ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО

ПО ТЕХНИЧЕСКОМУ РЕГУЛИРОВАНИЮ И МЕТРОЛОГИИ

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ГОСТ Р ИСО 10993-5— 2009

ИЗДЕЛИЯ МЕДИЦИНСКИЕ ОЦЕНКА БИОЛОГИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ МЕДИЦИНСКИХ ИЗДЕЛИЙ

Часть 5

Исследования на цитотоксичность: методы *in vitro*

ISO 10993-5:1999
Biological evaluation of medical devices — Part 5: Tests for *in vitro* cytotoxicity (IDT)

Издание официальное

БЗ 5—2009/184

Москва
Стандартинформ
2010

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

Цели и принципы стандартизации в Российской Федерации установлены Федеральным законом от 27 декабря 2002 г. № 184-ФЗ «О техническом регулировании», а правила применения национальных стандартов Российской Федерации — ГОСТ Р 1.0—2004 «Стандартизация в Российской Федерации. Основные положения»

Сведения о стандарте

1 ПОДГОТОВЛЕН Автономной некоммерческой организацией «Институт медико-биологических исследований и технологий» (АНО «ИМБИИТ»)

2 ВНЕСЕН Техническим комитетом по стандартизации ТК 422 «Оценка биологического действия медицинских изделий»

3 УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 2 декабря 2009 г. № 541-ст

4 Настоящий стандарт идентичен международному стандарту ИСО 10993-5:1999 «Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 5. Исследования на цитотоксичность: методы *in vitro*» (ISO 10993-5:1999 «Biological evaluation of medical devices — Part 5: Tests for *in vitro* cytotoxicity»).

При применении настоящего стандарта рекомендуется использовать вместо ссылочных международных стандартов соответствующие им национальные стандарты Российской Федерации, сведения о которых приведены в дополнительном приложении А

5 ВЗАМЕН ГОСТ Р ИСО 10993.5—99

Информация об изменениях к настоящему стандарту публикуется в ежегодно издаваемом информационном указателе «Национальные стандарты», а текст изменений и поправок — в ежемесячно издаваемых информационных указателях «Национальные стандарты». В случае пересмотра (замены) или отмены настоящего стандарта соответствующее уведомление будет опубликовано в ежемесячно издаваемом информационном указателе «Национальные стандарты». Соответствующая информация, уведомление и тексты размещаются также в информационной системе общего пользования — на официальном сайте Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии в сети Интернет

© Стандартинформ, 2010

Настоящий стандарт не может быть полностью или частично воспроизведен, тиражирован и распространен в качестве официального издания без разрешения Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии

Содержание

1 Область применения . . . 1
2 Нормативные ссылки . . . 1
3 Термины и определения . . . 1
4 Подготовка образцов . . . 2
5 Линии клеток . . . 3
6 Культуральная среда . . . 4
7 Приготовление маточной клеточной культуры . . . 4
8 Методы исследования . . . 4
9 Отчет об исследовании . . . 7
10 Оценка результатов . . . 7
Приложение А (справочное) Сведения о соответствии национальных стандартов Российской Федерации ссылочным международным стандартам . . . 8

Введение

Соблюдение положений стандартов серии ИСО 10993 «Оценка биологического действия медицинских изделий» позволит обеспечить системный подход к исследованию биологического действия медицинских изделий.

Целью этих стандартов не является безусловное закрепление единообразных методов исследований и испытаний за группами однородных медицинских изделий в соответствии с принятой классификацией их по виду и длительности контакта с организмом человека. Поэтому планирование и проведение исследований и испытаний должны осуществлять специалисты, имеющие соответствующую подготовку и опыт в области санитарно-химической, токсикологической и биологической оценок медицинских изделий.

Стандарты серии ИСО 10993 являются руководящими документами для прогнозирования и исследования биологического действия медицинских изделий на стадии выбора материалов, предназначенных для их изготовления, а также для исследований готовых изделий.

В серию ИСО 10993 входят следующие части под общим названием «Оценка биологического действия медицинских изделий»:

Часть 1 — Оценка и исследования;

Часть 2 — Требования к обращению с животными;

Часть 3 — Исследования генотоксичности, канцерогенности и токсического действия на репродуктивную функцию;

Часть 4 — Исследование изделий, взаимодействующих с кровью;

Часть 5 — Исследования на цитотоксичность: методы *in vitro*;

Часть 6 — Исследование местного действия после имплантации;

Часть 7 — Остаточное содержание этиленоксида после стерилизации;

Часть 9 —Основные принципы идентификации и количественного определения потенциальных продуктов деградации;

Часть 10 — Исследование раздражающего и сенсибилизирующего действия;

Часть 11 — Исследование общетоксического действия;

Часть 12 — Приготовление проб и стандартные образцы;

Часть 13 — Идентификация и количественное определение продуктов деградации полимерных медицинских изделий;

Часть 14 — Идентификация и количественное определение продуктов деградации изделий из керамики;

Часть 15 — Идентификация и количественное определение продуктов деградации изделий из металлов и сплавов;

Часть 16 — Моделирование и исследование токсикокинетики продуктов деградации и вымывания;

Часть 17 — Установление пороговых значений для вымываемых веществ;

Часть 18 — Исследование химических свойств материалов;

Часть 19 — Исследование физико-химических, морфологических и топографических свойств материалов;

Часть 20 — Принципы и методы исследования иммунотоксического действия медицинских изделий.

По причине широкого применения исследований цитотоксичности *in vitro* и распространенности их использования при оценке широкого круга медицинских изделий и материалов, целью настоящего стандарта ИСО 10993 является не обозначение одного исследования, а, скорее, определение схемы испытаний, которая требует принятия решений посредством серии шагов. Такой подход должен привести к выбору наиболее подходящего исследования.

Приводятся три категории исследований: экстракционный метод, метод прямого контакта и метод опосредованного контакта.

Выбор одной или нескольких из этих категорий зависит от характера оцениваемого образца, потенциального места использования и характера использования.

Затем этот выбор определяет детали приготовления испытуемых образцов, приготовление клеточных культур, а также способ, при помощи которого клетки подвергаются воздействию образцов или их экстрактов.

В конце периода воздействия проводится оценка наличия и степени эффекта цитотоксичности. Настоящий стандарт ИСО 10993 намеренно предоставляет свободу при выборе типа оценки. Такая

стратегия делает доступными целый ряд испытаний, что отражает подход многих групп, поддерживающих биологические испытания *in vitro*.

Многочисленные используемые методы и конечные точки, измеряемые при определении цитотоксичности, могут быть объединены в категории по типу оценки:

a) оценка повреждения клеток морфологическим способом;
b) оценка повреждения клеток;
c) оценка роста клеток;
d) оценка специфических аспектов клеточного метаболизма.

Следовательно, существует несколько альтернативных способов получения результатов в каждой из этих четырех категорий. Исследователь должен быть осведомлен о категориях испытаний, а также знать, к какой из них относится определенная методика, для того, чтобы проводить сравнения с другими результатами на схожих медицинских изделиях или материалах и для проведения межлабораторных испытаний.

При планировании испытаний необходимо учитывать природу испытуемого материала. Многие факторы оказывают значительное влияние на тест-систему, что может привести к ложным результатам. Например, известно, что натуральный латекс может стимулировать неблагоприятную биологическую реакцию в клетках млекопитающих из-за содержания природных растительных протеинов, что не исключает его применения в медицинских изделиях при условии отсутствия раздражающего и сенсибилизирующего действия.

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ИЗДЕЛИЯ МЕДИЦИНСКИЕ
ОЦЕНКА БИОЛОГИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ МЕДИЦИНСКИХ ИЗДЕЛИЙ

Часть 5

Исследования на цитотоксичность: методы *in vitro*

Medical devices. Biological evaluation of medical devices.
Part 5. Tests for *in vitro* cytotoxicity

Дата введения — 2010—09—01

1 Область применения

Настоящий стандарт устанавливает методы исследования цитотоксичности медицинских изделий *in vitro*.

Данные методы предусматривают проведение инкубации клеточной культуры непосредственно либо путем диффузии:

a) с экстрактами из изделия и (или)

b) в контакте с изделием.

Данные методы разработаны для определения *in vitro* биологической реакции клеток млекопитающих по определенным биологическим параметрам.

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы нормативные ссылки на следующие стандарты, содержащие положения, которые могут рассматриваться как разделы настоящего стандарта.

ИСО 10993-1 Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 1. Оценка и исследования

ИСО 10993-12:1996 Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 12. Приготовление проб и стандартные образцы

3 Термины и определения

В настоящем стандарте применены термины по ИСО 10993-1, а также следующие термины с соответствующими определениями:

3.1 **отрицательный контрольный образец:** Материал, который, подвергаясь исследованию в соответствии с настоящим стандартом, не проявляет цитотоксичности.

Примечание — Назначение отрицательного контрольного образца — продемонстрировать фоновую реакцию клеток, например, в качестве отрицательного контрольного образца использовались полиэтилен высокой плотности[1)] — для синтетических полимеров, стержни из окиси алюминия и керамики — для стоматологических материалов.

[1)] Полиэтилен высокой плотности может быть приобретен в Фармакопее США (Rockville, Maryland, USA) и FDA, Исследовательском Институте Хатано (Ochiai 729-5, Hadanoshi, Kanagawa 257-Japan). Эта информация приведена для удобства пользователя настоящим стандартом и не является рекламой этой продукции со стороны ИСО.

Издание официальное

3.2 **положительный контрольный образец:** Материал, который, подвергаясь исследованию в соответствии с настоящим стандартом, проявляет цитотоксичность, при этом результаты воспроизводимы.

Примечание — Назначение положительного контрольного образца — продемонстрировать соответствующую реакцию тест-системы. Например, стабилизированный оловоорганический поли(винилхлорид)[1)] используют в качестве положительного контрольного образца для твердых материалов и экстрактов, разведения фенола — в качестве положительного контрольного образца для экстрактов.

3.3 **контроль реактива:** Модельная среда без исследуемого материала, которая подвергается воздействию условий и процедур исследования.

Примечание — Для целей настоящего стандарта это определение заменяет приведенное в ИСО 10993-12, пункт 3.1.

3.4 **посуда для культуры:** Посуда, приемлемая для культуры клеток, включая стеклянные чашки Петри, пластмассовые чашки для культуры, пластмассовые флаконы для культуры или пластмассовые планшеты и микротитровальные пластины.

Примечание — Используют посуду, соответствующую требованиям класса ткани и подходящую для использования с клетками млекопитающих.

3.5 **субконфлуэнтность:** Примерно 80 % конфлуэнтности, т.е. завершение логарифмической фазы роста.

4 Подготовка образцов

4.1 Основные положения

Исследование проводят:

a) на экстракте из материала и (или)

b) на самом материале.

Материал должен представлять собой конечный продукт или часть конечного продукта, предназначенного для применения. Подготовка образцов должна быть в соответствии с ИСО 10993-12.

4.2 Приготовление экстрактов из материала

4.2.1 Принципы экстракции

Условия приготовления экстрактов должны приближаться к условиям клинического применения, но быть более жесткими, чтобы определить потенциальную токсическую опасность, не вызывая значительных изменений в исследуемом материале, таких как сплавление, плавление или растворение кусочков материала, или изменение химической структуры.

Примечание — Концентрация любого эндогенного или экстрагенного вещества в экстракте, а, следовательно, число подвергающихся воздействию исследуемых клеток зависит от площади контакта, объема модельной среды, pH, химической растворимости, скорости диффузии, осмомоляльности, встряхивания, температуры, времени и других факторов.

4.2.2 Модельная среда

Для исследования проб на клетках млекопитающих необходимо использовать следующие модельные среды:

a) культуральную среду с сывороткой;

b) культуральную среду без сыворотки;

c) физиологический солевой раствор;

d) другую подходящую модельную среду.

Примечание — Модельные среды представлены по мере убывания степени предпочтительности. Выбор растворителя должен отражать цель экстракции, причем необходимо рассмотреть использование и полярного, и неполярного растворителей. К другим подходящим модельным средам относят очищенную воду, растительное масло и диметилсульфоксид (ДМСО). ДМСО известен как цитотоксичный в определенных тест-системах при концентрации, превышающей 0,5 % общего объема.

[1)] Оловоорганический поли(винилхлорид) в качестве положительного контрольного образца можно приобрести в SIMS Portex Ltd, Hythe, Kent, CT21 6JL, UK, (продукт № 499-300-000). Полиуретаны ZDEC и ZDBC доступны от FDA, Исследовательского Института Хатано (Ochiai 729-5, Hadanoshi, Kanagawa 257 — Japan). Эта информация приведена для удобства пользователя настоящим стандартом и не является рекламой этой продукции со стороны ИСО.

4.2.3 Условия приготовления экстракта

4.2.3.1 Приготовление экстрактов следует проводить в стерильных, химически инертных закрытых контейнерах с соблюдением правил асептики в соответствии с ИСО 10993-12.

4.2.3.2 Рекомендуемыми условиями экстракции являются:

a) не менее 24 ч при (37 ± 2) °С;

b) (72 ± 2) ч при (50 ± 2) °С;

c) (24 ± 2) ч при (70 ± 2) °С;

d) (1 ± 0,2) ч при (121 ± 2) °С.

Рекомендуемые условия применяют в соответствии с характеристиками изделия и конкретными условиями использования. Методы экстракции с использованием культуральной среды с сывороткой могут применяться только при условиях, приведенных в 4.2.3.2, перечисление a).

4.2.3.3 Если экстракт (перед контактом с клетками) фильтруют, центрифугируют или обрабатывают каким-либо другим способом, это необходимо внести в окончательный отчет в соответствии с разделом 9. Подбор pH экстракта также заносят в отчет. Манипуляции с экстрактом, например подбор pH, могут повлиять на результат.

4.3 Приготовление материала для исследования методом прямого контакта

4.3.1 Материалы различных форм, размеров или физических состояний (например, жидкое или твердое) в исследованиях на цитотоксичность изучают без изменений.

Желательно, чтобы хотя бы одна из сторон твердого образца была плоской. Другие формы и физические состояния требуют внесения изменений в образец.

4.3.2 Следует учитывать стерильность образца.

4.3.2.1 С исследуемыми материалами стерилизованных изделий обращаются с соблюдением условий асептики в течение всего процесса исследования.

4.3.2.2 Исследуемые материалы изделий, которые выпускают нестерильными, но подвергают стерилизации перед применением, стерилизуют методом, рекомендованным изготовителем, и применяют с соблюдением условий асептики в течение всего процесса исследования.

Воздействие методов стерилизации и стерилизующих агентов на изделие принимают во внимание при выборе процедуры приготовления исследуемого материала до его использования в тест-системе.

4.3.2.3 Исследуемые материалы изделий, которые могут применяться нестерильными, используют в таком виде, в каком они выпускаются, процесс приготовления экстрактов проводят с соблюдением условий асептики в течение всего процесса исследования.

4.3.3 Жидкости исследуют:

a) прямым осаждением или

b) осаждением на биологически инертную абсорбирующую матрицу.

Примечание — Для этой цели подходят фильтровальные диски.

4.3.4 Если необходимо, материалы, являющиеся суперабсорбентами в соответствии с классификацией, погружают в культуральную среду перед исследованием, чтобы избежать сорбции культуральной среды в сосуде, используемом для исследования.

5 Линии клеток

5.1 Обычно используют известные линии клеток из известных источников[1)].

5.2 Если требуется особая чувствительность, используют лишь первичные клеточные культуры, линии клеток и культуры органического типа, полученные непосредственно из живых тканей, если можно продемонстрировать воспроизводимость и точность ответной реакции.

5.3 Если маточная культура линии клеток сохраняется, то ее содержат при температуре минус 80 °С или ниже в соответствующей культуральной среде, содержащей вещество, защищающее от воздействия низких температур (криопротектор), например, диметилсульфоксид или глицерол. Длительное хранение (от нескольких месяцев до многих лет) возможно только при температуре минус 130 °С или ниже.

5.4 Для исследования используют лишь клетки, не содержащие микоплазму.

Перед использованием маточные культуры исследуют надежным методом, чтобы убедиться в отсутствии микоплазмы.

[1)] Например, рекомендуемыми линиями клеток являются American Type Culture Collection CCL 1 (NCTC клон 929), CCL 163 (Balb/3T3 клон A31), CCL 171 (MRC-5) и CCL 75 (WI-38), CCL 81 (Vero) и CCL 10 [(BHK-21 (C-13)] и V-79 379A. Эта информация приводится для удобства пользователя настоящим стандартом и не является рекламой этой продукции со стороны ИСО. Возможно использование других линий клеток, если доказано, что они приводят к таким же или более релевантным результатам.

6 Культуральная среда

6.1 Культуральная среда должна быть стерильной.

6.2 Культуральная среда с сывороткой или без нее должна соответствовать условиям, требованиям роста или поддержания жизнеспособности определенной линии клеток.

Примечание — Можно включить в состав среды антибиотики, убедившись, что они не оказывают неблагоприятного воздействия на пробы.

Стабильность культуральной среды может различаться в зависимости от композиции и условий хранения. Среду, содержащую сыворотку и глютамин, хранят при температуре от 2 °С до 8 °С не более 7 сут. Среду без сыворотки, содержащую глютамин, хранят при температуре от 2 °С до 8 °С не более двух недель.

6.3 pH культуральных сред поддерживают на уровнях 7,2 и 7,4.

7 Приготовление маточной клеточной культуры

7.1 Используя выбранную линию и культуральную среду, готовят достаточное число клеток для проведения исследования. Если клетки должны быть выращены из культур, взятых из хранилища, необходимо удалить криопротектор при его наличии. Перед использованием клеточную культуру пересевают хотя бы один раз.

7.2 Клетки удаляют и вновь приводят во взвешенное состояние путем ферментной и/или механической дезагрегации, используя наиболее подходящий метод для клеток каждой линии.

8 Методы исследования

8.1 Число дублей

Для исследуемых проб и контроля необходимо использовать не менее трех дублей.

8.2 Испытание экстрактов

8.2.1 Это испытание позволяет оценить цитотоксичность качественно и количественно.

8.2.2 Определенное количество постоянно перемешиваемой клеточной суспензии капают в каждый из достаточного числа сосудов для экспонирования с экстрактом. Равномерно распределяют клетки по поверхности каждого сосуда легким вращением.

8.2.3 Культуры инкубируют при температуре (37 ± 2) °С в воздухе в присутствии 5 % (доля объема) двуокиси углерода или без нее в соответствии с выбранной для культуральной среды буферной системой.

Исследование можно осуществлять на субконфлюэнтном монослое, клетки которого прикрепляются к какому-либо твердому субстрату, или на свежесуспендированных клетках.

При оценке образования колоний следует использовать соответственно низкую плотность клеток.

8.2.4 Перед началом исследования субконфлуэнтность и морфологию культур проверяют с помощью микроскопа.

8.2.5 Проводят исследование.

a) на исходном экстракте и

b) серии разведений экстрактов, используя как разбавитель культуральную среду.

Если в исследовании используют монослой, то культуральную среду следует удалить и добавить кратное количество экстракта или его разведения в каждый из сосудов.

Если в исследовании используют суспензионные клетки, то добавляют экстракт или его разведение в каждый из дублирующих сосудов сразу же после приготовления клеточной суспензии.

8.2.6 Когда используют не изотонический экстракт, например воду, испытывают экстракт при наиболее физиологически совместимой концентрации после разведения в культуральной среде.

Примечание — Рекомендуется использовать концентрированную культуральную среду, например 2х, 5х, для разведения водных экстрактов.

8.2.7 Добавляют определенное количество пустого реактива, отрицательного и положительного контрольных образцов в дополнительные дублирующие сосуды.

Примечание — Контроль свежей культуральной среды при необходимости подвергают исследованию.

8.2.8 Сосуды инкубируют, используя условия, описанные в 8.2.3, в течение периода времени, соответствующего специфическим условиям конкретной пробы.

8.2.9 После периода инкубации, длительностью по меньшей мере 24 ч, определяют эффект цитотоксичности в соответствии с 8.5.

8.3 Испытание методом прямого контакта

8.3.1 Это испытание позволяет осуществить качественную и количественную оценки цитотоксичности.

8.3.2 Определенное количество постоянно перемешиваемой клеточной суспензии капают в каждый из достаточного числа сосудов для прямого воздействия на исследуемый образец. Клетки равномерно распределяют по поверхности каждого сосуда, осторожно вращая сосуд в горизонтальной плоскости.

8.3.3 Культуру инкубируют при температуре (37 ± 2) °С в воздухе в присутствии 5 % (доля объема) двуокиси углерода или без него в соответствии с выбранной для культуральной среды буферной системой до тех пор, пока культуры не вырастут до субконфлуэнтности.

8.3.4 Перед началом исследования субконфлуэнтность и морфологию культур проверяют с помощью микроскопа.

8.3.5 Удаляют культуральную среду. Затем в каждый сосуд доливают свежую культуральную среду.

8.3.6 Осторожно помещают исследуемые образцы на клеточный слой в центре каждого дублирующего сосуда и убеждаются в том, что образец покрывает приблизительно 1/10 поверхности клеточного слоя.

Проявляют осторожность для предотвращения нежелательного движения образцов, поскольку оно может привести к физическому повреждению клеток, например их смещению.

Примечание — При необходимости образец перед добавлением клеток помещают в сосуд.

8.3.7 Готовят дублирующие сосуды для отрицательного и положительного контрольных образцов.

8.3.8 Сосуды инкубируют в условиях, описанных в 8.3.3, в течение необходимого периода времени (не менее 24 ч), соответствующего специфическим условиям конкретной пробы.

8.3.9 Надосадочную культуральную среду сливают и определяют цитотоксический эффект в соответствии с 8.5.

8.4 Испытание методом непрямого контакта

8.4.1 Испытание методом диффузии на агаре

8.4.1.1 Это исследование используют для качественной оценки цитотоксичности. Исследование непригодно для вымываемых веществ, которые не могут диффундировать через слой агара или которые вступают в реакцию с агаром.

8.4.1.2 Для исследования капают определенное количество постоянно перемешиваемой клеточной суспензии в каждый из достаточного числа дублирующих сосудов. Клетки равномерно распределяют по поверхности каждого сосуда, осторожно вращая сосуды в горизонтальном направлении.

8.4.1.3 Культуры инкубируют при температуре (37 ± 2) °С в воздухе с 5 % (доля объема) двуокиси углерода или без нее в соответствии с выбранной для культуральной среды буферной системой до тех пор, пока культуры не вырастут приблизительно до конфлуэнтности в конце логарифмической фазы кривой роста.

8.4.1.4 Перед началом исследования субконфлуэнтность и морфологию культур проверяют с помощью микроскопа.

8.4.1.5 Удаляют из сосуда культуральную среду. Затем смешивают свежую культуральную среду, содержащую сыворотку с растопленным агаром, чтобы окончательная концентрация агара составляла от 0,5 % до 2 %, и вносят соответствующий объем в каждый сосуд. Используют исключительно агар, который подходит для выращивания клеток млекопитающих в культуре. Смесь культуральной среды с агаром должна находиться в жидком состоянии, при температуре, совместимой с температурой клеток млекопитающих.

Примечание — Доступен агар с достаточным диапазоном молекулярной массы и чистоты.

8.4.1.6 Осторожно помещают несколько исследуемых образцов на отвердевший слой агара в каждый сосуд. Убеждаются, что образец покрывает приблизительно 1/10 поверхности клеточного слоя.

Все абсорбирующие материалы до помещения на агар следует предварительно поместить в культуральную среду во избежание дегидратации агара.

8.4.1.7 Готовят дублирующие сосуды с обоими препаратами отрицательного и положительного контрольных образцов.

8.4.1.8 Сосуды инкубируют в условиях, описанных в 8.4.1.3, от 24 до 72 ч.

8.4.1.9 Осматривают клетки для определения цитотоксичности до и после осторожного удаления образцов с поверхности агара. Использование витальной окраски, например нейтрального красного, может способствовать обнаружению цитотоксичности. Витальный краситель можно добавлять до или после инкубации с образцом. Если краситель добавлен перед инкубацией, то культуры защищают от воздействия света во избежание повреждения клеток вследствие фотоактивации витального красителя.

8.4.2 Испытание методом диффузии на фильтре

8.4.2.1 Это исследование используют для качественной оценки цитотоксичности.

8.4.2.2 Свободный от поверхностно-активных веществ фильтр с размером пор 0,45 мкм помещают в каждый сосуд и добавляют определенное количество постоянно перемешиваемой клеточной суспензии в каждый из достаточного числа дублирующих сосудов для испытания. Осторожным вращением клетки равномерно распределяют по поверхности каждого фильтра.

8.4.2.3 Культуры инкубируют при температуре (37 ± 2) °С в воздухе в присутствии 5 % (доля объема) двуокиси углерода или без нее в соответствии с выбранной для культуральной среды буферной системой до тех пор, пока культуры не вырастут приблизительно до конфлуэнтности в конце логарифмической фазы кривой роста.

8.4.2.4 Перед началом исследования субконфлуэнтность и морфологию культур проверяют с помощью микроскопа.

8.4.2.5 Удаляют из сосудов культуральную среду. Затем фильтр стороной, на которой находятся клетки, помещают на слой застывшего агара (см. 8.4.1.6).

8.4.2.6 Осторожно помещают дублирующие исследуемые образцы на верхнюю (без клеток) сторону фильтра. Жидкие экстракты и свежесмешанные смеси помещают на фильтр.

8.4.2.7 Готовят дублирующие фильтры с препаратами отрицательного и положительного контрольных образцов.

8.4.2.8 Сосуды инкубируют в условиях, описанных в 8.4.2.3 , в течение 2 ч ± 10 мин.

8.4.2.9 Осторожно удаляют образцы с фильтра и отделяют фильтр от поверхности агара.

8.4.2.10 Определяют цитотоксичность, используя соответствующую методику окрашивания.

8.5 Определение цитотоксичности

8.5.1 Определяют цитотоксичность методом качественной или количественной оценки.

a) Качественная оценка: осматривают клетки через микроскоп, при желании используя цитохимическую окраску, чтобы оценить изменения, например изменение общей морфологии, вакуолизацию, расщепление, лизис клеток и целостность мембран. Отклонение от нормальной морфологии регистрируют в отчете об исследовании описательно или цифрами. В таблице 1 приведен удобный способ оценки испытуемых материалов.

Таблица 1

Шкала цитотоксичности	Интерпретация
0	Не цитотоксичный
1	Легкая цитотоксичность
2	Средняя цитотоксичность
3	Значительная цитотоксичность

Описывают метод оценки в отчете. Метод и результаты оценки должны быть включены в отчет об исследовании.

b) Количественная оценка: измеряют число погибших клеток, замедление роста клеток, пролиферацию клеток или образование колоний. Число клеток, количество белка, высвобождение ферментов, высвобождение или сокращение витальной окраски или другой измеримый параметр могут быть количественно оценены с помощью объективных средств. Объективные средства и результат регистрируют в отчете об исследовании.

Примечание — Для отдельных методов определения может потребоваться нулевое время или базовая контрольная линия клеточной культуры.

8.5.2 Необходимо убедиться в тщательности выбора методов исследования, так как результаты исследования могут оказаться недействительными, если исследуемый образец выделяет вещества, создающие помехи в тест-системе или в измерении.

Примечание — Материалы, которые могут выделять формальдегид, возможно достоверно исследовать только при оценке жизнеспособности клеток.

8.5.3 При наличии очевидных различий в результатах исследований между дублирующими сосудами с клеточной культурой исследование следует считать неприемлемым или неудовлетворительным.

8.5.4 Если отрицательный, положительный контрольные образцы или любой другой контроль (эталонный контроль, контроль среды, пустой, контроль реактива и т. д.) не вызывают ожидаемого ответа в тест-системе, то испытания повторяют.

9 Отчет об исследовании

В отчете об исследовании должны быть приведены следующие детали:

a) описание образца;

b) линии клеток и обоснование выбора;

c) культуральная среда;

d) метод проб и обоснование;

e) процедура экстракции по применимости и, по возможности, характер и концентрация вымываемых веществ;

f) отрицательный, положительный контрольные образцы и контроли других видов;

g) клеточный ответ и другие наблюдения;

h) любые соответствующие данные, необходимые для оценки результатов.

10 Оценка результатов

Общие результаты исследования должны оцениваться лицами, способными принимать обоснованные решения на основе данных исследования. Если результаты среди дубликатов не являются последовательными или недействительны, исследование повторяют.

Приложение А
(справочное)

Сведения о соответствии национальных стандартов Российской Федерации ссылочным международным стандартам

Таблица А.1

Обозначение ссылочного международного стандарта	Обозначение и наименование соответствующего национального стандарта
ИСО 10993-1	ГОСТ Р ИСО 10993-1—2009 Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 1. Оценка и исследования
ИСО 10993-12	ГОСТ Р ИСО 10993-12—2009 Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 12. Приготовление проб и контрольные образцы

УДК 615.46:002:006.354 ОКС 11.100.20 Р20 ОКП 94 4000

Ключевые слова: медицинские изделия, цитотоксичность, исследования, субконфлуэнтность, исследования *in vitro*

Редактор *О.А. Стояновская*
Технический редактор *Н.С. Гришанова*
Корректор *Ю.М. Прокофьева*
Компьютерная верстка *И.А. Налейкиной*

Сдано в набор 17.08.2010. Подписано в печать 01.09.2010. Формат 60 × 84 1/8. Бумага офсетная. Гарнитура Ариал.
Печать офсетная. Усл. печ. л. 1,86. Уч.-изд. л. 1,20. Тираж 89 экз. Зак. 682.

ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ», 123995 Москва, Гранатный пер., 4.
gost.e-ecolog.ru gost.e-ecolog.ru
Набрано во ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ» на ПЭВМ.
Отпечатано в филиале ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ» — тип. «Московский печатник», 105062 Москва, Лялин пер., 6.

gost.e-ecolog.ru