МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ СССР

УПРАВЛЕНИЕ ПО ВНЕДРЕНИЮ НОВЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ И МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ

ВСЕСОЮЗНЫЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ И ИСПЫТАТЕЛЬНЫЙ ИНСТИТУТ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ

СБОРНИК РУКОВОДЯЩИХ МЕТОДИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ ПО ТОКСИКОЛОГО-ГИГИЕНИЧЕСКИМ ИССЛЕДОВАНИЯМ ПОЛИМЕРНЫХ МАТЕРИАЛОВ И ИЗДЕЛИЙ НА ИХ ОСНОВЕ МЕДИЦИНСКОГО НАЗНАЧЕНИЯ

Москва 1987

gost.e-ecolog.ru

Утверждено начальником Управления
по внедрению новых лекарственных средств
и медицинской техники
Э. А. Бабаяном от 27 ноября 1985 года

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:

Э. А. Бабаян, В. Г. Лаппо, С. Я. Ланина, Т. И. Носкова, В. И. Тимохина.

Научно-методические документы разработаны и внедрены в практику токсиколого-гигиенической оценки материалов и изделий медицинского назначения сотрудниками ВНИИИ медицинской техники Минздрава СССР — **В. Г. Лаппо** (зав. отделом токсикологии), **В. И. Тимохиной, Н. М. Перовой, С. Я. Ланиной, В. И. Долгополовым, Н. М. Каминской, Н. Г. Тышковской, Р. И. Каюмовым, Л. А. Самариной, Н. Б. Емельяновой, Т. М. Винокурской, Т. В. Селаври**; сотрудниками Института органической химии АН УССР — **Г. А. Пхакадзе, Н. А. Галатенко**; Киевского медицинского института — **В. П. Яценко**; сотрудниками Московского медицинского стоматологического института им. Н. А. Семашко — **В. П. Марковым, И. Ю. Лебеденко.**

ОГЛАВЛЕНИЕ

Часть I. **Научно-методические документы по токсиколого-гигиеническим исследованиям новых полимерных, других материалов и изделий на их основе для медицины.**

1. Общие методические указания к токсиколого-гигиенической оценке полимерных материалов и изделий на их основе для медицины . 7
2. Методические указания к токсиколого-гигиеническому исследованию полимерных материалов и изделий для эндопротезирования 18
3. Методические указания к токсиколого-гигиеническому исследованию медицинских клеев, предназначенных для соединения мягких и костной тканей организма 25
4. Методические указания к токсиколого-гигиеническому исследованию материалов, узлов и аппаратов по замене функций внутренних органов 29
5. Методические указания к токсиколого-гигиеническому исследованию шовных хирургических нитей и перевязочных материалов . . 34
6. Методические указания к токсиколого-гигиеническому исследованию полимерных пломбировочных материалов стоматологического назначения 46
7. Методические указания к токсиколого-гигиеническому исследованию металлических сплавов для протезирования в ортопедической стоматологии 58

Часть II. **Унифицированная методика контроля токсичности серийно выпускаемых полимерных изделий медицинского назначения однократного применения**

1.1. Общие положения 62
1.2. Порядок отбора изделий 63
1.3. Условия приготовления экстрактов из изделий 63
1.4. Санитарно-химические испытания изделий 70
1.5. Гемолитический тест 73
1.6. Токсикологические испытания на мышах 73
1.7. Оценка результатов 74

Часть III. **Экспресс-методы определения токсичности полимерных материалов и изделий медицинского назначения**

1. Методика определения токсического действия вытяжек из материалов на культуре тканей 77

2. Методика определения гемолитического действия вытяжек из материалов и изделий «ин витро» 83
3. Методика определения токсического действия вытяжек из материалов и изделий на изолированном сердце лягушки 86
4. Методика определения биосовместимости полимерных материалов и изделий для эндопротезирования по их влиянию на лимфоидную ткань 88
5. Методика определения токсического действия вытяжек из материалов и изделий на половых клетках крупного рогатого скота . 94
Перечень литературы и справочных источников 96

ЧАСТЬ III

ЭКСПРЕСС-МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТОКСИЧНОСТИ МАТЕРИАЛОВ И ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОГО НАЗНАЧЕНИЯ

В связи со все увеличивающимся объемом разработок новых материалов и изделий особое значение приобретает разработка экспресс-методов на биологических тест-объектах и тест-системах. Эти методы можно применять в следующих случаях: а) при отборе оптимальных лабораторных образцов материалов и изделий на первом этапе их разработки; б) при оценке различных технологий переработки материалов в изделие; в) при выборе оптимального способа стерилизации изделия; г) при незначительном изменении рецептуры материала; д) при изменении сферы применения хорошо изученного материала.

1. МЕТОДИКА ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ВЫТЯЖЕК ИЗ МАТЕРИАЛОВ НА КУЛЬТУРЕ ТКАНЕЙ

1.1. Этапы исследования, их последовательность:
— приготовление вытяжек из полимерных образцов;
— подготовка тканевых культур для эксплантации;
— собственно токсикологические исследования;
— оценка результатов.

1.2. ОБЪЕМ И МЕТОДЫ ОСНОВНЫХ ЭТАПОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

1.2.1. Приготовление вытяжек из образцов полимерных материалов.

Условия приготовления вытяжек.

Модельная среда: среда 199 для культур тканей.

Соотношение размера образца к объему модельной среды: 1 $см^2$: 1 $см^3$ (в случае пленочных материалов) или 1 г : 1 $см^3$ (в случае объемных материалов.

Экспозиция: 24 часа.

Температурный режим экстракции: +37° С.

Обязательным условием является соблюдение стерильности при приготовлении вытяжки.

1.2.2. Подготовка тканевых культур для эксплантации.

Вид животных: белые беспородные крысы любого пола весом 130—150 г.

Группы эксперимента: контрольная (культивированные ткани) и опытная (на третьи сутки культивирования ткани среда

199 заменяется вытяжками из полимерных материалов, приготовленными по п. 1.2.1.). В каждой группе по 30 эксплантаций.

Условия эксплантации.

Животных умерщвляют эфирным наркозом или декапитацией. В стерильных условиях из задней половины спины выделяют фрагменты подкожной клетчатки размером 1×1 см. Кусочки клетчатки переносят в физиологический раствор с добавлением пенициллина или стрептомицина (на 10 см^3 раствора 25 мл препарата). Затем промывают тройной порцией физиологического раствора без антибиотика. Исходные кусочки клетчатки расчленяют на отдельные эксплантаты величиной не более 1,5 мм в поперечнике. Эксплантаты переносят в одинаковые по размерам флаконы Карреля с питательной смесью, состоящей из гусиной (петушиной) плазмы и среды 199. На дно каждого флакона равномерно помещают по 4—5 эксплантатов. Добавляют эмбриональный экстракт, приготовленный из 14—16 суточных крысиных зародышей. После формирования твердой фазы во флаконы вносят смесь лошадиной (бычьей) сыворотки и среды 199.

Соотношение ингредиентов в питательной среде составляет: среда 199 — 50%, экстракт зародышей крысы — 10%, плазма крови гуся (петуха) — 20%, лошадиная сыворотка (бычья) — 20% (для флаконов высотой 1 см, диаметром 3,5 см).

Твердую фазу формируют из 4 капель плазмы, 3 капель эмбрионального экстракта; жидкую фазу формируют на 12 капель среды 199 и 8 капель лошадиной (бычьей) сыворотки.

Культуру инкубируют при температуре +37° С, жидкую фазу меняют каждые трое суток.

1.2.3. Способ приготовления плазмы.

Гусиную (петушиную) плазму получают следующим образом. Приготавливают стерильную посуду: центрифужные пробирки на 20 мл, шприцы на 10 мл.

Взрослому гусю за 1 час до забора крови вводят внутримышечно 100 мл 0,025% раствора гепарина в физиологическом растворе (петуху — 40 мл). По истечении указанного времени из подкрыльцовой вены * с помощью иглы с трубкой от одноразовой системы для переливания крови в центрифужные пробирки отбирают 80—100 мл крови. Проводят центрифугирование при 2000—2500 об/мин в течение 20 минут. После этого верхний светлый слой плазмы отбирают с помощью пастеровской пипетки и переносят в химические парафинированные стерильные пробирки. Хранят в холодильнике не более одного месяца.

1.2.4. Получение эмбрионального экстракта.

В стерильных условиях вскрывается самка крысы с 14-16-суточными зародышами, которые извлекаются, промываются

* Примечание: у петуха берут кровь из яремной вены до полного обескровливания.

в физиологическом растворе с антибиотиками (соотношение то же, что и в п. 1.2.2) и затем осторожно помещаются в 20-миллилитровый шприц и выдавливают в колбу. После чего колба с содержимым в течение 30 минут перемешивается на магнитной мешалке, отстаивается в термостате при температуре 37° С 30—40 минут. Верхняя часть содержимого колбы (светлая) осторожно отбирается шприцем и запаивается в ампулы емкостью 10 мл. Ампулы хранят в холодильнике, срок годности — 1 месяц.

1.3. СОБСТВЕННО ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

1.3.1. После эксплантации образцов клетчатки на третьи сутки культивирования в опытных пробах производят замену жидкой фазы (питательной среды) вытяжкой из полимерного материала, приготовленной по п. 1.2.1. (2 мл на каждый флакон).

На 5, 7 и 10 сутки производится вычисление зональной активности роста (А), зональной интенсивности роста (И) и степени дегенерации (Д) клеток.

Наблюдения проводят при проецировании изображения культуры на экран с помощью любого проектора, приспособленного для закрепления флакона Карреля между источником света и оптической системой (например, «Этюд»). Определяют границы компактной, сетевидной зоны и зоны мигрирующих фибробластических элементов. Критерием для выделения этих зон является характер расположения растущих фибробластических элементов.

К компактной зоне относят участки плотного расположения растущих клеток. К сетевидной относят участки расположения анастомозирующих и ветвящихся клеточных тяжей. По вершинам изолированных врастающих в твердую фазу питательной среды клеточных тяжей к месту расположения изолированно лежащих клеток определяют зону мигрирующих элементов.

1.3.2. Получение количественных параметров.

С помощью курвиметра определяют общий периметр эксплантата (П экз.), а также его частей, соответствующих каждой зоне роста: периметр компактной зоны роста (П к. з. р.), периметр сетевидной зоны роста (П с. з. р.), периметр зоны мигрирующих элементов (П м. з. р.).

Площадь каждой зоны роста (S к. з. р., S с. з. р., S м. з. р.) определяют планиметрически при помощи миллиметровой бумаги. Затем на основании полученных данных для каждой зоны роста определяют зональную активность роста (А) и зональную интенсивность роста (И) по формулам

$$А = \frac{П_{з.р.}}{П_{экс.}} \quad \text{и} \quad И = \frac{S_{з.р.}}{П_{з.р.}} \ (мм^2),$$

где П з. р.— часть периметра эксплантата, соответствующая определенной зоне роста, П экс.— периметр эксплантата (мм²);

S з. р.— площадь соответствующей зоны роста (мм²).

Степень дегенерации клеток оценивается в баллах: отсутствие дегенерации клеток — 1 балл; наличие признаков — 3 балла.

На основе проведенных измерений и расчетов составляется таблица исходных данных (пример представлен в табл. 1.1.).

Показатель гистотоксичности (ПГТ) вычисляют по формуле

$$\text{ПГТ} = \frac{1}{n} \sum A_{ij}^{оп} \left(\frac{\Sigma И_i^{оп\,5}}{\Sigma Д_i^{оп\,5} \Sigma И_i^{к5}} + \frac{\Sigma И_i^{оп7}}{\Sigma Д_i^{оп7} \Sigma И_i^{к7}} + \frac{2\,\Sigma И_i^{оп10}}{\Sigma Д_i^{оп10} \Sigma И_i^{к10}} \right)$$

где $\frac{1}{n} \Sigma A_{ij}^{оп}$ — среднее значение в опыте зональной активности роста фибробластов во все наблюдаемые сроки культивирования;

$\Sigma И_i^{оп5}$ — суммарное значение в опыте средних величин зональной интенсивности роста на 5 сутки культивирования; аналогично: $\Sigma И_i^{оп7}$ на 7 сутки культивирования; аналогично: $\Sigma И_i^{оп10}$ на 10 сутки культивирования;

$\Sigma Д_i^{оп5}$ — суммарное значение в опыте среднего значения зональной дегенерации фибробластов на 5 сутки культивирования; аналогично: $\Sigma Д_i^{оп7}$ на 7 сутки культивирования; аналогично $\Sigma Д_i^{оп10}$ на 10 сутки культивирования;

$\Sigma И_i^{к5}$ — суммарное значение в контроле средних величин зональной интенсивности роста фибробластов на 5 сутки культивирования; $\Sigma И_i^{к7}$ на 7 сутки и $\Sigma И_i^{к10}$ на 10 сутки культивирования;

$i = 1,3$ — номер столбца таблицы средних значений активности и интенсивности роста фибробластов и их зональной дегенерации на 5 сутки $i = 1$; на 7 сутки $i = 2$ и на 10 сутки культивирования $i = 2$;

$j = 1,3$ — номер строки таблицы средних значений активности роста фибробластов: компактная зона $j = 1$, сетчатая зона $j = 2$, зона мигрирующих элементов $j = 2$;

n — количество данных показателя активности роста фибробластов.

Например, расчет ПГТ для образца, результаты исследований которого представлены в табл. 1.1.

$$\text{ПГТ} = \frac{0{,}65 + 0{,}91 + 0{,}95 + 0{,}51 + 0{,}71 + 0{,}85 + 0{,}64 + 0{,}92 + 0{,}98}{9} \cdot$$

$$\frac{23{,}74 + 16{,}72 + 2 \cdot 18{,}87}{3 \cdot 35{,}86 \quad 6 \cdot 49{,}98 \quad 6 \cdot 84{,}84} = 0{,}79 \cdot 0{,}35 \approx 0{,}28$$

1.4. ОЦЕНКА РЕЗУЛЬТАТОВ

1.4.1. При уровне значения ПГТ $\geqslant 0{,}72$ полимер характеризуется как нетоксичный; при значениях $0{,}72 \geqslant$ ПГТ $\geqslant 0{,}48$ — малотоксичный, при значениях $0{,}48 >$ ПГТ $\geqslant 0{,}27$ — умеренно токсичный и при значениях $0{,}27 >$ ПГТ — сильно токсичный.

1.4.1.1. Для мало и умеренно токсичных полимерных материалов в дальнейшем проводятся токсикологические исследования на целостном организме животных в соответствии с существующими методическими указаниями для различных групп изделий, утвержденных Минздравом СССР.

1.4.1.2. При получении результатов, характеризующих исследуемый полимерный материал как сильно токсичный, дальнейшие испытания на организменном уровне проводить нецелесообразно.

Таблица 1.1

Пример расчета ПГТ

Характер опыта	Зона роста	5 суток культивирования			7 суток культивирования			10 суток культивирования		
		А	И	Д	А	И	Д	А	И	Д
Норма (контроль)	Компактная (к)	0,76	10,37	1	0,93	11,61	1	1,0	37,04	2
	Сетчатая (с)	0,88	12,41	1	0,98	18,31	1	1,0	24,09	2
	Зона мигрирующих элементов	0,79	13,08	1	0,99	20,06	1	1,0	23,71	2
			Σ=35,86	Σ =3		Σ=49,98	Σ =3		Σ=84,84	Σ =6
Полимерный образец ПМ 1/42 (опыт)	Компактная (к)	0,65	4,69	1	0,51	2,97	2	0,64	3,44	2
	Сетчатая (с)	0,91	7,5	1	0,71	6,16	2	0,92	7,73	2
	Зона мигрирующих элементов	0,95	11,76	1	0,85	7,59	2	0,98	7,7	2
			Σ=23,74	Σ =3		Σ=16,72	Σ =6		Σ=18,87	Σ =6

А — активность роста
И — интенсивность роста
Д — степень дегенерации (в баллах)

ПЕРЕЧЕНЬ ЛИТЕРАТУРНЫХ И СПРАВОЧНЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Алексеева О. Г., Петкевич А. И. и др. Оценка некоторых методов «ин витро» для выявления аллергии к химическим веществам // Гигиена и санитария, 1975, № 7.

2. Алексеева О. Г., Дуева Л. А. Аллергия к промышленным химическим соединениям.— М.: Медицина, 1978.

3. Бернет Ф. Клеточная иммунология.— М.: Мир, 1971.

4. Брауде Н. И. Феномен трансформации малых лимфоцитов в бласты как иммунологическая проблема // Успехи современной биологии, 1969, т. 67, вып. 3.

5. Быховская М. С., Гинзбург С. Л. и др. Методы определения вредных веществ в воздухе и других средах.— М.: Медицина, 1961.

6. Ветеринарное акушерство и гинекология.— М.: Колос, 1977.

7. Вопросы гигиенического нормирования и изучения отдаленных последствий воздействия промышленных веществ.— М.: Медицина, 1972.

8. Вильямс Д. Ф., Роуд Р. Имплантаты в хирургии.— М.: Медицина, 1978.

9. ГОСТ 12.1.007—76 Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности.

10. Гадаскина И. Д., Филов В. А. Превращение и определение промышленных органических ядов в организме.— Л.: Медицина, 1971.

11. Гадаскина И. Д., Гадаскина Н. Д., Филов В. А. Определение промышленных неорганических ядов в организме.— Л.: Медицина, 1975.

12. Тезисы докладов V Всесоюзной конференции «Гигиена и токсикология высокомолекулярных соединений и химического сырья, используемого для их синтеза».— Л., 1975

13. Тезисы докладов VI Всесоюзной конференции «Гигиена и токсикология высокомолекулярных соединений и химического сырья, используемого для их синтеза».— Киев, 1976.

14. Гигиеническая оценка медицинских полимерных материалов и изделий различного назначения // Научный обзор ВНИИМИ.— М., 1983.

15. Гублер Е. В., Генкин А. А. Применение методов непараметрической статистики для оценки различий двух групп наблюдений в медико-биологических исследованиях.— М.: Медицина, 1978.

16. Зауголышков С. Д., Качанов М. М. и др. Экспрессные методы определения токсичности и опасности химических веществ.— М.: Медицина, 1978.

17. Измеров М. Ф., Саноцкий И. В., Сидоров К. К. Параметры токсикометрии промышленных ядов при однократном воздействии.— М.: Медицина, 1977.

18. Комиссарова И. А., Сура В. В. Цитохимические изменения лейкоцитов в периферической крови при иммунологической стимуляции в эксперименте // Бюл. экспрес экспер. биологии и медицины, 1969, т. 68, № 11.

19. Кисели Д. **Практическая микротехника и гистохимия.**— Будапешт: Изд-во Академии наук Венгрии, 1963.

20. Луппа Х. **Основы гистохимии.**— М.: Мир, 1980.

21. Мартынова А. П. **Гигиена труда в производстве и переработке синтетических волокон.**— М.: Медицина, 1977.

22. Меркулов Г. А. **Курс патогистологической техники.**— М.: Медицина, 1961.

23. **Методические указания по санитарно-химическому исследованию детских резиновых и латексных сосок.**— М., Минздрав СССР, 1974.

24. **Методические указания по санитарно-гигиенической оценке полимерных строительных материалов, предназначенных для применения в строительстве жилых и общественных зданий.**— М.: Минздрав СССР, 1976.

25. **Методы определения токсичности и опасности химических веществ.**— М.: Медицина, 1970.

26. **Методические указания к постановке исследований по гигиеническому нормированию промышленных аллергенов.**— М.: Минздрав СССР, 1978.

27. **Методические указания по гигиенической оценке одежды и обуви из полимерных материалов.**— М.: Минздрав СССР, 1977.

28. **Методические указания к постановке исследований по выявлению сенсибилизирующих свойств и установлению порогов аллергенов действия промышленных химических веществ.**— М.: Минздрав СССР, 1975.

29. **Методические и методологические вопросы гигиены и токсикологии полимерных материалов и изделий медицинского назначения** // Научный обзор ВНИИМИ.— М., 1982.

30. Мороз В. Г. **Влияние малых концентраций некоторых веществ на время переживания сперматозоидов «ин витро» и их энергетический обмен.**— Автореф. канд. дисс.— Л., 1969.

31. Новиков Ю. В., Ласточкина К. О., Болдина З. Н. **Методы определения вредных веществ в воде водоемов.**— М.: Медицина, 1981.

32. **Оценка воздействия вредных химических соединений на кожные покровы и обоснование предельно допустимых уровней загрязнения кожи** // Методические указания. Минздрав СССР — М., 1980.

33. Нарциссов Р. П. **Цитохимия ферментов лейкоцитов в педиатрии.**— Автореф. дисс.— М., 1970.

34. Перегуд Е. А. **Санитарная химия полимеров.**— М., 1967.

35. Пирс З. **Гистохимия.**— М.: Медицина, 1967.

36. Пиотровский Е. **Использование кинетики метаболизма и выведение токсичных веществ в решении проблем промышленной токсикологии.**— М.: Медицина, 1976.

37. Покровская М. И., Макарова М. С. **Цитология раневого экссудата как показатель процесса заживления ран.**— М.: Медгиз, 1962.

38. **Предельно допустимые концентрации вредных веществ в воздухе и воде.**— Л.: Химия, 1972.

39. **Принципы предельно допустимых концентраций.**— М.: Медицина, 1970.

40. **Профилактическая токсикология** // Сб. учебно-методических материалов. Программа ООН по окружающей среде. Центр международных проектов ГКНТ.— М., 1984, т. I и т. II.

41. Левицкая Л. А., Лаппо В. Г. **Экспресс-метод сравнительной оценки полимерных материалов для изделий, контактирующих с кровью, по их гемолитическому действию «ин витро».**— Рационализаторское предложение № 19 от 20.02.81 г.

42. Ромейс В. **Микроскопическая техника.**— М.: Иностранная литература, 1953.

43. Рылова М. Л. Методы исследования хронического действия вредных факторов среды в эксперименте.— М.; Л.: Медицина, 1964.

44. Синтетические полимеры медицинского назначения // Сб. лекций и материалов I Всесоюзной школы-семинара по медицинским полимерам.— Ташкент: Изд-во «Фан» УзССР, 1984.

45. Саноцкий И. В., Уланова И. П. Критерии вредности в гигиене и токсикологии при оценке опасности химических соединений.— М.: Медицина, 1975.

46. Соколов В. В., Нарциссов Р. П., Иванова Л. А. Цитохимия ферментов в профпатологии.— М.: Медицина, 1975.

47. Сосонкин И. Е. Агглюмерация лейкоцитов при диагностике аллергии, вызванной химическими и лекарственными соединениями // Лабораторное дело.— 1968.— № 12, С. 707.

48. Саноцкий И. В., Фоменко В. Н. Отдаленные последствия влияния химических соединений на организм.— М.: Медицина, 1979.

49. Трахтенберг И. И., Сова Р. Е., Шефтель В. О. Показатели нормы у лабораторных животных в токсикологическом эксперименте.— М.: Медицина, 1978.

50. Токсикология новых промышленных веществ.— М.: Медицина, 1961—1975, вып. 2—14.

51. Шевченко М. Г., Генель С. В., Феофанов В. Д. Гигиенические требования к полимерным материалам, применяемым в пищевой промышленности.— М.: Медицина. 1972.

52. Шефтель В. О. Полимерные материалы. Токсические свойства: Справочник.— Л.: Химия, 1982.

53. Экспрессные методы определения токсичности и опасности химических веществ.— М.: Медицина, 1978.

Редактор Галахова В. И.
Технический редактор Передерий С. П.

П-57177 Подписано к печати 11.08.86
Тираж 500. Зак. 27.

Типография Академии МВД СССР, Москва

gost.e-ecolog.ru