

615.38—085.44[:547.415.1—292]

### EXPERIMENTÁLNÍ PŘÍSPĚVEK K STUDIU MOŽNOSTI POUŽÍT Na<sub>2</sub>EDTA PŘI KONZERVACI KRVE

Podplukovník MUDr. Evžen SKALA, CSc., Ústřední vojenská nemocnice,  
doc. MUDr. Jan POSPÍŠIL, CSc., Biofyzikální ústav FVL Karlovy university v Praze  
(přednosta: prof. MUDr. Z. Dienstbier, DrSc.)

Snad všechny transfúzní služby používají ke konzervaci krve roztoků typu ACD (citrán sodný, kyselina citronová, glukóza), který byl navržen před 25 lety. To svědčí o tom, že v praxi vyhovuje, i když není optimální. Výlučné používání roztoků typu ACD vede ovšem k tomu, že takřka sama existence transfúzní služby je v současné době závislá na dostupnosti jediné chemikálie — citranu sodného. Nevýhody z toho plynoucí za mimořádných okolností jsou zcela zřejmé.

Cílem naší práce bylo zjistit, zda lze uvažovat pro tyto případy o konzervačním roztoku s antikoagulační látkou jiné povahy.

Zvolili jsme dvojsodnou sůl kyseliny etylendi-aminotetraoctové (dále EDTA). Tato látka byla připravena v IG-Farben již v roce 1938 a byla během 2. světové války studována v Německu z hlediska možnosti jejího využití pro jateční účely (5). Je známa pod řadou názvů: Trilon B\*), Komplexon III, Sequestren, Versen, Endrate, Edathamile, Anaklepton. Je to bílá, krystalická látka, rozpustná ve vodě až do koncentrace 11 %, s význačnou schopností vázat kationty. Vzniklé komplexní sloučeniny jsou ve vodě rozpustné a značně stálé v alkalické, ale i neutrální oblasti. K vazbě dochází v molárních poměrech — 37,21 mg EDTA váže 4,008 mg Ca\*\*).

Je třeba zdůraznit, že použití EDTA místo citranu sodného neznamená pro konzervaci krve přínos, ovšem jde o látku stálou, relativně levnou, sterilizovatelnou a výrobně zcela nezávislou na citranu sodném.

Nejdříve jsme stanovili v pokusech na psech, že maximální bezpečná koncentrace EDTA u vel-

mi rychlých transfúzí je 0,08 %, tedy 0,40 g EDTA pro 500 ml krve (14). Literární údaje o vlivu opakovaného podávání EDTA dospělým krysám jsme chtěli doplnit dlouhodobou aplikací EDTA rostoucím pokusným zvířatům, což pokládáme za citlivější test. V písemnictví jsme dále nenašli údaje o vlivu radiačního poškození příjemce na relativní toxicitu EDTA.

#### I. Vliv opakovaného podávání EDTA

##### Metodika

K pokusům jsme použili 87 krys kmene Wistar (Mezno) ve 2 kontrolních a 4 pokusných skupinách po 13—15 jedincích. Byly krmeny obvyklou dietou Velaz, vodu k pití měly ad libitum. Průměrná výchozí váha zvířat byla 93 g. Krysám jsme dvakrát týdně aplikovali intraperitoneálně sterilní zkoušený roztok, a to vždy v dávce 1 ml/100 g těl. váhy, přibližnou rychlostí 1 ml za vteřinu. Byly zkoušeny roztoky: 3mM-EDTA, 12 mM-EDTA, 48 mM-citrán sodný; 12 mM-CaNa<sub>2</sub> EDTA a 0,9 % NaCl (kontroly). Každý týden byla zaznamenána váha zvířat a sledován jejich stav. Po 8—9 týdnech byly krysy usmrceny (za 3 dny po poslední aplikaci zkoušené látky) a od 4 zvířat každé skupiny byly odebrány ledviny na histologické vyšetření (fixace 10% formolem, barvení hematoxylinem-eozinem). Byly provedeny rentgenogramy kostí. Váhové křivky jsme zpracovali statisticky Studentovým t- testem.

##### V ý s l e d k y

Pouze u skupiny zvířat, kterým byl aplikován 12 mM-roztok EDTA, došlo od 3. týdne k signi-

\*) Není bez zajímavosti, že tohoto názvu použili později Němci jako krycí označení tehdy nově vyvinutých bojových organofosfátů.

fikantnímu ( $p < 0,001$ ) snížení váhového přírůstu a toto snížení se udrželo po celou dobu sledování. Zvířata jevila v posledních 2—3 týdnech zvýšenou dráždivost. U ostatních skupin nedošlo k hodnotitelným odchylkám v tělesné váze a svým chováním se zvířata nelišila od kontrolních krys.

Při histologickém vyšetření nebyly v řezech barvených hematoxylinem-eozinem nalezeny patologické změny ani v glomerulech, ani v tubulárním aparátu.

Rentgenogramy kostí neprokázaly dekalciční změny v žádné skupině.

### Diskuse

Odpovídá-li celkové množství krevní plazmy 6,2 % tělesné váhy krysy a průměrná hladina vápníku v plazmě je 9,4 mg% (9), stačil by 1 ml 12 mM-roztoku EDTA/100 g váhy zvířete — podán intravenózně — k blokádě 83 % všeho plazmatického vápníku za předpokladu ekvivalentní vazby. Abychom vyloučili okamžitý dekalciční účinek preparátu, podávali jsme jej intraperitoneálně.

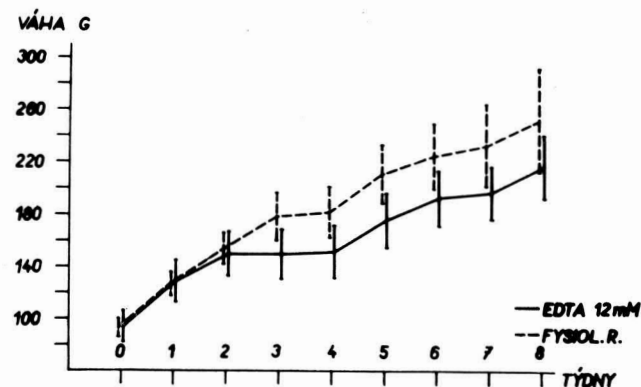
K zpomalení růstu došlo až za 3 týdny a rozdíl vah byl 30—40 g. Tento rozdíl se udržel až do konce sledování, neprohluboval se však. Aplikace  $\text{CaNa}_2\text{EDTA}$  o téže molaritě neměla žádný vliv.

Foreman (6) sledoval vliv opakovaného podávání  $\text{CaNa}_2\text{EDTA}$  dospělým krysám. Stanovil, že k vyvolání poruchy ledvin u poloviny pokusných zvířat je třeba podávat denně 203 mg  $\text{CaNa}_2\text{EDTA}$ /kg váhy/den. U dávky 62,5 mg nezjistil žádné změny v ledvinách ani po 16 dnech. Důležitá jsou dvě Foremanova zjištění: kromě ledvin nejsou postiženy jiné orgány, za několik dní po ukončení podávání preparátu histologicky zjištěné změny v ledvinách ustupují.

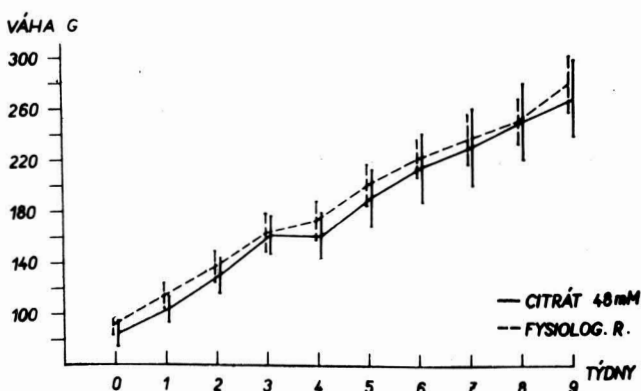
V klinické praxi bylo EDTA použito v řadě diagnostických i léčebných indikací. Od zprávy Hollanda a spol. (7), Dudleye a spol. (4) a Spencerové a spol. (15) o nejméně pěti smrtelných zakončených léčby sekundární hyperkalcémie pomocí EDTA bylo referováno opakovaně o podobných případech, ovšem při léčbě otravy olovem pomocí  $\text{CaNa}_2\text{EDTA}$  (8, 11, 16, 17). Sekční a histologický nálezy byly značně bohaté s řadou extrarenálních změn a s krvácivými projevy (11). Tím se tedy tyto případy podstatně liší od Foremanových pokusů (6). Může jít o účinek chelátu, ale i samotného těžkého kovu uvolněného z vazby na chelátotvornou látku vlivem kyselosti moče. Ovšem v některých případech (3, 7, 15) jde nesporně o vliv samotné EDTA, podané v obrovských dávkách (opakovaně kolem 10 g denně). S těmito dávkami se dnes již v písemnictví nesetkáváme; obvykle se neaplikuje více než 3 g EDTA denně.

Naše pokusy neřeší otázku vlastního mechanismu účinku opakovaného podávání EDTA na organismus. Širší aspekty této problematiky jsou diskutovány jinde (13). Domníváme se, že

Obr. 1



Obr. 2



posouzení váhových křivek rostoucích zvířat poskytuje cenné údaje celkového charakteru. Dosažené výsledky svědčí pro značnou kompenzační schopnost organismu. Lze soudit, že nadbytek EDTA, který je z praktických důvodů vždy v krevních konzervách — 0,4 g místo teoreticky nutných 0,25 g — se neuplatní ani při opakovaných transfúzích jako kumulativní nefrotoxický faktor.

## II. Vliv EDTA na ozářený organismus

### Metodika

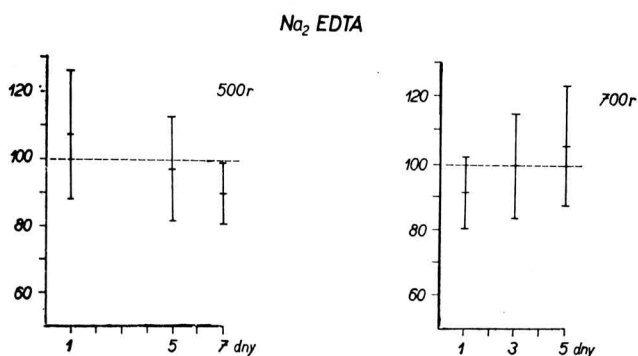
K pokusům jsme použili 1610 bílých laboratorních myší kmene H (Mezno), samců, o váze 18—22 g. Myši byly ozařovány Rtg-přístrojem Makrophos 250/200 kV, 14 mA, OK 100 cm, filtr 0,5 mm Cu, 1 mm Al, PV 11,8 mm Al, příliv 10 r/min. v kruhové, otáčející se schránce z organického skla (1 otáčka za 132 vt.), kde byla každá myš ve zvláštním oddílu. Předem bylo na 410 myších stanoveno, že LD 50/30 je za uvedených podmínek 500 r (95% mez spolehlivosti: 470—530 r). Pro další pokusy jsme proto zvolili dávky celotělového ozáření 500 r a 700 r.

Myším jsme aplikovali intravenózně izotonické roztoky EDTA (4,5 %) a citranu sodného (3,8 %), ředěné dále podle potřeby fyziologickým roztokem. Rychlost aplikace byla asi 0,1 ml za vteřinu.

Pro stanovení relativní toxicity jsme každou z obou látek podali v 5 dávkách, a to vždy 10 ozářeným a 10 neozářeným myším. Termíny podávání jsme zvolili s ohledem na klinický průběh nemoci z ozáření (viz grafy). Pokusy jsme vyhodnotili grafickou metodou podle Rotha (12).

### V ý s l e d k y

Obr. 3



O statisticky významnou změnu jde tehdy, nedotýká-li se příslušná úsečka osové čáry

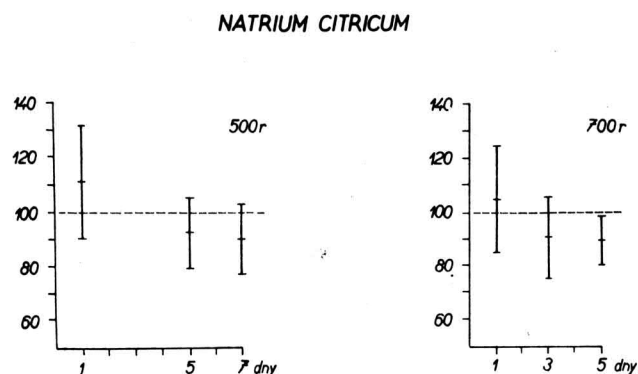
Relativní toxicita EDTA byla statisticky významně snížena u myši ozářených dávkou 500 r sedmý den po ozáření. Relativní toxicita citranu sodného byla snížena pátého dne po ozáření dávkou 700 r. Ve všech ostatních skupinách se relativní toxicita nelišila od neozářených kontrol. K uhynutí zvířat docházelo v křečích během několika vteřin po aplikaci roztoku.

### D i s k u s e

Z výsledků pokusů je zřejmé, že dochází jen k nepříliš významným změnám relativní toxicity obou sledovaných látek.

Naše pokusy nepřispívají k řešení otázky významu kalcia při akutní nemoci z ozáření. V podmínkách pokusu jde o náhlou jednorázovou hypokalcémii krátkého trvání. Vzhledem k značné kompenzační schopnosti organismu bychom spíše mohli pokusy považovat za jakési testování funkční schopnosti myokardu než za významnější zásah do iontového hospodářství celého organismu. Radioprotektivní účinek EDTA,

Obr. 4



popisovaný některými autory (1, 2), bychom spíše chápali jako nespecifický popud. Dobrá snášenlivost jednorázových dávek EDTA i citranu sodného ozářenými pokusnými zvířaty není v rozporu s příznivým účinkem vápníku při komplexní terapii nemoci z ozáření (10).

Lze předpokládat, že EDTA, stejně jako citranu sodného, je možno použít k přípravě krevních konzerv, určených k transfúzím ozářeným jedincům.

### Závěr

Výlučná orientace transfúzních služeb na konzervační roztoky s citranem sodným způsobuje, že chybí základní údaje o možnosti použití v případě nutnosti ke konzervaci krve antikoagulační látky jiného typu. Ke studiu jsme zvolili Na<sub>2</sub> EDTA. V pokusech na rostoucích krysách, kterým byla dvakrát týdně podávána tato látka po dva měsíce, bylo zjištěno, že teprve 12 mM-roztok v dávce 1 ml/100 g tělesné váhy snížil od 3. týdne váhovou křivku zvířat. Nedošlo k histologicky prokazatelným změnám ani k de-kalcinačním změnám na kostech.

Při studiu relativní toxicity této látky u myši ozářených celotělově 500 r a 700 r byly zjištěny nevýznamné změny. Lze tedy uvažovat o Na<sub>2</sub> EDTA jako možném základu roztoků ke konzervaci krve v případě nedostupnosti citranu sodného.

### Literatura

- Bacq, Z. M., Herve, A., Fischer, P.: Rayons X et agents de chelation. Bull. Acad. Méd. Belg., 16, 1953, 2: 228-235.
- Barnes, J. H., Philpot, J. S. L.: The role of calcium complex formation in radioprotection by inorganic condensed phosphates and EDTA. Int. J. Rad. Biol., 7, 1963, 427-445.
- Clarke, N. E., Clarke, C. N., Mosher, R. E.: The in vivo dissolution of metastatic calcium; an approach to atherosclerosis. Amer. J. med. Sci., 229, 1955, 2: 142-149.
- Dudley, H. R., Ritchie, A. C., Schilling, A., Baker, W. H.: Pathologic changes associated with the use of sodium ethylene diamine tetra-acetate in the treatment of hypercalcemia; report of two cases with autopsy findings. N. Engl. J. Med., 252, 1955, 9: 331-337.
- Dyckerhoff, H., Marx, R., Ludwig, B.: Über den Wirkungsmechanismus und die Verwendbarkeit einiger blutgerinnungshemmender organischer Substanzen. Z. ges. exp. Med., 110, 1942, 412-422.
- Foreman, H., Finnegan, C., Lushbaugh, C. C.: Nephrotoxic hazard from uncontrolled edathamil calcium-disodium therapy. J. Amer. med. Ass., 160, 1956, 12: 1042-1048.
- Holland, J. F., Danielson, E., Sahagian, E., Edwards, A.: Use of ethylene diamine tetra acetic acid in hypercalcemic patients. Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.), 84, 1953, 4: 359-364.
- Moeschlin, S.: Zur Klinik und Therapie der Bleivergiftung mit Bericht über eine tödliche toxische Nephrose durch Ca-EDTA (Calciumversenat). Schweiz. med. Wschr., 87, 1957, 34: 1091-1096.
- Payne, J. M., Sanson, B. F.: The susceptibility of various groups of rats to experimental hypocalcaemia. J. Physiol. (London), 168, 1963, 554-563.
- Pospíšil, J., Dientsbier, Z.: Experimentální příspěvek k léčbě nemoci z ozáření převody plné krve. Voj. zdrav. listy, 29, 1980, 3: 102-110.
- Reuber, M. D., Bradley, J. E.: Acute versenate nephrosis occurring as the result of treatment for lead intoxication. J. Amer. med. Ass., 174, 1960, 3: 263-269.
- Roth, Z. v Roth-Josífko-Malý-Trčka: Statistické metody v experimentální medicíně. Praha, SZdN 1962, s. 413.
- Skala, E. a spol.: Možnosti využití Na<sub>2</sub>EDTA při konzervaci krve. (Závěrečná zpráva výzkumného úkolů.) Praha 1965.
- Skala, E., Pospíšil, J.: Akutní toxicita Na<sub>2</sub>EDTA při rychlých transfúzích u psů. V tisku.
- Spencer, H., Greenberg, J., Berger, E., Perrone, M., Laszlo, D.: Studies on the effect of ethylene-diamintetraacetic acid in hypercalcemia. J. lab. clin. Med., 47, 1956, 1: 29-41.
- Vogt, W., Cottier, H.: Nekrotisierende Nephrose nach Behandlung einer subakut-chronischen Bleivergiftung mit Versenat in hohen Dosen. Schweiz. med. Wschr., 87, 1957, 22: 665-667.
- Weinig, E., Schwed, W.: Nil nocere! Gefahren bei der Behandlung der Bleiintoxikation mit Calciumversenat (Mosatil Komplexon). Münch. med. Wschr. 100, 1958, 46: 1788-1789.

Děkujeme doc. dr. Vorreithovi za histologické vyšetření preparátů a s. I. Tejnorové za vynikající technickou pomoc.