

ИЗУЧЕНИЕ СЕНСИБИЛИЗИРУЮЩЕГО ДЕЙСТВИЯ МЕДИЦИНСКИХ ИЗДЕЛИЙ:

«ИМПЛАНТАТА ВНУТРИДЕРМАЛЬНОГО НА ОСНОВЕ
КОЛЛАГЕНА COLLOST MICRO (КОЛЛОСТ МИКРО)»
И «ИМПЛАНТАТА ВНУТРИДЕРМАЛЬНОГО НА ОСНОВЕ
КОЛЛАГЕНА COLLOST INTENSE (КОЛЛОСТ ИНТЕНС)»

Третьякова Алла Валентиновна, старший научный сотрудник лаборатории иммунологии НИЦ ТБП – филиала ФГБУ «ГНЦ «Институт иммунологии» ФМБА России, Москва

Мельникова Светлана Владимировна, младший научный сотрудник лаборатории иммунологии НИЦ ТБП – филиала ФГБУ «ГНЦ «Институт иммунологии» ФМБА России, Москва

Демьяненко Илья Александрович, к.б.н., главный специалист Опытного-экспериментального производства ООО «БиоФАРМАХОЛДИНГ», научный сотрудник лаборатории эффекторов и медиаторов иммунитета НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва

Шишкина Анна Владимировна, к.х.н., главный специалист Опытного-экспериментального производства ООО «БиоФАРМАХОЛДИНГ», Москва

Калмыкова Нина Владимировна, к.б.н., заместитель генерального директора по разработкам и исследованиям ООО «БиоФАРМАХОЛДИНГ», младший научный сотрудник лаборатории эффекторов и медиаторов иммунитета НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва

Михина Лариса Валентиновна, к.б.н., начальник лаборатории иммунологии НИЦ ТБП – филиала ФГБУ «ГНЦ «Институт иммунологии» ФМБА России, Москва

Имплантат внутридермальный на основе коллагена COLLOST micro (КОЛЛОСТ микро)» и «Имплантат внутридермальный на основе коллагена COLLOST intense (КОЛЛОСТ интенс)» являются новыми медицинскими изделиями, представляющими собой стерильные, полностью биodeградируемые материалы, состоящие из микронизированного коллагена I типа. Имплантаты предназначены для инъекционного внутридермального введения с целью коррекции проявлений физиологической и патологической атрофии кожи. Область медицинского применения имплантатов: косметология, дерматология и пластическая хирургия. Изделия различаются фор-

мой выпуска коллагенового материала (рис. 1). В «КОЛЛОСТ микро» мелкодисперсный микронизированный коллаген упакован в укупоренные стеклянные флаконы и требует перед применением проведения гидратации физиологическим раствором или аутологичной плазмой крови пациента с последующим переносом материала в шприц. В «КОЛЛОСТ интенс» аналогичный микронизированный коллаген предварительно диспергирован в физиологическом растворе и предупакован в шприц.

Оценка сенсibiliзирующих свойств разрабатываемых медицинских изделий, контактирующих с тканями организма человека, является обязательным этапом доклинических исследований (ГОСТ ISO 10993-1-2011).

В связи с этим целью настоящего исследования являлось изучение сенсibiliзирующего действия медицинских изделий: «Имплантата внутридермального на основе коллагена COLLOST micro (КОЛЛОСТ микро)» и «Имплантата внутридермального на основе коллагена COLLOST intense (КОЛЛОСТ интенс)».

Материалы и методы

Нормативная документация. Исследование проведено в соответствии с ГОСТ 33044-2014, по плану исследования, составленному с учетом ГОСТ Р ИСО 10993-2-2009, ГОСТ Р ИСО 10993-10-2011.

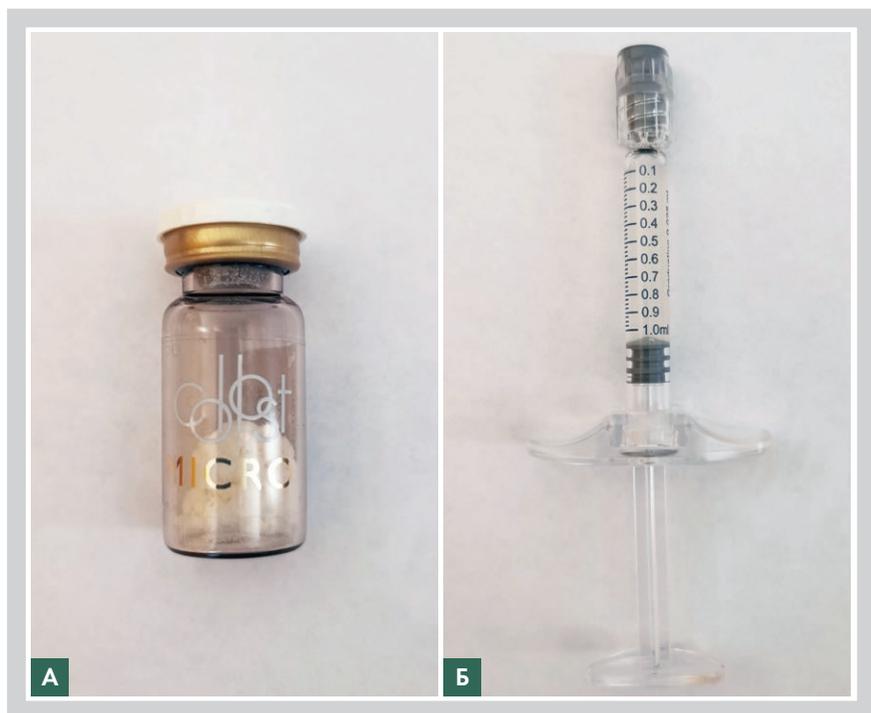


Рис. 1. Исследуемые медицинские изделия в первичной упаковке: «Имплантат внутридермальный на основе коллагена COLLOST micro (КОЛЛОСТ микро)» (А) и «Имплантат внутридермальный на основе коллагена COLLOST intense (КОЛЛОСТ интенс)» (Б)

Объект исследования. В работе тестировали следующие медицинские изделия: 1) «Имплантат внутридермальный на основе коллагена COLLOST micro (КОЛЛОСТ микро)» по ТУ 32.50.22–004-56533116–2019, серия №001012020, дата производства 15.01.2020, годен до 15.01.2025; 2) «Имплантат внутридермальный на основе коллагена COLLOST intense (КОЛЛОСТ интенс)» по ТУ 21.10.60–003-56533116–2019, серия 009062020, дата производства 23.06.2020, годен до 23.06.2023. Производитель медицинских изделий ООО «БиоФАРМАХОЛДИНГ».

Перед проведением испытаний медицинские изделия подготавливали согласно инструкции производителя: имплантат «КОЛЛОСТ микро» гидратировали 5 мл стерильного натрия хлорид раствора для инъекций 0,9% и переносили в стерильный одноразовый шприц; имплантат «КОЛЛОСТ интенс» извлекали из холодильника и выдерживали при комнатной температуре в течение 30 минут.

В качестве *контрольного объекта (носителя)* при проведении испытаний, а также для разведения материала имплантатов при приготовлении

доз/концентраций использовали стерильный натрия хлорид раствор для инъекций 0,9% производства ОАО «ДАЛЬХИМФАРМ».

Лабораторные животные. Исследование проведено на лабораторных животных: мышах линии Balb/c ($n=72$) массой 20–27 г и морских свинок-альбиносах ($n=46$) массой 370–510 г. Соотношение самок и самцов во всех проведенных экспериментах было равным. Животные были получены из питомника ФГБУН НЦБМТ ФМБА России, филиал «Андреевка». Мышей и морских свинок содержали в соответствии с СП 2.2.1.3218–14 «Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)», а также Руководством по содержанию и использованию лабораторных животных Национальной академии наук США [1]. Все процедуры по рутинному уходу за животными были выполнены в соответствии со стандартными операционными процедурами (СОП) вивария, их выполнение документировалось. Животных содержали в пластиковых клетках с

подстилом (мыши – по 6 особей, морские свинки – по 2–3 особи). Параметры окружающей среды были контролируемы: температура 20–26°C, влажность 30–70%, воздухообмен 15 объемов/час, продолжительность периода освещения 12 часов. Животные получали питьевую воду и стандартный гранулированный корм (ООО «Лабораторкорм», Россия) *ad libitum*. Карантин для мышей составлял не менее 14 суток, морских свинок – не менее 21 суток. Перед началом экспериментов животных распределяли по группам методом рандомизации по массе тела так, чтобы различия в массе тела между особями одного пола не превышали 20%. Всех животных подвергали эвтаназии методом ингаляции углекислым газом.

Обеспечение соблюдения принципов гуманного обращения с подопытными животными. Все планируемые манипуляции с подопытными животными, требования к условиям их кормления и содержания были оформлены в виде ветеринарного протокола по стандартной форме Комиссии по биоэтике НИЦ ТБП (ветеринарный протокол № 726, утвержден Комиссией по биоэтике НИЦ ТБП 28.10.2020). К работе с животными привлекались только обученные и квалифицированные сотрудники. Все манипуляции с животными были проведены только по процедурам, утвержденным в ветеринарном протоколе, с соблюдением принципов, изложенных в Директиве ЕС 86/609/ЕЕС и Хельсинской декларации Всемирной медицинской организации.

Изучение способности медицинских изделий вызывать гиперчувствительность немедленного типа (ГНТ). Оценку способности тестируемых медицинских изделий вызывать ГНТ проводили в реакции активной кожной анафилаксии (АКА) [2] после сенсibilизации трехкратным инъекционным введением. Исследование проведено на мышах линии Balb/c. Для сенсibilизации использовали медицинские изделия в дозах 0,01 и 0,1 мл на особь, что эквивалентно максимальной и десятикратной максимальной терапевтической дозе (ТД) для человека соответственно. Каждая экспериментальная группа включала по пять самцов и пять самок. Сенсibilизацию проводили по

следующей схеме: 1-е введение – подкожно, 2-е и 3-е – через сутки – внутрискожно. Животные контрольных групп получали носитель по схеме введения объектов исследования. На 14–17-е сутки после последней сенсибилизирующей инъекции проводили выявление ГНТ в реакции АКА. Для этого мышам подопытных и контрольной групп на выстриженных участках боковой поверхности тела внутрискожно вводили разрешающую дозу (РД) тестируемых объектов (0,05 мл неразведенных имплантатов) в две точки (РД тестируемых объектов была подобрана в предварительном эксперименте на 6 животных, как не вызывающая неспецифического повышения проницаемости кровеносных капилляров в месте внутрискожного введения). На контрольном участке животным вводили 0,05 мл носителя. Через 20 минут мышам внутривенно инъецировали по 0,2 мл 1% раствора синего Эванса, спустя 30 минут животных подвергали эвтаназии и определяли наличие и размеры (в случае наличия) синего пятна экссудата на внутренней стороне кожи в месте введения РД. Реакцию считали положительной при диаметре пятна не менее 2 мм.

Изучение способности медицинских изделий вызывать гиперчувствительность замедленного типа (ГЗТ). Оценку способности тестируемых медицинских изделий вызывать ГЗТ проводили методом максимального сенсибилизирующего воздействия (ГОСТ Р ИСО 10993–10-2011 [3]). Данный метод включает комбинированную сенсибилизацию (внутрискожное инъекционное введение и накожные аппликации) в одной концентрации, выбранной на этапе предварительного исследования для каждого пути введения с последующим выявлением ГЗТ при аппликации провокационной кожной пробы. Исследование проведено на морских свинках – альбиносах. В предварительном исследовании использовали по 8 морских свинок для каждого объекта испытания (соотношение самок и самцов 1:1). Всем морским свинкам после депиляции внутрискожно инъецировали 0,1 мл эмульсии полного адъюванта Фрейнда (ПАФ) в физрастворе (1:1). После этого четырем животным для каждого объекта

Таблица 1. Система классификации реакции кожи (ГОСТ Р ИСО 10993-10-2011, [3])

Описание ответной реакции	Баллы
Нет видимых изменений	0
Дискретная или очаговая эритема	1
Умеренная и сплошная эритема	2
Интенсивная эритема и припухлость	3

испытания внутрискожно вводили медицинские изделия в нативной форме и в разведениях 1:2 и 1:4 по 0,1 мл. Оставшимся четырем морским свинкам апплицировали на кожу медицинские изделия по 0,2 мл в нативной форме и в разведениях 1:2 и 1:4. Область аппликации накрывали стерильной марлей, закрепляли фиксирующей повязкой. По истечении 24 часов участки введения/аппликации оценивали полуколичественно в соответствии с системой классификации реакции кожи (табл. 1).

На основании проведенного анализа определяли концентрации материалов для основного эксперимента: для сенсибилизации – наивысшую концентрацию, которая не вызывает более чем дискретную или очаговую эритему (не более 1 балла), для провокационной пробы – наивысшую концентрацию, которая не вызывает эритемы (0 баллов).

В основном эксперименте каждая экспериментальная группа была представлена 10 животными (соотношение самок и самцов 1:1). Так как при производстве и подготовке к использованию тестируемых медицинских изделий применяется одинаковый носитель (натрия хлорид раствор 0,9%), использовали одну группу контроля для обоих изделий.

Для проведения сенсибилизации каждому животному на выстриженные участки кожи спины вводили внутрискожно в двух повторах:

- 1) ПАФ в смеси с носителем в соотношении 1:1;
- 2) объект испытания в концентрации, выбранной на этапе предварительного эксперимента (контрольным животным вводили носитель);
- 3) объект испытания в смеси с ПАФ в соотношении 1:1 (контрольным животным вводили носитель в смеси с ПАФ).

Объем каждой инъекции – 0,1 мл. Через 7 сут. проводили аппликацию тестируемых медицинских изделий

по 0,2 мл на межлопаточную область спины животных в концентрации, выбранной на этапе предварительных исследований. За 24 часа до начала аппликаций участки кожи обрабатывали 10% лаурилсульфатом натрия в вазелине. Область аппликации накрывали стерильной марлей, закрепляли фиксирующей повязкой. Продолжительность аппликации – 48 часов. Контрольным животным проводили аппликацию носителем. Через 13 сут. после завершения сенсибилизации проводили выявление ГЗТ методом провокационной кожной пробы. Использовали концентрацию, подобранную в предварительном эксперименте. На кожу боков морских свинок апплицировали медицинские изделия по 0,2 мл, накрывали стерильной марлей и закрепляли фиксирующей повязкой на 24 часа. Животным контрольной группы наносили по две провокационные пробы каждого медицинского изделия на разные участки. Через 24 и 48 часов после снятия повязки оценивали реакцию кожи на провокационную пробу в соответствии с системой классификации реакции кожи (табл. 1). Пробу считали положительной в случае, если средняя полуколичественная оценка в опытной группе была равна или превышала 1 балл, а в контрольной группе данный показатель был менее 1 балла.

Результаты

Изучение способности медицинских изделий вызывать гиперчувствительность немедленного типа (ГНТ). Анализ кожных лоскутов в зонах введения разрешающих доз (РД) медицинских изделий (рис. 2) не выявил наличие экссудата, окрашенного синим Эванса, во всех точках инъекций у 100% животных, получавших как «КОЛЛОСТ микро», так и «КОЛЛОСТ интенс», а также

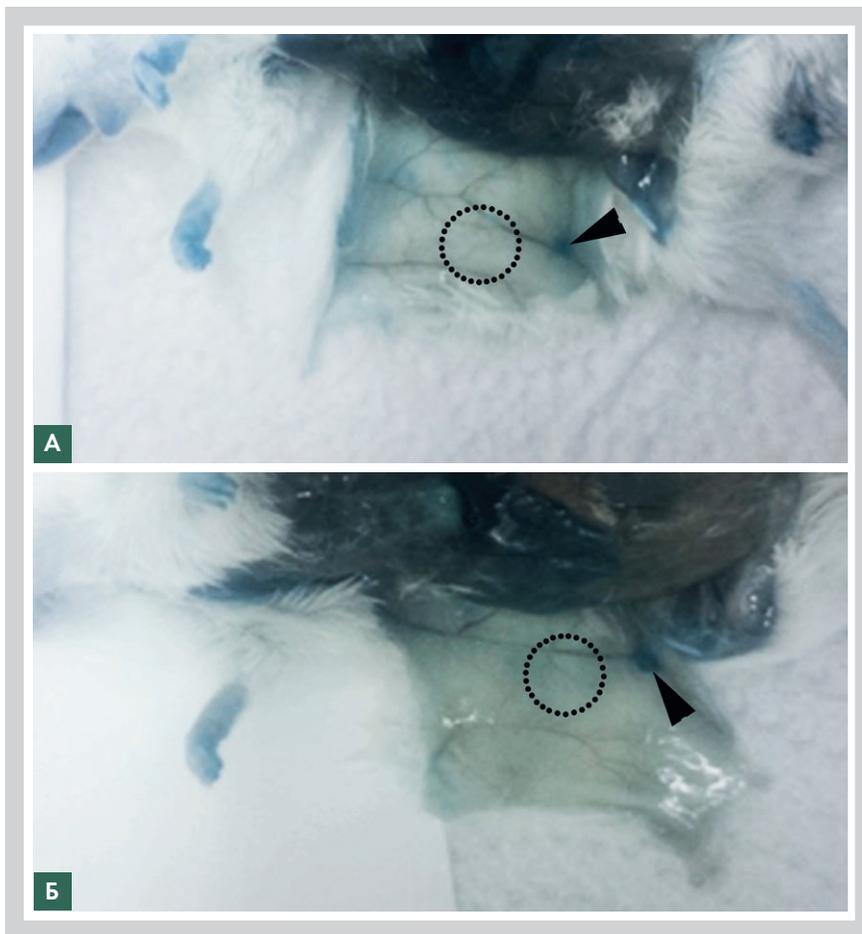


Рис. 2. Выявление ГНТ в реакции АКА после сенсibilизации мышей Balb/c медицинскими изделиями «КОЛЛОСТ микро» (А) и «КОЛЛОСТ интенс» (Б). Пунктирной линией отмечены области инъекционного введения РД. Стрелками показаны паховые лимфоузлы (синее окрашивание указывает на наличие красителя синего Эванса в кровотоке)

у всех животных соответствующих контрольных групп (табл. 2). Полученные данные свидетельствуют об отсутствии ГНТ к медицинским изделиям [2] в данной экспериментальной модели.

Изучение способности медицинских изделий вызывать гиперчувствительность замедленного типа (ГЗТ). В предварительном эксперименте осуществляли подбор доз медицинских

Таблица 2. Оценка реакции АКА после сенсibilизации мышей Balb/c медицинскими изделиями

Медицинское изделие, сенсibilизирующая доза (ТД)	Количество животных в группе (самцы:самки = 1:1)	Количество животных с положительной реакцией АКА
Контроль (носитель) для «КОЛЛОСТ микро»	10	0
«КОЛЛОСТ микро», 1 ТД	10	0
«КОЛЛОСТ микро», 10 ТД	10	0
Контроль (носитель) для «КОЛЛОСТ интенс»	10	0
«КОЛЛОСТ интенс», 1 ТД	10	0
«КОЛЛОСТ intense», 10 ТД	10	0

изделий для внутрикожного введения и накожных аппликаций. Реакция кожи (табл. 1) после внутрикожного введения медицинских изделий и при их накожных аппликациях как в нативной форме, так и при разведениях была оценена у всех животных в 0 баллов. На основании полученных данных заключили, что при сенсibilизации в основном эксперименте для внутрикожного введения и накожных аппликаций оба медицинских изделия следует вводить в нативной форме (без разведения). При этом участки кожи перед проведением провокационной кожной пробы (за 24 часа) в соответствии с требованиями ГОСТ Р ИСО 10993–10-2011 следует обработать раствором 10% лаурилсульфата (додецилсульфата) натрия в вазелине.

В основном эксперименте оценка реакции кожи (табл. 1) на провокационную пробу через 13 сут. после завершения сенсibilизации не выявила различий между контрольной и опытными группами животных (табл. 3). Реакция кожи у всех морских свинок составила 0 баллов (нет видимых изменений) через 24 и 48 часов после экспозиции с провокационной пробой. Результаты исследования свидетельствуют об отсутствии развития ГЗТ к обоим медицинским изделиям в данной экспериментальной модели (ГОСТ Р ИСО 10993–10-2011, [3]).

Обсуждение

Способность веществ при попадании в организм вызывать состояние гиперчувствительности – чрезмерной реакции иммунной системы, наносящей вред организму, называют сенсibilизирующими/аллергизирующими свойствами [2, 4]. Аллергические реакции разделяют на развивающиеся по «немедленному» и «замедленному» типам. Реакции «немедленного» типа (ГНТ) запускаются при взаимодействии антител с антигенами и развиваются, как правило, в течение 1–30 минут после попадания антигена в организм. Реакции «замедленного» типа (ГЗТ) возникают при взаимодействии антигена с Т-лимфоцитами и развиваются через 24–48 часов после проникновения антигена [2, 4, 5].

Таблица 3. Результаты оценки провокационной кожной пробы морских свинок-альбиносов после комбинированной сенсibilизации медицинскими изделиями с целью выявления ГЗТ

Медицинское изделие	Количество животных в группе (самцы:самки = 1:1)	Количество животных с положительным ответом на провокационную пробу	
		через 24 часа	через 48 часов
Контроль (носитель)	10	0	0
«КОЛЛОСТ микро»	10	0	0
«КОЛЛОСТ интенс»	10	0	0

В настоящей работе в рамках доклинических испытаний новых имплантируемых биорезорбируемых медицинских изделий на основе коллагена исследована их способность вызывать ГНТ и ГЗТ *in vivo* у лабораторных животных. Использование более простых тест-систем для достижения цели исследования не представлялось возможным, так как формирование гиперчувствительности невозможно полноценно оценить на моделях, устроенных проще, чем живые животные. Как правило, изучение сенсibilизирующих свойств медицинских изделий проводят, используя их вытяжки (экстракты), получаемые при инкубации изделий в жидкостях (ГОСТ Р ИСО 10993–12–2011). Однако применительно к испытываемым инъекционным имплантатам, применение данного подхода к исследованию являлось, по нашему мнению, некорректным вследствие того, что их основной структурный компонент – белок коллаген плохо растворим в рекомендуемых ГОСТ Р ИСО 10993–12–2011 экстрагирующих жидкостях. Кроме того, форма исполнения медицинских изделий в виде инъекционных имплантатов позволяет напрямую вводить их в ткани животных в различных дозировках, что, очевидно, будет лучше воспроизводить условия их применения в клинической практике. В связи с этим в качестве объекта исследования в данной работе использованы не экстракты, а имплантируемый материал медицинских изделий.

Для исследования реакций ГЗТ ГОСТ Р ИСО 10993–10–2011 предлагает использовать метод максимального сенсibilизирующего воздействия [3] или метод закрытых накожных аппликаций [6]. Для проведения настоящего исследования был выбран метод максимального сенсibilизирующего

воздействия вследствие того, что он предполагает проведение комбинированной сенсibilизации, включающей внутрикожное введение тестируемых объектов, что лучше отражает способ применения медицинских изделий в клинике, нежели сенсibilизация только при помощи накожных аппликаций.

ГОСТ Р ИСО 10993–10–2011 не описывает методов изучения ГНТ, включающих проведение сенсibilизации при помощи внутрикожных или подкожных инъекций. В связи с этим для оценки способности медицинских изделий вызывать ГНТ был использован метод АКА, широко применяемый в доклинических исследованиях лекарственных средств [2].

Результаты проведенных экспериментов *in vivo* не выявили развития реакций ГНТ и ГЗТ ни у одного из животных опытных групп, получавших как «Имплантат внутридермальный на основе коллагена COLLOST микро (КОЛЛОСТ микро)», так и «Имплантат

внутридермальный на основе коллагена COLLOST intense (КОЛЛОСТ интенс)».

Выводы

Полученные данные свидетельствуют об отсутствии сенсibilизирующего действия исследованных медицинских изделий в доклинических моделях на животных, что позволяет продолжить исследования их безопасности.

И в заключение

Медицинские изделия «Имплантат внутридермальный на основе коллагена COLLOST micro (КОЛЛОСТ микро)» и «Имплантат внутридермальный на основе коллагена COLLOST intense (КОЛЛОСТ интенс)» сенсibilизирующим действием в использованных доклинических моделях *in vivo* не обладают. Полученные данные свидетельствуют в пользу безопасности исследованных инъекционных имплантатов. ■

ЛИТЕРАТУРА

- [1] *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 8th edition. National Research Council (US) Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Washington (DC): National Academies Press; 2011. 220 p. DOI: 10.17226/12910.*
- [2] *Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть I / под ред. А.Н. Миронова – М.: Гриф и К, 2013. – 944 с.*
- [3] *Magnusson B., Kligman A. M. The identification of contact allergens by animal assay. The guinea pig maximization test. J. Invest. Dermatol. 1969; 52(3): 268–276. DOI: 10.1038/jid.1969.42.*
- [4] *Dispenza M.C. Classification of hypersensitivity reactions. Allergy Asthma Proc. 2019; 40(6): 470–473. DOI: 10.2500/aap.2019.40.4274.*
- [5] *Kuljanac I. Mechanisms of drug hypersensitivity reactions and the skin. Recent. Pat. Inflamm. Allergy Drug Discov. 2008; 2(1): 64–71. DOI: 10.2174/187221308783399252.*
- [6] *Buehler E.V. Delayed contact hypersensitivity in the guinea pig. Arch. Dermatol. 1965; 91: 171–175. DOI: 10.1001/archderm.1965.01600080079017.*