ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО

ПО ТЕХНИЧЕСКОМУ РЕГУЛИРОВАНИЮ И МЕТРОЛОГИИ

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ГОСТ Р ИСО 10993-4— 2009

ИЗДЕЛИЯ МЕДИЦИНСКИЕ

ОЦЕНКА БИОЛОГИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ МЕДИЦИНСКИХ ИЗДЕЛИЙ

Часть 4

Исследования изделий, взаимодействующих с кровью

ISO 10993-4:2002
Biological evaluation of medical devices — Part 4: Selection of tests for interactions with blood
(IDT)

Издание официальное

БЗ 5—2009/183

Москва
Стандартинформ
2010

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

Цели и принципы стандартизации в Российской Федерации установлены Федеральным законом от 27 декабря 2002 г. № 184-ФЗ «О техническом регулировании», а правила применения национальных стандартов Российской Федерации — ГОСТ Р 1.0—2004 «Стандартизация в Российской Федерации. Основные положения»

Сведения о стандарте

1 ПОДГОТОВЛЕН Автономной некоммерческой организацией «Институт медико-биологических исследований и технологий» (АНО «ИМБИИТ»)

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

3 УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 2 декабря 2009 г. № 537-ст

4 Настоящий стандарт идентичен международному стандарту ИСО 10993-4:2002 «Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 4. Исследования изделий, взаимодействующих с кровью» (ISO 10993-4:2002 «Biological evaluation of medical devices — Part 4: Selection of tests for interactions with blood»).

При применении настоящего стандарта рекомендуется использовать вместо ссылочных международных стандартов соответствующие им национальные стандарты Российской Федерации, сведения о которых приведены в дополнительном приложении D

5 ВЗАМЕН ГОСТ Р ИСО 10993.4—99

Информация об изменениях к настоящему стандарту публикуется в ежегодно издаваемом информационном указателе «Национальные стандарты», а текст изменений и поправок — в ежемесячно издаваемых информационных указателях «Национальные стандарты». В случае пересмотра (замены) или отмены настоящего стандарта соответствующее уведомление будет опубликовано в ежемесячно издаваемом информационном указателе «Национальные стандарты». Соответствующая информация, уведомление и тексты размещаются также в информационной системе общего пользования — на официальном сайте Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии в сети Интернет

© Стандартинформ, 2010

Настоящий стандарт не может быть полностью или частично воспроизведен, тиражирован и распространен в качестве официального издания без разрешения Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии

Содержание

1 Область применения . . . 1
2 Нормативные ссылки . . . 1
3 Термины и определения . . . 1
4 Сокращения . . . 2
5 Изделия, контактирующие с кровью (по классификации ИСО 10993-1) . . . 3
5.1 Изделия, не контактирующие с организмом человека . . . 3
5.2 Изделия, присоединяемые извне . . . 3
5.3 Имплантируемые изделия . . . 3
6 Методы . . . 3
6.1 Общие рекомендации . . . 3
6.2 Методы исследования . . . 7
6.3 Типы тестов . . . 9
Приложение А (справочное) Доклинические исследования изделий и протезов для сердечно-сосудистой системы . . . 10
Приложение В (справочное) Лабораторные методы: принципы, научное обоснование и интерпретация . . . 13
Приложение С (справочное) Исследование гемолитических свойств медицинских изделий и их компонентов . . . 18
Приложение D (справочное) Сведения о соответствии национальных стандартов Российской Федерации ссылочным международным стандартам . . . 23
Библиография . . . 24

Введение

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

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

Стандарты серии ИСО 10993 являются руководящими документами для прогнозирования и исследования биологического действия медицинских изделий на стадии выбора материалов, предназначенных для их изготовления, а также для исследований готовых изделий.

В серию ИСО 10993 входят следующие части под общим названием «Оценка биологического действия медицинских изделий»:

Часть 1 — Оценка и исследования;

Часть 2 — Требования к обращению с животными;

Часть 3 — Исследования генотоксичности, канцерогенности и токсического действия на репродуктивную функцию;

Часть 4 — Исследования изделий, взаимодействующих с кровью;

Часть 5 — Исследование на цитотоксичность: методы *in vitro*;

Часть 6 — Исследования местного действия после имплантации;

Часть 7 — Остаточное содержание этиленоксида после стерилизации;

Часть 9 — Основные принципы идентификации и количественного определения потенциальных продуктов деградации;

Часть 10 — Исследование раздражающего и сенсибилизирующего действия;

Часть 11 — Исследование общетоксического действия;

Часть 12 — Приготовление проб и стандартные образцы;

Часть 13 — Идентификация и количественное определение продуктов деградации полимерных медицинских изделий;

Часть 14 — Идентификация и количественное определение продуктов деградации изделий из керамики;

Часть 15 — Идентификация и количественное определение продуктов деградации изделий из металлов и сплавов;

Часть 16 — Моделирование и исследование токсикокинетики продуктов деградации и вымывания;

Часть 17 — Установление пороговых значений для вымываемых веществ;

Часть 18 — Исследование химических свойств материалов;

Часть 19 — Исследование физико-химических, морфологических и топографических свойств материалов;

Часть 20 — Принципы и методы исследования иммунотоксического действия медицинских изделий.

Настоящий стандарт устанавливает требования к выбору и разработке методов исследования медицинских изделий, взаимодействующих с кровью, в зависимости от конструкции изделия, применяемых материалов, клинической пользы, места применения и приемлемости риска.

Этот уровень специфичности может быть охвачен только в стандартах на конкретное медицинское изделие.

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ИЗДЕЛИЯ МЕДИЦИНСКИЕ
ОЦЕНКА БИОЛОГИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ МЕДИЦИНСКИХ ИЗДЕЛИЙ

Часть 4

Исследования изделий, взаимодействующих с кровью

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

Дата введения — 2010—09—01

1 Область применения

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

Настоящий стандарт устанавливает:

a) классификацию медицинских и стоматологических изделий, предназначенных для использования в контакте с кровью, основанную на области применения и длительности контакта в соответствии с ИСО 10993-1.

b) фундаментальные принципы, лежащие в основе оценки взаимодействия изделий с кровью;

c) пояснения к системному выбору методов исследования, а также принципы и научную основу этих методов.

Детальные требования не могут быть определены из-за ограниченности знаний и точности методов исследований. Настоящий стандарт описывает биологическую оценку в общих чертах и может быть не полным для специфических медицинских изделий.

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы нормативные ссылки на следующие стандарты:

ИСО 10993-1:1997 Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 1. Оценка и исследования

ИСО 10993-2:1992 Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 2. Требования к обращению с животными

3 Термины и определения

В настоящем стандарте применены термины по ИСО 10993-1, а также следующие термины с соответствующими определениями:

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.

Примечание — Эти изменения могут приводить или не приводить к клинически значимым или нежелательным последствиям. В приложении А приведена дополнительная информация по этим взаимодействиям.

3.2 ***ex vivo*:** Термин, относящийся к тест-системам взятия крови непосредственно от человека или подопытного животного в камеру для исследований, расположенную вне тела.

Примечание — В модели с использованием животных кровь может быть сразу же введена обратно животному (рециркуляция) или собрана в пробирки для дальнейшего ее исследования (один путь).

Издание официальное

3.3 **тромбоз:** *In vivo* феномен, приводящий к частичной или полной закупорке (окклюзии) тромбом просвета сосуда или аппарата.

Примечание 1 — Охарактеризование тромбоза включает *ex vivo* и *in vivo* методы на экспериментальных животных или в клинических условиях.

Примечание 2 — Тромб состоит из смеси красных кровяных клеток, агрегатов тромбоцитов, фибрина и других форменных элементов.

3.4 **коагуляция:** Феномен, вытекающий из активации каскада факторов свертывания.

Примечание — Факторы каскада коагуляции и фибринолитической системы могут быть измерены вслед за контактом с изделием как *in vitro*, так и *in vivo*.

3.5 **тромбоцит:** Безъядерное клеточное тело, присутствующее в циркулирующей крови, способное адгезировать к поверхности и агрегировать, формируя кровоостанавливающую пробку.

Примечание — Исследование тромбоцитов включает в себя подсчет их числа с анализом их структуры и функций. Тестирование может заключаться в анализе тромбоцитарных факторов или компонентов поверхности клеток, выделяемых тромбоцитами или адгезированных к поверхности изделия.

3.6 **гематология:** Исследование крови, состоящее в подсчете клеточных элементов и количественном определении компонентов плазмы.

3.7 **система комплемента:** Часть естественной иммунной системы, состоящая из нескольких белков плазмы, включая ферменты и клеточные рецепторы.

Примечание — Активные молекулы, получаемые из компонентов комплемента, вовлекаются в развитие воспалительных процессов, фагоцитоз и лизис клеток.

4 Сокращения

В настоящем стандарте применены следующие сокращения:

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;

CD62L — L-селектин;

CH-50 — 50 % общего гемолитического комплемента (гемолиза);

CT — компьютерная томография;

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;

НПВ (IVC) — нижняя полая вена;

ЯМР (MRI) — ядерный магнитный резонанс;

PAC-1 — моноклональное антитело к активированной форме гликопротеина 1 Ib/1 на поверхности тромбоцита;

ПЭТ (PET) — позитрон-эмиссионная томография;

ПОТ (PRP) — плазма, обогащенная тромбоцитами;

П-селектин (P-selectin) — рецептор, выделяемый в процессе реакции высвобождения тромбоцитов или эндотелиальных клеток;

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;

ТАТ — тромбин-антитромбиновый комплекс;

ТСС — терминальный комплекс комплемента;

ТВ (TT) — тромбиновое время;

ФВ (VWF) — фактор фон Виллебранда;

АИК (CPB) — аппарат искусственного кровообращения;

ELISA — фермент-связанное иммуносорбентное исследование.

5 Изделия, контактирующие с кровью (по классификации ИСО 10993-1)

5.1 Изделия, не контактирующие с организмом человека

См. ИСО 10993-1. Например, устройства для диагностики *in vitro*.

5.2 Изделия, присоединяемые извне

К данной категории согласно ИСО 10993-1 относят изделия, контактирующие с циркулирующей кровью и служащие в качестве магистралей и устройств для входа в сосудистую систему.

a) К категории изделий, присоединяемых извне 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.), контейнеры для эритроцитарной массы.

b) К категории изделий, присоединяемых извне и имеющих прямой контакт с циркулирующей кровью, относят, например, оборудование для атерэктомии, мониторы крови, катетеры, внутрисосудистые эндоскопы, внутрисосудистые лазерные системы, внутрисосудистые ультразвуковые системы, катетеры для контрпульсации, 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), подкожные системы поддержки циркуляции.

5.3 Имплантируемые изделия

К данной категории согласно ИСО 10993-1 относят изделия, частично или полностью имплантируемые внутрь сосудистой системы. Например, кольца для аннулопластики, 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, приборы для эмболизации, внутрисосудистые протезы, имплантируемые дефибрилляторы, стенты, артериовенозные шунты, мониторы крови, катетеры для введения лекарств, постоянные электроды водителя ритма (кардиостимулятора), внутрисосудистые мембранные оксигенаторы (искусственные легкие), фильтры для удаления лейкоцитов.

6 Методы

6.1 Общие рекомендации

6.1.1 На рисунке 1 приведена схема принятия решений, которая может быть использована при определении необходимости исследования гемосовместимых свойств.

На основании измерений первичных процессов или систем взаимодействие с кровью может быть разделено на пять категорий.

В таблицах 1 и 2 приведены примеры устройств, контактирующих с циркулирующей кровью, и соответствующие методы исследований.

Примечание — Для целей настоящего стандарта целесообразно было бы разработать подтверждение выбора категории, основанное на характере тестируемого изделия. Часто исследование тромбоза является предпочтительным методом при характеристике изделия. Во многих случаях логические обоснования могут быть использованы для замены исследованиями тромбоза некоторых комбинаций методов гематологии, исследования тромбоцитов и тестирования системы комплемента.

Для медицинских изделий существуют специфические международные стандарты на виды изделий (вертикальный стандарт). Требования к биологическим исследованиям и методам тестирования, сформулированные в этих вертикальных стандартах, имеют преимущество перед общими требованиями, изложенными в настоящем стандарте.

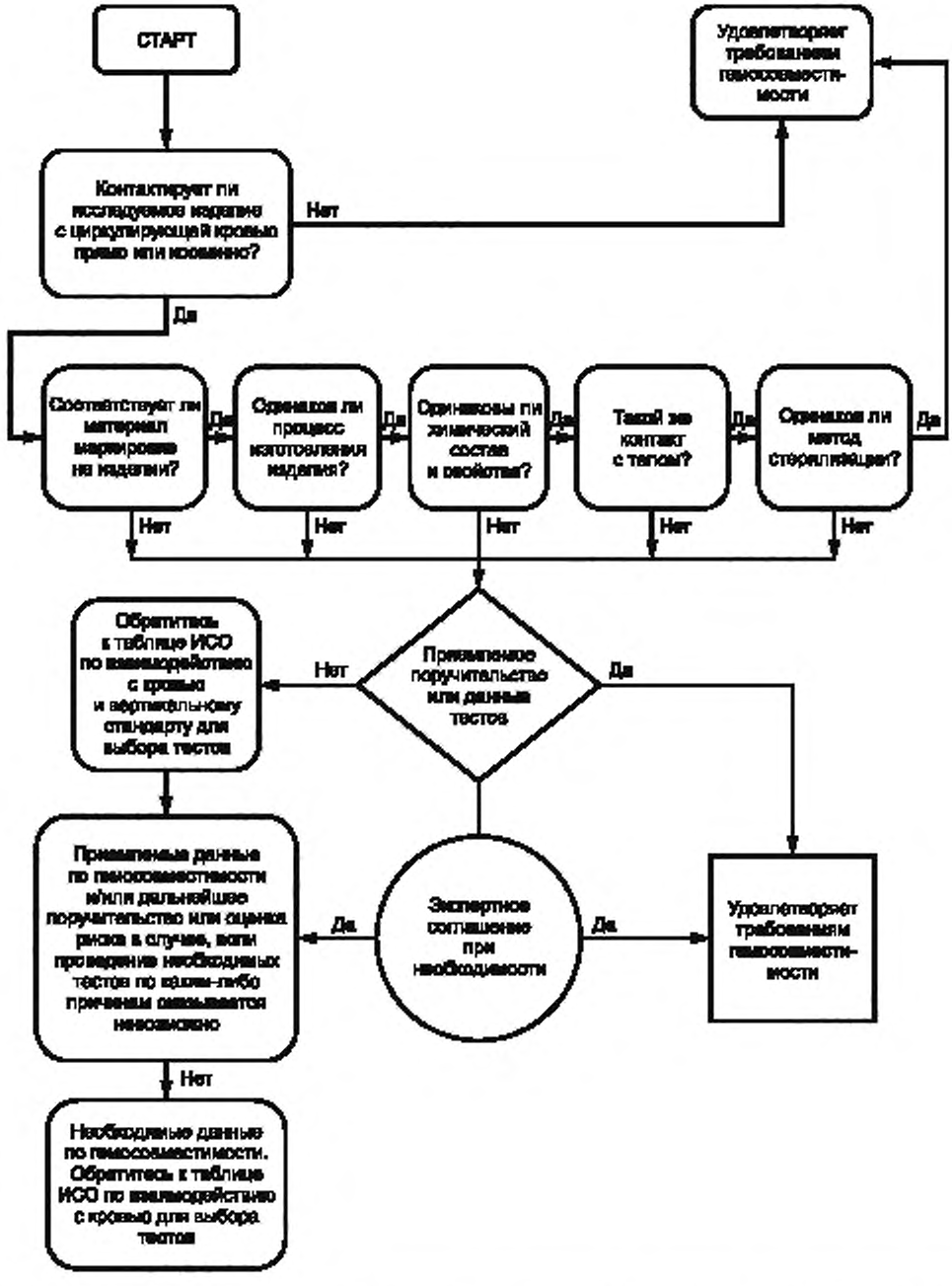


Рисунок 1 — Схема принятия решения о необходимости проведения исследований гемосовместимых свойств

Таблица 1 — Изделия и их компоненты, контактирующие с циркулирующей кровью, и рекомендуемые методы исследований. Изделия, присоединяемые извне

Примеры изделий	Категория тестов				
	Тромбоз	Коагуляция	Тромбоциты	Гематология	Система комплемента
Приборы для атерэктомии	—	—	—	X[a]	—
Мониторы крови	X	—	—	X[a]	—
Оборудование для забора и хранения крови, коммуникации	—	X	X	X[a]	—
Экстракорпоральные мембранные оксигенаторы, оборудование для гемодиализа/гемофильтрации, подкожно имплантируемые аппараты для поддержки кровообращения	X	X	X	X	X
Катетеры, проводники, внутрисосудистые эндоскопы, внутрисосудистый ультразвук, лазерные системы, катетеры для контрпульсации	X	X	—	X[a]	—
Оборудование для хранения клеток	—	X	X	X[a]	—
Аппараты для выделения специфических компонентов плазмы крови	—	X	X	X	X
Оборудование для донорского и терапевтического афереза	—	X	X	X	X
[a] Только гемолиз.					

Таблица 2 — Изделия и их компоненты, контактирующие с циркулирующей кровью, и рекомендуемые методы исследований. Имплантируемые изделия

Примеры изделий	Категория тестов				
	Тромбоз	Коагуляция	Тромбоциты	Гематология	Система комплемента
Кольца для аннулопластики, механические клапаны сердца	X	—	—	X[a]	—
Интрааортальные насос-баллоны	X	X	X	X	X
Искусственные желудочки сердца, полное искусственное сердце	X	—	—	X	—
Оборудование для эмболизации	—	—	—	X[a]	—
Внутрисосудистые протезы	X	—	—	X[a]	Внутрисосудистые протезы
Имплантируемые дефибрилляторы и кардиовертеры	X	—	—	X[a]	—
Проводники водителей ритма	X	—	—	X[a]	—
Фильтры для удаления лейкоцитов	—	X	X	X[a]	—
Искусственные (синтетические) сосудистые протезы и заплаты, включая артериовенозные шунты	X	—	—	X[a]	—
Стенты	X	—	—	X[a]	—
Клапаны сердца естественного происхождения, включая артериовенозные шунты	X	—	—	X[a]	—
Фильтры полой вены	X	—	—	X[a]	—
[a] Только гемолиз.					

6.1.2 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, площадь которых может быть вычислена, должна быть исследована зависимость результатов исследования от площади поверхности, $см^2$.

Тестированию подвергают только части изделия, контактирующие с кровью. Следует выбирать методы исследования, соответствующие последним достижениям науки в данной области.

6.1.3 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 [7].

Контрольные образцы материалов в качестве отрицательного и положительного контрольных образцов, 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 об изготовителе, классе и типе материала.

6.1.4 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.

6.1.5 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* [25], [26].

6.1.6 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.

6.1.7 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 (см. 6.3.1).

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

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

6.1.8 Положения раздела 5, пунктов 6.1.6 и 6.1.7, рисунка 1 и таблицы 2 служат руководством в выборе методов исследований, приведенных в 6.2.1.

6.1.9 Одноразовое лабораторное оборудование, предназначенное для забора крови и проведения исследования крови *in vitro*, проверяют, чтобы убедиться в отсутствии влияния на результаты проводимого исследования. Проверку можно осуществить, проводя исследование на контрольных образцах и сравнивая результаты с помощью методик, проверенных клинической практикой.

6.1.10 Если методы выбраны в соответствии с вышеизложенными требованиями и исследование проводят в условиях, моделирующих условия клинического применения, результаты исследования будут с наибольшей вероятностью прогнозировать воздействие изделия в клинической практике. Однако индивидуальные реакции животных различных видов и другие факторы могут ограничить возможности прогнозирования при любом методе исследования.

6.1.11 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 [26].

Исследования с использованием таких животных, как кролик, свинья, теленок, овца, собака, могут давать удовлетворительные результаты. Поскольку индивидуальные различия могут быть значительными (например, адгезия тромбоцитов, тромбоз [20] и гемолиз у собак происходит быстрее, чем у человека), все результаты исследований на животных следует интерпретировать с осторожностью. Использованные виды животных и число видов должны быть обоснованы (см. ИСО 10993-2).

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

6.1.12 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.

6.1.13 Даже незначительные модификации изделий, допущенных к применению в медицинской практике, могут привести к значительным изменениям клинических функций (например, 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.

6.1.14 Для получения статистически достоверных результатов проводят достаточное число 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 3 и 4.

Исследования классифицированы по пяти категориям, основанным на изучаемом процессе или системе:

a) тромбоз (см. 3.3),
b) коагуляция (см. 3.4),
c) тромбоциты и их функции (см. 3.5),
d) гематология (см. 3.6),
e) иммунология (см. 3.7).

Принципы и научная основа методов исследования изложены в приложении В.

Таблица 3 — Методы исследования изделий, присоединяемых извне

Тест	Метод	Комментарии
Тромбоз	Световая микроскопия (адгезия тромбоцитов, лейкоциты, агрегаты, эритроциты, фибрин и др.)	—
	Процент окклюзии; сокращение потока; гравиметрический анализ (масса тромбов); световая микроскопия (адгезия тромбоцитов, лейкоциты, скопления клеток, эритроциты, фибрин и т. д.); снижение давления через устройство, меченые антитела к тромботическим компонентам	
	СЭМ (адгезия и агрегация тромбоцитов, морфология тромбоцитов и лейкоцитов; фибрин)	
Коагуляция	ЧТВ (неактивированное)	—
	Исследование специфических коагуляционных факторов; ФПА, D-димер, F_{1+2}, PAC-1, S-12, TAT	
Тромбоциты	Подсчет тромбоцитов; агрегация тромбоцитов; время кровотечения	Рекомендуется для изделий длительного (от 24 ч до 30 сут) и постоянного контакта (более 30 сут)
	ТФ-4, β-TG, тромбоксан В2; гамма-изображение меченных ^{111}In тромбоцитов (выживание тромбоцитов)	
Гематология	Число лейкоцитов, дифференциальный анализ лейкоцитов; гемолиз (количество свободного гемоглобина в плазме)	—
	Подсчет ретикулоцитов; активация высвобождения специфических продуктов из клеток периферической крови (гранулоциты)	
Система комплемента	C3a, C5a, TCC, C4d, Bb, iC3b, SC5b-9, CH50, C3 конвертаза, C5 конвертаза.	—

Таблица 4 — Методы исследования имплантируемых изделий

Тест	Метод	Комментарии
Тромбоз	Процент окклюзии; сокращение потока; вскрытие изделия (макро- и микроскопия); аутопсия дистальных органов (макро- и микроскопия)	—
	СЭМ, ангиография	
Коагуляция	ЧТВ (неактивированное), ПВ; ТВ; плазменный фибриноген, ПДФ	—
	Исследование специфических факторов свертывания крови; ФПА, D-димер, F_{1+2}, PAC-1, S-12, TAT	
Тромбоциты	Подсчет тромбоцитов; агрегация тромбоцитов	—
	Исследование меченных ^{111}In тромбоцитов, ТФ-4 (фактор IV), β-TG, тромбоксан B2; гамма-излучение меченных изотопами тромбоцитов	
Гематология	Число лейкоцитов, дифференциальный подсчет лейкоцитов; гемолиз (количество свободного гемоглобина в плазме)	—
	Подсчет ретикулоцитов; активация высвобождения специфических продуктов из клеток периферической крови (гранулоциты)	
Система комплемента	C3a, C5a, TCC, C4d, Bb, iC3b, SC5b-9, CH50, C3 конвертаза, C5 конвертаза	—

6.2.2 Изделия, не контактирующие с организмом человека

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

6.2.3 Изделия, контактирующие извне

После использования таблиц 1 и 2 для определения соответствующей категории изделия по отношению к контакту с кровью следует использовать таблицу 3 для подбора соответствующих методов тестирования взаимодействия с кровью (см. также 6.1.6).

6.2.4 Имплантируемые изделия

После использования таблиц 1 и 2 для определения соответствующей категории изделия по отношению к контакту с кровью следует использовать таблицу 4 для подбора соответствующих методов тестирования взаимодействия с кровью (см. также 6.1.6). Выбор метода зависит также от специфических особенностей исследуемого изделия.

6.2.5 Указания и ограничения

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 измеряет активацию, вызванную исследуемым материалом, а не является артефактом, присущим тест-системе. Кроме того, уровни анализируемых веществ, получаемых при моделирование *in vitro* и *ex vivo* с использованием крови человека, нередко требуют соответствующего (иногда довольно значительного) разведения для получения надежных результатов с применением соответствующих методов анализа, например, радиоиммунологических методов. Следует убедиться, что в рассмотрение были приняты только результаты анализов, измеренных в пределах диапазона концентраций, обеспечивающих надежность использованного метода. Следует также убедиться, что был измерен диапазон разведений исследуемого образца.

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 тестами одного типа 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 уровень pH, температуру, последовательность проведения исследований изучаемого материала и экспериментального контрольного образца, 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.

6.3.2 Методы *ex vivo*

Методы *ex vivo* предназначены для изделий, которые предполагают использовать *ex vivo*, например изделия, присоединяемые извне. Исследования *ex vivo* также пригодны для изделий, эксплуатировать которые предполагается *in vivo*, например, сосудистые протезы. Однако в таком случае, исследование *ex vivo* не заменяет имплантацию в качестве теста.

Существуют готовые тест-системы для мониторинга адгезии тромбоцитов, возникновения эмболии, осаждения фибриногена, массы тромбов, адгезии лейкоцитов, убыли тромбоцитов в крови и активации тромбоцитов [20], [30], [48]. Скорость кровотока измеряют либо прибором с эффектом Допплера, 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 [23], [24], [25].

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 создает 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 контрольных образцов.

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 органов 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) [19].

Существуют методы оценки *in vivo*, которые не ограничивают продолжительность эксперимента. Для определения проходимости трансплантата 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)

Доклинические исследования изделий и протезов для сердечно-сосудистой системы

А.1 Общие положения

А.1.1 Обоснование

В настоящем приложении представлена информация по выбору тестов для оценки взаимодействия с кровью изделий, предназначенных для сердечно-сосудистой хирургии. Раздел 6 настоящего стандарта содержит руководство по решению вопроса о необходимости проведения испытаний изделий, контактирующих с кровью.

А.1.2 Классификация

Классификация взаимодействия изделия с кровью, приведенная ниже, дана как основа.

a) Взаимодействие, в результате которого воздействию подвергают, главным образом, изделие, которое может иметь или не иметь нежелательные последствия, подразделяют на следующие группы:

1) адсорбция белков плазмы, липидов, кальция или других веществ из крови на поверхности изделий или абсорбция таких веществ в изделие;

2) адгезия тромбоцитов, лейкоцитов или эритроцитов на поверхности изделия или абсорбция внутриклеточных компонентов в изделие;

3) образование псевдоинтимы или тканевой капсулы на поверхности изделия;

4) изменение механических и других свойств изделия.

b) Взаимодействие, обладающее потенциальным нежелательным воздействием на животное или человека:

1) активация тромбоцитов, лейкоцитов или других клеток, активация коагуляции, активация фибринолиза, активация комплемента, активация других путей иммунотоксичности (иммуносупрессия, повышение иммунитета, иммуномодуляция);

2) образование тромбов на поверхности изделия;

3) движение сгустка крови (тромба) или другого вещества с внутренней поверхности изделия по просвету системы кровообращения (эмболизация);

4) повреждение клеток, циркулирующей крови, приводящее к анемии, гемолизу, лейкопении, тробоцитопении или изменению функции клеток крови,

5) повреждение клеток и тканей, контактирующих с изделием;

6) гиперплазия интимы или скопление (аккумуляция) другой ткани на изделии либо вблизи него, что приводит к снижению кровотока или изменению других функций изделия;

7) адгезия и (или) рост бактерий и других возбудителей инфекции на поверхности изделия.

А.1.3 Достоинства и недостатки животных моделей и *in vitro* тестирования

Выбор модели с использованием животных может быть ограничен требованиями, связанными с размерами, доступностью определенных видов и их стоимостью. 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 животных различных видов 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 [30]. Еще одно преимущество заключается в том, что можно использовать большинство иммунологических методов, разработанных для человека, для других приматов. Среди них: ТФ-4, Р-TG, ФПА, TAT, 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. Свиней считают подходящими моделями благодаря сходству сердечно-сосудистой системы и гематологических показателей этого вида и человека. Также следует учитывать влияние хирургического воздействия при имплантации на результаты тестов и вводить соответствующий положительный контрольный образец.

Вследствие существенных отличий в гематологических и гемостатических факторах и их активности кровь человека следует использовать во всех случаях, когда это возможно.

Тромбообразование — процесс динамичный, поэтому для *in vitro* тестирования тромбообразования целесообразно, насколько это возможно, применение динамических условий (например, в условиях потока, создающих определенные силы сдвига на границе раздела кровь/материал). Для некоторых классов исследования взаимодействия крови с материалами могут быть применены тесты в статике.

Так как пациенты с имплантированными сердечно-сосудистыми изделиями могут получать антикоагулянты и антитромботические лекарства, важно моделировать эти условия *in vitro*.

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 Протоколы тестирования (для экспериментов на животных)

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, потребления 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 иметь компенсированный характер (общее число тромбоцитов, потребленных изделием, как правило, мало и не влияет на результаты анализа общего числа тромбоцитов) или привести к снижению численности тромбоцитов и факторов свертывания крови (площадь поверхности изделия велика, чтобы захватить число тромбоцитов, достаточное для изменения результатов анализа общего числа тромбоцитов).

А.1.5 Протоколы для тестирования *in vitro*

In vitro тестирование позволяет проводить достаточное для статистической оценки число тестов при относительно низкой стоимости и отсутствии необходимости умерщвления подопытных животных. Измерения связаны с высокой степенью вариабельности гематологических, гемодинамических и функциональных свойств, формированием крупных тромбов и активацией системы комплемента. *In vitro* подход позволяет регистрировать кинетику различных факторов и активностей, изменяя продолжительность контакта материала или изделия с кровью.

А.2 Канюли

Канюли обычно вводят в один или более основных кровеносных сосудов для обеспечения непрерывного поступления крови. Их также применяют 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. 5.2.2, 5.3).

А.3 Катетеры и зонды

Большинство тестов, применяемых 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 Допплеру 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 применение 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 применяя ультразвук или 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 [31], 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 в себя 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 [40], [41].

А.6 Протезы сердечного клапана

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

Одним из наиболее эффективных способов скрининга дисфункций искусственных клапанов является выслушивание [42]. Эхокардиография типов 2*D* и *M* позволяет получить с помощью 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. С помощью этого метода можно выявить разрастания и утолщения стенки клапана, сгустки крови. Используя черно-белую и цветовую визуализации отраженного эхо-сигнала при проведении эхокардиографии, можно идентифицировать и приблизительно оценить обратный ток крови [42].

Рекомендуют также определить выживание и агрегацию тромбоцитов, провести исследования свертывания крови и гемолиза, измерить давление кровяного русла и скорость кровотока, а также провести аутопсию клапана и прилегающих тканей [41], [43].

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 значение, равное 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 периодически проводимой ангиографией. Ультразвуковое исследование, ЯМР и ПЭТ могут быть весьма полезны. Результаты серии исследований меченых тромбоцитов коррелируют с площадью поверхности неэндотелизированных трансплантатов у бабуинов [30]. Применение метода меченых тромбоцитов облегчает выявление места образования тромбов на стенках. Рекомендуют проводить серию подсчетов числа 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. Систематическая оценка продольной и поперечной секций проксимального и дистального анастомозов, а также отдельных центральных частей сосуда необходима для тщательной оценки изделия [43].

А.8 Ловушки тромбов и стенты

Эти изделия исследуют ангиографией и ультразвуковым методом. Допускается применение методик для оценки протезов в соответствии с А.7 [43].

Приложение В
(справочное)

Лабораторные методы: принципы, научное обоснование и интерпретация

В.1 Основные положения

В.1.1 Обоснование

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 [17] — [44], [46] — [49] и [59] 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.

В.1.2 Принципы *in vitro* тестирования

Используют статические и динамические системы, например, циркуляцию по замкнутому кругу и системы на основе центрифугирования [50], [54].

В.1.3 Условия проведения тестирования

Для того чтобы исследования достигали цели и оценка взаимодействия изделия с кровью была адекватной, содержащую антикоагулянт кровь или плазму здорового человека или экспериментального животного инкубируют в контакте с материалом или изделием. Воздействие должно происходить в стандартизированных условиях, моделирующих условия применения в медицинской практике, в том числе длительность взаимодействия, температуру и характеристики кровотока. Аликвоту крови или плазмы исследуют сразу после контакта с материалом или изделием.

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

При подготовке образцов для тестирования особенно важно избегать активации или выделения в объем крови любых компонентов до начала тестирования. Однако, подходящие условия зависят от тестируемого изделия или материала и определяются условиями его эксплуатации.

В.1.4 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, коагуляцию, клетки крови и их функции, гематологию и активацию системы комплемента.

В.2 Тромбоз

В.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. Определение площади поверхности, покрытой тромбами и свободной от них, — полуколичественный тест, и может быть использован на основе сравнения.

В.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 В.2.1.

В.2.3 Гравиметрический анализ (определение массы тромбов)

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

В.2.4 Световая микроскопия

С помощью 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 полукачественным.

В.2.5 Перепад давления в изделии

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

В.2.6 Сканирующая электронная микроскопия (СЭМ)

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

В.2.7 Связывание антител

Вслед за качественной оценкой отложений фибрина и тромбоцитов с использованием микроскола возможно проведение количественных определений этих параметров с использованием антител, специфических к фибриногену и рецепторам мембран тромбоцитов. Для удаления компонентов крови, слабо связанных с поверхностью, исследуемые образцы перед взаимодействием с антителами следует тщательно промыть.

В.2.8 Исследование трансплантированного при аутопсии

Метод имеет важное значение для оценки биологической реакции организма на имплантированное изделие. Распределение, размеры и микроскопическую природу клеточных отложений можно наилучшим образом определить при патологоанатомическом исследовании. Некоторые предлагаемые процедуры опубликованы [40], [41].

В.2.9 Исследование дистальных органов при аутопсии

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

В.2.10 Ангиография, внутрисосудистый ультразвук, Допплеровский ультразвук, сцинтилляционная томография, магниторезонансная томография

Один или комбинация из данных методов может быть применен 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*.

В.3 Коагуляция

Коагуляционные методы основаны на использовании нативной (свежей, без антикоагулянтов) цельной крови, цельной крови с антикоагулянтами (обычно — цитратной), плазмы, обогащенной тромбоцитами, и бестромбоцитарной плазмы.

Так как большинство стандартных коагуляционных тест-наборов предназначены для обнаружения нарушений в функционировании системы свертывания, что приводит к замедлению свертывания или повышенной кровопотере, протоколы исследования взаимодействия изделие/кровь должны быть изменены так, чтобы подходить для регистрации ускорения тромбообразования, индуцированного контактом с биоматериалами. Тесты, основанные на активированном частичном тромбопластине, включают в себя такие активаторы, как каолин, целит или элагровую кислоту. Тест-комбинаций, содержащих такого рода активаторы, следует избегать, поскольку их применение маскирует ускорение коагуляции, вызванное контактом с материалом или изделием.

Кровь инкубируют с исследуемым материалом как в статических условиях (ячейка с параллельными пластинами), так и в системе с замкнутой циркуляцией, где исследуемым материалом является внутренняя поверхность трубок. После определенного времени инкубации проводят тестирование как поверхности, так и крови [54].

В.3.1 Частичное тромбопластиновое время (ЧТВ)

Частичное тромбопластиновое время [38] — 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 его рассматривают как фактор опасности 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 увеличивают 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.

В.3.2 Протромбиновое время (ПВ)

Этот тест основан на том, что в тщательно измеренном объеме плазмы крови имеется оптимальная концентрация ионов кальция и избыток тромбопластина, и переменные величины — концентрация протромбина и дополнительные факторы [38]. 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.

В.3.3 Тромбиновое время (ТВ)

Тромбиновое время [38] — время свертывания плазмы при добавлении раствора тромбина со стандартной активностью. Тромбиновое время увеличивается при дефиците фибриногена (ниже 100 мг/л), при аномалиях в молекуле фибриногена и при повышении уровней продуктов деструкции фибриногена и фибрина (ПДФ) или гепарина. Обычно тест проводят для оценки имплантируемых изделий.

В.3.4 Генерация тромбина

При взаимодействии с материалами интактная система свертывания в присутствии фосфолипидов (См. В.3.1.) генерирует тромбин, который может быть количественно измерен по конверсии хромогенного субстрата. Данный метод имеет гораздо более низкий разброс результатов по сравнению с обычными коагуляционными тестами.

В.3.5 Фибриноген

Дисфибриногенемия, афибриногенемия и гипофибриногенемия вызывают увеличение ЧТВ, ПВ и ТВ [21]. 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 только для оценки имплантируемых изделий.

В.3.6 Продукты деструкции фибриногена и фибрина (ПДФ)

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. Рекомендуется использование коммерчески доступных методов [51], [52].

В.3.7 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 применения в медицинской практике, предполагает ускоренный расход этих факторов в процессе абсорбции, коагуляции или в процессе других механизмов.

В.3.8 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. D-димер — продукт деградации разлагаемого плазмином полимеризованного фибрина (фактора XIII). Рекомендуется использование твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA) и радиоиммуноанализа (RIA).

В.4 Тромбоциты и их функции

Особенно важно избегать активации тромбоцитов в процессе приготовления суспензии клеток.

В.4.1 Подсчет числа тромбоцитов

Подсчет числа тромбоцитов является очень важным из-за их ключевой роли в предотвращении возможного кровотечения [21], [49], [59]. Значительное снижение числа 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 числа тромбоцитов во время функционирования имплантируемого изделия может быть вызвано ускоренным разрушением или удалением тромбоцитов из системы кровообращения. Подсчет числа тромбоцитов проводят в среде для суспендирования на основе ЭДТА.

Техника забора крови должна быть воспроизводимой. Агрегатометрия является тестом, подтверждающим нормальную реактивность тромбоцитов. Манипуляции с кровью, сопровождающиеся снижением активности тромбоцитов, могут быть легко обнаружены агрегатометрией. Однако под воздействием разнообразных условий, включая неправильный забор крови, тромбоциты способны переходить в гиперактивное состояние, которое плохо определяется с применением агрегометра. Агрегационные тесты следует модифицировать (подбором концентрации тромбоцитов и агрегирующих агентов) так, чтобы модифицированные методы способны были регистрировать гиперактивность тромбоцитов, в том числе проявившуюся в результате контакта с материалами или изделиями.

В.4.1.1 Подсчет тромбоцитов вручную

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

В.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 числе клеток, чем при подсчете вручную. Следовательно, разброс для автоматизированного счета может составлять всего 4 %, в то время как наилучший достижимый показатель для подсчета вручную составляет 11 %. Большинство приборов обладают способностью отличать тромбоциты от мелких частиц небиологического происхождения, что исключает необходимость визуально распознавать и дифференцировать осколки тромбоцитов.

В.4.2 Агрегация тромбоцитов

Агрегацию тромбоцитов [38] 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 применяют для определения изменения трансмиссии света, а регистрирующее устройство графически изображает изменение трансмиссии света, начиная с базовой установки (на значение «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 учитывать, 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. Агрегация тромбоцитов может быть зарегистрирована автоматически с использованием метода WU/HOAK [52].

В.4.3 Адгезивность клеток крови

Адгезивность клеток крови [34] — 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, например, К-счет Куники (KunikiK-score) [53]. Большинство этих методов основано 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 применен для качественной оценки адгезии других клеток крови на полимеры, которыми покрыты стеклянные шарики. Благодаря применению этого метода, был сделан вывод [34], 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 числа 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, меченные изотопами ^{51}Cr и ^{111}In [33], [55], [56].

В.4.4 Активация тромбоцитов

Использование определенных материалов и изделий может вызывать активацию тромбоцитов, которая сопровождается:

a) высвобождением из внутриклеточных гранул ряда веществ (ТФ-4, β-TG, серотонина и др.);

b) изменением морфологии тромбоцитов;

c) образованием микроагрегатов тромбоцитов.

Активированный тромбоцит протромбогенен. Активация тромбоцитов может быть оценена с помощью микроскопических (световая и электронная) методов, поточной цитометрией (определение наличия микроагрегатов), регистрацией уровня ТФ-4 и β-TG, выделения Р-селектина (GMP-140) или активированных гликопротеинов (GP Ib и GP IIb/IIIa) с использованием моноклональных антител. Различные эпитопы активированных тромбоцитов могут быть оценены с использованием двух или более антител (например, одно — к GP Ib или GP IIb/IIIa, а другое — к Р-селектину), регистрация с помощью поточной цитометрии [60].

В.4.5 Время кровотечения

Коммерческая доступность стерильного одноразового устройства, предназначенного для проведения разреза кожи стандартных глубины и длины в стандартных условиях, значительно повысила воспроизводимость и ценность этого испытания. Увеличение времени кровотечения указывает на сниженную функцию тромбоцитов или уменьшение числа тромбоцитов, которое может быть определено по В.4.1. Увеличение времени кровотечения при нормальном числе тромбоцитов наблюдается при взаимодействии с некоторыми внешними присоединяемыми устройствами кратковременного действия (например при экстракорпоральном кровообращении) [31]. Испытание может быть проведено на некоторых видах подопытных животных. Измерение времени кровотечения применимо в условиях *in vitro*.

В.4.6 Анализ функциональных свойств тромбоцитов

Принцип классического стандартного времени кровотечения был использован для автоматизированного анализа. Цельную кровь прокачивают через коллагеновый фильтр с диаметром апертуры (отверстия в измерительной ячейке) в 150 микрон. Тромбоциты адгезируют и агрегируют до тех пор, пока они не закроют просвет апертуры. Давление крови и температуры фиксированы, присутствие антикоагулянтов не влияет на результаты теста. Тест применим для крови животных.

В.4.7 Гамма-излучение тромбоцитов, меченных радиоизотопами

Высокая эмиссия гамма-излучения, свойственная ^{111}In, позволяет использовать его для этой цели [23], [30]. 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.

В.4.8 Период жизни тромбоцитов (выживание тромбоцитов)

Тромбоциты получают из крови пациентов и метят ^{51}Cr или ^{111}In [23], [24], [32], [57]. 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 обладает 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.

В.5 Гематология

В.5.1 Число лейкоцитов и дифференциальный подсчет лейкоцитов

Активацию лейкоцитов можно регистрировать с помощью световой микроскопии поверхности изделия, поточной цитометрии, по увеличению уровней маркеров, например, Л-селектина (L-selectin) и CD11b, а также в сдвиге лейкоцитарной формулы.

В.5.2 Гемолиз

Гемолиз является наиболее важным скрининг-тестом, потому что высокий уровень гемоглобина в плазме, являющийся показателем гемолиза, отражает реакцию лизиса эритроцитов при контакте с материалами и изделиями (см. приложение С).

В.5.3 Подсчет ретикулоцитов

Повышенное число ретикулоцитов — показатель усиленного образования эритроцитов в костном мозге. Это может быть реакцией на уменьшение числа эритроцитов в крови в результате хронической кровопотери (скрытого кровотечения), гемолиза и ряда других причин [61].

В.6 Система комплемента — CH 50, C3a, C5a, TCC, Bb, iC3b, C4d, SC5b-9

Снижение показателя CH 50 является индикатором расхода общего комплемента.

Недостатком регистрации *in vitro* продуктов расщепления комплемента является их высокий базовый уровень в плазме крови, а также видоспецифичность метода. Классический CH 50 метод применим для сыворотки крови человека, теленка, свиньи и кролика.

Другим функциональным методом определения *in vitro* активации системы комплемента является регистрация генерации C3- или C5-конвертазы комплемента (по конвертации субстрата).

Об активации системы комплемента см. ASTM F1984-99 и ASTM F2065-00 [13], [14].

Приложение С
(справочное)

Исследование гемолитических свойств медицинских изделий и их компонентов

С.1 Общие положения

Существует обширная литература, описывающая взаимодействие материал/кровь. Однако существует лишь несколько достаточно надежных и воспроизводимых методов тестирования, позволяющих предсказать поведение исследуемого материала при его клиническом применении. В настоящем приложении приведен обзор известных методов тестирования гемолитической активности и обсуждены факторы, имеющие отношение к их способности охарактеризовать медицинские и стоматологические изделия.

С.2 Термины и определения

В настоящем приложении применены следующие термины с соответствующими определениями:

С.2.1 **антикоагулянт:** Агент, предотвращающий или препятствующий коагуляции [62].

Примеры — Гепарин или цитрат.

С.2.2 **онкотическое давление; коллоидное осмотическое давление:** Суммарное влияние белков и других высокомолекулярных компонентов на осмотическое давление плазмы [62].

С.2.3 **гематокрит:** Отношение объема эритроцитов к общему объему крови (индивидуально для каждого образца).

С.2.4 **гемолиз:** Выделение гемоглобина (Hb) из эритроцитов в результате разрушения или частичного повреждения при интактной клеточной мембране.

С.2.5 **отрицательный контрольный образец:** Полиэтилен высокой плотности или другой материал с подтвержденными свойствами.

Примечание — См. ИСО 10993-12.

С.2.6 **эритроцитарная масса:** Компонент, полученный в результате центрифугирования цельной крови с последующим удалением супернатанта, состоящего из плазмы.

Примечание — Свойства эритроцитов человека для трансфузии: объем фракции эритроцитов составляет 0,65 — 0,80 объема цельной крови. Используемый образец содержит все эритроциты, большую часть лейкоцитов (примерно 2,5 — 3,0 $\times 10^9$ клеток/мл) и различное число тромбоцитов (в зависимости от метода центрифугирования).

С.2.7 **отмытые эритроциты:** Суспензия эритроцитов, полученная из цельной крови после удаления плазмы и отмывки в физиологическом растворе.

Примечание — Это эритроцитарная суспензия, из которой удалена большая часть плазмы, лейкоцитов и тромбоцитов. Число остаточной плазмы определяется протоколом отмывки. Использовать суспензию отмытых эритроцитов следует как можно быстрее после окончания процедуры отмывки. Хранить не дольше, чем 24 ч при температуре 1 °С — 6 °С.

С.2.8 **цельная кровь:** Кровь, полученная от здорового донора, содержащая цитрат или гепарин в качестве антикоагулянта.

С.3 Причины гемолиза

С.3.1 Механические силы — давление

Мембрана эритроцита полупроницаема. Разность давлений возникает, когда такая мембрана разделяет два раствора с различными концентрациями. Осмотическое давление существует, когда мембрана непроницаема для пассивного переноса растворителя. Этот перепад давления может вызывать разбухание эритроцитов и разрушение клеточной мембраны, сопровождаемое выделением свободного гемоглобина [62].

С.3.2 Механические силы — реология

Факторы, воздействующие на кровь (скорость потока, сдвиговые напряжения и другие силы), способные деформировать мембрану эритроцитов, могут вызывать разрушение их мембраны.

С.3.3 Биохимические факторы

Изменение структуры мембраны на молекулярном уровне способно изменить прочность и эластичность мембран эритроцитов. Недостаток питания или энергии (АТФ) может сопровождаться потерей дискообразной формы и микровезикуляции (microvesiculation) гемоглобина. Химические агенты, бактериальные токсины, pH и нарушения метаболизма под воздействием температуры способны подвергать опасности мембраны эритроцитов [63]. Эти факторы способствуют разрушению мембран эритроцитов при осмотических давлениях, существенно меньше ожидаемых. Может быть выполнен специальный тест, определяющий при каком осмотическом давлении разрушается мембрана эритроцита (осмотическая хрупкость).

С.4 Клиническая значимость гемолиза

С.4.1 Токсический эффект

Повышение уровня свободного гемоглобина в плазме может вызывать токсические эффекты или инициировать процессы, приводящие к поражению почек или других органов [62]. Определение концентрации свободного гемоглобина плазмы является удобным методом измерения степени повреждения эритроцитов, а также является косвенным индикатором травмы других форменных компонентов крови.

С.4.2 Тромбоз

Внутрисосудистый гемолиз сопровождается выделением фосфолипидов, способствующих тромбообразованию [66]. Значительное падение числа эритроцитов в крови в результате гемолиза приводит к анемии и снижению способности транспортировать кислород, что имеет соответствующее отрицательное воздействие на мозг и другие ткани.

С.5 Определение критериев отбора для гемолиза

Гемолиз является функцией от времени и свойств материала, таких как поверхностная энергия, морфология и химия поверхности. Гемолиз зависит также от сдвигового напряжения, взаимодействия материал/клетка, характера слоя адсорбированных белков, стабильности потока, захвата воздуха и особенностей источника крови [67], [68], [69]. При сравнении гемолитического потенциала материалов и медицинских приборов эти параметры следует тщательно контролировать. Спектр методов изучения гемолиза чрезвычайно широк: от простейших (*in vitro* в статике) до высокосложных (*in vivo* в потоке). Изучение гемолитического потенциала носит не абсолютный, но, скорее, относительный характер и определяется набором методов и стандартов, принятых в конкретной лаборатории. Методами *in vitro* могут быть измерены небольшие уровни гемоглобина плазмы, которые нельзя определить в условиях *in vivo* (например, вследствие связывания гемоглобина плазмы с гаптоглобином и быстрого удаления из крови). В качестве индикаторов *in vivo* гемолиза может быть применено измерение уровня лактат дегидрогеназы и гаптоглобина. Невозможно вывести универсальный критерий допустимого уровня гемоглобина, применимого для оценки любых медицинских изделий. Воздействие изделия на гемолиз может на какое-то время быть замаскировано травмой крови при хирургическом вмешательстве. Применение аппарата, провоцирующего гемолиз, может быть единственным шансом спасения жизни пациента. На практике применение многих аппаратов сопровождается гемолизом. Следовательно, если изделие провоцирует гемолиз, важно подтвердить, что изделие имеет клинические преимущества, а значение гемолиза лежит в клинически допустимых пределах. Критерии применимости должны быть обоснованы на основе оценки критериев риска и пользы. Следующие вопросы могут быть предложены выработки таких критериев:

a) Как долго будет применяться изделие в контакте с пациентом?

b) Насколько велик гемолиз, индуцированный материалом или изделием?

c) Каково отношение рисков и преимуществ в случае применения других известных аналогичных методов лечения?

d) Каковы гемолитические свойства этих известных аналогичных методов лечения? Как ведет себя данное изделие по сравнению с другими методами лечения?

e) Насколько эффективно тестируемое изделие по сравнению с другими методами лечения? Более эффективное изделие может вызывать более высокий гемолиз, однако дополнительная эффективность может повысить пользу для пациента.

С.6 Исследование гемолиза — Общие положения

С.6.1 Методы

С.6.1.1 Общие положения

Для оценки повреждения эритроцитов используют тесты *in vitro*. Прямые методы определяют гемолиз, индуцированный физическим и химическим контактом с эритроцитами. Непрямые методы определяют гемолиз, вызванный контактом с экстрактами из исследуемых материалов. Стандарт ASTM F 756-00 [10] описывает тестирование гемолитических свойств материалов (в основном за счет химических факторов), но его недостаточно для тестирования медицинских изделий в целом. ASTM F 756-00 (и тесты на гемолиз, перечисленные в GB/T 16175-1996 [11]) приведены в качестве примера и возможной отправной точки при разработке протокола тестирования гемолитических свойств конкретного аппарата. Исследование гемолитических свойств отдельных материалов следует дополнить динамическими тестами аппарата в сборе для определения вклада в гемолиз его конструкции, специфики использования по назначению и гемодинамических факторов.

В простейшей форме, в случае использования для контакта с тестируемыми материалами сильно разбавленных суспензий эритроцитов, значение гемолиза часто представляют в процентах гемоглобина, выделившегося в супернатант и нормализованного на общее количество гемоглобина в пробе (за 100 % принимают концентрацию гемоглобина, выделяющегося в пробу при полном разрушении всех присутствующих в ней эритроцитов). В случае тестирования медицинских изделий, для которых применение высоко разбавленных суспензий эритроцитов невозможно, гематокрит крови и другие факторы должны быть учтены при нормализации индекса гемолиза [63].

Каждая лаборатория, по меньшей мере, должна иметь возможность измерять общую концентрацию гемоглобина в крови и содержание его в плазме. Концентрация свободного гемоглобина плазмы (в норме от 0 до 10 мг/л) существенно ниже его общей концентрации в крови (в норме от 11000 до 18000 мг/л). Следовательно, для их определения в процессе тестирования должны быть задействованы разные методы.

Три аналитических метода получили наибольшее распространение при определении концентрации общего гемоглобина крови Hb [70].

Примечание — Исследователь должен учитывать, что ряд факторов может вносить искажения в результаты тестирования гемолитической активности. Химические агенты некоторых видов, содержащиеся в медицинских материалах и растворах, способны воздействовать на осмотическую стойкость эритроцитов (например, фиксирующие агенты, такие как формальдегид или глутаровый альдегид), провоцировать осаждение эритроцитов (например, ионы меди или цинка), изменять спектры поглощения гемоглобина (например, полиэтиленгликоль или этанол) [64], [65].

С.6.1.2 Определение концентрации общего гемоглобина крови

С.6.1.2.1 Гемоглобинцианидный метод

Первый из классических методов определения концентрации общего гемоглобина крови — гемоглобинцианидный — был опубликован Международным Комитетом по Стандартизации в Гематологии (International Committee for Standardization in Haematology) [71]. Гемоглобинцианидный анализ удобен тем, что легко может быть автоматизирован и для него доступны прямые стандарты (HiCN). Метод основан на окислении гемоглобина с последующим образованием циангемоглобина, имеющего максимум поглощения при 540 нм. Детергент, используемый в качестве лизирующего агента, помимо высвобождения гемоглобина из эритроцитов снижает мутность раствора (источник помех и ошибок при фотометрировании на 540 нм) за счет преципитации белков. При использовании данного метода спектральные помехи со стороны плазмы минимальны, что позволяет сравнивать поглощение образцов плазмы непосредственно с контрольным раствором.

Широкая полоса поглощения HiCN позволяет для ручного и автоматического определения использовать не только точные спектрофотометры, но и простые фотоколориметры с фильтрами. Применение эталонных образцов позволяет добиться сопоставимости результатов, полученных при использовании данного метода в разных лабораториях. Основной недостаток метода связан с необходимостью использовать высокотоксичные растворы цианидов, способные к тому же выделять синильную кислоту в процессе кислого гидролиза. Определенные трудности и расходы связаны с утилизацией опасных отходов.

С.6.1.2.2 Оксигемоглобиновый метод

Второй из классических методов определения концентрации общего гемоглобина крови — оксигемоглобиновый — в настоящее время не находит широкого применения. Оксигемоглобиновый метод основан на образовании HbO_2 в процессе обработки гидроксидом аммония и последующем спектрофотометрическом определении этого продукта. Применяют также регистрацию оксигемоглобина в разбавленном растворе карбоната натрия. Метод не имеет стабильных контрольных или стандартных образцов, что, впрочем, не столь важно, поскольку данный метод может быть использован в тех случаях, когда результат (концентрацию гемоглобина в плазме) представляют в процентах от концентрации общего гемоглобина крови. В таком случае стандартный образец (образец со 100 %-ным гемолизом) готовят из забранной крови непосредственно перед измерением.

С.6.1.2.3 Железный метод

Третий из классических методов определения концентрации общего гемоглобина крови основан на определении концентрации ионов железа, выделенных из гемоглобина крови взаимодействием с кислотой или озолением. Полученные препараты титруют $TiCl_3$ или обрабатывают специфическими агентами, взаимодействующими с железом, с последующим фотометрированием окрашенных комплексов. Данный метод слишком сложен для рутинных измерений и потому используется редко.

С.6.1.3 Измерение свободного гемоглобина плазмы

С.6.1.3.1 Прямые оптические и дополнительные химические методы

Благодаря многочисленным различным факторам (традициям, простоте применения, утилизации жидких отходов, доступности стандартов и т.д.) для определения концентрации свободного гемоглобина плазмы как индикатора гемолиза, в настоящее время применяют около 20 методов, но ни один из них не распространен широко. Все методы могут быть разделены на две большие группы:

1 Использующие регистрацию поглощения непосредственно оксигемоглобина (при 415, 541 и 577 нм) и его производных;

2 Использующие регистрацию поглощения производных гемоглобина, полученных путем химических превращений (гемоглобин реагирует с бензидин-подобными хромогенами и перекисью водорода, или из него формируют циангемоглобин) [72].

Анализы всех видов могут быть выполнены как в ручном режиме, так и автоматически.

Популярный метод измерения концентрации гемоглобина основан на его катализирующем эффекте при окислении производных бензидина, например, окислении тетраметилбензидина перекисью водорода. Скорость образования окрашенного продукта (определяется фотометрически при 600 нм) прямо пропорциональна концентрации гемоглобина. К преимуществам этого метода можно отнести простоту автоматизации с привлечением коммерчески доступной аппаратуры, отсутствие высокотоксичных и экологически опасных реагентов или отходов (синильная кислота и ее производные), доступность стандартных образцов гемоглобина, откалиброванных против стандартных образцов HiCN. Нижний предел чувствительности метода (5 мг/л) сравним с таковым для гемоглобинцианидного метода [70]. Основным недостатком этого метода является использование потенциально опасных для здоровья производных бензидина, а также высокие расходы на утилизацию реагентов и продуктов. Более того, диа-

пазон регистрируемых концентраций недостаточно широк (от 5 до 50 мг/л) [73], и в исследуемом образце может присутствовать ряд агентов, способных ингибировать (до 40 %) [74] реакцию окисления под действием перекиси, антикоагулянты, комплексообразующие с кальцием (цитраты, оксалаты, ЭДТА) [73], альбумин [75] или другие неспецифические компоненты плазмы [74].

Таким образом, прямые оптические методы, такие как методы Harboe [76], Cripps [77] или Taulier [78] с сравнимой чувствительностью и воспроизводимостью, могут быть заменены. Однако, как уже было отмечено выше, химические превращения гемоглобина и вызванные ими изменения его спектра могут искажать результаты в пробах на определение гемоглобина. Более того, необходимо вводить поправки, компенсирующие фоновую составляющую плазмы крови, способную влиять на вид спектра поглощения гемоглобина [72]. Исследователи должны хорошо понимать существование ограничений методов определения гемоглобина и осведомляться об их наличии при использовании конкретной методики [64], [65], [72], [75]. Это включает в себя и исследование супернатанта на предмет присутствия осадков и его спектра (с 400 до 700 нм) со спектром чистого гемоглобина.

С.6.1.3.2 Иммунонефелометрический метод

Иммунонефелометрический метод основан на регистрации гемоглобина плазмы методом нефелометрии с использованием коммерчески доступных антител. Этот метод пригоден для проведения рутинных работ. Он хорошо коррелирует и сопоставим с данными, полученными в случае применения оптических методов [79].

С.6.2 Консервация крови и ее компонентов

В этом разделе освещены лучшие способы сохранения крови и ее компонентов, рекомендованные Американской Ассоциации Банков Крови [80] и Совета Европы [81]. В целом, материалы и изделия следует тестировать с использованием крови, с химическими кондициями, имитирующими те, в которых изделие будет эксплуатироваться в клинике (выбор соответствующего антикоагулянта; минимальное использование консервантов; значения pH, соответствующие физиологическим [63]).

Растворы антикоагулянтов были разработаны для того, чтобы предотвращать свертывание крови при ее заборе, что позволят сохранять эритроциты в течение определенного времени. Все эти растворы содержат цитрат натрия, лимонную кислоту и глюкозу. Некоторые растворы дополнительно содержат аденин, гуанозин, маннитол, сахарозу, сорбитол и/или фосфаты [82], [83], [84], [85], [86], [87]. Хотя гепарин не используют для сохранения крови, его часто применяют в качестве антикоагулянта в клинике для пациентов, подвергаемых воздействию медицинских аппаратов и изделий.

Свертывание крови предотвращается за счет связывания цитратом ионов кальция. Во время хранения эритроциты метаболизируют глюкозу. Две молекулы аденозинтрифосфата (АТФ) генерируются фосфорилированием аденозиндифосфата (АДФ) на каждую молекулу глюкозы, метаболизированную в анаэробном цикле гликолиза Эмбдена-Мейерхофа. Молекулы АТФ поддерживают энергетические потребности эритроцитов по поддержке упругости мембран и определенных функций мембранного транспорта. Превращение АТФ в АДФ сопровождается выделением энергии, необходимой для поддержки этих функций. Для продления времени хранения раствор антикоагулянта должен быть подкислен, что обеспечивает достаточно высокую концентрацию ионов водорода в начальные моменты хранения при температуре 4 °С. Повышение кислотности во время хранения снижает интенсивность гликолиза. Аденозиновые нуклеотиды (АТФ, АДФ, АМФ) истощаются во время хранения, поэтому введение аденозина в раствор антикоагулянта позволяет синтезировать замену АМФ, АДФ и АТФ.

В процессе приготовления эритроцитарного концентрата значительные части глюкозы и аденина удаляются вместе с плазмой. Достаточная жизнеспособность эритроцитов после удаления плазмы может быть достигнута в случае, если клетки излишне не концентрированны. Нормальный цитрат фосфат декстрозный (ЦФД)-аденин концентрат эритроцитов должен иметь объем фракции эритроцитов не выше 0,8. Даже если удалить 90 % плазмы, жизнестойкость эритроцитов может быть поддержана введением добавок или суспензионных сред. Хлорид натрия, аденин и глюкоза необходимы для жизнестойкости, в то время как аденин и глюкоза могут быть применены для дальнейшей стабилизации клеточных мембран и предотвращения гемолиза [80].

Пригодность контейнеров для хранения продуктов крови оценивают различными методами, измеряющими качество продуктов крови [70], [83]. Контейнер с продуктами крови, содержащими подходящий антикоагулянт, хранят при температуре от 1 °С до 6 °С в статике. Через определенные промежутки времени определяют концентрацию свободного гемоглобина плазмы, чтобы определить жизнеспособность и качество сохраняемого продукта. Качество сохраняемого продукта может быть повышено аккуратным перемешиванием один раз в неделю. Оценку хранения в контейнере косвенно определяют по выделению из контейнера двуокиси углерода, генерируемой эритроцитами в процессе жизнедеятельности в отсутствии факторов перемешивания.

С.6.3 Защита персонала при работе с кровью

Для защиты персонала, получающего, транспортирующего и работающего с потенциально инфицированной кровью человека, необходимо наличие письменных инструкций. Потенциально инфицированные материалы включают в себя кровь и другие продукты и жидкости организма, оборудование, контактирующее (или потенциально способное контактировать) с кровью и другими жидкостями организма, а также материалы, используемые при культивировании организмов, вызывающих переносимые с кровью инфекции [88].

С.6.4 Забор крови (флеботомия)

Поскольку при заборе крови невозможно гарантировать 100 %-ную стерильность поверхности кожи, должна существовать строгая, стандартизованная процедура подготовки рабочей области для флеботомии. Прежде чем

начать пункцию вены, особенно важно убедиться, что раствор антисептика, нанесенный на поверхность кожи, полностью высох и никаких посторонних контактов с кожей не было допущено до момента установки иглы для забора [80].

Для предотвращения осеменения крови микроорганизмами лучше всего подходит забор в контейнер закрытого типа, не содержащий воздуха. Отверстие от иглы, остающееся после прокола изолирующей резиновой пробки флакона для образцов, должно быть тщательно закрыто, иначе частичный вакуум, создающийся в результате остывания образца крови, может привести к втягиванию загрязненного воздуха в контейнер [80].

С.6.5 Выбор источника эритроцитов

В идеальном случае тестирование гемолиза следует проводить с использованием эритроцитов человека. Однако в ряде случаев такой выбор может быть затруднен или даже невозможен. В некоторых странах источники крови человека ограничены, и запасы консервированной крови могут быть использованы исключительно для трансфузии человеку. Критерии здоровья доноров (человека или животных) также должны быть вопросом, подлежащим обсуждению. Любая кровь, независимо от источника ее получения, имеет ограниченное время хранения, поэтому своевременное получение именно крови человека может доставлять определенные трудности. В случае использования эритроцитов животного, особое внимание следует уделить получению 100 % контрольного раствора (полностью лизированные клетки), поскольку стабильность мембраны эритроцитов варьирует между различными видами животных. Отрицательный контрольный образец должен вызывать минимальный гемолиз, чтобы не маскировать гемолитическую активность исследуемого материала. Эритроциты кролика имеют гемолитические свойства, схожие с эритроцитами человека; эритроциты обезьяны — более, а гвинейской свиньи — менее чувствительны, по сравнению с эритроцитами человека [89].

С.6.6 Определение гемолиза — воздействие на кровь или ее компоненты *in vitro*, *ex vivo* и *in vivo*

Гемолиз может быть зарегистрирован после воздействия на исследуемый материал крови или ее компоненты в условиях *in vitro*, *ex vivo* и *in vivo*. *Ex vivo* и *in vivo* условия используют при изучении изделий, содержащих несколько различных материалов.

Допускается *ex vivo* и *in vivo* оценка на животных моделях или в процессе клинических испытаний. В первом случае тестируемое изделие сравнивают с контрольным образцом, обладающим допустимым уровнем гемолитической активности. Во втором случае исследуемый объект оценивают по клинически значимым последствиям гемолиза.

Цель *ex vivo* или *in vivo* тестов — охарактеризовать гемолитический потенциал медицинского изделия. Предварительные исследования могут проводиться и *in vitro* с применением как свежей, так и просроченной крови человека, а также крови животных. Для медицинских изделий, предназначенных для использования *ex vivo*, общепринятым методом является организация рециркуляции крови через изделие в условиях, имитирующих соответствующее клиническое применение. В дальнейшем некоторые изделия дополнительно изучают моделированием *ex vivo* на животной модели, а для ограниченного круга изделий — контрольными изучениями на людях. Размеры медицинского изделия и его назначение влияют на планирование этих исследований.

С.6.7 Прямой или непрямой контакт

Предлагаемые условия экстракции описаны в ИСО 10993-12. Некоторые методы предусматривают прямой контакт изделия с эритроцитами, в то время как в других описано приготовление экстрактов, которые затем приводят в контакт с эритроцитами. Выбор метода должен базироваться на назначении изделия и условиях его применения. Граничные условия следует принимать во внимание, если используются повышенные температуры, условия подготовки экстрактов изложены в ИСО 10993-12.

Приложение D
(справочное)

Сведения о соответствии национальных стандартов Российской Федерации ссылочным международным стандартам

Таблица D.1

Обозначение ссылочного международного стандарта	Обозначение и наименование соответствующего национального стандарта
ИСО 10993-1:1997	ГОСТ Р ИСО 10993-1—2009 Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 1. Оценка и исследования
ИСО 10993-2:1992	ГОСТ Р ИСО 10993-2—2009 Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 2. Требования к обращению с животными

Библиография

Международные стандарты

[1] ИСО 5840:1996 Сердечно-сосудистые имплантаты. Протезы клапанов сердца
ISO 5840:1996 Cardiovascular implants — Cardiac valve prostheses

[2] ИСО 5841-1 Кардиостимуляторы. Часть 1. Имплантируемые кардиостимуляторы
ISO 5841-1 Cardiac pacemakers — Part 1: Implantable pacemakers

[3] ИСО 5841-3 Имплантаты для хирургии. Кардиостимуляторы. Часть 3. Низкопрофильные соединители [IS-1] для имплантируемых кардиостимуляторов
ISO 5841-3 Implants for surgery — Cardiac pacemakers — Part 3: Low-profile connectors (IS-1) for implantable pacemakers

[4] ИСО 7198 Имплантаты для сердечно-сосудистой системы. Трубчатые сосудистые протезы
ISO 7198 Cardiovascular implants — Tubular vascular prostheses

[5] ИСО 7199 Имплантаты для сердечно-сосудистой системы и искусственные органы. Устройства для экстракорпорального насыщения крови кислородом (оксигенаторы)
ISO 7199 Cardiovascular implants and artificial organs — Blood-gas exchangers (oxygenators)

[6] ИСО 10993-12 Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 12. Приготовление проб и стандартные образцы
ISO 10993-12 Biological evaluation of medical devices — Part 12: Sample preparation and reference materials

[7] ИСО 3826 Контейнеры складные пластмассовые для человеческой крови и ее компонентов
ISO 3826 Plastics collapsible containers for human blood and blood components

Национальные стандарты

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

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

[10] ASTM F 756-00, Standard practice for assessment of hemolytic properties of materials

[11] GB/T 16175—1996 Organic silicone material material for medical use — Biological evaluation test methods

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

[13] ASTM F 1984—99, Standard Practice for Testing for Whole Complement Activation in Serum by Solid Materials

[14] ASTM F 2065—00, Standard Practice for Testing for Alternative Pathway Complement Activation in Serum by Solid Materials

[15] DIN 58 361-4:1980, Transfusionsbehältnisse und Zubehör, Blutbeutel aus Kunststoffen, Sicherheitstechnische Anforderungen, Prüfung, Überwachung und Kennzeichnung

[16] NF 90-300:1981, Matériel médico-chirurgical — Oxygénateurs

Научные статьи

[17] BOSCH, T., SCHMIDT, B., BLUMENSTEIN, M. and GURLAND, H.J., Thrombogenicity markers in clinical and ex vivo assessment of membrane biocompatibility. Contr. Nephrol., 59, 1987, pp. 90 — 98

[18] CHENOWETH, D.E., Complement activation produced by biomaterials. Trans. Amer. Soc. Artif. Int. Organs, 32: 226 — 232, 1986

[19] BURNS, G.L. PANTALOS, G.M. and OLSEN, D.B., The calf as a model for thromboembolic events with the total artificial heart. Trans. Amer. Soc. Artif. Int. Organs, 33, 1987, pp. 398 — 403

[20] COOPER, S.L., 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. Sci., 516, 1987, pp. 572 — 585

[21] CORRIVEAU, D.M. and FRITSMA, G.A. (Eds): Hemostasis and thrombosis in the clinical laboratory. J.B. Lippincott, Philadelphia, 1988, p. 443

[22] DAWIDS, S. (Ed): Test procedures for the blood compatibility of biomaterials. Kluwer, Dordrecht, Boston, 1993, p. 684

[23] 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. Sci., 516, 1987, pp. 541 — 571

[24] DEWANJEE, M.K., KAPADVANJWALA, M. and SANCHEZ, A., Quantitation of comparative thrombogenicity of dog, pig, and human platelets in a hemodialyser. Amer. Soc. Artif. Int. Organs J., 38, 1992, pp. 88 — 90

[25] DIDISHEIM, P., DEWANJEE, M.K., FRISK, C.S., KAYE, M.P. and FASS, D.N., Animal models for predicting clinical performance of biomaterials for cardiovascular use. In: Boretos J.W. and Eden M. (Eds). Contemporary Biomaterials, Noyes Publications, Park Ridge, NJ, USA, 1984, pp. 132 — 179

[26] 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. Trans. Amer. Soc. Artif. Int. Organs, 30, 1984, pp. 370 — 376

[27] DIDISHEIM, P., OLSEN, D.B., FARRAR, D.J., PORTNER, P.M., GRIFFITH, B.P., PENNINGTON, D.G., JOIST, J.H., SCHOEN, J.F., GRISTINA, A.G. and ANDERSON, J.M., Infections and thromboembolism with implantable cardiovascular devices. Trans. Amer. Soc. Artif. Int. Organs, 35, 1989, pp. 54 — 70

[28] DIDISHEIM, P., STROPP, J.Q., BOROWICK, J.H. and GRABOWSKI, E.F., Species differences in platelet adhesion to biomaterials: investigation by a two-stage technique, Trans. Amer. Soc. Artif. Int. Organs, 2, 1979, pp. 124 — 132

[29] 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, Bioengineering Research Group, Division of Heart and Vascular Diseases, NHLBI, Two Rockledge Center, 6701 Rockledge Drive, Bethesda, MD 20892, USA

[30] HARKER, L.A., KELLY, A.B. and HANSON, S.R., Experimental arterial thrombosis in non-human primates. Circulation, 83, Supplement IV, 1991, pp. 41 — 55

[31] HARKER, L.A., MALPASS, T.W., BRANSON, H.E., HESSEL, E.A. II 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, 1980, pp. 824 — 834

[32] HARKER, L.A., RATNER, B.D., and DIDISHEIM, P. (Eds): Cardiovascular Biomaterials and Biocompatibility. Supplement to Cardiovasc. Pathol., 2(3) (Suppl.), Jul-Sept 1993, pp. 1S — 224S

[33] KARWATH, R., SCHÜRER, M. and WOLF, H., Measurement of platelet adhesiveness onto artificial surfaces using Cr-51 and In-111 labelled platelets. Studia Biophys., 131, 1989, pp. 117 — 123

[34] KATAOKA, K., MAEDA, M., NISHIMURA, T., NITADORI, TSURUTA, T., AKAIKE, T., and SAKURAI, Y., Estimation of cell adhesion on polymer surfaces with the use of "column method". J. Biomed. Mater. Res., 14, 1980, pp. 817 — 823

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

[36] LEWIS, J.L., SWEENEY, J., BALDINI, L., FRIEDLAND, G.H., and SALZMAN, E.W., Assessment of thromboresistance of intravenous cannulae by 125 I-fibrinogen scanning. J. Biomed. Mater. Res., 19, 1985, p. 99

[37] MAHIOUT, A., MEINHOLD, H., JORRES, A., KRIEG, R., KESSEL., M., TRETZEL, J. and BAURMEISTER, U., Ex vivo model for preclinical evaluation of dialysers containing new membranes. Life Support Systems, 3, Suppl. 1, 1985, pp. 448 — 452

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

[39] PALATIANOS, G.M., DEWANJEE, M.K., and ROBINSON, R.P., et al. Quantification 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. Amer. Soc. Artif. Int. Organs, 35, 1989, pp. 667 — 670

[40] 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. Appl. Mater., 1, 1990, pp. 49 — 56

[41] SCHOEN, F.J., Interventional and surgical cardiovascular pathology. Appendix: Pathologic analysis of the cardiovascular system and prosthetic devices, W.B. Saunders Co., Philadelphia, 1989, pp. 369 — 396

[42] ROSENGART, T.K., LANG, S.J., Valvular Heart Disease. In. Barrie, P.S., Shires, G.T., Surgical Intensive Care, Little, Brown and Company, Boston, 1993, pp. 577 — 612

[43] ANDERSON, J.M., Cardiovascular Device Retrieval and Evaluation. In: Harker, L.A., Ratner, B.D., Didisheim, P. (Eds). Cardiovascular Biomaterials and Biocompatibility. Supplement to Cardiovasc. Pathol., 2, (3) (Suppl.), Jul-Sept 1993, pp. 199S — 208S

[44] SPENCER, P.C., SCHMIDT, B., SAMTLEBEN, W., BOSCH, T. and GURLAND, H.J., Ex vivo model of hemodialysis membrane biocompatibility. Trans. Amer. Soc. Artif. Int. Organs, 31, 1985, pp. 495 — 498

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

[46] 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, 1990, pp. 776 — 782

[47] 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, 2nd edn. W.B. Saunders, Philadelphia, 1989, pp. 447 — 452

[48] ZINGG, W., IP, W.F., SEFTON, M.V., and MANCER, K., A chronic arteriovenous shunt for the testing of biomaterials and devices in dogs. Life Support Systems, 4, 1986, pp. 221 — 229

[49] World Health Organization, Recommended methods for the visual determination of white cells and platelet counts. Document WHO/LAB/88.3, 1988

[50] ICH: Note for Guidance on Validation of Analytical Procedures: Methodology (CPMP/ICH/281/95) and Note for Guidance on Validation of Analytical Methods: Definitions and Terminology (CPMP/ICH/381/95), The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products

[51] GROTEMEYER, K.-H., VIAND, R., BEYKIRCH, K. Thrombozytenfunktion bei vasomotorischen. Kopfschmerzen und Migränekopfschmerzen. Dtsch. Med. Wschr., 108, 1983, pp. 775 — 778

[52] WU, K.K., HOAK, J.C. A new method for the quantitative detection of platelet aggregates in patients with arterial insufficiency. Lancet, 1974 II, p. 924

[53] KUNICKI, T.J., TUCELLI, M., BECKER, G.A., ASTER, R.H., A study of variables affecting the quality of platelets stored at room temperature. Transfusion, 15, 1975, pp. 414 — 421

[54] CHANDLER, A.B., In Vitro thrombotic coagulation of the blood: a method for producing a thrombus. Lab. Investigations, 7, 1958, pp. 110 — 114

[55] GOODMAN, S.L., LELAH, M.D., LAMBRECHT, L.K., COOPER, S.L., ALBRECHT, R.M., In vitro vs. Ex vivo Platelet Deposition on Polymer Surfaces. Scanning Electron Microscopy, I, 1984, pp. 279 — 290

[56] GOODMAN, S.L., COOPER, S.L., ALBRECHT, R.M., Activation of Platelets from Humans, Canines, and Macaques on Polymer Surfaces. Progress in Artificial Organs, ISAO Press, 1985

[57] ICSH Panel on Diagnostic Application of Radionuclides. Recommended method or 111Indium Platelet survival studies. J. Nuclear Med., 29, 1988, pp. 564 — 566

[58] NCCLS and ICSH. Methods for reticulocyte counting (Flow cytometry and supravital dyes), approved guideline. NCCLS document H44-A. Vol. 17, No. 15, 1997

[59] LEWIS, S.M., ROWAN, R.M., KUBOTA, F., Evaluation of a prototype for a reference platelet counter. J. Clin. Pathol., 43, 1990, pp. 932 — 936

[60] CHIGNIER, E., PARISE, M., MCGREGOR, L., DELABRE, C., FAUCOMPRET, S., MCGREGOR, J., A P-Selectin/CD62P monoclonal antibody (LYP-20), in Tandem with Flow Cytometry Detects in vivo activated circulating rat platelets in severe vascular trauma. Thrombosis and Haemostasis, 72, 1994, pp. 745 — 749

[61] KUNDU, S., HELLERMAN, E., SIO, R., GARCIA, C., OSTGAARD, R., Characterization of an in vitro Platelet function Analyzer, PFA-100. Clin. Appl. Thrombosis/Hemostasis, 2, 1996, pp. 241 — 249

Статьи, цитируемые в приложении С

[62] Taber's Cyclopedic Medical Dictionary, 17th Edition, F.A. Davis Company, Philadelphia, PA, 1993

[63] MUELLER, M.R., SCHIMA, H., ENGELHARDT, H., SALAT, A., OLSEN, D.B., LOSERT, U., WOLNER, E., In vitro Hematological Testing of Rotary Blood Pumps: Remarks on Standardization and Data Interpretation, Artif. Organs, 17(2), 1993, pp. 102 — 110

[64] NORTHUP, S.J., Hemocompatibility: Not all devices are created equal. Med. Devic Diagnost. Ind., Jan. 1997, pp. 145 — 150

[65] REED, K.W., YALKOWSKY, S.H., Lysis of human red blood cells in the presence of various cosolvents. J. Par. Sci. Technol., 39(2), 1985, pp. 64 — 68

[66] HOCH, J.R., SILVER, D., Hemostasis and Thrombosis, In Vascular Surgery: A Comprehensive Review, 3rd edition, W.S. Moore, ed., W.B. Saunders, Philadelphia, 63 — 79, 1991

[67] OFFEMAN, R.D., WILLIAMS, M.C., Material effects in shear-induced hemolysis, Biomater. Med. Dev. Art. Org., 7, 979, pp. 359 — 391

[68] LAMPERT, R.H., WILLIAMS, M.C., Effect of surface materials on shear-induced hemolysis, J. Biomed. Mater. Res., 6, 1972, pp. 499 — 532

[69] OBENG, E.K., CADWALLADER, D.E., In vitro dynamic method for evaluating the hemolytic potential of intravenous solutions. J. Parenteral Sci. Technol., 43, 1989, pp. 167 — 173

[70] HENRY, J.B., Hematology and Coagulation, In: Clinical Diagnosis & Management By Laboratory Methods, 18th edn., W.B. Saunders Co., Philadelphia, PA, USA, 556 — 603, 1991

[71] International Committee for Standardization in Haematology (ICSH): Recommendations for reference method for haemoglobinometry in human blood. (ICSH Standard EP 6/2: 1995) and specifications for international hemiglobin cyanide standard(4th edition) J. Clin. Path., 49, 1996, pp. 279 — 274

[72] MALINAUSKAS, R.A. Plasma hemoglobin measurement techniques for the in vitro evaluation of blood damage caused by medical devices, Artif. Organs, 21, 1997, pp. 1255 — 1267

[73] Sigma Diagnostics: Plasma Hemoglobin: Quantitative, colorimetric determination in plasma at 600nm (Procedure No. 527, April 1991) Sigma Diagnostics, St. Louis, MO

[74] STANDEFER, J.C., VANDERJAGT, D. Use of tetramethylbenzidine in plasma hemoglobin assay. Clin. Chem., 23, 1997, pp. 749 — 751

[75] FAIRBANKS, V.F., ZIESMER, S.C., O'BRIEN, P.C. Methods for measuring plasma hemoglobin in micromolar concentration compared. Clin. Chem. 1992; 38:132 — 140. (Erratum-Correction: Measurements of Plasma Hemoglobin, Clin. Chem., 39, 1993, pp. 2027 — 2028

[76] HARBOE, M., A method for determination of haemoglobin in plasma by near-ultraviolet spectrophotometry. Scand. J. Clin. Lab Invest., 11, 1959, pp. 66 — 70

[77] CRIPPS, C.M. Rapid method for the estimation of plasma haemoglobin levels. J. Clin. Pathol., 21, 1968, pp. 110 — 112

[78] TAULIER, A. [Value of derivative spectrophotometry for the determination of plasma and urinary haemoglobin. Comparison with the method using Allen's correction]. Ann. Biol. Clin. (Paris) 44, 1986, pp. 242 — 248 French

[79] LAMMERS, M., GRESSNER, A.M., Immunonephelometric quantification of free hemoglobin. J. Clin. Chem. Clin. Biochem., 25, 1987, pp. 363 — 367

[80] Standards for Blood Banks and Transfusion Services, 16th edn. Bethesda, MD: American Association of Blood Banks, 1994

[81] Guide to the Preparation, Use and Quality Assurance of Blood Components. Strasbourg: Council of Europe Publishing and Documentation Service, 1992, pp. 37 — 38

[82] Anticoagulant Citrate Dextrose Solution. U.S. Pharmacopeia 23, 1995, p. 119

[83] Anticoagulant and preservative solutions for human blood: Anticoagulant acid-citrate-glucose solutions (ACD) and Anticoagulant citrate-phosphate-glucose solution (CPD). European Pharmacopoeia 0209, 1997, pp. 400 — 403

[84] Anticoagulant Citrate Phosphate Dextrose Solution. U.S. Pharmacopeia 23, 1995, pp. 119 — 120

[85] Anticoagulant Citrate Phosphate Dextrose Adenine Solution, U.S. Pharmacopeia 23, 1995, pp. 121 — 122

[86] Anticoagulant Heparin Solution. U.S. Pharmacopeia 23, 1995, p. 122

[87] Anticoagulant Sodium Citrate Solution. U.S. Pharmacopeia 23, 1995, p. 122

[88] 29 CFR, Code of Federal Regulations, 1910. 1030, Bloodborne Pathogens

[89] WENNBERG, A., HENSTEN-PETTERSEN, A., Sensitivity of erythrocytes from various species to in vitro hemolyzation, J. Biomed. Mater. Res., 15, 1981, pp. 433 — 435

[90] A Colour Atlas of Comparative, Diagnostic and Experimental Haematology, Mosby-Year Book Europe Limited, London, England, 1994

[91] Sterile plastic containers for human blood and blood components. European Pharmacopoeia, 3.2.3, 1997, pp. 175 — 179

УДК 615.46:002:006.354 ОКС 11.100.20 Р20 ОКП 94 4000

Ключевые слова: медицинские изделия, гемосовместимость, кровь, биологические исследования, тромбоз, гематология, система комплемента

Редактор *О.А. Стояновская*
Технический редактор *Н.С. Гришанова*
Корректор *Л.Я. Митрофанова*
Компьютерная верстка *И.А. Налейкиной*

Сдано в набор 05.05.2010. Подписано в печать 21.06.2010. Формат 60 × 84 1/8. Бумага офсетная. Гарнитура Ариал. Печать офсетная. Усл. печ. л. 3,72. Уч.-изд. л. 4,00. Тираж 89 экз. Зак. 505.

ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ», 123995 Москва, Гранатный пер., 4.
gost.e-ecolog.ru ›@gostinfo.ru
Набрано во ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ» на ПЭВМ.
Отпечатано в филиале ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ» — тип. «Московский печатник», 105062 Москва, Лялин пер., 6.

gost.e-ecolog.ru