

ПРОТОКОЛ ИЗУЧЕНИЕ ГЕМОЛИТИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ

Заказчик: ЗАО "Научный Центр "БИОФОРМ".

Исполнитель: Отдел токсикологических испытаний и исследований материалов и изделий медицинского назначения, испытательной лаборатории ГУН ВНИИИМТ МЗ РФ.

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

1. Гемолитическое действие вытяжек из материала исследовали, руководствуясь ГОСТ Р ИСО 10993.4-99 «Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 4. Исследование изделий, взаимодействующих с кровью. Приложение В. Методы "in vitro" оценка гемолитического действия медицинских изделий», на изолированных эритроцитах кроликов.

Животных в эксперименте содержали, руководствуясь ГОСТ Р ИСО 10993.2-99 «Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 2. Положения об охране животных».

Образцы: материал представлен в стерильном виде. Одноразовые инъекционные пластиковые шприцы, заполненные материалом "АРГИФОРМ", закупоренные 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. Описание и результаты исследования

Изучение гемолитического действия вытяжек из материала "ин витро" проводилось в соответствии со стандартной методикой по 100% гемолизу на изолированных эритроцитах кроликов.

Допустимые параметры: изделие считается свободным от гемолитически активных веществ, если % гемолиза в 3 повторностях (3 эритроцитарные взвеси от 3-х кроликов) менее 2%.

Кровь, полученную путем пункции желудочка сердца у кроликов, помещали в пробирки, обработанные цитратом натрия. 5 мл цитратной крови центрифугировали 10 минут при 900 об/мин. Надосадочную жидкость сливали, к осадку эритроцитов добавляли 8.0 мл физиологического раствора, содержимое тщательно перемешивали и центрифугировали. Надосадочную жидкость снова сливали.

Готовили пробы:

- а) со 100 % гемолизом (5.0 мл дистиллированной воды, плюс 0.5 мл отмытых эритроцитов);
- б) контрольную (5.0 мл физиологического раствора, плюс 0.5 мл отмытых эритроцитов);
- в) опытную (5.0 мл вытяжки из испытуемого материала, плюс 0.5 мл отмытых эритроцитов).

Результаты приведены в таблице №1.

Проба со 100 % гемоллизом	Контрольная проба	Опытная проба
(В 3 – х повторностях)		
5 мл aqua dest. 0,5 мл эритроцитов	5 мл NaCl 0,5 мл эритроцитов	5 мл вытяжки 0,5 мл эритроцитов
Пробирки поставили в термостат на 1 час при 37 °С		
Отцентрифугировали при 2000 об/мин 20 мин		
Надосадочную жидкость отделили в отдельные пробирки для измерения оптической плотности E на спектрофотометре при длине волны 540 нм против воды, кювета 1 см		

Расчет гемоллиза для каждой из 3-х повторностей проводили по формуле:

$$\frac{(A_{\text{проба}} - A_{\text{контроль}}) \cdot 100\%}{A_{\text{со 100\% гемоллизом}}}$$

где $E_{\text{опыт.пробы}}$ – оптическая плотность вытяжки со взвесью эритроцитов;

$E_{\text{контрпробы}}$ – оптическая плотность NaCl со взвесью эритроцитов;

$E_{\text{со 100\% гемоллизом}}$ – оптическая плотность воды со взвесью эритроцитов.

Таблица №1

№ кролика	Вытяжка №1	Вытяжка №2	Контроль	H ₂ O 100% гемоллиз
	Оптический % гемолитической плотности	Оптический % гемолитической плотности		
1	0.012 - 0.19	0.007 - 0	0.009	1.593
2	0.018 – 0.34	0.011 - 0	0.011	2.101
3	0.021 – 0.48	0.014 – 0.14	0.011	2.101
M	0.336	0.046		

3. Заключение по гемолитическому действию

Вытяжки из всех испытанных образцов материала, не проявили гемолитическое действие в опытах "ин витро" с изолированными эритроцитами кроликов: гемоллиз составил от 0.05 до 0.34 % при допустимом значении показателя менее 2%.

Ведущий научный сотрудник ИЛ ГУН ВНИИИМТ МЗ _____ Н.М. Перова