

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ СССР

**УПРАВЛЕНИЕ ПО ВНЕДРЕНИЮ НОВЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ
СРЕДСТВ И МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ**

**ВСЕСОЮЗНЫЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
И ИСПЫТАТЕЛЬНЫЙ ИНСТИТУТ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ**

**СБОРНИК
РУКОВОДЯЩИХ МЕТОДИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ
ПО ТОКСИКОЛОГО-ГИГИЕНИЧЕСКИМ
ИССЛЕДОВАНИЯМ
ПОЛИМЕРНЫХ МАТЕРИАЛОВ И ИЗДЕЛИЙ
НА ИХ ОСНОВЕ МЕДИЦИНСКОГО НАЗНАЧЕНИЯ**

Москва 1987

В связи со все увеличивающимся объемом разработок новых материалов и изделий особое значение приобретает разработка экспресс-методов на биологических тест-объектах и тест-системах. Эти методы можно применять в следующих случаях: а) при отборе оптимальных лабораторных образцов материалов и изделий на первом этапе их разработки; б) при оценке различных технологий переработки материалов в изделие; в) при выборе оптимального способа стерилизации изделия; г) при незначительном изменении рецептуры материала; д) при изменении сферы применения хорошо изученного материала.

1. МЕТОДИКА ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ВЫТЯЖЕК ИЗ МАТЕРИАЛОВ НА КУЛЬТУРЕ ТКАНЕЙ

1.1. Этапы исследования, их последовательность:

- приготовление вытяжек из полимерных образцов;
- подготовка тканевых культур для эксплантации;
- собственно токсикологические исследования;
- оценка результатов.

1.2. ОБЪЕМ И МЕТОДЫ ОСНОВНЫХ ЭТАПОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

1.2.1. Приготовление вытяжек из образцов полимерных материалов.

Условия приготовления вытяжек.

Модельная среда: среда 199 для культур тканей.

Соотношение размера образца к объему модельной среды: $1 \text{ см}^2 : 1 \text{ см}^3$ (в случае пленочных материалов) или $1 \text{ г} : 1 \text{ см}^3$ (в случае объемных материалов).

Экспозиция: 24 часа.

Температурный режим экстракции: $+37^\circ \text{C}$.

Обязательным условием является соблюдение стерильности при приготовлении вытяжки.

1.2.2. Подготовка тканевых культур для эксплантации.

Вид животных: белые беспородные крысы любого пола весом 130—150 г.

Группы эксперимента: контрольная (культивированные ткани) и опытная (на третьи сутки культивирования тканей среда

199 заменяется вытяжками из полимерных материалов, приготовленными по п. 1.2.1.). В каждой группе по 30 эксплантаций.

Условия эксплантации.

Животных умерщвляют эфирным наркозом или декапитацией. В стерильных условиях из задней половины спины выделяют фрагменты подкожной клетчатки размером 1×1 см. Кусочки клетчатки переносят в физиологический раствор с добавлением пенициллина или стрептомицина (на 10 см³ раствора 25 мл препарата). Затем промывают тройной порцией физиологического раствора без антибиотика. Исходные кусочки клетчатки расчлняют на отдельные эксплантаты величиной не более 1,5 мм в поперечнике. Эксплантаты переносят в одинаковые по размерам флаконы Карреля с питательной смесью, состоящей из гусиной (петушиной) плазмы и среды 199. На дно каждого флакона равномерно помещают по 4—5 эксплантатов. Добавляют эмбриональный экстракт, приготовленный из 14—16 суточных крысиных зародышей. После формирования твердой фазы во флаконы вносят смесь лошадиной (бычьей) сыворотки и среды 199.

Соотношение ингредиентов в питательной среде составляет: среда 199 — 50%, экстракт зародышей крысы — 10%, плазма крови гуся (петуха) — 20%, лошадиная сыворотка (бычья) — 20% (для флаконов высотой 1 см, диаметром 3,5 см).

Твердую фазу формируют из 4 капель плазмы, 3 капель эмбрионального экстракта; жидкую фазу формируют на 12 капель среды 199 и 8 капель лошадиной (бычьей) сыворотки.

Культуру инкубируют при температуре +37° С, жидкую фазу меняют каждые двое суток.

1.2.3. Способ приготовления плазмы.

Гусиную (петушиную) плазму получают следующим образом. Приготавливают стерильную посуду: центрифужные пробирки на 20 мл, шприцы на 10 мл.

Взрослому гусю за 1 час до забора крови вводят внутримышечно 100 мл 0,025% раствора гепарина в физиологическом растворе (петуху — 40 мл). По истечении указанного времени из подкрыльцовой вены* с помощью иглы с трубкой от одноразовой системы для переливания крови в центрифужные пробирки отбирают 80—100 мл крови. Проводят центрифугирование при 2000—2500 об/мин в течение 20 минут. После этого верхний светлый слой плазмы отбирают с помощью пастеровской пипетки и переносят в химические парафинированные стерильные пробирки. Хранят в холодильнике не более одного месяца.

1.2.4. Получение эмбрионального экстракта.

В стерильных условиях вскрывается самка крысы с 14-16-суточными зародышами, которые извлекаются, промываются

* Примечание: у петуха берут кровь из яремной вены до полного обескровливания.

в физиологическом растворе с антибиотиками (соотношение то же, что и в п. 1.2.2) и затем осторожно помещаются в 20-миллилитровый шприц и выдавливают в колбу. После чего колба с содержимым в течение 30 минут перемешивается на магнитной мешалке, отстаивается в термостате при температуре 37°С 30—40 минут. Верхняя часть содержимого колбы (светлая) осторожно отбирается шприцем и запаивается в ампулы емкостью 10 мл. Ампулы хранят в холодильнике, срок годности — 1 месяц.

1.3. СОБСТВЕННО ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

1.3.1. После эксплантации образцов клетчатки на третьи сутки культивирования в опытных пробах производят замену жидкой фазы (питательной среды) вытяжкой из полимерного материала, приготовленной по п. 1.2.1. (2 мл на каждый флакон).

На 5, 7 и 10 сутки производится вычисление зональной активности роста (А), зональной интенсивности роста (И) и степени дегенерации (Д) клеток.

Наблюдения проводят при проецировании изображения культуры на экран с помощью любого проектора, приспособленного для закрепления флакона Карреля между источником света и оптической системой (например, «Этюд»). Определяют границы компактной, сетевидной зоны и зоны мигрирующих фибробластических элементов. Критерием для выделения этих зон является характер расположения растущих фибробластических элементов.

К компактной зоне относят участки плотного расположения растущих клеток. К сетевидной относят участки расположения анастомозирующих и ветвящихся клеточных тяжей. По вершинам изолированных растущих в твердую фазу питательной среды клеточных тяжей к месту расположения изолированно лежащих клеток определяют зону мигрирующих элементов.

1.3.2. Получение количественных параметров.

С помощью курвиметра определяют общий периметр эксплантата (П экз.), а также его частей, соответствующих каждой зоне роста: периметр компактной зоны роста (П к. з. р.), периметр сетевидной зоны роста (П с. з. р.), периметр зоны мигрирующих элементов (П м. з. р.).

Площадь каждой зоны роста (S к. з. р., S с. з. р., S м. з. р.) определяют планиметрически при помощи миллиметровой бумаги. Затем на основании полученных данных для каждой зоны роста определяют зональную активность роста (А) и зональную интенсивность роста (И) по формулам

$$A = \frac{P_{з.р.}}{P_{экз.}} \quad \text{и} \quad I = \frac{S_{з.р.}}{P_{з.р.}} \text{ (мм}^2\text{)},$$

где Π з. р.— часть периметра эксплантата, соответствующая определенной зоне роста, Π экс.— периметр эксплантата (мм^2);

S з. р.— площадь соответствующей зоны роста (мм^2).

Степень дегенерации клеток оценивается в баллах: отсутствие дегенерации клеток — 1 балл; наличие признаков — 3 балла.

На основе проведенных измерений и расчетов составляется таблица исходных данных (пример представлен в табл. 1.1.).

Показатель гистотоксичности (ПГТ) вычисляют по формуле

$$\text{ПГТ} = \frac{1}{n} \sum A_{ij}^{\text{он}} \left(\frac{\sum I_i^{\text{он}5}}{\sum D_i^{\text{он}5} \sum I_i^{\kappa5}} + \frac{\sum I_i^{\text{он}7}}{\sum D_i^{\text{он}7} \sum I_i^{\kappa7}} + \frac{2 \sum I_i^{\text{он}10}}{\sum D_i^{\text{он}10} \sum I_i^{\kappa10}} \right)$$

где $\frac{1}{n} \sum A_{ij}^{\text{он}}$ — среднее значение в опыте зональной активности роста фибробластов во все наблюдаемые сроки культивирования;

$\sum I_i^{\text{он}5}$ — суммарное значение в опыте средних величин зональной интенсивности роста на 5 сутки культивирования; аналогично: $\sum I_i^{\text{он}7}$ на 7 сутки культивирования; аналогично: $\sum I_i^{\text{он}10}$ на 10 сутки культивирования;

$\sum D_i^{\text{он}5}$ — суммарное значение в опыте среднего значения зональной дегенерации фибробластов на 5 сутки культивирования; аналогично: $\sum D_i^{\text{он}7}$ на 7 сутки культивирования; аналогично $\sum D_i^{\text{он}10}$ на 10 сутки культивирования;

$\sum I_i^{\kappa5}$ — суммарное значение в контроле средних величин зональной интенсивности роста фибробластов на 5 сутки культивирования; $\sum I_i^{\kappa7}$ на 7 сутки и $\sum I_i^{\kappa10}$ на 10 сутки культивирования;

$i=1,3$ — номер столбца таблицы средних значений активности и интенсивности роста фибробластов и их зональной дегенерации на 5 сутки $i=1$; на 7 суток $i=2$ и на 10 суток культивирования $i=2$;

$j=1,3$ — номер строки таблицы средних значений активности роста фибробластов: компактная зона $j=1$, сетчатая зона $j=2$, зона мигрирующих элементов $j=2$;

n — количество данных показателя активности роста фибробластов.

Например, расчет ПГТ для образца, результаты исследования которого представлены в табл. 1.1.

$$\text{ПГТ} = \frac{0,65 + 0,91 + 0,95 + 0,51 + 0,71 + 0,85 + 0,64 + 0,92 + 0,98}{9} \\ = \frac{23,74 + 16,72 + 2 \cdot 18,87}{3 \cdot 35,86 \quad 6 \cdot 49,98 \quad 6 \cdot 84,84} = 0,79 \cdot 0,35 \approx 0,28$$

1.4. ОЦЕНКА РЕЗУЛЬТАТОВ

1.4.1. При уровне значения $\text{ПГТ} \geq 0,72$ полимер характеризуется как нетоксичный; при значениях $0,72 > \text{ПГТ} \geq 0,48$ — малотоксичный, при значениях $0,48 > \text{ПГТ} \geq 0,27$ — умеренно токсичный и при значениях $0,27 > \text{ПГТ}$ — сильно токсичный.

1.4.1.1. Для мало и умеренно токсичных полимерных материалов в дальнейшем проводятся токсикологические исследования на целостном организме животных в соответствии с существующими методическими указаниями для различных групп изделений, утвержденных Минздравом СССР.

1.4.1.2. При получении результатов, характеризующих исследуемый полимерный материал как сильно токсичный, дальнейшие испытания на организменном уровне проводить нецелесообразно.