

Министерство здравоохранения СССР

КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ ЭКСПРЕСС-МЕТОД ОЦЕНКИ  
ТОКСИЧНОСТИ ПОЛИМЕРОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ  
КЛЕТОЧНОГО ТЕСТ-ОБЪЕКТА

Методические рекомендации

Москва - 1987 г.

Методические рекомендации предназначены для скрининга полимерных материалов и изделий медицинского назначения. Данный метод позволяет автоматически произвести количественную оценку токсичности водных вытжек из полимерных материалов и изделий.

Рекомендации предназначены для специалистов санэпидстанций и лабораторий, проводящих токсикологические исследования синтетических полимеров.

Разработаны: Всесоюзным научно-исследовательским и испытательным институтом медицинской техники

Исполнители: Еськов А.П., Какюмов Р.И., Гурилев О.М.,  
Соколов А.В., Филатов А.В.

УТВЕРЖДАЮ

Начальник Управления  
по внедрению новых  
лекарственных средств  
и медицинской техники

Ю. Г. Босков

КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ ЭКСПРЕСС-МЕТОД ОЦЕНКИ  
ТОКСИЧНОСТИ ПОЛИМЕРОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ  
КЛЕТОЧНОГО ТЕСТ-ОБЪЕКТА

Методические рекомендации

Значительный рост объема токсикологических испытаний и экспертиз в практике гигиенических исследований полимерных материалов и изделий медицинского назначения вызывает необходимость поиска экономически эффективных методов экспресс-анализа с использованием относительно простых биологических тест-объектов. Экспресс-методы оценки токсичности применимы в следующих случаях [6] :

- 1) при отборе оптимальных лабораторных образцов материалов и изделий на первом этапе их разработки;
- 2) при оценке различных технологий переработки материалов в изделие;
- 3) при выборе оптимального способа стерилизации изделия;
- 4) при незначительном изменении рецептуры материала;
- 5) при изменении области применения хорошо изученного материала,

В настоящее время применяют разнообразные тест-объекты, в том числе и сперму млекопитающих [8, 9, 10]. Сперматозоиды могут существовать вне организма в средах простого состава достаточно длительное время без изменения своих функциональных свойств. Основное назначение половых клеток, как носителей

наследственной информации, оплодотворение яйцеклетки. В связи с необходимостью продвижения мужских гамет к месту оплодотворения, именно подвижность является основным показателем физиологического, биохимического и морфологического статуса сперматозоидов [5].

Основными недостатками известных методик, в которых о функциональном состоянии сперматозоидов судят по характеру движения и продолжительности периода подвижности, являются трудоемкость и субъективная оценка подвижности. Настоящая методика позволяет автоматически произвести количественную оценку токсичности водных вытяжек из полимерных материалов. Время эксперимента не более 4 часов.

### 1. Тест-объект

В качестве тест-объекта используется замороженная в паре жидкого азота гранулированная сперма быка. Замороженную сперму быка можно получать на станциях искусственного осеменения или в Республиканском банке семени. В токсикологической лаборатории хранить сперму можно неограниченно долго в сосудах Дьюара, заполненных жидким азотом. В сосуды Дьюара жидкий азот доливае-ся каждые 3-4 дня.

Экспериментально показано, что коэффициент вариации концентрации сперматозоидов в гранулах спермы и рабочих растворах не превышает 10% [3]. Это говорит о том, что гранулы достаточно однородны для обеспечения стандартности контрольных образцов спермы.

### 2. Принцип метода

Принцип метода основан на анализе зависимости показателя

подвижности суспензии сперматозоидов от времени  $\bar{m} = f(t)$  [1, 2]  
Показатель подвижности определен, как

$$\bar{m} = a c_n \bar{V}$$

где  $a$  - постоянный коэффициент,  
 $c_n$  - концентрация подвижных клеток,  
 $\bar{V}$  - средний модуль скорости клеток.

Оценка показателя подвижности осуществляется путем подсчета числа флукутации интенсивности рассеянного излучения, вызванных прохождением клеток через оптический зонд.

### 3. Оборудование

1. Прибор для определения индекса токсичности (разработка ВНИИМТ) (рис. 1).

2. Печатающее устройство УВНПЧ-30-004 (рис. 1).

3. Комплект полистироловых кювет.

4. Химическое оборудование из стекла (из расчета на проведение одного эксперимента):

1) пробирки химические объемом 3-5 мл для оттаивания замороженной спермы - 10 шт.

2) пробирки с притертыми пробками объемом 1,5-2 мл для рабочих растворов - 10 шт.

3) покровные стекла одинаковой толщины для накрывания кювет - 10 шт.

4) пипетки объемом 1 мл - 3 шт.

5) мерные колбы с притертыми пробками объемом 100 мл для приготовления изотонических растворов - 2 шт.

6) глазные пипетки для заполнения кювет рабочими растворами - 2 шт.

ПРИБОР ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ИНДЕКСА ТОКСИЧНОСТИ

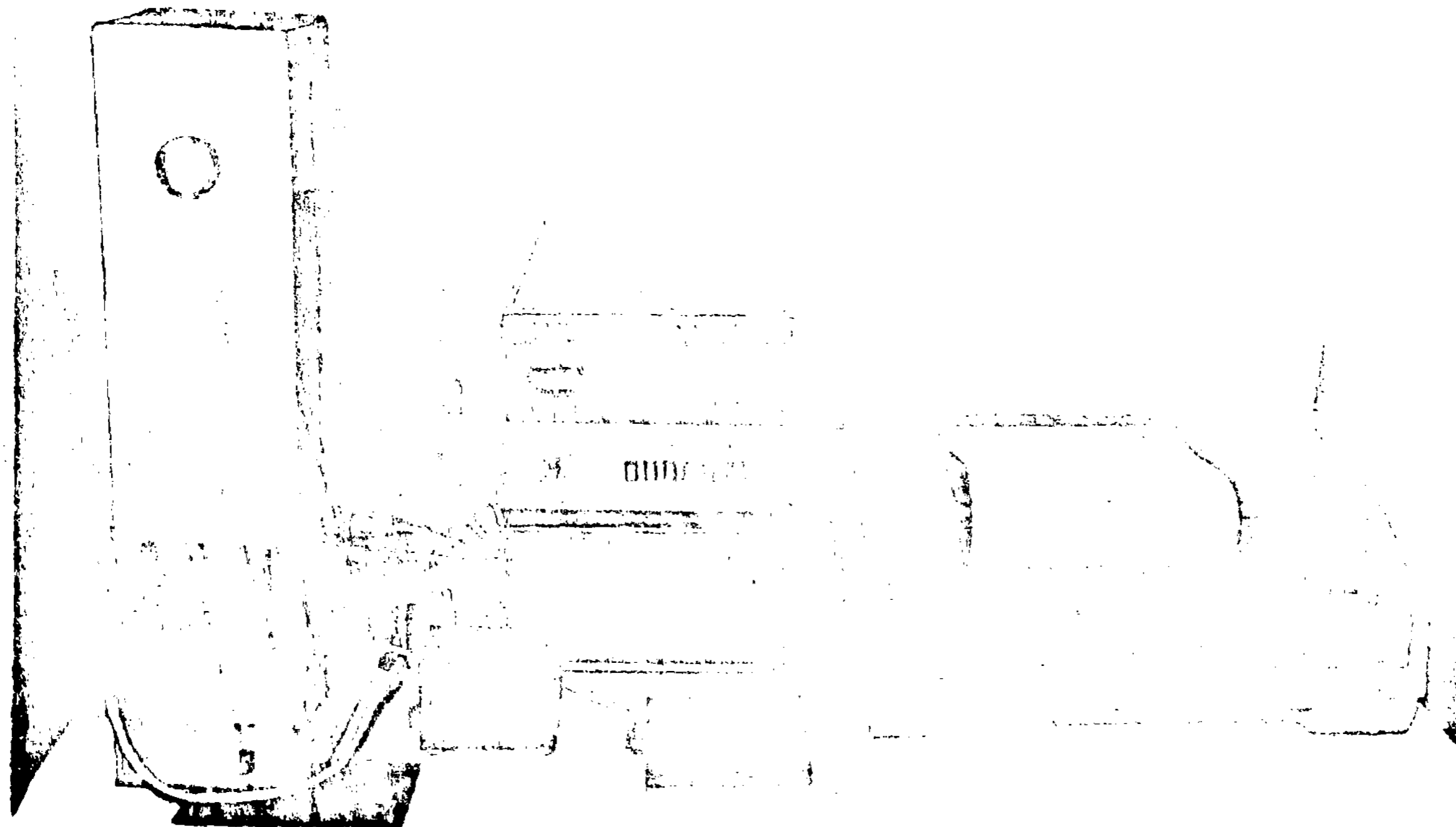


Рис. 1

5. Весы аналитические - I шт.
6. Пинцет анатомический - I шт.
7. Сосуд Дьюара емкостью 26,5 л (марка СДП-25) - I шт.
8. Сосуд Дьюара емкостью 5 л (марка СДС-5) - I шт.

#### 4. Температурный режим эксперимента

Все растворы в течение эксперимента должны быть постоянно нагреты до температуры  $+40 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ .

#### 5. Этапы исследования, их последовательность

##### 5.1. Приготовление вытяжек из полимерных материалов

Модельная среда - дистиллированная вода.

Экстракты из полимерных материалов или изделийготавливаются в соответствии с научно-методическими документами для данного вида изделия.

##### 5.2. Приготовление опытной и контрольной проб

Для определения индекса токсичности опытный раствор необходимо сравнить с контрольной средой. В качестве контрольного раствора выбрана глюкозо-цитратная среда (состав среды: глюкоза - 4 г; цитрат натрия - 0,58 г; вода дистиллированная - до 100 мл) pH 8,0 7 . Контрольная среда одновременно является разбавителем для оттаивания замороженной спермы. Опытной пробой является водная вытяжка из полимерного материала. Изотонию вытяжки достигают путем добавления сухих реактивов глюкозы и цитрата натрия. На 100 мл вытяжки добавляют 4 г глюкозы и 0,58 г цитрата натрия. Затем дозируют по 1 мл контрольный и испытуемый растворы в пробирки и ставят их в водяную баню при температуре  $+40^{\circ}\text{C}$ . Контрольный и опытный растворы готовят за-

ранее за I час до начала эксперимента.

### 5.3. Включение прибора

Включение прибора осуществляется нажатием тумблера "Сеть". Затем необходимо нажать кнопку "Пуск", после чего выдается распечатка бланка исходных данных (приложение I), подлежащей заполнению.

### 5.4. Оттаивание замороженной спермы

Отмеривают пипеткой в пробирки по 0,25 мл разбавителя и ставят их в водяную баню при температуре  $+40^{\circ}\text{C}$ . Охлажденным до температуры жидкого азота длинным анатомическим пинцетом извлекают из сосуда Дьюара гранулу спермы и быстро опускают в нагретый раствор. Каждую гранулу размораживают в отдельной пробирке. Нельзя оттаивать несколько гранул в одной пробирке! Сразу после размораживания содержимое пробирок с целью приготовления маточного раствора спермы сливают в одну пробирку и тщательно перемешивают.

### 5.5. Приготовление рабочих образцов

Общий объем рабочего образца выбран равным I мл. В каждую пробирку контрольной и опытной серии помещают по 0,2 мл суспензии сперматозоидов.

### 5.6. Подготовка проб к исследованию на приборе

Каждый рабочий образец переносится в кювету, которая накрывается покровным стеклом. Излишки рабочего раствора снимаются с кюветы фильтровальной бумагой. Затем кювета устанавливается в кюветодержатель прибора.



## 5.7. Накопление и обработка экспериментальных данных

Нажатием кнопки "Пуск" включается процесс накопления данных. Каждое оцененное значение показателя подвижности выдается на встроенный десятичный индикатор и печатающее устройство. При достижении нулевых значений показателя подвижности во всех десяти кюветах нажатием кнопки "Останов" производится остановка процесса накопления данных. После этого приступают к обработке результатов экспериментальных данных нажатием кнопки "Обработка". По завершении обработки автомат выдает значения среднего времени подвижности каждого образца и величину критерия токсичности на встроенные десятичные индикаторы и печатающее устройство. Кроме того по желанию оператора, на печатающем устройстве строится график зависимости  $m_i = f_i(t)$  каждого рабочего образца. Таким образом, в результате работы автомата экспериментатор получает протокол испытаний, представленный в приложении I.

## 6. Алгоритм обработки результатов

В результате работы автомата для каждого из десяти образцов рабочих растворов, которыми заполнены десять кювет, регистрируется зависимость  $m = f(t)$ . Для каждой такой зависимости вычисляется среднее значение функции [4]. Среднее значение функции ( $\bar{t}$  ср.) характеризует среднее время подвижности суспензии сперматозоидов:

$$\bar{t}_{\text{ср.}} = \frac{\sum_i m_{ij} \cdot d}{\sum_j m_{ij}}$$

где

$i$  - порядковый номер кюветы,  
 $j$  - порядковый номер оценки подвижности в  $i$ -той кювете.

Затем вычисляется индекс токсичности  $I_T$

$$I_T = \frac{\bar{t}_{\text{ср.}}^{\text{опит.}}}{\bar{t}_{\text{ср.}}^{\text{контроль}}} \cdot 100\%$$

В случае использования 5 опытных и 5 контрольных образцов имеем:

$$\bar{t}_{\text{ср.}}^{\text{контр.}} = \sum_{i=1}^5 t_{i, \text{ср.}} / 5 \quad \text{и} \quad \bar{t}_{\text{ср.}}^{\text{опыт.}} = \sum_{i=6}^{10} t_{i, \text{ср.}} / 5$$

где  $i = 1, 2, 3, 4, 5$  - соответствует кюветам с **контрольным** раствором,

$i = 6, 7, 8, 9, 10$  - соответствует кюветам с **опытным** раствором.

Среднее квадратическое отклонение величины  $\bar{I}_T$  определяется, как

$$\sigma = \bar{I}_T \sqrt{\left( \frac{\sigma_{\bar{t}_{\text{ср.}}^{\text{опыт.}}}}{\bar{t}_{\text{ср.}}^{\text{опыт.}}} \right)^2 + \left( \frac{\sigma_{\bar{t}_{\text{ср.}}^{\text{контр.}}}}{\bar{t}_{\text{ср.}}^{\text{контр.}}} \right)^2}$$

Определение значения среднего квадратического отклонения позволяет оценить разницу между контролем и опытным образцом с заданной вероятностью [4].

## 7. Оценка результатов исследований

Оценку характера биологического действия исследуемой вытяжки осуществляют следующим образом. Задают вероятность  $p$ , с которой необходимо оценить характер действия. Определяют соответствующий доверительный интервал  $\Delta \bar{I}_T = 2\sigma_{p=0,95}$  ( $\Delta \bar{I}_T = \sigma_{p=0,66}$ )

При  $\bar{I}_T + \Delta \bar{I}_T < 100\%$  вытяжка признается оказывающей угнетающее действие. При  $\bar{I}_T - \Delta \bar{I}_T \geq 100\%$  вытяжка признается неокзывающей угнетающее действие. При  $\bar{I}_T - \Delta \bar{I}_T < 100\% < \bar{I}_T + \Delta \bar{I}_T$  достигнутая в эксперименте точность не позволяет сделать вывод

о характере действия вытяжки. В этом случае можно увеличить количество образцов и тем самым повысить точность. Если не повысить точность оказывается невозможным, вытяжка должна быть подвергнута токсикологическому исследованию другими более чувствительными и точными методами.

### 8. Заключение

Описанная методика позволяет количественно оценить биологическое действие исследуемой вытяжки, и таким образом, осуществлять скрининг полимерных и других материалов и изделий.

Значимость результата (заключения), получаемого по данной методике может быть повышена. Для этого путем "калибровки" по результатам исследований на целостном организме для конкретной группы изделий и материалов необходимо определить предельно допустимое значение индекса токсичности  $I_T^{min}$ . Заключение о возможности использования данного образца делается аналогично п. 7, но экспериментальная величина индекса токсичности  $I_T$  сравнивается с его предельно допустимым значением  $I_T^{min}$

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Еськов А.П., Кажлов Р.И., Лужецкий А.С., Гурилев О.М., Рязанов Ю.Н., Смелик Г.И., Арефьев И.М., Лашко В.Г. Метод токсикологической оценки полимерных материалов "Гигиена и санитария 1985, № I, с.62-64.
2. Еськов А.П., Гурилев О.М., Лужецкий А.С., Рязанов Ю.Н., Кажлов Р.И. Способ определения токсичности полимерного материала. Авторское свидетельство № I224723. Опубликовано 15.04.86. Бюлл. № I4.
3. Исследование возможности создания лазерного полуавтомата для токсикологических исследований на сперме сельскохозяйственных животных". Рукопись, заключительный отчет, ВНИИМТ, 1986.
4. Корн Т., Корн Т.  
Справочник по математике. - М.: Наука, 1977 - 831 с.
5. Милованов В.К. Биология воспроизведения и искусственное осеменение животных - М., 1962. - 696 с.
6. Тиможина В.И., Лямина С.Я. Токсикологические и санитарно-химические методы оценки полимеров для контакта с живым организмом. - В кн.: "Синтетические полимеры медицинского назначения", Ташкент, издательство "ФАН" Уз ССР, 1984, 104-116 с.
7. Юценко Н.П., Семаков В.Г. Переживаемость спермы быка после замораживания при оттаивании в различных средах в зависимости от количества сперматозоидов в дозе. - Сб.тр. НИИСХ центр. р-нов Нечерноземной зоны, 1978, в. 42, с. 120-121.
8. Kalbe U. Gefrierkonserviertes Bullensperma als Testobjekt für Screening - Untersuchung von Umweltschadstoffen (Spermatest) - "Zeitschrift gesamte Hygiene und Grenzgebiete" 1983, 29, 112, 719-721.
9. Paluch D, Borzymuska - Izumnowicz M, Olszewska.  
Blach Z. In vitro screening studies of the toxicolo-

general testing of synthetic biomaterials. "Polymers in Medicine" 1980, 10, no. 4, 193-204.

10. Ivanova G., Mandys V., Waiytowa D. On toxicity question of synthetic polymers and their extracts tested in vitro and in vivo - "Polymers in Medicine" 1981, 11, no. 1, 27-37.

## ДИНАМИЧЕСКИЕ КИНЕЗИГРАММЫ

Дата \_\_\_\_\_

Температура \_\_\_\_\_

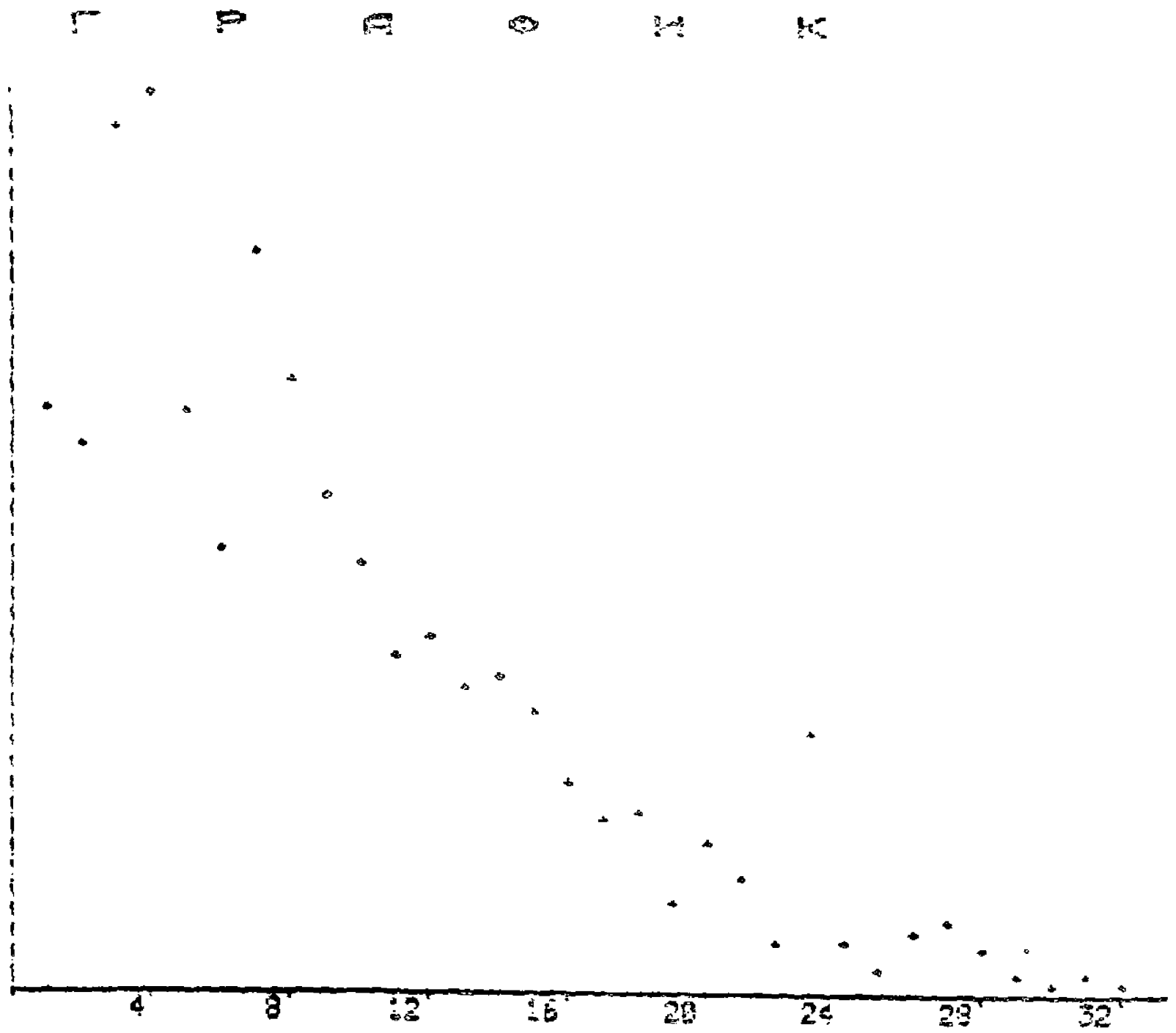
Образец № 1 \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_Образец № 2 \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_Образец № 3 \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_Образец № 4 \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_Образец № 5 \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_Образец № 6 \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_Образец № 7 \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_Образец № 8 \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_Образец № 9 \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_Образец № 10 \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Продолжительность измерения с. Период измерения мин. с.



010 0000 10 00  
0000 0000 00  
0000 0000 00  
0000 0000 00

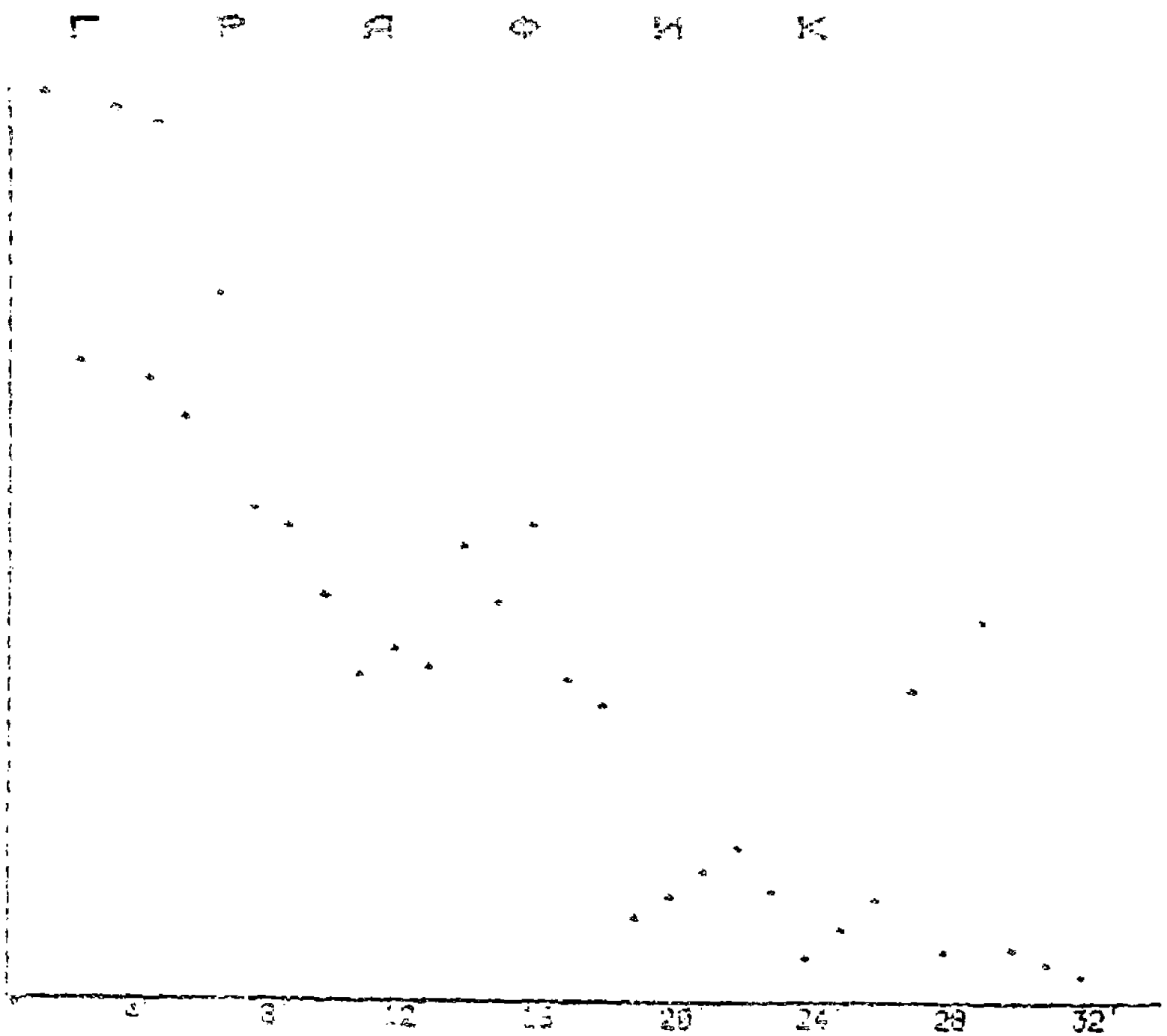
СПИСОК СРЕДСТВ ПОДВИЖНОСТИ, ММН. 111.74





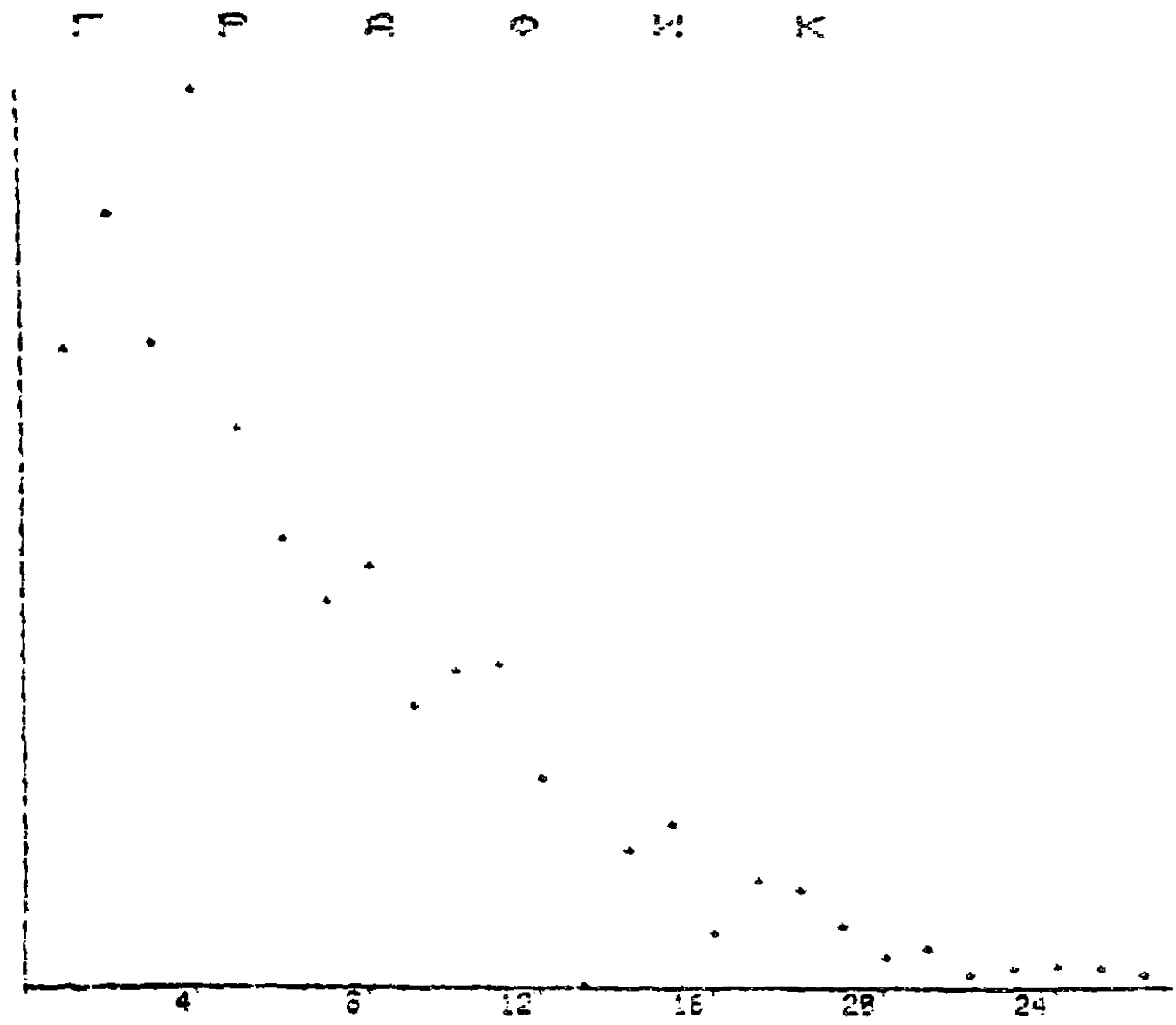
ОПИСАНИЕ РАБОТЫ  
№ 110  
№ 36.

ОПИСАНИЕ РАБОТЫ ПО ИЗМЕРЕНИЮ ДЛИНЫ ВОЛНЫ СВЕТОВОГО СПЕКТРА



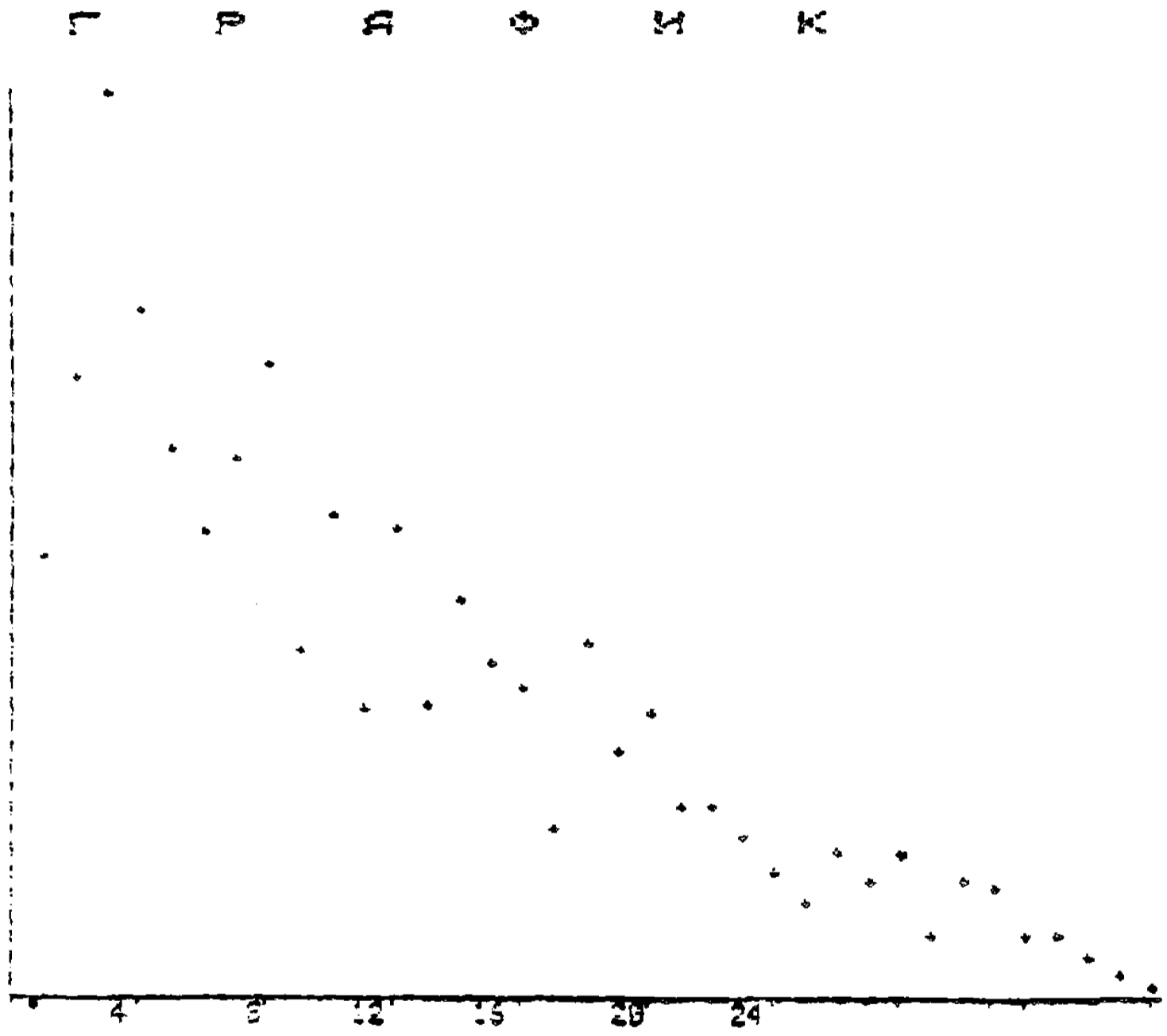
ДАТА 12. 3. 86.  
ОБРАЗЕЦ 4  
=====

СРЕДНЕЕ ВРЕМЯ ПОДВИЖНОСТИ , МИН. 32.38



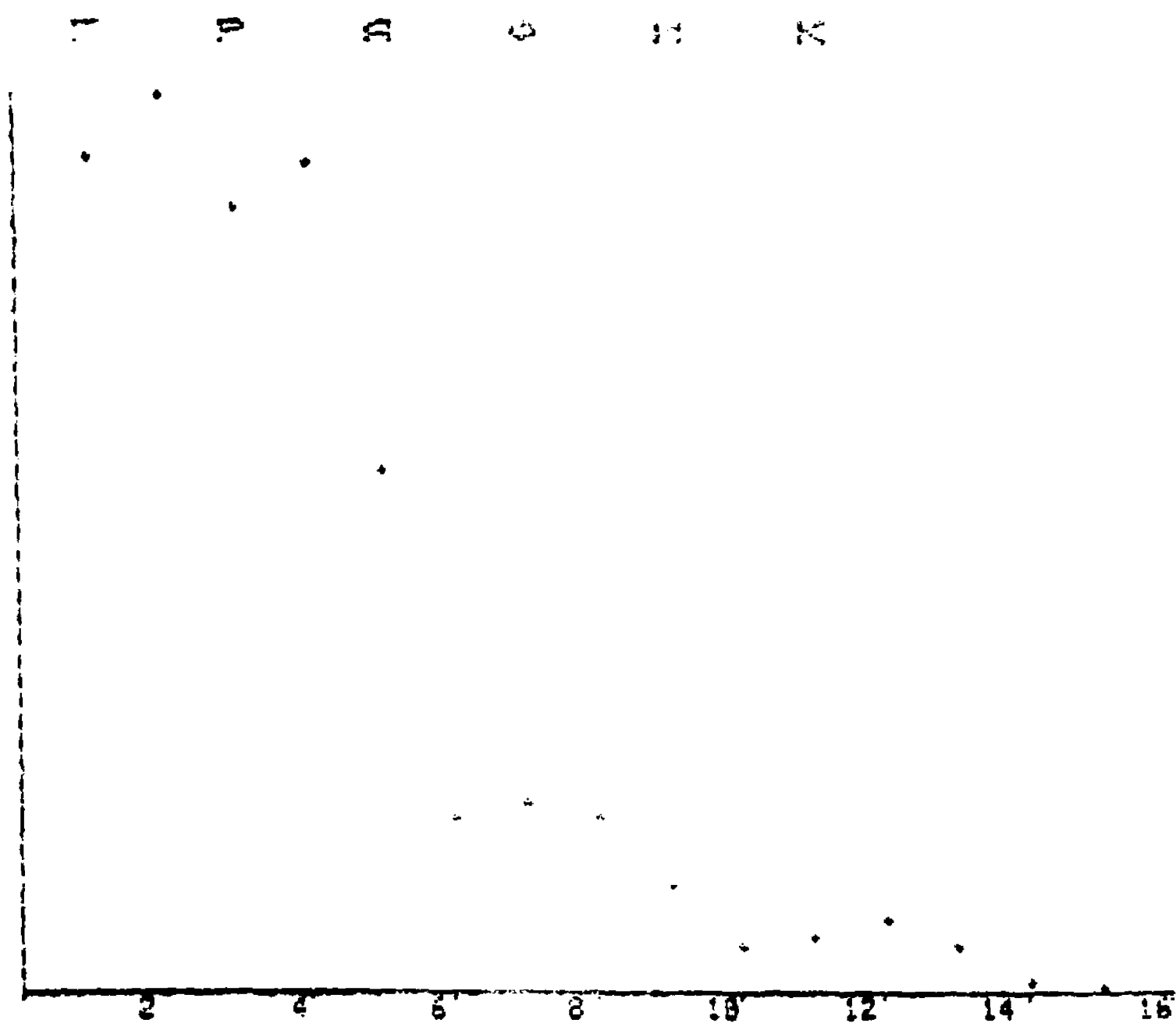
ДАТА 12. 3. 86.  
ОБЪЕМ 4  
=====

СРЕДНЕЕ ВРЕМЯ ПОДЪЕМНОСТИ , МИН. 142.24



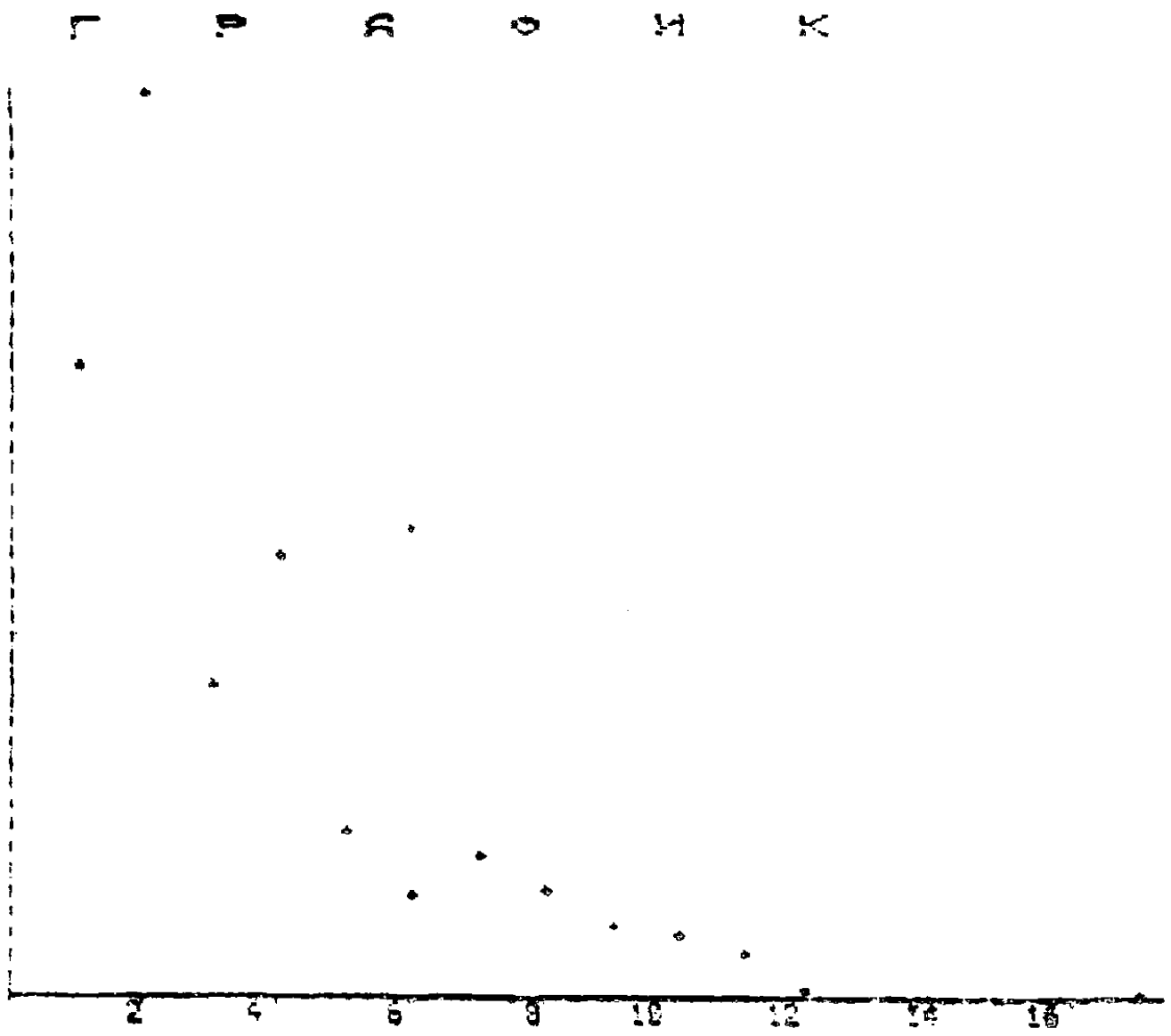
DATA 12. 3. 86.  
 OBPACEN 6  
 #####

CPBAHEE BPEMA HOBEPHHOCIA, min. 49.01



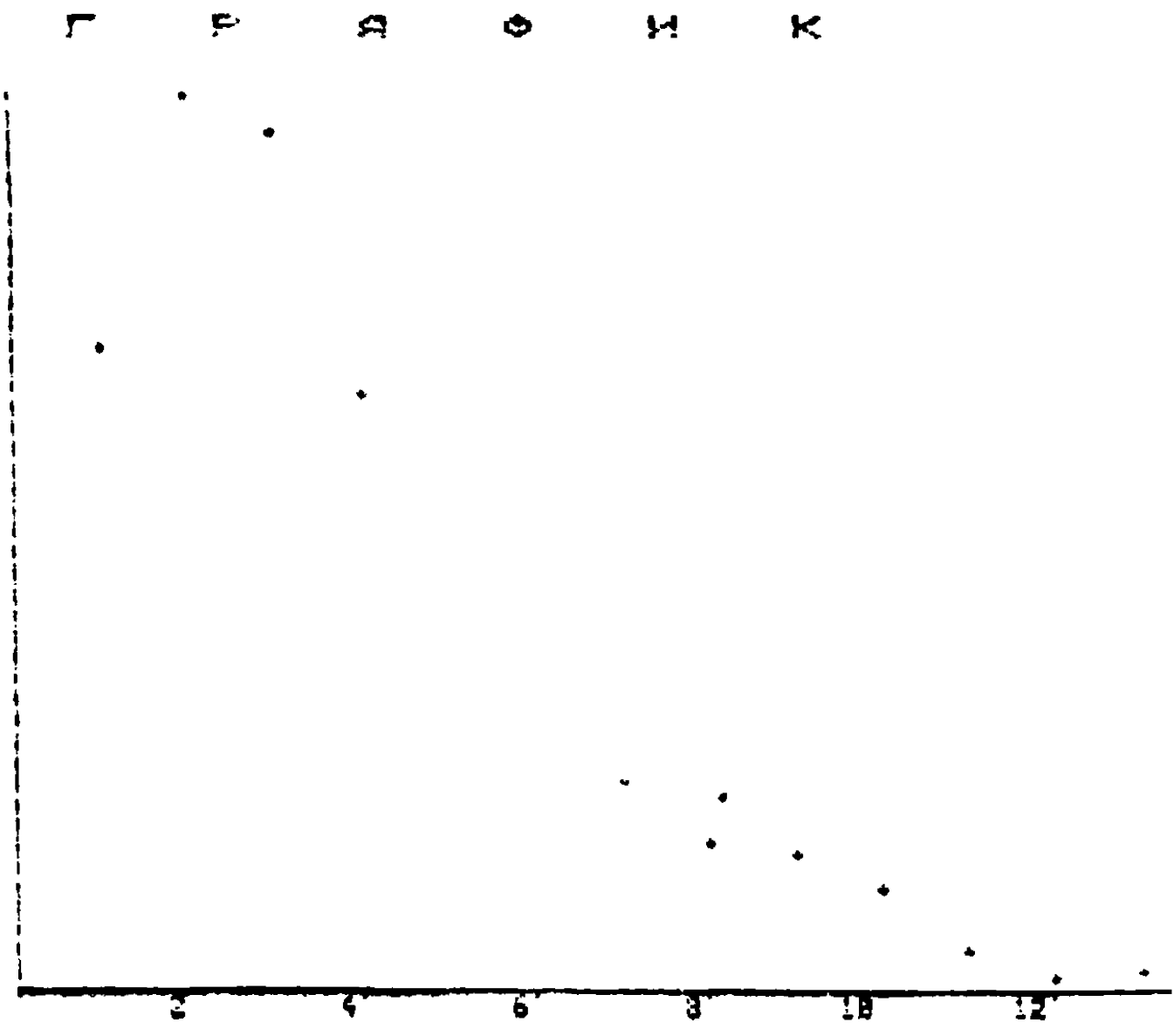
DATA 12. 3. 85.  
DEGREE 7  
\*\*\*\*\*

GRANULAR SPERM POLYMERIZATION, MIN. 43.35



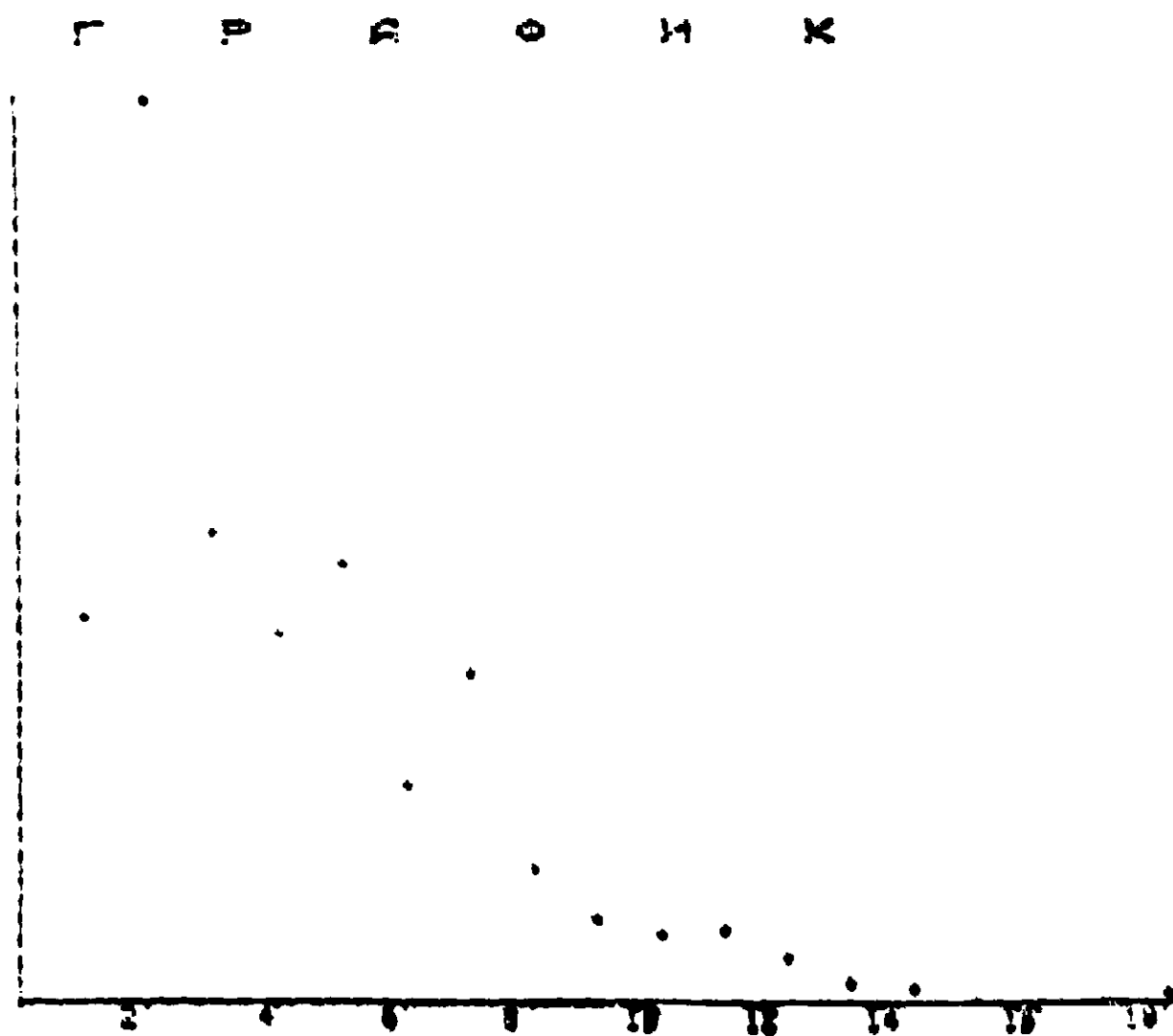
DATA 12. 7. 86.  
ОБРАЗЕЦ 87.  
\*\*\*\*\*

СРЕДНЕЕ ВРЕМЯ ПОСВИЩНОСТИ , МНН. 40.15



DATA 12. J. 86.  
 050300 9  
 \*\*\*\*\*

СРЕДНЕЕ ВРЕМЯ ПОЛОНЕРИКОСТИ, МИН. 52.75



КОМПЬЮТЕРНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ, ЗАО  
 КОМПЬЮТЕРНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ, ЗАО  
 КОМПЬЮТЕРНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ, ЗАО  
 КОМПЬЮТЕРНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ, ЗАО