Государственное санитарно-эпидемиологическое нормирование Российской Федерации

2.2.5. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ ПРОИЗВОДСТВЕННОЙ СРЕДЫ

Постановка исследований по выявлению раздражающих свойств химических соединений на конъюнктиву глаза с помощью теста на хориоаллантоисной оболочке куриного эмбриона

Методические указания
МУ 2.2.756—99

Издание официальное

Минздрав России
Москва • 2000

gost.e-ecolog.ru

2.2.5. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ ПРОИЗВОДСТВЕННОЙ СРЕДЫ

Постановка исследований по выявлению раздражающих свойств химических соединений на конъюнктиву глаза с помощью теста на хориоаллантоисной оболочке куриного эмбриона

Методические указания
МУ 2.2.756—99

ББК 51.1(2)1
П63

П63 **Постановка** исследований по выявлению раздражающих свойств химических соединений на конъюнктиву глаза с помощью теста на хориоаллантоисной оболочке куриного эмбриона: Методические указания.—М.: Федеральный центр госсанэпиднадзора Минздрава России, 2000.— 8 с.

ISBN 5—7508—0192—6

1. Разработаны Московским государственным университетом им. М. В. Ломоносова (Лукьянов А. С.), НИИ медицины труда РАМН (Халепо А. И., Ткачева Т. А.), Российским национальным комитетом по биоэтике при РАН (Павлова Т. Н.)

2. Утверждены и введены в действие Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации 20 июня 1999 года.

3. Введены в дополнение к действующим Методическим указаниям "К постановке исследований по изучению раздражающих свойств и обоснованию предельно допустимых концентраций избирательно действующих раздражающих веществ в воздухе рабочей зоны" № 2196—80.

ББК 51. 1(2)1

Редактор Барабанова Т. Л., Максакова Е. И.
Технический редактор Гарри Д. В.

Подписано в печать 17.02.00

Формат 60x90/16 Печ. л. 0,5

Тираж 150 экз. Заказ 65

ЛР № 021232 от 23.06.97 г.
Министерство здравоохранения Российской Федерации
101431, Москва, Рахмановский пер., д. 3

Оригинал-макет подготовлен к печати
и тиражирован Издательским отделом
Федерального центра госсанэпиднадзора Минздрава России
125167, Москва, проезд Аэропорта, 11.
Отделение реализации, тел. 198-61-01

© Федеральный центр госсанэпиднадзора Минздрава России, 2000

Содержание

1. Область применения 4
2. Постановка исследований 5
2.1. Тест-объект 5
2.2 Исследуемые соединения. 5
2.3. Оборудование, инструменты, реактивы 5
2.4. Ход определения 6
2.4.1. Подготовка куриного эмбриона 6
2.4.2. Тестирование вещества 6
3. Оценка результатов 7
4. Условия исключения или использования животных для дальнейшего испытания раздражающего эффекта тестируемого вещества 8
Библиографические данные 8

УТВЕРЖДАЮ
Главный государственный санитарный врач Российской Федерации, Первый заместитель Министра здравоохранения Российской Федерации
Г. Г. Онищенко
20 июня 1999 г.
Дата введения: с момента утверждения

2.2.5. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ ПРОИЗВОДСТВЕННОЙ СРЕДЫ

Постановка исследований по выявлению раздражающих свойств химических соединений на конъюнктиву глаза с помощью теста на хорио-аллантоисной оболочке куриного эмбриона

Методические указания
МУ 2.2.756—99

1. Область применения

Методические указания предназначены для токсикологов, занимающихся обоснованием гигиенических нормативов химических соединений в воздухе рабочей зоны, первичной токсикологической оценкой химических соединений, продукции и товаров различного назначения. Методические указания посвящены постановке исследований по изучению выраженных раздражающих свойств химических соединений, продуктов и изделий на их основе, различных препаратов на конъюнктиву глаза с помощью теста на хориоаллантоисной оболочке куриного эмбриона (HET-CAM test). Предлагаемый тест должен использоваться для скрининговой оценки возможного раздражающего действия исследуемых продуктов на конъюнктиву глаза с целью исключения тестирования на лабораторных животных продуктов с выраженными раздражающими свойствами.

Издание официальное

В "Международных рекомендациях по проведению медико-биологических исследований с использованием животных", опубликованных в 1985г. Советом международных медицинских научных организаций, сформулированы приемлемые для научных работников и для общественных групп защитников животных теоретические принципы и этические правила в отношении использования животных для биологических и медицинских исследований, где, в частности отмечено, что моральный долг ученых – гуманно относиться к экспериментальным животным, постоянно стремиться изыскивать способы получения результатов, ограничивающие либо исключающие использование животных. Вместе с тем отмечено, что при существующем уровне знаний использование животных является неизбежным. Учитывая требования настоящего времени – этические соображения об ограничении экспериментов на животных, а также то, что исследование раздражающего действия химических веществ на конъюнктиву глаза кролика является одним из самых болезненных для животных тестов, в соответствии с данными Методическими указаниями должен использоваться модифицированный HET-CAM test для предварительной оценки выраженного раздражающего действия веществ на конъюнктиву глаза. Этот тест хорошо зарекомендовал себя и используется для этой цели в разных странах.

2. Постановка исследований

2.1. Тест-объект

Тест-объектом является хориоаллантоисная оболочка 9—10-дневных куриных эмбрионов. Используются яйца кур породы "леггорн" из инкубаторов птицефабрик. До начала эксперимента яйца необходимо выдержать в стационарном положении тупым концом вверх, для чего за сутки до опыта их помещают в термостат при t=37,8 °С и влажности 62,5 %.

2.2 Исследуемые соединения

Для тестирования пригодны как жидкие (в том числе – окрашенные), так и твердые вещества. В эксперименте используется 10 % водный или масляный (медицинское оливковое масло) раствор вещества, в зависимости от преимущественной растворимости его в воде или масле. Вещества, растворимость которых в воде или масле менее 10 %, исследуются в нативном виде. Такие вещества предварительно измельчаются в ступке до порошкообразного состояния.

2.3. Оборудование, инструменты, реактивы

Термостат, зубоврачебный бор (или надфиль), весы аналитические, термометры, пинцеты, микропипетки, дозаторы, хронометр, бинокулярный микроскоп, ступка, подставка, набор колечек из инертного материала (например, из фторопласта или силиконовой резины) со следующими параметрами:

внутренний диаметр 4,5—5 мм, толщина 1—1,5 мм (кольца не должны иметь острых краев и неровностей), физраствор, медицинское оливковое масло, миорелаксант (диплацин или д-тубокурарин).

2.4. Ход определения

2.4.1. Подготовка куриного эмбриона

Перед началом опыта фиксирующая подставка для яйца, а также все используемые вещества должны быть нагреты до температуры инкубации в термостате.

Инкубированное яйцо, подготовленное к эксперименту, укрепляют на фиксирующей подставке тупым концом вверх так, чтобы примерно ¼ яйца выступала над подставкой. Зубоврачебным бором или надфилем вскрывают скорлупу в центре и, отламывая скорлупу небольшими кусочками, освобождают от нее воздушную камеру. Раствором миорелаксанта на физрастворе смачивают всю открытую поверхность и помещают яйцо в термостат. Концентрацию миорелаксанта подбирают опытным путем предварительно так, чтобы через 10—20 мин она обеспечивала обездвиживание эмбриона, которое должно сохраняться еще на 20—30 минут. В случае использования диплацина-дихлорида, ориентировочная начальная концентрация должна составлять 0,1—0,2 %.

Подставку с яйцом переносят на предметный столик бинокулярного микроскопа. Микропипеткой отсасывают из воздушной камеры избыток жидкости и осторожно удаляют жесткую подскорлуповую оболочку, обнажая хориоаллантоисную оболочку (ХАО). Если при этом ХАО повреждена, яйцо отбраковывается.

2.4.2. Тестирование вещества

На ХАО помещают два смоченных физраствором колечка с зазором между ними 1—2 мм. Устанавливают увеличение бинокуляра и освещение так, чтобы оба кольца занимали все поле зрения и, чтобы были освещены участки ХАО внутри колец. Дозатором в одно из колец наливают 0,02 мл растворителя (контроль), а в другое 0,02 мл тестируемого раствора вещества (опыт).

Для твердых веществ на выбранный участок ХАО аккуратно помещают 0,3 г тестируемого вещества в порошкообразном или пастообразном состоянии. Колечко при этом не используется. Вещество должно располагаться равномерно и занимать небольшой кругообразный участок. Наблюдение ведут за участком ХАО в приграничной с веществом зоне. В тех случаях, когда растворы веществ имеют интенсивную окраску или жидкость обладает низкой прозрачностью, мешающей наблюдениям, тестирование следует проводить по схеме для твердых веществ, нанося на поверхность ХАО каплю раствора объемом 0,3 мл.

Время наблюдения за состояние ХАО зависит от вида растворителя и приводится в табл. 1 (использованы рекомендации H.Spielman et al., основанные на итогах апробации HET-CAM теста в Германии).

Таблица 1

Вид растворителя	Время наблюдения (сек)
Дистиллированная вода	50
Масло медицинское оливковое	83
Без растворителя	100

Учитывается степень повреждения ХАО по следующим признакам:

1. Сужение сосудов без остановки или с временной остановкой тока крови в отдельных капиллярах;
2. Замедление и/или остановка кровотока;
3. Гиперемия;
4. Тромбоз сосудов;
5. Появление кровоизлияний и их распространенность;
6. Коагуляция белков ХАО (нарушение прозрачности).

Каждое вещество тестируется на 3—5 эмбрионах. Если результаты имеют большой разброс, то число эмбрионов для тестирования увеличивается до 10.

3. Оценка результатов

Степень выраженности раздражающего эффекта определяется согласно табл. 2.

Таблица 2

Группы	Выраженность эффекта	Наблюдаемая картина
5 группа	Отсутствие действия	Не отличается от контроля
4 группа	Слабое	Сужение сосудов с остановкой или с временной остановкой тока крови в отдельных капиллярах
3 группа	Умеренное	Замедление тока крови и тромбоз в отдельных капиллярах. Слабая гиперемия
2 группа	Выраженное	Тромбоз с остановкой кровотока в мелких сосудах; точечные кровоизлияния по всей обработанной поверхности. Выраженная гиперемия
1 группа	Резко выраженное	Коагуляция и лизис. Множественные кровоизлияния средних и мелких сосудов; тромбоз с остановкой кровотока

4. Условия исключения или использования животных для дальнейшего испытания раздражающего эффекта тестируемого вещества

Вещество, относящееся по результатам HET-CAM test к 1 или 2 группе, следует отнести к соединениям с выраженным раздражающим эффектом на конъюнктиву глаза кролика и исключить его дальнейшее тестирование по этому эффекту на лабораторных животных.

Вещества 3—5 группы подлежат дальнейшим испытаниям сначала на 1 кролике, а при отсутствии раздражающего эффекта , дополнительно – еще на 2 животных.

Библиографические данные

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 токсикологогигиенической 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. I-й съезд токсикологов России 17—20 ноября 1998г./Тезисы докладов.—М.,1998.—292 с.

3. К постановке исследований по изучению раздражающих свойств и обоснованию предельно допустимых концентраций избирательно действующих раздражающих веществ в воздухе рабочей зоны: Методические указания. Утв. МЗ СССР № 2196—80 от 11.09.80.—М.,1980.—18 с.

4. International Guiding principles for biomedical research involving animals. Geneva. Council for international organizations of medical science, 1985.

5. INVITOX protocol , Number 47. HET-CAM test. January 1992. Nottingham, England.

6. Lupke N.P. HET (Hen's Egg Test) in Toxicological Research. 1986.

7. Spielman H. et al. Results of validation study in Germany of two in vitro alternatives to the Draize eye irritation test and the 3T3 NRU cytotoxicity test. ATLA, 1996.—V. 24.—P. 741—758.

gost.e-ecolog.ru