



КонсультантПлюс
надежная правовая поддержка

"Методика определения гемолитического
действия полимерных материалов и изделий
"ин витро"
(утв. Минздравом СССР 27.11.1985)

Документ предоставлен **КонсультантПлюс**

www.consultant.ru

Дата сохранения: 24.09.2018

Источник публикации

"Сборник руководящих методических материалов по токсиколого-гигиеническим исследованиям полимерных материалов и изделий на их основе медицинского назначения", М., 1987

Примечание к документу

Название документа

"Методика определения гемолитического действия полимерных материалов и изделий "ин витро"
(утв. Минздравом СССР 27.11.1985)

Утверждена
Начальником Управления
по внедрению новых
лекарственных средств
и медицинской техники
Э.А.БАБАЯНОМ
27 ноября 1985 года

**МЕТОДИКА
ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГЕМОЛИТИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ
ПОЛИМЕРНЫХ МАТЕРИАЛОВ И ИЗДЕЛИЙ "ИН ВИТРО"**

В связи со все увеличивающимся объемом разработок новых материалов и изделий особое значение приобретает разработка экспресс-методов на биологических тест-объектах и тест-системах. Эти методы можно применять в следующих случаях: а) при отборе оптимальных лабораторных образцов материалов и изделий на первом этапе их разработки; б) при оценке различных технологий переработки материалов в изделие; в) при выборе оптимального способа стерилизации изделия; г) при незначительном изменении рецептуры материала; д) при изменении сферы применения хорошо изученного материала.

1. ПРИНЦИП МЕТОДА

Определение гемолитического действия вытяжки из полимера по 100% гемолизу.

2. ПРИГОТОВЛЕНИЕ ВЫТЯЖЕК

Вытяжки готовят в соответствии с методической и нормативной документацией для конкретных групп материалов и изделий.

3. ПРИГОТОВЛЕНИЕ 10% ВЗВЕСИ ЭРИТРОЦИТОВ

Для приготовления взвеси эритроцитов может быть использована эритроцитная масса или цитратная кровь, заготовленная на 3,9% растворе цитрата натрия в соотношении 1:9. Срок хранения цитратной крови (эритроцитарной массы) - 72 ч при +4 °С. Кровь (эритроцитарную массу) 5 мл центрифугировать 10 мин. при 900 об./мин. Надосадочную жидкость отделить. К осадку добавить 8 мл стерильного 0,9% раствора хлористого натрия. Содержимое взболтать и центрифугировать 10 мин. при 900 g. Надосадочную жидкость отделить.

Эта операция (отмывание клеток) повторяется два раза. После отмывания надосадочная жидкость должна быть прозрачна, бесцветна, не иметь следов гемолиза. Если надосадочная жидкость не отвечает указанным требованиям, эритроциты не могут быть использованы для приготовления взвеси эритроцитов.

Для получения 10% взвеси эритроцитов 1 мл осадка клеток смешивают с 9 мл 0,9% раствора хлористого натрия. Полученную взвесь эритроцитов можно хранить не более 24 часов в холодильнике при температуре от -4 до -6 °С.

4. ПРИГОТОВЛЕНИЕ ПРОБ: КОНТРОЛЬНОЙ И СО 100% ГЕМОЛИЗОМ

4.1. Контрольная проба: 0,5 мл 10% взвеси эритроцитов и 5 мл 0,9% раствора хлористого натрия.

4.2. Проба со 100% гемолизом (0,5 мл 10% взвеси эритроцитов и 5 мл дистиллированной воды). Происходит полное разрушение эритроцитов, что соответствует 100% гемолизу.

4.3. Контрольная проба и проба со 100% гемолизом готовятся для каждого образца эритроцитной взвеси.

5. ХОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ

До определения гемолитического действия к вытяжке (приготовленной на дистиллированной воде) необходимо добавить хлористый натрий из расчета 9 мг на 1 мл вытяжки для превращения дистиллированной воды в изотонический раствор для крови.

В 3 пробирки разлить по 0,5 мл 10% взвеси эритроцитов. К 0,5 мл 10% взвеси эритроцитов в каждую пробирку добавить по 5 мл вытяжки, в которую предварительно добавлен хлористый натрий до 0,9% раствора. Смесь поставить в термостат на 1 час при температуре 37 °С, затем отцентрифугировать в течение 20 мин. при 2000 об./мин.

Все манипуляции по отношению к контролю и пробе со 100% гемолизом проводятся параллельно с опытными пробами, как описано выше. Надосадочную жидкость отделить для проведения измерений оптической плотности.

6. ОПТИЧЕСКИЕ ИЗМЕРЕНИЯ

Опытные, контрольную пробу и пробу со 100% гемолизом измеряют на фотоэлектроколориметре (ФЭК-60, КФК) при длине волны 540 нм против холостой пробы (вода). Толщина кюветы 1 см. Результаты регистрируются по оптической плотности.

7. РАСЧЕТ % ГЕМОЛИЗА

Производится по формуле:

$$\% \text{ гемолиза} = \frac{E_{\text{оп}} - E_{\text{к}}}{E_{\text{100}}} \times 100,$$

где:

$E_{\text{оп}}$ - оптическая плотность опытной пробы;

$E_{\text{к}}$

$E_{\text{к}}$ - оптическая плотность контрольной пробы;

E_{100}

E_{100} - оптическая плотность воды со взвесью эритроцитов 100%

гемолиз.

Например: $E_{\text{оп}} = 0,015$; $E_{\text{к}} = 0,01$; $E_{\text{100}} = 1,0$.

$$\% \text{ гемолиза} = \frac{0,015 - 0,01}{1,0} \times 100 = 0,5.$$

Примечания:

1. Если оптическая плотность контрольной пробы (10% эритроцитная взвесь с 0,9% раствором хлористого натрия) составляет 0,03 и более, результаты всего опыта недостоверны и не учитываются.

2. Оптическая плотность раствора со 100% гемолизом должна быть не менее 0,8 и не более 1. В случае отклонения от указанных пределов опыт следует повторить с вновь приготовленной эритроцитной взвесью.

3. Если шкала фотоэлектроколориметра от 0 до 1,0, а оптическая плотность более 1, то необходимо раствор развести в 2 раза, затем определить оптическую плотность и увеличить ее еще в 2 раза.

4. При проведении научных исследований для обеспечения статистической достоверности результатов необходимо опыты ставить не менее чем на 5 образцах крови.

8. ОЦЕНКА РЕЗУЛЬТАТОВ

Испытуемое изделие свободно от гемолитически действующих веществ, если % гемолиза во всех трех пробах менее 2.

Если процент гемолиза одной пробы более 2, то опыт следует повторить. При получении такого же результата вытяжка считается гемолитически активной и дальнейшие испытания не проводятся.

В случае отсутствия гемолитического действия проводятся дальнейшие токсикологические испытания.
