

ОЦЕНКА ИЗМЕНЕНИЙ КЛЕТОЧНОГО СОСТАВА КРОВИ ПОСЛЕ КОНТАКТА С ЛИГАНДИЗОВАННЫМ ПОЛИСУЛЬФОНОМ

Д.А. Макаревич¹, Т.В. Рябцева¹, Д.Д. Дусь², А.К. Королик²

¹Белорусский государственный медицинский университет

²ГУ «МНПЦ хирургии, трансплантации и гематологии», Минск

Аннотация. В работе проведена оценка изменений клеточного состава крови после контакта с лигандизованным полисульфоном. По совокупности изменений клеточного звена крови после контакта с лигандизованным ПС можно заключить что применение данного метода производства (условий лигандизации и стерилизации) позволяет получить мембраны ПС с высокой степенью гемосовместимости.

Ключевые слова: полисульфон, гемосорбция, количество лейкоцитов, тромбоциты, биологически активные белки – анафилотоксины.

Введение. Полисульфон (ПС), а именно его производное полиэфирсульфон (ПЭС) является материалом для производства современных диализных мембран [1,2,3]. Известно, что это материал биологически инертен и не вызывает ярко выраженной активации иммунных реакций при контакте с кровью. Технология производства ПС позволяет создавать мембраны с заданным размером пор и может быть модифицирована для придания им гидрофильных свойств или специфических свойства для адсорбции на поверхности патогенетически значимых молекул (например, аутоиммунные антитела или ЛПС грамотрицательных бактерий). Исходя из этого есть предположение, что ПС-мембраны могут быть использованы для производства изделий медицинского назначения для гемосорбции.

Одним из важных вопросов при разработке изделий для гемосорбции является гемосовместимость, а именно степень клеточной адгезии на мембраны ПС, так как это напрямую влияет на безопасность применения изделия в медицине. В первую очередь важно не допустить тромбообразования во время процедуры, для этого необходимо минимизировать адсорбцию тромбоцитов на поверхности мембраны. Во-вторых, минимизировать активацию воспалительного ответа с помощью снижения адсорбции на поверхности мембран иммунных клеток. Целью данного исследования являлось исследование влияния процесса получения лигандизованного полисульфона на гемосовместимость ПС матрицы. Для этого цельную кровь пропускали через гемосорбционную колонку, заполненную капиллярами ПС, модифицированного присоединением специфического лиганда.

Материалы и методы. В работе использовали образцы стерилизованного лигандизованного полисульфона производства СП «Фребор» (Беларусь, г.Борисов). Параметры гемосовместимости оценивали после пропускания гепаринизированной цельной крови здоровых доноров через полимерный модуль, содержащий образцы полисульфона. Для перфузии крови через модуль использовали перистальтический насос и кровопроводящие магистрали, образующие замкнутый контур, позволяющий отбирать пробы во время эксперимента. Общее время перфузии крови составило 60 минут. Пробы крови отбирали до эксперимента, на 30 и 60 минуте эксперимента. Общий анализ крови проводили с использованием анализатора «CellDynRuby», (USA). Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием программ Statistica 12. Значения представляли в виде медианы и 25-75-перцентилей (Me (25;75)). Для сравнения двух независимых выборок использовали U-критерий Манна-Уитни. Для сравнения трех групп независимых данных был использован метод рангового анализа вариаций Краскела-Уоллиса. В качестве критерия достоверности различий показателей принимали уровень значимости $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение. После экспериментов наблюдали снижение концентрации эритроцитов на 6,64 (5,73;7,62) % от исходной концентрации.

Изменение количества лейкоцитов после контакта с исследуемыми образцами лигандизованного полисульфона (таблица 1) составило 2,83 (0,36 4,93) % от исходной концентрации. В лейкоцитарной формуле отмечено значимое снижение концентрации эозинофилов. Возможно, это связано с тем, что по данным научной литературы на поверхности эозинофилов обнаруживаются интегрины ($\alpha 4\beta 1$, $\alpha M\beta 2$), облегчающие адгезию к чужеродной поверхности [4]. Концентрация тромбоцитов изменилась после эксперимента в среднем на 9,22 (6,10; 22,09) % это говорит о низкой адгезии тромбоцитов к лигандизованному ПС.

Следует отметить, что при анализе данных, полученных после контакта крови с нелигандизованным ПС были получены аналогичные изменения (таблица 2). Однако изменение количества лейкоцитов, тромбоцитов после контакта с исследуемыми образцами нелигандизованного полисульфона составило 27,00 (20,63;28,60) % и 25,85 (21,88; 26,96)%, что значительно превышает допустимые значения. Поэтому мы предположили, что лигандизация ПС повышает его гемосовместимость посредством снижения гидрофобности поверхности и уменьшает адсорбцию лейкоцитов и тромбоцитов на поверхности полимера, увеличивая безопасность данного вида полимера для медицинского применения.

Таблица 1. – Изменение показателей общего анализа крови после контакта цельной крови с лигандизованным полисульфоном

Показатели	Время эксперимента, минут			Изменение концентрации, % от исходной
	0	30	60	
Эритроциты, $10^{12}/л$	4,01 (3,86;4,21)	3,82 (3,73;3,98)	3,78 (3,60;3,93)	6,64 (5,73;7,62)
Гемоглобин, г/дл	12,30 (11,35;13,10)	11,75 (11,00;12,65)	11,65 (10,65;12,30)	5,76 (5,26;6,17)
Лейкоциты, $10^9/л$	6,01 (5,19;6,67)	5,56 (5,24;6,35)	5,84 (5,05;6,25)	2,83 (0,36;4,93)
Нейтрофилы, $10^9/л$	3,11 (2,97;3,64)	3,16 (2,85;3,53)	3,08 (2,79;3,34)	4,12 (1,11;6,73)
Лимфоциты, $10^9/л$	2,22 (1,83;2,44)	2,02 (1,77;2,30)	2,11 (1,80;2,43)	2,27 (0,01;4,75)
Моноциты, $10^9/л$	0,39 (0,33;0,45)	0,36 (0,32;0,40)	0,38 (0,32;0,44)	2,03 (1,06;3,19)
Эозинофилы, $10^9/л$	0,17 (0,14;0,19)	0,13 (0,11;0,15)	0,16 (0,13;0,17)	10,39 (7,82;12,37)
Базофилы, $10^9/л$	0,06 (0,05;0,06)	0,05 (0,04;0,06)	0,05 (0,05;0,06)	5,08 (1,94;7,52)
Тромбоциты, $10^3/л$	300,00 (241,50;348,00)	278,00 (219,50;323,00)	251,50 (220,50;292,50)	9,22 (6,10; 22,09)

Резкое снижение количества лейкоцитов после контакта с нелигандизованным ПС является ответной реакцией организма на чужеродный материал и, по всей видимости, связано с активацией системы комплемента. Как результат активации системы комплемента образуются биологически активные белки – анафилотоксины – фрагменты C3a и C5a системы комплемента, которые стимулируют появление на поверхности лейкоцитов специальных рецепторов адгезии CR3 (CD11b/CD18), которые способствуют «прилипанию» клеток. Данное явление весьма нежелательно и может привести в клинической практике, во-первых, к лейкопении, а во-вторых, к активации каскада системы комплемента и развитию симптомов анафилотоксического шока: одышка, бронхоспазм.

Таблица 2. – Изменение показателей общего анализа крови после контакта цельной крови с полисульфоном без лиганда

Показатели	Время эксперимента, минут			Изменение концентрации, % от исходной
	0	30	60	
Эритроциты, $10^{12}/л$	3,9 (3,8; 4,1)	3,6 (3,5;3,9)	3,6 (3,4;3,9)	7,69 (10,52;12,80)
Гемоглобин, г/дл	12,54 (11,65;14,30)	12,15 (11,10;13,45)	11,95 (11,62;13,30)	4,70 (6,10;7,30)
Лейкоциты, $10^9/л$	6,3 (6,3;7,25)	5,3 (5,1;5,9)	4,6 (4,5;5,0)	27,00 (20,63;28,60)
Нейтрофилы, $10^9/л$	3,12 (2,89;3,75)	3,10 (2,78;3,33)	2,37 (2,09;3,04)	24,10 (16,3;27,01)
Лимфоциты, $10^9/л$	2,12 (1,72;2,22)	2,06 (1,79;2,29)	2,00 (1,71;2,12)	5,70 (0,58;4,50)
Моноциты, $10^9/л$	0,35 (0,31;0,42)	0,34 (0,34;0,41)	0,32 (0,31;0,40)	8,60 (4,80;8,80)
Эозинофилы, $10^9/л$	0,18 (0,15;0,20)	0,15 (0,11;0,18)	0,13 (0,10;0,15)	17,80 (13,3;25,01)
Базофилы, $10^9/л$	0,05 (0,04;0,06)	0,04 (0,04;0,05)	0,04 (0,04;0,05)	20,00 (1,94;10,10)
Тромбоциты, $10^3/л$	256,8 (255,4;287,8)	232,1 (220,5;255,0)	190,4 (199,5;210,2)	25,85 (21,88; 26,96)

Заключение. По совокупности изменений клеточного звена крови после контакта с лигандизованным ПС можно заключить что применение данного метода производства (условий лигандизации и стерилизации) позволяет получить мембраны ПС с высокой степенью гемосовместимости, которые незначительно влияют на изменение клеточного состава крови, при этом улучшается гемосовместимость по сравнению с нелигандизованным ПС.

Список использованных источников

1. Koga, Y. Biocompatibility of polysulfone hemodialysis membranes and its mechanisms: involvement of fibrinogen and its integrin receptors in activation of platelets and neutrophils / Y. Koga [et al.] // *Artificial Organs*. – 2018. – Vol. 42, № 9. – P. 246–258.
2. Yamamoto, K. Surface modification of polysulfone membranes to improve hemocompatibility in hemodialysis / K. Yamamoto [et al.] // *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*. – 2013. – Vol. 24, № 10. – P. 1223–1236.
3. Bowry, S. K. Polysulfone in hemodialysis: Advances in biocompatibility and performance / S. K. Bowry, E. Gatti, J. Vienken // *Contributions to Nephrology*. – 2011. – Vol. 173. – P. 110–118.
4. Spencer, L. A. Eosinophil granule proteins: form and function / L. A. Spencer, B. S. Ackerman, P. F. Weller // *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. – 2014. – Vol. 134, № 6. – P. 1237–1247.