Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

1.2. ГИГИЕНА, ТОКСИКОЛОГИЯ, САНИТАРИЯ

Оценка раздражающего действия методом ультразвуковой допплерографии на сосудах хориоаллантоисной оболочки куриного эмбриона *ex vivo*

Методические рекомендации
МР 1.2.0025—11

gost.e-ecolog.ru

ББК 51.2
О93

О93 **Оценка** раздражающего действия методом ультразвуковой допплерографии на сосудах хориоаллантоисной оболочки куриного эмбриона *ex vivo*: Методические рекомендации.— М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2011.—12 с.

1. Разработаны ФГУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в г. Москве» (Н. В. Завьялов, Е. Л. Скворцова); ОАО Завод экологической техники и эко-питания «ДИОД», г. Москва (В. П. Тихонов, Т. В. Шевченко, И. А. Родина, Е. Ю. Белянкина, К. Л. Плигина); ООО «СП Минимакс», г. Санкт-Петербург (М. Б. Гирина).

2. Утверждены Руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации Г. Г. Онищенко и введены в действие 28 июня 2011 г.

3. Введены впервые.

ББК 51.2

Редактор Е. В. Николаева
Технический редактор Е. В. Ломанова

Подписано в печать 30.09.11

Формат 60x88/16 Печ. л. 0,75

Тираж 200 экз. Заказ 124

Федеральная служба по надзору
в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
127994, Москва, Вадковский пер., д. 18, стр. 5, 7

Оригинал-макет подготовлен к печати и тиражирован
отделом издательского обеспечения
Федерального центра гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора
117105, Москва, Варшавское ш., 19а
Отделение реализации, тел./факс 952-50-89

© Роспотребнадзор, 2011
© Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2011

Содержание

1. Область применения 4
2. Введение 5
3. Принцип метода 5
4. Оборудование, материалы и реактивы 6
4.1. Характеристика объектов исследования 7
5. Подготовка исследуемых образцов 7
5.1. Растворители 7
5.2. Контроли 7
5.3. Исследуемые концентрации 8
6. Подготовка тест-объекта 9
7. Процедура тестирования 9
8. Анализ допплерограмм 9
9. Статистическая обработка данных 9
10. Интерпретация результатов 10
11. Форма представления результатов 11
Библиографический список 12

УТВЕРЖДАЮ
Руководитель Федеральной службы
по надзору в сфере защиты прав
потребителей и благополучия человека,
Главный государственный санитарный
врач Российской Федерации

Г. Г. Онищенко
28 июня 2011 г.
Дата введения: с момента утверждения

1.2. ГИГИЕНА, ТОКСИКОЛОГИЯ, САНИТАРИЯ

Оценка раздражающего действия методом ультразвуковой допплерографии на сосудах хориоаллантоисной оболочки куриного эмбриона *ex vivo*

Методические рекомендации
МР 1.2.0025—11

1. Область применения

1.1. Методические рекомендации предназначены для токсикологических исследований и испытаний парфюмерно-косметической (ПК) продукции, средств гигиены полости рта, а также сырья для их производства, в т. ч. полученных с применением нанотехнологий или содержащих наноматериалы.

1.2. Методические рекомендации могут быть использованы для оценки раздражающего действия слизистой оболочки глаза вновь разрабатываемой и серийно выпускаемой продукции. Данный метод может применяться в качестве самостоятельного экспресс-метода или в сочетании с другими токсикологическими методами.

1.3. Методические рекомендации предназначены для специалистов органов и организаций Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, а также могут быть использованы научно-исследовательскими организациями гигиенического профиля, медицинскими учебными заведениями и иными организациями, аккредитованными в установленном порядке.

2. Введение

В батарею токсикологических испытаний для оценки безопасности продукции входит исследование раздражающего действия на слизистую оболочку глаза. Для этой цели традиционно используется тест Драйза на лабораторных животных (Draize et al., 1944), являющийся одним из самых болезненных тестов. Возможной альтернативной заменой тесту Драйза является ХЕТ-КАМ-тест (HET-CAM – hen's egg test at the chorioallontoic membrane), в котором проводится визуальная оценка состояния сосудов хориоаллантоисной оболочки (ХАО) куриного эмбриона. Однако визуальная оценка не позволяет точно и объективно интерпретировать результаты исследования.

Дополнение стандартного ХЕТ-САМ теста методом высокочастотной допплерографии позволяет определять количественные характеристики изменения скорости кровотока в сосудах ХАО, которые отражают выраженность раздражающего действия.

Метод высокочастотной ультразвуковой допплерографии использует эффект изменения частоты сигнала отраженного движущегося объекта на величину пропорциональную скорости движения отражателя, открытый в 1842 г. Допплером. При отсутствии движения исследуемой среды доплеровского сигнала не существует, т. к. ультразвуковая волна проходит сквозь ткани без отражения, что делает данный метод исследования движущихся структур наиболее объективным.

Данные методические рекомендации содержат порядок проведения оценки раздражающего действия с применением метода высокочастотной допплерографии на сосудах ХАО куриного эмбриона *ex vivo*. Преимуществом настоящего метода являются простота, высокая чувствительность, объективная цифровая оценка результатов, повышающая их достоверность, воспроизводимость, а также экономичность, быстрота получения результатов. Кроме того, система отвечает современным этическим требованиям, согласно которым следует ограничивать использование млекопитающих в эксперименте.

3. Принцип метода

Основой данного метода исследования является ХЕТ-КАМ тест, применяемый для оценки раздражающего действия веществ на сосудах ХАО куриного эмбриона. Во время проведения исследования раствор тестируемого вещества наносят на ХАО. При возникновении раздражающего действия происходит сужение кровеносных сосудов без остановки или с временной остановкой тока крови, тромбоз, кровоизлияния и т. п., что, в свою очередь, вызывает изменение скорости кровотока. Модификация ХЕТ-КАМ теста с использованием прибора «Минимакс-

Допплер-К» позволяет провести количественную оценку скорости кровотока при возникновении раздражающего действия.

Ультразвуковой сигнал, отраженный от кровотока, поступает на приемный элемент датчика (частотой 25 МГц), далее этот сигнал усиливается, фильтруется и проходит в компьютерную часть прибора, где обрабатывается по специальной программе (Minimax Doppler v.1.7) и выдается на экран монитора в виде допплерограмм с цветным спектром. Также автоматически вычисляются количественные параметры скорости кровотока: линейная скорость кровотока V_s (см/с), объемная скорость кровотока Q_s (мл/с), средневзвешенная скорость кровотока по кривой средней скорости V_{am} (см/с). Показатели скорости кровотока (Q_s и V_{am}) коррелируют с линейной скоростью кровотока V_s. Таким образом, для изучения влияния исследуемых веществ достаточно оценки одного из параметров – линейной скорости кровотока (V_s).

Изменение линейной скорости кровотока является показателем выраженности местно раздражающего действия исследуемого вещества на сосуды ХАО.

4. Оборудование, материалы и реактивы

Допплерограф ультразвуковой компьютеризированный для исследования скорости кровотока ММ-Д-К «Минимакс-Допплер-К», оснащенный датчиком с частотой 25 МГц или с аналогичными характеристиками	
Термостат лабораторный, позволяющий поддерживать температуру (38,0 ± 0,5) °С	
Подставка	
Встряхиватель лабораторный типа Вортекс или с аналогичными характеристиками	ТУ 64-1-1081—73
Термометр лабораторный 0—55 °С	ГОСТ 8.279—78
Магнитная мешалка	ТУ 25-11-834—73
Весы аналитические (предел допустимой погрешности не более 0,01 мг)	ГОСТ 24104—2001
Колбы, цилиндры стеклянные мерные	ГОСТ 1770—74
Микропробирки пропиленовые конические объемом 0,5 и 1,5 $см^3$ с крышкой	
Штатив для микропробирок вместимостью 0,5 и 1,5 $см^3$	
Наконечники одноразовые для дозаторов переменного объема в штативах	
Дозаторы автоматические переменного объема	ТУ 9452-002-33189998—2002

Часы сигнальные	ТУ 25-07-57
Пинцеты медицинские	ГОСТ 21241—89
Шпатели металлические	ГОСТ 19126—2007
Фильтровальная бумага	ГОСТ 12026—76
Вода дистиллированная	ГОСТ 6709—02
Спирт этиловый (этанол)	ГОСТ Р 51652—2000 или ГОСТ 18300—87
Диметилсульфоксид (99,5 %)	
Калий гидроксид	ГОСТ 24363—80
0,9 %-й раствор NaCl	

4.1. Характеристика объектов исследования

Исследования проводят на 10-дневных куриных эмбрионах домашних кур породы белый леггорн. До начала эксперимента яйца выдерживают тупым концом вверх при температуре (38,0 ± 0,5) °С. Для поддержания влажности в термостат помещают емкость с водой, объемом 500 $см^3$.

5. Подготовка исследуемых образцов

5.1. Растворители

При работе с гидрофильными веществами в качестве растворителя используют физиологический раствор (0,9 % NaCl). При работе с гидрофобными веществами в качестве растворителя используют медицинское оливковое масло, диметилсульфоксид или этиловый спирт в конечной концентрации не более 1 %. При необходимости допускается использование других растворителей в концентрациях, не вызывающих раздражающего действия, что должно быть подтверждено экспериментально. Растворитель, вносимый в эквивалентных объемах, используется в качестве негативного контроля.

5.2. Контроли

В качестве негативного контроля используют растворитель, вносимый в эквивалентных объемах. В качестве позитивного контроля используют раствор КОН (2,5 %). Раствор КОН готовят непосредственно перед использованием. Для этого навеску (250,0 ± 0,1) мг помещают в мерную колбу вместимостью 10 $см^3$, до половины заполняют физиологическим раствором, перемешивают до полного растворения вещества, доводят объем физиологическим раствором до метки и тщательно перемешивают. Изменение скорости кровотока (*Vs*) при воздействии на сосуды ХАО контрольного образца КОН составляет (0,0 ± 2,0) %.

5.3. Исследуемые концентрации

Во избежание ложноположительных или ложноотрицательных результатов образцы исследуют в концентрациях, не вызывающих изменение pH инкубационной среды и/или осмотического давления (± 0,1).

Экстракты из испытуемых образцов готовят путем настаивания в физиологическом растворе или модельной среде (медицинское оливковое масло, диметилсульфоксид или этиловый спирт в конечной концентрации не более 1 %). Соотношения веса образца и объема модельной среды приведены в табл. 1. Навески образцов взвешивают в сухой чистой колбе, куда потом добавляют требуемый объем модельной среды. В другую колбу наливают модельную среду и обе колбы помещают в термостат при 37 °С и инкубируют 1 ч.

Таблица 1

Условия приготовления экстрактов

Вид продукции	Масса образца, г	Объем модельной среды, $см^3$	Степень разведения образца	Продолжительность экстракции, ч
Шампуни для волос и тела	1,0	4,0	1 : 5	1
Ополаскиватели для волос	1,0	4,0	1 : 5	1
Туалетное мыло	1,0	4,0	1 : 5	1
Средства для принятия душа и ванны	1,0	4,0	1 : 5	1
Дезодоранты и депилятории	1,0	4,0	1 : 5	1
Кремы, эмульсии и др. (не спиртосодержащие)	2,5	2,5	1 : 1	1
Кремы, эмульсии и др. (спиртосодержащие; с разогревающим эффектом)	1,0	4,0	1 : 5	1
Маски питательные, очищающие и др.	2,5	2,5	1 : 1	1
Зубные пасты и отбеливающие системы	1,0	4,0	1 : 5	1
Детские присыпки (тальк, пудра)	1,0	4,0	1 : 5	1
Средства моющие, чистящие, полирующие для мытья посуды, предназначенной для контакта с пищевыми продуктами и водой	1,0	4,0	1 : 5	1
Зубные эликсиры и ополаскиватели	2,5	2,5	1 : 1	1
Средства для нанесения на губы	1,0	4,0	1 : 5	1
Средства для макияжа глаз	1,0	4,0	1 : 5	1
Средства для интимной гигиены	1,0	4,0	1 : 5	1
Средства для защиты кожи от воздействия производственных вредных факторов (мази, кремы, пасты и т. д.)	1,0	4,0	1 : 5	1

6. Подготовка тест-объекта

Перед началом эксперимента яйцо помещают на фиксирующую подставку тупым концом вверх и вскрывают воздушную камеру. От скорлупы освобождают всю воздушную камеру, после чего поверхность подскорлуповой оболочки смачивают физиологическим раствором и полностью ее удаляют так, чтобы не повредить ХАО. На ХАО наслаивают 400 мм^3 физиологического раствора (для предотвращения высыхания). Яйцо помещают в термостат на 20 мин для снятия травматического шока.

Если происходит повреждение ХАО или возникают кровотечения, то яйцо отбраковывается.

7. Процедура тестирования

Выбрав кровеносный сосуд на поверхности ХАО, датчик располагают так, чтобы он находился под углом 60° к исследуемому сосуду, добиваясь при этом слабых по амплитуде пульсаций без острых пиков (медленно меняющаяся волна) допплерограмм, отображающихся на мониторе прибора.

После измерения скорости кровотока в выбранном сосуде на нулевой минуте проводится наслаивание экстракта из исследуемого образца в количестве 400 мм^3. Нулевая минута соответствует интактному состоянию сосудов ХАО эмбриона. Через 80 с оценивается изменение скорости кровотока сосудов ХАО под влиянием исследуемого образца.

8. Анализ допплерограмм

Анализируется не менее 10 эмбрионов для испытания одного образца. Компьютерная программа Minimax Doppler v.1.7, разработанная для прибора «Минимакс-Допплер-К», автоматически проводит анализ допплерограмм, вычисляя линейную скорость кровотока (параметр V_s, см/с).

9. Статистическая обработка данных

Раздражающее действие на слизистую оболочку глаза (X) соответствует изменению скорости кровотока V_s, выраженному в процентном соотношении относительно нулевой точки измерения и высчитывается по формуле:

$$\tilde{O} = \frac{(V_s)_n - (V_s)_0}{(V_s)_0} \cdot 100, \text{ где}$$

$(V_s)_n$ – линейная скорость кровотока в динамике измерений;

$(V_s)_0$ – линейная скорость кровотока на нулевой минуте.

Результат испытания представляется в виде:

$$X \pm \sigma, \text{ при } P = 0{,}95$$

За результат анализа принимают среднее арифметическое 10 и более параллельных измерений.

Среднее квадратичное отклонение (σ) результатов определений количественного выражения раздражающего действия вычисляется по формуле:

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n} (\bar{X} - X_i)^2}{n-1}}, \text{ где}$$

X_i – i-й результат определений;

n – число параллельных определений;

$\bar{X}$ – среднее арифметическое результатов изменения скорости кровотока.

Среднее арифметическое результатов изменения скорости кровотока вычисляется по формуле:

$$\bar{X} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^{n} X_i$$

Достоверность различий между контрольной группой (группа с растворителем) и опытной (исследуемые экстракты) вычисляется по формуле:

$$\dot{O} = \frac{\bar{X}_0 - \bar{X}_{\hat{e}}}{\sqrt{\sigma_0^2 + \sigma_{\hat{e}}^2}}$$

Все указанные статистические параметры можно также вычислять с помощью компьютерной программы «Statistica» или иных программных средств.

10. Интерпретация результатов

Вещество, вызывающее раздражающее действие (изменение скорости кровотока) относительно контрольной группы менее чем на 15 % следует отнести к соединениям с невыраженным раздражающим действием и исключить его дальнейшее тестирование по данному эффекту на лабораторных животных.

Вещества, вызывающие раздражающее действие (изменение скорости кровотока) относительно контрольной группы более чем на 15 %, подлежат дальнейшим испытаниям на млекопитающих.

11. Форма представления результатов

По результатам эксперимента оформляется протокол. В протоколе должна быть отражена следующая информация:

- название продукта;
- производитель;
- растворитель;
- разведение;
- полученные результаты.

Библиографический список

1. Лукьянов А. С. Оценка раздражающего действия веществ по тесту на хориоаллантоисной оболочке куриного эмбриона (HET-CAM test) в кн. Альтернативные методы исследований (экспресс-методы) для токсиколого-гигиенической оценки материалов и продуктов. М., ТОО Экспринт НВ, 1999. С. 103—107.

2. Лукьянов А. С., Павлова Т. Н., Халепо А. И., Ткачева Т. А. Тест HET-CAM как альтернатива окулярному тесту Draize //1-й съезд токсикологов России 17—20.11.1998 Тезисы докладов. М., 1998. 292 с.

3. Постановка исследований по выявлению раздражающих свойств химических соединений на конъюктиву глаза с помощью теста на хориоаллантоисной оболочке куриного эмбриона: Методические указания 2.2.756—99 (от 20.06.1999). М., 1999.

4. Методические указания по оценке раздражающего действия фармакологических веществ с помощью теста на хориоаллантоисной оболочке куриного эмбриона (ХЕТ-САМ тест): Методические указания. М., 2000.

5. Козлов В. А., Артюшенко Н. К., Шалак О. В. и др. Ультразвуковая допплерография в оценке состояния гемодинамики в тканях шеи, лица и полости рта в норме и при некоторых патологических состояниях //Медицинская академия последипломного образования, ООО «СП Минимакс». С.-Пб., 2000.

6. Belyankina E.J., Rodina I.A., Shevchenko T.V., Tikhonov V.P. «Application of ultrasonic dopplerografic metod on the model of chicken embryo vessels in ovo for standartization of natural substances» //The 12th International Congress «Phytopharm 2008». P. 20.

7. Способ оценки раздражающего действия и активности природных, синтетических субстанций и готовых препаратов на куриных эмбрионах методом ультразвуковой допплерографии //Патент на изобретение № 2383888, 2010.

gost.e-ecolog.ru