



УКРАЇНА

(19) UA (11) 28727 (13) U

(51) МПК (2006)

A61B 10/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ПАТЕНТУ
НА КОРИСНУ МОДЕЛЬвидається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ОЦІНКИ ЦИТОТОКСИЧНОЇ ДІЇ ЗАСОБІВ НА ОСНОВІ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ РЕЧОВИН

1

2

(21) u200706922

(22) 19.06.2007

(24) 25.12.2007

(72) ВОЛОЩЕНКО ОЛЕГ ІГНАТОВИЧ, UA,
РАЄЦЬКА ОЛЕНА ВІПЕНІВНА, UA, ЯЛОВЕНКО
ОЛЕНА ІГОРІВНА, UA, КУЗЬМІНА АНТОНІНА
ІВАНІВНА, UA(73) ДЕРЖАВНА УСТАНОВА "ІНСТИТУТ ГІГІЄНИ
ТА МЕДИЧНОЇ ЕКОЛОГІЇ ІМ. О.М.МАРЗЄЄВА
АКАДЕМІЇ МЕДИЧНИХ НАУК УКРАЇНИ", UA

(56)

(57) 1. Спосіб оцінки цитотоксичної дії засобів на основі поверхнево-активних речовин, що включає підготовку стандартної суспензії еритроцитів, екстинкцію супернатанту водного розчину, що має задану величину, шляхом додавання фосфатного буферного розчину до суспензії крові, центрифугування та видалення супернатанту, визначення екстинкції супернатанту суспензії еритроцитів, оцінку відсотка денатурації шляхом центрифугування проб розчинів еритроцитів у воді, у буферному розчині додецилсульфату натрію, у буферному розчині засобу, визначення екстинкції їх супернатантів, обчислення коефіцієнта денатурації, оцінку гемолітичної дії засобів шляхом приготування проб розчинів засобу, центрифугування проб розчинів еритроцитів у буферних розчинах засобу різної концентрації та контрольному розчині, визначення екстинкції супернатанту проби, обчислення

відсотка гемолізу еритроцитів в суспензії проби, розрахунок узагальнюючого коефіцієнта пошкоджуючої дії, який **відрізняється** тим, що при підготовці стандартної суспензії еритроцитів, екстинкцію супернатанту якої у водному розчині при вибраній стандартній дозі встановлюють 0,925-0,950, центрифугування при підготовці стандартної суспензії еритроцитів, оцінці відсотка денатурації, оцінці гемолітичної дії засобів проводять з об'ємом проб 4,0-4,1 мл при концентрації суспензії еритроцитів 1,25-1,26 % у пробі протягом 10-15 хв. при 1500-2000 об/хв., при оцінці гемолітичної дії засобів проби розчинів засобу готують із розчинів різної концентрації, як контрольний розчин використовують 1,25-1,26 % розчин стандартної суспензії еритроцитів у дистильованій воді, узагальнюючий коефіцієнт пошкоджуючої дії, який є коефіцієнтом цитотоксичності (K_c), розраховується за формулою:

$$K_c = H_{50} / D \times 10000,$$

де

 H_{50} - концентрація засобу, при якій настає гемоліз 50 % клітин у суспензії,

D - коефіцієнт денатурації гемоглобіну.

2. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що при значенні $K_c > 10$ засіб вважають таким, що не спричиняє подразнення шкіри.

Корисна модель відноситься до гігієни, а саме, до способу визначення цитотоксичної дії засобів на основі поверхнево-активних речовин (ПАР) для оцінки шкіро-подразнюючого потенціалу цих засобів і може бути використана при санітарно-гігієнічних дослідженнях безпечності косметичних засобів та засобів побутової хімії.

Відомий спосіб оцінки шкіро-подразнюючої дії на лабораторних тваринах, який включає нанесення засобу, що досліджується, на депільовану ділянку шкіри тварин на деякий час (експозиція 4-24 години) та реєстрацію проявів подразнюючої дії і оцінку ефектів [див.: Оценка воздействия вредных химических соединений на

кожные покровы и обоснование предельно-допустимых уровней загрязнения кожи / Метод, указания. - М.: Минздрав СССР, 1979. - №2102-79, 23с.].

Недоліком цього способу є необхідність використання великої кількості тварин у експериментальних дослідженнях, що суперечить сучасним вимогам біоетики.

Найбільш близькими до заявленого способу за технічною суттю є спосіб оцінки гемолітичної дії та відсотку денатурації гемоглобіну еритроцитів, суть якого полягає у фотометричному вимірюванні концентрації барвника (гемоглобіну) у супернатанті, що характеризує ступінь впливу

(13) U

(11) 28727

(19) UA

засобів на основі ПАР на клітинні мембрани та білки [див.: COLIPA validation project on in vitro eye irritation test for cosmetic ingredients and for the estimation of acute eye irritation potentials. Present status / W.J.W. Pape, U. Pfannenbecker, H. Argembeau et al. // *Toxicology in Vitro*. - 1999. - Vol. 13. - P.343-354].

Недоліками даного способу є необхідність використання специфічного обладнання, розрахованого на аналіз малих проб, які вимагають наступні режими центрифугування: час центрифугування - 5сек. при 4500об/хв, об'єм проб - 1,0мл, що неможливо виконати на стандартному обладнанні, високий відсоток псевдорезультатів, які є наслідком, з одного боку, порушень дозування через утворення повітряних пробок у піпетках дозаторах при автоматизованому процесі додавання у дослідну пробірку стандартної суспензії еритроцитів, буферного розчину, води, розчинів препарату, з другого боку, через високу густину стандартної суспензії еритроцитів (концентрація суспензії еритроцитів у пробі - 2,5%). Крім того, використання при оцінці гемолізу еритроцитів як позитивного контролю 0,1% розчину натрію додецилсульфату вимагає додаткових експериментальних досліджень.

В основу розробки даного способу було поставлено завдання створення рішення щодо оцінки шкіро-подразнюючої дії, яке дозволить скоротити кількість тварин в експерименті, спростити процедуру виконання обраного методу, розробити критерії оцінки результатів досліджень *in vitro* для розділення засобів, речовин на ті, що мають потенційну шкіро-подразнюючу дію, та ті, що не подразнюють шкіру, дослідження яких на тваринах можна не проводити.

Для досягнення поставленого завдання у способі оцінки цитотоксичної дії засобів на основі ПАР, який включає підготовку стандартної суспензії еритроцитів, екстинкція супернатанту водного розчину якої має задану величину, шляхом додавання фосфатного буферного розчину до суспензії крові, центрифугування та видалення супернатанту, визначення екстинкції супернатанту суспензії еритроцитів, оцінку відсотку денатурації шляхом центрифугування проб розчинів еритроцитів у воді, у буферному розчині додецилсульфату натрію, у буферному розчині засобу, визначення екстинкції їх супернатантів, обчислення коефіцієнту денатурації, оцінку гемолітичної дії засобів шляхом приготування проб розчинів засобу, центрифугування проб розчинів еритроцитів у буферних розчинах засобу різної концентрації та контрольному розчині, визначення екстинкції супернатанту проби, обчислення відсотку гемолізу еритроцитів в суспензії проби, розрахунок узагальнюючого коефіцієнту пошкоджуючої дії, згідно рішення, яке пропонується, екстинкцію супернатанту стандартної суспензії еритроцитів у водному розчині при обраній стандартній дозі встановлюють 0,925-0,950, центрифугування при підготовці стандартної суспензії еритроцитів, оцінці відсотку денатурації, оцінці гемолітичної дії засобів проводять з об'ємом проб 4,0-4,1мл при

концентрації суспензії еритроцитів 1,25-1,26% у пробі протягом 10-15хв. при 1500-2000об/хв; при оцінці гемолітичної дії засобів проби розчинів засобу готують із розчинів різної концентрації, як контрольний розчин використовують 1,25-1,26% розчин стандартної суспензії еритроцитів у дистильованій воді, узагальнюючий коефіцієнт пошкоджуючої дії, який є коефіцієнтом цитотоксичності (K_c), розраховують за формулою $K_c = H_{50}/D \times 10000$, де H_{50} - концентрація засобу, при якій настає гемоліз 50% клітин у суспензії; D - коефіцієнт денатурації гемоглобіну, а при значенні $K_c > 10$ засіб вважають таким, що не спричиняє подразнення шкіри.

Обрані режими центрифугування та підібрані об'єми проб, що досліджуються, змінюють процедуру виконання досліджень дозволяючи використовувати поширене обладнання, зменшення концентрації клітин в стандартній суспензії еритроцитів в 2 рази зменшує її густину, що полегшує дозоване додавання її до проби, можливість використання позитивного контролю 1,25-1,26% розчину стандартної суспензії еритроцитів у дистильованій воді обумовлено тим, що за рахунок зміни осмотичних умов поживного середовища еритроцитів настає їх 100% гемоліз, який супроводжується надходженням гемоглобіну у оточуюче середовище і реєструється по максимальному забарвленню його. Вплив різних засобів на основі ПАР на мембрану клітини та білкові структури може бути різний в залежності від біологічної дії на еукаріотичну клітину комплексу факторів: ПАР, інших компонентів рецептури, комплексів, що утворились при взаємодії компонентів рецептури між собою. Тому, використання одного показника для оцінки іритаційного потенціалу дає неповноцінну характеристику засобу. Для урахування двох характеристик (здатності спричиняти гемоліз еритроцитів та денатурацію гемоглобіну) обраний коефіцієнт цитотоксичності (K_c), який узагальнює результати досліджень, враховуючи і гемолітичну і денатураційну здатність засобу одномоментно.

Здійснення способу оцінки проводиться наступним чином:

Для підготовки стандартної суспензії еритроцитів в пробірку з 0,5мл цитратного розчину (рецептура: 1,936г тринатрійцитрату, 0,924г лимонної кислоти, 100мл дистильованої води) додають свіжу кров ссавців 4мл, перемішують, центрифугують 10хв. при 2000об/мін, видаляють верхній шар сироватки з фібрином. Далі, промивають буферним розчином (рецептура: 0,395г динатрійгідрофосфат, 0,76г калійдигідрофосфат, 0,72г натрійхлорид, 0,18г глюкози, 100мл води дистильованої) 3 рази, додають буферний розчин в об'ємі, що дорівнюється об'єму видаленої сироватки. Для перевірки густини суспензії еритроцитів в пробірку додають 3,95мл дистильованої води, 0,05мл суспензії еритроцитів, перемішують, центрифугують, оцінюють екстинкцію супернатанту при довжині хвилі 540нм. Якщо екстинкція даної проби становить 0,925, то це

означає, що суспензія еритроцитів встановлена необхідної густини і вона є стандартною суспензією еритроцитів, яка готова до роботи. В іншому випадку додають чи видаляють буферний розчин до суспензії еритроцитів і знов перевіряють її густину, як зазначено вище. Ці процедури проводять поки не отримають стандартну суспензію еритроцитів. При оцінці коефіцієнту денатурації визначають коефіцієнт екстинкції розчину стандартної суспензії еритроцитів у воді, у буферному розчині з додецилсульфатом натрію, у буферному розчині з засобом. Для цього в перші 9 пробірок додають 3,95мл дистильованої води, 0,05мл стандартної суспензії еритроцитів, у другі 9 пробірок - 3,75мл дистильованої води, 0,2мл % розчину додецилсульфату натрію у буферному розчині, 0,05мл стандартної еритроцитів, у треті 5 пробірок - 3,75мл дистильованої води, 0,2мл 1% розчину засобу у буферному розчині, 0,05мл стандартної суспензії еритроцитів. Вміст пробірок перемішують, струшують у міксері протягом 10хв, центрифугують 10хв при 2000об/мін., вимірюють екстинкцію супернатантів при 575 та 540нм, обчислюють коефіцієнт екстинкції (Q) для кожної групи за формулою:

$$Q = E_{575} / E_{540},$$

де E_{575} - значення екстинкції проби при довжині хвилі 575нм, E_{540} - значення екстинкції проби при довжині хвилі 540нм, Q - коефіцієнт екстинкції продукту, що досліджується. Відсоток денатурації обчислюють за формулою:

$$D = (Q_w - Q_{Pr}) / (Q_w - Q_{NLS}) \cdot 100\%,$$

Q_w - коефіцієнт екстинкції води,

Q_{Pr} - коефіцієнт екстинкції продукту,

Q_{NLS} - коефіцієнт екстинкції додецилсульфату натрію,

D - коефіцієнт денатурації гемоглобіну.

Для визначення гемолітичної дії засобів готують розчини різної концентрації засобу у буферному розчині, потім, в пробірки розливають по 3,75мл буферного розчину розливають, по 0,2мл розчину засобу п-ої концентрації у буферному розчині (на розчин кожної концентрації по 3 пробірки), по 0,05мл стандартної суспензії еритроцитів, в контрольні пробірки (3шт.) розливають по 3,95мл дистильованої води та по 0,05мл стандартної суспензії еритроцитів. Вміст пробірок перемішують, струшують у міксері протягом 10хв, центрифугують 10хв при 2000об/мін., вимірюють екстинкцію супернатантів при 530нм, обчислюють відсоток гемолізу еритроцитів у пробі за формулою: $h = E_{Pr} / E_w \cdot 100\%$, де h - відсоток гемолізу еритроцитів у пробі, E_{Pr} - екстинкція супернатанту дослідної проби, E_w - екстинкція супернатанту контрольної проби. Будують за допомогою програми Microsoft Excel криву залежності концентрації, при якій настає гемоліз, від відсотку гемолізу еритроцитів при даній концентрації, з рівняння кривої виводять значення концентрації гемоглобіну, при якій настає гемоліз 50% еритроцитів (H_{50}).

Коефіцієнт цитотоксичності для даного засобу обчислюють за формулою:

$$K_s = H_{50} / D \times 10000, \text{ де}$$

H_{50} - концентрація засобу, при якій настає гемоліз 50% клітин у суспензії;

D - коефіцієнт денатурації гемоглобіну,

K_s - коефіцієнт цитотоксичності.

Були проведені порівняльні дослідження розробленим in vitro способом, що викладено вище, та традиційним способом дослідження шкіро-подразнюючої дії на лабораторних тваринах за [Оценка воздействия вредных химических соединений на кожные покровы и обоснование предельно-допустимых уровней загрязнения кожи/ Метод, указания.- М.: Минздрав СССР, 1979. - №2102-79, 23с.]. Результати порівняльних досліджень in-vivo та in vitro способів представлені в табл. 1.

Оцінка цитотоксичної дії засобів на основі ПАР способом in vitro та ш

№	Найменування засобу
1	2
1	Крем-мило дитяче №1
2	Піна для ванн для дітей №1
3	Шампунь для дітей №1
4	Піна для ванн для дітей №2
5	Шампунь для дітей №2
6	Піна для ванн для дітей №3
7	Гель-душ №1
8	Шампунь №3
9	Шампунь №4
10	Шампунь №5
11	Дитяче рідке мило №2
12	Гель для душа №2
13	Гель для інтимної гігієни №1
14	Гель для душу №3
15	Шампунь №6
16	Гель для душу №4
17	Шампунь для волосся та тіла для чоловіків №7
18	Гель для душу №4
19	Шампунь і кондиціонер для чоловіків №1
20	Шампунь проти лупи №8
21	Піна для ванн №4
22	Гель-душ-піна №5
23	Шампунь №9
24	Гель для душу №6
25	Шампунь проти лупи №10
26	Шампунь №11
27	Крем-мило №3
28	Піна для ванн №6
29	Крем-мило №4
30	Шампунь №12
31	Шампунь №13
32	Рідке мило №5
33	Шампунь проти лупи №14
34	Лікувальний шампунь проти псоріазу, себореї, лупи №15
35	Рідина для миття посуду №1

Примітка: *клас засобів за ступенем проявлення шкіро-подразнюючого впливу на кожные покровы "Оценка воздействия вредных химических соединений на кожные покровы и обоснование предельно-допустимых уровней загрязнения кожи" №2102-79.

В результаті проведених досліджень за способом *in vivo* встановлено, що серед досліджених засобів виявлено тільки три, які показали різний за ступенем проявлення ефект шкіро-подразнюючої дії: рідина для миття посуду №1 (різко виражену подразнюючу дію (4 клас), крем-мило №3, рідке мило №5 (сухість, лущення шкіри (0-1 клас)). Ці ж засоби при оцінці заявленим способом показали: рідина для миття посуду №1 - $K_c=0,76$, тобто $K_c < 0$, крем-мило №3 - $K_c=4,63$, рідке мило №5 - $K_c=3,4$, тобто $0 < K_c < 10$. 16 засобів, що мали $K_c=0 < K_c < 10$, в експерименті на лабораторних тваринах з оцінки шкіро-подразнюючої дії не виявляли ефекту подразнення. Щодо засобів, які мали $K_c=10 < K_c < 100$, то вони не спричиняли подразнення шкіри, а засоби, які мали $K_c=20 < K_c < 100$, - не тільки не спричиняли подразнення шкіри, але навіть більшість з них не проявляли подразнюючу дію на слизову оболонку ока в дослідях на лабораторних тваринах. Тобто засоби, які мають коефіцієнт цитотоксичної дії (K_c) більше 10 не виявляють шкіро-подразнюючої дії при одноразовому нанесенні на шкіру на 1 добу (100% засобів); від 10 до 1 в аналогічних умовах проведення експерименту можуть спричиняти незначну подразнюючу дію (11,8% засобів); засіб, який спричиняє різко виражену подразнюючу дію (4 клас), має K_c менше 1. Крім того, відмічено, що всі розглянуті косметичні засоби дитячого асортименту показують високий K_c (95,59-24,96) і не подразнювали слизову оболонку ока. Із викладеного вище можна зробити висновок, що дослідження на тваринах з оцінки шкіро-подразнюючої дії можна не проводити, якщо засоби показують значення $K_c > 10$.

При дослідженні шкіро-подразнюючої дії на лабораторних тваринах указаних 35 засобів було використано 210 морських свинок, серед них 102 - на дослідження засобів, які мали $K_c > 10$. Тобто, при проведенні оцінки запропонованим способом кількість тварин залучених до експерименту скорочується на 102 голови (48,57%). Аналіз та узагальнення отриманих результатів досліджень підтверджує, що спосіб оцінки цитотоксичної дії засобів на основі ПАР у порівнянні із традиційним методичним підходом дозволяє скоротити кількість необхідних досліджень на лабораторних тваринах, що відповідає сучасним вимогам біоетики та є більш економічним.

Запропонований спосіб оцінки цитотоксичної дії на еритроцити є більш простим, достатньо чутливим та вірогідним при виявленні не подразнюючих шкіру засобів на основі ПАР, легко відтворюваним, і може бути застосованим на першому (скринінговому) етапі дослідження шкіро-подразнюючої дії засобів для розділення їх на ті, що мають потенційну шкіро-подразнюючу дію, та ті, що не подразнюють шкіру, дослідження яких на тваринах можна не проводити.