ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Изделия медицинские

ОЦЕНКА БИОЛОГИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ МЕДИЦИНСКИХ ИЗДЕЛИЙ

Часть 5

Исследование на цитотоксичность: методы in vitro

Издание официальное

БЗ 12—99/692

ГОССТАНДАРТ РОССИИ
Москва

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

1 РАЗРАБОТАН Всероссийским научно-исследовательским и испытательным институтом медицинской техники (ВНИИИМТ)

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

2 ПРИНЯТ И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ Постановлением Госстандарта России от 29 декабря 1999 г. № 862-ст

3 Настоящий стандарт, за исключением приложения А, представляет собой аутентичный текст международного стандарта ИСО 10993.5—92 «Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 5. Исследование на цитотоксичность: методы in vitro»

4 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

© ИПК Издательство стандартов, 2000

Настоящий стандарт не может быть полностью или частично воспроизведен, тиражирован и распространен в качестве официального издания без разрешения Госстандарта России

Содержание

1 Область применения 1
2 Нормативные ссылки 1
3 Определения 1
4 Приготовление образца 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 Исследование на токсичность на суспензионной кратковременной культуре подвижных клеток 8
Приложение Б Библиография 10

Введение

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

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

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

В стандарты серии ГОСТ Р ИСО 10993, имеющие групповой заголовок «Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий», входят:

- часть 1 — оценка и исследования;
- часть 3 — исследование генотоксичности, канцерогенности и токсического действия на репродуктивную функцию;
- часть 4 — исследование изделий, взаимодействующих с кровью;
- часть 5 — исследование 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 деструкции;
- 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 деструкции полимерных медицинских изделий;
- часть 16 — моделирование и исследование токсикокинетики продуктов деструкции и вымывания.

В настоящем стандарте приведены методы изучения цитотоксичности in vitro: экстракционный, метод прямого контакта и метод опосредованного контакта.

Выбор метода изучения определяет детали приготовления образцов для исследований на клеточных культурах, а также способ, при помощи которого клетки подвергают воздействию образцов или их экстрактов.

Методы исследования, приведенные в стандарте, взяты из международных, национальных стандартов, директив и нормативов.

Одна из методик исследований на токсичность на суспензионной кратковременной культуре подвижных клеток, применяемая в России, приведена в приложении А.

Допускается применять другие методы, обеспечивающие оценку биологического действия медицинских изделий в соответствии с требованиями международных стандартов.

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Изделия медицинские

ОЦЕНКА БИОЛОГИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ МЕДИЦИНСКИХ ИЗДЕЛИЙ

Часть 5
Исследование на цитотоксичность: методы in vitro

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

Дата введения 2002—01—01

1 Область применения

Настоящий стандарт устанавливает методы исследования цитотоксичности медицинских изделий in vitro: экстракционный метод прямого контакта, и метод опосредованного контакта. Выбор одного или более методов изучения зависит от природы образца, подлежащего исследованию, участка предполагаемого применения и характера использования.

Данные методы предусматривают проведение инкубации клеточной культуры либо непосредственно, либо путем диффузии, с вытяжками из изделия, и (или) 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 ссылки на следующие стандарты, содержащие положения, которые могут рассматриваться как разделы настоящего стандарта.

ГОСТ Р ИСО 10993.1—99 Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Оценка и исследования

ГОСТ Р ИСО 10993.12—99 Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Приготовление проб и стандартные образцы

3 Определения

В настоящем стандарте используют термины, приведенные в ГОСТ Р ИСО 10993.1 и ГОСТ Р ИСО 10993.12, а также следующие определения:

3.1 **материал отрицательного контроля:** Материал, который, подвергаясь исследованию в соответствии с настоящим стандартом, не проявляет цитотоксичности.

Примечание — Цель отрицательного контроля — продемонстрировать фоновую реакцию клеток, например полиэтилен высокой плотности — для синтетических полимеров, а стержни из окиси алюминия и керамики — для стоматологических материалов.

3.2 **материал положительного контроля:** Материал, который, подвергаясь исследованию в соответствии с настоящим стандартом, проявляет цитотоксичность, при этом результаты воспроизводимы.

Примечание — Цель положительного контроля — продемонстрировать соответствующую реакцию тест-системы. Например, стабилизированный оловоорганический поливинилхлорид используют в качестве положительного контроля для материалов и вытяжек, разведения фенола — в качестве положительного контроля для вытяжек.

Издание официальное

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

3.4 **посуда для культуры:** Посуда, 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.

4 Приготовление образца

4.1 Основные положения

Исследование проводят на вытяжке из материала и (или) на самом материале.

Материал должен представлять собой конечный продукт или часть конечного продукта, предназначенного для исследования.

4.2 Приготовление жидких вытяжек из материала

4.2.1 Общие требования

Условия приготовления вытяжек должны приближаться к условиям клинического применения, но быть более жесткими, чтобы определить потенциальную токсическую опасность, не вызывая значительных изменений (расплавление, или растворение кусочков материала, или изменение химической структуры).

Примечания

1 При интерпретации результатов исследований, условия которых были аггравированы, необходимо учитывать, насколько эти условия соответствуют условиям реального применения и потенциальной токсичности изделия.

2 Концентрация любого эндогенного или экстрагенного вещества в вытяжке, а следовательно, количество, подвергающееся воздействию клеток, зависит от площади контакта, объема вытяжки, pH, химической растворимости, осмомолярности, встряхивания, температуры и других факторов.

4.2.2 Модельная среда

Для исследований на клетках млекопитающих можно использовать следующие модельные среды:

- культуральную среду с сывороткой;
- культуральную среду без сыворотки;
- 9 г/л хлорида натрия в неионизированной воде;
- воду;
- другую подходящую модельную среду.

Примечание — Модельные среды представлены по мере убывания степени предпочтительности. К другим подходящим модельным средам относят растительное масло и диметилсульфоксид (ДМСО). ДМСО известен как цитотоксичный в определенных тест-системах при концентрации, превышающей 0,5 % (по объему).

4.2.3 Условия приготовления вытяжки

4.2.3.1 Приготовление вытяжки следует проводить в стерильных, химически инертных закрытых контейнерах с соблюдением асептики.

4.2.3.2 Время и температура экстракции зависят от характеристик материала и модельной среды:

а) не менее (24 ± 2) ч при (37 ± 2) °С;

б) (72 ±2) ч при (50 ± 2) °С;

в) (24 ±2) ч при (70 ± 2) °С;

г) (1 ±0,2) ч при (121 ± 2) °С.

Условия приготовления вытяжки должны по возможности имитировать условия обычного использования изделия. Наиболее предпочтительны условия приготовления вытяжки, и, в частности, условия приготовления вытяжки с использованием культуральной среды с сывороткой, приведены в перечислении а).

Рекомендованные условия можно применять в соответствии с характеристиками изделия и специфическими условиями применения.

4.2.3.3 При необходимости встряхивают сосуд с вытяжкой, регистрируют и дают пояснения в отчете.

4.2.3.4 Перед приготовлением вытяжки материал режут на маленькие кусочки. Для полимеров используют кусочки размером 10 - 15 мм. Шовный материал из оплавленного эластомера исследуют в неповрежденном виде.

4.2.3.5 Соотношение площади поверхности материала в квадратных сантиметрах и объема модельной среды в миллилитрах должно быть от 1,25 до 6,0. Площадь поверхности вычисляют на основе общего размера образца, неправильность поверхности и пористость не учитывают. Однако реальные характеристики поверхности учитывают при интерпретации результатов испытания. Если площадь поверхности определить трудно, то используют соотношение массы образца в граммах и объема модельной среды в миллилитрах лежащее в диапазоне 0,1—0,2 в соответствии с таблицей 1 ГОСТ Р ИСО 10993.12.

4.2.3.6 Вытяжки по возможности следует использовать сразу после приготовления.

Если вытяжки хранят, то стабильность вытяжек в условиях хранения следует проверить соответствующими методами.

Если вытяжку (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 вытяжки также заносят в отчет. Манипуляции с вытяжкой, 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 Стерильность образца должна соответствовать требованиям 4.3.2.1—4.3.2.3.

Соблюдают стерильность при приготовлении вытяжек и исследованиях материалов стерилизованных изделий.

4.3.2.1 Исследуемые материалы стерилизованных изделий подвергают процессу приготовления вытяжки и исследованию с соблюдением условий асептики.

4.3.2.2 Исследуемые материалы изделий, которые выпускают нестерильными, но подвергают стерилизации перед применением, стерилизуют методом, рекомендованным изготовителем. Приготовление вытяжки и исследование проводят с соблюдением асептики.

Воздействие методов стерилизации и стерилизующих агентов на изделие принимают во внимание при выборе процедуры приготовления исследуемого материала, предшествующей использованию этого материала в тест-системе.

4.3.2.3 Исследуемые материалы изделий, которые могут применяться нестерильными, используют в таком виде, в каком они выпускаются, процесс приготовления вытяжки и исследование проводят с соблюдением асептики.

4.3.3 Жидкости исследуют прямым осаждением или осаждением на биологически инертную абсорбирующую матрицу.

Примечание — Для этой цели подходят фильтровальные диски.

4.3.4 Если необходимо, материалы, которые в соответствии с классификацией являются суперадсорбентами, смачивают 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.

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

5.3 Если маточная культура линии клеток хранится, то ее хранят при температуре минус 80 °С или ниже в соответствующей клеточной среде, содержащей вещество, защищающее от воздействия низких температур, 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.

6 Культуральная среда

6.1 Культуральная среда должна быть стерильной.

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

Можно включить в состав среды антибиотики, убедившись, что они не оказывают отрицательного воздействия на исследование.

Стабильность среды культуры может различаться в зависимости от композиции и условий хранения. Среду, содержащую сыворотку и глютамин, хранят при температуре от 2 до 8 °С не более 7 сут. Среду, содержащую глютамин, хранят при температуре от 2 до 8 °С не более 1 мес.

6.3 pH культуральных сред поддерживают на уровне 7,2—7,4.

7 Приготовление маточной клеточной культуры

7.1 Используя выбранную линию, готовят соответствующее количество клеток, чтобы их хватило на все исследование. Если клетки должны быть выращены из культур, взятых из хранилища, где они хранились в присутствии агента, защищающего от воздействия низких температур, этот агент удаляют. Перед использованием клетки 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 каждой линии клеток.

8 Методы исследования

8.1 Количество дублей

Для проб и контроля необходимо использовать не менее трех дублей.

8.2 Исследование вытяжек

8.2.1 Для достижения воздействия вытяжек капают определенное количество постоянно перемешиваемой клеточной суспензии в каждый сосуд. Равномерно распределяют клетки по поверхности каждого сосуда легким вращением.

8.2.2 Выдерживают культуры при (37 ± 2) °С в воздухе в присутствии 5 % (по объему) двуокиси углерода или без нее в соответствии с выбранной для культуральной среды буферной системой.

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

При оценке образования колоний следует использовать соответственно низкую плотность клеток.

8.2.3 Осматривают культуры при помощи микроскопа.

8.2.4 Проводят исследование на самой вытяжке или серии разведений вытяжки, используя для этого культуральную среду.

Если в исследовании используют монослой, то культуральную среду следует удалить, отделить от культуры и добавить необходимое количество вытяжки или ее разведение в каждый из сосудов.

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

8.2.5 Нефизиологическую вытяжку, например воду, изучают при наиболее физиологически совместимой концентрации при разведении в культуральной среде.

Примечание — Рекомендуется использовать концентрированную культуральную среду, например 2, 5 для разведенных водных вытяжек.

8.2.6 Добавляют известные количества пустого реактива, отрицательного и положительного контроля в дополнительные дублирующие сосуды.

Примечание — Контроль в виде свежей культуральной среды при необходимости подвергают исследованию.

8.2.7 Инкубируют сосуды, используя условия, предложенные в 8.2.1, в течение периода времени, соответствующего специфическим условиям выбранного исследования.

8.2.8 После инкубации от 24 до 72 ч определяют цитотоксичность в соответствии с 8.5. Если в исследовании используют суспензионную кратковременную культуру подвижных клеток, то вытяжку помещают в сосуд перед тем, как в него добавляют клетки. После этого сразу определяют цитотоксичность при температуре и pH, совместимых с температурой и pH клеток млекопитающих.

8.3 Исследование методом прямого контакта

Это исследование позволяет осуществить качественную и количественную оценку цитотоксичности.

8.3.1 Для прямого воздействия на исследуемый образец капают известное количество постоянно помешиваемой клеточной суспензии в каждый из нужного количества сосуд. Равномерно распределяют клетки по поверхности каждого раствора, осторожно вращая сосуд в горизонтальной плоскости.

8.3.2 Инкубируют культуру при температуре (37±2) °С в воздухе в присутствии 5 % (по объему) диоксида углерода или без нее в соответствии с выбранной для культуральной среды буферной системой до тех пор, пока культура не вырастет приблизительно до соприкосновения клеток в конце логарифмической фазы кривой роста.

8.3.3 Осматривают культуру, используя микроскоп.

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

8.3.5 Осторожно помещают отдельные препараты исследуемого образца на клеточный слой в центре каждого дублирующего сосуда и убеждаются в том, что препарат покрывает $^{1}/_{10}$ поверхности клеточного образца.

Проявляют осторожность, чтобы предотвратить нежелательное движение препаратов, поскольку оно может приводить к физическому повреждению клеток, которое можно наблюдать в виде участков клеток, не достигших конца логарифмической фазы.

Примечание — При необходимости препарат помещают в сосуд перед тем, как в него добавляют клетки.

8.3.6 Готовят дублирующие сосуды для материалов отрицательного и положительного контроля.

8.3.7 Инкубируют сосуд в условиях, описанных в 8.3.2, в течение периода времени (не менее 24 ч), соответствующего специфическим условиям выбранного исследования.

8.3.8 Сливают всплывающую на поверхность культуральную среду и определяют цитотоксичность в соответствии с 8.5.

8.4 Исследование путем непрямого контакта

8.4.1 Диффузия агара

Это исследование используют для качественной оценки цитотоксичности. Исследование непригодно для вымываемых продуктов, которые не могут диффундировать через слой агара.

8.4.1.1 Для исследования капают известное количество постоянно помешиваемой клеточной суспензии в каждый из нужного количества дублирующих сосудов. Распределяют клетки равномерно по поверхности каждого сосуда, осторожно вращая сосуды в горизонтальном направлении.

8.4.1.2 Инкубируют культуры при (37 ± 2) °С в воздухе с 5 % (по объему) двуокиси углерода или без нее в соответствии с выбранной для культуральной среды буферной системой до тех пор, пока культуры не вырастут приблизительно до соприкосновения клеток в конце логарифмической фазы кривой роста.

8.4.1.3 Осматривают клетки, используя микроскоп.

8.4.1.4 Удаляют из сосуда культуральную среду. Затем готовят свежую культуральную среду, смешав сыворотку с растаявшим агаром, чтобы окончательная концентрация агара составляла от 0,5 до 2 г/л, и раскапывают соответствующий объем в каждый сосуд. Используют исключительно агар, который подходит для выращивания клеток млекопитающих в культуре. Смесь культуральной

среды с агаром должна представлять собой жидкость, температура которой должна быть совместима с температурой клеток млекопитающих.

Примечание — Возможны поставки агара с достаточным диапазоном молекулярного веса и чистоты.

8.4.1.5 Осторожно помещают несколько препаратов исследуемой пробы на отвердевший слой агара в каждый сосуд. Убеждаются, что препарат покрывает приблизительно $^{1}/_{10}$ поверхности клеточного слоя.

Все адсорбирующие материалы с культуральной средой следует смачивать перед тем, как поместить на агар, во избежание дегидратации агара.

8.4.1.6 Готовят дублирующие сосуды с препаратами отрицательного и положительного контроля.

8.4.1.7 Инкубируют сосуды в условиях, представленных в 8.4.1.2, в течение периода времени 24—72 ч.

8.4.1.8 Осматривают клетки, определяют цитотоксичность перед и после удаления препаратов с агара. Использование витальной окраски, например, нейтрального красного, способствует определению цитотоксичности. Витальную краску можно добавить до или после инкубации с препаратом. Если краска добавлена перед инкубацией, защищают культуры от воздействия света во избежание повреждения клеток вследствие фотоактивации витальной окраски.

8.4.2 Диффузия фильтра

Это исследование используют для качественной оценки цитотоксичности.

8.4.2.1 Помещают свободный от ПАВ фильтр размером пор 0,45 мм в каждый сосуд и добавляют известное количество постоянно перемешиваемой клеточной суспензии в каждый из соответствующего количества дублирующих сосудов для испытания. Осторожным вращением распределяют клетки равномерно по поверхности каждого фильтра.

8.4.2.2 Инкубируют культуры при (37 ± 2) °С в воздухе в присутствии 5 % (по объему) двуокиси углерода или без нее в соответствии с буферной системой, выбранной для культуральной среды до тех пор, пока культура не вырастет приблизительно до соприкосновения клеток в конце логарифмической фазы кривой роста.

8.4.2.3 Осматривают культуры, используя микроскоп.

8.4.2.4 Удаляют из сосудов культуральную среду. Затем фильтры стороной, на которой находятся клетки, помещают на слой отвердевшего агара (см. 8.4.1.5).

8.4.2.5 Осторожно помещают дублирующие препараты исследуемого образца на верхнюю сторону фильтра, на которой нет клеток. Жидкие экстракты и свежесмешанные смеси помещают в инертные кольца, находящиеся на фильтрах.

8.4.2.6 Готовят дублирующие фильтры с препаратами отрицательного и положительного контроля.

8.4.2.7 Инкубируют сосуды, используя условия, описанные в 8.4.2.2, в течение 2 ч ± 10 мин.

8.4.2.8 Осторожно удаляют препараты с фильтра и отделяют фильтр от поверхности агара.

8.4.2.9 Определяют цитотоксичность, используя адекватную методику окрашивания.

8.5 Определение цитотоксичности

8.5.1 Определяют цитотоксичность методом качественной или количественной оценки.

Качественная оценка: осматривают клетки через микроскоп, чтобы оценить изменения, например, изменение общей морфологии, вакуолизацию, расщепление, лизис клеток и целостность мембран. Отклонение от нормальной морфологии регистрируют в отчете об исследовании описательно (например не обнаружено, небольшие изменения, средние и очень значительные) или цифрами (например 0, 1, 2, 3). Описывают метод оценки в отчете.

Количественная оценка: измеряют количество погибших клеток, замедление роста клеток, пролиферацию клеток или образование колоний. Число клеток, количество белка, высвобождение ферментов, высвобождение витальной окраски, изменение подвижности клеток или другой измеримый параметр, который может быть количественно оценен при помощи объективных средств. Результаты регистрируют в отчете об исследовании.

Примечание — Для отдельных методов определения цитотоксичности возможно потребуется нулевое время или базовая линия клеточной культуры.

8.5.2 Убеждаются в тщательности выбора методов исследования, так как результаты исследования могут оказаться неудовлетворительными, если исследуемый препарат высвобождает вещества, которые создают помехи в тест-системе или в измерении.

Примечание — Материалы, которые выделяют формальдегид, исследуют, только определяя жизнеспособность клеток.

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

8.5.4 Если отрицательный, положительный или другой контроль (эталонный контроль, контроль среды, пустой, контроль реактива и т. д.) не имеют ожидаемого отклика в тест-системе, повторяют исследование.

9 Отчет об исследовании

В отчете об исследовании должны быть приведены:

- описание образца;
- линии клеток;
- культуральная среда;
- метод оценки;
- ход экстрагирования (если нужно) и, по возможности, природа и концентрация вымываемых веществ;
- отрицательный, положительный и другие виды контроля;
- осмотры;
- любые соответствующие данные, необходимые для оценки результатов.

10 Оценка результатов

Результаты исследования оценивают компетентные информированные лица, способные принимать решения на основе данных исследования. Если на основе полученных результатов нельзя сделать выводы, исследование повторяют.

ПРИЛОЖЕНИЕ А
(справочное)

Исследование на токсичность на суспензионной кратковременной культуре подвижных клеток

А.1 Приготовление вытяжек

А.1.1 Готовят вытяжки из конкретных изделий согласно нормативной документации.

А.2 Исследование на токсичность

А.2.1 Оборудование и реактивы

Для проведения исследования применяют:

- стенд для исследований (А.3);
- пробирки с притертой пробкой, 10 шт., объемом по 2 мл;
- дозатор пипеточный объемом 0,2; 0,1 мл;
- весы аналитические с погрешностью взвешивания не более 0,001 г;
- пинцет анатомический длиной 250 мм;
- сосуд Дьюара, 2 шт.
- термостат с максимальной температурой 50 °С;
- глюкоза, ч.д.а;
- натрий лимоннокислый трехзамещенный, ч.д.а;
- сперма быка (замороженная в жидком азоте), используют в качестве суспензионной кратковременной культуры подвижных клеток.

А.2.2 В течение эксперимента температура растворов должна быть (40 ± 1,5) °С.

А.2.3 Для определения индекса токсичности опытного раствора его сравнивают с отрицательным контрольным раствором (далее — контрольным раствором). В качестве контрольного раствора выбирают глюкозо-цитратную среду (глюкоза — 4 г, цитрат натрия — 1 г, дистиллированная вода — 100 мл).

Контрольный раствор одновременно является разбавителем для оттаивания замороженной спермы. Опытным раствором является вытяжка из изделия, доведенная до изотонии глюкозой и цитратом (глюкоза — 4 г, цитрат натрия — 1 г, вытяжка — 100 мл). Контрольный и опытный растворы по 0,4 мл помещают в пробирки с притертыми пробками и ставят в водяную баню при температуре (40 ± 1,5) °С. Контрольный и опытный растворы приготавливают заранее, за 1 ч до начала эксперимента.

А.2.4 Оттаивают замороженную сперму. Дозируют в пробирки по 0,3 или 0,4 мл разбавителя и ставят их в водяную баню при температуре (40 ± 1,5) °С. Охлажденным до температуры жидкого азота анатомическим пинцетом извлекают из сосуда Дьюара гранулу спермы и опускают в нагретый раствор. Не допускается оттаивать несколько гранул в одной пробирке!

Сразу после размораживания содержимое пробирок сливают в одну пробирку, тщательно перемешивают и получают маточный раствор спермы.

А.2.5 Для приготовления рабочих образцов в пробирки с контрольным и опытным растворами помещают по 0,1 мл маточного раствора спермы.

А.2.6 Рабочие образцы переносят в кюветы (капилляры). Кювету устанавливают в кюветодержатель (каретку) и помещают в стенд А.3.

А.2.7 Накапливают экспериментальные данные. При достижении нулевых значений показателя подвижности во всех кюветах прекращают процесс накопления данных.

А.2.8 Обрабатывают экспериментальные данные с помощью компьютера.

Для каждой пробы рассчитывают средневзвешенное время подвижности $t_{ср}$, услови. ед.

$$t_{ср} = \ln m_1 \cdot \frac{\sum_i (m_i \cdot i)}{\sum_i m_i},$$

где m_i — i-е значение показателя подвижности;

i — текущий номер оценки показателя подвижности.

Для контрольной и опытной выборок образцов вычисляют среднее арифметическое значение и среднее квадратическое отклонение, по которым в свою очередь рассчитывают для каждой выборки коэффициент вариации C, %, по формуле

$$C = \frac{\delta}{\overline{x}} \cdot 100,$$

где δ — среднее квадратическое отклонение;

$\overline{x}$ — среднее арифметическое значение.

При получении значения коэффициента вариации хотя бы для одной из выборок более 15 % эксперимент повторяют. Если коэффициент вариации для каждой из выборок меньше или равен 15 %, результаты считают статистически значимыми.

Затем вычисляют индекс токсичности *It* по формуле

$$It = \frac{\bar{t}^{o}_{ср}}{\bar{t}^{k}_{ср}} \cdot 100\%,$$

где $\bar{t}^{o}_{ср}$ и $\bar{t}^{k}_{ср}$ — средние арифметические значения средневзвешенного времени подвижности соответственно для опытной и контрольной выборок образцов.

А.2.9 Оценка результатов испытания

Исследуемую партию изделий считают нетоксичной, если индекс токсичности равен 70—120 %. Если индекс токсичности не соответствует указанному пределу, испытания повторяют. Если и в этом случае индекс токсичности не соответствует указанным пределам, партию изделий считают токсичной.

А.3 Стенд для проведения исследований

А.3.1. Назначение стенда для проведения исследований (далее — стенда)

А.3.1.1 Стенд предназначен для исследования вытяжек.

А.3.2. Технические характеристики стенда

А.3.2.1 Длина волны лазерного излучения 0,63 мкм.

А.3.2.2. Мощность лазерного излучения не менее 1 мВт.

А.3.2.3. Время одного анализа от 10 до 300 с с шагом 10 с.

А.3.2.4. Время перемещения капилляра с образцом не более 2 с.

А.3.2.5. Время обратного хода каретки не более 15 с.

А.3.2.6. Температура проб и рабочих образцов в диапазоне 35—45 °С с шагом 1 °С. Отклонение температуры от установленного значения +0,5 °С.

А.3.2.7. Основные размеры капилляра приведены на рисунке А.1.

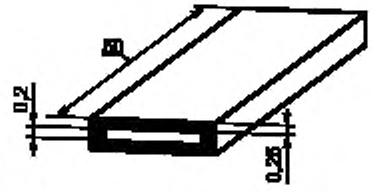


Рисунок А.1 — Капилляр

А.3.3 Краткое техническое описание стенда

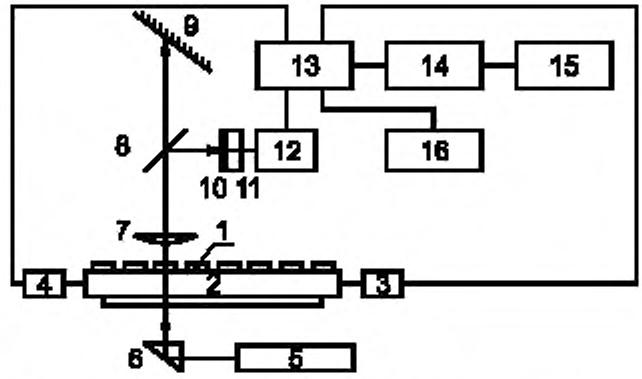
А.3.3.1. Функциональная схема стенда и приведена на рисунке А.2.

Конструктивное исполнение стенда обеспечивает одновременную оценку подвижности суспензии рабочего образца и визуальное наблюдение за клетками суспензии.

А.3.3.2. Проведение исследований

Включают стенд. С помощью компьютера задают контроллеру необходимые значения температуры каретки и блока подготовки проб, время одного анализа, количество используемых в данном эксперименте капилляров. После получения на мониторе информации о достижении заданных значений температуры готовят рабочие образцы в соответствии с А.2.5. Переносят рабочие образцы в капилляры.

Помещают капилляры с рабочими образцами на каретку и устанавливают в привод. С помощью компьютера проводят идентификацию капилляров и запускают процесс накопления экспериментальных данных. При достижении нулевых значений показателя подвижности во всех капиллярах останавливают процесс накопления экспериментальных данных и проводят их математическую обработку по алгоритмам, приведенным в А.2.8. Результаты расчетов распечатывают на принтере и записывают в базу данных. При необходимости происходящее в капиллярах с рабочими образцами наблюдают визуально на экране. Поддержание необходимой температуры каретки и на блоке подготовки проб, а также перемещение каретки осуществляют автоматически с помощью контроллера и компьютера.



1 — капилляр; *2* — каретка; *3* — привод; *4* — блок термостатирования; *5* — лазер; *6* — светоделительная пластина; *7* — микрообъектив; *8* — светоделительная пластина; *9* — экран; *10* — маска; *11* — фотодиод; *12* — усилитель; *13* — контроллер; *14* — компьютер, *15* — принтер; *16* — блок подготовки проб и рабочих образцов

Рисунок А.2 — Функциональная схема стенда

ПРИЛОЖЕНИЕ Б
(справочное)

Библиография

[1] ISO/TR 7405:1984, Biological evaluation of dental materials

[2] NF S 90—702:1988, Materiel medico-chirurgical — Evaluation in vitro de la cytotoxicite des materiaux et dispositifs medicaux

[3] NF S 91—142:1988, Implants dentaires: Cytocompatibilite — Etude de la prolifetion cellulaire

[4] NF S 91—143:1988, Implants dentaires: Cytocompatibilite — Etude des proteines cellulaires totales

[5] NF S 91—144:1988, Implants dentaires: Evaluation du relargage extra — cellulaire du ^{51}Cr

[6] NF S 91—145:1988, Implants dentaires: Cytocompatibilite — Etude de l' attachement et de l'etalement des cellules sur le biomateriau

[7] NF S 91—146:1988, Implants dentaires: Cytocompatibilite — Etude de la multiplication, la migration et l'adhesion cellulaire

[8] NF S 11—202:1989, Optique et instruments d'optique — Cytocompatibilite des lentilles de contact — Etude de la prolifiration cellulaire

[9] NF S 11—203:1989, Optique et instruments d'optique — Cytocompatibilite des lentilles de contact — Evaluation des proteines cellulaires totales

[10] NF S 11—204:1989, Optique et instruments d'optique — Cytocompatibilite des instiles de contact — Evaluation du relargage extracellulaire du ^{51}Cr

[11] NF S 11—205:1989, Optique et instruments d'optique — Cytocompatibilite des lentilles de contact — Etude de l'attachement et de l'etalement des cellules sur le biomateriau

[12] NF S 11—206:1989, Optique et instruments d'optique — Cytocompatibilite des lentilles de contact — Etude de la multiplication, la migration et l'adhesion cellulaire

[13] DIN V 13 930:1990, Biologische Prufungen von Dentalwerkstoffen

[14] BS 5736:1988, Evaluation of medical devices for biological hazards — Part 10; Method of test for toxicity to cells in culture of extracts from medical devices

[15] BS 5828:1989, Biological assessment of dental materials

[16] ASTM F813—83:1983, Standard practice for direct contact cell culture evaluation of materials for medical devices

[17] ASTM F 895—84:1984, Standard test method for agar diffusion cell culture screening for cytotoxicity

[18] U. S. Pharmacopeia XXII: Biological reactivity tests in vitro

[19] Guidance document for class III contact lenses, 1989. U. S. Food and Drug Administration

[20] AS 2696:1984, Method of testing catheters for cytotoxicity

[21] PAB Notification N. 489:1989, Approval standard of IOL in Japan

[22] ГОСТ Р 51148—98 Изделия медицинские. Требования к образцам и документации, представляемым на токсикологические, санитарно-химические испытания, испытания на стерильность и пирогенность

[23] ГОСТ Р 50855—96 Контейнеры для крови и ее компонентов. Требования химической и биологической безопасности и методы испытаний

УДК 615.46:002:006.354 ОКС 11.020 Р20 ОКСТУ 9403

Ключевые слова: медицинские изделия, исследования, биологические исследования, вытяжка, цитотоксичность, культура клеток

Редактор *Р. С. Федорова*
Технический редактор *О. Н. Власова*
Корректор *С. И. Фирсова*
Компьютерная верстка *З. И. Мартыновой*

Изд. лиц. № 02354 от 14.07.2000. Сдано в набор 17.07.2000 Подписано в печать 14.08.2000. Усл. печ. л. 1,86. Уч.-изд. л. 1,35.
Тираж 186 экз. С 5622. Зак. 1866.

ИПК Издательство стандартов,107076, Москва, Колодезный пер., 14.
Набрано в Калужской типографии стандартов на ПЭВМ.
Калужская типография стандартов, 248021, Калуга, ул. Московская, 256.
ПЛР № 040138

gost.e-ecolog.ru