

ПРОТОКОЛ ХРОНИЧЕСКИЙ 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. Хронический эксперимент включал в себя следующие испытания:

1.1. Хроническую 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

Хронический эксперимент проводили на 12-ти беспородных собаках. 9-ти собакам имплантировали материал "АРГИФОРМ" подкожно путем инъекции в бедро в количестве 15 мл. 3 контрольным собакам проводили ложную операцию.

Наблюдение за животными составило 6, 12 и 18 месяцев.

У всех собак до начала эксперимента, а также через 6, 12 и 18 месяцев после имплантации препарата исследовали гематологические показатели (количество эритроцитов, лейкоцитов, тромбоцитов, уровень гемоглобина), а также ряд биохимических показателей и активность ферментов сыворотки крови (общий белок, триглицериды, холестерин, билирубин, креатинин, мочевины, глюкоза, активность щелочной фосфатазы, лактатдегидрогеназы, аспартат и аланинаминотрансфераз).

Для исследования указанных показателей у собак брали кровь из подкожной вены голени.

На протяжении эксперимента отмечали общее состояние и поведение животных, регистрировали массу тела и ректальную температуру.

Подсчет форменных элементов крови производили на автоматическом счетчике "Пикоскель" (Венгрия).

Уровень гемоглобина определяли гемоглобинцианидным методом.

Уровни содержания общего белка, креатинина, мочевины и билирубина, а также активность лактатдегидрогеназы и щелочной фосфатазы определяли с помощью наборов фирмы "Диакон-Синтэко" (Россия).

Определение уровней содержания триглицеридов и холестерина проводили с помощью набора "Диасис" (Германия).

Активность аспартат- и аланинаминотрансфераз определяли с помощью наборов фирмы "Corgway" (Польша).

Для определения уровня глюкозы использовали набор фирмы "Labsystems" (Финляндия).

В биохимических исследованиях были применены универсальные контрольные сыворотки "Норма" и "Патология" ("Диасис", Германия).

Биохимические показатели и активность ферментов сыворотки крови животных определяли на биохимическом анализаторе ФП-901 "Labsystems" (Финляндия).

После окончания эксперимента была проведена эвтаназия животных передозировкой тиопентала и дроперидола, их внутренние органы были подвергнуты макроскопическому и патогистологическому исследованию.

2.2. Результаты исследования

Результаты представлены в таблицах №№ 1-8 в виде $M \pm m$, где M – среднее арифметическое результатов измерений, m – среднее квадратическое отклонение результатов измерений.

Таблица №1

Динамика массы тела собак, % от исходной

Группы животных	Периоды наблюдения		
	6 мес.	12 мес.	18 мес.
Контроль	102,00±1,76	103,76±1,54	105,80±1,05
Опыт	101,72± 1,04	103,21±1,21	105,04±0,85
P	>0.05	>0.05	>0.05

Измерения температуры не выявили отличий показателей у собак подопытной и контрольной групп за весь период исследований (таблица №2).

Таблица №2

Показатели ректальной температуры у собак, °С

Группы животных	Периоды наблюдения			
	1 мес.	6 мес.	12 мес.	18 мес.
Контроль	38,86± 1,36	38,53± 0,980	38,8± 0,96	38,33± 1,53
Опыт	38,24± 1,33	38,12± 0,95	38,52± 0,95	38,24± 1,35
P	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05

При исследовании морфологического состава периферической крови у опытных собак не отмечено достоверных различий гематологических показателей по сравнению с контролем (таблица №3).

Таблица №3

Гематологические показатели у собак при 18-месячной подкожной имплантации материала

Периоды наблюдения	Группы животных		P
	Контроль	Опыт	
	<i>Эритроциты, 10¹²/л</i>		
До введения (фон)	6,76±0,37	6,55±0,23	>0.05
6 месяцев	7,06±0,49	7,15±0,24	>0.05
12 месяцев	6,93±0,43	6,91±0,23	>0.05
18 месяцев	7,16±0,39	7,14±0,25	>0.05
	<i>Лейкоциты, 10⁹/л</i>		
До введения (фон)	10,96±0,58	10,37±0,44	>0.05
6 месяцев	10,93±0,48	10,40±0,63	>0.05
12 месяцев	10,80±0,55	11,04±0,45	>0.05
18 месяцев	10,73±0,47	11,13±0,55	>0.05
	<i>Тромбоциты, 10⁹/л</i>		
До введения (фон)	411,00±20,03	403,88±18,46	>0.05
6 месяцев	399,00±18,77	406,11±17,52	>0.05
12 месяцев	409,66±17,40	391,33±18,40	>0.05
18 месяцев	407,00±17,61	411,77±19,60	>0.05
	<i>Гемоглобин, г/л</i>		
До введения (фон)	107,33±5,36	104,66±6,50	>0.05
6 месяцев	108,33±4,41	106,00±4,42	>0.05
12 месяцев	109,66±6,96	107,77±5,56	>0.05
18 месяцев	108,33±6,36	109,22±4,51	>0.05

При подкожной имплантации материал на протяжении 18 месяцев хронического эксперимента не оказал влияния на уровни содержания общего белка сыворотки крови подопытных животных, что свидетельствует об отсутствии повреждающего действия

материала на белковообразующую функцию печени (таблица №4).

Таблица №4.

Содержание общего белка в сыворотке крови собак при 18-месячной подкожной имплантации материала, %

Периоды наблюдения	Контроль	Опыт	P
До введения (фон)	83,83± 5,58	78,25±4,76	>0.05
6 месяцев	89,26±6,02	81,70±4,46	>0.05
12 месяцев	89,90±6,67	87,62±9,47	>0.05
18 месяцев	82,00±6,76	83,60±4,71	>0.05

Для выявления возможного повреждающего действия материала в условиях хронического эксперимента на функцию печени собак исследовали активность щелочной фосфатазы, лактатдегидрогеназы, аспартат и аланинаминотрансфераз, а также уровень билирубина в сыворотке крови животных.

Как показали проведенные исследования, пребывание материала в организме животных не вызвало изменений активности указанных “печеночных” ферментов и уровня билирубина в сыворотке опытных крови собак (таблица №5).

Таблица №5.

Показатели активности ферментов и уровня билирубина в сыворотке крови собак при подкожной имплантации материала

Периоды наблюдения	Группы животных		
	Контроль	Опыт	P
	<i>Щелочная фосфатаза, Ед/л</i>		
До введения (фон)	159,00 ±14,96	156,50 ±11,38	>0.05
6 месяцев	181,23±16,18	193,48 ±22,54	>0.05
12 месяцев	188,46±19,12	165,74 ±17,96	>0.05
18 месяцев	200,66±17,26	186,81 ±14,74	>0.05
	<i>Аланинаминотрансфераза, Ед/л</i>		
До введения (фон)	40,90±4,10	42,47±1,82	>0.05
6 месяцев	51,76±3,96	51,55±2,44	>0.05
12 месяцев	48,96±3,62	53,71±1,93	>0.05
18 месяцев	52,83±4,74	46,00±1,89	>0.05
	<i>Аспартатаминотрансфераза, Ед/л</i>		
До введения (фон)	23,10±1,96	27,71±1,10	>0.05
6 месяцев	30,43±3,46	26,83±1,04	>0.05
12 месяцев	27,16±1,90	23,26±0,90	>0.05
18 месяцев	26,06±1,84	24,57±0,88	>0.05
	<i>Лактатдегидрогеназа, Ед/л</i>		
До введения (фон)	206,66±11,87	214,54±8,44	>0.05
6 месяцев	200,60±15,83	179,83±7,40	>0.05
12 месяцев	189,06±14,59	193,54±6,37	>0.05
18 месяцев	212,30±15,07	196,28±7,43	>0.05

	<i>Билирубин, мкмоль/л</i>		
До введения (фон)	10,95±0,96	9,27±0,36	>0.05
6 месяцев	9,79±0,77	10,52±0,36	>0.05
12 месяцев	9,51±0,38	10,78±0,34	>0.05
18 месяцев	10,56±0,64	9,93±0,34	>0.05

На протяжении 18-месячного хронического эксперимента в сыворотке крови опытных собак не отмечалось изменений уровня мочевины и креатинина, что позволяет сделать вывод об отсутствии повреждающего действия материала на экскреторную функцию почек подопытных животных (таблица №6).

Таблица № 6.

Уровни мочевины и креатинина в сыворотке крови собак

Периоды наблюдения	Группы животных		
	Контроль	Опыт	P
	<i>Мочевина, ммоль/л</i>		
До введения (фон)	6,06±0,44	6,85±0,25	>0.05
6 месяцев	6,96±0,50	6,25±0,25	>0.05
12 месяцев	6,56±0,43	5,66±0,22	>0.05
18 месяцев	6,70±0,30	5,76±0,23	>0.05
	<i>Креатинин, ммоль/л</i>		
До введения (фон)	136,16±5,48	140,34±3,35	>0.05
6 месяцев	144,90±4,57	140,55 ±5,50	>0.05
12 месяцев	141,26±5,93	147,20±5,65	>0.05
18 месяцев	148,96±3,87	142,67 ±3,94	>0.05

Для оценки влияния длительной имплантации материала собакам на углеводный обмен и функцию поджелудочной железы был определен уровень глюкозы в сыворотке крови. Как показали результаты исследований, уровень глюкозы у животных подопытной группы не изменялся на протяжении всего эксперимента и соответствовал стандартным величинам, характерным для собак (таблица №7).

Таблица №7.

Уровень глюкозы, ммоль/л в сыворотке крови собак при подкожной имплантации материала

Периоды наблюдения	Группы животных		P
	Контроль	Опыт	
До введения (фон)	4,93±0,29	4,65±0,15	>0.05
6 месяцев	4,53±0,33	4,42±0,14	>0.05
12 месяцев	5,03±0,23	4,43±0,14	>0.05
18 месяцев	5,00±0,36	4,57±0,15	>0.05

Для исследования возможного повреждающего действия материала на липидный обмен измеряли уровень общего холестерина и триглицеридов.

Как показали проведенные исследования, подкожная имплантация материала не влияла на указанные показатели липидного обмена (таблица №8).

Таблица № 8.

Уровень холестерина и триглицеридов в сыворотке крови собак при подкожной имплантации материала

Периоды наблюдения	Группы животных		
	Контроль	Опыт	P
	<i>Триглицериды, м моль/л</i>		
До введения (фон)	0,50±0,04	0,45 ± 0,01	>0.05
6 месяцев	0,49±0,04	0,58 ± 0,02	>0.05
12 месяцев	0,47±0,04	0,47 ± 0,01	>0.05
18 месяцев	0,56±0,02	0,52 ± 0,01	>0.05
	<i>Общий холестерин, м моль/л</i>		
До введения (фон)	3,81±0,35	3,32±0,14	>0.05
6 месяцев	3,93±0,38	4,21±0,17	>0.05
12 месяцев	4,21±0,25	3,63±0,13	>0.05
18 месяцев	4,34±0,35	3,92±0,15	>0.05

Таким образом, проведенные исследования показали, что пребывание материала “АРГИФОРМ” в организме собак на протяжении 18-х месяцев не влияет на общее состояние и поведение животных, не изменяет функционального состояния важнейших органов и систем организма животных.

2.3. Патоморфологическое изучение

2.3.1. Исследование органов

Макроскопическое исследование в обеих группах (контрольной и опытной) не выявило различий в органах животных.

В обеих группах собаки с густой шерстью, умеренного питания, слизистые оболочки влажные с выраженным синюшным оттенком. Кожные покровы и костный скелет не повреждены, расположение внутренних органов обычное.

Серозные оболочки полости сердца гладкие, влажные, серые, в виде пленки. Вены и венозные синусы наполнены темной жидкой кровью

Границы серого и белого вещества головного и спинного мозга четкие, ткань мозга блестит на разрезах, очаговые изменения в ней отсутствуют. Желудочки мозга щелевидные, с серыми, дряблыми, сосудистыми венозными сплетениями и небольшим количеством прозрачной жидкости.

Гипофиз округлый, инкапсулированный, дряблый, бледно-серый. Обе доли щитовидной железы расположены симметрично, кровенаполненные, красноватые, мелкозернистые.

Слюнные железы инкапсулированы, плотные, серые, дольчатые.

Вилочковая железа синюшного цвета, дольчатая со сливными экхимозами под капсулой.

Селезенка с гладкой капсулой, плотная, пульпа красная, без соскоба.

Печень плотная, с гладкой капсулой, кровенаполненная, красно-коричневая.

Желчные пути проходимы, стенки желчного пузыря тонкие, слизистая оболочка его бархатистая, в просвете желчного пузыря темнооливковая желчь.

Поджелудочная железа в капсуле, плотная, дольчатая, серая.

Надпочечники овальной формы, плотные, с четким делением паренхимы на мозговой и корковый слои.

Почки плотные, с гладкой поверхностью, с легко снимающейся капсулой, четкой границей красноватой коры и бледно-серого мозгового слоя, слизистые оболочки лоханок и мочевого пузыря гладкие.

В трахее и главных бронхах следы слизи, слизистая оболочка их гладкая, блестящая.

Легкие воздушные, покрыты тонкой плеврой серого цвета, неравномерное кровенаполнение переднее - нижних долей.

Сердце плотное, с полупрозрачными гладкими створками клапанов и гладким эндокардом, серо-красным, сочным, без очаговых изменений, плотным миокардом, умеренным количеством экхимозов под эпикардом, обычным рисунком расположения коронарных артерий и вен.

Интима ствола легочной артерии и аорты гладкая, блестящая.

Пищевод проходим, слизистая оболочка его гладкая, белесоватая, складчатая.

Желудок формы рога, с тонкими стенками, рельефными, серыми складками слизистой оболочки, без каких-либо очаговых изменений.

Кишечник содержит окрашенный желчью химус и кашицеобразные, коричневые каловые массы. Стенки его тонкие, слизистая оболочка тонкого кишечника бархатистая, розовая, толстого - серая, складчатая, очаговых изменений не обнаружено.

Органы репродукции имеют обычный рисунок строения.

Микроскопическое изучение органов собак опытной и контрольной групп также не выявило различий между ними.

Светооптический анализ структур изученных органов у всех животных, проведенный через 18 месяцев после имплантации материала, демонстрирует однотипные результаты.

В головном мозге нейроны больших полушарий имеют пирамидальную или полигональную форму, окружены бесструктурными глиальными клетками с четким ядром.

В подкорковом слое пучки нейроволокон различной природы, скопления нейронов в виде отдельных ядер.

В гипофизе петли полнокровных капилляров в передней доле окружены секреторными

клетками с преимущественно оксифильной цитоплазмой.

Фолликулы в средней доле округлой формы, многочисленны, заполнены бесструктурным коллоидом. В задней доле нейропилль единичные фолликулы.

Слюнные железы состоят из интенсивно базофильных железистых клеток, слюновыводящие протоки свободные, строма развита слабо.

В щитовидной железе строма развита слабо, фолликулы имеют овальную форму, заполнены бесструктурным коллоидом.

В тимусе многочисленные скопления лимфоцитов в корковом отделе, в мозговом - лимфоциты менее многочисленные.

Легкие с хорошо расправленными альвеолами, просветы их свободные, стенки альвеол тонкие, кровенаполненные.

В просветах крупных бронхов незначительное количество бесструктурного экссудата. Миокард состоит из пучков поперечно исчерченных волокон с сохраненными эксцентрично расположенными ядрами.

В корковом слое надпочечников мелкие железистые клетки расположены послойно. В мозговом - полигональные хромаффинные клетки, свободные синусы.

В почках клубочки округлой формы, субкапсулярная полость свободна, структура капиллярных петель сохранена.

Экскреторный отдел нефрона имеет строение, соответствующее его отделам.

Строма обычной структуры.

В печени строма развита слабо, печеночные дольки призматической и овальной формы, центральные вены свободные, гепатоциты с четкой структурой, синусоидные капилляры полнокровные.

В поджелудочной железе равномерно базофильные экскреторные железистые клетки ацинусов, эпителиальная выстилка выводящих протоков не повреждена.

Островковый аппарат в тонкой капсуле, содержит светлые полиморфные клетки обычной структуры.

Стенки желудка и кишечника имеют обычный рисунок строения.

Селезенка состоит из обширных синусов, содержащих эритроциты, и лимфоидных фолликулов обычных размеров.

В лимфатических узлах полиморфные фолликулы из мелких лимфоидных клеток, слабо развитая строма.

2.3.2. Изучение области имплантации (имплантационный тест)

В опытной группе на месте инъекции материала в подкожной клетчатке видно округлое скопление материала, окруженное тонкой капсулой. Размеры скопления материала на сроке 18 месяцев составляли в среднем 3 x 2 x 1,5см.. Материал визуально не изменен по сравнению с исходным.

Морфологическое изучение тканевой реакции в области имплантации материала показало, что материал сохраняет свою структуру, оставаясь гомогенным. Вокруг основного массива имплантата образуется очень тонкая соединительнотканная капсула толщиной от 50 до 150 микрон, в которой видны небольшие скопления крупных макрофагов с пенистой цитоплазмой. Эти клетки фагоцитируют материал, который в их цитоплазме остаётся в виде вакуолей.

Местами капсула отделяет основную массу материал от участков, которые состоят из рыхлой ячеистой ткани. В этих участках происходит интенсивная резорбция материал макрофагами. В основной массе материал сохраняет гомогенность, не инфильтрируется клетками, что и является причиной его длительной устойчивости.

В окружающей жировой клетчатке и мышечной ткани отмечается незначительная лимфоцитарная и макрофагальная инфильтрация с примесью единичных плазматических клеток.

2.3.3. Гонадотоксичность

Семенники у собак обеих групп имеют обычный рисунок строения. Сперматогенный эпителий канальцев находится в активном состоянии, имеются все клетки сперматогенеза, много митотически делящихся клеток, что свидетельствует о сохранившейся репродуктивной функции.

3. Заключение по хроническому эксперименту

Исследования показали, что материал "АРГИФОРМ" хорошо переносится животными, не влияет на их общее состояние, поведение, вес, а также на гематологические показатели и функциональное состояние основных органов и систем организма животных по показателям использованных биохимических тестов.

Все это свидетельствует об отсутствии токсического воздействия материала "АРГИФОРМ".

Макро- и микроскопическое исследования внутренних органов животных после подкожной имплантации материала собакам также не выявили каких-либо патологических изменений, связанных с токсическим действием материала.

Гистологическое изучение семенников свидетельствует о сохранности репродуктивной функции.

Гистологическое изучение тканевой реакции в области имплантации материала собакам говорит о том, что материал является биоинертным материалом, не вызывает воспалительную реакцию в ткани, окружается тонкой соединительнотканной капсулой и не подвергается заметной резорбции в течение длительного срока. Резорбция материала макрофагами наблюдалась только в краевых участках.

Заведующий лабораторией
экспериментальной патоморфологии
ММА им. И.М. Сеченова, д.м.н., профессор



А.Б. Шехтер