



РОССИЙСКОЕ АГЕНТСТВО  
ПО ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(19) RU<sup>(11)</sup> 2 148 644<sup>(13)</sup> C1  
(51) МПК<sup>7</sup> C 12 N 5/00, 5/08, A 61 K  
47/48, G 01 N 33/15

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21), (22) Заявка: 98112003/13, 02.07.1998

(24) Дата начала действия патента: 02.07.1998

(46) Опубликовано: 10.05.2000

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: US 5510254 A, 23.04.96. US 5272082 A, 21.12.93. JP 05336996 A, 21.12.93. Мамаева С.Е. Хромосомный анализ культивируемых клеток. В: Методы культивирования клеток. Сборник научных трудов. - Л.: Наука, 1988, с. 78 - 98.

Адрес для переписки:

620030, г. Екатеринбург, ул. Летняя 23,  
ЕНИИВИ, Глинских Н.П.

(71) Заявитель(и):

Екатеринбургский НИИ вирусных инфекций,  
НПО "Косметология"

(72) Автор(ы):

Глинских Н.П.,  
Виссарионов В.А.,  
Бахарев А.А.,  
Карпова Е.И.,  
Бурыгина Н.А.,  
Малюшенко О.И.

(73) Патентообладатель(ли):

Екатеринбургский НИИ вирусных инфекций,  
НПО "Косметология"

## (54) СПОСОБ КОНТРОЛЯ ЦИТОТОКСИЧНОСТИ БИОГЕЛЕЙ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ШТАММА ПЕРЕВИВАЕМЫХ ЛЕЙКОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА Л-41-КД/84

(57) Реферат:

Изобретение предназначено для оценки качества полиакриламидных гелей (ПААГ) и других биогелей, применяемых в экспериментальной вирусологии и пластической хирургии. Контроль цитотоксичности биогелей проводят с использованием штамма перевиваемых лейкоцитов человека Л-41-КД/84. Гель добавляют в среду роста тест-культуры. Доза посадки составляет 60 тыс. кл./мл. Культивируют в течение 72-96 ч. Далее определяют в динамике цитофизиологическую и цитоморфологическую стабильность культуры. При этом морфологическое исследование проводят по общепринятой методике. Определяют показатели эффективности прикрепления, полиферативной и митотической активности клеток, патологии митоза, морфологии клеток в монослое. Оценивают цитотоксичность биогелей по изменению этих показателей по сравнению с контролем. В качестве контроля

используют такую же тест-культуру, но без внесения геля. Изобретение позволяет дифференцировать препараты биогелей по их цитотоксичности, что исключает возможность использования цитотоксичных и фальсифицированных материалов, а также предупреждает вредные последствия их воздействия на организм. Объективность и стандартность контроля качества препарата обеспечивает использование для оценки цитотоксичности стандартной тест-культуры штамма перевиваемых лейкоцитов человека Л-41-КД/84, обладающей стабильностью культуральных и морфологических свойств. Морфологический анализ позволяет оценить направленность цитотоксичного действия исследуемого геля при определении изменений митотической активности, морфологии, в частности состояния метафазных ядер в клеточной культуре. 1 з.п.ф-лы, 1 табл.



RUSSIAN AGENCY  
FOR PATENTS AND TRADEMARKS

(19) **RU** <sup>(11)</sup> **2 148 644** <sup>(13)</sup> **C1**  
(51) Int. Cl.<sup>7</sup> **C 12 N 5/00, 5/08, A 61 K**  
**47/48, G 01 N 33/15**

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21), (22) Application: **98112003/13, 02.07.1998**

(24) Effective date for property rights: **02.07.1998**

(46) Date of publication: **10.05.2000**

Mail address:  
**620030, g.Ekaterinburg, ul. Letnjaja 23,**  
**ENIIVI, Glinskikh N.P.**

(71) Applicant(s):  
**Ekaterinburgskij NII virusnykh infektsij,**  
**NPO "Kosmetologija"**

(72) Inventor(s):  
**Glinskikh N.P.,**  
**Vissarionov V.A.,**  
**Bakharev A.A.,**  
**Karpova E.I.,**  
**Burygina N.A.,**  
**Maljushenko O.I.**

(73) Proprietor(s):  
**Ekaterinburgskij NII virusnykh infektsij,**  
**NPO "Kosmetologija"**

(54) **METHOD OF CONTROL OF BIOGEL CYTOTOXICITY USING HUMAN TRANSPLANTABLE LEUKOCYTE STRAIN L-41-KL/84**

(57) Abstract:

FIELD: medicine, experimental virology, plastic surgery. SUBSTANCE: invention relates to method of evaluation of quality of polyacrylamide gels. Control of biogel cytotoxicity is carried out using the strain L-41-KL/84 of human transplantable leukocytes. Gel is added to medium of test-culture growth at the dose of cells 60 000 cells/ml and cultured for 72-96 h followed by assay of cytophysiological and cytomorphological stability of culture in dynamics. Morphological study is carried out by conventional procedure. Indices of attachment efficiency, proliferative and mitotic activity of cells, mitosis pathology and morphology of cells in culture are determined. Cytotoxicity of biogels is estimated by change of these indices as compared with control data. The same test-culture is used as

control but without gel addition. Invention ensures to differentiate biogel preparations by their cytotoxicity that excludes the possibility of using cytotoxic and adulterated materials and prevents deleterious results of effect on body. Objectivity and standard of control of preparation quality provides the use of standard test-culture of human transplantable leukocytes of the strain L-41-KL/84 for evaluation of cytotoxicity being this strain shows stability of cultural and morphological traits. Morphological analysis ensures to evaluate the trend of cytotoxic effect of analyzed gel in determination of changes of mitotic activity, morphology, in part, the state of metaphase nuclei in cellular culture. EFFECT: improved method of control. 2 cl, 1 tbl

RU 2 1 4 8 6 4 4 C 1

RU 2 1 4 8 6 4 4 C 1

Изобретение относится к медицине и может быть использовано для оценки качества полиакриламидных гелей (ПААГ) и других биогелей, применяемых в экспериментальной вирусологии и пластической хирургии с целью исключения возможности использования цитотоксичных и фальсифицированных материалов, а также предупреждения вредных последствий их воздействия на организм.

Наиболее близкими к заявляемому являются методы определения цитотоксичности различных препаратов в культуре клеток по Wilson A. (Культура перевиваемых клеток. Методы. "Мир", 1989, с. 256-303). Суть способа заключается в том, что при внесении испытуемых препаратов в чувствительную клеточную культуру в случае содержания в препарате токсичных примесей происходит изменение способности клеток к размножению и их дегенерация.

Недостатком этого способа является односторонность оценки воздействия препарата на чувствительную культуру только по эффекту дегенерации, что не обеспечивает учета полноты реакции клеток на препарат. Методы не стандартизированы также по используемым для целей контроля клеточным культурам.

Целью предлагаемого изобретения является использование для контроля качества ПААГ и других биогелей стандартной тест-культуры штамма перевиваемых лейкоцитов человека Л-41-КД/84 (А.С. N 1331061 от 15.04.87), обладающего стабильностью культуральных и морфологических свойств, что обеспечивает стандартность проводимой оценки качества препарата.

Объективности и стандартности контроля способствует использование для оценки цитотоксичности критериев комплексной пролиферативной и морфологической характеристики клеток стандартной тест-культуры.

Определение пролиферативных характеристик культуры позволяет оценить степень задержки и/или повреждения общефизиологических процессов в клетках на уровне, не вызывающем морфологических повреждений. Морфологические исследования способствуют оценке направленности цитотоксичности исследуемого объекта при определении изменений митотической активности, морфологии клеток, в частности состояния метафазных ядер в клеточной культуре.

Пример осуществления указанного метода оценки качества ПААГ и силиконового геля приводим ниже. Используются ПААГ "Интерфалл" и "Формакирил", а также силиконовый гель. Все гели, взятые для исследования, были проверены на стерильность. Гель добавляли в среды роста тест-культуры в количестве 10% от их объема. Изменений в pH среды при этом не происходило, что свидетельствует об околонеutralной реакции гелей и их малой растворимости. Гели, внесенные в среду, тщательно суспендировали механическим встряхиванием и/или пипетированием.

Штамм клеток Л-41-КД/84 культивировали в среде, состоящей из равных объемов среды Игла и среды 199 с добавлением 10% сыворотки эмбриона крупного рогатого скота. Посадочная доза составляла 60 тыс.кл/мл. Наблюдение за клетками проводили до начала дегенерации в контрольной культуре, в которую не вносили гель. Сбор реплик для анализа проводили через 24, 48, 72, 96 часов от начала эксперимента. В это же время определяли пролиферативную активность культуры. Морфологическое исследование проводили по общепринятой методике; клетки культивировали во флаконах, объемом 250 мл со стеклами; через 24, 48, 72 и 96 часов извлекали пробы, отмывали в физиологическом растворе и фиксировали в 70% этаноле; окрашивали гематоксилином и эозином.

Во всех вариантах опыта и в контроле монослой был сформирован на 3-и сутки роста. Цитоплазма клеток - светлая, без включений. Границы клеток четко различимы. Ядра округлые, содержат 2 - 3 ядрышка, без включений. Наблюдалась единичные 2-х и 3-х ядерные клетки. Гигантских клеток и клеток с некрозом ядра не выявлено.

Данные митотической активности опытных культур по отношению к контролю - число патологических митозов (в %) и характер патологии представлены в таблице.

Основными видами патологии митозов были отставание хромосом в мета- и анафазе, К-

метафазы, трех- и четырехполюсные метафазы. Отставание хромосом и многополюсные митозы являются одной из основ для дальнейшей злокачественной трансформации культуры клеток, так как приводят к увеличению (полиплодизации) некоторых хромосом или всего хромосомного набора, что может служить признаком малигнизации культуры.

5 Такие проявления патологии в культуре являются показателем возможной цитотоксической и мутагенной активности испытуемых препаратов.

Исследованные серии плотных полиакриламидных гелей "Формакирил" и "Интерфалл" не вызывали статистически значимых изменений пролиферативной активности культуры.

10 Силиконовый гель вызывает резкое повышение числа патологических митозов, а также выраженное изменение их качественной характеристики за счет доли трех- и четырехполюсных митозов. Полученные данные подтверждают мнение Raszewski R et. al. (J. Cranio-Max.-Fac.Surg., 1990, 18.225) о случаях осложнений при использовании отдельных серий силиконовых гелей в пластической хирургии.

15 Таким образом, приведенные данные показывают необходимость контроля используемых гелей с применением тест-системы Л-41-КД/84 - штамма перевиваемых лейкоцитов человека, позволяющей дифференцировать препараты по их цитотоксичности, при условии контактирования испытуемых препаратов с клетками тест-системы Л-41 КД/84 в течение 72-96 часов.

20 **Формула изобретения**

1. Способ контроля цитотоксичности биогелей, отличающийся тем, что исследуемый биогель контактируют с тест-культурой штамма перевиваемых лейкоцитов человека Л-41-КД/84, определяют в динамике цитофизиологическую и цитоморфологическую стабильность культуры по показателям эффективности прикрепления, пролиферативной и митотической активности клеток, патологии митоза, морфологии клеток в монослое и оценивают цитотоксичность биогелей по изменению этих показателей по сравнению с контролем.

2. Способ по п.1, отличающийся тем, что контактирование проводят в течение 72 - 96 ч.

30

35

40

45

50

Влияние различных гелей на пролиферацию и митотическую активность клеток.

Гели	Показатели относительно контроля		Патология митоза	
	пролиферации	митотической активности	%% от числа делящихся клеток	характер патологии
ПААГ «Интерфалл» 72/96 ч	0.89/0.90	1.02/1.06	5.6/5.9	трехполюсные метафазы, отставание хромосом в мета- и анафазе
ПААГ «Формакирил» 72/96 ч	0.93/1.00	0.98/0.97	5.4/5.7	трехполюсные метафазы, отставание хромосом в метафазе
Силиконовый 72/96 ч	0.88/0.95	0.96/0.88	12.2/32.0	отставание хромосом в мета- и анафазе, трех- и четырехполюсные метафазы
Контрольная* тест-культура 72/96 ч	5.6/1.6	73.0%/19.0%	2.7/5.3	трехполюсные метафазы, К-метафазы и отставание хромосом в метафазе

\*- в контроле приведены абсолютные значения, в опытах – данные, относительно контроля.