

ПРОТОКОЛ СУБХРОНИЧЕСКИЙ ЭКСПЕРИМЕНТ

Заказчик: ЗАО "Научный Центр "БИОФОРМ".

Исполнитель: Лаборатория экспериментальной патоморфологии Московской медицинской академии им. И.М.Сеченова.

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

1. Субхронический эксперимент включал в себя следующие испытания:

1.1. Субхроническую токсичность материала исследовали, руководствуясь ГОСТ Р ИСО 10993.11-99 «Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 11. Исследование общетоксического действия».

1.2. Местное действие материала после имплантации (имплантационный тест) исследовали, руководствуясь ГОСТ Р ИСО 10993.6 -99 «Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 6. Исследование местного действия после имплантации».

1.3. Гонадотоксическое действие материала оценивали, руководствуясь ГОСТ Р ИСО 10993.10-99 «Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 3. Исследование генотоксичности, канцерогенности, и токсического действия на репродуктивную функцию», по состоянию гистеоструктуры органов воспроизведения самцов.

1.4. Патоморфологические исследования внутренних органов подопытных животных проводили, руководствуясь ГОСТ Р ИСО 10993.10-99 «Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 3. Исследование генотоксичности, канцерогенности и токсического действия на репродуктивную функцию».

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 эксперимента и результаты

2.1. Описание эксперимента

Субхронической эксперимент проводили на 40 беспородных белых крысах самцах массой тела 180 - 200 г. Материал вводили подкожно через иглу из стандартного шприца. Содержание животных осуществлялось в полном соответствии с санитарными нормами. Подопытные животные были разделены на 2 группы:

- контрольной группе (18 животным) была проведена подкожная имплантация пластинки из кварцевого стекла;
- опытной группе (22 животным) материал вводился в подкожную клетчатку с помощью инъекции через толстую иглу в количестве 0,8 мл, что составляет 4.0-4.4 мл на 1 кг массы тела.

Для оценки основных показателей, характеризующих функциональные и морфологические изменения органов и систем организма, использовали следующий перечень тестов, приведенный в таблице № 11

Таблица №11

Изучаемые показатели, методы и аппаратура, использованные в субхроническом эксперименте

Системы и функции	Методы изучения	Использованная аппаратура
Интегральные показатели	внешний вид, поведение, состояние кожных покровов, шерсти и слизистых, потребление пищи и воды	Визуальное наблюдение
Функции печени	бромсульфалеиновая проба, активность трансаминаз (АЛТ и АСТ), фосфатазы (ЩФ), лактатдегидрогеназы (ЛДГ), холинэстеразы (ХЭ), лейцинаминопептидазы (ЛАП), общий белок сыворотки крови, белковые фракции, общий холестерин сыворотки крови, сахар крови, общий и прямой билирубин	Анализатор ФП – 901, автоматический анализатор Techicon SMA16/60, рефрактометр ИРФ-22, прибор для электрофореза с анализатором фореграмм АФ Фотометр КФК-3
Функции почек	содержание азота мочевины, мочевой кислоты, креатинина, калия и натрия в сыворотке крови	Спектрофотометр "Shimadgzu UV-160A", Япония
Окислительно-восстановительные процессы	содержание сульфгидрильных (SH)– групп и малонового ангидрида (МДА) в сыворотке крови	Спектрофотометр "Shimadgzu UV-160A", Япония
Гематологические показатели периферической крови	содержание гемоглобина, эритроцитов, лейкоцитов, время свертывания крови	фотометр КФК-3 (Россия), счетчик форменных элементов крови "PICOSCALE SP" фирмы "Medicor", Венгрия
Патоморфологическое исследование области имплантации, внутренних органов, гонадотоксичность	гистологические срезы органов и тканей в области имплантации	фиксируют в нейтральном формалине и заливают в парафин; срезы окрашивают гематоксилином и эозином; просматривались в световом микроскопе IMOVELL - CARL ZEIS YENA UTHV, Германия

2.2. Результаты исследований субхронической токсичности

Интегральные показатели

На протяжении всего периода наблюдения не отмечено гибели подопытных животных, изменений внешнего вида, поведения, двигательной активности по сравнению с

контрольной группой животных.

Функция печени

По данным бромсульфалеиновой пробы (таблица №12) экскреторная функция печени не отличается у крыс опытной и контрольной групп.

Активность ферментов АЛТ, АСТ, ХЭ, ЛДГ, ЩФ ЛАП, а также уровни общего белка, альбумина, холестерина, сахара, общего и прямого билирубина в сыворотке крови в обеих группах статистически не различаются (таблицы №№13 и 14), что свидетельствует об отсутствии гепатотоксического действия материала.

Функция почек

У опытных животных не выявлено статистически значимых различий в содержании азота мочевины, мочевой кислоты, креатинина, калия и натрия в сыворотке крови по сравнению с контрольными животными (таблица №14), что свидетельствует об отсутствии нефротоксического действия материала.

Окислительно - восстановительные процессы

Изучение возможного влияния материала на уровень перекисного окисления липидов (ПОЛ) проводилось методом оценки содержания небелковых SH - групп, малонового ангидрида (МДА) в сыворотке крови животных.

Подавляющую часть SH - групп составляет восстановленный глутатион, играющий важную роль в процессах детоксикации. МДА является вторичным продуктом ПОЛ и его уровень характеризует интенсивность перекисных процессов в организме.

Содержание SH - групп определяли фотоколориметрически ультрамикрометодом, а уровень МДА измеряли спектрофотометрически по реакции с 2-тиобарбитуровой кислотой.

Результаты, приведенные в таблице №15, свидетельствуют о том, что различия в уровне SH - групп и МДА в сыворотке крови контрольных и опытных животных не обнаружены.

Таким образом, пребывание материала в организме животных на протяжении 2.5 месяцев не влияет на уровень перекисного окисления липидов.

Гематологические показатели

У опытных и контрольных животных такие показатели, как содержание гемоглобина, количество эритроцитов, цветной показатель, количество тромбоцитов и лейкоцитов, гематокрит и время свертывания крови колеблются, не выходя за пределы физиологической нормы, однако статистически значимых различий между группами не установлено (таблица № 15).

Это свидетельствует об отсутствии токсического влияния материала на морфологический состав и функциональное состояние периферической крови экспериментальных животных.

Результаты гематологических и биохимических исследований крыс представлены в таблицах №№ 12-16 в виде $M \pm m$, где M – среднее арифметическое результатов измерений, m – среднее квадратическое отклонение результатов измерений.

Определение относительной массы внутренних органов

По окончании эксперимента у животных проводилось определение массы внутренних органов.

Результаты определения весовых коэффициентов внутренних органов показали, что достоверных отклонений в коэффициентах массы печени, селезенки, почек, тимуса, семенников в опытной группе по сравнению с контрольной не обнаружено.

Результаты определения весовых коэффициентов внутренних органов представлены в таблице №17 также в виде $M \pm m$.

Таблица №12

Бромсульфалеиновая проба, мг%

Группы животных	Концентрация бромсульфалеина в плазме через 2 мин	P
Контроль	$10,73 \pm 0,37$	$>0,05$
Опыт	$10,08 \pm 0,28$	$>0,05$

Таблица №13

Энзимологические показатели сыворотки крови

Показатели	Контроль	Опыт	P
Аланиновая аминотрансфераза, Ед/л	$36,29 \pm 1,36$	$35,07 \pm 1,23$	$>0,05$
Аспарагиновая аминотрансфераза, Ед/л	$116,73 \pm 4,26$	$119,6 \pm 3,86$	$>0,05$
Лактатдегидрогеназа, Ед/л	$2077,88 \pm 46,91$	$2172,50 \pm 49,10$	$>0,05$
Холинэстераза, Ед/л	$151,28 \pm 5,52$	$143,15 \pm 3,80$	$>0,05$
Щелочная фосфатаза, Ед/л	$42,06 \pm 1,42$	$40,88 \pm 1,35$	$>0,05$
Лейцинаминопептидаза, Ед/л	$30,06 \pm 0,51$	$29,22 \pm 0,62$	$>0,05$

Таблица №14

Биохимические показатели сыворотки крови

Показатели	Контроль	Опыт	P
Общий белок, г%	$6,84 \pm 0,30$	$7,03 \pm 0,32$	$>0,05$
Альбумины, г%	$2,89 \pm 0,10$	$2,66 \pm 0,08$	$>0,05$
Холестерин, мг%	$70,98 \pm 2,56$	$70,70 \pm 3,78$	$>0,05$
Сахар, мг%	$113,67 \pm 3,64$	$114,74 \pm 5,41$	$>0,05$
Азот мочевины, мг%	$30,13 \pm 1,14$	$27,38 \pm 0,87$	$>0,05$
Мочевая кислота, мг%	$3,65 \pm 0,08$	$3,43 \pm 0,09$	$>0,05$
Натрий, мэкв/л	$138,00 \pm 3,97$	$138,11 \pm 3,53$	$>0,05$
Калий, мэкв/л	$7,44 \pm 0,19$	$7,19 \pm 0,19$	$>0,05$
Углекислый газ, мэкв/л	$18,44 \pm 0,70$	$19,33 \pm 0,54$	$>0,05$
Креатинин, мг%	$0,72 \pm 0,01$	$0,75 \pm 0,01$	$>0,05$
Общий билирубин, мг%	$0,27 \pm 0,01$	$0,25 \pm 0,01$	$>0,05$
Прямой билирубин, мг%	$0,12 \pm 0,06$	$0,14 \pm 0,01$	$>0,05$

Таблица №15

Уровень небелковых SH – групп, ммоль/мл и MDA, ммоль/мл в сыворотке крови

Группы животных	Небелковые SH-группы	MDA	P
Контроль	$0,30 \pm 0,01$	$69,62 \pm 1,98$	$>0,05$
Опыт	$0,30 \pm 0,01$	$71,92 \pm 2,13$	$>0,05$

Таблица №16

Гематологические показатели

Показатели	Контроль	Опыт	P
Гемоглобин, г%	12,74 ± 0,11	12,93 ± 0,05	>0,05
Эритроциты, млн/мм	5,96 ± 0,15	6,30 ± 0,20	>0,05
Тромбоциты, тыс/мм	812,20 ± 21,98	771,43 ± 15,15	>0,05
Лейкоциты, тыс/мм	9,35 ± 0,28	9,93 ± 0,33	>0,05
Гематокрит, %	41,49 ± 1,25	45,00 ± 1,3	>0,05
Время свертывания, с	39,10 ± 1,38	39,54 ± 1,23	>0,05

Таблица №17

Весовые коэффициенты внутренних органов крыс

Органы, мг	Контроль	Опыт	P
Тимус	2,28 ± 0,03	2,20 ± 0,04	>0,05
Селезенка	2,85 ± 0,12	2,82 ± 0,08	>0,05
Почки	8,27 ± 0,28	8,90 ± 0,22	>0,05
Семенники	10,44 ± 0,31	11,30 ± 0,35	>0,05
Печень	51,43 ± 1,36	50,72 ± 1,25	>0,05

2.3. Патоморфологическое изучение

2.3.1. Методика, описание и результаты патоморфологического исследования

Патоморфологическое изучение ткани области имплантации материала проводилось в сроки 7, 14, 75 суток, гистологическое исследование внутренних органов (печени, почек, селезенки, семенников) проводилось в конце эксперимента.

Образцы ткани фиксировались в нейтральном формалине, заливались в парафин, срезы окрашивались гематоксилином и эозином, пикрофуксином по Ван-Гизону и толуидиновым синим на кислые гликозаминогликаны (ГАГ).

2.3.2. Имплантационный тест

В контрольной группе, где была имплантирована стеклянная пластина, через 7 суток вокруг имплантата отмечается макрофагальная и лимфоцитарная клеточная реакция ткани с примесью нейтрофилов, что свидетельствует о наличии умеренного асептического воспаления, а также пролиферации фибробластов.

Через 14 суток формируется ещё незрелая соединительнотканная капсула вокруг имплантата. Через 2,5 месяца была обнаружена фиброзная капсула вокруг имплантата. Она состоит из зрелой соединительной ткани и имеет небольшую толщину. В пограничной зоне капсулы вблизи имплантата видны немногочисленные крупные макрофаги и единичные гигантские многоядерные клетки. В капсуле и окружающей жировой клетчатке отмечаются небольшие лимфо - макрофагальные инфильтраты с примесью единичных нейтрофилов.

В опытной группе исследование тканей в области имплантации материала в динамике через 7, 14 и 75 дней после его подкожного введения дало следующие результаты.

Через 7 суток материал расположен компактно, имеет ячеистую структуру и окрашивается слабо эозинофильно. Местами в нем видны небольшие единичные скопления крупных макрофагов. Нейтрофильная инфильтрация материала отсутствует. Вокруг материала только начинает формироваться очень тонкая соединительнотканная капсула с рыхлой структурой. В ней и окружающей клетчатке практически отсутствуют нейтрофилы и минимален отек ткани. Макрофагальная реакция умеренная, пролиферация фибробластов очень слабая. В пограничном слое капсулы с материалом видны немногочисленные макрофаги и практически отсутствуют гигантские клетки. За пределами капсулы видны небольшие скопления материала, отщепившегося от основной компактной массы. Эти скопления подвергаются резорбции крупными макрофагами с пенистой цитоплазмой.

Через 14 суток основная масса материала остается компактной, по-прежнему имея ячеистую структуру. Клетки в нем единичны (макрофаги). Соединительнотканная капсула незрелая и крайне тонкая. Фибробластическая реакция, по - прежнему слабая. В пограничном слое увеличивается число макрофагов, которые формируют непрерывный ряд, гигантские клетки единичные. Местами в капсуле видны небольшие фрагменты материала, окруженные макрофагами и реже гигантскими клетками. Большая часть этих фрагментов резорбирована, на их месте остаются пустые ячейки. Резорбция основной массы имплантата осуществляется только на небольших участках на периферии, где видно прорастание материала фибробластами и макрофагами. Воспалительная инфильтрация практически отсутствует.

Через 2,5 месяца после имплантации структура материала несколько изменяется: появляются мелкоячеистые и мелкозернистые участки. Соединительнотканная капсула приобретает более фиброзную структуру, но остается очень тонкой. Значительно уменьшается число макрофагов в пограничной зоне, воспалительная инфильтрация отсутствует. Местами капсула утолщена за счет остатков материала или ячеистой ткани, остающейся после резорбции последнего. Там встречаются макрофаги и отдельные гигантские клетки.

2.3.3. Исследование внутренних органов

Внутренние органы (печень, почки, селезенка, семенники) исследовались после окончания эксперимента.

Заметных различий в их гистологической структуре между контрольной и опытной группами не обнаружено.

В печени, как в опыте, так и в контроле, отмечалось умеренное, полнокровие центральных вен, ветвей воротной вены, межбалочных капилляров. Структура долек и балок не нарушена, количество купферовских клеток обычное, умеренная лимфо-гистиоцитарная инфильтрация в строме вокруг триад отмечается у отдельных животных, как в опыте, так и в контроле. Незначительная белковая дистрофия гепатоцитов одинаково выражена у контрольных и опытных животных.

В почках гистоструктура органа сохранена. Клеточный состав клубочков и стромы почек обычный и не различается в контроле и опыте. Эпителий извитых и прямых канальцев, в основном, не изменен, местами отмечается зернистость его цитоплазмы, но выражена она одинаково в контроле и опыте.

В селезенке у части животных отмечается полнокровие красной пульпы, одинаково выраженное в контроле и опыте. Лимфатические фолликулы обычной величины, имеют зародышевые центры. В маргинальных зонах фолликулов умеренное количество

плазматических клеток, макрофагальная реакция одинаковая.

2.3.4. Гонадотоксичность

В семенниках гистоструктура органа сохранена. Дистрофических и некротических изменений не обнаружено. Сперматогенный эпителий канальцев находится в активном состоянии, выявлены все типичные клеточные ассоциации: сперматогонии, сперматиды, сперматоциты первого и второго порядка. Много активно делящихся клеток. Все это свидетельствует о сохранности репродуктивной функции.

3. Заключение по субхроническому эксперименту

Проведенное субхроническое исследование материала “АРГИФОРМ” показывает, что в эксперименте на крысах длительное пребывание материала в организме животных не вызывает статистически достоверных сдвигов по сравнению с контролем по основным биохимическим показателям, характеризующим функцию печени, почек, окислительно-восстановительные процессы, а также по гематологическим показателям. Все это свидетельствует об отсутствии токсического воздействия материала, что подтверждается и патоморфологическим исследованием, не обнаружившим изменений гистоструктуры внутренних органов.

Гистологическое изучение семенников говорит о сохранившейся репродуктивной функции животных.

Гистологическое изучение области имплантации у крыс свидетельствует об очень слабо выраженной тканевой реакции на имплантацию материала и высокой степени его биосовместимости. Асептическая реакция ткани очень низка в первые дни после имплантации и практически отсутствует через 2 недели и 2,5 месяца. Образующаяся вокруг имплантата капсула необычайно тонкая, так как материал вызывает очень слабую фибробластическую реакцию ткани.

Заведующий лабораторией экспериментальной патоморфологии ММА им. И.М. Сеченова,
д.м.н., профессор _____ А.Б. Шехтер