



ЎЗБЕКИСТОН RESPУБЛИКАСИ САНИТАРИЯ МЕЪЁРЛАРИ,  
ҚОИДАЛАРИ ВА ГИГИЕНИК НОРМАТИВЛАРИ  
(СанҚМ)



"УТВЕРЖДАЮ"

Главный Государственный  
санитарный врач Р Уз,  
министра здравоохранения  
Б.И.НИЯЗМАТОВ

" 18 " 07 2005 г.

**ТРЕБОВАНИЯ К ОПРЕДЕЛЕНИЮ БЕЗОПАСНОСТИ  
ПИЩЕВОЙ ПРОДУКЦИИ, СОДЕРЖАЩЕЙ ГЕНЕТИЧЕСКИ  
МОДИФИЦИРОВАННЫЕ ИСТОЧНИКИ (ГМИ)**

Санитарно-эпидемиологические правила и нормативы  
СанПиН - № 0185-05

Издание официальное

Ташкент-2005

Составители: Шарипова Н.В., Худайбергганов А.С., Элинская О.Л.,  
Эрнафасов К.Х., Рузиева М.М., Тухтаров Б.Э., Исраилова Г.М.,  
Тураев И.И.

Рецензенты:  
д.м.н., профессор кафедры медицинской  
биологии и генетики 2-ТашГосМИ

П.Х. ХАЛИКОВ.

Зав.лабораторией токсикологии  
и гигиены ЦНИЛ 2-ТашГосМИ  
к.м.н. с.н.с.

Бойко И.Б.

При составлении использованы принципы международной системы «GLP» (Качественной лабораторной практики) Организации экономического сотрудничества и развития (ОЭСР) (1998 г.), Методические указания -МУК РФ 2.3.2.970—00. “Пищевые продукты и пищевые добавки”.

## СОДЕРЖАНИЕ

1.	Область применения	5
2.	Термины и определения	6
3.	Общие положения	6-7
4.	Порядок гигиенической экспертизы, государственной регистрации и перерегистрации пищевой продукции, содержащей генетически модифицированные источники (ГМИ).	7-9
5.	Порядок проведения гигиено –токсикологической оценки безопасности пищевой продукции, содержащей генетически модифицированные источники (ГМИ)	11-21
6.	Специальные методы исследования	21-27
7.	Исследование возможной канцерогенности и влияния на продолжительность жизни	27
8.	Клинические испытания новых видов пищевой продукции, полученной из генетически модифицированных источников	27
9.	Генетическая оценка пищевой продукции, содержащей генетически модифицированные источники (ГМИ)	29

## I. ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

1. 1. Настоящие санитарные правила и нормативы (далее – санитарные правила) разработаны в соответствии с Законами Республики Узбекистан Закон Республики Узбекистан "О государственном санитарном надзоре" от 3 июля 1992 года с изменениями и дополнениями 6 мая 1995 года и 15 апреля 1999 года //Ведомости Верховного Совета Республики Узбекистан. –1992. - №9. -статья 355; Ведомости Олий Мажлиса Республики Узбекистан. –1995. -№6. -статья 118; -1999. -№5. -статья 124), "Об охране здоровья граждан" от 29 августа 1996 года с изменениями и дополнениями от 15 апреля 1999 года //Ведомости Олий Мажлиса Республики Узбекистан. –1996. -№19. -статья 128; -1999. -№5. -статья 124), "О качестве и безопасности пищевой продукции", от 30 августа 1997 года. //Ведомости Олий Мажлиса Республики Узбекистан. –1997. -№9. -статья 239).

1.2. Санитарные правила «Требования к определению безопасности пищевой продукции, содержащей генетически модифицированные источники (ГМИ)» предназначены для органов государственной исполнительной власти, предприятий, организаций, учреждений и иных юридических лиц (далее - организаций), граждан предпринимателей без образования юридического лица, должностных лиц и граждан, деятельность которых осуществляется в области обращения пищевой продукции и сельскохозяйственного продовольственного сырья, для учреждений санитарно-эпидемиологической службы, научных центров, кафедр, осуществляющих токсикологическую и гигиеническую оценку безопасности пищевой продукции.

1.2. Требования, изложенные в настоящих санитарных правилах в отношении пищевой продукции, содержащей генетически модифицированные источники (ГМИ), применяются на этапах экспертизы и регистрации, а также при разработке и постановке их на производство, промышленном производстве, хранении, транспортировании, закупке, ввозе в страну и реализации (далее - при обращении), при разработке нормативной и технической документации, регламентирующей вопросы обращения пищевой продукции, содержащей генетически модифицированные источники (ГМИ).

1.3. Гигиенические требования к веществам, материалам, в том числе вспомогательным и упаковочным, контактирующим с пищевой продукцией, содержащей ГМИ, устанавливаются специальными санитарными правилами и нормами.

### Термины и определения

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

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

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

*Качество пищевой продукции* - совокупность характеристик, которые обуславливают потребительские свойства и пищевую ценность продуктов.

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

*Генная инженерия* – совокупность приемов, методов и технологий, в том числе технологий получения рекомбинантных рибонуклеиновых (РНК) и дезоксирибонуклеиновых (ДНК) кислот, по выделению генов из организма,

*Генная инженерная деятельность* – деятельность, осуществляемая с использованием методов генной инженерии и генно-инженерно-модифицированных организмов.

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

## 2. Общие положения

2.1. Санитарные правила «Требования к определению безопасности пищевой продукции, содержащей генетически модифицированные источники (ГМИ)» устанавливают гигиенические требования по определению безопасности для человека пищевой продукции, содержащей генетически модифицированные источники (ГМИ), а также требования по соблюдению указанных нормативов при разработке нормативной и технической документации на них и их обращения.

2.2. Настоящие санитарные правила разработаны с целью обеспечения единого, научно-обоснованного подхода к оценке безопасности пищевой продукции, содержащей генетически модифицированные источники (ГМИ) на этапах разработки, экспертизы, регистрации и обращения.

2.3. При разработке новых видов пищевой продукции, содержащей генетически модифицированные источники (ГМИ) и их усовершенствовании, ввозе, а также при разработке (изменении) технологических процессов юридическими лицами, осуществляющими разработку, обеспечивается обоснование их соответствия критериям безопасности, срокам годности, требованиям по их соблюдению на этапах обращения, а также методам контроля.

2.4. Разработчик новой пищевой продукции, содержащей генетически модифицированные источники (ГМИ) (или) ее производитель обязаны включить в нормативную и техническую документацию показатели ее качества и безопасности,

гигиенические нормативы, требования по обеспечению указанных нормативов в процессе производства, хранения, транспортирования и реализации продукции, а также требования к ее упаковке и маркировке, сроки годности и методы контроля качества и безопасности продукции.

2.5. Качество и безопасность каждой партии (серии) пищевой продукции, содержащей генетически модифицированные источники (ГМИ) подтверждается производителем в удостоверении о качестве и маркируется соответствующим образом.

2.6. Постановка на производство (ввоз) пищевой продукции, содержащей генетически модифицированные источники (ГМИ) допускается только после разрешения Министерства здравоохранения республики Узбекистан и проведения регистрации в соответствии с настоящими правилами и процедурой, устанавливаемой Министерством здравоохранения Республики Узбекистан.

2.7. Постановка на производство (ввоз) пищевой продукции, содержащей генетически модифицированные источники (ГМИ), допускается только при наличии:

- токсиколого-гигиенической экспертизы и регистрации пищевой продукции полученной из ГМИ в ДГСЭН МЗ Р Уз;
- экологической экспертизы материалов запланированного производства Госкомприродой Р Уз;

2.8. Импортируемая на территорию Республики Узбекистан пищевая продукция, содержащая генетически модифицированные источники (ГМИ) должны отвечать требованиям действующих в Республике Узбекистан санитарных правил и гигиенических нормативов, если иное не оговорено международными соглашениями.

2.9. Организации, осуществляющие производство и поставку импортируемых на территорию Республики Узбекистан пищевой продукции, содержащей генетически модифицированные источники (ГМИ), обязаны зарегистрировать их в соответствии с настоящими правилами.

2.10. Не допускается реклама пищевой продукции, содержащей генетически модифицированные источники (ГМИ), не прошедшей Государственную регистрацию в Министерстве здравоохранения Республики Узбекистан.

### **3. Порядок гигиенической экспертизы, государственной регистрации и перерегистрации пищевой продукции, содержащей генетически модифицированные источники (ГМИ).**

3.1. Проведение гигиенической экспертизы и регистрации пищевой продукции, содержащей генетически модифицированные источники (ГМИ) осуществляется в соответствии с настоящими правилами и в порядке, установленном Министерством здравоохранения Республики Узбекистан.

3.2. Гигиеническая экспертиза и регистрация пищевой продукции, содержащей генетически модифицированные источники (ГМИ) включает следующие процедуры:

- первичную экспертную оценку документов и материалов, характеризующих данную продукцию;
- определение потребности в проведении необходимых исследований;
- экспериментальные токсикологические, гигиенические и медико-биологические исследования;
- проведение комплекса необходимых санитарно-химических, санитарно-микробиологических и других видов исследований, в соответствии с требованиями СанПиН Р Уз за № 0138-03;
- комплексную экспертную оценку результатов с учетом полученных в ходе исследований данных;
- оформление регистрационного удостоверения на пищевой продукции, содержащей генетически модифицированные источники (ГМИ), присвоение номера, включение в реестр.

3.3. Для проведения работ по гигиенической экспертизе и регистрации пищевой продукции, содержащей генетически модифицированные источники (ГМИ) ее производитель, поставщик или полномочный представитель предоставляют следующие документы:

- заявку установленной формы с указанием полных реквизитов производителя или поставщика;
- акт отбора проб установленной формы, в котором указывается дата, место отбора образцов, их количество, наименование продукции, юридический адрес предприятия-изготовителя, дата производства, фамилии, должности и подписи лиц, отбиравших образцы;
- при наличии посредника - доверенность от производителя на проведение работ по регистрации пищевой продукции, содержащей генетически

модифицированные источники (ГМИ) с указанием получателя регистрационного удостоверения и его владельца;

- образцы пищевой продукции, содержащей генетически модифицированные источники (ГМИ) в количестве, определенном действующим порядком экспертизы. В случае проведения токсикологических или клинических испытаний количество необходимых образцов определяется дополнительно.

3.4. Для пищевой продукции, содержащей генетически модифицированные источники (ГМИ), производимых в Узбекистане, представляются:

- нормативная или техническая документация (технические условия, технологическая инструкция, рецептура), оформленная в соответствии с установленными требованиями;

- пояснительная записка, описывающая пищевую продукцию, содержащей генетически модифицированные источники (ГМИ), область ее применения, рекомендации по применению, противопоказания, ограничения по применению при их наличии;

- потребительская этикетка или ее проект, заверенный производителем;

- материалы (оригинальные и литературные для аналогов) по токсиколого-гигиенической и медико-биологической оценке пищевой продукции, содержащей генетически модифицированные источники (ГМИ);

- санитарно-гигиеническая характеристика производства, выданная центром Госсанэпиднадзора по месту производства.

3.5. Для импортируемой пищевой продукции, содержащей генетически модифицированные источники (ГМИ) представляются:

- результаты генной идентификации, определенной лабораторией генетики;

- сертификаты качества и безопасности фирмы-изготовителя, содержащие данные о показателях безопасности, ингредиентный состав и его характеристику, сроки годности, условия хранения;

- потребительская этикетка или ее проект, заверенная производителем;

- материалы (оригинальные и литературные для аналогов) по токсиколого-гигиенической и медико-биологической оценке, протоколы или заверенные копии результатов испытаний, в которых указаны учреждения, проводившие эти испытания, схема проведения испытаний и результаты в сравнении с контрольной группой;

- гигиенический сертификат, в котором указывается, что производство данной продукции осуществляется в соответствии с национальными и/или международными требованиями (требования GMP - Good manufacture practice, стандартам Международной организации стандартизации - ISO 9000, 9001, 9002) или Сертификата национальных и/или международной («EuroNett») организаций о соответствии производства стандартам ISO 9000—9002. Декларация фирмы изготовителя о соответствии производства указанным выше требованиям ISO может быть представлена в виде специальных знаков на бланках фирмы.

Все материалы представляются в оригинале или нотариально заверенные копии в переводе на узбекский или русский языки.

3.6. Учреждение (организация) для проведения токсикологических исследований на безопасность определяется ДГСЭН МЗ Р Уз в зависимости от вида, состава ГМИ и исследовательских направлений научных центров и лабораторий.

3.7. Оценка пищевой продукции, содержащей генетически модифицированные источники (ГМИ) по санитарно-химическим показателям безопасности осуществляется аттестованными МЗ Р Уз и аккредитованными в установленном порядке органами государственного санитарно-эпидемиологического надзора при гигиенической сертификации, после проведения токсикологических исследований и разрешения МЗ Р Уз.

3.8. В случае отсутствия или непредставления необходимых документов, о наличии в составе пищевой продукции, содержащей генетически модифицированные источники

(ГМИ) неразрешенных в Республике Узбекистан компонентов и лекарственного сырья, содержащих сильно- действующих компонентов, являющихся лекарственными средствами в терапевтических дозах, может быть принято решение об отказе в регистрации.

3.9. Экспертиза пищевой продукции, содержащей генетически модифицированные источники (ГМИ), предназначенных для детей первых трех лет жизни не производится, в связи с необходимостью ограничения его применения детьми.

3.10. По итогам экспертизы уполномоченным учреждением госсанэпидслужбы Республики Узбекистан готовится регистрационное удостоверение или мотивированный отказ в адрес заявителя.

3.11. В случае обращения по поводу перерегистрации пищевой продукции, содержащей генетически модифицированные источники (ГМИ), связанного с изменением или увеличением числа фирм-поставщиков, ДГСЭН МЗ Республики Узбекистан в порядке, установленном Минздравом Республики Узбекистан, выдается документ, подтверждающий право поставки и реализации данной продукции на территории Республики Узбекистан. Вышеуказанный документ выдается только при наличии доверенности от фирмы-изготовителя, подтверждающей права фирмы-поставщика на распространение данного вида продукции.

3.12. При выдаче «Регистрационного удостоверения» на отечественный вид пищевой продукции, содержащей генетически модифицированные источники (ГМИ), уполномоченное учреждение госсанэпидслужбы Республики Узбекистан направляет информацию в территориальный центр Госсанэпиднадзора по месту его производства (разработки) для осуществления Госсанэпиднадзора за соблюдением установленных требований при обращении.

#### **4. Порядок проведения гигиено -токсикологической оценки безопасности пищевой продукции, содержащей генетически модифицированные источники (ГМИ)**

4.1. Токсикологическая оценка безопасности пищевой продукции, содержащей генетически модифицированные источники (ГМИ) проводится в соответствии с настоящими правилами, с учетом принципов Международной системы «GLP» (качественной лабораторной практики), принятых ФАО/ВОЗ в целях повышения качества и законности исследований, используемой для определения безопасности пищевой продукции.

4.2. Термины, касающиеся организации оборудования для исследования.

-средства исследования- персонал, помещения и исполнительные отделы, которые необходимы для проведения неклинических исследований для оценки безопасности для здоровья человека. Для исследований, которые проводятся в нескольких местах, средствами исследования считаются те, где находится Директор исследования;

-место проведения исследования - это место, где проводятся фазы исследований;

-управляющий средствами исследования – человек ( люди), который имеет полномочия и ответственность за проведение , организацию и функционирование средств исследования;

-спонсор- лицо, которое полномочно, поддерживает и/или представляет на рассмотрение неклинические исследования по оценке безопасности для здоровья человека и окружающей среды;

- главный научный сотрудник - лицо, которое на всех участках исследования действует от имени Директора и несет ответственность за порученную стадию исследования. Ответственность Директора исследования за всеобщее проведение исследования не может быть передано Главному Научному Сотруднику. Это включает в себя одобрение плана исследований и его корректировка, одобрение заключительного отчета и обеспечение соблюдения всех Принципов токсикологических исследований;



-программа по контролю за качеством - определенная система, включая персонал, которая независима от проведения исследования и предназначена для обеспечения соответствия управления средствами исследования;

- стандарты Проведения Процедур - процедуры, зафиксированные в документах, где описывается проведение исследований или какая-нибудь другая деятельность, но не определенная детально в плане или в стандартах по исследованию;

- главное расписание - это собранная информация для содействия в применении рабочей нагрузки и планирования в исследованиях средств исследований;

-неклинические исследования оценки безопасности для здоровья человека и окружающей среды- эксперимент или множество экспериментов, в которых объект исследуется в лабораторных условиях или в простой среде для получения данных о его качествах и безопасности, и предназначенного для соответствующего регулятивного органа;

-план исследования - документ, в котором определяются объекты и экспериментальное расписание проведения их исследования, а также поправки к ним;

-изменение плана исследования - намеренное изменение или поправка в план после его принятия;

-отклонение от плана исследования - непреднамеренное отклонение от плана исследования после его принятия;

-система исследования – медико-биологические, физические или химические системы или их комбинация, используемая в исследовании;

-первичные данные - вся документация и все сообщения по средствам исследования в оригинале или их утвержденные копии, которые являются результатом первичных наблюдений и деятельности исследования. Например, гистоморфологические препараты органов и тканей экспериментальных животных, фотографии, микрофильмы, наблюдения, данные от автоматической аппаратуры, а также средства хранения данных на период, который определен ниже;

-образец - материал, состоящий из одной системы исследования для проверки, анализа или сохранения;

-экспериментальная начальная дата - дата, где начало проведения исследования зафиксировано;

-экспериментальная последняя дата - последняя дата, при которой были собраны данные об исследовании;

-вступительная дата исследования - дата, при которой Директор исследования подписал план исследования;

-завершающая дата исследования - дата, при которой Директор исследования подписывает заключительный отчет (доклад);

-объект исследования - предмет исследования;

-вспомогательный объект - предмет предназначаемый для обеспечения сравнения с основным объектом исследования;

-партия - определенное количество или множество объектов исследования или вспомогательных объектов, полученных за периода производства, которые должны иметь одинаковые свойства и соответствовать своему назначению.

#### 4.3. Схема токсикологической оценки безопасности пищевой продукции, содержащей генетически модифицированные источники (ГМИ) у экспериментальных животных

Вид животных	Линейные или беспородные белые крысы самцы (дополнительно – крысы самки)
Продолжительность эксперимента	не менее 6 месяцев для крыс
Количество групп животных	3

Описание экспериментальных групп	1-ая (контроль-1) -крысы на протяжении эксперимента находятся на общевивар-ном или полусинтетическом рационе 2-ая (контроль-2) – крысам в рацион включается аграммированное количество изучаемой продукции, полученной традиционным способом 3-я (опыт) – крысам в рацион включается аграммированное количество изучаемой продукции, полученной из генно-модифицированного источника
Содержание животных	по 5 в клетке
Количество забоев	2 (через 1 и 6 месяцев от начала эксперимента)
Количество крыс в группе на начало эксперимента	Ориентировочно, с учетом возможной гибели, 36
Исходная масса крыс	60—80 г при формировании групп разница средней массы крыс не должна превышать 3 г
Количество крыс в группе, взятых на исследование при забое	8

4.3.1. Экспериментальные рационы. Общевиварный рацион крыс (на 1 крысу массой 130—240 г)

Ингредиент	масса, г	белок, г	жир, г	углеводы, г	ккал
Подсолнечник (семена) овес	3,7 10,3	0,76 1,03	1,9 0,63	0,114 4,9	22,1 25,8
Хлеб 2 сорта пшеничный	4	0,34	0,05	1,83	9,32
Каша пшенная	2,5	0,27	0,34	1,56	10,5
Творог нежирный	2	0,36	0,012	0,036	1,76
Рыбная мука	0,5	0,23	0,027	0	1,17
Мясо 2 к.	4	0,8	0,39	0	6,72
Морковь	8	0,104	0,008	0,67	2,4
Зелень (салат)	8	0,12	0,016	0,25	1,36
Рыбий жир .	0,1	0	0,099	0	0,9
Дрожжи	0,1	0,05	0,01	0,083	0,085
NaCl	0,15				
<b>ИТОГО</b>	<b>43,35</b>	<b>4,06</b>	<b>3,48</b>	<b>9,44</b>	<b>82,12</b>

Рацион, рекомендуемый институтом питания РАМН

Продукты	Вес продуктов в г на 100 г смеси	Вес крыс в граммах						
		40—60	60—90	90—120	120—200	200—280	280—330	свыше
Казеин	24	2,4	3,15	3,58	4,8	5,1	6,0	7,0
Дрожжи*	6	0,6	0,78	0,89	1,2	1,27	1,5	1,5
Крахмал	56	5,6	7,38	8,35	<b>4,2</b>	П,9	14,0	<b>16,0</b>
Масло раст.	5	0,5	0,65	0,74	1,0	1,0	1,2	1,5

Лярд	5	0,5	0,65	0,74	1,0	1,0	1,2	1,5
Солевая смесь**	4	0,4	0,52	0,59	0,8	0,8	1,0	1,0
Витамины ж/р***	1	0,1	0,1	0,12	0,15	0,18	0,19	0,19
Целлюлоза	2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Отруби	8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8

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

\*Состав витаминной смеси на 100 г смеси

Витамины	Количество
В <sub>1</sub> (тиамида-бромид)	500 мг
В <sub>2</sub> (Рибофлавин)	500 мг
В <sub>6</sub> (пиродоксин)	500 мг
Пантотенат кальция	2г800мг
Никотиновая кислота	2г
Фолиевая кислота	20 мг
В <sub>12</sub> (на кончике скальпеля)	4 мг
Викасол	100 мг
Глюкоза (или сахароза, или фруктоза)	93,600 мг (до 100 г)

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

Состав солевой смеси

№пп	Название солей	Формула	г
1	Хлористый натрий	NaCl	58,5
2	Фосфорнокислый калий однозамещенный	KHPO <sub>4</sub>	163,3
3	Сернокислый магний	Mg SO <sub>4</sub> X 7H <sub>2</sub> O	24,1
4	Углекислый кальций	CaCO <sub>3</sub>	160,2
5	Сернокислое железо (закисное)	FeSO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O	11,1
6	Йодистый калий	KJ	0,322
7	Сернокислый марганец	MnSCU x 2H <sub>2</sub> O	1,87
8	Сернокислый цинк	ZnSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	0,230
9	Сернокислая медь	CuSO <sub>4</sub> x 5H <sub>2</sub> O	0,200
10	Хлористый кобальт	CoCh x 6H <sub>2</sub> O	0,010
11	Фтористый натрий	NaF	0,210
12	Алюмокалиевые квасцы	KA1(SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> x I2H <sub>2</sub> O	0,047
		Итого:	420,089

Приготовление жирорастворимых витаминов

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

4.3.2. Исследуемые показатели *Интегральные показатели*

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

*Биохимические показатели*

Биохимические показатели определяются при забое животных.

Показатель	Метод
Сыворотка крови	
Общий белок	Унифицированный метод по биуретовой реакции
Альбумин	Унифицированный метод по реакции с бромкрезоло-вым зеленым
Белковые фракции	Унифицированный метод электрофоретического разделения
Глюкоза	Глюкозооксидазные методы
Мочевина	Унифицированный метод по цветной реакции с диацетилмонооксимом
Креатинин	Унифицированный метод по цветной реакции Яффе
Общие липиды	Турбидиметрический
Холестерин	Унифицированные методы по реакции с уксусным ангидридом или с хлорным железом
Триглицериды	Спектрофотометрические
Минеральный состав	Атомно-абсорбционный
Аланинаминотрансфераза	Спектрофотометрические
Аспаргатаминотрансфераза	Спектрофотометрические
Щелочная фосфатаза	Спектрофотометрические
Глутатионредуктаза глутатионпероксидаза супероксиддисмутаза каталаза	Спектрофотометрические
Продукты ПОЛ (малоновый диальдегид, диеновые конъюгаты)	Спектрофотометрические
а-амилаза	Спектрофотометрические

*Гематологические показатели*

Показатель	Метод
Концентрация гемоглобина	Гемиглобинцианидный
Общее количество эритроцитов	Унифицированный метод подсчета в счетной камере
Гематокритная величина	Унифицированный микрометод (модификация Й. Тодорова)
Среднее содержание гемоглобина в эритроците (ССЭ) (пг)	Расчетный $ССЭ = \frac{\text{конц.гемогл.г}\% \times 10}{\text{эритроциты в млн}}$
Средняя концентрация гемоглобина в эритроците (СКЭ)(%)	Расчетный $СКЭ = \frac{\text{конц.гемогл.г}\%}{\text{гематокритная величина об}\%} \times 100$

Средний объем одного эритроцита (СОЭ) (мю)	Расчетный $COЭ = \frac{\text{гематокритн. величина} \times 10}{\text{эритроциты в млн}}$
Общее количество лейкоцитов, лейкоцитарная формула	<ul style="list-style-type: none"> <li>• унифицированный метод подсчета в счетной камере;</li> <li>• унифицированный метод морфологического исследования форменных элементов крови с дифференцированным подсчетом лейкоцитарной формулы;</li> <li>• приготовление мазков крови унифицированным методом, фиксация и окраска мазков унифицированным методом</li> </ul>

#### 4.3.3. Морфологические исследования

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

Исследуемые органы	Методы
все внутренние органы	Макроскопические исследования при вскрытии на забое
Печень почки селезенка желудок тонкий кишечник семенники поджелудочная железа сердце	<p>1. Обзорные гистологические исследования, окраска срезов органов, полученных с парафиновых блоков, гематоксилином и эозином</p> <p>2. Дополнительные специальные морфологические исследования:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• изучение жировых включений в клетке, окраска Суданом;</li> <li>• выявление жирных кислот с помощью сульфата нильского голубого;</li> <li>• выявление холестерина;</li> <li>• выявление в клетках РНК окрашиванием пиронином и метиловым зеленым;</li> <li>• выявление липофусцина в клетках;</li> <li>• выявление коллагеновых волокон в соединительной ткани;</li> <li>• выявление эластических волокон в соединительной ткани;</li> <li>• морфометрический метод исследований размеров площади гистологических структур и их колебаний в патологии</li> </ul>

#### 4.4. Оценка гигиенических показателей пищевой продукции, содержащей генетически модифицированные источники (ГМИ)

Необходимость проведения тех или иных гигиенических исследований для каждого вида пищевой продукции, полученной из генетически модифицированных источников, определяется экспертом на основании требований, изложенных в СанПиН Р Уз за № 0138-03, с учетом химического состава исходной аналогичной продукции, полученной традиционным способом без использования генной инженерии.

##### 4.4.1. Показатели безопасности

Показатель	Метод определения	Предел обнаружения
Цинк, медь, свинец, кадмий, олово, железо	Атомно-абсорбционный	1 мкг/кг
Ртуть	Колориметрический	10 мкг/кг
Мышьяк	Колориметрический	100 мкг/кг
Пестициды	Газожидкостная хроматография	1 мкг/кг

Углеводороды	Оптические и хроматографические методы (ГЖХ, ВЭЖХ, ХМС)	100 мкг/кг
Патулин	Хроматографический (ТСХ)	10 мкг/кг
Афлатоксин М 1	Хроматографические ТСХ, ВЭЖХ	0,3 мкг/кг 0,02 мкг/кг
Афлатоксин В 1	Хроматографические ТСХ, ВЭЖХ	1 мкг/кг 0,15 мкг/кг
Зеараленон	Хроматографический ТСХ, ВЭЖХ	100 мкг/кг 5 мкг/кг
Дезоксиниваленол	Хроматографический ТСХ ВЭЖХ	200 мкг/кг 50 мкг/кг
Т-2 токсин	Хроматографический ГЖХ	50 мкг/кг
Нитриты	Титрометрический	10 мг/кг
Нитрозамины	Флюориметрический хемиллюминисцентный	1 мкг/кг 0,1 мкг/кг
Остаточные количества антибиотиков	Микробиологический	0,01—0,5 ЕД/г

#### 4.4.2. Показатели пищевой ценности

Показатель	Метод
Общий белок	Определение азота по Кьельдалю с пересчетом на белок
Фракционный состав белков	Молекулярно-ситовая хроматография
Аминокислотный состав белков	Аминокислотный анализатор
Общие липиды	Гравиметрический
Жирно-кислотный состав общих липидов и фракций	ГЖХ-жирных кислот
Фосфолипиды	ВЭЖХ
Стерины и эфиры стериннов	Хромато-масс-спектрометрическое
Углеводы	ВЭЖХ
Крахмал	Поляриметрический ферментативный
Гемицеллюлоза, клетчатка, пектин	ВЭЖХ
Витамин А и каротиноиды	ВЭЖХ
Витамин Е	ВЭЖХ
Витамин Д	ВЭЖХ
Витамин С (аскорбиновая кислота)	Метод визуального титрования 2,6 дихлорфенолиндофенолом
Витамин В <sub>1</sub>	Флуориметрический тиохромный метод
Витамин В <sub>2</sub>	Флуориметрический (титрование рибофлавинсвязывающим апобелком)
Витамин РР	Флуориметрический метод
Витамин В <sub>6</sub>	ВЭЖХ
Витамин В <sub>12</sub>	Радиоиммунологический

Фолиевая кислота	Радиоиммунологический метод конкурентного связывания
Кальций	Визуальное титрование с кальцеином
Фосфор неорганический	Колориметрический
Натрий, калий, магний, железо, цинк, медь, хром, молибден	Атомно-абсорбционный
Селен	Спектрофлюориметрический
Нуклеиновые кислоты	Спектрофотометрический
Флаваноиды	ВЭЖХ хроматофотометрический
Эфирные масла	ГЖХ, ВЭЖХ
Соланин	Спектрофотометрический
Биогенные амины	ВЭЖХ
Дубильные вещества	Титрометрический, колориметрический
Цианогенные глико-зиды	Титрометрический
Фенолкарбоновые кислоты	Спектрофотометрический

#### 4.5. Показатели субстанционных и функциональных свойств пищевой продукции

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

Показатель	Метод определения
Идентификация состава продуктов	Гистологический метод
Растворимость	Спектрофотометрия
Водоудерживающая способность	Метод центрифугирования
Эмульсионная стабильность	Метод центрифугирования
Критическая концентрация геле-образования	Метод термотропного гелеобразования
Жирудерживающая способность	Метод центрифугирования
Конформационная стабильность	Микрокалориметрия
Идентификация аминокислотных остатков	Метод ионопарной ВЖХ
Термодинамические свойства	Метод дифференциальной сканирующей микрокалориметрии
Интегральная гидрофобность	Микрокалориметрия
Реологические свойства водных дисперсий	Вискозиметрия
Аминокислотный состав	ВЖХ
Органолептические свойства жиров: цвет, запах, прозрачность	Квалиметрия
Показатель преломления	Рефрактометрия

Плотность жиров	Денситометрия, гравиметрия
Вязкость жиров	Вискозиметрия
Жирно-кислотный состав	ГЖХ
Йодное число	Воллометрия
Кислотное число	Воллометрия
Число омыления	Воллометрия
Температура клейстеризации крахмала	Вискозиметрия
Размер крахмальных зерен	Оптическая микроскопия
Водоудерживающая способность крахмала	Гравиметрия
Реологические свойства водных дисперсий крахмала	Вискозиметрия
Набухание крахмальных зерен	Оптическая микроскопия
Критическая концентрация гелеобразования крахмала	Метод термотропного гелеобразования
Содержание амилозы и амило-пектина	Спектрофотометрия

4.6. Определение биологической ценности и усвояемости пищевой продукции, содержащей генетически модифицированные источники (ГМИ).

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

#### 4.6.1. Химический метод

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

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

Методы гидролиза белков

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

Определение содержания аминокислот

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



## Расчет аминокислотного сора

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

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

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

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

За величину АС исследуемого белка принимают наименьшее из полученных значений.

## Расчет биологической ценности

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

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

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

$$АСУ = АС \cdot У$$

При этом, если получаемая величина превышает единицу, то значение биологической ценности приравнивается к единице и белок считается полноценным; если расчетная

величина меньше единицы, то она отражает конкретное значение биологической ценности и тип лимитирующей белок незаменимой аминокислоты.

#### 4.6.2. Биологический метод

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

##### Схема экспериментов

1. Животные - линейные белые крысы одного пола с исходной массой тела около - 50 г.
2. Длительность эксперимента - 4 недели: последние 5 дней-обменный период.
3. Содержание животных - индивидуальное в обменных клетках.
4. Опытный (опытные) или контрольный (казеин) белки являются единственным источником азота в корме животных. В случае исследования белка, содержащегося в многокомпонентных пищевых продуктах, при составлении корма учитывается содержание в этих продуктах других пищевых веществ.
5. Корм готовят ежедневно; его потребление и потребление воды не ограничивают.
6. Одноуровневые исследования:
  - количество групп животных - одна контрольная (казеин) и опытная или опытные в зависимости от количества испытуемых образцов белка;
  - число животных в каждой группе - 10;
  - содержание белка в корме 9 % (по калорийности);
  - в случае необходимости расчета истинных значений аминокислотной ценности и усвояемости белков вводится дополнительная группа крыс (10—15 животных), которые содержат в индивидуальных обменных клетках на безбелковой, но энергетически эквивалентной другим диете в течение всего эксперимента.
7. Многоуровневые исследования:
  - количество групп животных - 5 опытных (для каждого исследуемого белка) и 5 контрольных (для казеина);
  - число животных в каждой группе - 10;
  - содержание белка (опытного или контрольного) в корме - 3, 6, 9, 12 и 18 % (по калорийности). Вводится дополнительная группа животных на безбелковой диете.
8. Критерии оценки: масса тела ежедневно (в обменном периоде взвешивание не производится); поедаемость корма (ежедневно, за обменный период отдельно), экскреция азота с калом (за обменный период).
9. Рассчитывают для каждого уровня белка в корме кажущиеся или истинные значения биологической ценности (коэффициент эффективности белка - КЭБ) и усвояемости (У) по следующим формулам.

$MT$

$КЭБ_{каж} = \frac{MT}{B_3};$

$B_3$

$MT+MT_{66}$

$КЭБ_{ист.} = \frac{MT}{B_3};$

$B_3$

где,

$MT$ - привес массы тела за экспериментальный период;

$MT_M$  - потеря массы тела за экспериментальный период, крысами, потреблявшими безбелковую диету;

$B$  - количество потребленного белка за экспериментальный период.

$B_0 - K$

$У_{каж} = \frac{B_0 - K}{B_0};$

$B_0$

$$U_{ист.} = \frac{B_0 - (K - K_{66})}{B_3}$$

где,

$B_0$  - количество потребленного белка за обменный период;

$K$  - количество белка, экскретированного с калом за обменный период;

$K_{66}$  - количество белка, экскретированного с калом за обменный период крысами, потреблявшими безбелковую диету.

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

### 5. Специальные методы исследования

Необходимость проведения тех или иных специальных методов исследования определяется специалистом ДГСЭН МЗ Р Уз.

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

#### *Условия проведения эксперимента*

Исследования проводятся на белых линейных крысах. Животные разбиваются на 3 группы, в каждой группе 10 самцов и 25 самок. Исходная масса самок не менее 180 г, исходная масса самцов не менее 200 г. 1-ая контрольная группа крыс (самцы и самки) получает на протяжении всего эксперимента общевиварный или полусинтетический рацион; 2-ая контрольная группа (самцы и самки) получает общевиварный или полусинтетический рацион с включением исследуемого продукта, полученного традиционным способом в агарированном количестве; опытная группа крыс (самцы и самки) получает общевиварный или полусинтетический рацион с включением аналогичного продукта, полученного из генетически модифицированных источников в том же количестве, что и крысы 2-ой контрольной группы. Животные находятся на этих рационах 30 дней до спаривания, во время спаривания, беременности, лактации. Полученное потомство находится на этих рационах до момента половой зрелости. Исследуются 5 поколений крыс.

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

Для спаривания в клетку к двум самкам подсаживают вечером одного самца, утром осуществляют микроскопирование влагалищных мазков. Первый день беременности определяют по наличию сперматозоидов во влагалищных мазках. По 10 беременных самок из каждой группы забивают на 20-ый день беременности. Плоды извлекают из рогов матки и обследуют визуально для обнаружения видимых аномалий развития, после этого плоды взвешивают. После наружного осмотра плоды каждого помета делят на 2 группы. Одну фиксируют в жидкости Буэна и используют для изучения внутренних органов. Другую фиксируют в 96 %-ном этаноле и используют для изучения состояния скелета (2—3 плода от приплода). Подсчитывают количество желтых тел, количество живых эмбрионов, количество погибших эмбрионов (мест резорбции). Вычисляют общую эмбриональную смертность, смертность эмбрионов до и после имплантации.

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

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

## 5.2. Исследование возможного мутагенного действия

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

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

На подопытных и контрольных животных проводятся исследования:

- цитогенетические исследования метафазным методом в соматических клетках (костный мозг, лимфоциты крови животных);
- изучение генетических изменений в половых клетках методом выявления доминантных летальных мутаций;
- изучение генных мутаций производится по выбору на микроорганизмах или дрозофиле; микробиологические методы используются для первичной оценки на мутагенность. Для этих целей чаще всего используют штаммы микроорганизмов *Salmonella thyphmuri*. В зависимости от характера опыта используются следующие животные:

- Линейные мыши (C57 B1/6 или другие чувствительные к мутагенам), самцы, вес 18—20 г.
- Гибридные мыши, самки, вес 18—20 г.

Для оценки мутагенного действия испытуемого продукта изучают хромосомные aberrации в клетках костного мозга и доминантные летальные мутации (ДЛМ) в половых клетках подопытных и контрольных животных. Цитогенетические исследования проводят метафазным методом. Согласно методу, животных, получавших испытуемый и контрольный продукт, через 24 часа после последнего скармливания забивают (предварительно за 2 часа до забоя вводят внутривенно колхицин для накопления метафаз) и берут костный мозг из 2-х бедренных костей. После гипотенизации клеток в термостате с помощью 0,5 %-ного раствора КС1 и фиксации смесью этанол + уксусная кислота готовят цитогенетические препараты. От каждого животного анализируют 70—100 клеток на стадии метафазы деления ядра. В опытах используют мышей-самцов линии C57 B1/6 в возрасте 2 месяца, весом около 20 г. Считается, что животные этой линии наиболее чувствительны к мутагенам.

Генетические изменения в половых клетках изучают методом выявления доминантных летальных мутаций у мышей-самцов C57 B1/6. Проведение эксперимента сводится к следующему: подопытным и контрольным животным скармливают испытуемый продукт в течение 30 дней. После периода скармливания 15 подопытных и 13 контрольных самцов ссаживают с интактными виргинными самками линии СВА в соотношении 1:2с целью их скрещивания. Подсадка самок к подопытным самцам производится еженедельно на протяжении 3-х недель, что дает возможность оценить действие испытуемого продукта на половые клетки в постмейотическом периоде - сперматиды и зрелые спермин. Отсаженных беременных самок убивают методом смещения шейных позвонков на 15—17 день беременности, вскрывают, подсчитывают число желтых тел, количество живых и мертвых эмбрионов. По этим данным рассчитывают индексы мутагенности: доимплантационную, постимплантационную смертность, индуцированную летальность. В случае необходимости рекомендуется проводить исследования на генные мутации на дрозофиле или микроорганизмах.

Метод исследования генных мутаций в зародышевых клетках дрозофилы, основанный на определении в х-хромосоме самцов дикого типа (Д 32) рецессивных летальных мутаций, передающихся через дочерей самкам второго поколения.

Метод выявления на микроорганизмах мутагенной активности трансгенного продукта, подвергнутого метаболическим процессам в организме млекопитающих (тест Эймса и метод промежуточного хозяина).

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

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

Метод исследования заключается в количественной оценке изменений тяжести протекания системной анафилаксии и уровня циркулирующих сенсибилизирующих антител (субклассов JgG1 + JgG4) у крыс, получающих в составе рациона тестируемый продукт, полученный из генетически модифицированных источников, в сравнении с животными, получающими аналогичный продукт, изготовленный из традиционных источников.

#### Принцип метода

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

Определение включает следующие этапы:

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

#### Животные

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

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

Формируют 2 группы крыс по 25 животных в каждой. Животные 1-й группы получают тестируемый продукт, а животные 2-й группы - контрольный продукт в составе своих рационов. На 1-ый, 3-й, 45-й день опыта крыс в/б сенсибилизируют ОВА, а на 21-й день эксперимента вводят дополнительную («бустерную») дозу антигена, уменьшенную в 10 раз в сравнении с первоначальной. Кормление рационами продолжают до утра 29-го дня эксперимента. Далее крыс помещают в домики для в/в манипуляций и вводят раствор ОВА в/в, после чего оценивают на протяжении 24 ч тяжесть развивающейся реакции анафилаксии. Непосредственно перед введением разрешающей дозы у крыс отбирают 0,1—0,2 мл крови из хвостовой вены для определения уровня специфических антител.

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

## Материалы и оборудование

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

## Приготовление антигена и сенсibilизация

Навеску 10 мг ОВА растворяют в 1,0 мл физиологического раствора (ФР) и добавляют 1,0 мл 10%-ного водного раствора алюмо-калиевых квасцов. На этой стадии раствор должен оставаться прозрачным. После этого добавляют по каплям при перемешивании 0,6 мл водного раствора NaOH 1 моль/л до образования плотного белого осадка. Проверяют pH по универсальному индикатору:  $pH = 5 \pm 1$ . Осадок отделяют центрифугированием 5 мин при 3000 об/мин. Супернатант декантируют, а осадок промывают 10 мл ФР.

Центрифугирование и промывку повторяют 3 раза. Окончательно осадок гидроксида алюминия с адсорбированным ОВА диспергируют в 20 мл ФР.

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

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

Введение разрешающей дозы и оценка тяжести системной анафилаксии.

Перед введением разрешающей дозы ОВА крыс помещают в домики для в/в манипуляций. Хвост животного погружают на 10—15 мин в воду с температурой  $37 \pm 1$  °С. С помощью иглы для в/в введений и шприца типа «туберкулиновый» отбирают 0,2—0,3 мл крови для определения антител. После этого строго в/в вводят разрешающую дозу 5 мг ОВА в 0,5 мл ФР (10 мг /мл ОВА). Внимание! *Подкожное попадание раствора белка не допускается!*

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

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

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

## Имуноферментное определение специфических антител

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

В лунки полистерольных планшет вносят по 1,0 мкг ОВА в 0,1М Na-бикарбонатном буфере pH  $9,7 \pm 0,1$  и оставляют на 16 ч в холодильнике. По окончании адсорбции антигена буфер удаляют путем промывки 0,01 М Na-фосфатным буфером pH  $7,3 \pm 0,1$  с 0,15М NaCl и 0,1 % Твин-20 (Твин-PBS). В лунки на 30 мин вносят по 200 мкл 1 %-ного раствора желатины в Твин-PBS. Отмывку повторяют, после чего вносят в лунки по 100 мкл стандартов крысиных антител к ОВА, очищенных методом аффинной хроматографии, или исследуемых сывороток крови крыс в разведении 1 : 2000. Разведения выполняют на PBS с 0,2 %-ного бычьего сывороточного альбумина (DSA-PBS). Планшеты инкубируют 90 мин при 22 °С со встряхиванием, после чего 5-кратно отмывают Твин-PBS и вносят по 100 мкл кроличьих антител к JgG крысы, конъюгированных с пероксидазой, в разведении 1 : 1000 в BSA-PBS. Инкубацию и отмывку повторяют, после чего проводят реакцию со 100 мкл субстрата 0,04%-ного о-фенилендиамина и 0,04%-ного H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в 0,1 М Na -цитрат-фосфатном буфере pH  $6,00 \pm 0,05$  в течение 10 мин при 37 °С. Реакцию останавливают добавлением 100 мкл 1 М H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> Оптическую плотность измеряют при длине волны 492 нм на фотометре АКИ-Ц-01.

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

#### 5.4. Математическом обработка результатов эксперимента и оценка результата

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

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

$$AI = (I/N) \cdot \sum^N g_i, \text{ где}$$

$N$  - число крыс в группе;

$i$  - номер крысы;

$g$  - тяжесть реакции анафилаксии в баллах.

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

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

$p$  - долевого показатель;  $\arcsin$  - определяется в радианах.

Далее для двух сравниваемых групп №№ 1 и 2 рассчитывают величину  $\chi^2$ -критерия по формуле:

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

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

Различие в тяжести реакции анафилаксии между двумя группами в целом признается достоверным, если достоверно различие хотя бы по одному, из двух вышеуказанных, показателю. Достоверность различий средних значений и дисперсий уровней антител к ОВА в двух группах определяют, соответственно, с использованием Т-теста Стьюдента и F-теста на остаточную дисперсию Фишера. Анализуют подвергают показатели оптической плотности (D<sub>492</sub>) концентрации антител (мг/мл) и десятичного логарифма концентрации антител. Все расчеты выполняют на ЭВМ с использованием стандартного пакета программ EXCEL5.0a.

#### 5.6. Иммунологические исследования

Исследования на крысах

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

Изучаемые показатели	
Показатели гуморального иммунитета	Суммарный уровень иммуноглобулинов и количество иммуноглобулинов различных классов
Показатели клеточного иммунитета	Реакция бласттрансформации лимфоцитов <i>in vitro</i> Реакция торможения миграции лейкоцитов
Неспецифические факторы иммунитета	Система комплемента белки острой фазы лизоцим

#### Исследования на мышах

Исследование иммуномодулирующего действия продукта на гуморальное звено иммунитета

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

#### 5.7. Изучение иммуномодулирующего действия продукта на клеточное звено иммунитета

Изучение иммуномодулирующего действия продукта на клеточное звено иммунитета определяют в реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) к эритроцитам барана. Используются мыши двух оппозитных линий. Испытываемый продукт скармливают мышам в течение 21 дня (опытная группа мышей - 10). После курса скармливания опытной и одной контрольной группе вводят подкожно в межлопаточную область эритроциты барана в дозе 1 млн клеток на мышь в объеме 0,1 мл. Вторая контрольная группа остается интактной. На пятый день всем мышам в подушечку одной задней лапы вводят разрешающую дозу эритроцитов барана в концентрации 1 млрд клеток на мышь в объеме 0,02 мл. В контрлатеральную подушечку лапы в том же объеме - 0,95 %-ный раствор натрия хлорида. Местную воспалительную реакцию оценивают через 18—20 часов путем определения веса опытной и контрольной лапок. Интенсивность местной реакции определяют по индексу реакции.

#### 5.8. Изучение продукта как сенсibiliзирующего агента к продуктам метаболизма организма

Изучение продукта как сенсibiliзирующего агента к продуктам метаболизма организма изучают в тесте чувствительности мышей к гистамину.

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

#### 5.9. Изучение влияния продукта на естественную резистентность мышей к сальмонеллам мышинного тифа

Изучение влияния продукта на естественную резистентность мышей к сальмонеллам мышинного тифа проводят на модели внутр. рибрюшинного заражения мышей линии C57BL/6 десятикратно отличающимися дозами *S.typhimurium* штамм 415. Испытываемый продукт скармливают мышам в течение 21 дня (опытная группа - 30 мышей). Контрольная



группа - 30 мышей. После курса скармливания мышам заражают тремя дозами культуры: от 1000 до 10 микробных клеток на мышь (соблюдая 10-кратный интервал). Наблюдение за животными производится в течение 14 дней. Подсчитывают ЛД50 в опытной и контрольной группе, % гибели животных по каждой дозе и проводят сравнительный анализ результатов.

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

## **6. Исследование возможной канцерогенности и влияние на продолжительность жизни**

Данные исследования проводятся в соответствии с действующими нормативными документами и в установленном порядке.

## **7. Клинические испытания новых видов пищевой продукции, полученной из генетически модифицированных источников**

В клинических исследованиях на добровольцах следует использовать три уровня дозировки:

1. Нормальный диетический уровень - количество пищевого продукта, которое типично потребляется человеком.
2. Максимальный диетический уровень - максимальное количество пищевого продукта, которое может быть использовано для ежедневного потребления в течение длительного срока совместно с другой пищей.
3. Максимально выполнимое введение - максимальное количество пищевого продукта, которое можно употребить в течение короткого срока (обычно ограничивается физиологической вместимостью желудочно-кишечного тракта).

### **7.1. Условия проведения клинических испытаний**

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

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

### **7.2. Оценка органолептических свойств продуктов и их переносимости**

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

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

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

### **7.3. Рекомендуемые биохимические показатели**

- 7.3.1 Сыворотка крови: -Липопропротеиды высокой плотности (по показаниям)

- Общий белок
- Белковые фракции
- Креатинин
- Азот мочевины
- Мочевая кислота
- Тимоловая проба
- Сулемовая проба
- Физические свойства мочи
- Микроскопия осадка мочи
- Малоновый диальдегид (плазма крови)
- Малоновый диальдегид (эритроциты)
- Диеновые конъюгаты (плазма крови)
- Диеновые конъюгаты (эритроциты)
- Глутатионредуктаза
- Глутатионпероксидаза
- Каталаза
- Супероксиддисмутаза
- Отдельные аминокислоты (по показаниям)
- Общий холестерин
- Триглицериды
- Липопротеиды низкой и очень низкой плотности (по показаниям)
- Аполипопротеины А<sub>1</sub> В (по показаниям)
- Содержание витаминов (по показаниям)
- Витамин А и каротиноиды Витамин Е
- Витамин С Витамин РР Витамины группы В
- Глюкоза
- Щелочная фосфатаза
- Аланинаминотрансфераза –
- Аспартатаминотрансфераза
- Амилаза
- Минеральный состав (по показаниям)
- Моча
- Суточный диурез, рН, относительная плотность
- Креатинин
- Азот мочевины
- Белок (по показаниям)
- Глюкоза (по показаниям)
- Реакция на ацетон (по показаниям)

#### 7.4.Рекомендуемые гематологические показатели периферической крови

- Гемоглобин
- Количество эритроцитов
- Цветной показатель
- Содержание лейкоцитов и лейкоцитарная формула
- Фибриноген
- Фибринолитическая активность
- Протромбиновое время

#### 7.5.Рекомендуемые иммунологические показатели

Показатели гуморального иммунитета Количество В клеток, (СД 19.СД го);

Иммуноглобулины основных классов;

Показатели клеточного иммунитета Фенотипирование Т-клеток;

Неспецифический иммунный ответ Компоненты системы комплемента Определение числа фагоцитирующих клеток и фагоцитарного индекса.

Генерация супероксидного аниона нейтрофилами. В качестве дополнительных можно рекомендовать:

1. Проведение исследований на протяжении 6-ти месяцев. В этих исследованиях наблюдают от 100 до 500 добровольцев, потребляющих новый продукт на максимальном диетическом уровне. Контролируют общее состояние добровольцев, физиологические параметры, биохимические показатели крови и т. д.
2. Проведение длительных популяционных исследований, которые позволят оценить долговременные последствия влияния потребления новых продуктов питания на большое количество людей и идентифицировать маленькие субпопуляции (менее чем 0,1 % населения), которые могут иметь особые проблемы с новыми продуктами питания. В

зависимости от природы (характера) продукта питания испытания проводят на 100—300 добровольцах, получающих новые продукты питания на нормальных диетических уровнях в течение 1,5—2 лет. В дополнение к контролю жизненно важных признаков, физиологических параметров, биохимических показателей крови и т. д. также необходимо обеспечить сбор информации относительно влияния этой продукции на деторождение и количество онкологических заболеваний.

## **8. Генетическая оценка пищевой продукции, содержащей генетически модифицированные источники (ГМИ)**

8.1. Необходимость проведения тех или иных исследований по данному разделу и для каждого конкретного вида пищевой продукции, полученной из генетически модифицированных источников, определяется министерством здравоохранения и проводится лабораториями (центрами) Института генетики АН Р Уз (или центрами «Биоинженерия»).

8.2. Методы генетической оценки пищевой продукции, содержащей генетически модифицированные источники (ГМИ) устанавливаются Институтом генетики АН Р Уз и утверждаются Агентством Узстандарт.