



КонсультантПлюс

"МР 1.2.0329-23. 1.2. Гигиена, токсикология, санитария. Методические рекомендации по оценке кардиотоксического действия наночастиц на организм. Методические рекомендации"
(утв. Главным государственным санитарным врачом РФ 26.06.2023)

Документ предоставлен **КонсультантПлюс**

www.consultant.ru

Дата сохранения: 19.02.2024

Утверждаю
Руководитель Федеральной службы
по надзору в сфере защиты прав
потребителей и благополучия человека,
Главный государственный
санитарный врач
Российской Федерации
А.Ю.ПОПОВА
26 июня 2023 г.

1.2. ГИГИЕНА, ТОКСИКОЛОГИЯ, САНИТАРИЯ

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ОЦЕНКЕ КАРДИОТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ НАНОЧАСТИЦ НА ОРГАНИЗМ

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ МР 1.2.0329-23

I. Область применения

1.1. Настоящие методические рекомендации (далее - МР) определяют унифицированные методические подходы к оценке кардиотоксического действия наночастиц (далее - НЧ) в экспериментальном исследовании на лабораторных животных. Полученные результаты являются основанием для принятия управленческих решений по возможности использования НЧ, уточнению регламентов и технологии применения, ограничению применения, оптимизации условий труда работающих.

1.2. МР разработаны с целью обеспечения единой научно обоснованной системы гигиенической оценки безопасности для работников металлургической промышленности и других отраслей, в которых производятся, используются и образуются наночастицы и наноматериалы, а также людей, проживающих вблизи источников наночастиц и наноматериалов, загрязняющих окружающую среду.

II. Общие положения

2.1. В МР под наноразмерными частицами, или НЧ, понимаются такие частицы, линейный размер которых не превышает 100 нм. К наноматериалам относятся объекты, один из линейных размеров которых составляет менее 100 нм.

2.2. Кардиотоксичность НЧ - это свойство химических веществ в форме НЧ вызывать структурно-функциональные нарушения в сердечно-сосудистой системе (далее - ССС).

2.3. Многие токсиканты, в том числе в виде частиц нанометрового диапазона, обладают кардиотоксическим действием, что является одним из факторов риска возникновения заболеваний ССС. Согласно данным Всемирной организации здравоохранения (статистика о ведущих причинах смертности и инвалидности во всем мире за период 2000 - 2019 г.) болезни сердца остаются лидирующей причиной смертности во всем мире уже 20 лет [26]. С 2000 г. число случаев смерти от сердечно-сосудистых заболеваний возросло на 2 миллиона и в 2019 г. достигло почти 9 миллионов. На долю болезней сердца приходится 16% всех случаев смерти в мире [25].

2.4. Полная оценка риска здоровью от влияния НЧ включает комплексный подход к изучению кардиотоксического действия, начиная с молекулярно-биологических, токсикологических тестов и специальных кардиологических исследований, позволяющих провести адекватную оценку их воздействия на состояние ССС. Полный перечень экспериментальных исследований включает неинвазивную регистрацию электрокардиограммы (далее - ЭКГ), артериального давления (далее - АД), ультразвуковое исследование сердца животных [15], изучение изолированного сердца методами Лангендорфа и Нилли [4, 11, 12], оценку сократительной функции миокарда in vitro на препаратах изолированных мышц сердца (трабекулах и папиллярных мышцах) [13] и изолированных кардиомиоцитах [21], гистоморфометрическую

оценку сердца и сосудов, исследование биохимических показателей крови и характеристик сердечного миозина (соотношение тяжелых цепей миозина, скорость скольжения тонкого филамента по миозину) [14, 16, 20], экспрессию генов [6].

2.5. МР содержат описание методов исследования кардиотоксичности НЧ для организма с применением в качестве тест-объекта мелких лабораторных грызунов - крыс.

III. Планирование токсикологического эксперимента

3.1. Начальным этапом перед проведением токсикологического эксперимента является поиск литературных данных о кардиотоксическом действии исследуемых НЧ. Для анализа литературных данных используются экспериментальные исследования (in vitro, in vivo), а при наличии - и эпидемиологические.

3.2. Для оценки кардиотоксического действия НЧ на организм используются различные пути их поступления (например, ингаляционный, внутрибрюшинный, желудочный, интратрахеальный, интраназальный, внутримышечный, внутривенный).

3.3. В рамках каждой экспериментальной модели сравниваемые группы лабораторных крыс формируются рандомизированной выборкой из общего стада и содержатся в одинаковых контролируемых условиях, а исследования на них проводятся параллельно. Выбираются сопоставимые по виду, полу, возрасту и количеству крысы в группах. В сравниваемые группы входят сопоставимые по виду, полу, возрасту и количеству крысы. Рекомендуемая минимальная численность крыс в каждой группе - 6 особей, желательная - 10 - 12 особей. Отклонение по исходной массе тела крыс в группе не превышает $\pm 20\%$ от средней массы в группе.

3.4. Для оценки сдвигов показателей состояния ССС, вызванных интоксикацией НЧ, используется сравнение с величинами, измеренными в группе контрольных крыс. Группе контрольных крыс вводится деионизированная вода или среда, которая используется для приготовления наносuspензий, тем же объемом, какой вводится опытным крысам в соответствии с методическими документами <1>.

<1> Методические рекомендации "Постановка экспериментальных исследований по изучению характера комбинированного действия химических веществ с целью разработки профилактических мероприятий", утвержденные заместителем Главного государственного санитарного врача СССР 06.12.1985 N 4050-85; [ГОСТ 32647](#) "Комбинированные исследования хронической токсичности и канцерогенности", введенный [приказом](#) Госстандарта от 06.10.2014 N 1274-ст.

3.5. Для оценки влияния НЧ на ССС рекомендуется использовать моделирование интоксикации умеренной степени выраженности, которая проводится и оценивается в соответствии с методическими документами <2>.

<2> [МУ 1.2.2520-09](#) "Токсиколого-гигиеническая оценка безопасности наноматериалов", утвержденные руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации 05.06.2009 (далее - МУ 1.2.2520-09); [МУ 1.2.2635-10](#) "Медико-биологическая оценка безопасности наноматериалов", утвержденные руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации 24.05.2010 (далее - МУ 1.2.2635-10).

При подборе доз или концентраций для проведения исследований по оценке кардиотоксичности НЧ рекомендуется использовать данные:

- общетоксическое действие изучаемых НЧ, имеющиеся в научной литературе (при наличии использовать данные о характере зависимости "доза-эффект");

- установленные LD₅₀ или LC₅₀;

- механизмы кардиотоксического действия токсикантов, входящих в состав изучаемых НЧ, но в ионной форме, а также частиц химических аналогов микроразмерного диапазона;

- результаты предварительного пилотного эксперимента при однократном изолированном введении НЧ. По результатам такого пилотного эксперимента выбирается та доза или концентрация, при которой обнаруживаются изменение состояния организма (при оценке сдвигов базовых функциональных показателей), но при этом не развивается клиническая картина тяжелой интоксикации <3>.

<3> [МУ 1.2.2520-09](#); [МУ 1.2.2635-10](#).

3.6. Комплексную оценку изменений ССС после экспозиционного периода рекомендуется осуществлять на разных уровнях организации живого организма (от молекулярного до системно-органо), но не менее чем по двум категориям:

- для оценки изменений у крыс ССС на системно-органном уровне неинвазивно регистрируются ЭКГ, по которой анализируется частота сердечных сокращений (далее - ЧСС), амплитуды зубцов Р, R, Т, продолжительность интервалов RR, PQ, QT, QRS, и параметры АД, где отмечается систолическое (далее - САД), диастолическое, среднее, пульсовое АД, минутный объем крови в соответствии с методическими документами <4>. Для минимальной оценки учитываются ЧСС и САД;

<4> Методические указания "Ускоренная оценка действия химических соединений на сердечно-сосудистую систему в эксперименте с целью гигиенического нормирования", утвержденные заместителем Главного государственного санитарного врача СССР 31.12.1987 N 4546-87 (далее - МУ N 4546-87).

- на тканево-клеточном уровне выполняется гистологическая оценка тканей сердца и сосудов с морфометрией (размеры кардиомиоцитов, количество ядер на единицу площади препарата, ядерно-цитоплазматические отношения в миокарде, толщина функциональных слоев стенок сосудов);

- на молекулярном уровне рекомендуется оценивать соотношения тяжелых цепей миозина методом гель-электрофореза в полиакриламидном геле (SDS-ПААГ) либо экспрессию генов семейства CYP1 методом полимеразной цепной реакции (далее - ПЦР) в реальном времени;

- рекомендуется выполнять биохимический анализ сыворотки крови по показателям, характеризующим состояние ССС, например: активность лактатдегидрогеназы (далее - ЛДГ) и ее изоферментов в соответствии с методическими документами <5>, уровень кальция, С-реактивный белок (далее - СРБ), креатинкиназа (далее - КК), креатин-киназа-МВ (далее - КК-МВ), тропонин I, ангиотензинпревращающий фермент (далее - АПФ), миоглобин, натрийуретические пептиды, фактор роста эндотелия сосудов (англ. vascular endothelial growth factor, далее - VEGF), эндотелии-1. Для минимальной оценки рекомендуется выполнять исследование не менее чем по 5 показателям.

<5> МУ N 4546-87.

3.7. Перечень необходимого оборудования для проведения исследований представлен в [приложении 1](#) к настоящему МР.

IV. Статистическая обработка данных

4.1. Данные, полученные для каждой крысы, рассматриваются как статистическая выборка, и, следовательно, каждая группа крыс как набор статистических выборок, для которых комплексное среднее

значение и его стандартная ошибка вычислены с использованием метода объединения выборок, который применяется при проведении мета-анализа данных по уравнению [5, 7].

4.2. Перед оценкой значимости межгрупповых различий выполняется проверка данных на нормальность распределения, после чего сравнение данных опытной и контрольной группы производится с помощью критериев для независимых выборок: t-критерия Стьюдента (при нормальном распределении) и U-критерия Манна-Уитни (при отсутствии нормального распределения). При одновременном сравнении более двух групп крыс рекомендуется применять t-критерий Стьюдента с поправкой на множественные сравнения (при нормальном распределении данных) или критерий Краскела-Уоллиса (при отсутствии нормального распределения).

V. Методология оценки кардиотоксического действия НЧ в эксперименте

5.1. Методы исследования изменений CCC in vivo.

После экспозиционного периода перед эвтаназией оценивается состояние CCC с помощью неинвазивной регистрации ЭКГ и параметров АД.

Чтобы снизить стресс от измерений без наркотизации до проведения измерений выполняется адаптация животных в течение 3 последовательных дней до дня измерений. Крысы помещаются в "домики" на 30 - 60 минут, чтобы привыкнуть находиться в замкнутом пространстве, либо ведется подготовка к регистрации в соответствии с инструкцией к прибору. При необходимости адаптация крыс заменяется на введение наркоза внутримышечно или внутривенно.

Для регистрации ЭКГ крыс помещают в "домики" таким образом, чтобы лапы были расположены на электродах (серебряных пластинах), или в соответствии с положениями, указанными в инструкции к прибору. После 20-минутной адаптации крыс начинается 10 - 15 минутная запись ЭКГ. Далее выполняется анализ записей. На ЭКГ оцениваются следующие показатели: ЧСС, амплитуды зубцов P, R, T, продолжительность интервалов RR, PQ, QT, QRS, вольтаж изоэлектрической линии.

Для регистрации параметров АД животных помещают в цилиндрические фиксаторы для лабораторных крыс на нагревательные платформы. На хвост надеваются измерительные манжеты для регистрации. Измерения проводятся при достижении температуры хвоста крыс плюс 32 - 35 °С. Измеряются и анализируются следующие параметры: систолическое, диастолическое, среднее, пульсовое АД, скорость кровотока и минутный объем крови в хвосте.

5.2. Гистоморфометрическая оценка тканей сердца и аорты.

Для изучения изменений на тканевом уровне проводятся гистологические исследования сердца и аорты в соответствии с методическими документами <6>.

<6> Оценка токсичности и опасности химических веществ и их смесей для здоровья человека: Руководство. М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2014. 639 с.

Тканевые образцы фиксируются в 10% нейтральном формалине, а затем проводятся по изопропиловым спиртам и заливаются в парафиновые блоки. Гистологические срезы окрашиваются гематоксилином-эозином (гематоксилин-карацци, эозин 1% водный раствор), также применяется окраска пикрофуксином, ШИК-реакция и окраска по Рего (для выявления дистрофических и некробиотических повреждений кардиомиоцитов).

Оценка состояния миокарда в разных отделах сердца (правого и левого желудочков, правого и левого предсердий) и аорты проводится на гистологических препаратах оптической микроскопией при увеличениях от х 50 до х 1000 с применением стандартных объективов. При обзорной микроскопии оценивается гистологическая структура ткани в подопытных и в контрольной группах:

- в сердце: размеры кардиомиоцитов, количество ядер на единицу площади препарата, ядерно-цитоплазматические отношения в миокарде, наличие очагов повреждения кардиомиоцитов (исчезновение поперечной исчерченности кардиомиоцитов, изменение содержания гликогена в цитоплазме (ШИК-реакция), наличие цитолиза, очагов опустошения), состояние интерстиции, наличие реактивной клеточной инфильтрации в интерстиции, очагов склероза;

- в аорте: толщина функциональных слоев стенки аорты, толщина стенки, признаки повреждения эндотелия, включения различной природы в стенке аорты, разволокнения фиброэластического каркаса.

Количественная оценка изменений проводится морфометрически с использованием сетки Автандилова и компьютерной программы распознавания образов [1, 2].

5.3. Изучение нарушений на молекулярном уровне.

Для оценки соотношения тяжелых цепей миозин экстрагируется из сердечной ткани разных отделов сердца (предсердия, правый и левый желудочки) крыс всех исследуемых групп. Сердечная ткань каждого отдела в течение 10 минут измельчается в специальном растворе (следующего состава: 2% тритона X-100, 0,5 мМ фенолметилсульфонил флуорида, 5 мМ дитиотреитола (далее - ДТТ), 4 мМ MgCl₂, 1 мМ этиленгликольтетрауксусной кислоты и 20 мМ фосфатного буфера (pH 6,5)) в соотношении 1 : 10 (масса ткани/объем раствора) и выдерживается в холодильнике при температуре плюс 4 °С в течение 10 - 15 минут. Данную смесь центрифугируют при 14500 g в течение 15 минут, и полученный осадок в течение 30 минут экстрагируют в буфере (следующего состава: 1 мМ аденозинтрифосфат, 4 мМ MgCl₂, 1 М KCl, 40 мМ фосфатного буфера (pH 6,5)) в соотношении 1 : 3. Затем смесь с данным буфером центрифугируют в течение 15 минут при 14500 g, а полученный после центрифуги супернатант смешивают с деионизированной водой в соотношении 1 : 10. Этот раствор выдерживается при температуре плюс 4 °С в течение 20 минут. После чего центрифугируется в течение 15 минут при 14500 g, и полученный осадок миозина растворяется в высокоионном буфере (следующего состава: 40 мМ фосфатного буфера, 1 М KCl, 4 мМ MgCl₂ (pH 6,5)) в соотношении 1 : 2. Миозин хранится не более суток до начала эксперимента. Все операции по выделению миозина и его хранение проводятся при температуре плюс 4 °С.

Состав изоформ тяжелых цепей миозина из миокарда разных отделов (предсердий, правого и левого желудочков) сердца крыс определяется с помощью вертикального денатурирующего полиакриламидного гель-электрофореза с додецил сульфатом натрия по методу Reiser & Kline [20, 22] с незначительными модификациями.

Рекомендуется использовать мини-гели размерами 100 x 120 x 0,75 мм. Концентрация полиакриламида составляет 8% для разделяющего (нижнего) геля и 4% - для концентрирующего (верхнего) геля при соотношении акриламида к бисакриламиду - 50 : 1.

Раствор разделяющего геля (следующего состава: 8% полиакриламида 50 : 1, 0,375 М буфера трис(гидроксиметил)аминометан-гидрохлорида (англ. Tri (Hydroxymethyl) Amino Methane Hydrochloride, далее - Tris-HCl) pH 8,8, 10% глицерола, 0,1% додецил сульфата натрия (англ. sodium dodecyl sulfate, далее - SDS), 0,1% персульфата аммония (англ. Ammonium persulfate, далее - APS), и 0,07% тетраметилэтилендиамина (англ. Tetramethylethylenediamine, далее - TEMED), деионизированная H₂O (до объема 10 мл)) заливается в установку из чистых стекол, сверху добавляется 120 мкл изопропанола для выравнивания и во избежание испарения геля. Полимеризация происходит в течение 30 - 40 минут.

Раствор концентрирующего геля (следующего состава: 4% полиакриламида 50 : 1, 0,14 М буфера Tris-HCl pH 6,8, 10% глицерола, 0,25% SDS, 6 мМ этилендиаминтетрауксусной кислоты, 0,1% APS, 0,01% TEMED, деионизированная H₂O (до объема 4 мл)) заливается в установку поверх предыдущего геля с предварительной промывкой от изопропанола, сверху вставляются специализированные "гребенки" для создания "кармашков". Полимеризация концентрирующего геля происходит в течение 20 - 30 минут.

Пробы миозина растворяются в буфере для образцов следующего состава: 625 мМ Tris-HCl pH 6,8, 15 мМ ДТТ, 1% SDS, 0,01% бромфенолового голубого красителя, 15% глицерола. Концентрация миозина в буфере составляет 0,1 мг/мл. В каждый кармашек загружается по 3 - 7 мкл полученного раствора. Перед погружением в кармашки раствор белка нагревается в течение 3 минут при температуре плюс 85 °С.

Для проведения электрофоретического разделения используется специальный буфер для электрофореза (следующего состава: 50 мМ трис(гидроксиметил)аминометана, 75 мМ глицина, 0,05% SDS и 0,07% β -меркаптоэтанола) против того же буфера, разведенного в два раза. Электрофорез проводится при постоянном напряжении 100 мВ в течение 40 минут и далее при 160 мВ в течение 6 часов при температуре плюс 8 °С. Также используется альтернативный вариант при постоянной силе тока 15 мА в течение 40 минут, и затем 25 мА в течение 3 часов при температуре плюс 8 °С.

По окончании электрофореза гель промывается водой трижды по 5 минут. Окрашивание проводится с помощью краски Кумасси. Далее гель отмывается в растворе, содержащем 20% этилового спирта и 10% уксусной кислоты. Затем гель сканируется с помощью денситометра и определяется процентное соотношение α - и β -тяжелых цепей миозина в пробе.

Экспрессия генов определяется в соответствии с методикой, описанной Ansari с соавторами [6].

5.4. Биохимическое исследование крови.

В рамках комплексной оценки состояния ССС в сыворотке крови определяются следующие показатели: активность ЛДГ и ее изоферментов <7>, уровень кальция, тропонин I, миоглобин, натрийуретические пептиды, VEGF, концентрация эндотелина-1, АПФ, СРБ, КК-МВ.

<7> МУ N 4546-87.

Определение активности ЛДГ и ее изоферментов, уровня кальция, АПФ, СРБ, КК-МВ может выполняться на биохимическом анализаторе с использованием соответствующих коммерческих наборов. Другие показатели измеряются вручную с применением готовых тест-систем иммуноферментного анализа.

VI. Оценка кардиотоксического действия НЧ в экспериментальном исследовании

6.1. На кардиотоксическое действие НЧ указывают изменения показателей в опытной группе относительно контрольной. Учитываются имеющиеся литературные данные и оцениваются показатели не менее, чем на двух уровнях организации живого организма. Литературные данные и изменения, полученные в эксперименте, оцениваются в соответствии с табл. 1.

Таблица 1

Оценка кардиотоксического действия НЧ в экспериментальном исследовании

N	Показатели	Возможное состояние признака	Балл
1	2	3	
Литературные данные			
1	Литературные данные о кардиотоксичности НЧ в экспериментах in vitro	Данные об изменениях в культуре кардиомиоцитов или изолированных кардиомиоцитах	0,5
		Данные об изменениях в культуре клеток стенок сосудов или в изолированных сосудах	0,5
2	Литературные данные о	Исследования на холоднокровных	0,5

	кардиотоксичности НЧ в экспериментах in vivo	Исследования на теплокровных (учитываются изменения, не входящие в перечень ниже)	0,5
3	Эпидемиологические данные о кардиотоксичности НЧ	Данные о кардиотоксическом действии исследуемых НЧ на человека	2
Методы исследования изменений ССС in vivo			
4	Показатели электрокардиограммы	Показатели не отличаются от контрольной группы	0
		Статистически значимо отличаются от контрольной группы 1 - 2 показателя	2
		Статистически значимо отличаются от контрольной группы более 2 показателей	4
5	Показатели АД	Показатели не отличаются от контрольной группы	0
		Статистически значимо отличаются от контрольной группы 1 - 2 показателя	2
		Статистически значимо отличаются от контрольной группы более 2 показателей	4
Гистологические исследования			
6	Гистоморфометрические показатели сердца	Показатели не отличаются от контрольной группы	0
		Статистически значимо отличаются от контрольной группы 1 - 2 показателя	1
		Статистически значимо отличаются от контрольной группы более 2 показателей	2
7	Гистоморфометрические показатели аорты	Показатели не отличаются от контрольной группы	0
		Статистически значимо отличаются от контрольной группы 1 - 2 показателя	1
		Статистически значимо отличаются от контрольной группы более 2 показателей	2
Молекулярные исследования			
8	Характеристика миозина	Показатель не отличается от контрольной группы	0
		Показатель статистически значимо отличается от контрольной группы	3
9	Экспрессия генов семейства СYP	Показатели не отличаются от контрольной группы	0

		Хотя бы 1 показатель статистически значимо отличается от контрольной группы	3
Биохимические исследования			
10	Показатели крови	Показатели не отличаются от контрольной группы	0
		Статистически значимо отличаются от контрольной группы 1 - 2 показателя	1
		Статистически значимо отличаются от контрольной группы более 2 показателей	2

6.2. Заключение о кардиотоксическом действии исследуемого наноматериала производится по сумме полученных баллов в соответствии с табл. 2.

Таблица 2

Оценка кардиотоксического действия НЧ
в экспериментальном исследовании

Сумма баллов	Значение
0	НЧ не обладают кардиотоксическим действием
0,5 - 5,5	НЧ обладают умеренным кардиотоксическим действием
6 - 24	НЧ обладают выраженным кардиотоксическим действием

VII. Отчетность

7.1. В протокол об исследовании рекомендуется включать описание исследуемых НЧ, дизайн исследования, литературный обзор, результаты в виде таблиц и рисунков, анализ результатов и заключение. Рекомендуемая форма и пример заполнения протокола представлены в [приложениях 2 - 3](#) к настоящему МР.

Приложение 1
к МР 1.2.0329-23

ОБОРУДОВАНИЕ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЙ <8>

<8> Примечание: допускается использование оборудования, комплектующих и расходных материалов с аналогичными или лучшими техническими характеристиками.

1. В [табл. 1.1 - 1.5](#) приведены перечни приборов для проведения исследований по оценке кардиотоксического действия наночастиц на организм.

Таблица 1.1

Перечень приборов для неинвазивной регистрации ЭКГ и АД

Наименование средств измерения	Обозначение и наименование документов, технические характеристики
Система для неинвазивной регистрации ЭКГ крыс (минимум в 2 отведениях) с программным обеспечением (далее - ПО) для регистрации и анализа	-
Система для неинвазивного измерения АД у крыс (систолического, диастолического, среднего) с ПО для регистрации и анализа	-
Инфракрасный термометр для измерения температуры хвоста крыс	-

Таблица 1.2

Перечень приборов для гистоморфометрических исследований

Наименование средств измерения	Обозначение и наименование документов, технические характеристики
Гистологическая заливочная станция (с поддержанием температуры от комнатной до плюс 90 °С, шаг 1 °С)	-
Гистологический ротационный микротом (с диапазоном толщины среза 0,5 - 600 мкм)	-
Оптический медико-биологический микроскоп с цветной фотокамерой и ПО с увеличением от х 50 до х 1000	ГОСТ 28489

Таблица 1.3

Перечень приборов для молекулярных исследований

Наименование средств измерения	Обозначение и наименование документов, технические характеристики
1	2
Гистологическая заливочная станция (с поддержанием температуры от комнатной до плюс 90 °С, шаг 1 °С)	-
Гистологический ротационный микротом (с диапазоном толщины среза 0,5 - 600 мкм)	-

Оптический медико-биологический микроскоп с цветной фотокамерой и ПО с увеличением от х 50 до х 1000	ГОСТ 28489
Высокоскоростная центрифуга с охлаждением (до 30000 об/мин, контроль температуры от минус 20 °С до плюс 40 °С)	-
"Холодовая комната" (от плюс 2 °С до плюс 23 °С)	-
Низкотемпературный морозильник (минус 80 °С)	-
Лабораторный генератор льда	-
Ячейки и источник питания для гель-электрофореза	-
Сканирующий денситометр для документирования и анализа гелей, блотов и пленок	-
Система ПЦР с оптической детекцией в реальном времени	-

Таблица 1.4

Перечень приборов для анализа сыворотки крови

Наименование средств измерения	Обозначение и наименование документов, технические характеристики
Автоматический биохимический анализатор со встроенным ПО для определения ферментов, субстратов, липидов, электролитов, специфических белков в крови	-
Спектрофотометр со встроенным ПО, предназначенный для работы с микропланшетами	-

Таблица 1.5

Общелабораторное оборудование

Наименование средств измерения	Обозначение и наименование документов, технические характеристики
Вычислительная техника: компьютеры, периферийное оборудование и программное обеспечение для регистрации и анализа данных	-
Термостат	-
Секундомер	ГОСТ 8.423
Лабораторная центрифуга (скорость не менее 3000 об./мин)	-
Центрифуга на 12 мест для пробирок типа "Эппендорф" 1,5 - 2,0	-

мл (скорость не менее 3000 оборотов/минуту)	
Двухкамерные холодильники лабораторные (плюс 4 °С, минус 20 °С)	-
Весы для взвешивания крыс	ГОСТ Р 53228
Весы лабораторные высокого класса точности - до 5-го знака	ГОСТ Р 53228
рН-метр	-
Дозаторы, автоматические пипетки	ГОСТ 28311
Пинцеты	ГОСТ 21241
Скальпели	ГОСТ 21240
Ножницы	ГОСТ 21239
Штативы для пробирок 1,5/2, 15 мл	-
Посуда мерная лабораторная	ГОСТ 1770
Посуда лабораторная стеклянная	ГОСТ 25336
Одноразовая пластиковая лабораторная посуда и расходные материалы: (например, пластиковые пробирки, сменные наконечники к дозаторам, пробирки типа "Эппендорф")	-

Приложение 2
к МР 1.2.0329-23

(рекомендуемый образец)

Пример протокола
оценки кардиотоксического действия НЧ _____ в экспериментальном
исследовании

1.1. Характеристика исследованных НЧ:

Параметр	Характеристика НЧ
Химическая формула НЧ	
Размер, нм	
Форма	

Концентрация НЧ	
Растворитель	

1.2. Дизайн проведенных исследований
1.3. Литературный обзор
1.4. Полученные результаты
1.5. Анализ данных
1.6. Заключение По результатам проведенных исследований в соответствии с настоящими МР НЧ _____ (не) обладают кардиотоксическим действием.
1.7. Исполнители:

Должность, ученая степень, ученое звание				ФИО (выполненные работы)
		(подпись)		

Приложение 3
к МР 1.2.0329-23

(рекомендуемый образец)

Пример протокола
об оценке кардиотоксического действия НЧ оксидов свинца
и кадмия в экспериментальном исследовании

1.1. Характеристика исследованных НЧ:

Параметр	Характеристика НЧ	
Химическая формула НЧ	PbO	CdO

Размер, нм	49,6 ± 16,0 нм	57,0 ± 13,0 нм
Форма	Сферическая	Сферическая
Концентрация НЧ	0,5 мг/мл	0,5 мг/мл
Растворитель	Деионизированная вода	Деионизированная вода

1.2. Дизайн проведенных исследований.

Субхроническую интоксикацию моделировали на нелинейных белых крысах путем внутрибрюшинных инъекций суспензий исследуемых НЧ отдельно или в комбинации 3 раза в неделю в течение 6 недель (всего 18 введений). Разовые дозы: PbO - 2,5 мг/кг массы тела, CdO - 0,25 мг/кг массы тела.

1.3. Литературный обзор.

В исследовании Elgharabawy с соавторами [9] было обнаружено, что белые крысы, получавшие внутривенно НЧ PbO в течение 4 недель, продемонстрировали по сравнению с контролем заметное увеличение гемодинамических параметров (систолического, диастолического, среднего АД, частоты сердечно-сосудистых сокращений), биохимических показателей сыворотки крови (лактатдегидрогеназы, креатинкиназы, креатинкиназы-МВ) и маркеров окислительного стресса (снижение каталазы, супероксиддисмутазы, восстановленного глутатиона и увеличение тиобарбитуровой кислоты в тканях сердца), а также изменения в гистологической картине сердца.

1.4. Полученные результаты.

Рис. 2.1 иллюстрирует снижение АД после воздействия НЧ оксидов свинца и кадмия. При отсутствии значимых изменений частоты ССС гипотоническое воздействие НЧ различной природы может указывать на повреждение сосудистого русла за счет проникновения и накопления НЧ в клетках сосудов, а также прямого повреждения эндотелия, повышения оксидативного стресса и развития воспаления. На снижение АД помимо указанных причин также может влиять изменение соотношения вазоконстрикторов и вазодилататоров, представленное на рис. 2.2.

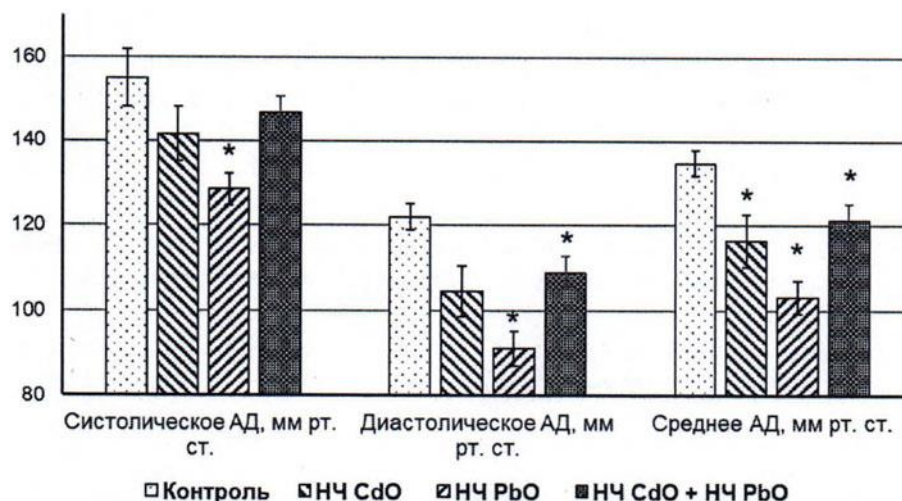


Рис. 2.1. Снижение параметров АД после субхронического внутрибрюшинного воздействия суспензиями НЧ PbO и НЧ CdO

Примечание: * - статистически значимое отличие от контроля; данные представлены в виде $\bar{X} \pm S_x$.

Было показано снижение мощных вазоконстрикторов - эндотелина-1 и АПФ (рис. 2.2 а, б). Избыток эндотелина-1 может вызывать повышение АД, а его недостаток - снижать, за счет снижения сосудистого сопротивления [17]. Было показано, что острое воздействие ацетата свинца на крыс увеличивает активность АПФ и индуцирует экспрессию ангиотензина II [24]. Sharifi с соавторами [23] показали, что сывороточная и локальная активность АПФ повышены на ранней стадии интоксикации свинцом. Тем не менее, хроническое воздействие свинца подавляет активность АПФ в тканях и сыворотке крови. В наших экспериментах активность АПФ снижалась после субхронического воздействия НЧ PbO, что соответствует второй фазе влияния свинца на АПФ, а также является косвенным подтверждением поражения кардиомиоцитов. АПФ продуцируется эпителиальными клетками легких и сердца с преимущественной локализацией на фибробластах и эндотелиальных клетках сосудов [27].

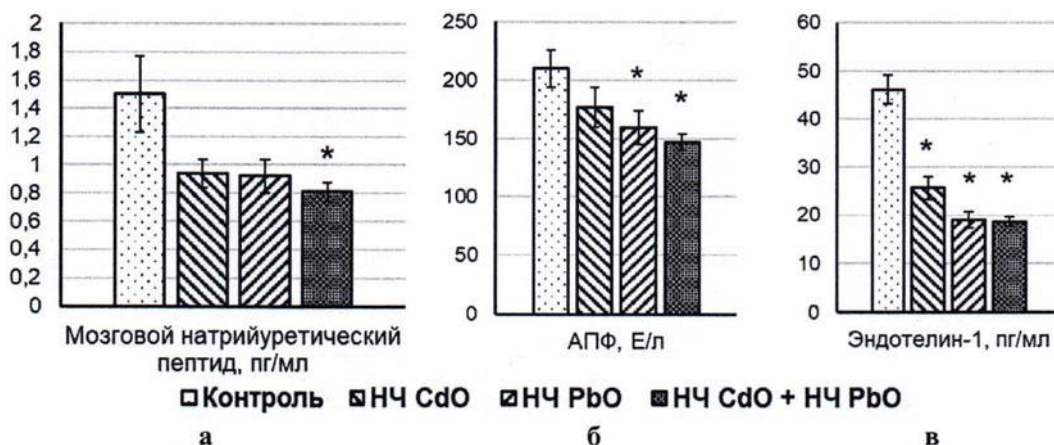


Рис. 2.2. Снижение вазоактивных веществ в крови после субхронического внутрибрюшинного воздействия суспензиями НЧ PbO и НЧ CdO

Примечание: * - статистически значимое отличие от контроля: а) мозгового натрийуретического пептида, пг/мл; б) АПФ, Е/л; в) эндотелина-1, пг/мл; данные представлены в виде $\bar{X} \pm S_x$.

Мозговой натрийуретический пептид, основным эффектом действия которого является вазодилатация [19], также был снижен. Основное место его секреции - кардиомиоциты желудочков сердца [3]. Снижение мозгового натрийуретического пептида и толщины кардиомиоцитов (рис. 2.3 а) указывает на их токсическое повреждение, которое может быть следствием усиления оксидативного стресса [10] и прямого повреждения кардиомиоцитов НЧ [8, 18].

О повреждении эндотелия также говорит снижение продукции эндотелина-1 (рис. 2.2 в) и толщины эндотелия на гистологических препаратах (рис. 2.3 б).

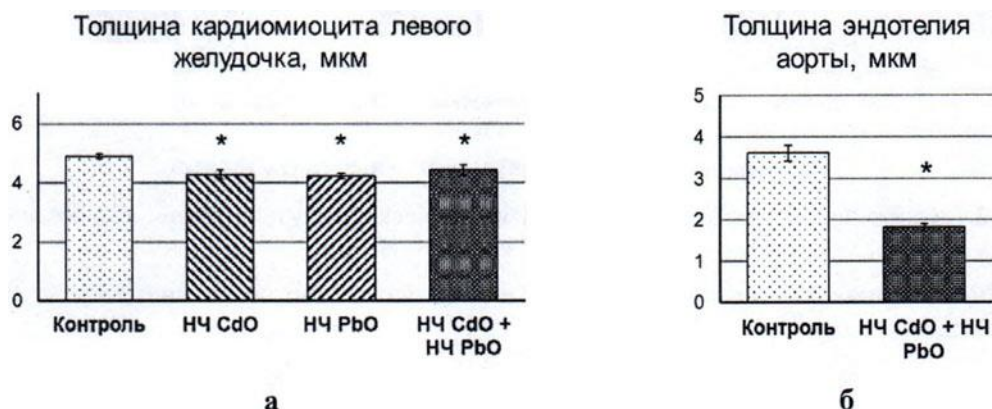


Рис. 2.3. Гистологические изменения в сердце и аорте крыс после субхронического внутрибрюшинного воздействия суспензиями НЧ PbO и НЧ CdO

Примечание: * - статистически значимое отличие от контроля: а) снижение толщины кардиомиоцита, мкм; б) снижение толщины эндотелия, мкм; данные представлены в виде $\bar{X} \pm S_x$.

На молекулярном уровне (рис. 2.4) показано увеличение медленно-циркулирующих β -тяжелых цепей миозина, что коррелирует со снижением скорости скольжения тонкого филамента по миозину и ростом временных параметров сокращения изолированных мышечных препаратов и может служить предвестником развития сердечной недостаточности.

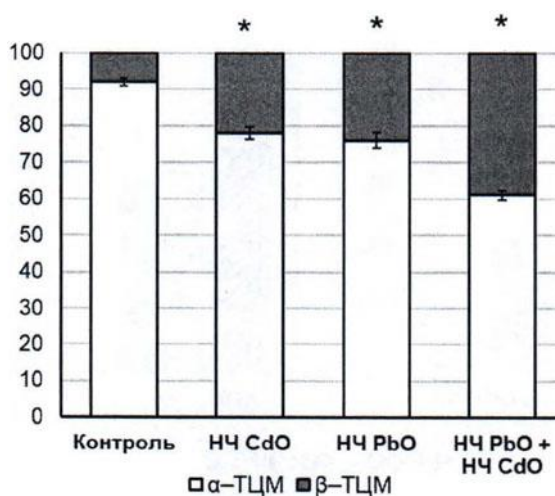


Рис. 2.4. Молекулярная характеристика миокарда крыс после внутрибрюшинного воздействия суспензиями НЧ PbO и НЧ CdO

Примечание: * - экспрессия α - и β -тяжелых цепей миозина (ТЦМ), %; данные представлены в виде $\bar{X} \pm S_x$.

1.5. Оценка кардиотоксических эффектов исследуемых НЧ:

N	Показатели	Балл		
		PbO	CdO	PbO + CdO
Литературные данные				
1	Литературные данные о кардиотоксичности НЧ в экспериментах in vitro	-	-	-
2	Литературные данные о кардиотоксичности НЧ в экспериментах in vivo	0,5	-	-

3	Эпидемиологические данные о кардиотоксичности НЧ	-	-	-
Методы исследования изменений CCC in vivo				
4	Показатели электрокардиограммы	0	0	0
5	Показатели АД	2	1	2
Гистологические исследования				
6	Гистоморфометрические показатели сердца	1	1	1
7	Гистоморфометрические показатели аорты	-	-	1
Молекулярные исследования				
8	Характеристика миозина	3	3	3
9	Экспрессия генов семейства CYP	-	-	-
Биохимические исследования				
10	Показатели крови	2	1	2
Итого		8,5	6	9

1.6. Анализ данных.

Несмотря на отсутствие статистически значимых изменений на ЭКГ, НЧ оксидов свинца и кадмия изолированно и в комбинации привели к явным изменениям множества показателей на разных уровнях организации живого. По сумме баллов в соответствии с [табл. 2](#) НЧ оксидов свинца и кадмия изолированно и в комбинации обладают выраженным кардиотоксическим действием.

1.7. Заключение.

По результатам проведенных исследований в соответствии с настоящими МР НЧ оксидов свинца и кадмия как изолированно, так и в комбинации обладают выраженным кардиотоксическим действием.

НОРМАТИВНЫЕ И МЕТОДИЧЕСКИЕ ДОКУМЕНТЫ

1. Федеральный [закон](#) от 30.03.1999 N 52-ФЗ "О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения".
2. [СанПиН 3.3686-21](#) "Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней".
3. [СанПиН 2.1.3684-21](#) "Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических)

мероприятий".

4. Р 1.2.3156-13 "Оценка токсичности и опасности химических веществ и их смесей для здоровья человека".

5. [МУ 4.2.2039-05](#) "Техника сбора и транспортирования биоматериалов в микробиологические лаборатории".

6. [МУ 1.2.2520-09](#) "Токсиколого-гигиеническая оценка безопасности наноматериалов".

7. [МУ 1.3.2569-09](#) "Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы".

8. [МУ 1.2.2635-10](#) "Медико-биологическая оценка безопасности наноматериалов".

9. Методические указания "Ускоренная оценка действия химических соединений на сердечно-сосудистую систему в эксперименте с целью гигиенического нормирования", утвержденные заместителем Главного государственного санитарного врача СССР 31.12.1987 N 4546-87.

10. Методические рекомендации "Постановка экспериментальных исследований по изучению характера комбинированного действия химических веществ с целью разработки профилактических мероприятий", утвержденные заместителем Главного государственного санитарного врача СССР 06.12.1985 N 4050-85.

11. [ГОСТ 1770](#) "Посуда мерная лабораторная стеклянная. Цилиндры, мензурки, колбы, пробирки. Общие технические условия".

12. [ГОСТ 32647](#) "Комбинированные исследования хронической токсичности и канцерогенности".

13. [ГОСТ 8.423](#) "Государственная система обеспечения единства измерений (ГСП). Секундомеры механические".

14. [ГОСТ 25336](#) "Посуда и оборудование лабораторные стеклянные. Типы, основные параметры и размеры".

15. [ГОСТ 21240](#) "Скальпели и ножи медицинские. Общие технические требования и методы испытаний".

16. [ГОСТ 21241](#) "Пинцеты медицинские. Общие технические требования и методы испытаний".

17. [ГОСТ 22340](#) "Аквадистилляторы медицинские электрические. Общие технические требования и методы испытаний".

18. [ГОСТ 19908](#) "Тигли, чаши, стаканы, колбы, воронки, пробирки и наконечники из прозрачного кварцевого стекла. Общие технические условия".

19. [ГОСТ 28489](#) "Микроскопы световые. Термины и определения".

20. [ГОСТ 21239](#) "Ножницы. Общие требования и методы испытаний".

21. [ГОСТ Р 53228](#) "Весы неавтоматического действия. Часть 1. Метрологические и технические требования".

22. [ГОСТ 28311](#) "Дозаторы медицинские лабораторные. Общие технические требования и методы испытаний".

Методические рекомендации разработаны ФБУН "Екатеринбургский медицинский научный центр профилактики и охраны здоровья рабочих промпредприятий" Роспотребнадзора (д.м.н., профессор

[Б.А. Кацнельсон](#), к.б.н. С.В. Клинова, д.б.н. И.А. Минигалиева, д.м.н. М.П. Сутункова, д.м.н. В.Б. Гурвич, д.м.н., профессор Л.И. Привалова, Ю.В. Рябова, Д.Р. Шаихова); ФГБОУ ВО "Уральский государственный медицинский университет" Минздрава России (к.м.н., доцент И.Е. Валамина); ФГБУН "Институт иммунологии и физиологии Уральского отделения Российской Академии наук" (д.б.н. Л.В. Никитина, к.б.н. О.П. Герцен, к.б.н. С.Р. Набиев).
