

**МЕТОД КОМПЛЕКСНОЙ ОЦЕНКИ  
ГЕМО(НЕ)СОВМЕСТИМОСТИ ПОЛИМЕРНЫХ  
МАТЕРИАЛОВ МЕДИЦИНСКОГО НАЗНАЧЕНИЯ**

Инструкция по применению

Учреждения-разработчики: лаборатория гемо- и лимфосорбции Центральной научно исследовательской лаборатории Белорусского государственного медицинского университета; лаборатория прикладной биохимии Института биоорганической химии НАН Беларуси

Авторы: д-р мед. наук, проф. В. В. Кирковский, д-р биол. наук, проф. В. П. Голубович, мл. науч. сотр. Д. А. Макаревич, канд. мед. наук, доц. Д. В. Введенский; мл. науч. сотр. Т. В. Рябцева; мл. науч. сотр. Е. Л. Седёлкина

## Методология

Гемосовместимость — это обобщенная характеристика материала, предназначенного для длительного или кратковременного контакта с кровью или ее компонентами [1–4].

Особенностью данного метода является комплексный анализ влияния полимерных материалов, как на клеточный состав, так и на гуморальные факторы крови, учитывающий изменения активности иммунной системы. Гемосовместимость по одному из определяемых параметров может сочетаться с гемонесовместимостью по другому, поэтому мы предлагаем использовать метод общего счёта, когда за отклонение изучаемого показателя начисляется определённое количество баллов. Далее баллы суммируются, и выводится комплексная оценка гемо(не)совместимости полимера. Проанализировав изменение показателей по различным параметрам данной схемы можно делать вывод о возможности применения исследуемого полимера в медицинской практике.

### **Бальная система оценки гемо(не)совместимости полимерных материалов (матриц)**

Данная система обобщает полученные результаты по всем нижеописанным методам оценки гемо(не)совместимости полимеров (формулы 1–11). Для оценки степени гемо(не)совместимости испытываемого полимера по каждому изучаемому параметру рассчитывается процент изменения показателя от исходного и присваивается определенное количество баллов. Отклонение от 0,1–1,0 % — это 0 баллов, от 1,1–5,0 % — 1 балл, от 5,1–10,0 % — 2 балла, от 10,1–15,0 % — 3 балла, от 15,1–25,0 % — 4 балла, от 25,1 % и выше — 5 баллов. Максимально возможное количество баллов — 65. Материал, набравший в тесте *in vitro* минимальное количество баллов, является наиболее гемосовместимым: 0–13 баллов — высокая гемосовместимость, 14–29 — хорошая гемосовместимость, 30–49 — удовлетворительная гемосовместимость, 50–65 — гемонесовместимый полимерный материал.

В данную систему включены стандартные методики, воспроизводимые в любой биохимической лаборатории. Предложенную систему можно использовать в качестве стандарта определения гемосовместимости полимерных матриц для гемосорбентов.

В качестве оценки влияния синтетических материалов на клеточную компоненту крови исследуются количественные и качественные характеристики клеток крови: эритроцитов, тромбоцитов, лейкоцитов [5–9].

В качестве оценки гуморальной компоненты крови определяются активность таких ферментов, как эластаза и каталаза, а также изменения в активности системы комплемента [6–9].

Разработанный метод оценки гемо(не)совместимости полимерных материалов медицинского назначения является объективным, обладает высокой чувствительностью и производительностью. Предложенную систему можно использовать в качестве стандарта определения гемо(не)совместимости полимерных матриц для гемосорбентов.

### **ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ**

Метод оценки гемо(не)совместимости полимерных материалов медицинского назначения рекомендуется применять в следующих случаях:

- синтез новых полимеров и оценка возможности их использования в медицине;
- при разработке методов модификации полимеров с целью повышения их биосовместимости;
- скрининговые исследования известных полимерных материалов с целью определения возможности их использования в медицине.

### **Перечень необходимого оборудования, реактивов и средств**

Оборудование:

1. Спектрофотометр «SOLAR» 1251-С.
2. Центрифуга ОПН-8-УХЛ 4.2.
3. Насос перистальтический аппарат гемосорбции ДПР 72.
4. Водяная баня до 100 °С.
5. Термостат воздушный типа ТС-80М-2 на 37 °С.
6. Микроскоп с увеличением x20, x40.

Лабораторная посуда и принадлежности:

1. Стандартные центрифужные пробирки емкостью по 10 мл.
2. Мерные стаканчики до 150 мл.
3. Мерные цилиндры на 200 мл.
4. Полуавтоматические пипетки-дозаторы с объемом на 50–1000 мкл.
5. Кровопроводящие магистрали.
6. Кюветы для спектрофотометрии.
7. Планшет плоскодонный 96-луночный.

Материалы и реактивы:

1. Раствор хлорида натрия (0,09–0,45 %).

2. Фосфатный буфер (рН 7,4 155 мМ, рН 7,4 5 мМ).
3. Сухие пекарские дрожжи *S. cerevisiae* (ГОСТ 28483–90).
4. Форболмиристатацетат (матричный раствор 1 г/мл).
5. Краска Романовского–Гимзе.
6. Раствор фиколл-верографина ( $\rho = 1,120 \text{ г/см}^3$ ,  $\rho = 1,080 \text{ г/см}^3$ ).
7. Раствор Хенкса (без  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Mg}^{2+}$ ).
8. Уксусная кислота (3 %).
9. Нитросинийтетразолий.
10. Диметилсульфаксид.
11. Гидроксид К (2М).
12. Раствор АДФ (рН 7,35 20 мкг/мл).
13. Эмульсия линолевой кислоты (1 мМ).
14. Перекись водорода (10 мМ).
15. Додецилсульфатнатрия (6 %).
16. Ортофосфорная кислота (3 %).
17. Тиобарбитуровая кислота (0,8).
18. Эритроциты барана.
19. Гемолитическая сыворотка.
20. Субстрат эластаз Вос-Glu(OBu)-Pro-Nva-pNA.
21. Трис-НСl-буфер (0,1 М);

## Технология использования метода

### Методы для оценки гемо(не)совместимости матриц в отношении клеточного звена крови

**Определение изменения концентрации клеток крови.** Подсчет процента изменения показателя производят по формуле:

$$X = ((C_{\text{до}} - C_{\text{после}})/C_{\text{до}}) \times 100 \%, \quad (1)$$

где  $C_{\text{до}}$  — концентрация клеток крови без контакта с экспериментальным образцом;  $C_{\text{после}}$  — концентрация клеток крови после эксперимента;  $X$  — процент изменения параметра.

**Определение осмотической резистентности (устойчивости) эритроцитов.** В исследовании используют гепаринизированную венозную кровь до и после стендового эксперимента. В качестве модели максимально возможного снижения осмотической резистентности эритроцитов производится окисление крови в присутствии двухвалентных ионов меди в конечной концентрации 1 мМ [10, 11].

До эксперимента отбирается 600 мкл крови. 200 мкл инкубируется с ионами двухвалентной меди в концентрации 1 мМ в течение 1 часа. Непосредственно после эксперимента отбирают 200 мкл крови, контактировавшей с полимером.

Предварительно готовят рабочие растворы натрия хлорида различной концентрации: 0,1 %; 0,45 %. Рабочие растворы хлорида натрия разливают в 4 центрифужные пробирки по 5 мл. В 1-ю пробирку, содержащую 0,1%-ный раствор хлорида натрия, добавляют 200 мкл из пробы до эксперимента. Во 2-ю пробирку, содержащую 0,45%-ный раствор хлорида натрия, добавляют 200 мкл пробы до эксперимента ( $G_{до}$ ). В 3-ю пробирку, содержащую 0,45%-ный раствор хлорида натрия, добавляют 200 мкл пробы после эксперимента ( $G_{после}$ ). В 4-ю пробирку, содержащую 0,45%-ный раствор хлорида натрия, добавляют 200 мкл пробы после инкубации с ионами меди ( $G_{макс}$ ). Пробирки оставляют на 1 ч при комнатной температуре, а затем центрифугируют (5 мин при 2000 об/мин). Надосадочную жидкость из каждой пробирки исследуют на спектрофотометре при длине волны  $\lambda = 512$  нм. В качестве холостой пробы используют 0,45%-ный раствор натрия хлорида. Определяют процент (степень) гемолиза, приняв за 100 % гемолиз в пробирке с 0,1%-ным раствором натрия хлорида ( $G$ ).

Далее подсчитывают процент изменения данного показателя по формуле:

$$X = ((G_{после} - G_{до}) / (G_{макс} - G_{до})) \times 100 \%. \quad (2)$$

**Оценка степени гемолиза эритроцитов в процессе взаимодействия крови с полимером.** Разрушение эритроцитов непосредственно во время контакта крови с исследуемым полимером фиксируется по степени гемолиза в плазме крови [12].

До постановки стендового эксперимента отбирается 1 мл крови: 500 мкл крови смешивается с 1,5 мл Na-фосфатного буферного раствора 155 мМ рН 7,4 ( $A_{до}$ ), 500 мкл крови добавляется в пробирку с 1,5 мл Na-фосфатного буферного раствора 5 мМ рН 7,4 для моделирования максимального разрушения эритроцитов ( $A_{макс}$ ). После постановки стендового эксперимента отбирается 500 мкл крови и смешивается с 1,5 мл Na-фосфатного буферного раствора 155 мМ рН 7,4 ( $A_{после}$ ). Пробирки инкубируют 10 мин при температуре 37 °С, а затем центрифугируют (5 мин при 2000 об/мин). Надосадочную жидкость из каждой пробирки исследуют на спектрофотометре при длине волны  $\lambda = 545$  нм ( $A$ ). В качестве холостой пробы используют Na-фосфатный буферный раствор 155 мМ, рН 7,4. Процент изменения показателя определяют по следующей формуле:

$$X = ((A_{после} - A_{до}) / (A_{макс} - A_{до})) \times 100 \%. \quad (3)$$

**Оценка фагоцитарной активности нейтрофилов.** Используют 300 мкл гепаринизированной венозной крови, инкубированной с экспериментальным образцом ( $ФП_{после}$ ), пробу 300 мкл крови без инкубации с полимером, но с активатором ФМА (форболмиристатацетат) в конечной концентрации 0,1 мкМ ( $ФП_{макс}$ ), пробу 300 мкл крови в отсутствие какого-либо активатора и без инкубации с экспериментальным образцом ( $ФП_{до}$ ). В каждую пробу добавляют 300 мкл суспензии пекарских дрожжей [8].

Инкубацию проводят в термостате (37 °С) 30 минут. Затем, для остановки реакции фагоцитоза, пробы помещают на 30 секунд в морозильную камеру ( $t = -18\text{ °C}$ ). Далее центрифугируют при 1500 об/мин 5 минут и отбирают из верхнего слоя 20 мкл, делают мазки. Приготовленные мазки сушат на воздухе, затем фиксируют в течение 10 минут этанолом. После полного высыхания окрашивают по Романовскому–Гимзе. После высыхания мазков проводят микроскопический учет. Считают не менее 100 клеток нейтрофилов и производят расчет фагоцитарного показателя:

$$\text{ФП} = A/(A+B) \times 100 \%,$$

где А — количество фагоцитирующих клеток; В — количество нефагоцитирующих нейтрофилов («пустых»); ФП — фагоцитарный показатель.

Затем рассчитывают процент изменения показателя:

$$X = ((\text{ФП}_{\text{после}} - \text{ФП}_{\text{до}})/(\text{ФП}_{\text{макс}} - \text{ФП}_{\text{до}})) \times 100 \%. \quad (4)$$

**Оценка адгезивной активности нейтрофилов.** Для изучения адгезивной активности нейтрофилов необходимо выделить полиморфноядерные клетки из цельной крови. Цельную кровь отбирают по 4 мл до и после стендового эксперимента с экспериментальным образцом. Цельную кровь инкубируют для оседания эритроцитов при комнатной температуре в течение 30 минут. Отбирают образовавшуюся лейковзвесь. Лейковзвесь в объеме 3 мл наслаивают на растворы градиентов плотности: 1 мл фиколл-верографина с  $\rho = 1,120\text{ г/см}^3$ , 1 мл фиколл-верографина с  $\rho = 1,080\text{ г/см}^3$  [13].

Выделенную суспензию нейтрофилов в количестве 100  $\mu\text{l}$  вносят в лунки 96-луночного плоскодонного планшета. Для активации клеток используют ФМА (форболмиристатацетат) в конечной концентрации 0,1 мкМ. Учёт результатов проводят на спектрофотометре при длине волны  $\lambda = 650\text{ нм}$  (П). Затем подсчитывают процент изменения данного показателя по формуле:

$$X = ((P_{\text{после}} - P_{\text{до}})/(P_{\text{акт}} - P_{\text{до}})) \times 100 \%, \quad (5)$$

где  $P_{\text{после}}$  — проба после контакта с экспериментальным образцом;  $P_{\text{до}}$  — проба без контакта с экспериментальным образцом;  $P_{\text{акт}}$  — проба без контакта с экспериментальным образцом с добавлением активатора; X — процент изменения параметра.

**Оценка кислородзависимого метаболизма нейтрофилов.** Для изучения кислородзависимого метаболизма нейтрофилов необходимо выделить полиморфноядерные клетки из цельной крови. Цельную кровь отбирают по 4 мл до стендового эксперимента и после. Выделенную суспензию нейтрофилов в количестве 100  $\mu\text{l}$  вносят в пробирки типа «эппендорф». Для активации клеток используют ФМА (форболмиристатацетат) в конечной концентрации 0,1 мкМ. Добавляют 100 мкл фосфатного буфера и 50 мкл НСТ, инкубируют 20 минут при 37 °С. Остановку реакции проводят путем центрифугирования в течение 15 минут при 1000 об/мин. Для

фиксации используют 0,9 % NaCl и центрифугируют еще 5 минут при 2000 об/мин. Экстракцию проводят добавлением 130 мкл DMSO и 70 мкл 2М КОН, инкубируют 20 минут при 60 °С. Регистрацию результатов проводят спектрофотометрически, измеряют оптическую плотность при длинах волн  $\lambda = 490$  нм и  $\lambda = 630$  нм. Концентрацию гранул формазана оценивают по разнице оптической плотности раствора  $D(\lambda = 630) - D(\lambda = 490)$  (П) [14]. Затем подсчитывают процент изменения данного показателя по формуле:

$$X = ((P_{\text{после}} - P_{\text{до}})/(P_{\text{акт}} - P_{\text{до}})) \times 100 \%, \quad (6)$$

где  $P_{\text{после}}$  — проба после контакта с полимером;  $P_{\text{до}}$  — проба без контакта с полимером;  $P_{\text{акт}}$  — проба без контакта с полимером с добавлением активатора;  $X$  — процент изменения параметра.

**Оценка агрегации тромбоцитов.** Для исследования используют тромбоцитарную плазму, полученную путём центрифугирования цельной крови в течение 5 минут при 1000 об/мин. Забор крови проводят до и после контакта с экспериментальным образцом. Далее набирают в пробирку 200 мкл тромбоцитарной плазмы (250 000 тромбоцитов в 1 мкл) и помещают ее в водяную баню при 37 °С. Через одну минуту вносят 100 мкл раствора АДФ (рН 7,35 в концентрации 20 мкг/мл) и немедленно включают секундомер. Покачивая или потряхивая пробирку, отмечают время образования в смеси крупных агрегатов тромбоцитов (Т) [15].

Затем подсчитывают процент изменения данного показателя по формуле:

$$X = ((T_{\text{до}} - T_{\text{после}})/T_{\text{до}}) \times 100 \%, \quad (7)$$

где  $T_{\text{до}}$  — проба без контакта с экспериментальным образцом;  $T_{\text{после}}$  — проба после эксперимента;  $X$  — процент изменения параметра.

#### **Оценка гемо(не)совместимости матриц в отношении гуморального звена крови**

**Определение прооксидантной активности крови.** Для определения прооксидантной активности используют плазму крови, полученную до и после стендового эксперимента. Плазму инкубируют в реакционной системе с эмульсией линолевой кислоты (1 мМ), с добавлением перекиси водорода (10 мМ) в течение 90 минут. О прооксидантной активности судят по ускорению перекисного окисления линолевой кислоты в присутствии плазмы по сравнению с контролем, где вместо плазмы используют физиологический раствор. Активность процессов ПОЛ оценивают спектрофотометрически по накоплению продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (ТБК-активных продуктов) [16–18]:

$$C = ((D \times 5.4)/1.56) \times 10,$$

где  $D$  — оптическая плотность пробы при 532 нм.

Скорость накопления ТБК-АП в системе окисления подсчитывают по формуле:

$$A = ((C_{\text{опыта}} - C_{\text{контроль}}) / t_{\text{инкуб.}}) \times 1000, \text{ нмоль/л}\cdot\text{мин},$$

где  $A$  — скорость накопления ТБК-АП;  $C_{\text{опыта}}$  — концентрация ТБК-АП в опытной пробе;  $C_{\text{контроль}}$  — концентрация ТБК-АП в контрольной пробе;  $X$  — процент изменения параметра.

Затем подсчитывают процент изменения данного показателя по формуле:

$$X = ((A_{\text{до}} - A_{\text{после}}) / A_{\text{до}}) \times 100 \%, \quad (8)$$

где  $A_{\text{до}}$  — проба без контакта с экспериментальным образцом;  $A_{\text{после}}$  — проба после эксперимента;  $X$  — процент изменения параметра.

**Определение ТБК-активных продуктов перекисного окисления липидов.** Для определения ТБК-активных продуктов используют 0,8%-ный раствор тиобарбитуровой кислоты (ТБК). ТБК-тест основан на том, что при нагревании в кислой среде альдегидные продукты ПОЛ реагируют с ТБК с образованием окрашенного комплекса, поглощающего в области видимого спектра с длиной волны 532–535 нм. ТБК-тест показывает суммарное накопление продуктов ПОЛ, как присутствующих в испытуемом биологическом материале, так и образующихся в ходе нагревания с ТБК. Поскольку спектр этих продуктов весьма разнообразен, используют термин ТБК-активные продукты [19].

Для анализа содержания ТБК-АП к 1 мл пробы ( $A_{\text{до}}$ ,  $A_{\text{после}}$ ) приливают 0,4 мл 6%-ного раствора додецил сульфата натрия, 3 мл 3%-ной ортофосфорной кислоты и 1 мл 0,8 % ТБК (рН = 7.4). Затем пробирки накрывают алюминиевой фольгой для предотвращения испарения жидкости из реакционной смеси и помещают на водяную баню на 30 минут при 100 °С. После инкубации на водяной бане пробирки охлаждают в холодной воде 3–5 минут. Измерение оптической плотности опытных проб проводят на спектрофотометре при длине волны 532 нм. Расчет содержания продуктов, реагирующих с ТБК, проводят с учетом коэффициента молярной экстинкции комплекса ТБК-малоновый диальдегид, равного  $1,56 \cdot 10^5 \text{ моль}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$  по следующей формуле:

$$C_{\text{ТБК}} = D \times V_{\text{смеси}} / 1,56 \times 10^5 \times V_{\text{пробы}}.$$

Затем подсчитывают процент изменения данного показателя по формуле:

$$X = ((A_{\text{до}} - A_{\text{после}}) / A_{\text{до}}) \times 100 \%, \quad (9)$$

где  $A_{\text{до}}$  — проба без контакта с экспериментальным образцом;  $A_{\text{после}}$  — проба после эксперимента;  $X$  — процент изменения параметра.

**Определение активности системы комплемента (методом 50 % гемолиза).** Метод иммунного гемолиза основан на комплемент-зависимом гемолизе нагруженных эритроцитов барана [9]. Для полного гемолиза по классическому пути необходимо наличие всех компонентов комплемента.



В соответствии с международным стандартом, за единицу активности комплемента принимается такое его количество, которое вызывает 50 % гемолиз в стандартных условиях (стандартные сенсibilизированные эритроциты барана, стандартные буферные системы, стандартные физико-химические условия проведения реакции и т. д.). Гемолитическая активность комплемента выражается в гемолитических единицах и обозначается  $CH_{50}$ .

Для определения активности комплемента используют сыворотку крови, полученную до и после контакта с полимерным материалом в стендовом эксперименте ( $A_{до}$ ,  $A_{после}$ ). Далее приводится методика постановка реакции.

Эритроциты барана отмывают 3 раза физиологическим раствором. Готовят 3%-ную взвесь отмытых эритроцитов. Готовят разведение гемолитической сыворотки в утроенном титре. Сенсibilизация эритроцитов барана (приготовление гемолитической системы): к взвеси эритроцитов приливают равный объём разведённой гемолитической сыворотки, инкубируют при 37 °С в термостате 30 минут. Раскапывают ряд пробирок для получения стандарта оптической плотности при различном проценте гемолиза эритроцитов. Разводят опытные образцы сывороток. Для каждой сыворотки — 10 разведений. Инкубируют пробирки 45 минут в термостате при 37 °С, далее на 4 минуты помещают в холодильник при 4 °С. Центрифугируют 10 минут при 2000 об/мин. Измерение оптической плотности надосадочной жидкости при длине волны 512 нм. Подсчёт полученных результатов: выбирают пробирку, в которой оптическая плотность приближается к оптической плотности в пробирке с 50 % гемолизом. Количество сыворотки в данной пробирке делят на десять (т. к. сыворотку разводят в 10 раз). Подсчитывают количество условных единиц гемолиза  $CH_{50}$  (А) по следующей формуле:

$$1/\text{количество сыворотки} = x CH_{50}.$$

Далее производят расчёт процента изменения данного показателя после контакта с полимером по формуле:

$$X = ((A_{до} - A_{после})/A_{до}) \times 100 \%, \quad (10)$$

где  $A_{до}$  — проба без контакта с экспериментальным образцом;  $A_{после}$  — проба после эксперимента; X — процент изменения параметра.

**Определение активности эластазы.** Ход определения активности эластазы в плазме и сыворотке крови [20]. В опытную пробу ( $A_{до}$ ,  $A_{после}$ ) вносят 0,1 мл плазмы крови, 2,7 мл 0,1 М Трис-НСl буферного раствора (рН 8,0) и 0,1 мл субстрата (Woc-Glu(OBu)-Pro-Nva-pNA). Смесь инкубируют в течение 4 ч при 37 °С, после чего добавляют 0,1 мл ледяной уксусной кислоты. В холостую пробу уксусную кислоту вносят перед субстратом. Пробу центрифугируют 30 мин при 5000 об/мин. Надосадочную жидкость сливают и определяют оптическую плотность опытных проб

против холостых при 410 нм (за контроль принимают оптическую плотность дистиллированной воды). Количество п-нитроанилина, образовавшегося после расщепления субстрата, определяют по калибровочному графику. Для его построения на оси абсцисс откладывают различные концентрации п-нитроанилина (0,02–0,24 мкмоль/л), на оси ординат — оптическую плотность соответствующих растворов (п-нитроанилин растворяют в дистиллированной воде). Расчет активности эластазы проводят по формуле:

$$\frac{x(\text{мкмоль/л}) \cdot y(\text{мл})}{z(\text{мл}) \cdot \mu(\text{ч})} = \text{мкмоль}/(\text{ч} \cdot \text{л}),$$

где  $x$  — количество образовавшегося п-нитроанилина (мкмоль/л),  $y$  — коэффициент для пересчета на 1 л плазмы крови;  $z$  мл — количество лизата тромбоцитов в пробе (мл);  $\mu$  — длительность инкубации (ч).

Затем подсчитывают процент изменения данного показателя по формуле:

$$X = ((A_{\text{до}} - A_{\text{после}})/A_{\text{до}}) \times 100 \%, \quad (11)$$

где  $A_{\text{до}}$  — проба без контакта с экспериментальным образцом;  $A_{\text{после}}$  — проба после эксперимента.

## Результаты

Основным результатом внедрения метода оценки гемо(не)совместимости полимерных материалов медицинского назначения является выбор наиболее гемосовместимого полимера в качестве матрицы для создания новых биоспецифических гемосорбентов (прил. 1).

На основании вышеизложенного этот метод может быть рекомендован для внедрения в практику научно-практических учреждениях Беларуси.

## Контроль качества исследований

Для получения объективных и воспроизводимых результатов необходимо строго соблюдать правила настройки лабораторного оборудования и процедуры ежедневной проверки в соответствии с инструкцией по эксплуатации. Для подтверждения объективности или истинности получаемых результатов исследование необходимо проводить одномоментно и в дублях (триплетах), на крови одного донора. При таких условиях гарантируется воспроизводимость и истинность полученных результатов.

## Техника безопасности

Правила техники безопасности регламентируются инструкцией по применению стандартного лабораторного оборудования (микроскоп, термостат и др.), правилами техники безопасности при работе в клиничко-диагностической лаборатории и нормативными документами по соблюдению санитарно-эпидемиологического режима при работе с биологическими материалами.

*Возможные осложнения:* при разработке методики не выявлены.

*Противопоказания:* не установлены, поскольку метод относится к клинической лабораторной диагностике.

Репозиторий БГМУ

## Литература

1. *Blood compatible aspects of poly(2-methoxyethylacrylate) (PMEA) — relationship between protein adsorption and platelet adhesion on PMEA surface* / M. Tanaka [et al.] // *Biomaterials*. 2000. Vol. 21. № 14. P. 1471–1481.
2. *Weston, M. J.* Resin column perfusion with blood or plasma separated by the continuous flow centrifuge / M. J. Weston, P. J. Mellon, P. G. Langley // *Clin. Sci.* 1975. Vol. 187–192.
3. *Лопаткин, Н. А.* Эфферентные методы в медицине / Н. А. Лопаткин, Ю. М. Лопухин. М., 1989. С. 56–69.
4. Проблемы разработки и внедрения в клиническую практику методов эфферентной терапии / А. А. Степанюк [и др.] // 4-я Бел. науч.-практ. конф. ; Минский науч.-исслед. ин-т. Минск, 2003. С. 91–92.
5. *Лабораторная гематология* / С. А. Луговская [и др.]. М., 2002. 116 с.
6. *Тиц, Н.* Клиническое руководство по лабораторным тестам / Н. Тиц. М., 2003. 942 с.
7. *Меньшиков, В. В.* Лабораторные методы исследования в клинике / В. В. Меньшиков. М. : Медицина, 1987. 365 с.
8. *Ройтберг, Г. Е.* Лабораторная и инструментальная диагностика внутренних органов / Г. Е. Ройтберг, А. В. Струтынский. М., 2003. 237 с.
9. *Фримель, Г.* Иммунологические методы / Г. Фримель. М. : Медицина, 1987. 466 с.
10. *Изменение реологических свойств крови и осмотической резистентности эритроцитов при активации свободнорадикальный процессов* / Е. В. Ройтман [и др.] // *Тромбоз, гемостаз и реология*. 2001. Т. 3. С. 18–21.
11. *Dasgupta, A.* In vitro lipid peroxidation of human serum catalyzed by cupric ion : antioxidant rather than peroxidant role of ascorbate / A. Dasgupta, J. Zdunek // *Life Sci.* 1992. Vol. 50. P. 875–882.
12. Проблема гомеостаза в аспекте биосовместимости полимерных матриц / Д. А. Макаревич [и др.] // *Материалы Междунар. Науч. конф. «Проблемы регуляции висцеральных функций»*. Минск, 2008. К 2. С. 116–120.
13. *Зинкин, В. Ю.* Способ количественной оценки кислородзависимого метаболизма нейтрофильных гранулоцитов человека / В. Ю. Зинкин, М. А. Годков // *Клин. лаб. диагн.* 2004. № 8. С. 26–29.
14. *Дейл, М. М.* Руководство по иммунофармакологии / М. М. Дейл, Дж. К. Формен. М. : Медицина, 1998.
15. *Определение прооксидантной активности плазмы крови в норме и при патологии* / Т. В. Рябцева [и др.] // *Материалы Респуб. науч. конф. «Молекулярная медицина и биохимическая фармакология»*. Гродно, 2007. С. 162–168.
16. *A rapid method to quantify pro-oxidant activity in cultures of wood-decaying white-rot fungi* / A. N. Kapich [et al.] // *J. of Microbiological Methods*. 2005. Vol. 61. P. 261–271.
17. *Владимиров, Ю. А.* Свободные радикалы в биологических системах / Ю. А. Владимиров // *Соросовский образовательный журнал*. 2000. Т. 6. № 12. С. 13–19.
18. *Гаврилов, В. Б.* Анализ методов определения продуктов перекисного окисления липидов в сыворотке крови по тесту с тиобарбитуровой кислотой / В. Б. Гаврилов, А. Р. Гаврилова, Л. М. Мажуль // *Лабораторное дело*. 1985. № 5. С. 118–20.
19. *Биоспецифический сорбент для реус-иммунизации у беременных* / О. В. Козлякова [и др.] // *Материалов VIII съезда акушеров-гинекологов и неонатологов Респ. Беларусь*. Витебск, 2007. С. 179–181.

**Обоснование целесообразности практического использования  
метода комплексной оценки гемо(не)совместимости  
полимерных материалов медицинского назначения**

Актуальность проблемы гемосовместимости полимерных материалов связана с глобальным ростом потребления синтетических полимерных материалов во всех областях медицины. Подавляющее большинство материалов медицинского назначения функционирует в прямом или косвенном контакте с тканями организма. В ответ на взаимодействие полимера и ткани происходит активация клеток и биологически-активных молекул. В связи с этим проблема биологической совместимости полимерных материалов, является весьма актуальной. Биосовместимость — интегральная характеристика естественного или синтетического полимера, характеризующая его способность взаимодействовать с организмом, не изменяя гомеостаз (Н. А. Лопаткин, Ю. М. Лопухин).

Появление любого нового полимера медицинского назначения всегда связано с необходимостью решения каких-либо конкретных задач определенной области медицины. Для этого полимер должен соответствовать ряду качественных признаков, необходимых для реализации поставленной задачи. Чтобы достичь требуемых свойств, необходимо не только синтезировать специальный материал, но и изучить влияние полимера на жизненно важные процессы, изучить проблему взаимодействия полимера с организмом в целом и его тканями и средами в частности, включая такие аспекты, как биологическое разрушение полимера, деградация полимера и продуктов его метаболизма в живом организме и т. д. (А. А. Степанюк и др.).

В настоящее время в Республике Беларусь активно развивается эфферентная медицина. Эта область медицины изучает в том числе и вопросы детоксикации биологических жидкостей вне организма. Плазмаферез и гемосорбция являются одними из основных методов экстракорпоральной медицины. Для успешной реализации данного направления необходимо использовать максимально инертные полимерные материалы. В настоящее время в лечебно-практических учреждениях широко применяются, разработанные в Республике гемосорбенты «Овосорб», «Липосорб», «Нуклеосорб», «Анти-IgE» (Биоспецифическая сорбция: новые направления в комплексной терапии заболеваний (Т. М. Талако, Д. А. Макаревич, А. А. Рябов, И. М. Ровдо, В. В. Кирковский, В. П. Голубович). Данные сорбенты успешно применяются для лечения гнойно-септической, аллергической и аутоиммунной патологии. Также постоянно ведётся активная

разработка новых гемосорбентов, на различных синтетических матрицах, не обладающих недостатками своих предшественниц.

Существуют различные типы матриц, которые могут быть применены для создания гемосорбентов, так, например, полистирольные активированные шарики «Сферон», цианур-целлюлозные диски, волокна «Фибан» с ионообменными свойствами и др. Однако на сегодняшний день нет единого методического подхода четко отвечающего на вопрос гемо(не)совместимости того или иного полимерного материала медицинского назначения. Поэтому данный метод комплексной оценки гемо(не)совместимости является прогрессивным шагом в направлении развития экстракорпоральной медицины и применения полимеров медицинского назначения в целом.

УТВЕРЖДАЮ

Проректор по научной работе  
С. Л. Кабак  
« \_\_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2009 г.

**Отчёт**  
**о предварительных испытаниях метода комплексной оценки**  
**гемо(не)совместимости полимерных материалов**  
**медицинского назначения**

В соответствии с направлением исследований по разработке биоспецифических гемосорбентов в лаборатории гемо-и лимфосорбции ЦНИЛ были проведены испытания метода комплексной оценки гемо(не)совместимости полимерных материалов медицинского назначения. Для исследований использовали кровь условно здоровых доноров ( $n = 14$ ). В качестве объекта исследований использовали полиакриламидный гель, полипропилен, модифицированный акриловой кислотой.

Исследования по оценке гемо(не)совместимости экспериментальных образцов полиакриламидной матрицы проводились в статическом эксперименте (система с высокой стрессовой составляющей). Статистическая обработка полученных результатов проводилась с использованием непараметрического критерия Манна–Уитни в программе Statistica 9.0.

Результаты проведенных стендовых экспериментов и определения гемо(не)совместимости по предложенной методике представлены в табл. 1.

Исходя из данных, представленных на табл. 1, экспериментальный образец полиакриламидной матрицы показал хорошую гемосовместимость по методу комплексной оценки гемосовместимости. Так наиболее значительными для данного экспериментального образца были изменения гуморального компонента крови, и концентрации тромбоцитов.

Исследования по оценке гемо(не)совместимости экспериментальных образцов полипропиленовой матрицы, модифицированной акриловой кислотой проводились в статическом эксперименте (система с высокой стрессовой составляющей). Статистическая обработка полученных результатов проводилась с использованием непараметрического критерия Манна–Уитни в программе Statistica 9.0.

Результаты проведенных стендовых экспериментов и определения гемо(не)совместимости по предложенной методике представлены в табл. 2.

Таблица 1

## Оценка гемосовместимости полиакриламидной матрицы

Показатель	Значение (%)	Оценка по бальной шкале
Концентрация эритроцитов	0,85 ± 0,14	0
Концентрация лейкоцитов	1,44 ± 0,24	1
Концентрация тромбоцитов	10,92 ± 0,41	3
Определение осмотической резистентности эритроцитов	2,95 ± 0,20	1
Оценка гемолиза эритроцитов	1,70 ± 0,11	1
Оценка фагоцитарной активности нейтрофилов	7,38 ± 0,53	2
Оценка адгезивной активности нейтрофилов	9,02 ± 0,94	2
Оценка кислородзависимого метаболизма нейтрофилов	16,78 ± 1,50**	4
Оценка агрегационной способности тромбоцитов	12,93 ± 1,16	3
Оценка прооксидантной активности крови	14,12 ± 0,77	3
Определение ТБК-активных продуктов	19,14 ± 1,36**	4
Определение активности системы комплемента	1,07 ± 0,12	0
Определения активности эластазы	9,24 ± 0,31	2
Итого		26 баллов*

\* — полиакриламидная матрица (26 баллов), хорошая гемосовместимость; \*\* — разница с исходным уровнем статистически достоверна  $p < 0,05$ .

Таблица 2

## Оценка гемо(не)совместимости полипропиленовой матрицы, модифицированной акриловой кислотой

Показатель	Значение (%)	Оценка по бальной шкале
Концентрация эритроцитов	0,33 ± 0,08	0
Концентрация лейкоцитов	0,81 ± 0,11	0
Концентрация тромбоцитов	2,65 ± 0,18	1
Определение осмотической резистентности эритроцитов	0,14 ± 0,03	0
Оценка гемолиза эритроцитов	0,44 ± 0,09	0
Оценка фагоцитарной активности нейтрофилов	2,57 ± 0,18	1
Оценка адгезивной активности нейтрофилов	3,99 ± 0,57	1
Оценка кислородзависимого метаболизма нейтрофилов	4,20 ± 0,39	1
Оценка агрегационной способности тромбоцитов	7,42 ± 1,31	2
Оценка прооксидантной активности крови	4,49 ± 0,43	2
Определение ТБК-активных продуктов	9,38 ± 0,66	2
Определение активности системы комплемента	0,68 ± 0,03	0
Определения активности эластазы	5,32 ± 0,55	2
Итого		12 баллов*

\* — полипропиленовая матрица (12 баллов), высокая гемосовместимость.



Исходя из данных, представленных на табл. 2, экспериментальный образец полипропиленовой матрицы с привитой акриловой кислотой показал высокую гемосовместимость. Так наиболее значительными для данного экспериментального образца были изменения гуморального звена иммунитета.

При оценке динамики стандартных биохимических показателей для исследуемых полимеров достоверных изменений установлено не было.

Таким образом, результаты применения метода комплексной оценки гемо(не)совместимости полимеров медицинского назначения отражают не только количественные, но и функциональные изменения активности клеточного и гуморального звеньев крови после контакта с заведомо чужеродной полимерной поверхностью. Данный метод может быть применен для оценки гемо(не)совместимости полимерных материалов медицинского назначения.

Главный научный сотрудник  
лаборатории гемо- и лимфосорбции  
ЦНИЛ БГМУ, д-р мед. наук, проф.

В. В. Кирковский

Заведующий лабораторией  
гемо- и лимфосорбции  
ЦНИЛ БГМУ, канд. мед. наук, доц.

Д. В. Введенский

Мл. науч. сотр. лаборатории гемо-  
и лимфосорбции ЦНИЛ БГМУ

Д. А. Макаревич

Мл. науч. сотр. лаборатории гемо-  
и лимфосорбции ЦНИЛ БГМУ

Т. В. Рябцева

Мл. науч. сотр. лаборатории гемо-  
и лимфосорбции ЦНИЛ БГМУ

Е. Л. Седёлкина

Подписано в печать 09.02.10. Формат 60×84/16. Бумага писчая «КюмЛюкс».

Печать офсетная. Гарнитура «Times».

Усл. печ. л. 0,93. Уч.-изд. л. 0,81. Тираж 50 экз. Заказ 157.

Издатель и полиграфическое исполнение:

учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет».

ЛИ № 02330/0494330 от 16.03.2009.

ЛП № 02330/0150484 от 25.02.2009.

Ул. Ленинградская, 6, 220006, Минск.