Министерство здравоохранения СССР

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

Методические рекомендации

Москва - 1987 г.

gost.e-ecolog.ru

Методические рекомендации предназначены для скрининга полимерных материалов и изделий медицинского назначения. Данный метод позволяет автоматически произвести количественную оценку токсичности водных вытяжек 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., Каюмов Р.И., Гурилев О.М., Соколов А.В., Филатов А.В.

УТВЕРЖДАЮ

Начальник Управления по внедрению новых лекарственных средств и медицинской техники

М.Г.Бобков

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] :

I) 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, IO] . 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.

I. Тест-объект

В качестве тест-объекта используется замороженная в парах 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 доливается 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 флуктуации интенсивности рассеянного излучения, вызванных прохождением клеток через оптический зонд.

3. Оборудование

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

2. Печатающее устройство УВВПЧ-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

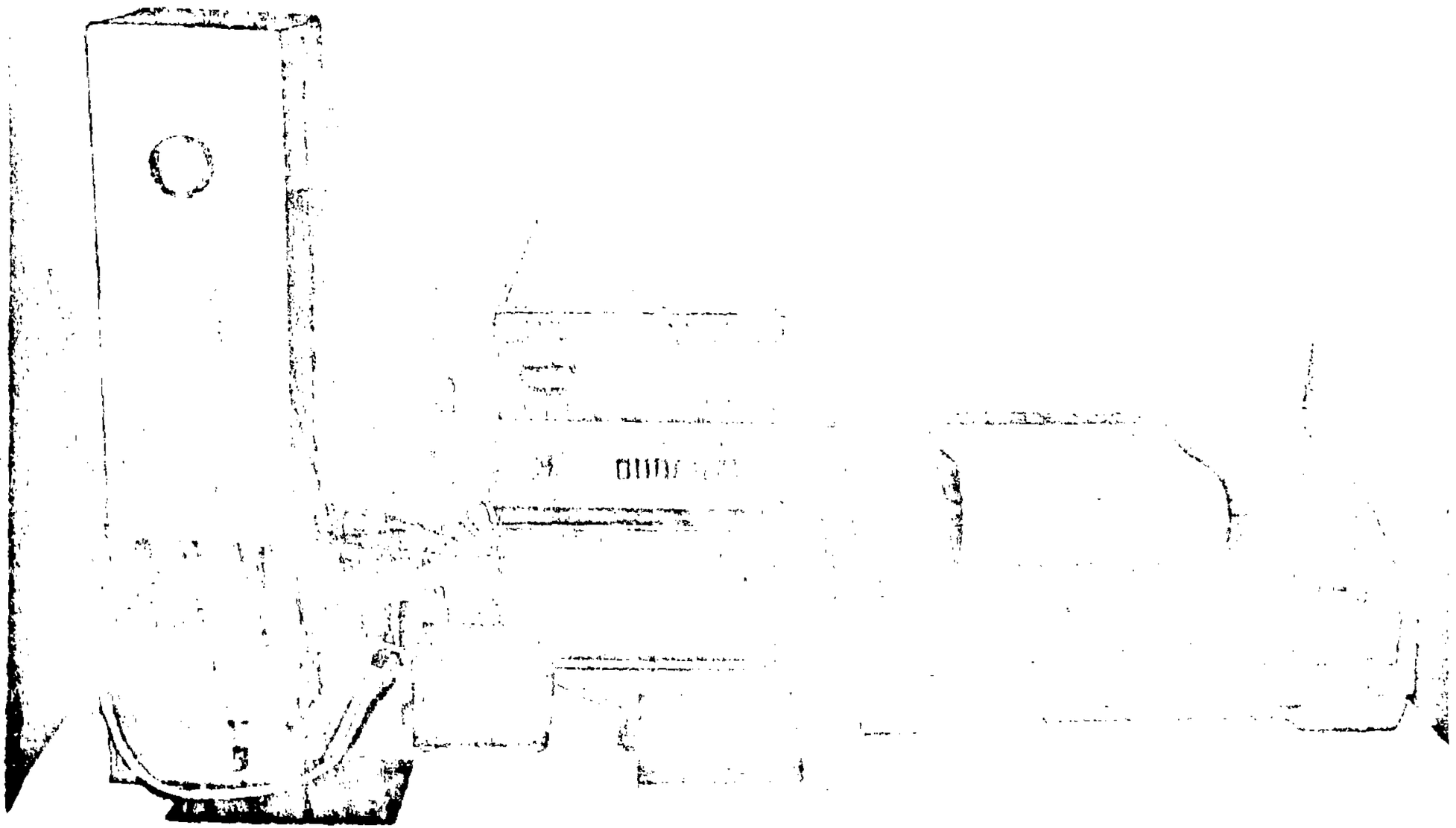


Рис. I

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 ± 0,5°С.

5. Этапы исследования, их последовательность

5.I. Приготовление вытяжек из полимерных материалов

Модельная среда - дистиллированная вода.

Экстракты из полимерных материалов или изделий приготавливаются 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 I00 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 I00 мл вытяжки добавляют 4 г глюкозы и 0,58 г цитрата натрия. Затем дозируют по I мл контрольный и испытуемый растворы в пробирки и ставят их в водяную баню при температуре +40°С. 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°С. 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 (t ср.) характеризует среднее время подвижности суспензии сперматозоидов:

$$t_{i\,ср.} = \frac{\sum_j m_{ij} \cdot j}{\sum_j m_{ij}}$$

где i – порядковый номер кюветы,

j – порядковый номер оценки подвижности в i-той кювете.

Затем вычисляется индекс токсичности I_T

$$I_T = \frac{\bar{t}_{ср.}^{\,опыт.}}{\bar{t}_{ср.}^{\,контр.}} \cdot 100\%$$

В случае использования 5 опытных и 5 контрольных образцов имеем

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

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

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

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 $\bar{I}_T - \Delta \bar{I}_T \geqslant 100\%$ вытяжка признается неоказывающей 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

I. Еськов А.П., Каюмов Р.И., Лужецкий А.С., Гурилев О.М., Рязанов Ю.Н., Смелик Г.И., Арефьев И.М., Лапшо 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., Каюмов Р.И. Способ определения токсичности полимерного материала. Авторское свидетельство № 1224723. Опубликовано 15.04.86. Бюлл. № 14.

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. Тимохина В.И., Лапина 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. Юденко 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 Y. Gefrierkonservierter Bullensperma als Testobjekt für Screening - Untersuchung von Umweltschadstoffen (Spermatest) - „ Zeitschrift gesamte Hygiene und Grenzgebiete" 1983, 29, N 12, 719-721.

9. Palucka D., Borzemska - Szymonowicz M., Olszewska Black Z. In vitro screening studies of the toxicolo-

gical testing of synthetic biomaterials „Polimers in Medicine" 1980, 10, N4, 193-204.

10 Stranska G. Mandys V. Waitzowa D On toxicity question of synthetic polymers and their extracti tested in vitro and in vivo - „Polimers in Medicine" 1981, 11, N1, 29-37

ДИНАМИЧЕСКИЕ КИНЕЗИСГРАММЫ

Дата _____ Температура ____

Образец № I _____

_____

Образец № 2 _____

_____

Образец №3 _____

_____

Образец № 4 _____

_____

Образец № 5 _____

_____

Образец № 6 _____

_____

Образец № 7 _____

_____

Образец № 8 _____

_____

Образец № 9 _____

_____

Образец № IO _____

_____

Продолжительность измерения с. Период измерения мин. с.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ДАННЫЕ

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
149	159	143	182		152	161	219	139	
149	112	171	253		174	231	384	329	
221	155	144	176		132	89	239	179	
259	189	299	285		161	115	282	153	
149	182	125	227		101	42	179	153	
115	124	109	194		34	26	88	79	
109	86	86	204		37	36	71	119	
157	83	94	263		34	27	59	49	
127	71	63	144		21	18	46	39	
109	57	71	209		9	16	35	24	
86	61	72	120		11	11	14	27	
91	58	47	195		14	2	5	17	
78	79	1	121		9	2	7	7	
81	69	31	165		2	1		5	
72	83	37	138		1	1		1	
93	56	12	128		1	1		2	
44	51	24	70			1		1	
45	14	22	147					4	
21	18	14	182						
38	22	7	119						
29	25	9	89						
15	19	3	79						
68	7	4	67						
11	12	5	52						
5	17	4	39						
15	54	3	61						
13	8		43						
11	66		69						
4	9		26						
2	6		43						
4	4		46						
2			25						
			25						
			17						
			9						
			4						

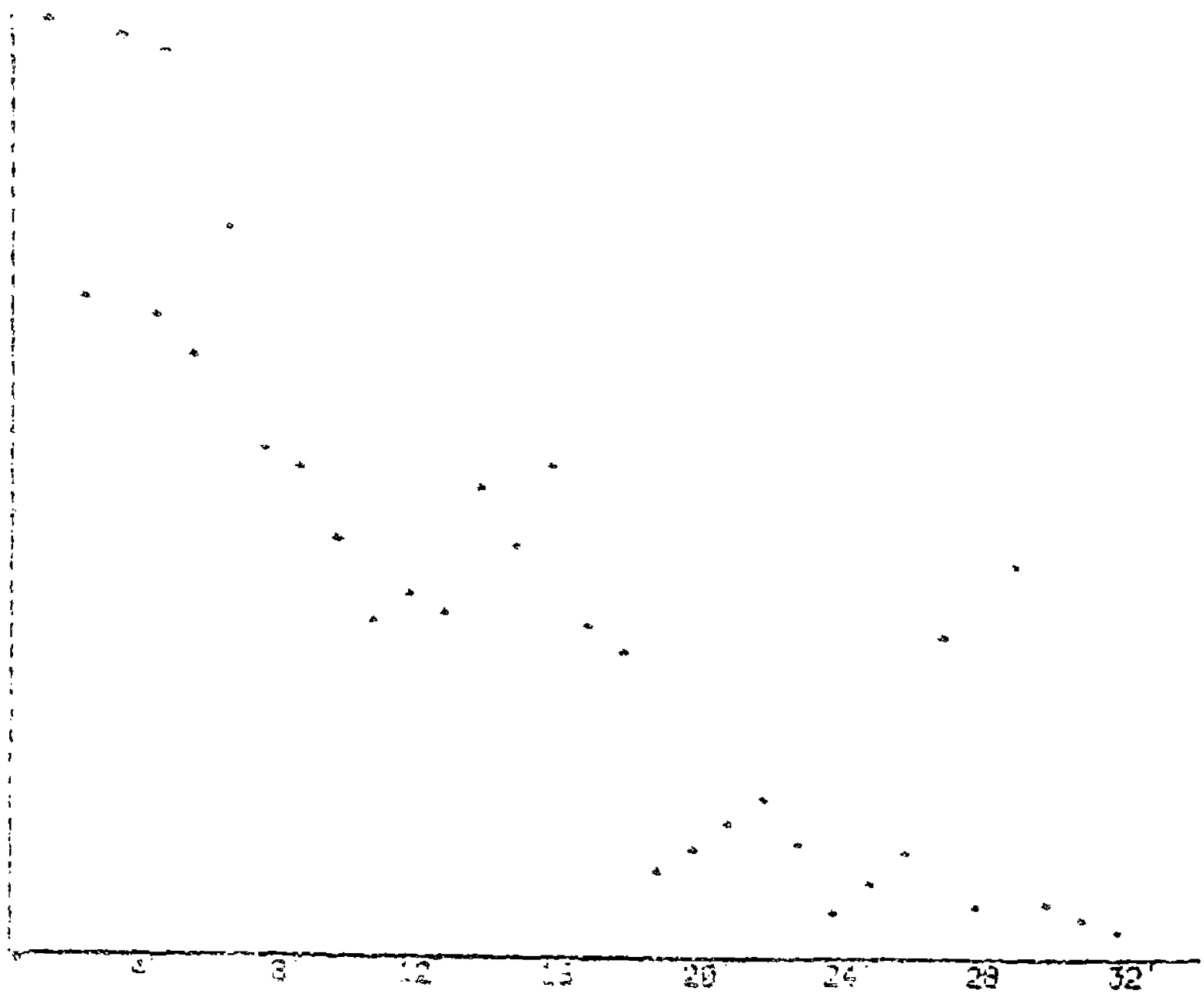
[illegible]

[illegible] [illegible] [illegible] [

ДАТА 13. 3. 86.
ОБРАЗЕЦ 2

СРЕДНЕЕ ВРЕМЯ ПОЛУРАСПАДА , МИН. 125.41

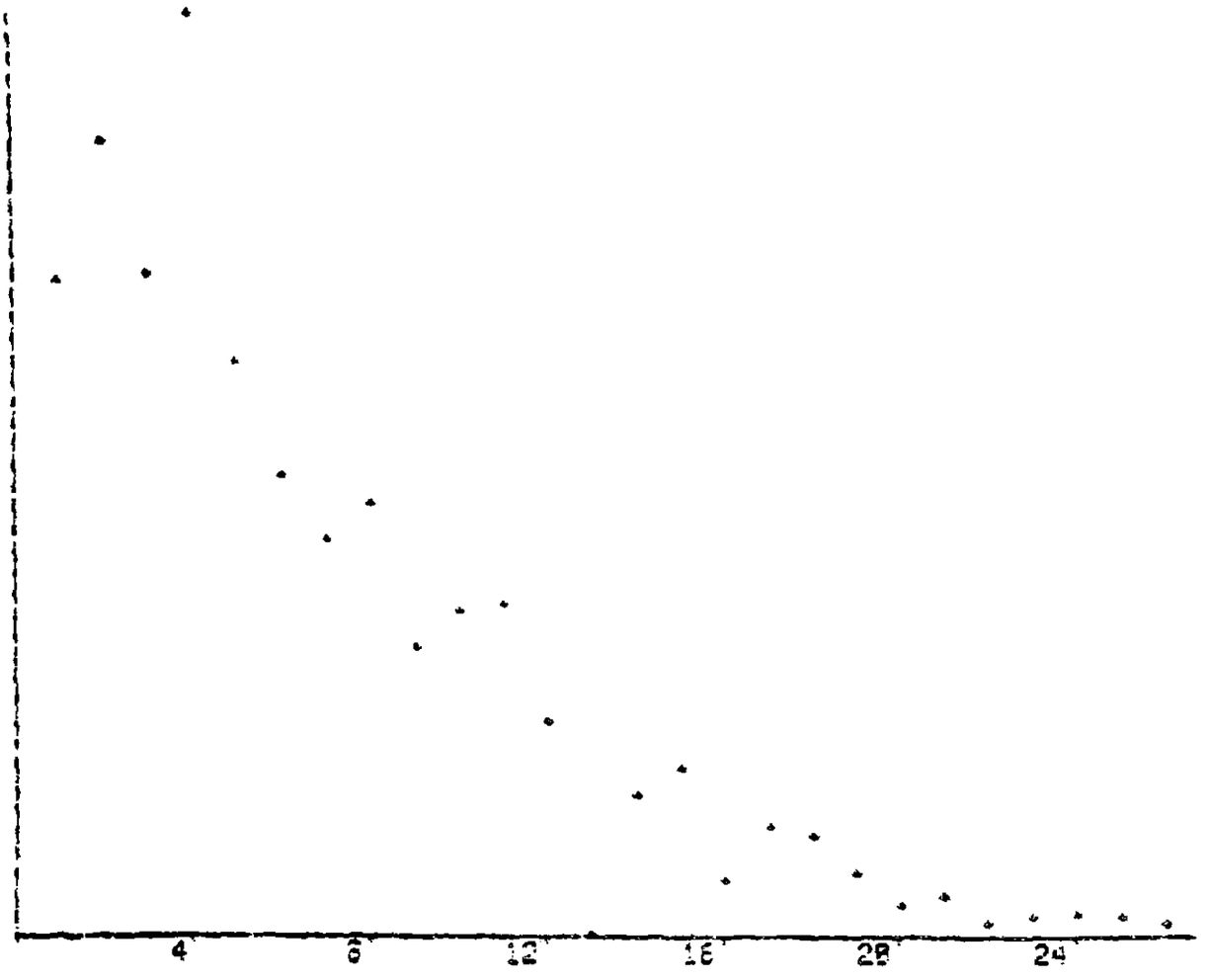
Г Р А Ф И К



ДАТА 12. 3. 86.
ОБРАЗЕЦ 3

СРЕДНЕЕ ВРЕМЯ ПОДВИЖНОСТИ , МИН. 82.38

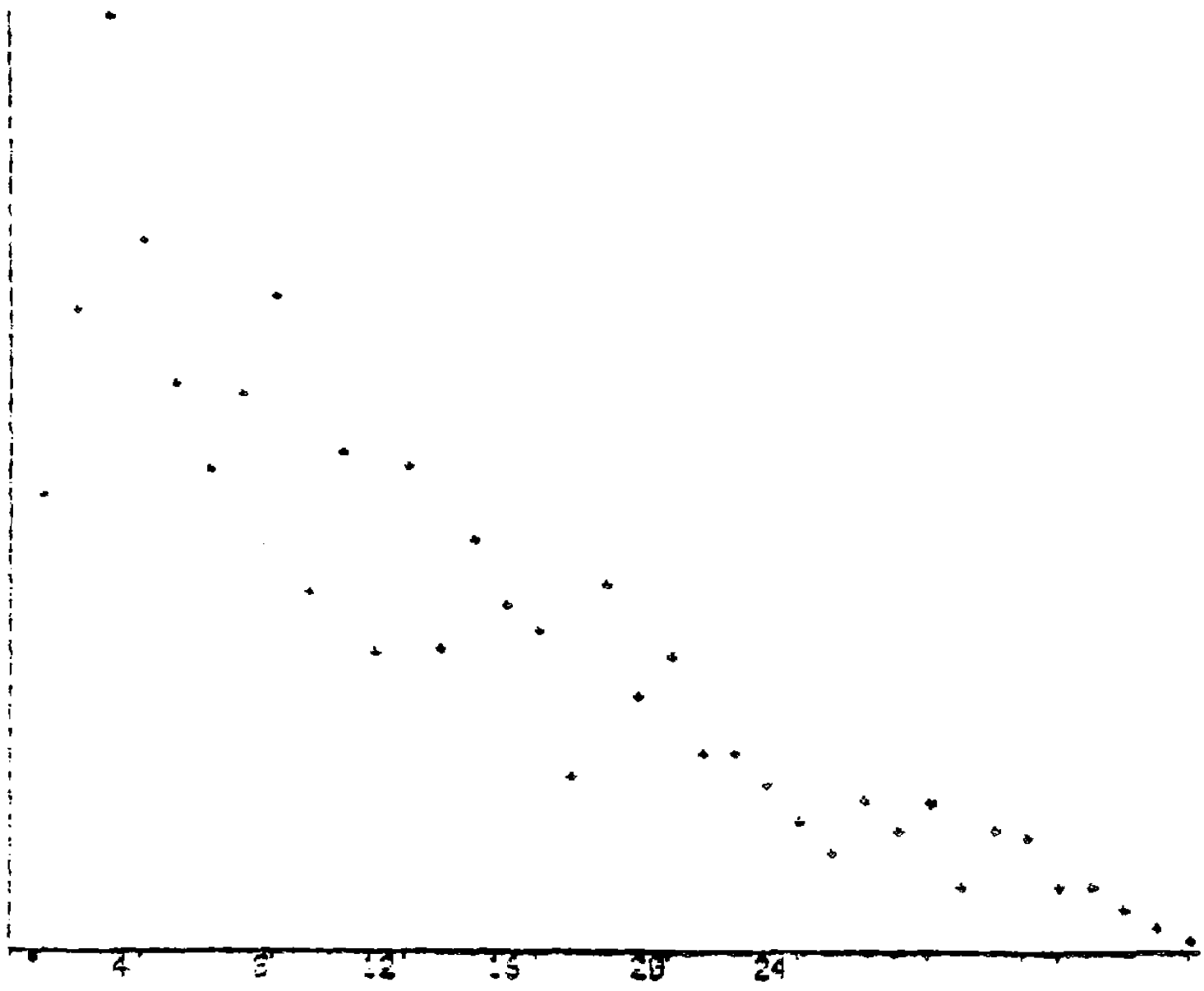
ГРАФИК



ДАТА 12. 3. 86.
ОБРАЗЕЦ 4
=====

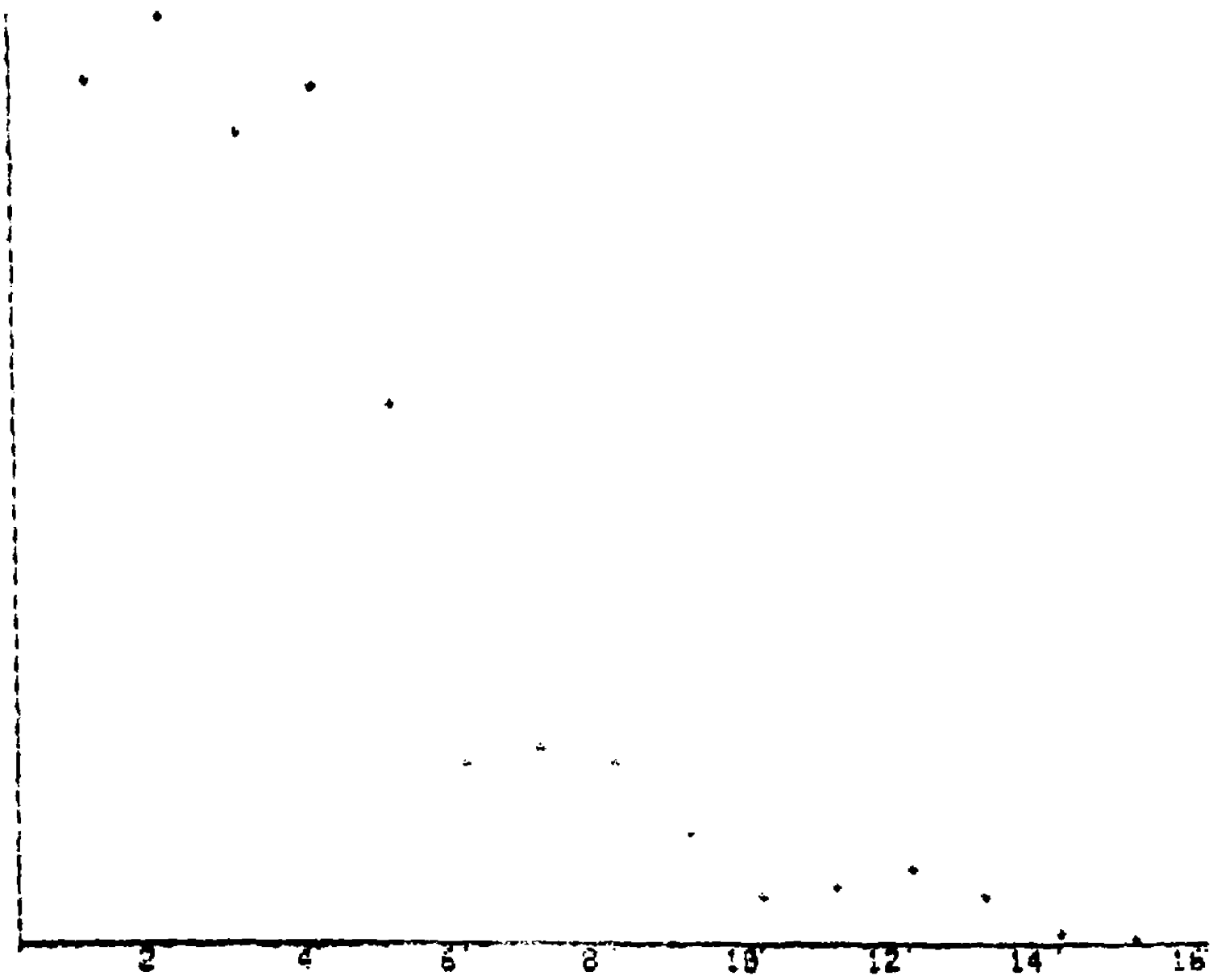
СРЕДНЕЕ ВРЕМЯ ПОДВИЖНОСТИ , МИН. 142.24

Г Р А Ф И К



ДАТА 12. 3. 86.
ОБРАЗЕЦ 6

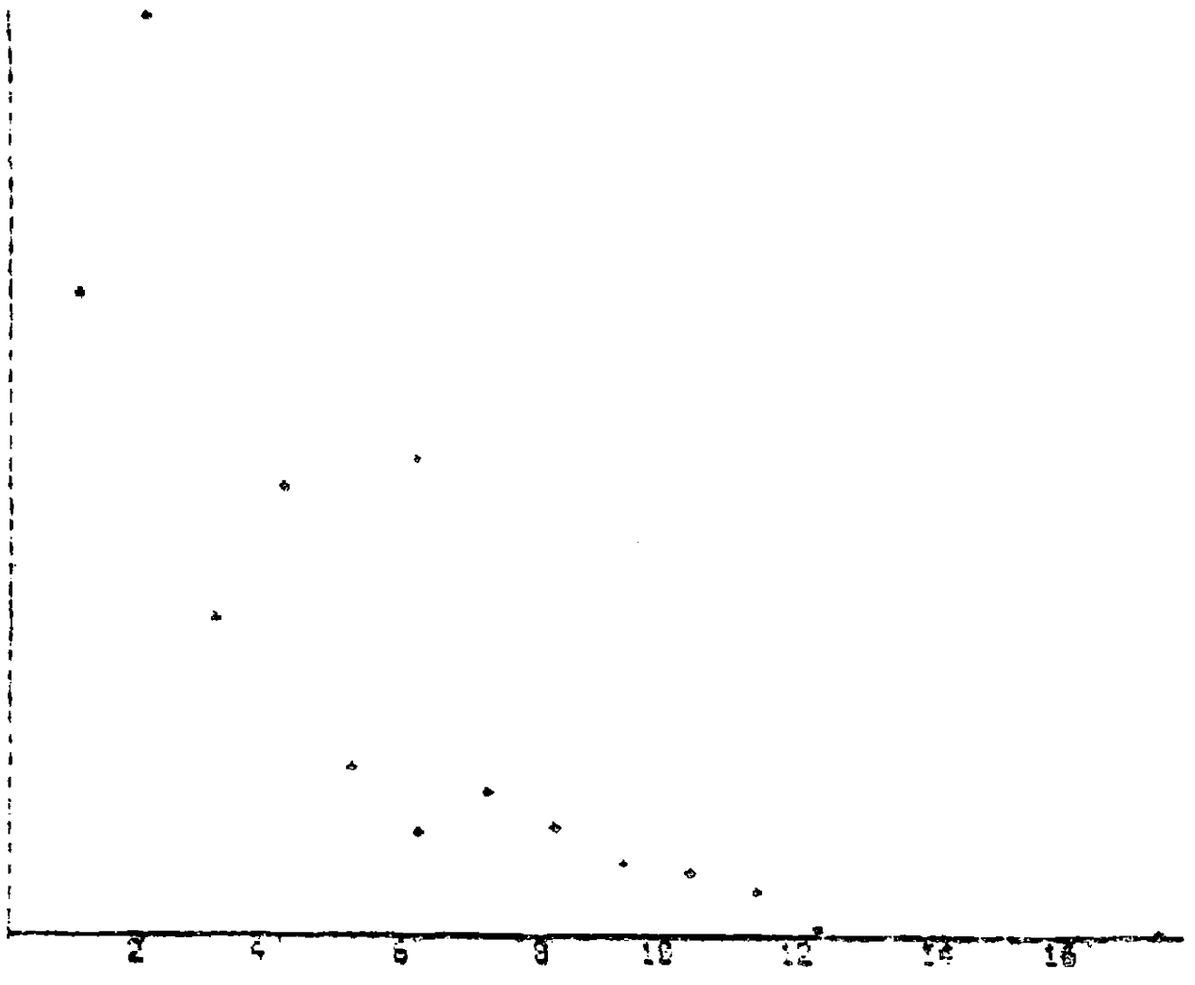
СРЕДНЕЕ ВРЕМЯ ПОДВИЖНОСТИ , мин. 89.0:



ДАТА 12. 3. 85.
ОБРАЗЕЦ 7

СРЕДНЕЕ ВРЕМЯ ПОДВИЖНОСТИ , МИН. 43.35

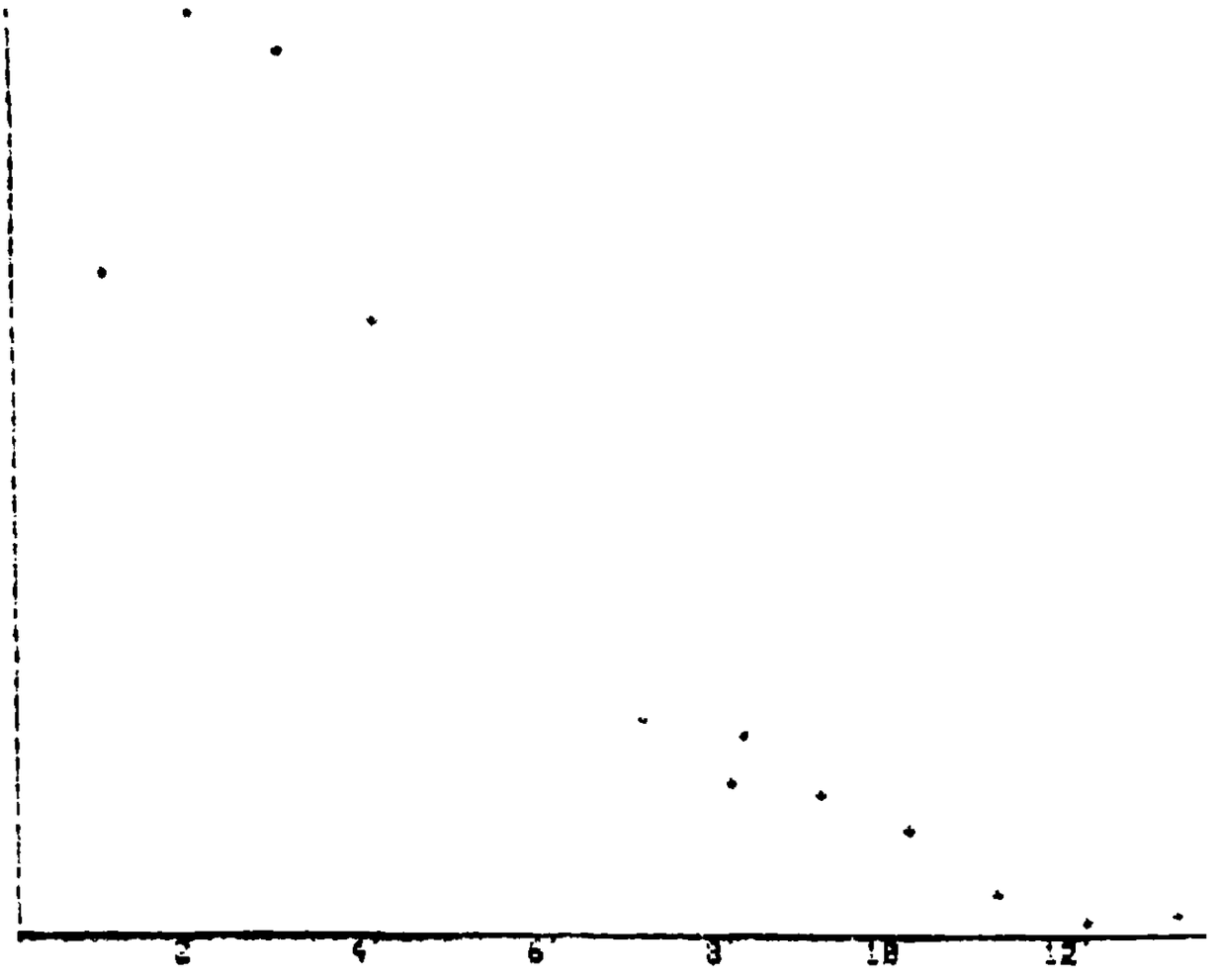
ГРАФИК



ДАТА :2. 3. 86.
ОБРАЗЕЦ 9
*****

СРЕДНЕЕ ВРЕМЯ ПОДВИЖНОСТИ , МИН. 48.15

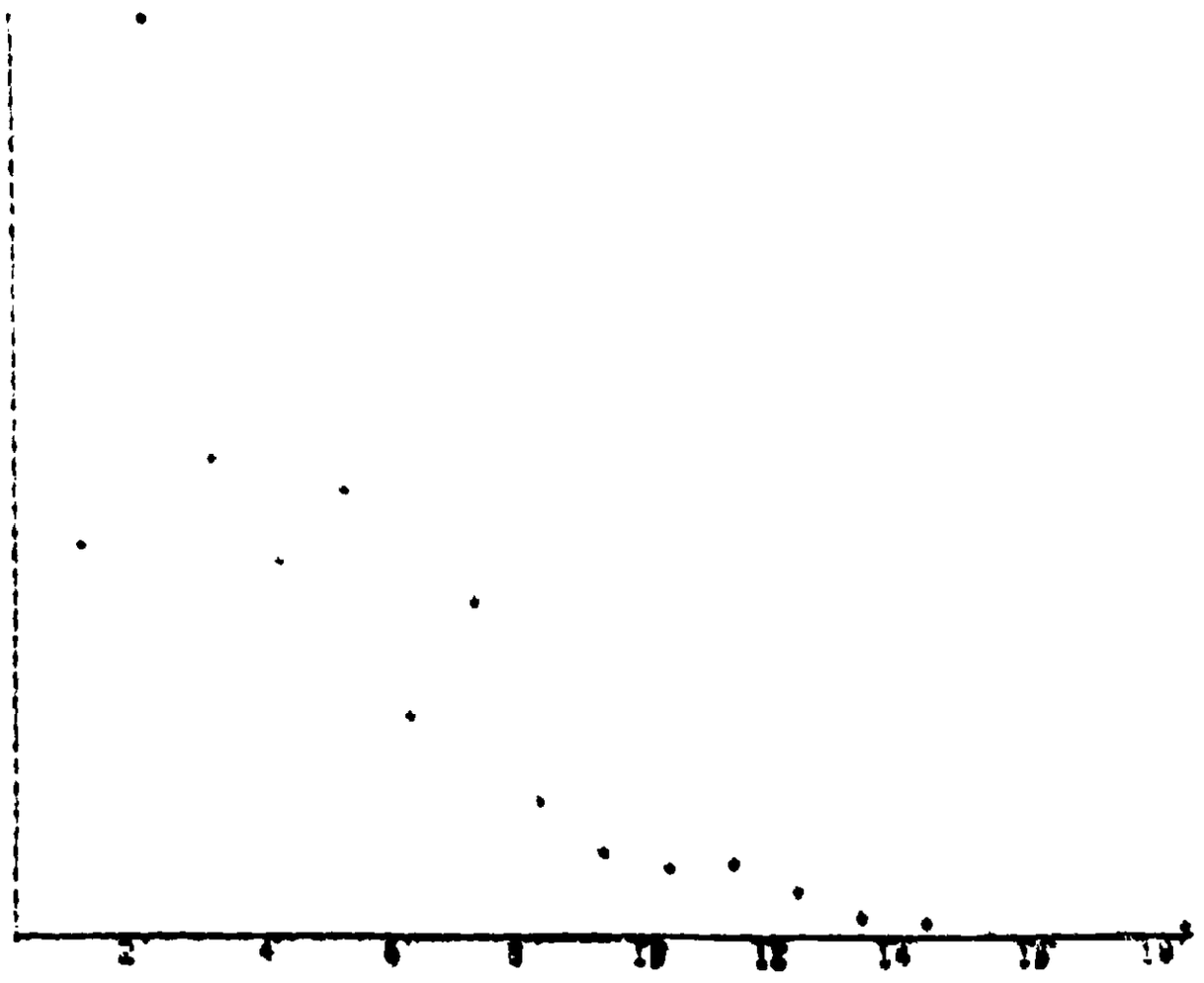
Г Р А Ф И К



ДАТА :2. 3. 86.
ОБРАЗЕЦ 9

СРЕДНЕЕ ВРЕМЯ ПОДВИЖНОСТИ , МИН. 53.75

Г Р А Ф И К



СРЕДНЕЕ ВРЕМЯ ПОДВИЖНОСТИ, МИН.:
ОПЫТ - 40.31+/- 2.12
КОНТРОЛЬ - 115.44+/- 12.66

КРИТЕРИЙ ТОКСИЧНОСТИ, %
Кт 41.85+/- 9.69

ВНИИМТ Зак. 483. Тир. 300

gost.e-ecolog.ru