

ПРОТОКОЛ

ИЗУЧЕНИЕ ЦИТОТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ

Заказчик: ЗАО "Научный Центр "БИОФОРМ"

Исполнитель: НИИ Биомедицинской химии, лаборатория медицинских биотехнологий

Объект испытаний: Материал-биополимер водосодержащий с ионами серебра "АРГИФОРМ"

1. Цитотоксическое действие материала исследовали, руководствуясь ГОСТ Р ИСО 10993.5-99 «Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 5. Исследование на цитотоксичность: методы "in vitro"», на линии клеток феохромоцитомы крыс PC12 с использованием МТТ теста.

Для того, чтобы подтвердить положение о том, что бактерицидная активность материала "АРГИФОРМ" обусловлена присутствием только на определенном промежутке времени в его составе ионов серебра, проведены сравнительные испытания по определению цитотоксичности трех образцов материалов.

2. Образцы

2.1. Серийно выпускаемый материал-биополимер водосодержащий с ионами серебра "АРГИФОРМ" (далее "АРГИФОРМ"). Представлен в стерильном виде. Одноразовые инъекционные пластиковые шприцы, заполненные материалом "АРГИФОРМ", укупоренные пробками и запаянные в индивидуальный блистер. Блистер со шприцем, в комплекте с иглой для инъекций, упакованы в индивидуальные фирменные картонные коробки. На коробках типографским способом нанесена маркировка, наименование материала и торговый знак.

2.2. Серийно выпускаемый полиакриламидный материал без ионов серебра ФОРМАКРИЛ CE 0123 (далее ПААМ). Представлен в стерильном виде. Одноразовые инъекционные пластиковые шприцы, заполненные материалом "ФОРМАКРИЛ", укупоренные пробками и запаянные в индивидуальный блистер.

2.3. «Отмытый» от ионов серебра по методике, описанной в п. 3.2.3.1., моделирующей «вымываемость» ионов серебра в организме человека, материал "АРГИФОРМ" (далее "АРГИФОРМ, отмытый от ионов серебра»). Представлен в стерильном виде. Одноразовые инъекционные пластиковые шприцы, заполненные материалом, укупоренные пробками и запаянные в индивидуальный блистер.

2.3.1. Методика приготовления отмытого от ионов серебра материала "АРГИФОРМ"

Содержание ионов серебра в испытуемом материале перед началом эксперимента составляло 38,8 мкг/г.

Вымываемость ионов серебра из материала АРГИФОРМ, предназначенного для эндопротезирования, моделировали путем настаивания в дистиллированной воде при температуре $(40 \pm 1)^\circ\text{C}$. Соотношение между весом материала и объемом модельной

среды рассчитывали по формуле:

$$\frac{M \cdot K}{V},$$

где M - максимально возможное количество материала, используемое в клинической практике, равное 20 г;

K - коэффициент аггравации, равный 10;

V - объем крови в организме человека (5 л).

Вымываемость ионов серебра в вытяжку, которую меняли после каждого определения, анализировали атомно-абсорбционным спектрометрическим методом на приборе ААС-30, чувствительность метода 0.01мкг/г.

Динамика миграции ионов серебра из геля приведена в таблице №1.

Таблица №1

Время экспозиции, сутки	0	1	2,5	7,5	10	17	23
Содержание ионов серебра, мкг/г	38,8	0,17	0,15	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01

Как следует из приведенной таблицы, к 7,5 суткам ионы серебра в пределах чувствительности метода не обнаружены.

3. Эксперимент по изучению цитотоксичности

Проведено 3 серии опытов по изучению цитотоксичности.

1 серия. Испытания контрольных материалов.

2 серия. Испытания образцов материалов на основе полиакриламидных материалов (ПААМ и «Аргиформ») и экстрактов из них.

3 серия. Испытания образцов материалов (ПААМ и «Аргиформ, отмытый от ионов серебра») и экстрактов из них.

3.1. Материалы, использованные в эксперименте и методика эксперимента

Линии клеток

Использовали линию клеток феохромоцитомы крыс PC12 . Клетки не содержали микроплазмы.

Подготовка клеток

Клетки культивировали в среде RPM I 1640 (фирмы "ПАНЭКО"), содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки и антибиотиков, до состояния плотного многослоя (конфлюэнта) в 48-луночных планшетах при температуре 37°C с содержанием 5% CO₂.

Контрольные материалы

В качестве отрицательного контрольного материала, использовали силикон фирмы "БАЕР СИЛИКОН" марки HV 3/422.

В качестве положительного контрольного материала использовали водные растворы фенола.

4. Методика эксперимента

Для определения цитотоксического действия препаратов использовали МТТ-тест. Для этого к клеткам добавляли 0,5%-ный раствор МТТ- реактива и через 3 часа инкубировали при температуре 37°C. Образовавшиеся кристаллы (только в живых клетках) растворяли вместе с клетками при добавлении 25%-ного раствора додецилсульфата натрия. Окрашенный раствор фотометрировали в мультиiskanе “Plus P version 2.03” при 492 нм.

Все работы по тестированию, в том числе и по получению экстрактов из материалов, проводили в стерильных условиях в ламинаре фирмы "FLOW".

Экстракты из гелевых материалов получали, инкубируя 1 г “Аргиформа” в 5 мл культуральной ростовой среды RPMI 1640 с рН 7.4 при температуре 37°C в течение 24 часов.

Цитотоксичность материала изучали при добавлении его «per se» к клеткам в количестве 50 и 100 мг/лунку в трех параллельных пробах. Экстракты из материала изучали при замене ими ростовой среды полностью.

5. Наблюдения и результаты

Результаты испытаний представлены в % к контролю, в котором клетки содержали только культуральную среду (контрольный реактив).

5.1. Испытание цитотоксичности образцов контрольных материалов

Результаты изучения цитотоксичности контрольных материалов приведены в таблице №2.

Таблица №2

№	Образец	Количество	% к контролю
1	Силикон	50 мг	98,5
2	Водный раствор фенола	0,015 мл	71,4
3	Водный раствор фенола	0,030 мл	52,4

5.2. Испытание цитотоксичности образцов материалов на основе полиакриламидных гелей (ПААМ и “Аргиформ”) и экстрактов из них

Результаты изучения цитотоксичности материалов и их экстрактов представлены в таблице №3.

Таблица №3

№	Образец	Количество	% к контролю
1	ПААМ	50 мг	87,9
2	ПААМ	100 мг	92,4
3	Аргиформ	50 мг	63,1
4	Аргиформ	100 мг	0
5	Экстракт из ПААМ	100%	94,7
6	Экстракт из Аргиформа	100%	41,5

Сравнительный анализ цитотоксичности образцов "ПААМ" и "АРГИФОРМ" показал, что гибель клеток вызывает лишь образец материала "АРГИФОРМ" и при определенном содержании ионов серебра. Из приведенной таблицы видно, что цитотоксический эффект наблюдается только у образца материала "АРГИФОРМ" при воздействии на клетки больших количеств его. То есть, цитотоксичность обусловлена присутствием в материале ионов серебра, которые обеспечивают его антибактериальное свойство.

5.3. Испытания на цитотоксичность образцов материалов ПААМ и «Аргиформ, отмытый от ионов серебра» и экстрактов из них

В следующей серии экспериментов сравнивали цитотоксичность материалов ПААМ и «Аргиформ, отмытый от ионов серебра» и экстрактов из них.

Как следует из результатов опыта, приведенных в таблице № 4, испытуемые объекты не проявили цитотоксической активности.

Таблица №4

№	Образец	Количество	% к контролю
1	ПААМ	50 мг	104,8
2	ПААМ	100 мг	109,4
3	Аргиформ, отмытый от ионов серебра	50 мг	106,3
4	Аргиформ, отмытый от ионов серебра	100 мг	98,1
5	Экстракт из ПААМ	100%	112,9
6	Экстракт из Аргиформа, отмытого от ионов серебра	100%	105

6. Заключение по цитотоксичности

Опыты *in vitro* на культуре клеток феохромоцитомы крыс РС12 показали, что антибактериальный материал "АРГИФОРМ" после освобождения от ионов серебра не оказывает цитотоксического эффекта.

Проведенный эксперимент показывает, что основа материала - полиакриламидный гель не обладает цитотоксичностью, а подавляющее воздействие на клетки материала "АРГИФОРМ" носит временный характер и обусловлено присутствием в нем ионов серебра для придания ему бактерицидных свойств.

Исполнитель испытаний:

Ведущий научный сотрудник НИИ Биомедхимии, д.б.н. _____ (Абакумова О.Ю.)