

ПРОТОКОЛ

Изучение цитотоксичности в опытах in vitro.

Материал - биополимер водосодержащий с ионами серебра «Аргиформ».

Материал - биополимер водосодержащий с ионами серебра АРГИФОРМ разработан производителем для эндопротезирования тканей человека. В состав выпускаемого полиакриламидного водосодержащего материала ФОРМАКРИЛ, были добавлены ионы серебра для защиты материала от бактериального воспаления. В связи с добавлением ионов серебра материал обладает свойством подавления бактерий на определенном промежутке времени, что подтверждают проведенные тесты. В связи с этими данными, изучение проводили в сравнении с использованием трех вариантов материала.

Образцы

1. Серийно выпускаемый материал Аргиформ с ионами серебра, далее "Аргиформ".
2. Серийно выпускаемый полиакриламидный материал без ионов серебра ФОРМАКРИЛ SE 0123 (аналоги: ИНТЕРФАЛЛ Украина, БИО-АЛКАМИД SE 0123 Италия, АКВАМИД SE 0543 Дания) далее ПААМ.
3. Отмытый материал Аргиформ от ионов серебра по методике описанной ниже, моделирующей вымываемость ионов серебра в организме человека после имплантации, далее "Аргиформ (без ионов серебра)".

Методика приготовления отмытого от ионов серебра материала Аргиформ:

Вымываемость ионов серебра из материала АРГИФОРМ, предназначенного для эндопротезирования, в модельную среду (дистиллированная вода): при имплантации 20 гр. материала;

Вытяжки готовили путем настаивания в модельной среде при температуре $40^{\circ}\text{C} \pm 1,0^{\circ}\text{C}$ при соотношении между весом материала и объемом среды рассчитывали по формуле: $M/V \cdot K$, где

M- максимально возможное количество материала,

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

K- коэффициент аггравации – 10.

Вымываемость ионов серебра в вытяжку, которую меняли после каждого определения, анализировали атомно-абсорбционным спектрометрическим методом на приборе ААС-30. Результаты эксперимента приведены в таблице.

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

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

Эксперимент на вымываемость ионов серебра показал, что к 17 суткам содержание ионов серебра равно 0. Материал принимает характеристики первоначального вещества и теряет способность подавления бактерий.

Эксперимент

Использовали линию клеток феохромоцитомы крыс РС12 . Клетки не содержали микроплазмы

Клетки культивировали в среде RPM I 1640 (фирмы "ПАНЭКО"), содержащей 10 % эмбриональной телячьей сыворотки и антибиотика, до состояния плотного многослой (конфлюэнта) в 48-луночных планшетах при 37°C с содержанием 5% CO_2 .

Все работы по тестированию образцов, в том числе и по получению их экстрактов проводили в стерильных условиях в ламинаре фирмы "FLOW". Исследовали цитотоксичность материала Аргиформ и его экстракта. Экстракт получали, инкубируя 1 г Аргиформа в 5 мл культуральной ростовой среды RPMI 1640, рН 7.4 при 37°C в течение 24 часов.

Материал добавляли к клеткам в количестве 50 и 100 мг/лунку в трех параллельных пробах.

Экстрактом материала заменяли ростовую среду полностью.

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

В качестве положительного контрольного материала использовали водный раствор фенола.

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 37 °С образывавшиеся кристаллы (только в живых клетках) растворяли в месте с клетками при добавлении 25% ного раствора додецилсульфата натрия. Окрашенный раствор фотомертрировали в мультискане «Plus P version 2.03» при 492 нм. Результаты представленные в % к контролю, в котором клетки содержали только культуральную среду (контрольный реактив).

Наблюдения и результаты

Таблица №1 Испытание контрольных материалов.

№	Образец	Количество материала в мл.	% 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%

В таблице 2 представлены результаты исследования цитотоксичности материалов и их экстрактов. Обнаружена цитотоксичность только у материала с ионами серебра и его экстракта.

Таблица 2. сравнительный анализ цитотоксичности ПААМ и Аргиформ.

№	Образец	Количество материала в мл.	% 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 ПААМ		94,7%
6	Экстракт Аргиформ		41,5%

В следующей серии экспериментов сравнивали цитотоксичность материалов Аргиформ (без ионов серебра) и ПААМ и их экстрактов. Клетки с материалами и их экстракты

культивировали 24 часа. В образцах и экстракте не обнаружили цитотоксической активности таблица 3.

Таблица 3 сравнительный анализ цитотоксичности ПААМ и Аргиформ.

№	Образец	Количество материала в мл.	% к контролю
1	ПААМ	50 мг	104,8%
2	ПААМ	100 мг	109,4%
3	Аргиформ (без ионов серебра)	50 мг	106,3%
4	Аргиформ (без ионов серебра)	100 мг	98,1%
5	Экстракт ПААМ		112,9%
6	Экстракт Аргиформ (без ионов серебра)		105%

Оценка результатов

Заключение: Опыты *in vitro* на культуре клеток феохромоцитомы крыс РС12 показали, что антибактериальный материал «Аргиформ», после экстрагирования ионов серебра, не цитотоксичен.

Исполнитель испытаний:
Ведущий научный сотрудник НИИ
Биомедхимии, дбн

(Абакумова О. Ю.)