

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

В. 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 приготавливают 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 неокказывающей 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, Bozemska - 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., Vaityova 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 _____

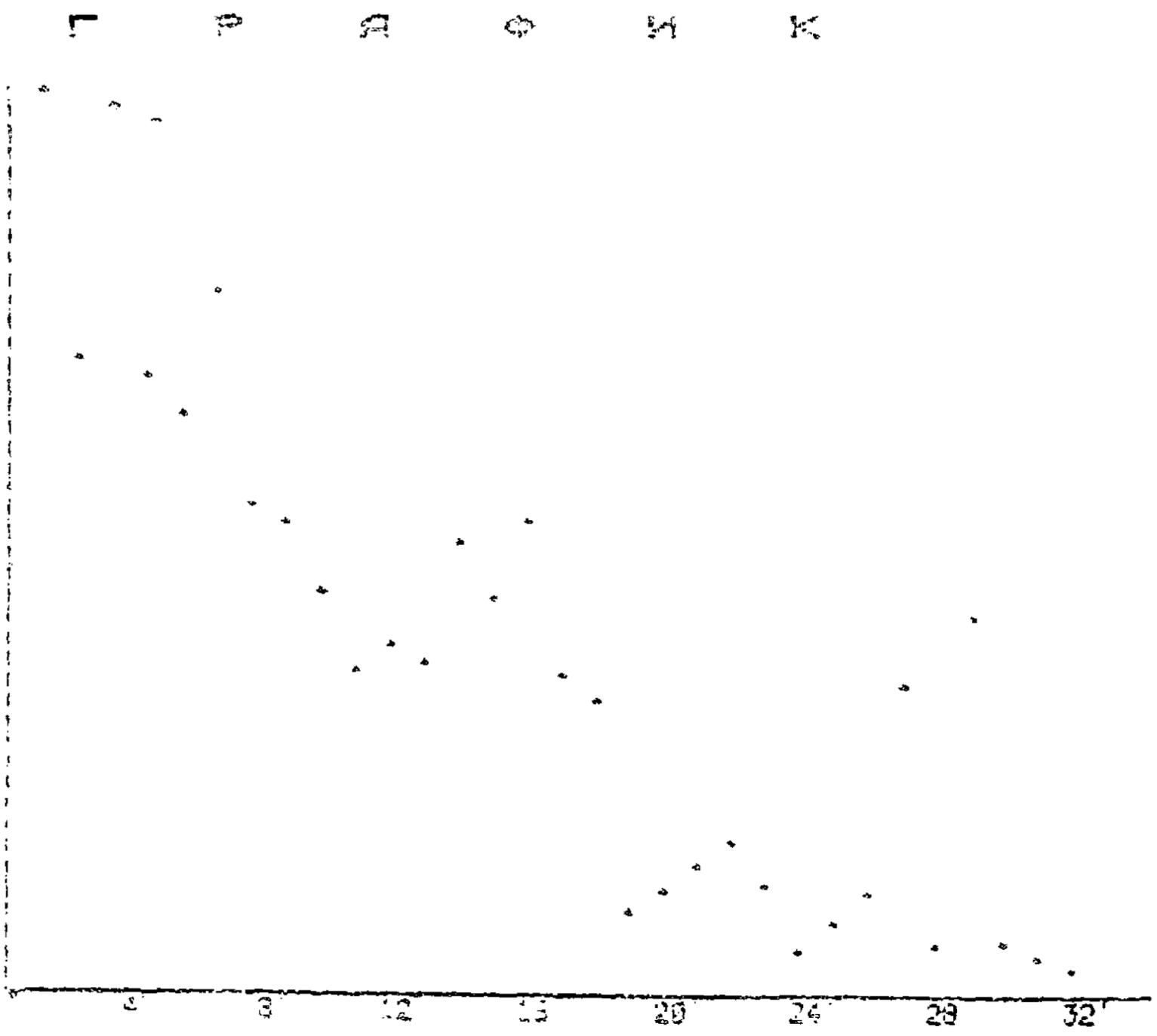
Температура _____

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.

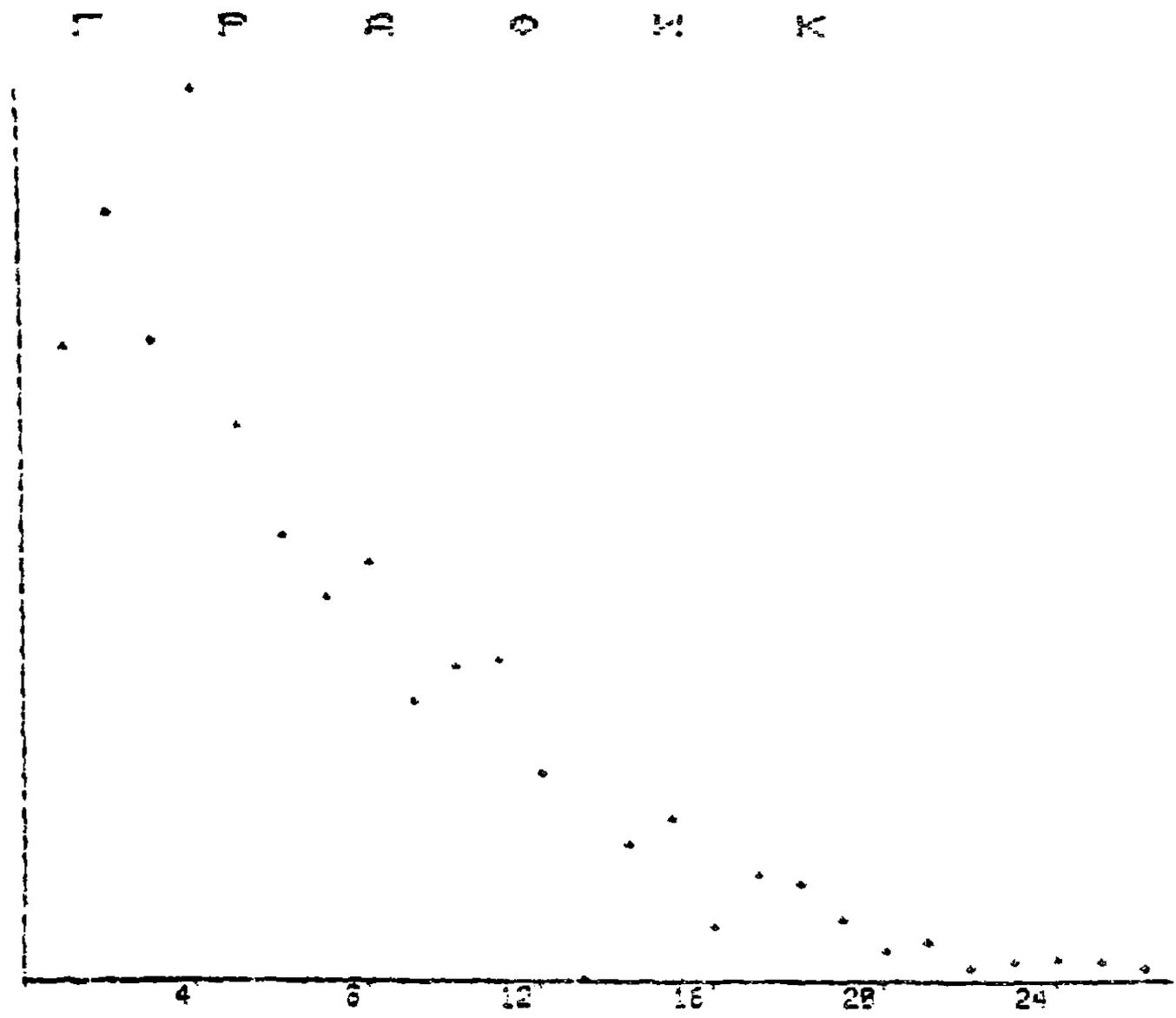
СЛУЖБА ЗАДАТАЦИЈА
БРОЈ: 110. 12. 36.

СЛУЖБА ЗАДАТАЦИЈА ПОСРЕДСТВОМ: МММ. 125. 01



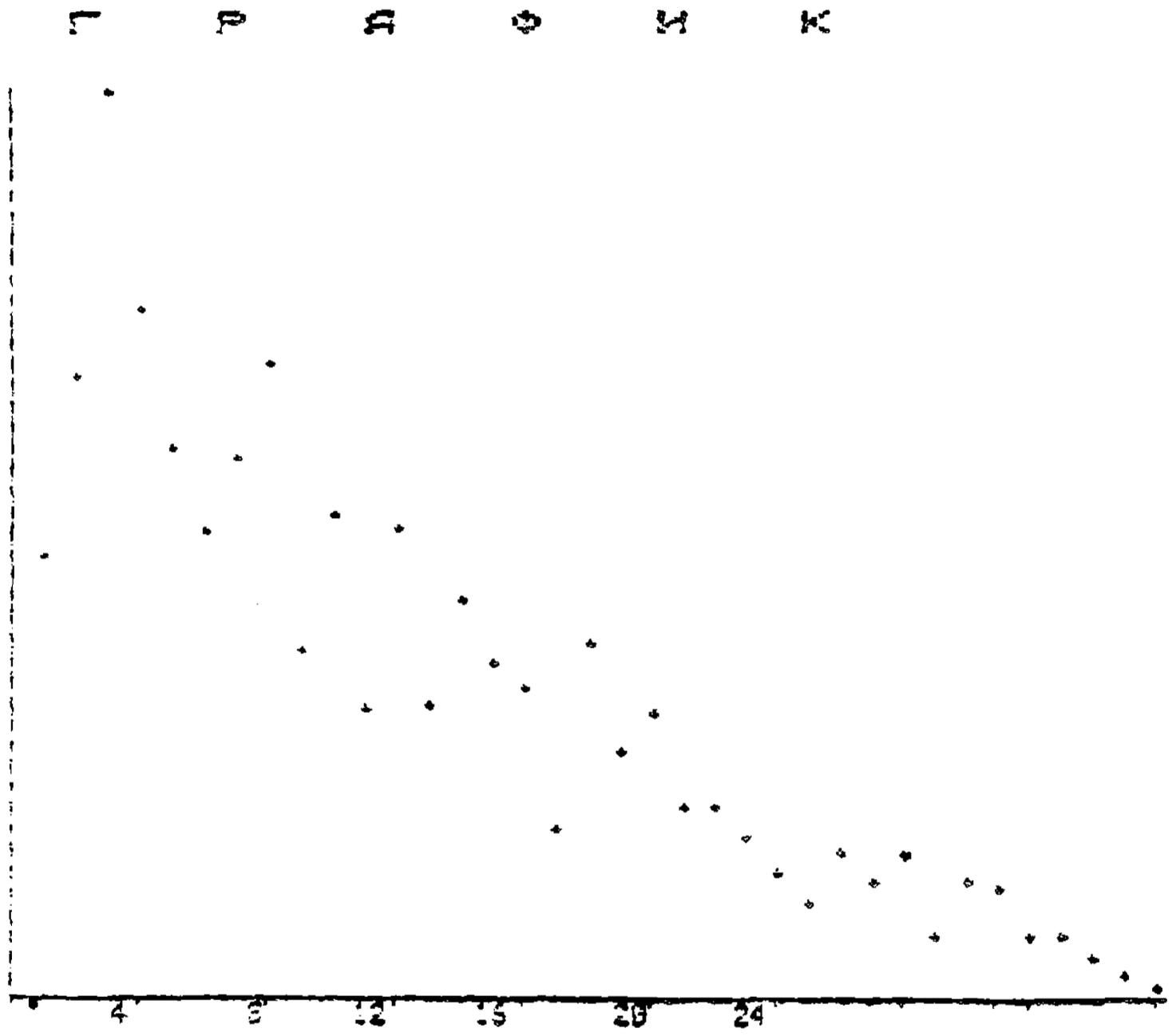
ДАТА 12. 3. 86.
ОБРАЗЕЦ 4
=====

СРЕДНЕЕ ВРЕМЯ ПОДВИЖНОСТИ , МИН. 32.38



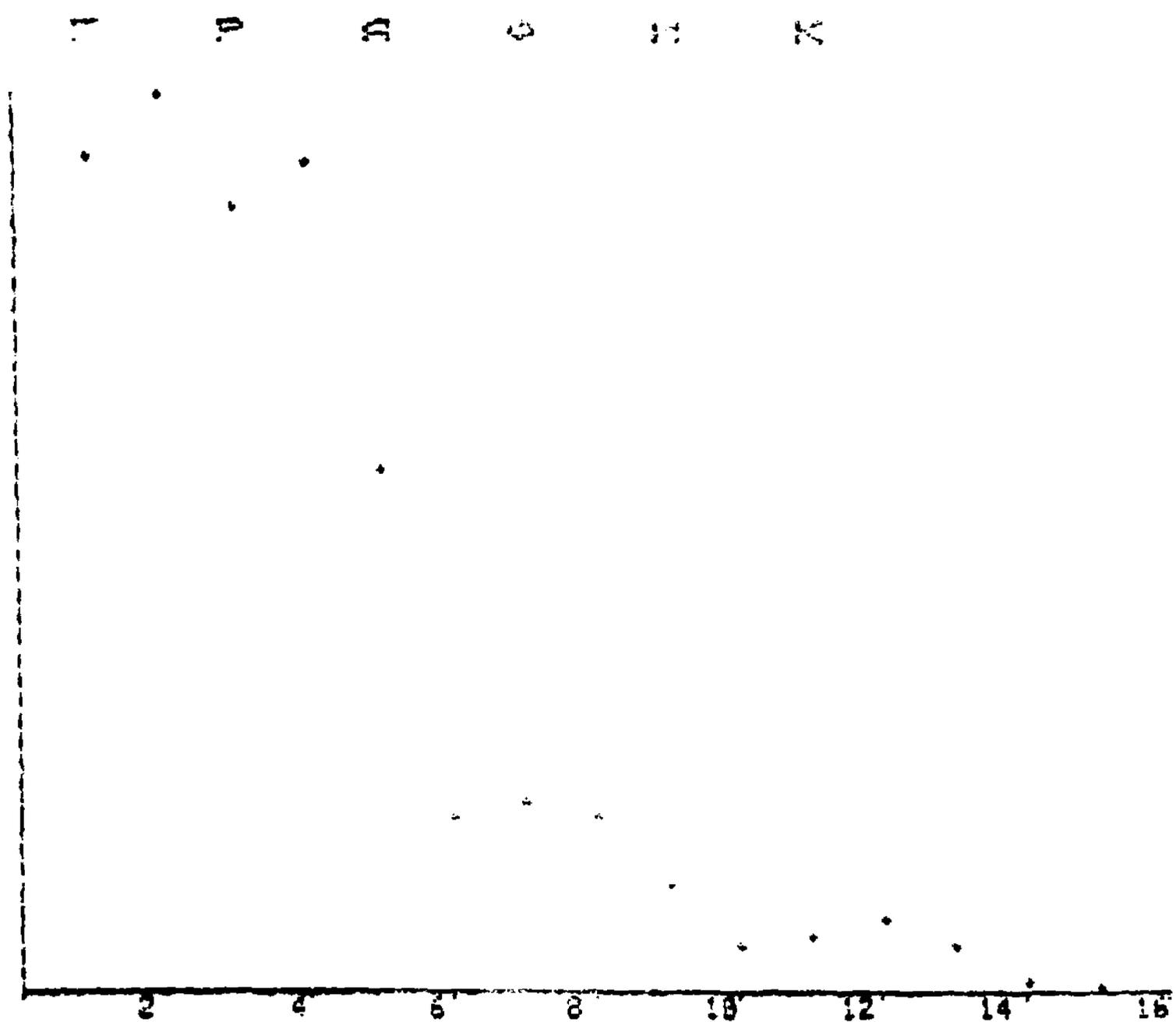
ДАТА 12. 3. 86.
ОБЪЕМ 4
=====

СРЕДНЕЕ ВРЕМЯ ПОДЪЕМНОСТИ , МИН. 142.24



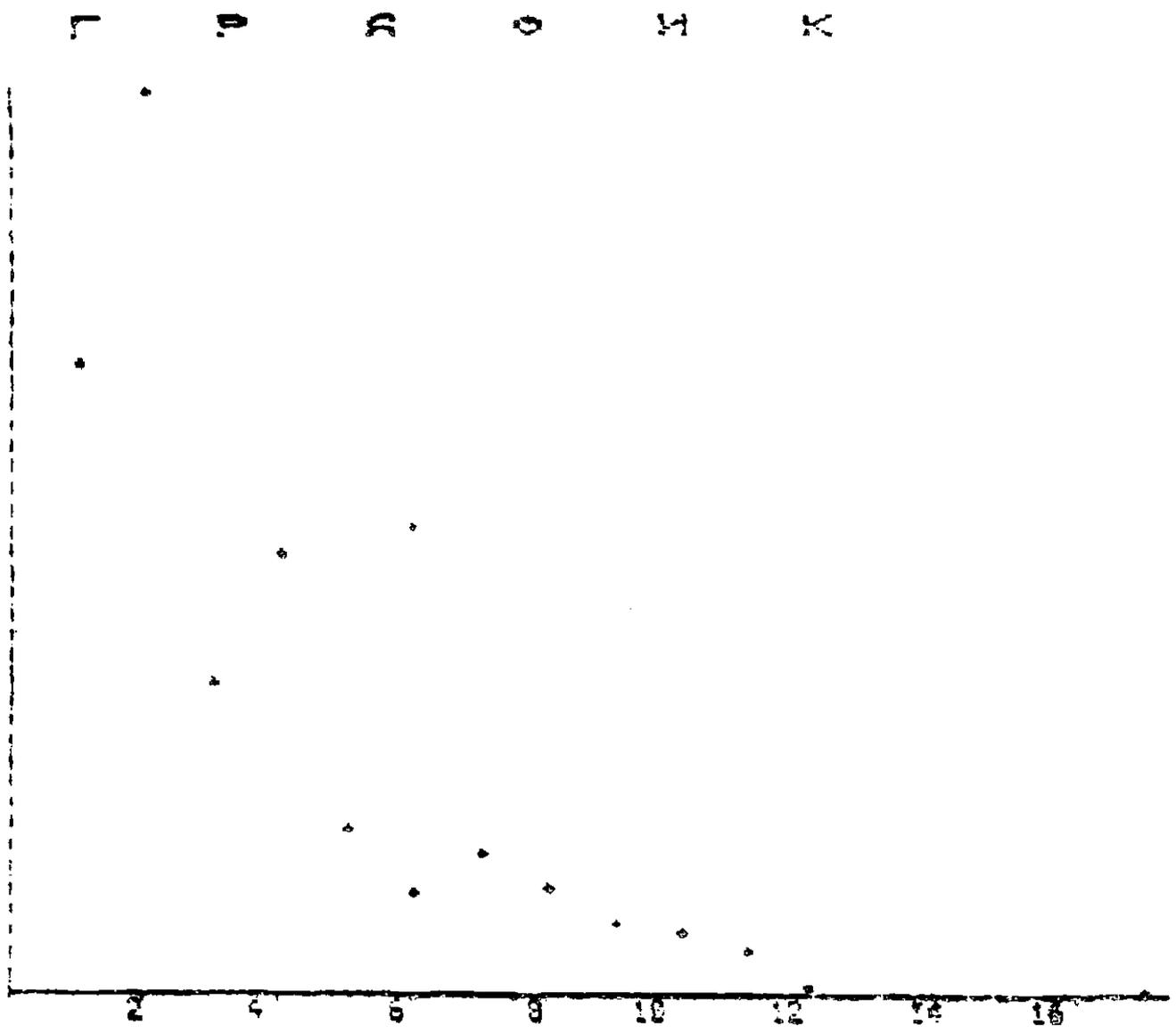
DATA 12. 3. 86.
ОБРАЗЦУ 6
=====

СРЕДНЕЕ ВРЕМЯ ПОДВЕРЖЕННОСТИ, мин. 49.01



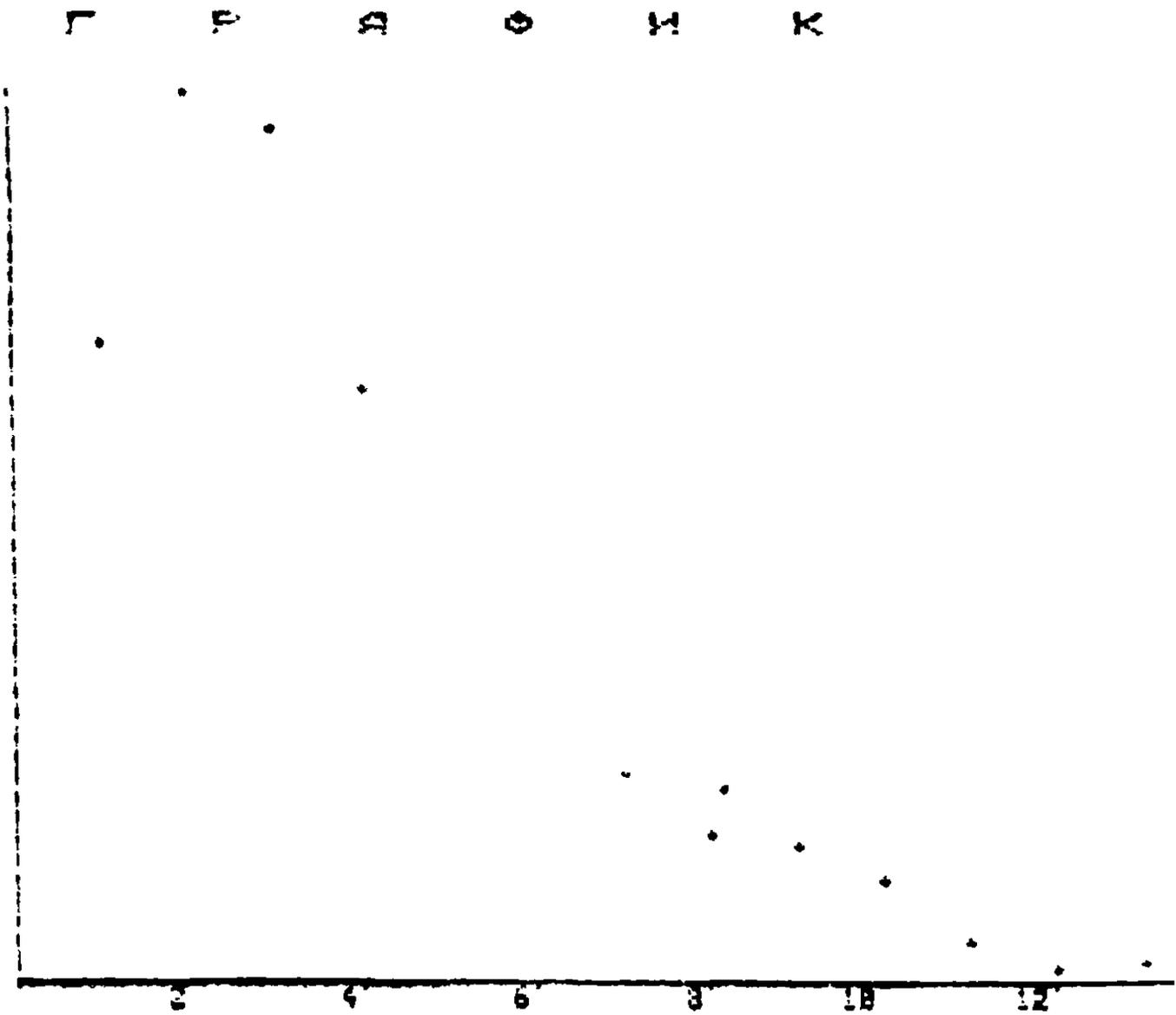
DATA 12. 3. 85.
DEGREE 7

СРЕДНЕЕ ВРЕМЯ ПОДВЫЖНОСТИ, МНН. 43.35



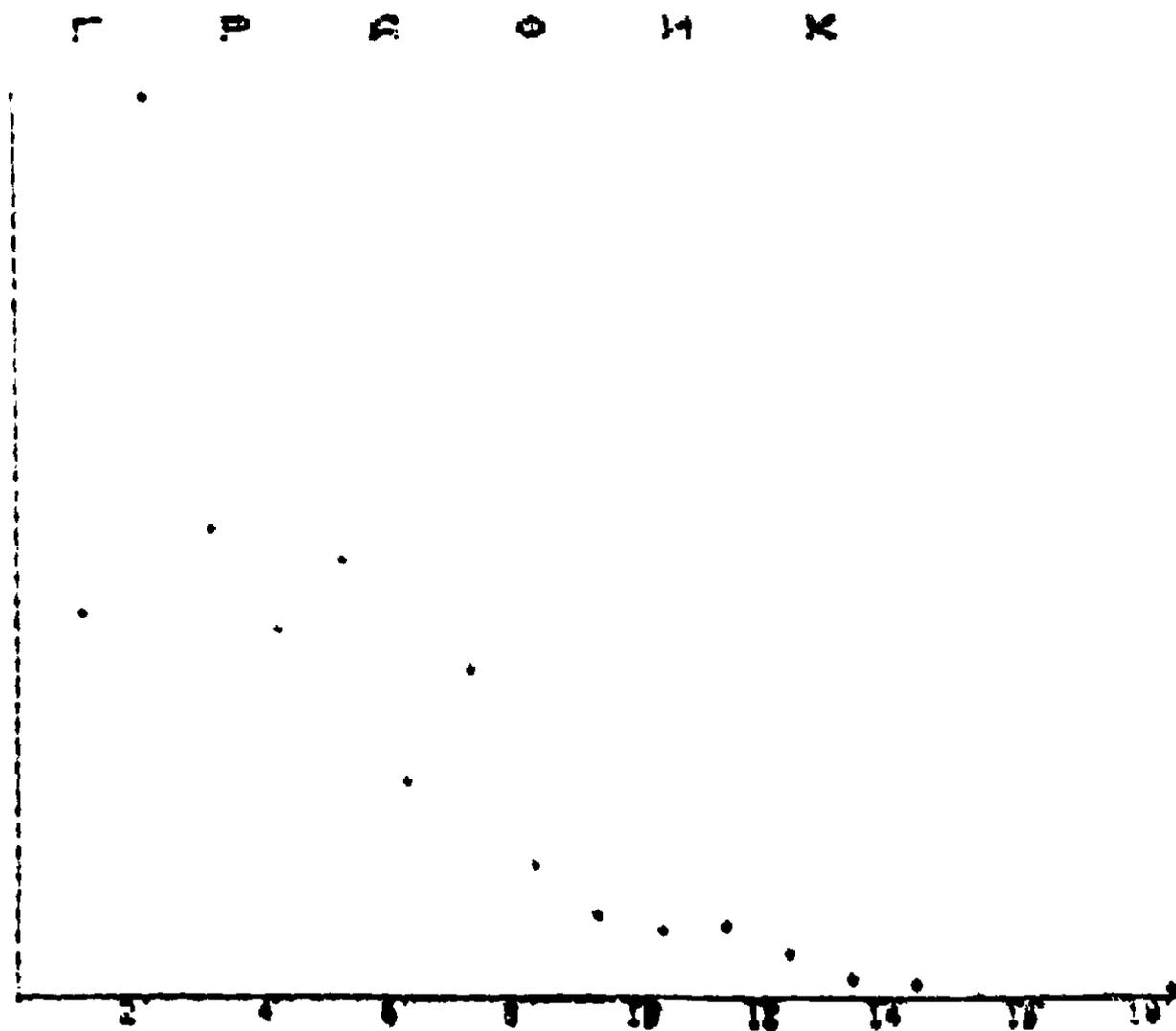
DATA 12. 7. 86.
 ОБРАЗЕЦ 87.

СРЕДНЕЕ ВРЕМЯ ПОСВИЩНОСТИ, МНН. 40.15



DATA 12. J. 86.
 050300 9

СРЕДНЕЕ ВРЕМЯ ПОЛОНЕРСКОГО, МИН. 52.75



КОМПЬЮТЕРНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ, ЗАО :
 АДРЕС : 40.000 / 1 / 10
 КОМПЬЮТЕРНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ, ЗАО :
 АДРЕС : 40.000 / 1 / 10