

1.2. ОБЩИЕ ВОПРОСЫ. ГИГИЕНА,
ТОКСИКОЛОГИЯ, САНИТАРИЯ

**Подходы к проведению хронических
ингаляционных экспериментов
с наноразмерными аэрозолями
на мелких лабораторных животных**

Методические рекомендации
МР 1.2.0151—19

Издание официальное

Москва • 2019

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

1.2. ОБЩИЕ ВОПРОСЫ, ГИГИЕНА,
ТОКСИКОЛОГИЯ, САНИТАРИЯ

**Подходы к проведению хронических
ингаляционных экспериментов
с наноразмерными аэрозолями на мелких
лабораторных животных**

**Методические рекомендации
МР 1.2.0151—19**

ББК 51.24

П44

П44 **Подходы** к проведению хронических ингаляционных экспериментов с наноразмерными аэрозолями на мелких лабораторных животных: Методические рекомендации.—М.: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 2019.—10 с.

ISBN 978–5–7508–1709–2

1. Разработаны ФБУН «Екатеринбургский медицинский-научный центр профилактики и охраны здоровья рабочих промпредприятий» Роспотребнадзора (В. Б. Гурвич, Б. А. Кацнельсон, М. П. Сутункова, С. Н. Соловьёва, Л. И. Привалова, И. А. Минигалиева, С. В. Клинова, В. О. Рузаков).

2. Утверждены руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации А. Ю. Поповой 15 августа 2019 г.

3. Введены впервые.

ББК 51.24

ISBN 978–5–7508–1709–2

Содержание

I. Область применения	4
II. Общие положения	4
III. Основные типы и ключевые параметры ингаляционной экспозиции и принципы мониторинга этих параметров	5
IV. Основные способы генерации НЧ-аэрозолей для подачи в ингаляционную установку	7
V. Продолжительность ингаляционных экспериментов	8
VI. Показатели эффекта ингаляционного воздействия НЧ-аэрозолей	9

УТВЕРЖДАЮ

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

А. Ю. Попова

15 августа 2019 г.

**1.2. ОБЩИЕ ВОПРОСЫ. ГИГИЕНА,
ТОКСИКОЛОГИЯ, САНИТАРИЯ**

**Подходы к проведению хронических ингаляционных
экспериментов с наноразмерными аэрозолями
на мелких лабораторных животных**

**Методические рекомендации
МР 1.2.0151—19**

I. Область применения

1.1. Настоящие методические рекомендации (далее – МР) определяют подходы к проведению хронических ингаляционных экспериментов с наноразмерными аэрозолями на мелких лабораторных животных (крысы, мыши, морские свинки или хомяки) для экспериментально-гигиенической оценки аэрозолей, способных загрязнять воздух рабочей зоны, а также непроизводственных помещений и окружающую атмосферу.

1.2. МР определяют основные характеристики воздействия наноразмерных аэрозолей и применяемого оборудования.

1.3. МР предназначены для научных организаций Роспотребнадзора, а также могут быть использованы организациями, осуществляющими эксперименты с наноразмерными аэрозолями.

II. Общие положения

2.1. Экспериментальное изучение токсичности и опасности веществ в нано-состоянии проводится в связи с развитием производства и использования наноматериалов, а также в связи с аэрозольным загрязнением воздуха рабочей зоны и атмосферы населённых мест другими технологическими процессами (например, металлургии сталей, ферроспла-

вов, цветных металлов и их сплавов, электродуговой сварки, лазерной обработки металлов), которые включают существенную фракцию частиц наноразмерного диапазона (далее наночастиц – НЧ).

2.2. Информация о действии НЧ на организм может быть получена с помощью экспериментальных моделей, таких как разовое и повторное внутрибрюшинное, внутрижелудочное и интратрахеальное введение мышам или крысам водных НЧ-суспензий с заданными геометрическими и физико-химическими характеристиками (чаще относится к НЧ элементарных веществ (металлов или металлоидов) и их оксидам, т. к. такие НЧ могут образовывать промышленные аэрозоли (п. 2.1).

2.3. К наиболее актуальным задачам, для решения которых хронические ингаляционные эксперименты могут считаться методом выбора, относятся:

а) характеристика кинетики накопления НЧ в лёгких и в других органах и выведения из организма при умеренной или низкоуровневой ингаляционной экспозиции, наиболее близкой к реальным условиям воздействия НЧ-аэрозолей на человека;

б) оценка эффективности защитных и интенсивности патологических механизмов реакции организма на такие воздействия;

в) уточненное обоснования безопасных для здоровья уровней воздействия НЧ-аэрозолей на человека (предельно допустимые концентрации).

2.4. Геометрические и физико-химические характеристики воздействующих НЧ и основные параметры воздействия не могут быть стандартными, а выбираются исходя из конкретных задач каждого исследования, но с учётом общих принципов, рассматриваемых ниже.

III. Основные типы и ключевые параметры ингаляционной экспозиции и принципы мониторинга этих параметров

3.1. Для решения задач, перечисленных в п. 2.3, необходимо обеспечить точный и одинаковый уровень НЧ-воздействия на всех мелких лабораторных животных подопытной группы и исключить возможность поступления НЧ в организм этих животных неингаляционным путем, не поддающимся количественному учету (например, в результате слизывания с загрязненной щётки).

Рекомендуется использование ингаляционных систем типа «только нос» (как, например, в экспериментах с полидисперсной пылью), обеспечивающих наиболее надежное поступление НЧ в организм животных. Недостатком таких систем является иммобилизационный стресс и

возможность развития связанных с ним побочных эффектов или усиления реальных эффектов действия ингалируемых НЧ. В связи с этим требуется:

а) обязательная одновременная «ложная экспозиция», то есть посадка животных контрольной группы в «пеналы» – ограничители подвижности идентичной ингаляционной установки, питаемой равным по объёму потоком чистого воздуха;

б) ограничение времени разовой экспозиции (не более 4 часов).

3.2. При решении задач, требующих более длительной разовой или непрерывной экспозиции (например, для обоснования безопасного содержания НЧ в атмосферном воздухе городских и сельских поселений), должны использоваться ингаляционные системы (камеры) типа «всё тело», но при обязательном индивидуальном размещении животных внутри таких камер по решетчатым ячейкам, не иммобилизующим их, но исключающим возможность скучивания.

3.3. Конструкция установки типа «только нос» (наиболее часто, но не обязательно – цилиндрическая «башня» с многоярусным расположением по её окружности патрубков, к которым подключаются «пеналы» с животными), а также её аэродинамические характеристики и объёмы воздуха, подаваемого в общее рабочее пространство и удаляемого из него, должны обеспечить:

а) быстрое достижение равновесного уровня заданной концентрации НЧ;

б) совпадение её (по усреднённым величинам) во всех точках подсоединения животных как по вертикали, так и по окружности;

в) небольшое отрицательное давление в рабочем пространстве, препятствующее выбиванию НЧ из него в лабораторное помещение.

Режим эксплуатации установки, обеспечивающий соответствие всем названным требованиям, отрабатывается перед началом каждого конкретного эксперимента.

3.4. Аналогичные требования (с поправкой на конструктивные различия между ингаляционными установками разных типов) предъявляются и к системам «всё тело».

3.5. В процессе проведения эксперимента на мелких лабораторных животных в предварительно выбранных репрезентативных точках рабочего пространства установки должны непрерывно отбираться аспирационные пробы НЧ на фильтры, тип которых, как и методы измерения массы и геометрических характеристик задержанных НЧ (формы, распределения по размерам), выбираются с учётом химической природы и физических свойств этих НЧ. Концентрации НЧ в воздухе могут изме-

ряться в массо-объёмных единицах измерения (мг/м^3), числом НЧ в единице объёма воздуха (мл). Рекомендуется наличие в системе автоматического измерителя счётной концентрации НЧ, показания которого позволяют оперативно оценивать стабильность работы установки.

3.6. Должен быть обеспечен контроль концентрации НЧ, а также автоматический контроль температуры и влажности воздуха в пределах, являющихся физиологическими для данного вида мелких лабораторных животных.

IV. Основные способы генерации НЧ-аэрозолей для подачи в ингаляционную установку

4.1. В тех случаях, когда целью исследования является решение задач, перечисленных в п. 2.3, применительно к конкретному веществу, специально производимому в форме НЧ с заданными характеристиками, исходным аэрозоль-образующим материалом должен служить порошок именно этого материала. Такой материал загружается в генератор, действующий по принципу механического взмучивания частиц порошка в потоке воздуха. Также генератор используется для ресуспандирования в потоке воздуха НЧ из реальных образцов пыли, отобранных в конкретном металлургическом или ином производстве (п. 2.1). Повторность загрузки генератора, интенсивность механического воздействия, скорость воздушного потока, необходимость и способ последующего освобождения, НЧ-аэрозоля полученного от крупных частиц и его разбавления чистым воздухом определяются эмпирически на этапе отработки режима работы ингаляционной системы.

4.2. В тех случаях, когда целью исследования является более общее решение задач, перечисленных в п. 2.3, в рамках развития теоретических основ профилактической нанотоксикологии, или уточнение токсикологической характеристики какого-либо конкретного вида НЧ для оценки рисков, создаваемых смешанными промышленными аэрозолями, в составе которых этот вид НЧ (в особенности элементарно-оксидных) обнаруживается в разных количествах, рекомендуется использовать генерирование НЧ непосредственно экспериментально-ингаляционной установкой, которое обеспечивает ингаляционное воздействие на животных не вторичного, а только что образованного в ходе этого воздействия «свежего» НЧ-аэрозоля, то есть позволяет моделировать реальную аэрогенную НЧ-экспозицию человека в производственных условиях с той степенью неизбежной агрегации и изменения поверхности НЧ, которая имеет место в этих условиях.

4.3. Конкретные способы этого генерирования экспериментального НЧ-аэрозоля (например, расплавление и испарение сверхчистого металла при высокой температуре или при электроискровом разрушении в инертной газовой среде с последующей конденсацией НЧ и их окислением в потоке холодного воздуха; высокотемпературное разложение паров подходящего элементоорганического соединения с теми же последующими стадиями) имеют в основе те же физические и химические процессы, которые приводят к образованию НЧ в металлургических и сварочных производствах.

V. Продолжительность ингаляционных экспериментов

5.1. Общая продолжительность хронического ингаляционного воздействия НЧ-аэрозолей в эксперименте определяется при его планировании в соответствии с поставленными задачами. В этом случае рекомендуемые сроки должны рассматриваться как минимальные, если имеются основания для проведения более длительных экспериментов.

Так, например, если учесть, что средняя продолжительность жизни крысы равна 30 месяцам, типичный хронический ингаляционный эксперимент, длящийся 4 месяца, то есть всего 13 % от этой продолжительности, слишком краток в сопоставлении с трудовым периодом человека даже в производствах с вредными условиями труда (в Российской Федерации около 50 % средней продолжительности жизни). К тому же указанная в п. 3.1 4-часовая максимальная длительность разовой экспозиции животных в системах «только нос» намного короче даже сокращённого рабочего дня, что дополнительно занижает суммарную хроническую экспозицию в эксперименте по сравнению с реальной. Поэтому рекомендуется проведение хронических ингаляционных экспериментов продолжительностью до 10—12 месяцев (в данный срок не входят несколько недель, необходимых для предварительной адаптации животных к спокойному пребыванию в «пенале»). Если ставится задача выявления канцерогенного действия, то этот срок должен быть удлинён.

5.2. Необходимо учитывать, что динамическое равновесие между первичным отложением НЧ при дыхании, транслокацией НЧ внутри организма и элиминацией из него (с «плато накопления») может достигаться быстрее, чем при действии частиц микрометрового диапазона, причём неодинаково быстро для НЧ разных размеров и разной химической природы. В пределах вышеуказанного общего периода ингаляционной НЧ-экспозиции необходимо предусмотреть не менее одного, а по возможности, и больше промежуточных сроков выведения из эксперимента животных как для определения у них задержки НЧ в лёгких и

других органах-мишенях и содержания НЧ (или соответствующего химического элемента) в моче и кале, так и показателей состояния организма (глава 6). В те же сроки аналогичные исследования проводятся у животных, выводимых из контрольной («ложная экспозиция») группы.

VI. Показатели эффекта ингаляционного воздействия НЧ-аэрозолей

6.1. Содержание НЧ (или соответствующего химического элемента) в лёгких и других органах-мишенях, а также в выделениях должно определяться высокочувствительными методами: прежде всего, различными вариантами атомно-адсорбционной (далее – ААС) и атомно-эмиссионной спектроскопии (далее – АЭС), а для веществ, являющихся парамагнетиками – также по спектру электронного парамагнитного резонанса (далее – ЭПР). Применение обоих подходов рекомендуется потому, что суммарное накопление элемента в органе (определяемого при ААС или АЭС) обуславливается не только химическим веществом, образующим НЧ и определяемым методом ЭПР (использование которого возможно для веществ, являющихся парамагнетиками), но и свободными или вторично связанными ионами, образующимися при всегда происходящем более или менее активном растворении НЧ в биологических средах. Дополнительную информацию о накоплении НЧ в органах и тканях и их внутриорганной локализации (включая внутриклеточную) можно получить с помощью трансмиссионной и сканирующей электронной микроскопии.

6.2. Показатели распределения НЧ в организме, указанные в п. 6.1, оцениваются при исследовании:

лёгких;

трахеобронхиальных лимфоузлов;

основных органов вторичного накопления любых НЧ, проникших в кровотока (печень, селезёнка);

головного мозга, в ольфакторную зону которого НЧ, первично отложившиеся в носовых ходах, перемещаются перинеурально;

в почках как органе выделения растворившихся НЧ;

в других органах, токсическое поражение которых специфично для рассматриваемого НЧ-образующего химического элемента или представляет особый интерес в свете задач эксперимента.

В этих же органах рекомендуется качественное и морфометрическое изучение гистопатологических нарушений, выявляемых при световой и электронной микроскопии.

6.3. Важную роль играет проведение через сутки после завершающей НЧ-экспозиции бронхоальвеолярного лаважа (БАЛ) с оценкой цитологических и биохимических показателей сдвигов в получаемой жидкости (БАЛЖ).

6.4. В набор функциональных критериев оценки состояния организма лабораторного животного и отдельных его систем входят интегральные и специфические показатели. Сдвиги интегральных показателей отражают стресс-обусловленные нарушения гомеостаза. Специфичность показателей отражает особенности действия конкретного НЧ-образующего химического элемента (например, нарушений порфиринового обмена и кроветворения при действии свинецсодержащих НЧ). Относительно специфичными являются также некоторые эффекты, как правило, выраженные при действии НЧ, но менее выраженные или не выявляемые при действии их химических аналогов микрометровых размеров. К ним относятся общепризнанные показатели гепатотоксичности, спленотоксичности и нефротоксичности, а также полиорганной генотоксичности, которые свойственны практически всем НЧ (судя по данным большого числа субхронических экспериментов, основанных на повторных внутрибрюшинных инъекциях).

**Подходы к проведению хронических ингаляционных экспериментов
с наноразмерными аэрозолями на мелких лабораторных животных**

**Методические рекомендации
MP 1.2.0151—19**

Компьютерная верстка Е. В. Ломановой

Подписано в печать 25.12.19

Формат 60x84/16

Тираж 100 экз.

Печ. л. 1,0
Заказ 28

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
ФБУЗ ФЦГиЭ Роспотребнадзора
117105, Москва, Варшавское ш., 19а

Реализация печатных изданий, тел./факс: 8 (495) 633-86-59