



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

258053

(11) B₁

(61)

(23) Výstavní priorita
(22) Přihlášeno 26 03 85
(21) PV 2175-85

(51) Int. Cl.⁴
A 61 L 17/00

(40) Zveřejněno 17 12 87
(45) Vydáno 01.03.89

(75)
Autor vynálezu

HOFFMAN PAVEL ing., PRAHA,
PŮŽA VLADIMÍR doc. MUDr. DrSc., HRADEC KRÁLOVÉ

(54)

Způsob stanovení biologické tolerance a
toxicity látek popřípadě jejich směsí

Způsob stanovení biologické tolerance a toxicity látek, popřípadě jejich směsí, spočívá v tom, že se zkoušené látky fixují na nosič, se kterým se uvede do kontaktu s živými živočišnými buňkami v kultivačním médiu, biologická odezva živočišných buněk na zkoušené látky fixované na nosič se sleduje mikroskopicky, popřípadě mikrofotograficky nebo mikrokinematograficky. Způsob stanovení lze využít ve zdravotnictví a v potravinářství.

Vynález se týká způsobu stanovení biologické tolerance a toxicity látek nebo jejich směsí.

V současné době je biologická tolerance a toxicita látek nebo jejich směsí zjišťována celou řadou biologických zkoušek. Československý lékopis předpisuje následující biologické zkoušky. Zkoušku akutní toxicity, jejíž podstatou je vstřikování roztoků do žíly laboratorních myší, zkoušku na krysím srdci in situ, zkoušku přežívání krysích spermií, zkoušku na hemolytický účinek, zkoušku na pyrogenní látky, zkoušku na kožní dráždivost, zkoušku na oční dráždivost a zkoušku na lokální reakci. Obdobně tomu je i u lékopisů jiných států. Používané biologické zkoušky mají četné přednosti, ale i některé nevýhody. Největší potíže bývají u látek ve vodě málo rozpustných nebo nerozpustných, dále u nečistot provázejících látky ve stopových množstvích. Rovněž výsledky bývají často ovlivněny individuálním stavem laboratorních zvířat způsobem aplikace látek. Ve většině případů zkouška neumožňuje práci ve větší sérii, archivaci materiálu i dokumentaci pro reprodukce a vzájemné srovnání nebo probíhá v živém makroorganismu.

Výše uvedené nedostatky jsou částečně odstraněny způsobem stanovení biologické tolerance a toxicity látek podle vynálezu, jehož podstata spočívá v tom, že se zkoušené látky fixují na nosič, s nímž se uvedou do kontaktu s živými živočišnými buňkami v kultivačním médiu; biologická odezva živočišných buněk na zkoušené látky fixované na nosiči se sleduje mikroskopicky, případně mikrofotograficky nebo mikrokinematograficky. Jako nosiče je vhodné použití filtračních membrán. Nosič může být také živočišného původu na bázi kolagenu a elastinu, připravený například z přírodní blanité vrstvy serosy, submukosy nebo fascie.

Přednostmi způsobu stanovení biologické tolerance a toxicity látek nebo jejich směsí podle vynálezu jsou možnosti sledovat látky plynné, kapalně, v suspenzích, rozpustných ve vodě nebo rozpouštědlech nebo i vůbec nerozpustných. Další předností je schopnost velmi citlivé detekce příměsí a nečistot, provázejících biologicky zcela nezávadné látky, a to i v jinak obtížně stanovitelných množstvích. Použitím nosičů k vázání látek a jejich směsí umožňuje se protrahované, časově sledovatelné, postupné uvolňování jejich složek vyvolávajících reakci živočišných buněk pěstovaných *in vitro*. Podle této reakce je možno zjistit dynamiku působení určité látky nebo i určité koncentrace látky. Rovněž je možné, za použití části téhož nosiče s látkou vyzkoušet reakci kultivovaných buněk různých druhů živočichů nebo jejich různých tkání. Sledování biologické odezvy živočišných buněk na zkoušenou látku podle vynálezu umožňuje vzájemné porovnání působení látek v časovém sledu, ale i statistické vyhodnocení.

Uvedenou metodikou lze sledovat chování různých živočišných buněk vůči zkoušenému materiálu, z čehož lze usuzovat i na biologickou odezvu jednotlivých částí tkání organismů vůči zkoušenému materiálu. U látek nepodléhajících při skladování změnám, lze uchovávat části nosičů s nanesenými látkami pro pozdější srovnání nebo reprodukci. Mikrofotografické nebo mikrokineematografické záběry reakce buněk na zkoušené látky nanesené na nosičích slouží jako trvalý doklad.

Pro přípravu nosičů z živočišného pojiva jsou vhodné přírodní blanité vrstvy serosy, submukosy nebo fascie, zbavené nekolagenních a neelastinových příměsí. Dále kolagenní membrány připravené nejlépe z rekonstituovaného kolagenu. Nanášení plyných látek se provádí zavěšením nosičů v prostředí plynů nebo jejich filtrací přes nosiče. Kapaliny se nanášejí máčením, natíráním nebo filtrací. Suspense se nanášejí obdobně jako kapaliny. Látky rozpustné se nanášejí jako kapaliny a voda nebo rozpouštědlo se vysuší. Nerozpustné látky jemné struktury se za sucha vtírají do nosičů a neulpělé se s povrchu oprášejí. Nerozpustné látky hrubší struktury se nanesou na vodou zvlhčený povrch,

případně i jejich filtrací přes nosič a po oschnutí se opráší částechy, které se nepřilepily. Některé látky se na nosič zachytí při dialyse. Membránové filtry připravené z umělých hmot, jakožto nosiče nejsou tak universální jako nosiče z živočišného pojiva. Nosiče se zkoušenými látkami se nastříhají na proužky 2 až 8 mm široké, délky asi 10 cm. Tahem za volné konce se přitisknou na mikroskopická sklíčka s homogenními narostlými buňkami. Trvalé přitisknutí proužků nosiče k buňkám se zajistí pomocí těsnění ze silikonové pryže, dosedlého na proužek mimo sklíčko. Po připuštění kultivačního roztoku se kultivuje při stálé teplotě, vhodné pro použité buňky. Mikrofotografické nebo mikrokineematografické snímkování se provádí v časových intervalech od zahájení kultivace. Současně se provádí kontrolní snímky buněčné kultury s nosičem bez zkoušených látek. Konečné hodnocení se provede srovnáním snímků všech časových úseků i původní buněčné kultury.

Mimo zjišťování biologické tolerance a toxicity látek používaných ve zdravotnictví lze způsob dle vynálezu využít i k ověřování zdravotní nezávadnosti látek v potravinářství, textilním i kosmetickém průmyslu.

Vynález je blíže osvětlen následujícími příklady .

Příklad 1

Nosič živočišného původu ze submukosy tenkého střeva ovce byl vystaven účinku směsi 80 % kysličníku uhličitého a 20 % ethylenoxidu po dobu 12 hod. Po odsání směsi a provzdušnění po dobu 6 hod. byl odstřížek přitlačen k buňkám fibroblastní a epitheloidní linie, narostlým na mikroskopickém krycím sklíčku, po připuštění osmoticky vyváženého a obohaceného fyziologického roztoku byla provedena kultivace za stálé teploty 37 °C. Ihned byl zhotoven mikrofotografický záběr nosiče a jeho okolí, který byl opakován každou hodinu po dobu 12 hodin.

Příklad 2

Ústřížek téhož nosiče, exponovaného účinku směsi 80 % kysličníku uhličitého a 20 % ethylenoxidu po dobu 12 hod. byl pro-

vzdušnén po dobu 12 hod. Dále bylo postupováno přesně jak uvedeno v příkladě 1.

V případě příkladu 1 nosič s látkou vyvolal nežádoucí reakci buněk a byl označen jako toxický. V případě příkladu 2 nosič nevyvolal žádnou reakci buněk, což prokázalo nepřítomnost toxické látky.

Příklad 3

Nosič živočišného původu ze serozní vrstvy tenkého hovězího střeva byl 24 hodin máčen v 0,5 % roztoku methylenové modři v 96 % ethanolu denaturovaném 1 % benzínu. Po vyjmutí z roztoku byl po dobu 1 hodiny dvakrát vyluhován 96 % ethanolom denaturovaným 1 % benzínu za teploty 20 °C a po okapání sušen 24 hodin při téže teplotě. V dalším bylo postupováno přesně jak uvedeno v příkladě 1.

U příkladu 3 nedošlo k reakci buněk, látka byla označena jako netoxická. Tytéž nosiče připravené podle příkladu 1, 2, 3 byly zkoušeny in vivo a hodnoceny bez evidentní tkáňové reakce. Z uvedeného plyne, že metoda in vitro je citlivější než in vivo. Nosiče vložené do sterilizátorů plynem mohou tudíž být použity jakožto indikátory residua plynu.

Příklad 4

Ústřížek membránového filtru tuzemské výroby Sympor, přes který byla filtrována suspenze vloček vypadlých po ochlazení destilované vody procházející hadicí z nízkotlakého polyetylenu, byl po odsátí a usušení přitlačen jakožto nosič k buňkám diploidní linie lidských buněk narostlých na mikroskopickém krycím sklíčku a po napuštění kultivačního média kultivován za teploty 37 °C. Bezprostředně po napuštění kultivačního média byl zhotoven první fotografický náběr, další za 30 min, za 1 hod, 3, 6 a 8 hodin. Vyhodnocení vzorku jakožto netolerantního odpovídalo zkoušením hadice předepsaným pro polymery používané ve zdravotnictví.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

1. Způsob stanovení biologické tolerance a toxicity látek, případně jejich směsí, vyznačující se tím, že se zkoušené látky fixují na nosič, s nímž se uvedou do kontaktu s živými živočišnými buňkami v kultivačním médiu, biologická odezva živočišných buněk na zkoušené látky fixované na nosič se sleduje mikroskopicky, případně mikrofotograficky nebo mik-rokinematograficky.
2. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že nosič je živočišného původu na bázi kolagenu a elastinu, připravený například z přírodní blanité vrstvy serosy, submukosy nebo fascie.
3. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že nosič je filtrační membrána.