ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Изделия медицинские

Оценка биологического действия медицинских изделий

Часть 4

ИССЛЕДОВАНИЕ ИЗДЕЛИЙ, ВЗАИМОДЕЙСТВУЮЩИХ С КРОВЬЮ

Издание официальное

БЗ 1—2000/799

ГОССТАНДАРТ РОССИИ
Москва

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

1 РАЗРАБОТАН Всероссийским научно-исследовательским и испытательным институтом медицинской техники (ВНИИИМТ)

ВНЕСЕН Техническим комитетом по стандартизации ТК 422 «Оценка биологического действия медицинских изделий»

2 ПРИНЯТ И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ Постановлением Госстандарта России от 29 декабря 1999 г. № 862-ст

3 Настоящий стандарт содержит полный аутентичный текст международного стандарта ИСО 10993.4—92 «Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 4. Исследование изделий, взаимодействующих с кровью», а также дополнения, отражающие потребности национальной политики, направленной на обеспечение безопасности применения медицинских изделий»

4 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

© ИПК Издательство стандартов, 2000

Настоящий стандарт не может быть полностью или частично воспроизведен, тиражирован и распространен в качестве официального издания без разрешения Госстандарта России

Содержание

1 Область применения 1
2 Нормативные ссылки 1
3 Определения 1
4 Сокращения 2
5 Изделия, контактирующие с кровью 2
5.1 Изделия, не контактирующие с кровью 2
5.2 Изделия, контактирующие с кровью вне организма 2
5.3 Имплантируемые изделия 3
6 Методы 3
6.1 Общие рекомендации 3
6.2 Методы исследования 4
6.3 Типы тестов 8
Приложение А Исследования изделий и протезов для сердечно-сосудистой системы, проводимые в ходе их применения in vivo 10
Приложение Б Лабораторные методы: принципы и научное обоснование 13
Приложение В Методы in vitro оценки гемолитического действия изделий 17
Приложение Г Библиография 22

Введение

Соблюдение положений стандартов серии ГОСТ Р 10993 «Оценка биологического действия медицинских изделий» позволит обеспечить системный подход к исследованию биологического действия медицинских изделий.

Целью этих стандартов не является безусловное закрепление конкретных методов исследований и испытаний за группами однородных медицинских изделий в соответствии с принятой классификацией по виду и длительности контакта с организмом человека. Поэтому планирование и проведение исследований и испытаний должны осуществлять специалисты, имеющие специальную подготовку и опыт в области санитарно-химической, токсикологической и биологической оценок медицинских изделий.

Стандарты этой серии являются руководящими документами для прогнозирования и исследования биологического действия медицинских изделий на стадии выбора материалов, предназначенных для их изготовления, а также для исследований готовых образцов.

В серию ГОСТ Р ИСО 10993, имеющую групповой заголовок «Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий» входят следующие части:

- ГОСТ Р ИСО 10993.1 — оценка и исследования;
- ГОСТ Р ИСО 10993.3 — исследование генотоксичности, канцерогенности и токсического действия на репропродуктивную функцию;
- ГОСТ Р ИСО 10993.4 — исследование изделий, взаимодействующих с кровью;
- ГОСТ Р ИСО 10993.5 — исследование на цитотоксичность: методы in vitro;
- ГОСТ Р ИСО 10993.6 — исследование местного действия после имплантации;
- ГОСТ Р ИСО 10993.7 — остаточное содержание окиси этилена после стерилизации;
- ГОСТ Р ИСО 10993.9 — основные принципы идентификации и количественного определения потенциальных продуктов деструкции;
- ГОСТ Р ИСО 10993.10 — исследование раздражающего и сенсибилизирующего действия;
- ГОСТ Р ИСО 10993.11 — исследование общетоксического действия;
- ГОСТ Р ИСО 10993.12 — приготовление проб и стандартные образцы;
- ГОСТ Р ИСО 10993.13 — идентификация и количественное определение продуктов деструкции полимерных медицинских изделий;
- ГОСТ Р ИСО 10993.16 — моделирование и исследование токсикокинетики продуктов деструкции и вымывания.

Объектом стандартизации настоящего стандарта являются методы исследования взаимодействия изделий с кровью в зависимости от вида и длительности контакта в процессе предполагаемого применения изделия в медицинской практике.

Методы исследования, изложенные в стандарте, взяты из международных, национальных стандартов, директив и нормативов.

Допускается применение других методов, обеспечивающих оценку биологического действия медицинских изделий в соответствии с требованиями международных стандартов.

В приложении В изложены некоторые методы исследования гемолитического действия медицинских изделий in vitro, применяемые в России при оценке биологического действия медицинских изделий.

Приложения А, Б, В и Г носят информационный характер.

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Изделия медицинские

Оценка биологического действия медицинских изделий

Часть 4

ИССЛЕДОВАНИЕ ИЗДЕЛИЙ, ВЗАИМОДЕЙСТВУЮЩИХ С КРОВЬЮ

Medical devices. Biological evaluation of medical devices.
Part 4. Selection of tests for interactions with blood

Дата введения 2002—01—01

1 Область применения

Настоящий стандарт распространяется на методы оценки взаимодействия медицинских изделий (далее — изделий) с кровью.

В стандарте приведена классификация изделий, в том числе стоматологического назначения, контактирующих с кровью, в зависимости от вида и длительности контакта в соответствии с ГОСТ Р ИСО 10993.1.

В стандарте изложены:

- фундаментальные принципы, лежащие в основе оценки взаимодействия изделий с кровью;
- пояснения к системному выбору методов исследования, а также принципы и научная основа этих методов.

Требования настоящего стандарта являются рекомендуемыми.

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы ссылки на следующие стандарты, которые могут рассматриваться как разделы настоящего стандарта:

ГОСТ Р ИСО 10993.1—99 Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 1. Оценка и исследования

ГОСТ Р ИСО 10993.12—99 Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 12. Приготовление проб и стандартные образцы

ГОСТ Р 51148—98 Изделия медицинские. Требования к образцам и документации, представляемым на токсикологические, санитарно-химические испытания, испытания на стерильность и пирогенность

3 Определения

В настоящем стандарте применяют термины, приведенные в ГОСТ Р ИСО 10993.1, а также следующие определения:

3.1 **взаимодействие изделий с кровью:** Взаимодействие изделий с кровью или любым из ее компонентов, вызывающее изменения в крови, органах, тканях, либо влияющее на само изделие. Эти изменения могут приводить или не приводить к клинически значимым или нежелательным последствиям.

3.2 **ex vivo:** Термин, относящийся к тест-системам взятия крови непосредственно от человека или подопытного животного в камеру для исследований. В модели с использованием животных кровь

Издание официальное

можно сразу же вводить животному (рециркуляция) или собирать в пробирки для дальнейшего ее исследования (один путь). В любом случае камера для испытаний расположена вне тела.

4 Сокращения

В таблице 1 представлен перечень сокращений, которые применяют в настоящем стандарте.

Таблица 1 — Сокращения

Сокращения и краткие обозначения	Полное название
Bb	Продукт альтернативного пути активации комплемента
β-TG	Бета-тромбоглобулин
C4d	Фрагмент активированного С4 компонента системы комплемента
C3a, C5a	Продукты расщепления компонентов С3 и С5 комплемента при его активации
D-димер (D-Dimer)	Специфические продукты распада фибрина (F XIII перекрестно связанный фрагмент распада фибрина)
ЭКМО (ECMO)	Экстракорпоральный мембранный оксигенатор
СЭМ	Сканирующая электронная микроскопия
ПДФ (FDP)	Продукты деградации фибрина/фиброногена
ФПА (FPA)	Фибринопептид А
F_{1+2}	Активирующий протромбин фрагмент 1+2
iC3b	Продукт активации центрального компонента системы комплемента
ИЛ-1 (IL-1)	Интерлейкин-1
IVC	Нижняя полая вена
ЯМР (MRI)	Ядерный магнитный резонанс
PAC-1	Моноклональное антитело к активированной форме гликопротеина IIb/IIIa на поверхности тромбоцита
ПЭТ (PET)	Позитрон-эмиссионная томография
ТФ-4 (PF-4)	Фактор тромбоцитов
ПВ (PT)	Протромбиновое время
ЧТВ (PTT)	Частичное (парциальное) тромбопластиновое время
АЧТВ (APTT)	Активированное частичное тромбопластиновое время
РИА (RIA)	Радиоиммунологический анализ
S-12	Моноклональное антитело к альфа-гранулам мембраны компонента GMP 140, которые подвергаются воздействию во время реакции высвобождения тромбоцитов
SC5b-9	Продукт терминального пути активации комплемента
TAT	Тромбин-антитромбиновый комплекс
TCC	Терминальный комплекс комплемента
ТВ (TT)	Тромбиновое время
ФВ (VWF)	Фактор фон Виллебранда
АИК (CPB)	Аппарат искусственного кровообращения
ELSA	Фермент-связанное иммуносорбентное исследование

5 Изделия, контактирующие с кровью

Изделия, контактирующие с кровью, подразделены на категории в соответствии с ГОСТ Р ИСО 10993.1.

5.1 Изделия, не контактирующие с кровью

См. ГОСТ Р ИСО 10993.1. Например, устройства для диагностики in vitro.

5.2 Изделия, контактирующие с кровью вне организма

К данной категории согласно ГОСТ Р ИСО 10993.1 относят изделия, контактирующие с циркулирующей кровью и служащие в качестве магистралей и устройств для переливания крови. Отдельные примеры вошли в 5.2.1 и 5.2.2 настоящего стандарта.

5.2.1 К категории изделий, контактирующих с кровью вне организма и не имеющих прямого контакта с кровеносным руслом, относят, например, канюли, удлинители, изделия для сбора крови, хранения и введения крови и ее продуктов (трубки, иглы, мешки и др).

5.2.2 К категории изделий, контактирующих с кровью вне организма и имеющих прямой контакт с циркулирующей кровью, относят, например, аппараты искусственного кровообращения, экстракорпоральные мембранные оксигенаторы, оборудование для гемодиализа, оборудование для донорского и терапевтического афереза, устройства для абсорбции специфических веществ крови, изделия, вводимые в сердце и сосуды, экстракорпоральные системы вспомогательного кровообращения, временные электроды кардиостимулятора (водителя ритма).

5.3 Имплантируемые изделия

К данной категории согласно ГОСТ Р ИСО 10993.1 относят изделия, частично или полностью имплантируемые внутрь сосудистой системы. Например, механические протезы или биопротезы клапанов сердца, протезы или биотрансплантаты сосудов, вспомогательные устройства для системы кровообращения (искусственный желудочек сердца, искусственное сердце, интрааортальные баллонные насосы), фильтры для нижней полой вены, стенты, артериовенозные шунты, мониторы крови, катетеры для введения лекарств, постоянные электроды водителя ритма (кардиостимулятора), интраваскулярные мембранные оксигенаторы (искусственные легкие).

6 Методы

6.1 Общие рекомендации

6.1.1 При возможности для исследований применяют соответствующую модель или систему, которая моделирует геометрию и условия контакта изделия с кровью при применении по назначению, включая продолжительность контакта, температуру, условия стерильности и состояние кровотока. Для изделий, геометрия которых известна, например протезы сосудов различной длины, необходимо оценить зависимость результатов исследования от площади поверхности (длины) изделия.

Следует выбирать методы исследования, соответствующие последним достижениям науки в данной области.

Примечание — Исследуют лишь части изделия, контактирующие с кровью.

6.1.2 Если отсутствие контроля в эксперименте нельзя обосновать, контроль обязателен. При возможности в качестве контроля используют изделия, применяемые в медицинской практике, или хорошо изученные материалы, характеристики которых известны согласно ГОСТ Р ИСО 10993.12.

Стандартные образцы материалов в качестве отрицательного и положительного контроля, а также все исследуемые материалы должны соответствовать требованиям контроля качества и всем процедурам, гарантирующим качество материалов предприятием-изготовителем и испытательной лабораторией. Материалы и изделия должны иметь маркировку с информацией о производителе, классе и типе материала.

6.1.3 Исследование материалов, предполагаемых для изготовления отдельных частей и деталей изделия, следует проводить методом скрининга. Проведение этих исследований не заменяет изучение изделия в целом в условиях, моделирующих условия применения в медицинской практике.

6.1.4 Исследования, которые не моделируют условия применения, могут не совсем точно воспроизводить природу взаимодействия изделия с кровью во время клинического применения. Например, отдельные экспресс—тесты in vitro или ex vivo недостаточны для прогнозирования отдаленного результата взаимодействия крови и изделия in vivo [22], [23].

6.1.5 Изделия, предполагаемые к применению ex vivo (контактирующие извне), исследуют ex vivo. Изделия, предполагаемые к применению in vivo (имплантаты), исследуют in vivo на модели с использованием животных в условиях, где это возможно, моделирующих условия клинического применения.

6.1.6 Методы исследования in vitro пригодны для скрининга изделий, контактирующих извне, или имплантатов, но они могут неточно прогнозировать результаты взаимодействия изделия с кровью при длительном, многократном или постоянном контакте.

Изделия, предназначенные для бесконтактного применения, на взаимодействие с кровью не исследуют.

Изделия, имеющие кратковременный контакт с кровью (например, ланцеты, гиподермические иглы, капиллярные трубки и др.), как правило, на взаимодействие с кровью не исследуют.

6.1.7 Положения раздела 5, пунктов 6.1.5 и 6.1.6 служат руководством в выборе методов исследований, приведенных в 6.2.1.

6.1.8 Одноразовое лабораторное оборудование, предназначенное для забора крови и проведения исследования крови in vitro, проверяют, чтобы убедиться в отсутствии влияния на результаты прово-

димого исследования. Проверку можно осуществить, проводя исследование на стандартных образцах и сравнивая результаты при помощи методик, проверенных клинической практикой.

6.1.9 Если методы выбраны в соответствии с 6.1.1—6.1.8 и исследование проводят в условиях, моделирующих условия клинического применения, результаты исследования будут с наибольшей вероятностью прогнозировать воздействие изделия в клинической практике. Индивидуальные реакции животных различных видов и другие факторы могут ограничить возможности прогнозирования при любом методе исследования.

6.1.10 Из-за индивидуального характера реактивности крови у животных различных видов, при возможности, используют кровь человека. При необходимости использования животных, например если осуществляют оценку изделий, предназначенных для длительного или многократного, или постоянного контакта с кровью, необходимо учитывать, что каждый вид обладает индивидуальной реактивностью крови. Реактивность и другие показатели крови у человека и у приматов очень близки [23].

Примечание — Использование приматов в исследованиях совместимости крови и изделий запрещено законом государств Европейского Сообщества (86/906/EEC) и законами других стран.

Исследования с использованием таких животных, как свинья, теленок, овца, могут давать удовлетворительные результаты. Для доклинической оценки протезов сосудов из биоматериалов пригодны собаки [43]. Поскольку индивидуальные различия могут быть значительными (например, адгезия тромбоцитов, тромбоз [17] и гемолиз у собак происходит быстрее, чем у человека), все результаты исследований на животных следует интерпретировать с осторожностью.

6.1.11 Антикоагулянты не используют, за исключением случаев, когда изделие должно функционировать в их присутствии. Выбор и концентрация антикоагулянта влияют на взаимодействие крови с изделием. Изделия, которые применяют с антикоагулянтами, исследуют в присутствии антикоагулянтов. Концентрации антикоагулянтов должны соответствовать используемым в клинических условиях.

6.1.12 Даже незначительные модификации изделий, допущенных к применению в медицинской практике, могут привести к значительным изменениям клинических функций. Примеры модификаций: изменения конструкции изменения, в той или иной степени химического состава поверхности или всего объема материала, из которого изготовлено изделие, изменение текстуры, пористости или других свойств искусственных сосудов. Поэтому необходимо учитывать влияние всевозможных модификаций на взаимодействие изделий с кровью при оценке их клинического значения.

6.1.13 Для получения статистически достоверных результатов проводят достаточное количество исследований, в том числе подходящий контроль. Вариабельность некоторых методов требует многократного повторения исследований для определения значимости этих методов. Проведение исследования взаимодействия изделия с кровью в течение длительного времени дает информацию о зависимости результатов взаимодействия от продолжительности контакта. При планировании эксперимента необходима консультация со специалистом по статистике.

6.2 Методы исследования

6.2.1 Методы, рекомендуемые для изучения взаимодействия изделий и материалов с кровью

Рекомендуемые методы исследования сгруппированы на основе категорий изделий. Перечни методов приведены в таблицах 2—6.

Рекомендуют два уровня исследований. Уровня подразделяют на пять классов. В основе разделения лежит изучаемый процесс или система:

- тромбоз,
- коагуляция,
- тромбоциты и их функции,
- гематология,
- иммунология.

Для получения максимальной информации о спектре реакций, возникающих в результате контакта изделия с кровью, выбирают из каждого класса один или несколько тестов уровня 1 (таблицы 2, 3 и 5).

Дополнительные исследования в соответствии с уровнем 2 являются необязательными (таблицы 4 и 6).

Принципы и научная основа методов исследования уровней 1 и 2 изложены в приложении В.

Таблица 2 — Изделия, контактирующие с кровью извне. Уровень 1 — Кровоток, непрямой (см. 5.2.1)

Тест	Метод	Комментарии
Тромбоз	Световая микроскопия (адгезия тромбоцитов, лейкоциты, агрегаты, эритроциты, фибрин и др.)	Световую микроскопию можно заменить на СЭМ, если какие-либо свойства материала осложняют световую микроскопию
Коагуляция	ЧТВ (неактивированное)	—
Тромбоциты	Подсчет тромбоцитов	—
Гематология	Количество лейкоцитов, дифференциальный подсчет лейкоцитов; гемолиз (гемоглобин плазмы)	Гемолиз — наиболее важный тест этой категории, который регистрирует степень разрушения клеточной стенки эритроцитов при контакте материалов и изделий с кровью. Этот метод должен быть одним из нормативных стандартных методов определения гемолиза
Иммунология	C3a, C5a, TCC, C4d, Bb, iC3b, SC5b-9	Перечень, включая четыре последние теста, отражает различные стадии активации комплемента

Таблица 3 — Изделия, контактирующие с кровью извне. Уровень 1 — Циркулирующая кровь (см. 5.2.2)

Тест	Метод	Комментарии
Тромбоз	Процент окклюзии; сокращение потока; гравиметрический анализ (масса тромбов); световая микроскопия (адгезия тромбоцитов, лейкоциты, скопления клеток, эритроциты, фибрин и т. д.); снижение давления через устройство	Световую микроскопию можно заменить на СЭМ, если свойства материала затрудняют осуществление световой микроскопии. Для изделий, имеющих длительный или многократный контакт (см. 6.2.1.2), снижать давление не рекомендуется
Коагуляция	ЧТВ (неактивированное)	—
Тромбоциты	Подсчет тромбоцитов; агрегация тромбоцитов; время кровотечения	—
Гематология	Количество лейкоцитов, дифференциальный анализ лейкоцитов; гемолиз (количество свободного гемоглобина в плазме)	Гемолиз — наиболее важный тест этой категории, который регистрирует степень разрушения клеточной стенки эритроцитов при контакте материалов и изделий с кровью. Этот метод должен быть одним из нормативных стандартных методов определения гемолиза
Иммунология	C3a, C5a, TCC, C4d, Bb, iC3b, SC5b-9	Перечень, включая четыре последние теста, отражает различные стадии активации комплемента

Таблица 4 — Изделия, контактирующие с кровью извне. Уровень 2 — Дополнительный

Тест	Метод	Комментарии
Тромбоз	СЭМ (адгезия и агрегация тромбоцитов, морфология тромбоцитов и лейкоцитов; фибрин)	—
Коагуляция	Исследование специфических коагуляционных факторов; ФПА, D-димер, F_{1+2}, PAC-1, S-12, TAT	—

Продолжение таблицы 4

Тест	Метод	Комментарии
Тромбоциты	ТФ-4, β-TG, тромбоксан В2; гамма-изображение меченых индием ^{111}In тромбоцитов (выживание тромбоцитов)	Маркировка индием ^{111}In рекомендуется только для изделий, имеющих длительный или многократный контакт с кровью (см. 6.2.1.2)
Гематология	Подсчет ретикулоцитов; активация высвобождения специфических продуктов из клеток периферической крови (гранулоциты)	Рекомендуется только для изделий, имеющих длительный или многократный контакт с кровью (см. 6.2.1.2)
Иммунология	ИЛ-1 и другие цитокинины; определение i-РНК, специфической для цитокининов	—

Таблица 5 — Имплантируемые изделия. Уровень 1 (см. 6.3)

Тест	Метод	Комментарии
Тромбоз	Процент окклюзии; сокращение потока; вскрытие изделия (макро- и микроскопия); аутопсия дистальных органов (макро- и микроскопия)	—
Коагуляция	ЧТВ (неактивированное), ПВ; ТВ; плазменный фибриноген, ПДФ	—
Тромбоциты	Подсчет тромбоцитов; агрегация тромбоцитов	—
Гематология	Количество лейкоцитов, дифференциальный подсчет лейкоцитов; гемолиз (количество свободного гемоглобина в плазме)	Гемолиз — наиболее важный тест этой категории, который регистрирует степень разрушения клеточной стенки эритроцитов при контакте материалов и изделий с кровью. Этот метод должен быть одним из нормативных стандартных методов определения гемолиза
Иммунология	C3a, C5a, TCC, C4d, Bb, iC3b, SC5b-9	Перечень, включая четыре последние теста, отражает различные стадии активации комплемента

Таблица 6 — Имплантируемые изделия. Уровень 2 — Дополнительный

Тест	Метод	Комментарии
Тромбоз	СЭМ, ангиография	—
Коагуляция	Исследование специфических факторов свертывания крови: ФПА, D-димер, F_{1+2}, PAC-1, S-12, TAT	—
Тромбоциты	Исследование меченых ^{111}In индием-111 тромбоцитов, ТФ-4 (фактор IV), β-TG, тромбоксан В2; гамма-излучение меченых изотопами тромбоцитов	—
Гематология	Подсчет ретикулоцитов; активация высвобождения специфических продуктов из клеток периферической крови (гранулоциты)	—
Иммунология	ИЛ-1 и другие цитокинины; определение i-РНК, специфичной для цитокининов	—

6.2.1.1 *Неконтактирующие изделия*

Неконтактирующие изделия не подвергают исследованию их взаимодействия с кровью. Одноразовые наборы для теста проверяют с целью исключения влияния материалов, из которых они изготовлены, на результаты исследований.

6.2.1.2 *Изделия, контактирующие извне*

Изделия, контактирующие извне, и методы их исследования приведены в таблицах 2—4. Эти методы рекомендуют для изделий, предназначенных для кратковременного (менее 24 ч), длительного или многократного (от 24 ч до 30 сут) контакта с кровью. См. также 6.1.6.

6.2.1.3 *Имплантируемые изделия*

Методы, предназначенные для исследования имплантируемых изделий, приведены в таблицах 5 и 6. Эти методы рекомендуют для изделий, имеющих длительный или многократный контакт (от 24 ч до 30 сут) или постоянный контакт (более 30 сут).

6.2.2 Указания и ограничения

В таблице 7 перечислены имеющиеся в продаже наборы, предназначенные для изучения человеческой крови, а в таблицах 2—6 приведен перечень методов исследований. Методы уровня 1 (относительно простые) являются основными, при оценке взаимодействия материалов и изделий с кровью. Методы уровня 2 (более сложные) считают дополнительными. Они требуют специального опыта от исполнителей при проведении исследования и интерпретации результатов. Проведение исследований обоих уровней требуют повышенного внимания к техническим деталям.

Таблица 7 — Имеющиеся в продаже наборы для исследования тромбоцитов, коагуляции, фибринолиза и компонентов комплемента

Фактор	Метод исследования
Плазминоген	Колориметрия, флюоресцентный
Антитромбин III	Хромогенный, флюоресцентный
Протеин С	Хромогенный
Протеин S	Хромогенный
Антиплазмин	Хромогенный
Прекалликреин	Хромогенный
Калликреин	Флюоресцентный
ТФ-4	РИА, ELISA, хромогенный
β-TG	РИА, ELISA
Тромбоксан В2	РИА, ELISA
Фактор VIII-ФВ	Хромогенный, время образования сгустка
Фактор IX	Хромогенный, время образования сгустка
Фактор IXa	Флюоресцентный
Фактор X	Хромогенный, время образования сгустка
Фактор Xa	Флюоресцентный
Фактор XII	Хромогенный, время образования сгустка
Фактор XIIa	Флюоресцентный
ФПА	РИА, ELISA
C3, C5	РИА
Bb, iC3b, C4d, SC5b-9	ELISA
TCC	ELISA
TAT	РИА, ELISA
ИЛ-1	РИА, ELISA
F_{1+2}	РИА, ELISA
D-димер	РИА, ELISA

Примечание — Эти методы проверены в клинико-диагностических лабораториях на человеке. Прежде чем использовать их в исследованиях на животных, необходимо проверить значимость получаемых показателей и их сопоставимость.

РИА используют для изучения взаимодействия изделия с кровью человека, но, как правило, он не пригоден для крови животных. Наборы, предназначенные для исследований с использованием человеческой крови, обычно не дают реакции с кровью животных, за исключением крови некоторых приматов. При разработке тест-систем следует убедиться в том, что тест-система действительно изме-

ряет активацию, вызванную исследуемым материалом, а не является артефактом, присущим тест-системе.

При исследовании взаимодействия изделия с кровью может возникнуть разброс в полученных результатах из-за неправильного обращения с кровью либо неадекватно прогнозируемого воздействия материала до начала исследования. Например, когда исследование ограничивают лишь одним типом тестов или допускают попадание постороннего материала, не относящегося к испытуемому материалу или изделию. Материалы, которые предполагают применять в условиях медленного (венозного) потока крови, могут взаимодействовать с потоком совсем иначе, когда их используют с потоком с высокой скоростью (артериальная кровь). Изменение конструкции и (или) условий потока могут изменять гемосовместимость материала in vivo.

6.3 Типы тестов

6.3.1 Тесты in vitro

При рассмотрении результатов, полученных в тестах in vitro, учитывают следующие показатели: гематокрит, антикоагулянты, условия хранения пробы, срок хранения пробы, наличие контакта с воздухом и pH, температуру, последовательность проведения исследований изучаемого материала и контроля, соотношение площади поверхности и объема, условия динамики жидкости (особенно скорость кровотока либо скорость вымывания стенки). Исследования следует проводить, по возможности, в пределах не более 4 ч, так как многие свойства крови изменяются сразу же после отбора образца.

6.3.1.1 *Исследования тромбоцитов*

Методика забора крови должна быть воспроизводима. Тромбоциты могут стать гиперреактивными в различных условиях, включая неправильный забор крови. Измерения, предназначенные для подтверждения нормальной реактивности тромбоцитов, проводят с помощью агрегометра. Этим методом определяют пробы тромбоцитов со сниженной реактивностью. Гиперреактивные тромбоциты на агрегометре в нормальных условиях испытаний не выявляются. Для того чтобы определить, становятся ли тромбоциты гиперреактивными в результате воздействия материала или изделия с кровью, тесты на агрегацию тромбоцитов модифицируют (уменьшая соответствующим образом концентрацию тромбоцитов и агрегирующих агентов).

6.3.1.2 *Исследование коагуляции*

Методы исследования коагуляции основаны на использовании нативной (свежей, без антикоагулянтов) цельной крови, цельной крови с антикоагулянтом (цитратной), богатой тромбоцитами плазмы крови или плазмы крови, обедненной тромбоцитами. Большинство стандартизованных методов исследований коагуляции разработаны с целью определения клинических значимых нарушений свертываемости крови, приводящих к задержке тромбообразования или к сильным кровотечениям. Поэтому чтобы оценить коагуляцию, ускоренную под действием биоматериалов, соответствующим образом изменяют программу изучения взаимодействия изделия с кровью. Для определения АЧТВ рекомендуют применять такие активаторы, как коалин, целит, эллаговая кислота. Избегают употребления реактивов с такими активаторами, поскольку они способны маскировать ускорение коагуляции, вызванное материалами и изделиями. Исследуемый материал является активатором. Необходимо включать контроль без материала.

Кровь подвергают воздействию исследуемого материала либо в неподвижной камере с параллельными плоскими ячейками, либо в замкнутой системе, где внутренняя поверхность трубки является исследуемым материалом. По истечении заданного заранее времени контакта с исследуемой поверхностью проводят исследование поверхности соприкосновения изделия и крови.

6.3.2 Методы ex vivo

Методы ex vivo предназначены для изделий, которые предполагают использовать ex vivo, например изделия, присоединяющиеся извне. Исследования ex vivo также пригодны для изделий; ex vivo не заменяет имплантацию. Существуют готовые тест-системы для мониторинга адгезии тромбоцитов, возникновения эмболии, осаждения фибриногена, массы тромбов, адгезия лейкоцитов, убыли тромбоцитов в крови и активации тромбоцитов [17], [27], [43]. Скорость кровотока измеряют либо прибором с эффектом Доплера, либо электромагнитным методом. Изменение скорости кровотока может служить индикатором возникновения тромбов, их размеров, мест отложения, а также развивающейся эмболии. Для мониторинга взаимодействия изделий с кровью ex vivo используют компоненты крови с радиоактивными метками. Чаще всего метят тромбоциты и фибриноген. Изменение реактивности тромбоцитов при нанесении метки будет минимизировано при более тщательном соблюдении всех деталей этой процедуры [20], [21], [32].

Преимущества тестов ex vivo по сравнению с тестами in vitro заключаются в том, что при исследованиях ex vivo используют поток нативной крови, что исключает артефакты, вызванные антикоагулянтами, и создают физиологические условия кровотока. Ex vivo можно исследовать несколько материалов, так как появляется возможность менять камеры, а также наблюдать отдельные события в реальном времени. Среди недостатков исследований ex vivo — различие скорости кровотока в разных экспериментах, у разных животных, и, как правило, относительно короткие периоды времени для оценки. В связи с этим рекомендуется использовать одно и то же животное для положительного и отрицательного контроля.

6.3.3 Методы in vivo

Исследование in vivo предусматривает имплантацию материала или изделия животным. Лоскуты для реконструирования сосудов, протезы сосудов из биологического материала, кольцевые протезы, сердечные клапаны — примеры изделий, для исследования которых пригодны методы in vivo. Тесты in vivo обычно проводят для изучения гемосовместимости изделий, контактирующих с кровью более 24 ч.

В большинстве случаев успех экспериментов in vivo определяется временем свободного кровотока. Процентное выражение окклюзии и массы тромбов определяют после удаления изделия. Тенденция тромбов, образовавшихся на стенках изделия, к эмболизации дистальных органах должна быть изучена путем макро- и микроскопических исследований органов, лежащих ниже по течению от изделия. Тромбы чаще всего скапливаются в почках, попадая туда по кровотоку почечных артерий от изделий, имплантированных выше по течению, на которых и происходила эмболизация (например, системы вспомогательного кровообращения, искусственное сердце, протезы аорты) [16].

Существуют методы оценки in vivo, которые не ограничивают продолжительность эксперимента. Для определения проходимости трансплантанта или места образования тромба используют артериограмму. Для наблюдения за осаждением тромбоцитов в различные периоды времени используют рентгеновские снимки. Выживание тромбоцитов и их убыль в крови используют в качестве индикаторов взаимодействия между кровью и изделием и пассивации вследствие образования неоинтимы или адсорбции белка.

В некоторых тест-системах in vivo свойства материала не являются определяющими при взаимодействии между кровью и изделием. Параметры потока, соответствие, пористость и конструкция трансплантата могут иметь большее значение, чем биосовместимость самого материала. Например, системы с низкой скоростью кровотока могут давать результаты исследования, в значительной степени отличающиеся от результатов исследования того же материала в условиях системы с высокой скоростью кровотока. В таких случаях результаты, полученные в тест-системе in vivo, должны иметь более важное значение в сравнении с результатами исследований in vitro.

ПРИЛОЖЕНИЕ А
(справочное)

Исследования изделий и протезов для сердечно-сосудистой системы, проводимые в ходе их применения in vivo

А1 Общие вопросы

А.1.1 В настоящем приложении представлена информация по выбору тестов для оценки взаимодействия с кровью изделий, предназначенных для сердечно-сосудистой хирургии. Пункт 6.2.1 содержит полный набор основных (уровень 1) и дополнительных (уровень 2) методов оценки взаимодействия изделий с кровью трех категорий: не контактирующие с кровью, контактирующие с кровью извне и имплантаты.

А.1.2 Классификация результатов взаимодействия изделия с кровью, приведенная ниже, дана для информации.

А.1.2.1 Взаимодействие, в результате которого воздействию подвергают, главным образом изделие и которое может иметь или не иметь нежелательные последствия, подразделяют на следующие группы:

- адсорбция белков плазмы, липидов, кальция или других веществ из крови на поверхности изделий или абсорбция таких веществ в изделие;
- агрегация тромбоцитов, лейкоцитов или эритроцитов на поверхности изделия, или абсорбция внутриклеточных компонентов в изделие;
- образование псевдоинтимы или тканевой капсулы на поверхности изделия;
- изменение механических и других свойств изделия.

А.1.2.2 Взаимодействие, обладающее потенциальным нежелательным воздействием на животное или человека:

- активация тромбоцитов, лейкоцитов или других клеток, активация коагуляции, активация фибринолиза, активация комплемента, активация других путей иммунотоксичности (иммуносупрессия, повышение иммунитета, иммуномодуляция);
- образование тромбов на поверхности изделия;
- движение сгустка крови (тромба) или другого вещества с внутренней поверхности изделия по просвету системы кровообращения (эмболизация);
- повреждение клеток, циркулирующей крови, приводящее к анемии, гемолизу, лейкопении, тробоцитопении или изменению функции клеток крови;
- повреждение клеток и тканей, контактирующих с изделием;
- гиперплазия интимы или скопление (аккумуляция) другой ткани на изделии либо вблизи него, что приводит к снижению кровотока или изменению других функций изделия;
- адгезия и (или) рост бактерий и других возбудителей инфекции на поверхности изделия.

А.1.3 Процедуры, используемые для оценки изделий, предназначенных для сердечно-сосудистой хирургии на животных, почти те же, что в клинической практике. Однако модели с использованием экспериментальных животных позволяют осуществлять постоянный мониторинг и исследование важных переменных при систематическом контроле.

А.1.4 Рекомендуется соблюдать определенные общие требования.

Тромбоз, тромбоэмболия, кровотечение и инфекция — эти явления свидетельствуют о недопустимости использования и дальнейшей разработки уже имеющихся протезов сердечно-сосудистой системы. Для изделий с кратковременным воздействием на кровь (менее 24 ч), важными являются точные определения степени различий гематологических, гемодинамических переменных, а также переменных, характеризующих функционирование изделия, образование массы тромбов и возможно эмболия. При длительном, многократном или постоянном контакте (более 24 ч) внимание уделяют методике серии измерений, которые смогут дать информацию относительно времени тромбообразования и тромбоэмболии, потребление компонентов циркулирующей крови, возникновения гиперплазии внутренней поверхности сосудов и инфекции. В обоих типах воздействия и категориях контакта исследование гемолиза имеет важное значение. На образование тромбов может оказывать значительное влияние хирургическая техника, разнообразные, зависящие от времени, тромболитические и эмболитические эффекты, инфекции, вызванные изделием, и возможные изменения поверхности применяемых изделий, например гиперплазия интимы и лизис эндотелия.

Последствия взаимодействия чужеродных поверхностей с кровью могут быть различными: от множественного тромбоза и эмболии до неуловимых эффектов, таких как ускорение потребления гемостатических элементов; последнее может компенсироваться или привести к снижению численности тромбоцитов и факторов свертывания крови.

А.1.5 При взаимодействии изделия с кровью может происходить нарушение функции органов. Например, функции почек и легких подвергаются действию со стороны свернувшейся крови и комплекса тромбоциты (лейкоциты) комплемент.

Такие показатели, как выживание тромбоцитов, β-TG и специфический белок ТФ-4 в плазме крови могут отражать степень активации тромбоцитов (и, возможно, риск тромбоэмболии) даже при отсутствии значительного повышения показателей первичного гемостаза. Стандартное время кровотечения является показателем функции тромбоцитов in vivo. Удлинение этого показателя предполагает наличие тромбоцитопении или других качественных изменений в свертывающей системе, которые возникают при применении АИК [28]. Измерение ФПА дают информацию о внутрисосудистом свертывания крови.

В исследовании сосудистых трансплантатов из биологических тканей, клапанов сердца и других изделий, имплантированных или контактирующих извне, для определения локализации тромбов используют радионуклеотидный метод [20], [21], [36]. Кроме того, важную информацию может дать двумерное сканирование и тщательное исследование извлеченного изделия [37], [38].

А.1.6 Выбор модели с использованием животных может быть ограничен требованиями, связанными с размером, доступностью определенных видов и их ценой. Очень важно, чтобы исследователи внимательно относились к различиям и сходству физиологии выбранных видов животных и человека, особенно связанных с коагуляцией, функцией тромбоцитов и лизисом фибрина, а также с реакцией на фармакологические агенты, такие как анестетики, антикоагулянты, агенты, растворяющие тромбы и тромбоциты, и, наконец, антибиотики.

Так как реактивность различных видов животных неодинакова, и реакция на различные изделия также различна, данные, полученные лишь на животных одного вида, необходимо интерпретировать с осторожностью. Приматы, такие как бабуины, обладают большим сходством гематологических показателей, механизма свертывания крови и сердечно-сосудистой системы с человеческими [27]. Еще одно преимущество заключается в том, что можно использовать большинство иммунологических методов, разработанных для человека, для других приматов. Среди них: ТФ-4, β-TG, ФПА, ТАТ, F_{1+2}. Часто используют собак, что позволяет получить ценную информацию, так как тромбоз, зависящий от примененного изделия, у них возникает быстрее, чем у человека. Это различие можно рассматривать как преимущество использования собак в исследовательских целях. Свинью считают подходящей моделью благодаря сходству сердечно-сосудистой системы и гематологических показателей этого вида и человека.

А.2 Канюли

Канюли обычно вводят в один или более основных кровеносных сосудов для обеспечения непрерывного поступления крови. Их также используют в АИК и других устройствах. Канюли можно исследовать в остром или хроническом эксперименте и, как правило, их исследуют как артериовенозные (AV) шунты. Использование канюль незначительно изменяет уровни клеток в циркулирующей крови или факторы свертывания крови. Канюли, как и другие устройства, имеющие контакт с кровью вне организма согласно 5.2.1, обычно в меньшей степени подвергают исследованию (см. 6.2.1.2).

А.3 Катетеры и зонды

Большинство тестов, используемых для исследования канюль, подходят и для исследования катетеров и зондов. Положение катетеров в артериальной или венозной системе может значительно повлиять на взаимодействие изделия с кровью. Рекомендуется осуществлять одновременное контрольное исследование, используя противоположную артерию или вену. При удалении катетера необходима осторожность, чтобы не сдвинуть тромб. Исследование in situ дает возможность оценить степень участия повреждений интимы или мест ввода катетеров и зондов в процессе образования тромба. Исследование кинетики с применением меченых компонентов крови рекомендуется только для катетеров, которые вводят на длительное время, но может быть полезным для прогнозирования накопления тромбов in vivo. Антиграфия и измерение скорости кровотока по Доплеру могут быть также полезны.

А.4 Экстракорпоральные оксигенаторы, гемодиализаторы, оборудование для лечебного афереза и устройства для абсорбции специфических компонентов крови

Гемостатическая реакция на АИК может быть весьма значительной и острой. Многие факторы, такие как использование отсосов крови, состав подаваемой насосом жидкой части крови, гипотермия, контакт крови с воздухом и время контакта, влияют на результаты исследования. Эмболы в отводящих магистралях можно определять, периодически помещая ex vivo фильтры для крови, или используя ультразвук, или применяя другие неинвазивные приемы. Накопление тромбов можно оценивать непосредственно во время работы устройства, отмечая такие функциональные показатели изделия, как падение давления в оксигенаторе и скорость переноса кислорода. Приобретенная временная дисфункция тромбоцитов, ассоциирующаяся с выборочным высвобождением альфа-гранул, наблюдалась у пациентов с подключенным АИК [28]; время кровотечения и другие методы исследования тромбоцитарного гемостаза особенно результативны.

АИК и гемодиализаторы могут стать причиной активации комплемента. В результате может возникнуть значительный легочный лейкостаз, повреждение легких и их функций. Поэтому количественная оценка гемолитической активности комплемента весьма значима и зависит от применяемого изделия.

Оборудование для терапевтического афереза и устройства для абсорбции специфических субстанций из крови благодаря высокому показателю соотношения между площадью поверхности и объемом могут быть потенциальной причиной активации комплемента, коагуляции, тромбоцитов и лейкоцитов. Исследование взаимодействия крови с подобными изделиями следует проводить по тем же принципам, как и испытание экстракорпоральных оксигенаторов и гемодиализаторов.

А.5 Изделия, поддерживающие работу желудочков сердца (системы вспомогательного кровообращения)

Эти изделия могут вызывать значительные изменения различных компонентов крови. Среди факторов, приводящих к такому эффекту, можно указать на значительные площади инородных поверхностей, воздействующих на кровь, высокий режим кровотока и участки, нарушающие кровоток, либо закручивая его, либо разделяя. Исследование таких изделий может включать измерение гемолиза, концентрации тромбоцитов и фибриногена, жизнеспособности тромбоцитов, активности комплемента. Необходим мониторинг функционирования печени, легких, центральной нервной системы. Важным компонентом оценки изделия является детальное исследование патологических изменений с помощью хирургического катетера.

А.6 Протезы сердечного клапана

При проведении оценки сердечных клапанов играют важную роль инвазивное, неинвазивное и гидродинамическое исследования.

Эхокардиография типов 2D и М позволяет получить при помощи ультразвука изображение сердца. Отражение от тканей с различной степенью акустического поглощения воспринимается и передается в форме изображения. При этом может быть изучена структура поверхности клапанов. Работающие протезы клапанов формируют эхо-сигналы высокого уровня, что дает возможность получать довольно четкое изображение движущегося препятствия (тромба, эмбола). Однако качество изображения зависит от того, какой клапан исследуют. Эхокардиография может оказаться весьма ценной в исследовании работы протезов клапанов, изготовленных из биологических тканей. При помощи этого метода можно выявить разрастания и утолщения стенки клапана, сгустки крови. Используя черно-белую и цветовую визуализацию отраженного эхо-сигнала при проведении эхокардиографии, можно идентифицировать и приблизительно оценить обратный ток крови.

Рекомендуют также определить выживание и агрегацию тромбоцитов, провести исследования свертывания крови и гемолиза, измерить давление кровяного русла и скорость кровотока, а также сделать аутопсию клапана и прилегающих тканей.

А.7 Протезы сосудов

В различные участки венозной и артериальной системы могут быть имплантированы пористые и непористые материалы. Выбор участка определяется, главным образом, предполагаемым применением протеза. Чем меньше длина протеза сосуда и чем больше его диаметр, тем выше вероятность того, что протез не закупорится. Правило большого пальца для протезов сосудов, внутренний диаметр которых менее 4 мм, можно сформулировать следующим образом: длина протеза сосуда должна составлять величину, равную диаметру, умноженному на 10 (например, 40 мм для протеза диаметром 4 мм). Наличие просвета в протезе сосуда определяется с помощью пальпирования пульса в дистальном участке протеза, а также периодической проводимой ангиографией. Ультразвуковое исследование, ЯМР и ПЭТ могут быть весьма полезны. Результаты серии исследований меченых тромбоцитов коррелируют с площадью поверхности неэндотелизированных трансплантатов у бабуинов [27]. Применение метода меченых тромбоцитов облегчает выявление места образования тромбов на стенках. Рекомендуют проводить серию подсчетов тромбоцитов, высвобождающихся компонентов клеток крови, продуктов деградации фибриногена/фибрина и активированных продуктов коагуляции. Аутопсия такого протеза и прилегающих к нему сегментов сосуда для морфологических исследований целостности эндотелия и реакции пролиферации может дать ценную информацию.

А.8 Ловушки тромбов и стенты

Эти изделия исследуют путем ангиографии и ультразвукового метода. Допускается применение методик для оценки протезов в соответствии с А.7.

ПРИЛОЖЕНИЕ Б
(справочное)

Лабораторные методы: принципы и научное обоснование

Б.1 Основные положения

Б.1.1 В настоящем приложении рассматривают принципы и научное обоснование методов исследования, изложенных в 6.2.1. Подробное описание этих методов можно найти в стандартах по лабораторной медицинской практике и клинической патологии. В ссылках [14]—[39], [41]—[44] рассматривают методы исследования, которые могут быть полезны для оценки изделий, взаимодействующих с кровью. Из-за биологического разнообразия и технических ограничений точность многих из этих методов недостаточно высока. По возможности, чтобы определить значимость результатов, исследования повторяют несколько раз.

Б.1.2 Для того, чтобы исследования достигали цели и оценка взаимодействия изделия с кровью была адекватной, сначала подвергают воздействию материала или изделия кровь или плазму здорового человека, обработанную антикоагулянтом. Воздействие должно происходить в условиях, моделирующих условия применения в медицинской практике, в том числе длительность взаимодействия, температуру и характеристики кровотока. Известное количество крови, подвергнутой воздействию, или плазмы исследуют сразу после контакта с материалом или изделием. Условия воздействия должны учитывать предполагаемое использование изделия. Обеспечивают следующие условия:

- длительность воздействия не менее 15 мин;
- температура 37 °С;
- кровоток моделирует предполагаемое применение изделия;
- начало тестирования — в течение 15 мин, следующих за воздействием.

Выбор условий зависит от того, какое изделие или материал исследуют, а также от назначения данного изделия.

Б.1.3 Во время исследования изделий, контактирующих извне, и имплантируемых изделий в условиях, в которых их применяют, кровь собирают в антикоагулянт, а исследование проводят, как описано, без предварительной стадии воздействия. Тесты разделены на пять категорий согласно 6.2.1 в соответствии с процессом или системой, которые исследуют: тромбоз, коагуляция, клетки крови и их функции, гематология и иммунология.

Б.2 Тромбоз

Б.2.1 Процентное выражение окклюзии

После того как изделие использовали и извлекли, оценку окклюзии осуществляют визуально и оценивают в процентах. Определяют степень тромбообразования в проводящем пути. Отсутствие видимой окклюзии необязательно означает отсутствие процесса тромбообразования, поскольку тромб со времени его образования может изменить свое местонахождение к тому моменту, когда оценивают процент окклюзии. Причиной закупорки сосуда может быть не только тромбоз, но и гиперплазия интимы, особенно в местах соединения протеза с сосудом. Для определения природы окклюзии проводят микроскопическое исследование.

Б.2.2 Уменьшение кровотока

Параметры кровотока (скорость или объем) измеряют после одного применения. Измерение можно проводить во время, перед или после применения. Пояснение и интерпретацию результатов проводят в соответствии с Б.2.1.

Б.2.3 Гравиметрический анализ (определение массы тромбов)

Массу тромбов измеряют после удаления изделия. Пояснение и интерпретацию результатов проводят в соответствии с Б.2.1.

Б.2.4 Световая микроскопия

При помощи этой методики можно получить информацию о плотности клеток, клеточной агрегации, фибрине, отложившемся на материале, а также о месте расположения этих отложений на материалах или изделии. Метод является приблизительным.

Б.2.5 Перепад давления в изделии

Этот показатель измеряют до и после применения. Пояснение и интерпретацию результатов проводят в соответствии с Б.2.1.

Б.2.6 Сканирующая электронная микроскопия (СЭМ)

Пояснение и интерпретацию проводят в соответствии с Б.2.4. Этот метод имеет преимущество перед световой микроскопией (см. Б.2.4), так как дает более подробную информацию относительно тонкой структуры изучаемых компонентов. Выводы о количественных характеристиках требуют достаточного количества повторных определений, что позволило бы установить степень воспроизводимости результатов.

Б.2.7 Исследование трансплантированного изделия при аутопсии

Метод имеет важное значение для оценки биологической реакции организма на имплантированное изделие. Распределение, размер и микроскопическую природу клеточных отложений можно наилучшим образом

определить при патолого-анатомическом исследовании. Некоторые предлагаемые процедуры опубликованы [37], [38].

Б.2.8 Исследование дистальных органов при аутопсии

Цель исследования — изучение влияния имплантированных изделий на дистальные органы. Среди возможных эффектов — тромбоэмболия, инфекция и закупорка изделия.

Б.2.9 Ангиография

Метод используют для определения наличия просвета или степени сужения сосудистого протеза или другого канала, а также для определения тромбообразования на стенках изделия во время их функционирования in vivo.

Б.3 Коагуляция

Б.3.1 Частичное тромбопластиновое время (ЧТВ)

Частичное тромбопластиновое время [35] — это время образования сгустка в рекальцифицированной цитратной плазме при добавлении частичного тромбопластина. Частичный тромбопластин — фосфолипидная взвесь, которую обычно экстрагируют из тканевого тромбопластина, гомогената мозга или легкого млекопитающих. Сокращение ЧТВ, возникающее при контакте с материалами в условиях применения в медицинской практике, указывает на гиперкоагуляцию и рассматривают как фактор риска тромбозов. Удлинение ЧТВ предполагает дефицит каких-либо факторов свертывания крови (за исключением факторов VII и XIII): I (фибриноген), II (протромбин), V, VIII, IX, X, XI или XII.

Гепарин и другие антикоагулянты также удлиняют ЧТВ.

В продаже имеется набор реактивов для определения частичного тромбопластинового времени, в который входят различные активные вещества такие как коалин или целит. Тест-набор, в котором используют эти реактивы, называется «Тест активированного парциального (частичного) тромбопластинового времени» (АЧТВ). Тест не применим для оценки взаимодействия между кровью и изделием in vitro, поскольку активирующие вещества маскируют активацию, вызванную изделием или входящими в его состав материалами.

Б.3.2 Протромбиновое время (ПВ)

Кровь смешивают с необходимым количеством цитрата натрия, плазму получают центрифугированием [35]. Этот тест основан на том, что в тщательно измеренном объеме плазмы имеется оптимальная концентрация ионов кальция и избыток тромбопластина, а переменные величины — концентрация протромбина и дополнительные факторы. Не рекомендуется использовать оксалат в качестве антикоагулянта, поскольку фактор V менее стабилен в этом растворе, что приводит к увеличению протромбинового времени. Этот тест позволяет определять протромбин и дополнительные факторы. В присутствии тканевого тромбопластина время образования сгустка зависит от концентрации протромбина, факторов V, VII и X (при условии, что фибриноген, фибринолитическая и антикоагулирующая активность в норме). Увеличение протромбинового времени обычно указывает на дефицит протромбина или факторов V, VII, X или фибриногена.

Этот тест имеет значение только для оценки имплантируемых изделий.

Б.3.3 Тромбиновое время (ТВ)

Тромбиновое время [35] — время свертывания плазмы при добавлении раствора тромбина со стандартной активностью. Тромбиновое время удлиняется при дефиците фибриногена (ниже 100 мг/дл), при аномалиях в молекуле фибриногена и при повышении уровней продуктов деструкции фибриногена и фибрина (ПДФ) или гепарина. Обычно тест проводят для оценки имплантируемых изделий.

Б.3.4 Фибриноген

Дисфибриногенемия, афибриногенемия и гипофибриногенемия вызывают увеличение ЧТВ, ПВ и ТВ [18]. Скрининговый тест ТВ наиболее чувствителен к дефициту фибриногена. Если требуется точный показатель фибриногена, рекомендуется модифицированный тест ТВ «Рептилазовое время», тест-набор которого также имеется в продаже.

Тест имеет значение лишь для оценки имплантируемых изделий.

Б.3.5 Продукты деструкции фибриногена и фибрина (ПДФ)

В продаже имеется несколько наборов для иммунологического исследования продуктов деструкции фибриногена и фибрина [18]. Очищенные Д и Е фрагменты вводят лабораторным животным, у которых образуются специфические иммуноглобулины. Иммуноглобулины собирают, экстрагируют и очищают, чтобы получить специфическую антисыворотку в контролируемых концентрациях. Суспензию латекса покрывают анти-ПДФ-глобулином, чувствительным к ПДФ при концентрации 2 мкг/мл. При этом имеют в виду, что иммунологические исследования могут не иметь значения, когда используют кровь некоторых животных.

Нормальное растворение фибрина происходит с образованием X, Y, C, D и E фрагментов в концентрации менее 2 мкг/мл плазмы. Нормальный низкий уровень ПДФ достигается при низкой скорости реакции расщепления и высокой скорости выхода ПДФ в кровь. Патологическая деструкция фибриногена и фибрина, результат повышенной активности плазминогена, дает ПДФ в концентрации от 2 до 40 мкг/мл и более. Тест имеет значение лишь для оценки имплантируемых изделий.

Б.3.6 Исследование специфических факторов свертывания крови

Значительное снижение содержания факторов свертывания крови (например, менее 50 % нормального или контрольного уровня), возникающее в результате воздействия материала или изделия в условиях приме-

нения в медицинской практике, предполагает ускоренный расход этих факторов в процессе абсорбции, коагуляции или в процессе других механизмов.

Б.3.7 FPA, D-димер, F_{1+2}, TAT

Повышение уровня ФПА, D-димеров или F_{1+2} является показателем активности механизмов свертывания крови. Увеличение концентрации ТАТ указывает на усиление процесса свертывания крови и формирование комплекса между генерируемым тромбином и циркулирующим антитромбином.

Б.4 Тромбоциты и их функции

Б.4.1 Подсчет тромбоцитов

Подсчет тромбоцитов является очень важным из-за их ключевой роли в возможном кровотечении. Значительное снижение количества тромбоцитов в крови, подверженной воздействию изделия, может быть вызвано процессами объемной и поверхностной агрегации клеток, их депонированием (например, в селезенку) или коагуляцией крови на материалах или изделиях. Уменьшение количества тромбоцитов во время функционирования имплантируемого изделия может быть вызвано ускоренным разрушением или удалением тромбоцитов из системы кровообращения.

Б.4.1.1 *Подсчет тромбоцитов вручную*

В некоторых клинических лабораториях подсчет тромбоцитов проводят вручную, несмотря на доступность приборов для подсчета тромбоцитов, обладающих высокой точностью (Б.4.1.2).

Б.4.1.2 *Автоматизированный счет тромбоцитов в цельной крови и в тромбоцитарной плазме*

Автоматизированный подсчет тромбоцитов можно проводить либо в хорошо перемешанной цельной крови, либо в тромбоцитарной плазме. Использование цельной крови предпочтительнее, так как использование тромбоцитарной плазмы дает менее точные результаты. Автоматизированный подсчет тромбоцитов проводят на большем количестве клеток, чем при ручном счете. Следовательно, разброс для автоматизированного счета может составлять всего 4 %, в то время как наилучший достижимый показатель для ручного счета составляет 11 %. Большинство приборов обладает способностью отличать тромбоциты от мелких частиц небиологического происхождения, что исключает необходимость визуально распознавать и дифференцировать осколки тромбоцитов.

Б.4.2 Агрегация тромбоцитов

Агрегацию тромбоцитов [35] вызывает добавление к тромбоцитарной плазме при постоянном перемешивании агрегирующих агентов (например, АДФ, эпинефрин, коллаген, тромбин и др.). По мере того, как происходит агрегация тромбоцитов, плазма становится все светлее. Оптическую систему используют для определения изменения трансмиссии света, а регистрирующее устройство графически изображает изменение трансмиссии света, начиная с базовой установки (на «0»). Замедленная или слабая агрегация тромбоцитов может быть вызвана активацией тромбоцитов и высвобождением содержащихся гранул, увеличением показателя ПДФ или определенными лекарственными препаратами (например, аспирином, нестероидными противовоспалительными средствами). Важно иметь в виду, что у некоторых животных агрегация тромбоцитов может варьировать или отсутствовать, когда используют отдельные агенты. Спонтанная агрегация тромбоцитов, происходящая в отсутствие ее индукторов, является патологическим процессом, указывающим на активацию тромбоцитов.

Б.4.3 Адгезивность клеток крови

Адгезивность клеток крови [31] — один из показателей совместимости материала с кровью. Чем меньше адгезированных клеток крови, тем более совместимы поверхность материала и кровь.

Разработаны различные методы измерения адгезивности клеток на поверхности. Большинство этих методов основаны на следующем наблюдении: определенная часть тромбоцитов удаляется из нормальной цельной крови в результате прохождения через колонку со стеклянными шариками в условиях контролируемого потока и давления. Этот принцип был использован для качественной оценки адгезии других клеток крови на полимеры, которыми покрыты стеклянные шарики. Благодаря использованию этого метода, был сделан вывод [31], что адгезия периферических лимфоцитов и полиморфонуклеарных лейкоцитов (PMNs) собак на стеклянные шарики, покрытые полигидроксиэтилметакрилатом (PHEMA) ниже, чем на стеклянные шарики, покрытые полистиролом и некоторыми другими полимерами. В этом исследовании использовали изолированные лимфоциты и PMNs.

В качестве альтернативного метода можно предложить подсчет тромбоцитов, адгезированных на исследуемую поверхность. Вслед за воздействием крови в условиях применения в медицинской практике исследуемую поверхность промывают, чтобы удалить неадгезированные клетки, высушивают и готовят к световой или к сканирующей электронной микроскопии. Подсчитывают число адгезированных тромбоцитов на единицу площади и отмечают их морфологические особенности (общее число тромбоцитов и число агрегатов тромбоцитов). Можно также использовать тромбоциты, меченые изотопами хрома ^{51}Cr и индия ^{111}In.

Б.4.4 Стандартное время кровотечения

Благодаря доступности стерильных одноразовых приспособлений для осуществления надрезов кожи стандартной глубины и длины в стандартных условиях значительно повысилась воспроизводимость данного теста и его ценность. Увеличение времени кровотечения указывает на снижение функции тромбоцитов или уменьшение их числа в крови, последнее можно определить отдельно (Б.4.1). Увеличенное время кровотечения в сочетании с нормальным числом тромбоцитов наблюдалось при использовании некоторых изделий, контакти-

рующих извне и имеющих ограниченное воздействие (например, кардиопульмонарный шунт) [28]. Тест следует использовать с экспериментальными животными определенных видов.

Б.4.5 Гамма-излучение тромбоцитов, меченых радиоизотопами

Высокая эмиссия гамма-излучения, свойственная ^{111}In, позволяет использовать его для этой цели [20], [27]. Этот метод дает возможность определения локализации тромбоцитов на поверхности изделия и проведения их количественной оценки. Метод используют для оценки изделий, контактирующих извне так же хорошо, как и имплантируемые изделия.

Б.4.6 Период жизни тромбоцитов (выживание тромбоцитов)

Тромбоциты получают из крови пациентов и метят ^{51}Cr или ^{111}In [20], [21], [32]. Оба эти изотопа метят тромбоциты всех возрастов, присутствующие в образце, не вымываются в больших количествах из тромбоцитов, не захватываются другими клетками и не используются вновь во время тромбопоэза. ^{111}In обладают преимуществом, поскольку является хорошим источником гамма-излучения. При этом требуется меньшее число меченых тромбоцитов, и появляется возможность одновременного определения локализации тромбоцитов на поверхности и изучения их выживаемости. Снижение выживаемости тромбоцитов указывает на ускоренное удаление тромбоцитов из системы кровообращения в результате иммунного, тромбообразовательного и других процессов.

Б.4.7 PAC-1 и S-12

Это моноклональные антитела, распознающие различные эпитопы активированных тромбоцитов.

Б.5 Гематология

Б.5.1 Число лейкоцитов и дифференциальный подсчет лейкоцитов

Использование определенных изделий может вызвать лейкопению, лейкоцитоз либо агрегацию лейкоцитов; увеличение числа лейкоцитов может указывать на наличие бактериальной инфекции. Сдвиг лейкоцитарной формулы (например, увеличение числа гранулоцитов, лимфоцитов, моноцитов) может также предполагать инфекцию.

Б.5.2 Гемолиз

Гемолиз является наиболее важным скриннинг-тестом, потому что высокий уровень гемоглобина в плазме, являющегося показателем гемолиза, отражает реакцию лизиса эритроцитов при контакте с материалами и изделиями.

Б.5.3 Подсчет ретикулоцитов

Повышенное количество ретикулоцитов — показатель усиленного образования эритроцитов в костном мозге. Это может быть реакцией на уменьшение количества эритроцитов в крови в результате хронической кровопотери (скрытого кровотечения), гемолиза и ряда других причин.

Б.6 Иммунология

Б.6.1 C3a, C5a, TCC, Bb, C3b, C4d, SC5b-9

Повышение уровня любого из этих активных компонентов комплемента является показателем активации системы комплемента. Некоторые материалы активируют комплемент, и активные компоненты комплемента в свою очередь активируют лейкоциты, вызывая их агрегацию и депонирование в легких.

Б.6.2 ИЛ-1 и другие цитокинины

Повышенные уровни отдельных цитокининов наблюдаются при контакте с кровью и тканями отдельных материалов. Цитокинины играют важную роль в регулировании воспалительной реакции, контролируя рост фибропластов, клеток гладкой мускулатуры и клеток эндотелия.

ПРИЛОЖЕНИЕ В
(справочное)

Методы in vitro оценки гемолитического действия изделий

В.1 Определение степени гемолиза

В.1.1 Принцип метода

Метод основан на сравнении оптической плотности суспензии вытяжки с кровью с оптической плотностью крови при 100 % гемолизе.

Для исследования используют эритроцитарную массу или цитратную кровь человека или кролика. Для обеспечения статистической достоверности отбирают пять образцов крови.

В.1.2 Средства контроля

Реактивы:

- спирт этиловый 96 %-ный;
- физиологический раствор (0,85 %-ный водный раствор натрия хлорида);
- натрий лимонно-кислый 5,5-водный для приготовления 3,8 %-ного водного раствора натрия цитрата;
- натрия хлорид, ч.д.а. или х.ч.;
- вода дистиллированная.

Оборудование:

- центрифуга с частотой вращения 2000 об/мин;
- фотометр;
- пробирки химические объемом 1—5 мл;
- пипетки объемом 1—2 мл;
- шприцы объемом 1—5 мл;
- вата медицинская;
- штатив для пробирок;
- ножницы;
- термостат;
- холодильник.

В.1.3 Приготовление вытяжек

Вытяжки из изделий и материалов готовят в соответствии с ГОСТ Р 51148 и ГОСТ Р ИСО 10993.12.

В.1.4 Приготовление 10 %-ной взвеси эритроцитов

Для приготовления взвеси эритроцитов используют эритроцитарную массу или цитратную кровь, приготовленную на 3,8 %-ном растворе натрия цитрата в соотношении 1:9.

Примечание — Срок хранения цитратной крови (эритроцитарной массы) — 72 ч в холодильнике при температуре от плюс 4 до плюс 6 °С.

В.1.4.1 *Отмывание эритроцитов*

Цитратную кровь (эритроцитарную массу) в количестве 5 мл центрифугируют при частоте вращения 900 об/мин в течение 10 мин. Надосадочную жидкость отделяют. К осадку добавляют 8 мл физиологического раствора. Содержимое осторожно перемешивают и центрифугируют еще 10 мин. Надосадочную жидкость отделяют. Она должна быть прозрачной, бесцветной, не иметь следов гемолиза. Если надосадочная жидкость не отвечает указанным требованиям, то операцию по отмыванию осадка эритроцитов физиологическим раствором повторяют.

В.1.4.2 Для получения 10 %-ной взвеси эритроцитов 1 мл осадка клеток смешивают с 9 мл физиологического раствора.

Примечание — Полученную взвесь эритроцитов хранят не более 24 ч в холодильнике при температуре от плюс 4 до плюс 6 °С.

В.1.5 Приготовление опытной пробы

К вытяжке из изделия, приготовленной на дистиллированной воде, добавляют натрия хлорид из расчета 9 мл на 1 мл вытяжки. Если вытяжку готовили на физиологическом растворе, то хлорид натрия не добавляют.

В пробирки с 0,5 мл 10 %-ной взвеси эритроцитов всех образцов крови вносят по 5 мл вытяжки из изделия.

В.1.6 Приготовление контрольной пробы

0,5 мл 10 %-ной взвеси эритроцитов разводят в 5 мл физиологического раствора.

В.1.7 Приготовление пробы со 100 %-ным гемолизом

0,5 мл 10 %-ной взвеси эритроцитов разводят в 5 мл дистиллированной воды. При этом происходит полное разрушение эритроцитов, что соответствует 100 %-ному гемолизу.

Примечание — Контрольную и со 100 %-ным гемолизом пробы готовят для каждого образца эритроцитарной взвеси.

В.1.8 Проведение анализа

Пробирки с опытными, контрольной и со 100 %-ным гемолизом пробами помещают в термостат на 1 ч при температуре (37 ± 2) °С, после чего центрифугируют в течение 20 мин при частоте вращения 2000 об/мин.

Надосадочную жидкость отделяют для проведения измерения ее оптической плотности.

Оптическую плотность измеряют на фотометре в кювете с толщиной слоя 1 см при длине волны 540 нм. Измеряют оптическую плотность опытной пробы, оптическую плотность положительного контроля и оптическую плотность отрицательного контроля со 100 %-ным гемолизом.

Гемолиз $\alpha_г$, %, вычисляют по формуле

$$\alpha_г = \frac{E_{оп} - E_к}{E_{100}} \cdot 100, \qquad (В.1)$$

где $E_{оп}$ — оптическая плотность опытной пробы;

$E_к$ — оптическая плотность контрольной пробы;

E_{100} — оптическая плотность пробы со 100 %-ным гемолизом.

Если оптическая плотность контрольной пробы составляет 0,03 и более, результаты всего опыта считают недостоверными и не учитывают.

Оптическая плотность пробы со 100 %-ным гемолизом должна быть от 0,8 до 1,0. В случае отклонения от указанных пределов опыт следует повторить с вновь приготовленной эритроцитарной взвесью.

В.1.9 Оценка результатов

Если гемолиз во всех образцах крови менее 2 %, то исследуемая вытяжка свободна от гемолитически активных веществ, а изделие не обладает гемолитическим действием.

Если гемолиз хотя бы в одном из образцов крови 2 % и более, то опыт следует повторить. При повторном получении аналогичного результата вытяжку считают гемолитически активной, и дальнейшие исследования не проводят.

В.2 Время рекальцификации плазмы крови в присутствии исследуемого образца

В.2.1 Принцип метода

Метод основан на определении времени свертывания рекальцифицированной плазмы крови кролика или человека после ее непосредственного контакта с поверхностью исследуемых материалов. Время рекальцификации, определяемое этим методом, отражает активацию внутренней системы коагуляции, обусловленную контактом крови с поверхностью материала и возможной экстракцией веществ кровью из объема материала.

В.2.2 Средства контроля

Реактивы:

- 3,8 %-ный водный раствор натрия цитрата;
- раствор хлористого кальция концентрации 0,025 моль/л;
- 0,85 %-ный раствор натрия хлорида;
- спирт этиловый 96 %-ный.

Оборудование — гемокоагулометр.

В.2.3 Проведение анализа

Очищенные и тщательно отмытые в физиологическом растворе образцы материала и контрольный образец (обычно предметное стекло или стеклянные шарики) инкубируют в пластиковых пробирках с цитратной, 1:9 (декальцифицированной) плазмой крови кролика или человека в течение 5 мин при 37 °С. Исследуемый материал берут из расчета 120 см² или 4 г на 1 мл плазмы крови. Затем пробы по 50—100 мкл плазмы переносят в реакционные кюветы, добавляют равные объемы раствора хлористого кальция, перемешивают и на коагулометре измеряют время свертывания при непрерывном перемешивании.

Количественной характеристикой метода является относительное время рекальцификации (*OBP*), которое вычисляют по формуле

$$OBP = \frac{t_{и.о}}{t_{к.о}}, \qquad (В.2)$$

где $t_{и.о}$ — время свертывания плазмы крови в присутствии исследуемого образца, с;

$t_{к.о}$ — время свертывания плазмы крови в присутствии контрольного образца, с.

В.3 Определение гемолиза при непосредственном контакте материала с кровью

В.3.1 Принцип метода

Метод основан на изучении влияния материала на лизис эритроцитов при контакте с кровью.

В.3.2 Средства контроля

Реактивы:

- 3,8 %-ный раствор натрия цитрата;
- 0,85 %-ный раствор натрия хлорида.

Оборудование:
- суховоздушный термостат;
- центрифуга рефрижераторная;
- спектрофотометр или фотоэлектроколориметр.

В.3.3 Проведение анализа

Общая площадь плоских образцов составляет 90 и 120 $см^2$ на тест при толщине св. 0,5 и до 0,5 мм соответственно. Для образцов, площадь которых трудно определить (порошки, гранулы, пористые материалы), берут 6 г материала на тест. Очищенные и тщательно отмытые в физиологическом растворе образцы материала инкубируют в бюксах с 10 мл физиологического раствора при температуре 37 °С в течение 30 мин. Затем в каждый бюкс добавляют по 200 мкл цитратной крови (9:1) кролика или человека, перемешивают и вновь инкубируют в термостате при температуре 37 °С в течение 4 ч. После инкубации проводят отбор проб из бюксов в центрифужные пробирки.

Пробирки помещают в центрифугу для осаждения крови при ускорении 400 g в течение 15 мин. На спектрофотометре или фотоэлектроколориметре измеряют оптическую плотность супернатанта в диапазоне длин волн 530—550 нм.

За количественный критерий метода принимают гемолиз $\alpha_г$, который вычисляют по формуле

$$\alpha_г = \frac{E_х - E_к}{E_{100} - E_к} \cdot 100, \qquad (В.3)$$

где $E_х$ — оптическая плотность пробы, инкубируемой с исследуемым материалом;
$E_к$ — оптическая плотность контрольной пробы (положительный контроль);
E_{100} — оптическая плотность пробы после 100 % гемолиза (отрицательный контроль).

В.4 Количество и морфология адгезированных тромбоцитов на поверхности материала

Активация тромбоцитов является одной из определяющих стадий взаимодействия чужеродной поверхности с кровью. К основным характеристикам гемосовместимости материалов и изделий на клеточном уровне относятся количество и степень морфологических изменений адгезированных тромбоцитов в условиях in vitro, определяемые двумя методами. Рекомендуемыми являются методы: радиоизотопный и сканирующая электронная микроскопия.

В.4.1 Радиоизотопный метод измерения количества адгезированных тромбоцитов

В.4.1.1 *Принцип метода*

Метод заключается в регистрации количества адгезированных на поверхности материалов клеток после инкубации исследуемых образцов с мечеными радиоактивной меткой тромбоцитами крови человека или кролика.

В.4.1.2 *Средства контроля*

Реактивы:
- 3,8 %-ный раствор натрия цитрата;
- спирт этиловый 96 %-ный;
- радиоактивный ^{51}Cr (в виде хроматов и бихроматов);
- 0,85 %-ный раствор натрия хлорида.

Оборудование:
- центрифуга рефрижераторная;
- гамма-счетчик;
- термостат;
- специальные камеры из полиметилметакрилат;
- бокс с ламинарным потоком обеспыленного воздуха;
- встряхивающее устройство;
- микроскоп.

В.4.1.3 *Проведение анализа*

Цитратную кровь (1:9) центрифугируют при ускорении 400 g в течение 15 мин. Плазму, обогащенную тромбоцитами, отделяют, проводят мечение радиоактивным ^{51}Cr из расчета $7,4 \cdot 10^6$ Бк на 1 мл и помещают в термостат при температуре 37 °С на 60 мин при постоянном встряхивании. Оставшуюся кровь центрифугируют при том же режиме 30 мин для получения бестромбоцитарной плазмы. После инкубации меченые тромбоциты доводят до объема 6 мл бестромбоцитарной плазмой. Удельная активность полученной меченой тромбоцитарной плазмы составляет 150—200 имп/(мин · мкл) при концентрации тромбоцитов $(6—7) \cdot 10^5$ $мкл^{-1}$. Инкубацию в меченой тромбоцитарной плазме очищенных и тщательно отмытых в физиологическом растворе исследуемых и контрольных образцов проводят в камере из полиметилметакрилата, позволяющей без контакта инкубационной среды и поверхности материала с воздухом одновременно испытывать в идентичных условиях 10 образцов в объеме инкубационной среды. Рабочая часть камеры представляет собой пять цилиндрических полостей (диаметр основания 18 мм), соединенных последовательно между собой короткими ци-

линдрическими каналами (диаметр 3 мм). Образцы помещают в основание полостей камеры в боксе с ламинарным потоком обеспыленного воздуха. Камеру с исследуемыми и контрольными образцами в виде дисков диаметром 18 мм (по пять каждого образца) заполняют физиологическим раствором, а затем на вытеснение — меченой тромбоцитарной массой.

Оптимальное время инкубации — 60 мин при температуре 37 °С и постоянном встряхивании. После трехкратной промывки образцов в физиологическом растворе измеряют их активность, используя гамма-счетчик.

Из-за хорошей воспроизводимости результатов контролем служат стеклянные диски из предметного стекла. В ряде случаев в качестве контроля используют близкий к тестируемому образцу по составу и специфике применения материал с известными медико-биологическими свойствами.

Количественной характеристикой метода является относительный показатель адгезии тромбоцитов *ОПАТ*, который вычисляют по формуле

$$ОПАТ = N_{обр} / N_к, \qquad (В.4)$$

где $N_{обр}$, $N_к$ — активность исследуемого и контрольного образцов за одинаковое время, пропорциональная количеству тромбоцитов, адгезированных к соответствующим поверхностям.

В.4.2 Метод сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) для определения количества и степени активации адгезированных тромбоцитов

В.4.2.1 *Принцип метода*

Адгезия тромбоцитов на поверхность материала сопровождается значительными морфологическими изменениями клеток, степень выраженности которых пропорциональна степени активации тромбоцитов. Чем сильнее воздействует материал на клетки, тем интенсивнее протекают процессы образования псевдоподий, распластывания по поверхности и, наконец, формирования на поверхности агрегатов.

Адгезированные тромбоциты разделяют на три класса:

- одиночные клетки с псевдоподиями и без них;
- полностью распластанные по поверхности тромбоциты;
- клеточные агрегаты.

Основными параметрами для характеристики процесса взаимодействия тромбоцитов с поверхностью, регистрируемой методом СЭМ, служат:

- количество тромбоцитов, адгезированных на поверхность исследуемого материала (относительно контрольного материала);
- количество клеток каждого из указанных выше классов (относительно контрольного материала);
- морфология одиночных клеток.

В.4.2.2 *Средства контроля*

Реактивы:

- спирт этиловый (50, 70, 80, 90 и 100 %-ный);
- 0,85 %-ный раствор натрия хлорида;
- 2,5 %-ный раствор глютарового альдегида;
- 3,8 %-ный раствор натрия цитрата.

Оборудование:

- сканирующий электронный микроскоп;
- аппарат для ионного напыления;
- установка количественного анализа изображения или персональный компьютер с программой морфологического анализа.

В.4.2.3 *Проведение анализа*

Цельную кровь здорового донора отбирают в силиконизированные пробирки, содержащие цитрат натрия, в соотношении кровь/антикоагулянт 9:1. Затем кровь центрифугируют при ускорении 100 g в течение 20 мин для получения обогащенной тромбоцитами плазмы.

Образцы приводят в контакт с тромбоцитарной плазмой и инкубируют при комнатной температуре в течение 10—30 мин. Время инкубации подбирают для исследуемого ряда образцов в отдельном эксперименте так, чтобы количество адгезированных клеток было достаточным для количественного анализа. После этого образцы промывают в физиологическом растворе для удаления излишков тромбоцитарной плазмы. Образцы фиксируют 1 ч в 2,5 %-ном растворе глутарового альдегида и проводят дегидратацию в растворах спирта с возрастающими концентрациями 50, 70, 80, 90 и 100 %, с последующей сушкой на воздухе.

Просмотр образцов после напыления на их поверхность слоя меди или золота толщиной ~50 нм проводят на СЭМ при мощности 5 кВт и рабочих увеличениях 2000—7500.

Количественной характеристикой адгезии тромбоцитов является относительный показатель адгезии тромбоцитов, который вычисляют по формуле (В.4), где $N_{обр}$ и $N_{контр}$ — количество адгезированных клеток на образце и контроле соответственно, подсчитанное на 25 микрополях, произвольно выбранных на разных

участках образца. Контролем служит близкий по составу и специфике применения материал с известными медико-биологическими свойствами.

По аналогии, относительное количество клеток в каждом из классов парциальные значения *ОПАТ* вычисляют по формуле

$$ОПАТ_i = G_{обр_i} / G_{контр_i}, \quad (В.5)$$

где $G_{обр_i}$ и $G_{контр_i}$ — количество клеток i-го класса (i = 1, 2, 3...) на образце и контроле соответственно.

Даже при одинаковом количестве тромбоцитов на образцах парциальные $ОПАТ_i$ позволяют получать дополнительную информацию об активации тромбоцитов и тромбогенных свойствах материалов.

Количественной характеристикой «распластывания» клеток является фактор формы F, который вычисляют по формуле

$$F = 4\pi S / P^2, \quad (В.6)$$

где S — средняя площадь клеток, см^2;

P — средний периметр клеток, см.

Клетки находятся на 5—7 случайно выбранных микрополях объекта.

Фактор формы должен быть: $0 < F < 1$.

Чем ближе значение фактора формы к единице, тем меньше степень морфологических изменений адгезированных клеток.

В.5 Гемолитический метод определения степени активации комплемента поверхностью материала

В.5.1 Принцип метода

Взаимодействие чужеродной поверхности с кровью приводит к быстрой активации всех систем гемостаза (свертывающей, фибринолитической, кининовой) и исследование степени активации комплемента, являющегося системой гуморального иммунного ответа, представляется важным для прогнозирования гемосовместимости материалов и изделий. Предлагаемый метод регистрирует изменение суммарной активности системы комплемента после контакта сыворотки крови человека с исследуемым образцом.

В.5.2 Средства контроля

Реактивы:

- эритроциты барана;
- сыворотка крови человека;
- гемолитическая сыворотка кролика;
- гепарин;
- веронал-мединаловый буфер. Приготовление маточного раствора буфера: 5,76 г веронала растворяют в 500 мл дистиллированной воды, охлаждают, добавляют 85 г NaCl, 3,75 г мединала, 0,22 г $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ и 1,0 г $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, доводят до 2 л дистиллированной водой. Раствор хранят в холодильнике. Рабочий раствор готовят непосредственно перед употреблением, доводя 100 мл маточного раствора до 500 мл дистиллированной водой.

Оборудование:

- центрифуга рефрижераторная;
- установка кинетического титрования комплемента;
- специальные кюветы для инкубации.

В.5.3 Проведение анализа

Первоначально готовят суспензию трижды отмытых эритроцитов барана в веронал-мединаловом буфере (центрифугированием при ускорении 400 g в течение 15 мин) с концентрацией по шкале плотности ФЭК, равной 0,5 буфера.

Для сенсибилизации эритроцитов в суспензию добавляют гемолитическую сыворотку кролика, растворенную в веронал-мединаловом буфере до титра 1:2400, из расчета 0,3 мл на 55 мл суспензии эритроцитов, и выдерживают перед началом эксперимента в течение 30 мин при температуре 37 °С, периодически перемешивая. Затем готовят эталон сравнения по светопропусканию, соответствующий 50 %-ному лизису эритроцитов, путем смешивания 2,5 мл суспензии сенсибилизированных эритроцитов с 2,5 мл лизата эритроцитов.

Оптическую плотность эталона сравнения измеряют на ФЭК при длине волны 540 нм, и полученное значение фиксируют на все время эксперимента диафрагмой на левом барабане ФЭК.

Инкубацию предварительно очищенных и отмытых образцов исследуемого материала в виде пленок (удельной площадью 20 см^2) или гранул (массой 5 г) с разбавленной веронал-мединаловым буфером сывороткой крови человека проводят в специальных кюветах объемом 1 мл без доступа воздуха.

Активность комплемента определяют добавлением 100 мкл исследуемой разбавленной сыворотки к 5 мл суспензии сенсибилизированных эритроцитов. Для обеспечения постоянной температуры (37 °С) и кинетического режима реакции применяют термостатические ячейки с мешалкой.

Количественными критериями метода являются:

- константа скорости индуцированной активации системы комплемента $k_{инд}$, $см^{-2} \cdot с^{-1}$, которую вычисляют по формуле

$$k^{1}_{инд} = \ln\left(\tau^{обр}_{1/2} / \tau^{с}_{1/2}\right) / St, \qquad (В.7)$$

где $\tau^{обр}_{1/2}$, $\tau^{с}_{1/2}$ — время полулизиса эритроцитов барана комплементом сыворотки после инкубации с образцом и в контрольной кювете (без образца) соответственно, с,

S — площадь поверхности образца полимера, $см^2$,

t — время инкубации, с;

- относительная (по купрофану) константа скорости индуцированной активации системы комплемента $k^{отн}_{инд}$, которую вычисляют по формуле

$$k^{отн}_{инд} = k^{обр}_{инд} / k^{купр}_{инд}, \qquad (В.8)$$

где $k^{обр}_{инд}$, $k^{купр}_{инд}$ — константы скорости индуцированной активации системы комплемента образца и стандарта соответственно.

В качестве контроля можно также использовать любой материал медицинского назначения с известными медико-биологическими свойствами.

ПРИЛОЖЕНИЕ Г
(справочное)

Библиография

Г.1 Международные стандарты

[1] ISO 5840:1989, Cardiovascular implants — Cardiac Valve prostheses

[2] ISO 5841-1:1989, Cardiac pacemakers — Part 1: Implantable pacemakers

[3] ISO 5841-3:1992, Cardiac pacemakers — Part 3: Low-profile connectors (IS-1) for implantable pacemakers

[4] ISO 7198-1*, Cardiovascular implants — Tubular vascular prostheses — Part 1: Synthetic vascular protheses

[5] ISO 7198-2*, Cardiovascular implants — Tubular vascular prostheses — Part 2: Sterile vascular prostheses of biological origin — Specification and methods of test

[6] ISO 7199*, Cardiovascular implants and artificial organs — Blood-gas exchangers

[7] 10993-12*, Biological evaluation of medical devices — Part 12: Sample preparation and refrence materials

Г.2 Национальные стандарты

[8] ANSI/AAMI CVP3—1981, Cardiac valve prostheses

[9] ANSI/AAMI VP20—1986, Vascular graft prostheses

[10] ASTM F 756—87, Standard practice for assessment of hemolytic properties of materials

[11] BS 5736—11:1990, Evaluation of medical devices for biological hazards — Part 11: Method of test for haemolysis

[12] DIN 58 361-4:1980, Transfusionsbehaltnisse und Zubehor, Blutbeutel aus Kunststoffen, Sicherheitstechnische Anforderungen, Prufung, Uberwachung und Kennzeichnung

[13] NF 90-300:1981, Materiel medico-chirurgical — Oxygenateurs

Г.3 Научные статьи

[14] Bosch, T., Schmidt, B., Blumenstein, M. and Gurland, H. J., Thrombogenicity markers in clinical and ex vivo assessment of membrane biocompatibility. Cont Nephrol, 59: 90—98, 1987

[15] Chenoweth, D. E., Complement activation produced by biomaterials. Trans Am Soc Artif Int Organs 32: 226—232, 1986

[16] Burns, G. L., Pantalos, G. M. and Olsen, D. B., The calf as a model for thromboemboloc events with the total artificial heart. Trans Am Soc Artif Int Organs 33: 398—403, 1987

* Будут опубликованы

[17] Cooper, S. R., Fabrizius, D. J. and Grasel, T. G., Methods of assessment of thrombosis ex vivo. In: Leonard E. F., Turitto V. T., and Vroman L. (Eds): Blood in contact with natural and artificial surfaces. Ann N. Y. Acad Sciences 516: 572—585, 1987

[18] Corriveau, D. M. and Fritsma, G. A. (Eds): Haemostasis and thrombosis in the clinical laboratory. J. B.Lippincott, Philadelphia, 1988, 443 pp

[19] Dawids, S et al. (eds): Test procedures for the blood compatibility of biomaterials. In preparation, 1992

[20] Dewanjee, M. K., Methods of assessment of thrombosis in vivo, In: Leonard E. F., Turitto V. T. and Vroman L. (Eds): Blood in contact with natural and artificial surfaces. Ann N. Y. Acad Sciences, 516: 541—571, 1987

[21] Dewanjee, M. K., Kapadvanjwala, M. and Sanchez, A. Quantiation of comparative thrombogenicity of dog, pig, and human platelets in a hemodialyzer. Am Soc Artif Int Organs Journal 38: 88—90, 1992

[22] Didisheim, P., Dewanjee, M. K., Frisk, C. S., Kaye, M. P. and Fass, D. N.. Animal models for predicting clinical perfomance of biomaterials for cardiovascular use. In: Boretos J. W. and Eden M. (Eds): Contemporary Biomaterials, Noyes Publications, Park Ridge, NJ, USA, pp. 132—179, 1984

[23] Didisheim, P., Dewanjee, M. K., Kaye, M. P., Frisk, C. S., Fass, D. N., Tirrell, M. V. and Zollman, P. E., Nonpredictability of long-term in vivo response from short-term in vitro or ex vivo blood/material interactions. Trams Am Soc Artif Int Organs 30: 370—376, 1984

[24] Didisheim, P., Olsen, D. B., Farrar, D. J., Portner, P. M., Griffith, B. P., Pennington, D. G., Joist, J. H., Schoen, Gristina, A. G. and Anderson, J. M., Infections and thromboembolism with implantable cardiovascular devices. Trans Am Soc Artif Int Organs 35: 54—70, 1989

[25] Didisheim, P., Stropp, J. Q., Borowick, J. H. and Grabowski, E. F., Species differences in platatet adhesion to materials: investigation by a two-stage technique, Trans Am Artif Int Organs 2: 124—132, 1979

[26] Guidelines for blood/material interactions. Report of the National Heart, Lung and Blood Institute Working Group, U. S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health. NIH Publication No. 85—2185, revised September 1985. Available from Biomaterials Program, Devices and Technology Branch, Division of Heart and Vascular Diseases, NHLBI, 312 Federal Building, 7550 Wisconsin Avenue, Bethesda, MD 20892, USA; phone 301—496—1586, FAX 301—480—6282

[27] Harker, L. A., Kelly, A. B. and Hanson, S. R., Experimantal arterial thrombosis in nonhuman primates. Circulation 83. Supplement IV, 41—55, 1991

[28] Harker, L. A., Malpass, T. W., Branson, H. E., Hessel, E. A. and Slichter, S. J., Mechanism of abnormal bleeding in patients undergoing cardiopulmonary bypass: Acquired transient platelet dysfunction associated with selective alpha granule release. Blood 56: 824—834, 1980

[29] Harker L. A., Ratner B. D. and Didisheim P. (Eds): Cardiovascular Biomaterials and Biocompatibility. Supplement to Cardiovascular Pathology. Elsevier, New York, in press 1992

[30] Karwath, R., Schurer, M. and Wolf, H., Measurement of platelet adhesiveness onto artifial surfaces using Cr-51 and In-111 labelledplatelets. Studia Biophysica 131: 117—123, 1989

[31] Kataoka, K., Maeda, M., Nishimura, T., Nitadori, Y., Tsuruta, T., Akaike T. and Sakurai, Estimation of cell adhesion on polymer surfaces with the use of «columm method». J Biomed Mat Res 14: 817—823, 1980

[32] Kay, L. A. Essentials of Haemostasis and Thrombosis. Churchill Livingstone, Edinburgh, 1988, 290 pp

[33] Lewis, J. P., Sweeney, J., Baldini, L., Friedland, G. H. and Salzman, E. W., Assessment of thromboresistance of intravenous cannulae by 125 I-fibrinogen scanning. J. Biomed Mat Res 19:99, 1985

[34] Mahiout, A., Meinhold, H., Jorres, A., Krieg, R., Kessel, M., Tretzel, J. and Bauermeister, U., Ex vivo model for preclinical evaluation of dialyzers containing new membranes. Life Support Systems 3: suppl 1, 448—452, 1985

[35] Miale, J. B., Laboratory medicine hematology. Sixth edition, CV Mosby, St. Louis, 1982

[36] Palatianos, G. M., Dewanjtt, M. K. and Robinson, R. P. et al, Quantitaion of platelet loss with Indium-111 labelled platelets in a hollow-fiber membrane oxygenator and arterial filter during extracorporeal circulation in a pig model. Trans Am Soc Artif Int Organs 35: 667—670, 1989

[37] Schoen, F. J., Anderson, J. M., Didisheim, P., Dobbins, J. J., Gristina, A. G., Harasaki, H. and Simmons, R. L., Ventricular assist device (VAD) pathology analyses: guidelines for clinical studies. J. Applied Materials 1: 49—56, 1990

[38] Schoen, F. G., Interventional and surgical cardiovascular pathology. Appendix: Pathologic analysis of the cardiovascular system and prosthetic devices, pp 369—396. W. B. Saunders Co., Philadelphia, 1989. [39] Spencer, P. C., Schmodt, B., Sambtleben, W., Bosch, T. and Gurland, H. J >, Ex vivo model of hemodialysis mmbrane biocompatibility. Trans Am Soc Artif Int Organs 31: 495—498, 1985

[40] Tripartite Biocompatibility Guidance for MedicalDevices.Prepared by toxicology sub-group of the Tripartite Subcommittee on medical devices, September 1986

[41] Ward, R. A., Schmidt, B., Blumenstein, M. and Gurland, H. J., Evaluation of phagocytic cell function in an ex vivo model of hemodialysis. Kidney International 37: 776—782, 1990

[42] White, R. A., Diagnosis and therapy of emergent vascular diseases. In: Shoemaker, W. C., Ayres, S., Holbrook, P. R. and Thompson, W. L., Textbook of critical care, second edition. W.B. Saunders, Philadelphia, 1989, pp. 447—452

[43] Zingg, W., Ip, W. F., Sefton, M. V. and Mancer, K., A chronic arteriovenous shunt for testing of biomaterials and devices in dogs. Life support Systems 4: 221—229, 1986

[44] WHO/LAB/88.3, Recommened methods for the visual determination of white cell and platelet count, S. M. Lewis, R. M. Rowan and F. Kubota, J. Clin. Pathol. 43: 1990 932—936

[45] Сборник руководящих методических материалов по токсиколого-гигиеническим исследованиям полимерных материалов и изделий на их основе медицинского назначения. Москва, 1987

[46] Севастьянов В. И., Беломестная З. М., Дубович Т. И., Петров М. В. О предварительной оценке тромборезистентности полимерных материалов. Высокомолекул. соединения, 23 А, 1864—1867, 1981

[47] V. I. Sevastianov, Z. M. Belomestnaya, N. K. Zimin. In vitro assessment of the hemocompatible properties of polymers. Artif. Organs, 7, 126—133, 1983

[48] V. I. Sevastianov, E. A. Tseytlina. The activation of the complement system by polymer materials and their blood compatibility. J. Biomed. Mater. Res., 18, 969—978, 1984

[49] Сборник методических рекомендаций по оценке биосовместимых свойств искусственных материалов, контактирующих с кровью. Под ред. Добровой Н. Б., Носковой Т. И., Новиковой С. П., Севастьянова В. И., М., «ВНИТИПРИБОР», 1990

[50] Биосовместимость. Под ред. Севастьянова В. И. М., «ИЦ ВНИИГС», 1999, 367 с

УДК 615.46:002:006.354 ОКС 11.020 Р20 ОКСТУ 9403

Ключевые слова: имплантаты, биологические исследования, кровь, взаимодействие, деструкция, изделия, контактирующие извне

Редактор *В. П. Огурцов*
Технический редактор *Л. А. Кузнецова*
Корректор *Е. Ю. Митрофанова*
Компьютерная верстка *А. П. Финогеновой*

Изд. лиц. № 02354 от 14.07.2000. Сдано в набор 13.07.2000. Подписано в печать 14.09.2000. Усл. печ. л. 3,26. Уч.-изд. л. 3,20. Тираж 172 экз. С 5855. Зак. 1839.

ИПК Издательство стандартов, 107076, Москва, Колодезный пер., 14.
Набрано в Калужской типографии стандартов на ПЭВМ.
Калужская типография стандартов, 248021, Калуга, ул. Московская, 256.
ПЛР № 040138

gost.e-ecolog.ru