

**1.2. ГИГИЕНА, ТОКСИКОЛОГИЯ, САНИТАРИЯ**

**Оценки раздражающего действия методом ультразвуковой  
доплерографии на сосудах хориоаллантоисной оболочки  
куриного эмбриона *ex vivo***

**Методические рекомендации  
МР 1.2. 0025-11**

Оценка раздражающего действия методом ультразвуковой доплерографии на сосудах хориоаллантоисной оболочки куриного эмбриона *ex vivo*. Методические рекомендации – М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2011 – 13 с.

1. Разработаны: ФГУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в городе Москве» (Н.В. Завьялов, Е.Л. Скворцова); ОАО Завод экологической техники и экопитания «ДИОД», Москва (В.П. Тихонов, Т.В. Шевченко, И.А. Родина, Е.Ю. Белянкина, К.Л. Плигина); ООО «СП Минимакс», Санкт-Петербург (М.Б. Гирина).

2. Утверждены Руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации и введены в действие «28» июня 2011 г.

3. Введены впервые.

**СОДЕРЖАНИЕ**

1.	Область применения .....	4
2.	Введение .....	5
3.	Принцип метода.....	6
4.	Оборудование, материалы и реактивы.....	7
4.1.	Характеристика объектов исследования.....	8
5.	Подготовка исследуемых образцов.....	8
5.1.	Растворители.....	8
5.2.	Контроли.....	8
5.3.	Исследуемые концентрации.....	9
6.	Подготовка тест-объекта.....	10
7.	Процедура тестирования.....	10
8.	Анализ доплерограмм.....	10
9.	Статистическая обработка данных.....	11
10.	Интерпретация результатов.....	12
11.	Форма представления результатов.....	12
	Библиографический список.....	13

**УТВЕРЖДАЮ**

Руководитель Федеральной службы  
по надзору в сфере защиты прав  
потребителей и благополучия человека,  
Главный государственный санитарный  
врач Российской Федерации

\_\_\_\_\_ Г.Г. Онищенко

« 28 » июня \_\_\_\_\_ 2011 г.

Дата введения: с момента утверждения

**1.2. ГИГИЕНА, ТОКСИКОЛОГИЯ, САНИТАРИЯ****Оценка раздражающего действия методом ультразвуковой  
доплерографии на сосудах хориоаллантоисной оболочки  
куриного эмбриона *ex vivo*****Методические рекомендации  
МР 1.2.0025-11****1. Область применения**

1.1. Методические рекомендации предназначены для токсикологических исследований и испытаний парфюмерно-косметической (ПК) продукции, средств гигиены полости рта, а также сырья для их производства, в том числе полученных с применением нанотехнологий или содержащих наноматериалы.

1.2. Методические рекомендации могут быть использованы для оценки раздражающего действия слизистой оболочки глаза вновь разрабатываемой и серийно выпускаемой продукции. Данный метод может применяться в качестве самостоятельного экспресс-метода или в сочетании с другими токсикологическими методами.

1.3. Методические рекомендации предназначены для специалистов органов и организаций Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, а также могут быть использованы научно-исследовательскими организациями гигиенического профиля, медицинскими учебными заведениями и иными организациями, аккредитованными в установленном порядке.

## 2. Введение

В батарею токсикологических испытаний для оценки безопасности продукции входит исследование раздражающего действия на слизистую оболочку глаза. Для этой цели традиционно используется тест Драйза на лабораторных животных (Draize et al., 1944), являющийся одним из самых болезненных тестов. Возможной альтернативной заменой тесту Драйза является ХЕТ-КАМ-тест (HET-CAM - hen's egg test at the chorio-allantoic membrane), в котором проводится визуальная оценка состояния сосудов хориоаллантаической оболочки (ХАО) куриного эмбриона. Однако визуальная оценка не позволяет точно и объективно интерпретировать результаты исследования.

Дополнение стандартного ХЕТ-КАМ теста методом высокочастотной доплерографии позволяет определять количественные характеристики изменения скорости кровотока в сосудах ХАО, которые отражают выраженность раздражающего действия.

Метод высокочастотной ультразвуковой доплерографии использует эффект изменения частоты сигнала отраженного движущегося объекта на величину пропорциональную скорости движения отражателя, открытый в 1842 г. Допплером. При отсутствии движения исследуемой среды доплеровского сигнала не существует, так как ультразвуковая волна проходит сквозь ткани без отражения, что делает данный метод исследования движущихся структур наиболее объективным.

Данные методические рекомендации содержат порядок проведения оценки раздражающего действия с применением метода высокочастотной доплерографии на сосудах ХАО куриного эмбриона *ex vivo*. Преимуществом настоящего метода являются простота, высокая чувствительность, объективная цифровая оценка результатов, повышающая их достоверность, воспроизводимость, а также экономичность, быстрота получения результатов. Кроме того, система отвечает современным этическим требованиям, согласно которым следует ограничивать использование млекопитающих в эксперименте.

### 3. Принцип метода.

Основой данного метода исследования является ХЕТ-КАМ тест, применяемый для оценки раздражающего действия веществ на сосудах ХАО куриного эмбриона. Во время проведения исследования раствор тестируемого вещества наносят на ХАО. При возникновении раздражающего действия происходит сужение кровеносных сосудов без остановки или с временной остановкой тока крови, тромбоз, кровоизлияния и т.п., что, в свою очередь, вызывает изменение скорости кровотока. Модификация ХЕТ-КАМ теста с использованием прибора «Минимакс-Допплер-К» позволяет провести количественную оценку скорости кровотока при возникновении раздражающего действия.

Ультразвуковой сигнал, отраженный от кровотока, поступает на приемный элемент датчика (частотой 25 МГц), далее этот сигнал усиливается, фильтруется и проходит в компьютерную часть прибора, где обрабатывается по специальной программе (Minimax Doppler v.1.7.) и выдается на экран монитора в виде доплерограмм с цветным спектром. Также автоматически вычисляются количественные параметры скорости кровотока: линейная скорость кровотока  $V_s$  (см/сек), объемная скорость кровотока  $Q_s$  (мл/сек), средневзвешенная скорость кровотока по кривой средней скорости  $V_{am}$  (см/сек). Показатели скорости кровотока ( $Q_s$  и  $V_{am}$ ) коррелируют с линейной скоростью кровотока  $V_s$ . Таким образом, для изучения влияния исследуемых веществ достаточно оценки одного из параметров - линейной скорости кровотока ( $V_s$ ).

Изменение линейной скорости кровотока является показателем выраженности местно раздражающего действия исследуемого вещества на сосуды ХАО.

#### 4. Оборудование, материалы и реактивы.

- доплерограф ультразвуковой компьютеризированный для исследования скорости кровотока ММ-Д-К «Минимакс-Допплер-К», оснащенный датчиком с частотой 25 МГц или с аналогичными характеристиками;
- термостат лабораторный, позволяющий поддерживать температуру  $38,0 \pm 0,5^{\circ} \text{C}$ ;
- подставка;
- встряхиватель лабораторный типа Вортекс ТУ 64-1-1081-73 или с аналогичными характеристиками;
- термометр лабораторный  $0-55^{\circ}\text{C}$  ГОСТ 8.279-78;
- магнитная мешалка ТУ 25-11-834-73;
- весы аналитические (предел допустимой погрешности не более 0,01 мг) ГОСТ 24104-2001;
- колбы, цилиндры стеклянные мерные ГОСТ 1770-74;
- микропробирки пропиленовые конические объемом 0,5 и 1,5 см<sup>3</sup> с крышкой;
- штатив для микропробирок вместимостью 0,5 и 1,5 см<sup>3</sup>;
- наконечники одноразовые для дозаторов переменного объема в штативах;
- дозаторы автоматические переменного объема ТУ 9452-002-33189998-2002;
- часы сигнальные ТУ 25-07-57;
- пинцеты медицинские ГОСТ 21241-89;
- шпатели металлические ГОСТ 19126-2007;
- фильтровальная бумага ГОСТ 12026-76;
- вода дистиллированная ГОСТ 6709-02;
- спирт этиловый (этанол) ГОСТ Р 51652-2000 или ГОСТ 18300-87;
- диметилсульфоксид (99,5%);
- калий гидроксид ГОСТ 24363-80;
- 0,9% раствор NaCl.

#### **4.1. Характеристика объектов исследования.**

Исследования проводят на 10-дневных куриных эмбрионах домашних кур породы белый леггорн. До начала эксперимента яйца выдерживают тупым концом вверх при температуре  $38,0 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ . Для поддержания влажности в термостат помещают емкость с водой, объемом  $500 \text{ см}^3$ .

### **5. Подготовка исследуемых образцов.**

#### **5.1. Растворители.**

При работе с гидрофильными веществами в качестве растворителя используют физиологический раствор (0,9% NaCl). При работе с гидрофобными веществами в качестве растворителя используют медицинское оливковое масло, диметилсульфоксид или этиловый спирт в конечной концентрации не более 1%. При необходимости допускается использование других растворителей в концентрациях, не вызывающих раздражающего действия, что должно быть подтверждено экспериментально. Растворитель, вносимый в эквивалентных объемах, используется в качестве негативного контроля.

#### **5.2. Контроли.**

В качестве негативного контроля используют растворитель, вносимый в эквивалентных объемах. В качестве позитивного контроля используют раствор КОН (2,5 %). Раствор КОН готовят непосредственно перед использованием. Для этого навеску  $250,0 \pm 0,1 \text{ мг}$  помещают в мерную колбу вместимостью  $10 \text{ см}^3$ , до половины заполняют физиологическим раствором, перемешивают до полного растворения вещества, доводят объем физиологическим раствором до метки и тщательно перемешивают. Изменение скорости кровотока ( $V_s$ ) при воздействии на сосуды ХАО контрольного образца КОН составляет  $40,0 \pm 2,0\%$ .



### 5.3 Исследуемые концентрации.

Во избежание ложноположительных или ложноотрицательных результатов образцы исследуют в концентрациях, не вызывающих изменение рН инкубационной среды и/или осмотического давления ( $\pm 0,1$ ).

Экстракты из испытуемых образцов готовят путем настаивания в физиологическом растворе или модельной среде (медицинское оливковое масло, диметилсульфоксид или этиловый спирт в конечной концентрации не более 1%) . Соотношения веса образца и объема модельной среды приведены в таблице 1. Навески образцов взвешивают в сухой чистой колбе, куда потом добавляют требуемый объем модельной среды. В другую колбу наливают модельную среду и обе колбы помещают в термостат при  $37^0$  С и инкубируют 1 час.

Таблица 1

#### Условия приготовления экстрактов

Вид продукции	Масса образца, г	Объем модельной среды, см <sup>3</sup>	Степень разведения образца	Продолжительность экстракции, час
Шампуни для волос и тела	1,0	4,0	1:5	1
Ополаскиватели для волос	1,0	4,0	1:5	1
Туалетное мыло	1,0	4,0	1:5	1
Средства для принятия душа и ванны	1,0	4,0	1:5	1
Дезодоранты и депилятории	1,0	4,0	1:5	1
Кремы, эмульсии и др. (не спиртосодержащие)	2,5	2,5	1:1	1
Кремы, эмульсии и др. (спиртосодержащие; с разогревающим эффектом)	1,0	4,0	1:5	1
Маски питательные, очищающие и др.	2,5	2,5	1:1	1
Зубные пасты и отбеливающие системы	1,0	4,0	1:5	1
Детские присыпки (тальк, пудра)	1,0	4,0	1:5	1
Средства моющие, чистящие, полирующие для мытья посуды, предназначенной для контакта с пищевыми продуктами и водой	1,0	4,0	1:5	1
Зубные эликсиры и ополаскиватели	2,5	2,5	1:1	1
Средства для нанесения на губы	1,0	4,0	1:5	1
Средства для макияжа глаз	1,0	4,0	1:5	1

Вид продукции	Масса образца, г	Объем модельной среды, см <sup>3</sup>	Степень разведения образца	Продолжительность экстракции, час
Средства для интимной гигиены	1,0	4,0	1:5	1
Средства для защиты кожи от воздействия производственных вредных факторов (мази, кремы, пасты и т.д.)	1,0	4,0	1:5	1

### **6. Подготовка тест-объекта.**

Перед началом эксперимента, яйцо помещают на фиксирующую подставку тупым концом вверх и вскрывают воздушную камеру. От скорлупы освобождают всю воздушную камеру, после чего поверхность подскорлуповой оболочки смачивают физиологическим раствором и полностью ее удаляют так, чтобы не повредить ХАО. На ХАО наслаивают 400 мм<sup>3</sup> физиологического раствора (для предотвращения высыхания). Яйцо помещают в термостат на 20 мин для снятия травматического шока.

Если происходит повреждение ХАО или возникают кровотечения, то яйцо отбраковывается.

### **7. Процедура тестирования.**

Выбрав кровеносный сосуд на поверхности ХАО, датчик располагают так, чтобы он находился под углом 60° к исследуемому сосуду, добиваясь при этом слабых по амплитуде пульсаций без острых пиков (медленно меняющаяся волна) доплерограмм, отображающихся на мониторе прибора.

После измерения скорости кровотока в выбранном сосуде на 0 минуте проводится наслаивание экстракта из исследуемого образца в количестве 400 мм<sup>3</sup>. Нулевая минута соответствует интактному состоянию сосудов ХАО эмбриона. Через 80 сек оценивается изменение скорости кровотока сосудов ХАО под влиянием исследуемого образца.

### **8. Анализ доплерограмм.**

Анализируется не менее 10 эмбрионов для испытания одного образца. Компьютерная программа Minimax Doppler v.1.7., разработанная для прибора

«Минимакс-Допплер-К», автоматически проводит анализ доплерограмм, вычисляя линейную скорость кровотока (параметр  $V_s$ , см/сек).

### 9. Статистическая обработка данных.

Раздражающее действие на слизистую оболочку глаза ( $X$ ) соответствует изменению скорости кровотока  $V_s$ , выраженному в процентном соотношении относительно нулевой точки измерения и вычисляется по формуле:

$$X = \frac{(V_s)_n - (V_s)_0}{(V_s)_0} \cdot 100$$

где  $(V_s)_n$  – линейная скорость кровотока в динамике измерений;

$(V_s)_0$  - линейная скорость кровотока на нулевой минуте.

Результат испытания представляется в виде:

**$X \pm \sigma$ , при  $P=0,95$**

За результат анализа принимают среднее арифметическое 10 и более параллельных измерений.

Среднее квадратичное отклонение ( $\sigma$ ) результатов определений количественного выражения раздражающего действия вычисляется по формуле:

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (\bar{X} - x_i)^2}{n - 1}}$$

где  $x_i$  –  $i$ -й результат определений,  $n$ - число параллельных определений,

$\bar{X}$  - среднее арифметическое результатов изменения скорости кровотока.

Среднее арифметическое результатов изменения скорости кровотока вычисляется по формуле:

$$\bar{X} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i$$

Достоверность различий между контрольной группой (группа с растворителем) и опытной (исследуемые экстракты) вычисляется по формуле:

$$T = \frac{\bar{X}_o - \bar{X}_k}{\sqrt{\sigma_o^2 + \sigma_k^2}}$$

Все указанные статистические параметры можно также вычислять с помощью компьютерной программы Statistica или иных программных средств.

### **10. Интерпретация результатов.**

Вещество, вызывающее раздражающее действие (изменение скорости кровотока) относительно контрольной группы менее, чем на 15% следует отнести к соединениям с невыраженным раздражающим действием и исключить его дальнейшее тестирование по данному эффекту на лабораторных животных.

Вещества, вызывающие раздражающее действие (изменение скорости кровотока) относительно контрольной группы более, чем на 15%, подлежат дальнейшим испытаниям на млекопитающих.

### **11. Форма представления результатов.**

По результатам эксперимента оформляется протокол. В протоколе должна быть отражена следующая информация:

- название продукта;
- производитель;
- растворитель;
- разведение;
- полученные результаты.

**Библиографический список:**

1. Лукьянов А.С. «Оценка раздражающего действия веществ по тесту на хориоаллантаисной оболочке куриного эмбриона (HET-CAM test) в кн. Альтернативные методы исследований (экспресс-методы) для токсиколого-гигиенической оценки материалов и продуктов» // М., ТОО Экспринт НВ, 1999 г., с.103-107.
2. Лукьянов А.С., Павлова Т.Н., Халепко А.И., Ткачева Т.А. «Тест HET-CAM как альтернатива окулярному тесту Draize» // 1-й съезд токсикологов России 17-20.11.98 Тезисы докладов. М., 1998 г. с.292.
3. «Постановка исследований по выявлению раздражающих свойств химических соединений на конъюнктиву глаза с помощью теста на хориоаллантаисной оболочке куриного эмбриона» // Методические указания 2.2.756-99 (от 20.06.1999) - М, 1999.
4. «Методические указания по оценке раздражающего действия фармакологических веществ с помощью теста на хориоаллантаисной оболочке куриного эмбриона (HET-CAM тест)» // Методические указания - М, 2000 г.
5. Козлов В.А., Артющенко Н.К., Шалак О.В. и др. «Ультразвуковая доплерография в оценке состояния гемодинамики в тканях шеи, лица и полости рта в норме и при некоторых патологических состояниях»// Медицинская академия последипломного образования, ООО «СП Минимакс», - С-Пб, 2000 г.
6. Belyankina E.J., Rodina I.A., Shevchenko T.V., Tikhonov V.P. «Application of ultrasonic dopplerographic method on the model of chicken embryo vessels in ovo for standartization of natural substances» // The 12th International Congress «Phytopharm 2008», P. 20.
7. «Способ оценки раздражающего действия и активности природных, синтетических субстанций и готовых препаратов на куриных эмбрионах методом ультразвуковой доплерографии» // патент на изобретение №2383888, 2010 г.