

О ПРЕДВАРИТЕЛЬНОЙ ОЦЕНКЕ ТРОМБОРЕЗИСТЕНТНОСТИ
ПОЛИМЕРНЫХ МАТЕРИАЛОВ

Севастьянов В. И., Беломестная З. М., Дубович Т. И.,
Петров М. В.

Проведен экспериментальный анализ трех экспресс-методов (определение времени свертывания крови, количества адгезированных тромбоцитов и степени альбуминизации) для предварительного отбора *in vitro* тромбозустойчивых полимерных материалов. Показана ограниченность применения метода свертывания крови.

На данном этапе наших знаний о механизме взаимодействия полимерных материалов с кровью [1, 2] целесообразно использовать ступенчатую систему тестов (*in vitro* → *vivo* → *in vivo*), чтобы по возможности дать надежную оценку тромбозустойчивости материалов.

В связи с интенсивным развитием работ в области синтеза и модификации полимеров медицинского назначения одной из первоочередных задач является поиск адекватных количественных экспресс-методов для предварительного их отбора *in vitro*. Разработка тестов — непростая задача, что связано главным образом с отсутствием четких представлений о механизме взаимодействия синтетического материала с кровью. В частности, это привело многих исследователей к слепому переносу классических биохимических методов гематологии (объемные характеристики крови) на изучение тромбозустойчивых свойств полимеров (контактные явления на границе кровь — материал). В настоящее время основной акцент сделан на изучение первичных стадий взаимодействия поверхности полимера с кровью, а именно на адсорбцию белков плазмы крови и на адгезию клеточных элементов крови [2, 3].

При выборе экспресс-методов тестирования *in vitro* мы исходили из следующих предпосылок: 1) ограниченность использования классических методов гематологии; 2) тромбогенез обусловлен адгезией тромбоцитов; 3) адгезия тромбоцитов связана с предшествующей ей адсорбцией белка, в частности с составом адсорбционного слоя.

Экспериментальная оценка предлагаемых трех экспресс-методов и посвящена настоящая работа.

Определение времени свертывания крови. Для улучшения воспроизводимости результатов время свертывания крови на поверхности тестируемого материала определяли в специальном боксе, в потоке обессыпанного воздуха при постоянной температуре и влажности. Метод регистрации — визуальный.

Количественным критерием служило относительное время свертывания (OBC) [4]

$$OBC = \frac{\text{время свертывания на поверхности тестируемого материала}}{\text{время свертывания на поверхности контроля}}$$

Определение количества адгезированных тромбоцитов радиоизотопным методом. Известно, что адгезия тромбоцитов играет важную роль при взаимодействии поверхности полимерного материала с кровью [2], поэтому вполне очевиден выбор величины адгезии тромбоцитов в качестве одного из параметров, характеризующих тромбозустойчивость. Адгезию ^{51}Cr -тромбоцитов, полученных по стандартной методике [5], изучали в специальной камере, позволяющей одновременно исследовать 10 образцов, как в статике, так и в динамике, в идентичных условиях при постоянной температуре в отсутствие контакта с воздухом.

В качестве количественного критерия метода был предложен относительный показатель адгезии тромбоцитов (OPAT) [4]

$$OPAT = \frac{\text{число тромбоцитов на единицу площади тестируемого материала}}{\text{число тромбоцитов на единицу площади контроля}}$$

Определение степени альбуминизации радиоизотопным методом. На ряде полимеров было показано, что высокий уровень адсорбции фибриногена коррелирует с высоким уровнем адгезии тромбоцитов [2]. Более того, отмечалось, что тромбозустойчивость полимерных материалов определяется относительной поверхностной концентрацией альбумина плазмы крови. Поэтому для определения тромбозустойчивости образца целесообразно определять степень альбуминизации, т. е. отношение количества адсорбированного ^{125}I -альбумина к количеству адсорбированного ^{125}I -фибриногена на единицу площади тестируемого образца. Измерение адсорбции проводили в смеси фосфатного буфера (pH 7,4), содержащего по 100 мг/% меченого альбумина или фибриногена и равного объема немеченой плазмы, полученной из свежей донорской крови человека, стабилизированной 3,8% раствора цитрата натрия (соотношение антикоагулянт : кровь = 1 : 9). Мы использовали готовые меченные белки человека «Isotope» (Венгрия). Количество адсорбированного белка вычисляли исходя

из суммарной концентрации меченого и немеченого белка в смеси и исходной удельной активности меченого белка.

За количественный критерий была принята относительная степень альбуминизации (ОСАЛ)

$$ОСАЛ = \frac{\text{степень альбуминизации тестируемого материала}}{\text{степень альбуминизации контроля}}$$

Подсчет активности для ОПАТ и ОСАЛ проводили на γ-счетчике «Berthold-5300». Относительная ошибка метода ОВС ~10%, а методов ОПАТ и ОСАЛ ~15–20%. Предполагается, что с увеличением ОВС и ОСАЛ и с уменьшением ОПАТ растет вероятность тромбогенеза исследуемого полимерного материала.

Испытания проводили на образцах (диаметр 18 мм), изготовленных на одной прессформе, или из пленок полимеров, полученных из раствора на стеклянной поверхности в обессыщенных условиях. В случае ПЭ и ПТФЭ исследовали промышленные медицинские полимеры в виде пленочного материала. Текстуру поверхности образцов контролировали выборочно с помощью профилографа.

Максимальный размер микронеровностей тестируемой поверхности, определенный с помощью профилографа, не превышал 0,1–0,2 мкм. Сборку рабочих камер проводили в боксе с ламинарным потоком обессыщенного воздуха. Камеру с образцами и контролем заполняли фосфатным буфером, а затем (на вытеснение) меченоей тромбоцитарной плазмой.

Из-за хорошей воспроизводимости результатов и качества поверхности для внутреннего стандарта во всех трех тестах было выбрано стекло.

Стеклянные диски (диаметр 18 мм), изготовленные из предметного стекла, хранили в спирт-эфирной смеси (1:1). Непосредственно перед экспериментом их тщательно промывали в фосфатном буфере. Дезактивацию и обработку поверхности использованных стекол осуществляли следующим образом: экспозиция 24 ч в растворе 3%-ной соляной и 10%-ной лимонной кислот; промывка водой; экспозиция 15–20 мин в хромовой смеси; промывка дистиллированной водой; промывка дистиллированной водой.

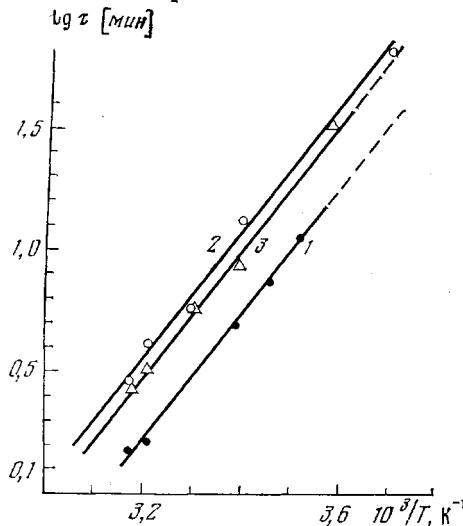
Доверительный интервал (с надежностью 0,90) вычисляли с помощью распределения Стьюдента по результатам 5–10 измерений для каждого полимера одной партии в тромбоцитарной плазме в среднем двух кроликов.

На наш взгляд, использование относительных (стандартизованных) показателей для характеристики полимерных материалов не только уменьшает разброс экспериментальных данных, но и позволяет более корректно сравнивать результаты, полученные разными авторами. Кроме того, ОПАТ и ОВС не зависят от биологической вариабельности состава крови данного вида животного, его возраста и концентрации тромбоцитов. ОВС не зависит от способа определения времени свертывания крови.

В табл. 1 представлены значения ОПАТ, ОВС и ОСАЛ для ряда полимерных материалов. Видно, что если ОПАТ в этом ряду изменяется в 80 раз (от 40 для каучука СКТВ до 0,5 для биомера), то величина ОВС остается постоянной. Кроме того, для полимеров (биомер, кремнийорганический вулканизат, тefлон, ПЭ) следует однозначное соответствие между ОПАТ и ОСАЛ, с одной стороны, и тромбогенезом в *in vivo* — с другой [2]. Заметим, что изменение ОПАТ не связано с качеством поверхности данных полимерных материалов.

Проведенный рентгеноструктурный анализ показал, что величина ОПАТ зависит не только от химической природы поверхности, но и от объемной структуры полимера (наблюдается положительная корреляция между ОПАТ и долей кристаллической фазы полимера).

Оказалось также (табл. 2), что если ОПАТ чувствителен не только к природе полимера, но и к степени его химической чистоты, то величина ОВС практически одинакова для всех исследуемых материалов.



Зависимость в аррениусовых координатах времени свертывания τ на стекле от температуры для крови кролика (1), быка (2) и человека (3). $E=11,4 \pm 2,3$ ккал/моль

Таблица 1

Влияние природы полимера на его тромборезистентные свойства

Исследуемый материал	ОПАТ *	ОВС **	ОСАЛ ***
Поли-4-метилпентен-1 (ОНПО «Пластполимер»)	5,5±1,1	1,6±0,1	—
Полиуретан ТПУ-1Р (ВНИИСС)	1,5±0,3	1,6±0,2	—
Полиуретан СКУПФЛ-1 (ВНИИСС)	3,0±0,6	1,7±0,2	—
Полиуретан ПУС-П	2,7±0,4	1,8±0,3	—
Полиуретан ППЭ-204 (ВНИИСС)	3,0±0,5	1,9±0,3	15
ПТФЭ карбонизированный	1,0±0,2	1,8±0,2	—
Поликарбонат «Лексан» (США)	0,6±0,1	2,0±0,2	—
Поликарбонат «Дифлон» (НПО «Пластмассы»)	0,8±0,1	1,9±0,2	—
Кремнийорганический вулканизат МСК-1 (ВНИИСС)	1,0±0,2	2,0±0,3	300
Сульфированный стиролизопреновый блок-сополимер (ВНИИМП)	0,9±0,2	2,2±0,3	—
Сополимер метилметакрилата с N-винилпирролидоном (ВНИИТКГП)	0,8±0,1	1,6±0,1	—
Полиэтилен	1,8±0,2	2,0±0,2	5
Каучук СКФ-263 (ВНИИСС)	14,0±3,0	2,3±0,3	—
Каучук СКТВ (ВНИИСС)	40,0±9,0	1,9±0,3	—
Каучук СКТВ-1 (ВНИИСС)	38,8±8,0	1,8±0,2	—
Биомер (США)	0,5±0,1	1,7±0,2	900
Политетрафторэтилен	1,0±0,2	1,8±0,3	200

* Время экспозиции в ^{51}Cr -тромбоцитарной плазме кролика 30 мин, статика 310К.

** Относительная влажность 70%, нативная кровь кролика, 310К.

*** Время экспозиции в ^{125}I -белковом растворе 2 ч, статика, 310К. Степень альбуминизации стекла 0,05.

Таблица 2

Влияние степени химической чистоты полимера на ОПАТ и ОВС

Исследуемый материал	ОПАТ	ОВС
Поли-4-метилпентен-1 (исходный)	5,5±1,1	1,6±0,1
Поли-4-метилпентен-1 (переосажденный)	3,5±0,7	2,0±0,2
Поли-4-метилпентен-1 (дважды переосажденный)	2,0±0,4	2,3±0,2
Полиуретан ТПУ-1Р (исходный)	1,5±0,3	1,6±0,2
Полиуретан ТПУ-1Р (переосажденный)	0,9±0,2	1,6±0,2
Полиуретан ТПУ-1Р (дважды переосажденный)	0,8±0,1	1,6±0,2
Полиуретан СКУПФЛ-1	3,0±0,6	1,8±0,3
Полиуретан СКУПФЛ-1 (повышенной степени чистоты)	1,0±0,2	1,7±0,2

На рисунке изображены температурные зависимости времени свертывания крови кролика, быка и человека на стекле. Если к процессу свертывания подойти как к сложной последовательности биохимических реакций, протекающих с эффективной скоростью $1/t$ (t — время свертывания), то эффективную энергию активации процесса свертывания крови E_{eff} можно считать постоянной в интервале температур 275—315 К и не зависящей от видовой принадлежности крови.

Величина E_{eff} практически не меняется для всех полимерных материалов с одинаковым ОВС, т. е. время свертывания *in vitro* определяется не контактом крови с полимером, а ее взаимодействием с воздухом (реакция крови на перенос *in vivo* → *in vitro*).

Метод определения свертывания крови можно использовать при сильном избирательном взаимодействии поверхности тестируемого материала с факторами свертывания крови, которые происходят или за счет процессов сорбции (гидрогели), или (и) за счет значительного химического взаимодействия функциональных групп поверхности с компонентами крови, т. е., когда взаимодействие кровь — полимер преобладает над взаимодействием кровь — воздух. Так, например, для модифицированного полиакриламидного геля ОВС равно 20.

Таким образом, из трех рассмотренных тестов наиболее корректны методы по адсорбции белка и адгезии тромбоцитов, которые можно рекомендовать для первичной оценки *in vitro* тромборезистентности искусственных материалов. Заметим, что и на тромбогенной, и на тромборезистентной поверхности происходит адсорбция,

а затем и адгезия тромбоцитов. Поэтому при дальнейшей разработке методов тестирования *in vitro* необходимо учитывать более тонкие эффекты, а именно изменение конформации адсорбированного белка и различие в морфологии адгезированных тромбоцитов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Смуррова Е. В., Доброда Н. Б., В сб. Химия и технология высокомолекулярных соединений (итоги науки и техники), т. 10, 1976, стр. 30.
2. The Behavior of Blood and Its Components as Interfaces, ed. by L. Vroman, E. F. Leonard, N. Y., 1977.
3. Доброда Н. Б., Вестник Академии медицинских наук СССР, 1978, № 11, 53.
4. Севастьянов В. И., Дубович Т. И., Беломестная З. М., В сб. научных трудов НИИ Трансплантологии и искусственных органов МЗ СССР, 1979, стр. 140.
5. Recommended methods, Blood, 50, 1137, 1977.

Научно-исследовательский институт
трансплантологии и искусственных
органов

Поступила в редакцию
14.III.1980

ON THE PRELIMINARY EVALUATION OF THROMBORESISTENCE OF POLYMER MATERIALS

*Sevast'yanov V. I., Belomestnaya Z. M., Dubovitch T. I.,
Petrov M. V.*

Summary

The experimental analysis of three express-methods (determination of the blood coagulation time, of the amount of adsorbed thrombocytes and of albuminization degree) for preliminary selection *in vitro* of thromboresistant polymer materials has been performed. The limited possibility of using the blood coagulation method is shown.

УДК 541.64 : 536.58

ОБ ОПРЕДЕЛЕНИИ ТЕМПЕРАТУР ПЛАВЛЕНИЯ ПОЛИМЕРНЫХ КРИСТАЛЛОСОЛЬВАТОВ ПО МУТНОСТИ СИСТЕМЫ

*Новлева М. М., Смирнова В. Н., Ханин З. С.,
Волохина А. В., Панков С. П.*

Определение мутности в системах поли-*n*-фенилентерефталамид (ПФТА) — серная кислота использовано для характеристики температуры плавления кристаллосольватов ПФТА · *n*H₂SO₄. Прослежены зависимости температуры плавления кристаллосольвата от характеристической вязкости ПФТА и концентрации полимера в системе ПФТА — серная кислота. Эти результаты сопоставлены с данными метода ДТА и показана удовлетворительная корреляция двух методов. Основываясь на характере зависимости температуры плавления кристаллосольвата ПФТА · *n*H₂SO₄ от концентрации полимера в системе ПФТА — серная кислота, высказано предположение об образовании двух несколько отличающихся по составу кристаллосольватов. Выявленна также зависимость температур плавления кристаллосольватов от концентрации серной кислоты в интервале 98—100,5%.

Согласно сообщениям различных исследователей, ароматические полиамиды способны образовывать с растворителями кристаллосольваты. Такая способность, сравнительно редко наблюдавшаяся ранее для полимерных систем, обнаружена у поли-*m*-