаудального размера. Потомство взвешивают при рождении, затем еженедельно. Учитывают следующие показатели физиологического развития крысят: сроки отлипания ушных раковин, появление первичного волосяного покрова, открытие глаз, прорезывание резцов, опускание семенников, открытие влагалища, выживаемость потомства. Наблюдения за потомством осуществляют ежедневно в течение 30 дней и рассчитывают выживаемость на 30-й день.

54. Изучение влияния наноматериалов на плодовитость и общую репродуктивную функции в эксперименте на двух поколениях животных (при необходимости).

Исходное количество животных в группе должно составлять 10 самцов и 20 самок. F_0 родительское поколение получает исследуемый наноматериал в течение экспозиционного периода (70 дней), периода беременности и до окончания вскармливания F_1 поколения. После достижения животными F_1 зрелости (≈ 3 мес.) их спаривают и получают потомство F_2 . Как в опытной, так и в контрольной группах F_1 и F_2 должно быть получено потомство не менее, чем от 10 самок. При изучении физического развития потомства F_1 и F_2 регистрируют размер помета, число живых и мертворожденных плодов, число особей разного пола, динамику массы и выживаемость молодняка на 4, 7, 14, 21 и 30-й дни после рождения, а также сроки отлипания ушной раковины, появление первичного волосяного покрова, прорезывание резцов, открытие глаз, переход к самостоятельному питанию, опускание семенников, открытие влагалища. В возрасте 30 дней у потомства изучают эмоционально-двигательное поведение с использованием теста «открытое поле», определяют суммационно-пороговый показатель, статическую работоспособность. За единицу наблюдения принимают помет. Полученные данные обрабатывают статистически, сравнивают с контролем и регистрируют в таблицах.

55. Подробное методическое описание и рекомендации по интерпретации результатов, в том числе с целью классифицирования наноматериалов по способности оказывать репротоксическое действие руководствуясь требованиями СГС (GHS) приведены в ГОСТ 32379 [17], ГОСТ 32380 [18], ГОСТ 34554 [19] и ГОСТ 34555 [20].

ГЛАВА 10

ОЦЕНКА И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ, ОФОРМЛЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

56. Результаты исследований оценивают по наблюдаемым токсическим эффектам, клинико-лабораторным показателям, морфологическим и

морфометрическим данным, полученным при анализе биологического материала (аутопсии).

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

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

58. Результаты токсикологических исследований, как правило, оформляются в виде отчета (протокола) о проведении исследований/испытаний, либо в форме соответствующего заключения, токсикологического паспорта.

В отчете о проведении исследований приводится информация о наноматериале, содержащаяся в сопроводительной документации и нормативных документах на конкретный вид наноматериала, включая идентификационные данные, химическое строение и физико-химические свойства исследуемого наноматериала, предполагаемую область применения и вероятность воздействия на человека; сведения о токсичности макроматериала и аналогичных материалов (при наличии).

В отчете должны быть представлены данные (в т. ч. количественные), полученные в результате наблюдений и исследований в текстовой и/или табличной форме, включающие следующую информацию: число используемых животных для каждой группы, число животных с определенными признаками токсичности, число животных, найденных мертвыми во время испытания или умерщвленных из гуманных соображений, описание развития токсических эффектов, их обратимость, результаты аутопсии.

В заключительном разделе отчета о проведении исследований в форме выводов приводят токсикологическую характеристику и классификационную оценку опасности для здоровья человека исследованного наноматериала по эффектам общетоксического и специфического воздействия, кожно-раздражающему, кожно-резорбтивному и ирритативному действию, а также приводят научно обоснованные безопасные уровни воздействия наноматериала на организм человека.

В заключительном разделе отчета также могут быть приведены необходимые санитарно-гигиенические меры, в т. ч.: по организации технологических процессов производства и применения наноматериалов, перечень рекомендуемых средств индивидуальной защиты работающих, санитарные правила и другие нормативные документы, регламентирующие получение и использование наноматериалов (при наличии), рекомендации по предупредительной маркировке.

Приложение 1
к инструкции по применению
«Метод токсикологических исследований
и оценки токсичности и опасности
наноразмерных объектов и структур»
(Справочное)

Допустимые максимальные разовые объемы наноматериалов для введения лабораторным животным (крысам и мышам) в виде жидкостей (эмульсий, суспензий, дисперсий)

Путь введения	Вид животных	
	Крыса	Мышь
Внутрижелудочно (в зависимости от массы тела животного), не более, см ³	3–8*	0,5–1,0**
Внутритрахеально, внутриглоточно или внутригортанно, не более, см ³	0,5	–

* — при массе тела животного 100–200 г разовый объем жидкого наноматериала должен быть не более 3 см³, 201–250 г — не более 4–5 см³, 251–300 г — не более 6 см³, более 300 г — не более 8 см³;

** — при массе тела животного 20–25 г разовый объем жидкого препарата должен быть не более 0,5 см³, 26–30 г — не более 0,8 см³, более 30 г — не более 1,0 см³.

Приложение 2
к инструкции по применению
«Метод токсикологических исследований
и оценки токсичности и опасности
наноразмерных объектов и структур»
(Справочное)

**Перечень рекомендуемых показателей для оценки токсичности
и опасности наноматериалов в подострых, субхронических
и хронических экспериментах**

Наименование исследуемого показателя	Время (периодичность) оценки изменения показателя у животных
Общее состояние животных (внешний вид, рефлексы, двигательная активность, состояние шерстного покрова)	Ежедневно
Поедаемость корма	Ежедневно
Масса тела	1 раз в неделю и при выведении животных из исследования
Суммационно-пороговый потенциал	В 1-й и последний день эксперимента при выведении животных из исследования
Поведенческие реакции (ориентировочные реакции, двигательная координация, эмоциональная реактивность, норковый рефлекс)	В 1-й и последний день эксперимента при выведении животных из исследования
Абсолютная и относительная масса внутренних органов (печень, почки, селезенка, сердце, легкие и другие внутренние органы при необходимости)	По окончании эксперимента при выведении животных из исследования
Патоморфологические: макроскопические, микроскопические, морфометрические изменения внутренних органов (печень, почки, селезенка, сердце, легкие и другие органы при необходимости)	По окончании эксперимента при выведении животных из исследования (при отсутствии гибели животных). В течение эксперимента (в случае гибели животных)
Гематологические показатели: концентрация гемоглобина в крови, гематокрит, общее количество эритроцитов, общее количество лейкоцитов, лейкоцитарная формула (базофилы, нейтрофилы, лимфоциты, эозинофилы, моноциты), общее количество тромбоцитов, скорость оседания эритроцитов	По окончании эксперимента при выведении животных из исследования
Биохимические показатели сыворотки крови: общий белок, альбумин, глобулины, глюкоза, креатин, мочевины, общие липиды, холестерин, триглицериды, минеральный состав (натрий, калий, фосфор, хлориды), аланинаминотрансфераза, щелочная фосфатаза, аспартатаминотрансфераза, лактатдегидрогеназа, холинэстераза, другие показатели (при необходимости)	По окончании эксперимента при выведении животных из исследования

Наименование исследуемого показателя	Время (периодичность) оценки изменения показателя у животных
Система антиоксидантной защиты: восстановленный глутатион, глутатионредуктаза, глутатионпероксидаза, глутатионтрансфераза, SH-группы, глутатионфосфатдегидрогеназа, каталаза, супероксиддисмутаза, продукты перекисного окисления липидов (малоновый диальдегид, диеновые конъюгаты)	По окончании эксперимента при выведении животных из исследования
Иммунологическая реактивность (иммуноглобулины, циркулирующие иммунные комплексы, лизоцим, комплемент в сыворотке крови, интегральный показатель антибактериальной защиты сыворотки крови, тест бессубстратного восстановления нитро-синего тетразолия (НСТ) в диформаза (НСТ-тест), другие показатели (при необходимости))	По окончании эксперимента при выведении животных из исследования
Общий анализ мочи: суточный диурез, цвет и прозрачность, относительная плотность, рН, белок, глюкоза, креатинин, мочевины, форменные элементы крови (при наличии), билирубин (при наличии), кетоны (при наличии)	По окончании эксперимента при выведении животных из исследования
Показатели бронхоальвеолярной жидкости (лаважа): лактатдегидрогеназа, гаммаглутамилтранспептидаза, щелочная фосфатаза, общий белок	По окончании эксперимента при выведении животных из исследования
Эритроциты крови: аспартатамино-трансфераза, глутатионпероксидаза, глутатионредуктаза, супероксиддисмутаза, каталаза	По окончании эксперимента при выведении животных из исследования

Приложение 3
к инструкции по применению
«Метод токсикологических исследований
и оценки токсичности и опасности
наноразмерных объектов и структур»
(Справочное)

Список используемых источников

1. Определение приоритетных видов наноматериалов в объектах окружающей среды, пищевых продуктах и живых организмах : метод. рекомендации 1.2.2641-10 : утв. Роспотребнадзором 24.05.2010. – М., 2010. – 85 с.
2. ГОСТ 12.1.007-76. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности : введ. 17.12. 1992 // Система стандартов безопасности труда : сб. стандартов. – Минск, 2008. – Ч. 1. – С. 183–186.
3. ГОСТ 32296-2013. Методы испытаний по воздействию химической продукции на организм человека. Основные требования к проведению испытаний по оценке острой токсичности при внутрижелудочном поступлении методом фиксированной дозы : введ. 01.08.2014 [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://docs.cntd.ru/document/1200111000>.
4. ГОСТ 32644-2014. Методы испытания по воздействию химической продукции на организм человека. Острая пероральная токсичность – метод определения класса острой токсичности : введ. 01.06.2015 [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://docs.cntd.ru/document/1200115815>.
5. ГОСТ 32373-2020. Методы испытания по воздействию химической продукции на организм человека. Основные требования к проведению испытаний по оценке острой токсичности при накожном поступлении : введ. 01.07.2021 [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://docs.cntd.ru/document/566430518>.
6. ГОСТ 32542-2013. Методы испытаний по воздействию химической продукции на организм человека. Основные требования к проведению испытаний по оценке острой токсичности при ингаляционном поступлении : введ. 01.08.2014 [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://docs.cntd.ru/document/1200111001>.
7. Методы определения и оценки токсикологических и клинико-лабораторных показателей безопасности и безвредности для человека товаров народного потребления : инструкция по применению : утв. 18.07.2012 № 004-0612 / Г. И. Эрм [и др.]. ; ГУ «Республиканский научно-практический центр гигиены», УО «Белорусский государственный медицинский университет». – Минск, 2012. – 17 с.
8. ГОСТ 32436-2013. Методы испытания по воздействию химической продукции на организм человека. Испытания по оценке острого раздражающего/разъедающего (коррозионного) действия на кожу : введ. 01.08.2014 [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://docs.cntd.ru/document/1200108405>.
9. ГОСТ 34658-2020. Методы испытания по воздействию химической продукции на организм человека. Оценка раздражающего/разъедающего

воздействия на глаза : введ. 01.07.2021 [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://docs.cntd.ru/document/566422798>.

10. Требования к постановке экспериментальных исследований для первичной токсикологической оценки и гигиенической регламентации веществ : инструкция по применению : утв. 14.12.2004 №1.1.11-12-35-2004 / Л. В. Половинкин [и др.] ; Министерство здравоохранения Республики Беларусь, ГУ «Республиканский научно-практический центр гигиены». – Минск, 2004. – 42 с.

11. ГОСТ 32371-2013. Методы испытания по воздействию химической продукции на организм человека. Кожно-резорбтивное действие: метод *in vivo* : введ. 01.08.2014 [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://docs.cntd.ru/document/1200107869>.

12. ГОСТ 32375-2013. Методы испытания по воздействию химической продукции на организм человека. Испытания по оценке кожной сенсibilизации : введ. 01.08.2014 [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://docs.cntd.ru/document/1200110799>.

13. ГОСТ 34556-2019. Методы испытания по воздействию химической продукции на организм человека. Испытания по оценке кожной сенсibilизации методом изучения реакции региональных лимфатических узлов: введ. 01.06.2020 [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://docs.cntd.ru/document/1200167064>.

14. ГОСТ 34659-2020. Методы испытания по воздействию химической продукции на организм человека. Оценка хромосомных aberrаций в клетках костного мозга млекопитающих: введ. 01.07.2021 [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://docs.cntd.ru/document/566430519>.

15. ГОСТ 34660-2020. Методы испытания по воздействию химической продукции на организм человека. Учет микроядер в эритроцитах млекопитающих : введ. 01.07.2021 [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://docs.cntd.ru/document/566461004>.

16. Оценка генотоксических свойств методом ДНК-КОМЕТ *in vitro* : метод. рекомендации МР 4.2.0014-10 : утв. Роспотребнадзором 14.10. 2010 [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://meganorm.ru/Index2/1/4293808/4293808552.htm>.

17. ГОСТ 32379-2020. Методы испытания по воздействию химической продукции на организм человека. Испытания по оценке репродуктивной/онтогенетической токсичности (скрининговый метод) : введ. 01.07.2021 [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://docs.cntd.ru/document/566461111>.

18. ГОСТ 32380-2013. Методы испытания по воздействию химической продукции на организм человека. Испытания по оценке токсического воздействия на пренатальное развитие: введ. 01.08.2014 [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://docs.cntd.ru/document/1200108398>.

19. ГОСТ 34554-2019. Методы испытания по воздействию химической продукции на организм человека. Испытания по оценке репродуктивной токсичности двух поколений: введ. 01.06.2020 [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://docs.cntd.ru/document/1200167062>.

20. ГОСТ 34555-2019. Определение токсичности при повторном/многократном воздействии с одновременным определением оценки

репродуктивной/эмбриональной токсичности скрининговым методом : введ.
01.06.2020 [Электронный ресурс]. – Режим доступа:
<https://docs.cntd.ru/document/1200167063>.