

ВЛИЯНИЕ ПРИРОДЫ АНТИКОАГУЛЯНТА НА РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ ГЕМОСОВМЕСТИМЫХ СВОЙСТВ МЕДИЦИНСКИХ МАТЕРИАЛОВ В УСЛОВИЯХ *IN VITRO*

Немец Е.А.¹, Севастьянов В.И.¹, Уваров С.П.^{1, 2}, Романов О.В.²

¹ ФГБУ «ФНЦ трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова» Минздравсоцразвития России, г. Москва

² ФГБУ «ВНИИИМТ» Росздравнадзора, г. Москва

Был проведен сравнительный анализ влияния выбора антикоагулянта на результаты тестирования материалов медицинского назначения. Показано, что замена цитрата натрия на гепарин сопровождается значительными изменениями параметров адгезии и активации тромбоцитов. Полученные результаты позволяют прийти к заключению о целесообразности применения гепарина при тестировании гемосовместимых свойств медицинских материалов *in vitro*.

Ключевые слова: тромбоциты, антикоагулянт, биоматериалы, гемосовместимость.

SPECIFIC ASPECTS OF INTERACTION OF PLATELETS WITH THE HEPARINIZED MATERIALS

Nemets E.A.^{1, 2}, Sevastianov V.I.^{1, 2}, Uvarov S.P.¹, Romanov O.V.²

¹ Academician V.I. Shumakov Federal Research Center of Transplantology and Artificial Organs, Moscow

² All-Russian Research and Testing Institute of Medical Technique, Moscow

Comparative analysis of anticoagulant nature on medical materials testing was done. It was found that change of citrate by heparin is accompanied by significant changes in platelet adhesion and activation. This results allowed us to arrive at a conclusion about reasonability of heparin usage as anticoagulant in *in vitro* testing.

Key words: platelets, anticoagulant, biomaterials, blood compatibility.

ВВЕДЕНИЕ

Материалы, используемые для изготовления искусственных органов и изделий медицинского назначения, контактирующих с кровью человека, не должны оказывать отрицательного воздействия на кровь и ее компоненты, т. е. должны быть гемосовместимыми [1].

Определяющую роль в механизме взаимодействия чужеродной поверхности с кровью, и тем самым в ее гемосовместимости, играют процессы адгезии и активации тромбоцитов [2]. В экспериментальных исследованиях *in vivo* в качестве антикоагулянта применяют гепарин, а при оценке гемосовместимых свойств образцов медицинских изделий

в условиях *in vitro* используют кровь, стабилизированную цитратом натрия [3].

Механизм действия этих антикоагулянтов различен. Гепарин катализирует инактивацию тромбина антитромбином III, воздействуя на процесс свертывания крови на конечных стадиях, непосредственно предшествующих образованию фибрина [4]. Цитрат натрия предотвращает свертывание крови за счет выведения кальция из системы гемостаза посредством его комплексообразования [5]. В то же время ионы кальция являются не только критическим компонентом внутреннего пути свертывания крови, но и участвуют в процессах адгезии и активации тромбоцитов [6].

Статья поступила в редакцию 13.01.12 г.

Контакты: Немец Евгений Абрамович, ведущий научный сотрудник ФГБУ «ФНЦ трансплантологии и искусственных органов им. академика В.И. Шумакова».

Тел. 8 (499) 193 86 62, e-mail: evgnemets@yandex.ru

Вполне вероятно, что часто дискутируемая в научной литературе причина расхождений результатов, полученных в условиях *in vitro* и *in vivo* при оценке гемосовместимых свойств медицинских изделий, обусловлена в ряде случаев различной природой используемых антикоагулянтов [7].

Для экспериментального обоснования данного предположения целью данной работы было изучение влияния природы антикоагулянта на взаимодействие поверхности биоматериалов с тромбоцитами в условиях *in vitro*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве материалов для изучения количества и морфологии адгезированных тромбоцитов использовали синтетические полимеры медицинского назначения в виде пленок:

- полиэтилен медицинский низкой плотности (ПЭ), ГОСТ 10354-82, партия 65, толщина 60 мкм, ЗАО «Синпласт», Россия;
- поливинилхлорид медицинский (ПВХ), толщина 180 мкм, марки ПМ-1/42, ТУ 64-2-286-79;
- полиуретан (ПУ) в виде пленок толщиной 200 мкм марки Т-0533-90;
- политетрафторэтилен (ПТФЭ) в виде пленок, толщиной 80 мкм, ГОСТ 5-1078-71, Россия.

Источником тромбоцитов служила кровь человека, полученная от здоровых доноров мужского пола (22–47 лет). В качестве антикоагулянта использовали 3,8% водный раствор цитрата натрия и раствор гепарина на физиологическом растворе (ФР) с концентрациями 4, 8, 12 ед/мл. Венозную кровь отбирали в пробирки объемом 10 мл, содержащие 1 мл антикоагулянта. Для получения плазмы, обогащенной тромбоцитами (ПОТ), стабилизированную кровь центрифугировали при 200 г в течение 20 минут.

Аликвоты ПОТ объемом 100 мкл наносили на поверхность исследуемого образца с помощью микропипетки. Образцы помещали внутрь чашки Петри во влажную атмосферу для предотвращения высыхания капли. Время инкубации составляло 15 минут при комнатной температуре.

После инкубации исследуемые образцы тщательно промывали в ФР для удаления слабосвязанных с поверхностью тромбоцитов и фиксировали в 2,5% растворе глutarового альдегида в течение не менее 2 часов.

В качестве основного метода исследования была выбрана сканирующая электронная микроскопия (СЭМ) [8].

Образцы обезвоживали последовательной инкубацией в растворах этилового спирта с возрастающей концентрацией по схеме: 50% спирт – 3 мин, 50% спирт – 3 мин, 70% спирт – 3 мин, 90% спирт – 6 мин, 96% спирт – 6 мин. Готовые образцы суши-

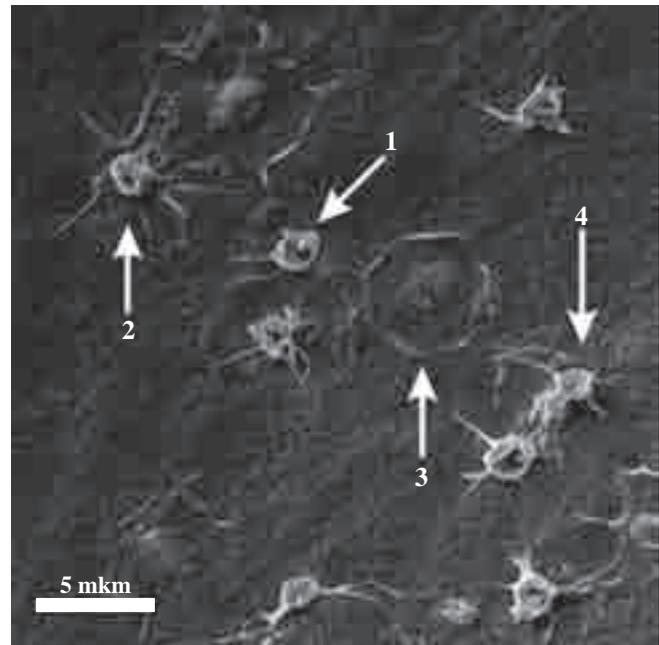


Рис. 1. Разделение адгезированных тромбоцитов по морфологическим признакам

ли на воздухе и наклеивали на предметный столик для электронной микроскопии. Необходимое для электронно-микроскопических исследований токопроводящее покрытие получали методом ионного напыления платины в течение 40 секунд при постоянном токе 5–7 мА на установке JFC-1600 (JEOL, Япония).

Регистрацию количества и морфологии адгезированных тромбоцитов проводили с применением сканирующего электронного микроскопа JSM-6360 LA (JEOL, Япония) при увеличении $\times 1500$. На поверхности каждого из образцов произвольным образом выбирали 25 полей. В каждом поле производили подсчет общего числа адгезированных тромбоцитов, а также отдельных морфологических форм (рис. 1).

Для количественной оценки процесса адгезии тромбоцитов на поверхности биоматериалов использовали относительный показатель адгезии тромбоцитов (ОПАТ), определяемый по формуле:

$$\text{ОПАТ} = \frac{N_{\text{обр}}}{N_{\text{контр}}}$$

где $N_{\text{обр}}$ и $N_{\text{контр}}$ – общее количество клеток, адгезированных на поверхности образца и контроля соответственно. В качестве контроля использовали поверхность того же материала с тромбоцитами, адгезированными в результате инкубации с цитратной плазмой.

Для оценки степени активации адгезированных тромбоцитов было выбрано три морфологических класса:

- 1) слабо активированные (сферические и с псевдоподиями, подклассы 1 и 2 на рис. 1);

- 2) сильно активированные (полностью распластан- ные, подкласс 3 на рис. 1);
- 3) агрегаты (подкласс 4 на рис. 1).

Для оценки влияния антикоагулянта не только на количество адгезированных на поверхности биоматериалов тромбоцитов, но и на степень активации клеток был введен относительный показатель степени активации тромбоцитов ОСАТ:

$$ОСАТ = \frac{N_A^Г}{N_A^Ц} \cdot \frac{N_\Sigma^Ц}{N_\Sigma^Г}$$

где $N_A^Г$ и $N_A^Ц$ – количество активированных форм клеток, адгезированных на поверхности материала из тромбоцитарной плазмы, стабилизированной гепарином и цитратом соответственно. А $N_\Sigma^Ц$ и $N_\Sigma^Г$ – общее количество клеток, адгезированных на поверхности материала из тромбоцитарной плазмы, стабилизированной цитратом и гепарином соответственно.

Различия в значениях ОПАТ и ОСАТ будут свидетельствовать о наличии влияния природы антикоагулянта на характер взаимодействия поверхности исследуемых материалов с тромбоцитами.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Был проведен сравнительный анализ адгезии и активации тромбоцитов человека на поверхности различных полимерных материалов в зависимости от природы и концентрации антикоагулянта.

Рис. 2 иллюстрирует влияние природы и концентрации антикоагулянта на количество тромбоцитов, адгезированных на поверхности медицинских материалов. В качестве контроля использовали количество клеток, адгезированных из цитратной плазмы на поверхности исследуемого материала.

Как видно из рис. 2, при переходе от цитрата натрия к гепарину количество адгезированных тромбоцитов, как правило, снижается. Однако зависимость ОПАТ от концентрации гепарина носит экстремальный характер с ярко выраженным минимумом адгезии тромбоцитов при концентрации гепарина до 8,0 ЕД/мл.

На рис. 3–5 представлены графики распределения тромбоцитов, адгезированных на поверхности исследованных материалов, по степени их активации.

В случае поверхности ПУ (рис. 3) морфологическая картина активации тромбоцитов при переходе от цитрата к гепарину практически не меняется вплоть до концентрации последнего, равной 8,0 ЕД/мл. С ростом концентрации гепарина до 12 ЕД/мл количество распластных форм тромбоцитов заметно увеличивается, а количество агрегатов, напротив, снижается.

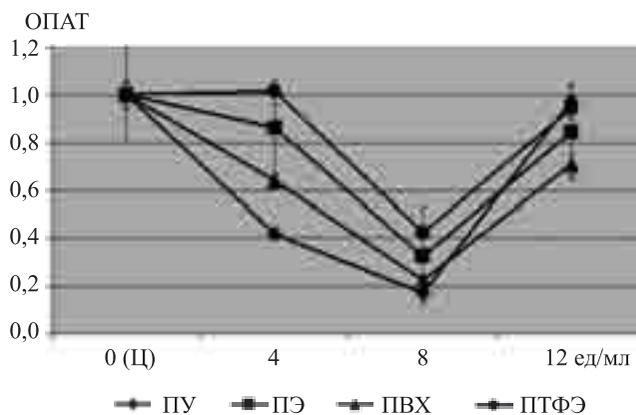


Рис. 2. Влияние природы антикоагулянта на количество тромбоцитов, адгезированных на поверхности медицинских материалов

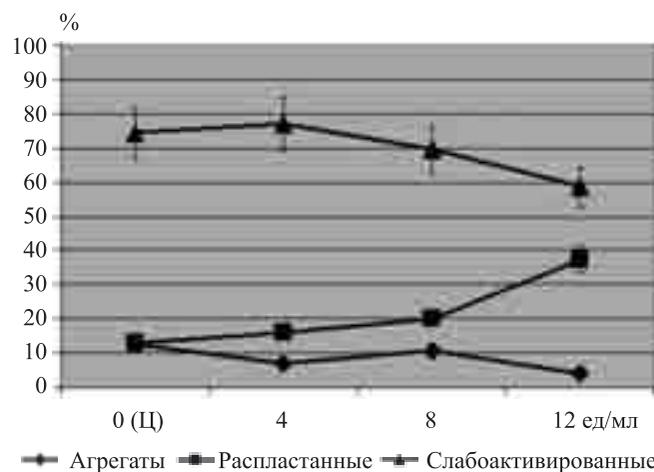


Рис. 3. Распределение тромбоцитов по классам на поверхности ПУ

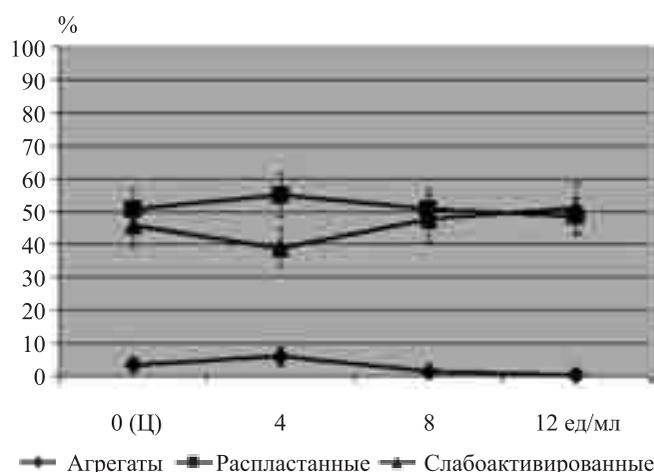


Рис. 4. Распределение тромбоцитов по классам на поверхности ПЭ

Для поверхности ПЭ (рис. 4) переход от цитратной плазмы к гепаринсодержащей существенным образом не влияет на характер активации тромбо-

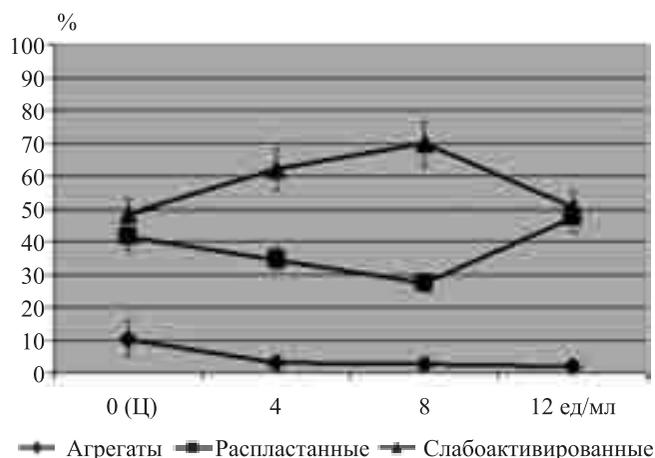


Рис. 5. Распределение тромбоцитов по классам на поверхности ПВХ

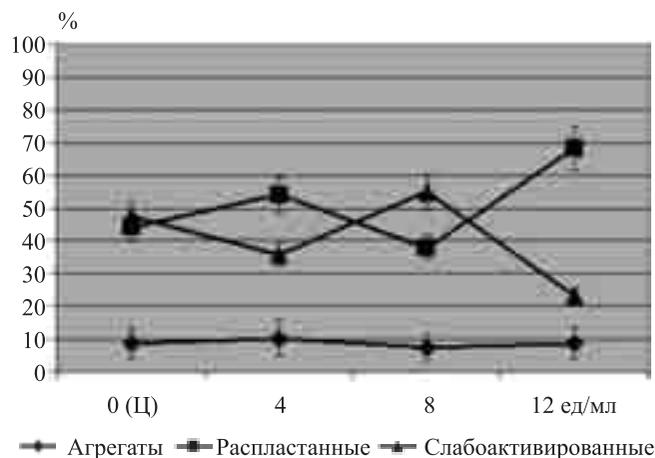


Рис. 6. Распределение тромбоцитов по классам на поверхности ПТФЭ

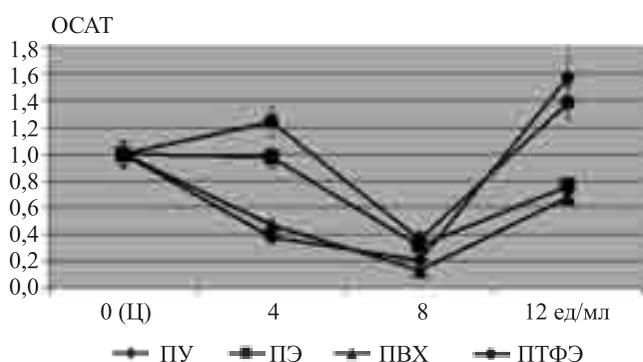


Рис. 7. Влияние природы антикоагулянта на степень активации тромбоцитов, адгезированных на поверхности медицинских материалов

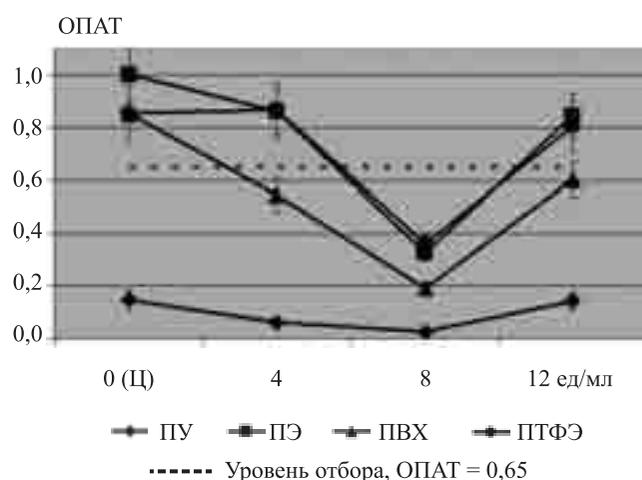


Рис. 8. Значения ОПАТ в соответствии с ГОСТ Р ИСО 10993

цитов. Можно лишь отметить некоторое снижение числа агрегатов среди активированных форм тромбоцитов при концентрации гепарина, превышающей 8,0 ед/мл.

На рис. 5 представлены распределения тромбоцитов по классам на поверхности ПВХ в зависимости от природы антикоагулянта, аналогичные поверхности ПУ (рис. 3). При переходе от цитрата к гепарину наблюдается снижение активации тромбоцитов с минимумом при концентрации гепарина, равной 8,0 ед/мл. При увеличении концентрации гепарина до 12 ед/мл количество агрегатов продолжает снижаться, а количество распластанных клеток повышается, что, как и в случае с ПУ (рис. 3), свидетельствует о повышении активации тромбоцитов при высоких концентрациях гепарина.

В случае ПТФЭ при малой и средней концентрациях гепарина (4,0 и 8,0 ед/мл) не наблюдается существенных изменений в характере активации адгезированных тромбоцитов по сравнению с цитратной плазмой. С повышением концентрации гепарина до 12 ед/мл происходит заметное увеличение количества распластанных клеток на фоне снижения слабоактивированных форм. Количество адгезиро-

ванных агрегатов для данного материала не зависит от концентрации гепарина.

Следует отметить, что для большинства изученных полимерных материалов замена цитрата на гепарин не сопровождается существенными изменениями в количестве сильно активированных форм адгезированных тромбоцитов. Однако увеличение концентрации гепарина до 12 ед/мл сопровождается заметным повышением сильноактивированных форм адгезированных тромбоцитов за счет полностью распластанных клеток. При этом число адгезированных агрегатов с ростом концентрации гепарина имеет тенденцию к снижению.

На рис. 7 приведена зависимость относительной степени активации тромбоцитов (ОСАТ) от природы и концентрации антикоагулянта. Этот параметр является интегральным и учитывает как количество адгезированных клеток, так и степень их активации. Как видно из рис. 7, замена цитрата на гепарин в относительно низкой концентрации (4,0 ед/мл) может сопровождаться как повышением (ПТФЭ), так

и снижением (ПВХ и ПУ) степени активации адгезированных тромбоцитов, тогда как в случае ПЭ замена цитрата на гепарин не сопровождается изменением параметра ОСАТ. Минимальная активация адгезированных тромбоцитов для всех изученных образцов медицинских материалов наблюдается при концентрации гепарина, равной 8,0 ед/мл. Увеличение концентрации гепарина до 12 ед/мл сопровождается значительным повышением критерия ОСАТ (рис. 7). При этом степень активации адгезированных тромбоцитов может быть как выше (ПУ и ПТФЭ), так и ниже (ПЭ и ПВХ) по сравнению с цитратной плазмой.

Из полученных результатов изучения влияния природы и концентрации антикоагулянта на процессы адгезии (рис. 2) и активации (рис. 7) тромбоцитов на поверхности различных материалов можно сделать вывод, что эти два процесса идут параллельно: рост общего количества адгезированных тромбоцитов сопровождается увеличением вклада активированных форм в распределение клеток по классам.

Вероятно, при низкой концентрации гепарина (4 ед/мл) количества активного гепарина не хватает для эффективного подавления адгезии и активации тромбоцитов в случае поверхности, демонстрирующей высокую адгезию и степень активации тромбоцитов, например ПТФЭ. Возможно, причиной этого служит инактивация существенной части гепарина агентами, присутствующими в плазме крови и выделяющимися в процессе адгезии и активации тромбоцитов, например тромбоцитарным фактором 4, который ингибирует каталитические свойства гепарина в отношении к инактивации тромбина антитромбином III [9]. При концентрации гепарина, равной 8,0 ед/мл, адгезия и активация тромбоцитов для всех изученных материалов минимальна и резко возрастает с повышением концентрации антикоагулянта до 12 ед/мл. Механизм этого пока остается неясным и требует дальнейшего изучения.

Испытания гемосовместимых свойств медицинских материалов согласно ГОСТ Р ИСО 10993 «Изделия медицинские, оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 4, исследование изделий, взаимодействующих с кровью», действующему на территории РФ, предполагают применение ПЭ в качестве единого контроля при регистрации адгезии и активации тромбоцитов в условиях *in vitro*. При этом критерием отбора является соответствие условию $ОПАТ \leq 65 \pm 0,05$.

На рис. 8 представлены результаты исследования гемосовместимых свойств медицинских материалов согласно ГОСТ Р ИСО 10993. Общий вид кривых незначительно отличается от таковых, представленных на рис. 2, иллюстрирующем влия-

ние природы и концентрации антикоагулянта на характер адгезии тромбоцитов при выборе в качестве контроля количества тромбоцитов, адгезированных из цитратной плазмы на поверхности соответствующего исследуемого материала. Вместе с тем применение единого контроля (поверхность ПЭ, цитратная плазма) позволяет выявить области применимости конкретного материала в зависимости от специфики его функционирования. Так, полиуретан и поливинилхлорид во всем диапазоне изученных концентраций гепарина удовлетворяет критерию гемосовместимости согласно показателю ОПАТ. В то же время полиэтилен и тефлон демонстрируют значения $ОПАТ \leq 0,65 \pm 0,05$ лишь при концентрации гепарина, равной 8,0 ед/мл.

Поскольку концентрация гепарина в зависимости от специфики функционирования медицинских изделий может различаться значительно, исследование гемосовместимых свойств медицинских материалов и изделий следует проводить в широком диапазоне концентраций гепарина. Это позволит оценить степень пригодности того или иного материала с точки зрения применения их в составе конкретного изделия медицинского назначения, предназначенного для функционирования в условиях контакта с кровью при определенной концентрации антикоагулянта.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании полученных экспериментальных данных можно сделать вывод, что адгезия и активация тромбоцитов на поверхности биоматериала зависят от природы антикоагулянта. Как количество, так и степень активации тромбоцитов, адгезированных в условиях *in vitro* при контакте поверхности медицинских материалов различной природы с тромбоцитарной плазмой, стабилизированной гепарином, могут быть выше или ниже по сравнению с цитратной плазмой.

Поскольку при оценке *in vivo* биологической безопасности медицинских изделий, предназначенных для контакта с кровью, в качестве антикоагулянта используется гепарин, то для снижения риска возможных расхождений результатов экспериментов в условиях *in vitro* и *in vivo* целесообразнее в экспериментах *in vitro* использовать гепаринизированную, а не цитратную кровь. Учитывая, что зависимость адгезии и активации тромбоцитов от концентрации гепарина носит нелинейный характер, эксперименты в условиях *in vitro* следует проводить при различных концентрациях гепарина.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 11-02-12185).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Ремеева А.А., Немец Е.А., Севастьянов В.И.* Методические особенности оценки адгезии тромбоцитов человека и кролика на поверхность полимерных материалов методами оптической и сканирующей электронной микроскопии // Вестник трансплантологии и искусственных органов. 2008. № 2. С. 38–45.
2. *Севастьянов В.И.* Общие представления о процессах взаимодействия чужеродной поверхности с биологическими средами // Биосовместимые материалы / Под ред. В.И. Севастьянова, М.П. Кирпичникова. М.: МИА, 2011. С. 25–30.
3. Энциклопедия клинических лабораторных тестов / Под ред. Н.У. Тица. – М.: Лабинформ, 1997. С. 7–10.
4. *Жозефович М., Жозефович Ж.* Гепаринсодержащие и гепариноподобные полимеры // Журнал Всесоюзного химического общества им. Д.И. Менделеева. – 1985. № 30. С. 410–418.
5. *Папаян Л.П.* Плазменно-коагуляционное звено гемостаза // Гемостаз. Физиологические механизмы, принципы диагностики основных форм геморрагических заболеваний; под ред. Н.Н. Петрищева, Л.П. Папаян, Санкт-Петербург, 1999. С. 10–19.
6. *Маркосян А.А.* Кальций. Физиология свертывания крови. М.: Медицина, 1966. С. 76–81.
7. *Севастьянов В.И.* Взаимодействие чужеродной поверхности с белковыми и клеточными компонентами биологических сред // Биосовместимые материалы; под ред. В.И. Севастьянова, М.П. Кирпичникова. М.: МИА, 2011. С. 100–108.
8. *Доброва Н.Б., Носкова Т.И., Новикова С.П., Севастьянов В.И.* Сборник методических рекомендаций по оценке биосовместимых свойств искусственных материалов, контактирующих с кровью. М., 1991. 70 с.
9. *Jacobs H., Okano T., Lin J.Y., Kim S.W.* PGE-heparin conjugate releasing polymers // J. Controlled. Release. 1985. Vol. 2. P. 313–319.