

KATARINA B. PAVLOVIĆ<sup>1</sup>  
VOJISLAV N. BOŽANIĆ<sup>2</sup>  
JASNA V. STANOJEVIĆ<sup>1</sup>  
VESNA K. MILIĆEVIĆ<sup>2</sup>  
BOJAN J. ILIĆ<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Hemofarm STADA, Vršac  
<sup>2</sup>Fakultet organizacionih nauka,  
Beograd

STRUČNI RAD

UDK 615.273:006.35

DOI: 10.2298/HEMIND100225010P

## LABORATORIJSKA ANALIZA HEMOLITIČKIH SVOJSTAVA MATERIJALA KOJI DOLAZE U KONTAKT SA KRVlju: UPOREDNA PRIMENA DVE VARIJANTE METODE ISPITIVANJA PREMA STANDARDU ASTM F756 U SKLADU SA ISO 10993-4

*U ovom radu prikazano je poređenje rezultata dve varijante in vitro metode ispitivanja prema standardu ASTM F756 u skladu sa ISO 10993-4 hemolitičkih svojstava šest polaznih materijala (Polipropilen Moplen EP 540 P, Polikarbonat bezbojan 164 R-112, Polikarbonat braon 164 R-51918, Polietilen NG 3026 K, Polietilen NG – Purell GB 7250, Polietilen VG – Hplex 5502) za proizvodnju medicinskih sredstava i jednog materijala (Polietilen NG granulata) za proizvodnju boca za infuzione rastvora. Jedna varijanta metode zasniva se na direktnom kontaktu polaznog materijala sa svinjskom krvlju, a druga na dobijanju ekstrakta polaznog materijala autoklaviranjem i kontaktu tako dobijenog ekstrakta sa svinjskom krvlju. Na osnovu dobijenih rezultata zaključeno je da svi materijali zadovoljavaju kriterijume prihvatljivosti i to u slučaju obe varijante metode ispitivanja, kao i da metoda direktnog kontakta ima veću osetljivost od metode u kojoj su korišćeni ekstrakti ovih materijala.*

Ispitivanje hemolitičkih svojstava materijala koji dolaze u kontakt sa krvlju se vrši prema zahtevima standarda ASTM F756, *Standard Practice for Assessment of Hemolytic Properties of Materials* [1]. Ova metoda se može realizovati u dve varijante, od kojih se prva zasniva na direktnom kontaktu polaznog materijala sa svinjskom krvlju, a druga na dobijanju ekstrakta polaznog materijala autoklaviranjem i kontaktu tako dobijenog ekstrakta sa svinjskom krvlju.

Obe varijante metode zasnivaju se na merenju absorbancija supernatanta svakog uzorka nakon inkubiranja i centrifugiranja. Na osnovu dobijene vrednosti absorbancije supernatanta određuje se koncentracija oslobođenog hemoglobina, a na osnovu toga i procenat hemolitičkog dejstva ispitivanog materijala. U obe varijante metode koriste se pozitivna i negativna kontrola, pri čemu je pozitivna kontrola voda za injekcije (*water for injection*, WFI), u kojoj usled osmotskog šoka dolazi do delimične ili potpune lize eritrocita, a negativna PBS pufer, u kome nema hemolitičkog dejstva. Prikazano je poređenje rezultata dobijenih primenom obe varijante metode za ispitivanje navedenih sedam polaznih materijala. Ispitan je i potencijalni uticaj dužine inkubiranja uzoraka, pri čemu su uzorci u varijanti metode sa direktnim kontaktom inkubirani u trajanju od 3, 15 i 24 h. Ovo uporedno ispitivanje je služilo za izvođenje zaključaka o pogodnosti za primenu jedne ili druge varijante metode [8], a sa druge strane i za definisanje relevantne dužine inkubiranja i na osnovu toga opredeljivanja za onu varijantu metode koja je osetljivija, a samim tim i pouzdanija za ocenu hemolitičkih svojstava polaznih

materijala. Pored toga, kao sekundarna osobina varijante metode, razmatrala se i složenost metode, u smislu neophodne laboratorijske opreme, što može imati uticaja na cenu metode i masovnost njene primene u poslovnoj praksi.

Standard ASTM F756 [2] podrazumeva korišćenje zečije krvi kao radnog materijala za ispitivanje osetljivosti eritrocita na hemolitičko dejstvo materijala, a u svrhu ocene podobnosti materijala za upotrebu u kontaktu sa humanom krvju.

Sličnost hemolitičke osetljivosti eritrocita svinjske krvi i eritrocita humane krvi je takva da rezultati dobijeni ispitivanjem hemolitičkih svojstava materijala korišćenjem svinjske krvi mogu biti aplicirani prilikom ocene primenjivosti materijala koji su u kontaktu sa humanom krvlju koja se kao deficitarna ne koristi.

Test hemolize, odnosno ispitivanja hemolitičkih svojstava je načešće primenjivan metod za određivanje hemokompatibilnosti polaznih materijala koji se koriste za proizvodnju medicinskih sredstava i biomaterijala, koji dolaze u kontakt sa humanom krvlju. Hemokompatibilnost definiše sposobnost medicinskog sredstva ili biomaterijala da ostane u kontaktu sa humanom krvlju u toku klinički relevantnog vremenskog perioda bez uzrokovanja promena krvi ili plazme, odnosno samog materijala [3].

Prilikom podnošenja registracionih fajlova za medicinska sredstva i biomaterijale u nacionalnoj laboratoriji za medicinska sredstva, obavezno je ispitivanje hemolitičkih svojstava prema zahtevima pomenutog standarda ASTM F756 [2] i standarda ISO 10993-4:2002 *Biological Evaluation of Medical Devices – Part 4: Selection of Tests for Interactions with Blood* [4].

Potencijalna interakcija medicinskog sredstva ili biomaterijala sa humanom krvlju je veoma važan aspekt ocenjivanja bezbednosti ovih proizvoda. Zbog toga je za

Autor za prepisku: K.B. Pavlović, Hemofarm STADA, Beogradski put bb, 26300 Vršac, Srbija.

E-pošta: kpavlovic25@gmail.com

Rad primljen: 25. februar 2010.

Rad prihvaćen: 3. mart 2010.

proizvođače medicinskih sredstava i biomaterijala od izuzetnog značaja ispitivanje polaznih materijala, kako ne bi došlo do pojave neusaglašenog gotovog proizvoda.

Procenat od 90–95% humane krvi čini voda. Ostatak čine različiti ćelijski elementi kao što su crvena krvna zrnca, bela krvna zrnca, krvne pločice i dr. Medicinska sredstva i biomaterijali koji se danas proizvode projektuju se tako da budu kompatibilni sa elementima humane krvi što znači da ne smeju biti uzrok tromboze, antigenog odgovora, destrukcije proteina plazme, kao ni razgradnje belih ili crvenih krvnih zrnaca. Crvena krvna zrnca sadrže hemoglobin, protein koji je odgovoran za transport kiseonika i ćelijsko disanje. Liziranjem eritrocita dolazi do ispuštanja slobodnog hemoglobina u plazmu, što u organizmu dovodi do ozbiljnog oštećenja jetre i renalne funkcije. Ova činjenica koristi se u ispitivanju hemolitičkih osobina zbog karakteristične absorbancije hemoglobina na 540 nm pri reakciji sa Drabkinovim reagensom [5]. Tako je kada govorimo o ulaznoj kontroli polaznih materijala za proizvodnju medicinskih sredstava i biomaterijala, test hemolize postao jedan od najčešće korišćenih testova za ocenu hemokompatibilnosti, kako zbog kratkog vremena izvođenja, tako i zbog niske cene.

Ispitivanje *in vitro* hemolitičkih svojstava gotovih proizvoda i polaznih materijala može se raditi njihovim direktnim izlaganjem razblaženoj životinjskoj krvi ili izlaganjem njihovog ekstrakta. Za sve proizvode i materijale nisu jednako podobne obe varijante metode ispitivanja zbog specifičnih osobina svake od njih.

U ovom radu urađena je komparativna analiza rezultata ispitivanja šest polaznih materijala za medicinska sredstva i jednog materijala za proizvodnju boca za infuzione rastvora u direktnom kontaktu i u kontaktu njihovih ekstrakata sa svinjskom krvlju što upravo i predstavlja dve varijante ove metode. Rezultati su tabelarno prikazani, a na osnovu dobijenih rezultata pokazano je da varijanta metoda direktnog kontakta sa svinjskom krvlju pokazuje veću osetljivost u odnosu na varijantu metode u kojoj su korišćeni ekstrakti ovih materijala. Utvrđeno je i da dužina inkubiranja uzoraka nema uticaja na osetljivost metode, pri čemu su ispitana vremena inkubiranja u trajanju od 3, 15 i 24 h.

## MATERIJAL I METODE

### Ispitivani polazni materijali

U ovom radu korišćeni su sledeći polazni materijali za ispitivanje hemolitičkih svojstava:

1. polipropilen Moplen EP 540 P,
2. polikarbonat bezbojan 164 R-112,
3. polikarbonat braon 164 R-51918,
4. polietilen NG 3026 K,
5. polietilen NG – Purell GB 7250,
6. polietilen VG – Hiplex 5502,

7. polietilen NG granulat za boce za infuzione rastvora.

Postupak za ispitivanje hemolitičkih svojstava potpuno je identičan za sve navedene polazne materijale. U potpunosti su primenjene obe varijante postupka definisanog standardom ASTM F756 sa jedinom razlikom što je polazni materijal bila svinjska krv, a ne zečija krv. Količina koja se koristi za ispitivanje je 6 g po ispitivanom materijalu, s obzirom da se svaki uzorak radi u tri ponovka.

### Sakupljanje i čuvanje krvi

Svinjska krv koja je korišćena za ispitivanja se uzima sa farme životinja nakon detaljnog veterinarskog pregleda. Krv se uzima u sterilnu bocu u kojoj se nalazi 5% rastvor natrijum-citrata. Odnos 5% rastvora natrijum-citrata i krvi je 1:9. Prema standardu za metodu ispitivanja krv se čuva na temperaturi 2–8 °C i koristi se najduže 72 h. Krv koja je korišćena u ovom ispitivanju čuvana je 48 h na temperaturi 2–8 °C.

### Pravljenje standardne krive za određivanje koncentracije hemoglobina

Za pravljenje standardne krive korišćena je kontrolna krv sa poznatom koncentracijom hemoglobina. Krv je razblažena Drabkinovim reagensom. Za svaku pojedinačnu koncentraciju izmerena je absorbancija na 540 nm. Kontrolna krv korišćena u toku ispitivanja prikazanih u ovom radu je ABX Minotrol 16 Control N (cHb = 135 mg/ml).

### Određivanje cHb u plazmi

Alikvot od 3 ml svinjske krvi sa antikoagulansom (5% natrijum-citrat) centrifugiran je 15 min na 3000 o/min. Pipetom je odvojeno 750 µl supernatanta (plazme) u koji je dodato 750 µl Drabkinovog reagensa. Rastvor je ostavljen 15 min na sobnoj temperaturi i očitana je absorbancija na 540 nm. Rezultat je prikazan u tabeli 1.

*Napomena.* Kada je vrednost cHb u plazmi  $\geq 2$  mg/ml, krv se ne može koristiti za dalja ispitivanja [2].

### Određivanje cHb u krvi

U dve kivete je pipetom odvojeno po 20 µl svinjske krvi i u svaku je dodato po 5 ml Drabkinovog reagensa. Kivete su ostavljene 15 min na sobnoj temperaturi, nakon čega je očitana absorbancija na 540 nm. Koncentracije su izračunate i određena je srednja vrednost koncentracije Hb u krvi. Krv je razblažena PBS puferom tako da finalna koncentracija Hb ulazi u okvir kriterijuma prihvatljivosti  $10 \pm 1$  mg/ml. Rezultati su prikazani u tabeli 2 [2,6].

### Provera napravljenog razblaženja krvi

Krv je razblažena PBS puferom u odnosu 1:14. Napravljeno je 75 ml razblažene krvi. Uzeta su tri alikvota od po 400 µl i dodata u tri kivete sa po 5 ml Drab-

kinovog reagensa. Kivete su ostavljene na sobnoj temperaturi 15 min. Očitana je absorbancija na 540 nm. Određene su pojedinačne koncentracije Hb i izračunata je srednja vrednost. Izračunata je i srednja vrednost absorbancija [2]. Rezultati su prikazani u tabeli 3.

#### Ispitivanje hemolitičkih svojstava polaznih materijala u direktnom kontaktu sa krvlju

U po tri epruvete odmereno je po 2 g svakog od ispitivanih polaznih materijala i epruvete su dopunjene sa po 10 ml PBS. U svaku epruvetu dodato je po 1,4 ml razblažene krvi ( $c = 9,05$  mg/ml).

pozitivna kontrola je pripremljena u triplikatu tako što je u tri epruvete pipetom odvojeno po 7 ml WFI, a zatim dodato po 1 ml razblažene krvi.

Negativna kontrola je pripremljena u triplikatu tako što je u tri epruvete pipetom odvojeno po 7 ml PBS, a zatim dodato po 1 ml razblažene krvi.

Sve pripremljene epruvete su termostahirane 3 h na 37 °C. U toku inkubiranja na svakih 45 min su okretane i vraćane na inkubiranje.

Nakon inkubiranja svi uzorci su prebačeni u kivete za centrifugiranje i centrifugirani 15 min na 3000 o/min.

Iz svake kivete uzet je po alikvot od 1 ml i dodat je u epruvetu u kojoj se nalazi 1 ml Drabkinovog reagensa. Epruvete su ostavljene 15 min na sobnoj temperaturi. Očitana je absorbancija na 540 nm [2,6]. Rezultati su prikazani u tabeli 4.

#### Ispitivanje hemolitičkih svojstava polaznih materijala u kontaktu njihovih ekstrakata sa svinjskom krvlju

*Priprema ekstrakata.* Svaki uzorak je pripremljen u triplikatu tako što je u epruvetu odmereno po 2 g ispitivanog materijala i dodato 10 ml PBS pufera. Triplikati pozitivne i negativne kontrole pripremljeni su tako što je u po tri epruvete pipetom odvojeno po 10 ml WFI i 10 ml PBS. Sve pripremljene epruvete su autoklavirane 1 h na 121 °C. Nakon autoklaviranja sadržaj epruveta je prebačen u kivete za centrifugiranje. Kivete su centrifugirane 10 min na 3500 o/min.

*Ispitivanje hemolitičkih svojstava.* Iz svake kivete je pipetom odvojeno u epruvete po 7 ml ekstrakta, pozitivne i negativne kontrole. U svaku epruvetu je dodato po 1 ml razblažene krvi ( $c = 9,05$  mg/ml). Sa uzorcima, pozitivnom i negativnom kontrolom je postupano kao što je opisano u delu teksta koji se odnosi na direktan kontakt ispitivanih materijala sa svinjskom krvlju [2,6]. Rezultati su prikazani u tabeli 5.

#### Uticaj dužine inkubiranja na osetljivost metode direktnog kontakta

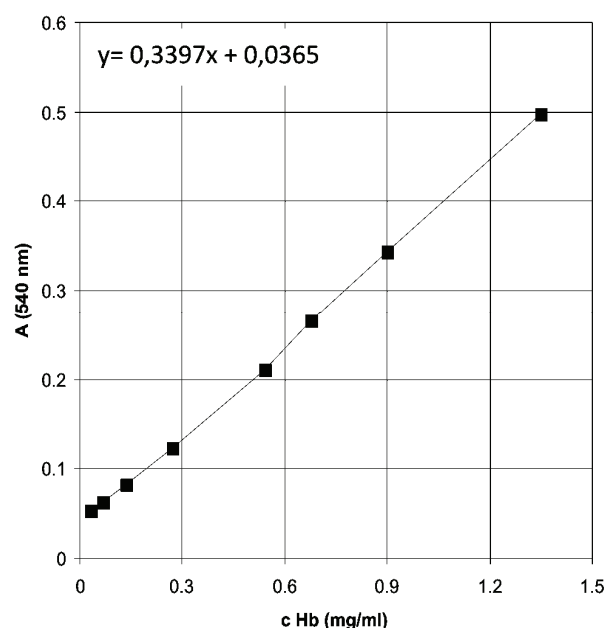
Za metodu direktnog kontakta ponovljeno je ispitivanje sa istim uzorcima i različitim dužinama inkubiranja. Uzorci su inkubirani na 37 °C u trajanju od 3, 15 i 24 h.

## REZULTATI I DISKUSIJA

Prilikom obrade i diskusije rezultata primenjeni su opšti principi za ocenjivanje tačnosti (istinitost i preciznost) metoda i rezultata merenja u skladu sa standardom SRPS ISO 5725-1 [7].

#### Pravljenje standardne krive za određivanje koncentracije hemoglobina

Upotrebljeno je 8 koncentracija Hb za pravljenje standardne krive, razblaživanjem kontrolne krvi. Koncentracije i izmerene absorbancije prikazane su na slici 1. Ekstrapolacijom je dobijena jednačina krive.



Slika 1. Standardna kriva za određivanje koncentracije Hb.  
Figure 1. Standard curve for Hb concentration determination.

Jednačina krive,  $y = 0,3397x + 0,0365$ , korišćena je u daljem radu za izračunavanje nepoznatih koncentracija hemoglobina.

#### Određivanje Hb u plazmi

U tabeli 1 prikazana je izmerena vrednost absorbancije uzorka plazme, na osnovu koje je izračunata koncentracija Hb (mg/ml) u plazmi. S obzirom da je uzorak plazme pomešan sa Drabkinovim reagensom u odnosu 1:1, faktor razblaženja je 2.

Tabela 1. Određivanje koncentracije Hb u plazmi  
Table 1. Plasma Hb concentration determination

$A_{540nm}$	Faktor razblaženja	cHb (plazma) / mg ml <sup>-1</sup>
0,206	2	0,998

Stajanjem citrirane životinjske krvi povećava se fragilnost eritrocita, zbog čega je i navedeno da se krv

može koristiti najduže 72 h (čuva se na 2–8 °C) od trenutka uzimanja, ali se i pored toga koncentracija hemoglobina u plazmi određuje pri svakom ispitivanju. Isto važi i za određivanje koncentracije hemoglobina u samoj krvi.

### Određivanje Hb u krvi

U tabeli 2 prikazani su rezultati određivanja koncentracije Hb u svinjskoj krvi.

Tabela 2. Određivanje koncentracije Hb u krvi  
Table 2. Whole blood Hb concentration determination

$A_{540nm}$	Faktor razblaženja	cHb (svinjska krv) mg/ml	cHb, sr. vr. mg/ml
0,257	251	162,92	146,66
0,213	251	130,41	

Na osnovu dobijene srednje vrednosti cHb od 146,66 mg/ml, krv treba razblažiti 15 puta, da bi se dobila krv koncentracije koja zadovoljava kriterijum prihvatljivosti cHb = 10±1 mg/ml.

### Provera napravljenog razblaženja svinjske krvi

Na osnovu ove provere (Tabela 3) zaključuje se da je razblaženje dobro napravljeno i da je zadovoljen kriterijum prihvatljivosti da početna koncentracija Hb za nastavak ispitivanja bude 10±1 mg/ml.

Tabela 3. Provera koncentracije Hb u napravljenom razblaženju krvi  
Table 3. Checking of dilution factor applied to whole blood

$A_{540nm}$	Faktor razblaženja	cHb (svinjska krv), mg/ml	cHb, sr. vr. mg/ml	$A_{540nm}$ sr. vr.
0,259	13,5	8,84	9,05	0,2643
0,269	13,5	9,24		
0,265	13,5	9,08		

### Ispitivanje hemolitičkih svojstava u direktnom kontaktu polaznih materijala sa svinjskom krvlju

U tabeli 4 prikazani su rezultati ispitivanja 7 polaznih materijala u direktnom kontaktu sa svinjskom krvlju. Određena je standardna devijacija i procenat hemolitičkog dejstva.

Procenat hemolitičkog dejstva određen je na osnovu formule:

$$\%H = \frac{(A(\text{uzorka}) - A(\text{negativne kontrole})) \times 100\%}{0,844A_{sr}(\text{razbl. krvi}) - A(\text{negativne kontrole})}$$

### Ispitivanje hemolitičkih svojstava polaznih materijala u kontaktu njihovih ekstrakta sa svinjskom krvlju

U tabeli 5 prikazani su rezultati ispitivanja 7 polaznih materijala u kontaktu njihovih ekstrakata sa svinjskom krvlju. Određena je standardna devijacija i procenat hemolitičkog dejstva.

Tabela 4. Rezultati ispitivanja 7 polaznih materijala u direktnom kontaktu sa svinjskom krvlju  
Table 4. Results of testing of seven raw materials in direct contact with swine blood

Određena karakteristika	Uzorak								
	D1(I)	D1(II)	D1(III)	D2(I)	D2(II)	D2(III)	D3(I)	D3(II)	D3(III)
$A_{540nm}$	0,045	0,045	0,045	0,045	0,045	0,045	0,045	0,045	0,045
F. razblaženja	16	16	16	16	16	16	16	16	16
cHb	0,400	0,400	0,400	0,400	0,400	0,400	0,400	0,400	0,400
St. dev.		0			0			0	
%H		0			0			0	
	D4(I)	D4(II)	D4(III)	D5(I)	D5(II)	D5(III)	D6(I)	D6(II)	D6(III)
$A_{540nm}$	0,046	0,047	0,047	0,045	0,045	0,046	0,047	0,046	0,045
F. razblaženja	16	16	16	16	16	16	16	16	16
cHb	0,447	0,495	0,495	0,400	0,400	0,447	0,495	0,447	0,400
St. dev.		0,028			0,027			0,047	
%H		0,94			0,19			0,56	
	D7(I)	D7(II)	D7(III)	P1WFI	P2WFI	P3WFI	N1PBS	N2PBS	N3PBS
$A_{540nm}$	0,046	0,046	0,045	0,227	0,229	0,230	0,045	0,045	0,045
F. razblaženja	16	16	16	16	16	16	16	16	16
cHb	0,447	0,447	0,400	8,97	9,07	9,11	0,400	0,400	0,400
St. dev.		0,027			0,072			0	
%H		0,37			103,13			0	

Tabela 5. Rezultati ispitivanja 7 polaznih materijala u kontaktu njihovih ekstrakata sa svinjskom krvlju  
 Table 5. Results of testing of extracts of seven raw materials testing in contact with swine blood

Određena karakteristika	Uzorak								
	E1(I)	E1(II)	E1(III)	E2(I)	E2(II)	E2(III)	E3(I)	E3(II)	E3(III)
$A_{540\text{ nm}}$	0,045	0,045	0,045	0,045	0,045	0,045	0,045	0,045	0,045
F. razblaženja	16	16	16	16	16	16	16	16	16
cHb	0,400	0,400	0,400	0,400	0,400	0,400	0,400	0,400	0,400
St. dev.		0			0			0	
%H		0			0			0	
	E4(I)	E4(II)	E4(III)	E5(I)	E5(II)	E5(III)	E6(I)	E6(II)	E6(III)
$A_{540\text{ nm}}$	0,046	0,046	0,046	0,045	0,045	0,045	0,045	0,046	0,046
F. razblaženja	16	16	16	16	16	16	16	16	16
cHb	0,447	0,447	0,447	0,400	0,400	0,400	0,400	0,447	0,447
St. dev.		0			0			0,027	
%H		0,56			0			0,37	
	E7(I)	E7(II)	E7(III)	P1WFI	P2WFI	P3WFI	N1PBS	N2PBS	N3PBS
$A_{540\text{ nm}}$	0,045	0,045	0,045	0,217	0,234	0,233	0,046	0,044	0,045
F. razblaženja	16	16	16	16	16	16	16	16	16
cHb	0,400	0,400	0,400	8,50	9,30	9,26	0,447	0,353	0,400
St. dev.		0							
%H		0			102,75			0	

Na slici 2 prikazan je odnos dobijenih rezultata procenta hemolitičkog dejstva ispitivanih polaznih materijala u direktnom kontaktu i kontaktu njihovih ekstrakata sa svinjskom krvlju.

#### Kriterijumi prihvatljivosti pri ispitivanju hemolitičkih svojstava polaznih materijala

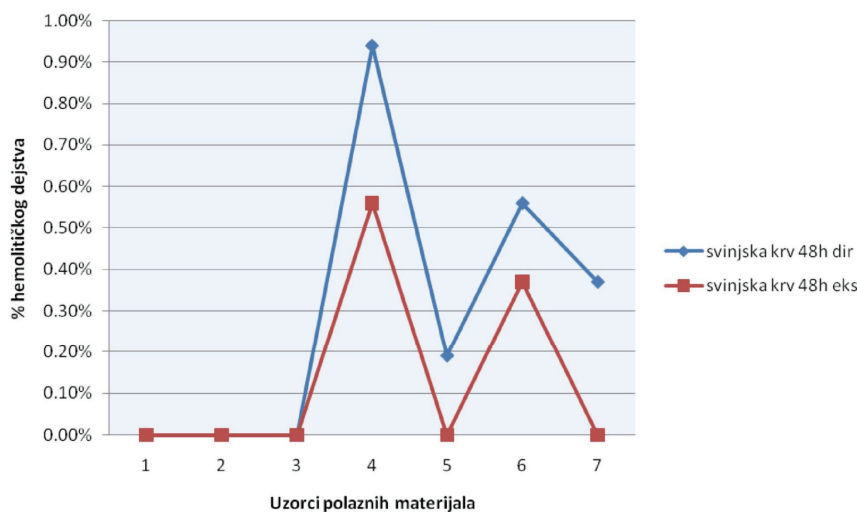
U tabeli 6 navedeni su kriterijumi prihvatljivosti koji se odnose na obe metode ispitivanja hemolitičkih svojstava polaznih materijala.

#### Uticaj dužine inkubiranja na osetljivost metode direktnog kontakta

Na slici 3 prikazani su rezultati ispitivanja uticaja dužine inkubiranja na osetljivost metode direktnog kontakta. Pokazano je da dužina inkubiranja uzoraka nema uticaja na osetljivost metode.

#### Osvrt na ekonomičnost izabrane varijante metode

Pored prednosti metode direktnog kontakta kao osetljivije, neophodno je istaći i troškovni aspekt njene



Slika 2. Procenat hemolitičkog dejstva u direktnom kontaktu i kontaktu ekstrakata polaznih materijala sa svinjskom krvlju.  
 Figure 2. Percentage of hemolysis in direct contact and their extracts' contact with swine blood.

primene. Navedena metoda je jeftinija zbog manjeg utroška resursa koji se ogleda u manjem angažovanju ljudskih resursa, kraćem vremenu izvođenja i užem asortimanu laboratorijske opreme, što implicira snižavanje ukupnih troškova poslovanja korporacije u farmaceutskoj industriji [9,10]. To ukazuje na činjenicu da se metoda direktnog kontakta, može, po potrebi, češće primenjivati u praksi uz isti trošak rada laboratorije.

Tabela 6. Kriterijumi prihvatljivosti za određivanje hemolitičkih svojstava materijala koji dolaze u kontakt sa krvlju

Table 6. Acceptance criteria for hemolytic properties of materials that come in contact with blood

Uzorci	Hemolitičko dejstvo, %	Ocena hemolitičkih svojstava
Ispitivani materijali	0–2	Odsustvo hemolitičkog dejstva
	2–5	Blago hemolitičko dejstvo
	>5	Hemolitičko dejstvo
Negativna kontrola	≤2	Odsustvo hemolitičkog dejstva
Pozitivna kontrola	≥8	Izraženo hemolitičko dejstvo

Gore navedeno upućuje na moguće smernice daljeg istraživanja sa aspekta primene analize troškova s ciljem povećanja ekonomičnosti relevantne metode ispitivanja [10].

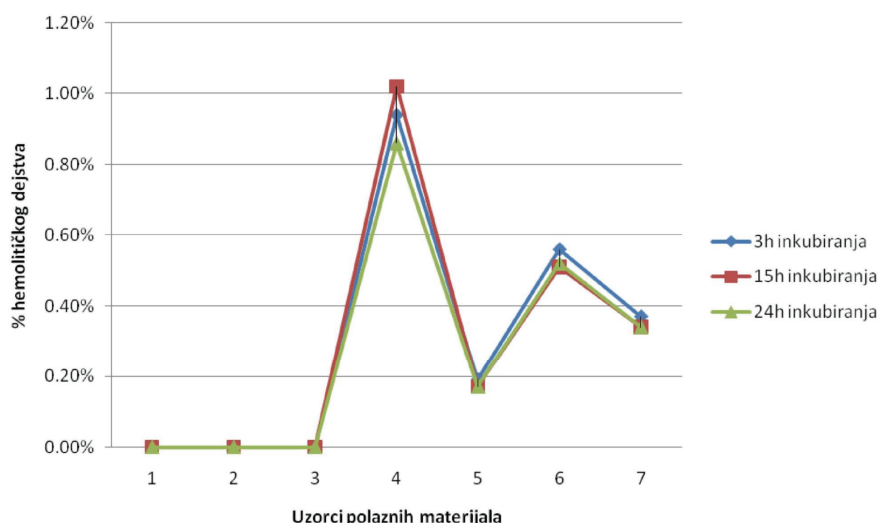
## ZAKLJUČAK

U ovom radu predstavljene su dve varijante metode ispitivanja hemolitičkih svojstava polaznih materijala od kojih se šest koristi za proizvodnju medicinskih sredstava i jedan za proizvodnju plastičnih boca za infuzione rastvore, koji direktno ili indirektno dolaze u kontakt sa

humanom krvlju. Za sedam polaznih materijala urađeno je poređenje dobijenih rezultata po obe varijante metode kada su ispitivani materijali direktno i njihovi ekstrakti bili u kontaktu sa svinjskom krvlju. Rezultati obe varijante metode pokazuju da polazni materijali polipropilen Moplen EP 540 P, polikarbonat bezbojan 164 R-112 i polikarbonat braon 164 R-51918 imaju 0% hemolitičkog dejstva. U indirektnom kontaktu polazni materijali polietilen NG – Purell GB 7250 i polietilen NG granulat za boce za infuzione rastvore imaju 0% hemolitičkog dejstva dok u direktnom kontaktu imaju 0,19 i 0,37%. Uzorci polaznih materijala polietilen NG 3026 K i polietilen VG – Hiplex 5502 u obe varijante primenjene metode pokazuju odsustvo hemolitičkog dejstva i to u direktnom kontaktu 0,94 i 0,56%, a u indirektnom 0,56 i 0,37%.

Na osnovu dobijenih rezultata zaključeno je da svi materijali zadovoljavaju kriterijume prihvatljivosti i to u slučaju obe varijante metode ispitivanja, kao i da metoda direktnog kontakta ima veću osetljivost od metode u kojoj su korišćeni ekstrakti ovih materijala. Metoda pokazuje reproduktivnost dobijenih rezultata u odnosu na procenat hemolitičkog dejstva, u direktnom i indirektnom kontaktu, ali s obzirom da je u pitanju biološki test međulaboratorijska varijabilnost je očekivana.

Prikazano je poređenje rezultata dobijenih primenom obe varijante metode za ispitivanje navedenih sedam polaznih materijala. Ovaj uporedni prikaz je služio za izvođenje zaključaka o pogodnosti za odabir jedne od prikazanih varijanti metode za rutinsku primenu u laboratoriji, na osnovu veće osetljivosti, a time i pouzdanosti za ocenu hemolitičkih svojstava polaznih materijala. Na osnovu dobijenih rezultata izabrana je varijanta metode direktnog kontakta, koja je pored navedenih prednosti i manje složena i vremenski manje zahtevna, s obzirom da ne zahteva upotrebu autoklava i dodatnog angažova-



Slika 3. Uticaj dužine inkubiranja na osetljivost metode direktnog kontakta.  
Figure 3. Incubation length impact on direct contact method's sensitivity.

nog vremena osoblja, što snižava njenu cenu i olakšava primenu. U radu je pokazano i da dužina inkubiranja uzoraka nema uticaj na osetljivost varijantu metode direktnog kontakta. Zbog toga se ova varijanta metode može preporučiti za dalju primenu, ne samo kao pouzdanija sa aspekta struke, već i sa aspekta ekonomičnosti ispitivanja kao varijanta metode koja je jeftinija zbog manjeg angažovanja osoblja i manjeg obima opreme.

## LITERATURA

- [1] Practice Under the Jurisdiction of ASTM Committee F04 on Medical and Surgical Materials and Devices and is the direct responsibility of Subcommittee F04.16 on Biocompatibility Test Methods (<http://www.astm.org>).
- [2] ASTM F 756, Standard practice for assessment of hemolytic properties of materials, 2009.
- [3] D. Albert, Materials characterization as an integral part of global biocompatibility, *Med. Plast. Biomater.* **11** (4) (1997) 16–23.
- [4] ISO 10993-4, Biological evaluation of medical devices – Part 4: Selection of tests for interactions with blood, 2002.
- [5] G.L. Moore, M.E. Ledford, A. Merydith, A micromodification of the Drabkin hemoglobin assay for measuring plasma hemoglobin in the range of 5 to 2000 mg/dl, *Biochem. Med.* **26** (1981) 167–173.
- [6] R.A. Malinauskas, Plasma hemoglobin measurement techniques for the *in vitro* evaluation of blood damage caused by medical devices, *Artif. Organs* **21** (1997) 1255–1267.
- [7] SRPS ISO 5725-1, Tačnost (istinitost i preciznost) metoda i rezultata merenja. Deo 1: Opšti principi i definicije, 2007.
- [8] V. Božanić, G. Pejović, Akreditovane laboratorije, FON, Beograd, 2010 (knjiga u pripremi, udžbenik).
- [9] V. Božanić, B. Jovanović, Upravljanje kvalitetom materijalnih resursa, udžbenik, FON, Beograd, 2010.
- [10] B. Ilić, V. Milićević, Menadžment troškova – strategijski okvir, monografija, FON, Beograd, 2009.

## SUMMARY

LABORATORY TESTING OF HEMOLYTIC PROPERTIES OF MATERIALS THAT COME IN CONTACT WITH BLOOD: COMPARATIVE APPLICATION TESTING METHOD'S TWO VARIANTS ACCORDING TO THE STANDARD ASTM F756 IN ACCORDANCE WITH ISO 10993-4

Katarina B. Pavlović<sup>1</sup>, Vojislav N. Božanić<sup>2</sup>, Jasna V. Stanojević<sup>1</sup>, Vesna K. Milićević<sup>2</sup>, Bojan J. Ilić<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Hemofarm STADA, Vršac, Serbia

<sup>2</sup>Faculty of Organizational Sciences, Belgrade, Serbia

(Professional paper)

The presence of hemolytic material in contact with blood may produce increased levels of blood cell lysis and increased levels of plasma hemoglobin. This may induce toxic effects or other effects which may stress the kidneys or other organs. In this paper two variants of *in vitro* method and obtained results' comparison were presented for testing of hemolytic properties of six raw materials (polipropylene Moplen EP 540 P, polycarbonate colorless 164 R-112, polycarbonate brown 164 R-51918, polietylene NG 3026 K, polietylene NG – Purell GB 7250, polietylene VG – Hiplax 5502) for medical device manufacturing and one raw material (polietylen NG granulate) used for infusion solutions plastic bottles manufacturing. One of the method variants relies on direct contact of the raw material with swine blood and the other on contact of extract of the material with swine blood. Both variants imply reading of the absorbance of the supernatant after tubes were incubated and centrifuged. According to the values obtained and using the standard curve free hemoglobin concentration is determined and based on this percentage hemolysis of raw material. Positive and negative controls were used in both variants where water for injection (WFI) was used as positive control in which partial or complete hemolysis of erythrocytes occurs due to osmotic shock and phosphate buffer saline was used as negative control with no hemolytic property. In this paper a comparison of results obtained by both method variants for testing of seven raw materials is presented, while these conclusions cannot be used neither for all materials, nor for all applications without preliminary testing using both variants and then choosing more sensitive and more reliable one. It was shown and stated in the paper as well that incubation time being 3, 15 or 24 h, had no impact on the variants with direct contact sensitivity. This comparative approach was used for drawing conclusions in terms of suitability for application of one or the other method variant, as well as for defining relevant incubation time and finally for choosing the more sensitive and more reliable variant for assessment of hemolytic properties of raw materials. The variant with direct contact was chosen from the aspect of less complexity regarding necessary laboratory equipment which makes it economically more favorable and fit for the purpose.

Ključne reči: Hemolitička svojstava materijala • Biološka laboratorijska ispitivanja • ASTM F 756 • ISO 10993-4 • SRPS ISO 5725-1 • Ekonomičnost

Key words: Hemolytic properties of materials • Biology laboratory tests • ASTM F 756 • ISO 10993-4 • SRPS ISO 5725-1 • Cost-effectiveness