

612.111/112-085:615.47

MOŽNOSTI KLINICKÉHO VYUŽITÍ SEPARÁTORU KREVNÍCH TĚLÍSEK

Pplk. MUDr. Milan BLÁHA, CSc., genmjr. doc. MUDr. Jaroslav VAŇÁSEK, CSc., MUDr. Oldřich ŠIROKÝ,
RNDr. Miroslav PECKA

Vojenský lékařský výzkumný a doškolovací ústav JEP v Hradci Králové
(náčelník. genmjr. doc. MUDr. Jaroslav Vaňásek, CSc.)

II. interní klinika Lékařské fakulty UK v Hradci Králové
(přednosta: plk. doc. MUDr. Vladimír Pidrman, CSc.)

Do nedávné doby bylo možno bez zvláštních obtíží převádět nemocným pouze erytrocyty. V posledních patnácti letech bylo dosaženo zlepšení techniky separace krevních elementů natolik, že mohly být do kliniky zavedeny převody dalších krevních součástí, a to za účelem terapeutickým a dokonce i preventivním. Převody mohutných léčebných dávek leukocytů a krevních destiček mají význam pro moderní vojenské lékařství. Využití separátoru krve je při komplexní léčbě nemoci z ozáření již těžko odmyslitelné. Léčba hematologické formy akutní nemoci z ozáření vyžaduje v rámci moderní podpůrné terapie intenzivní převody leukocytů a destiček.

Dosud existují čtyři možnosti, jak oddělit součásti krve, aby je bylo možno převádět od dárce postiženému člověku:

1. **Diferenční centrifugace** — jde o centrifugaci krve odebrané obvyklým způsobem; od jednoho dárce lze získat z 500 ml krve plazmu a erytrocytární masu a ty pak dále různým způsobem zpracovávat. Z krve získané od několika dárců lze vyrobit destičkový náplav anebo odsát leukocytární „buffy coat“. Výtěžek je však zvláště u leukocytů malý a produkce je technicky i časově náročná.

2. **Filtrační leukaferéza** — metodu zavedl r. 1970 v USA Djerassi [6]. Krev, kterou odebíráme dárce, je čerpána rotačním čerpadlem přes nylonový filtr („Leukopack“). Tam se zachytí granulocyty, neboť mají schopnost adherovat na vláknech umělé hmoty. Až proteče asi 2,5 l krve, je filtr zpětně promýván zvláštním roztokem a leukocyty jsou vymyty do sběrného vaku. Metoda má vysokou výtěžnost a je poměrně jednoduchá. Někteří autoři však pochybují o plné funkční zdatnosti získaných leukocytů — adherence na nylonových

vláknech spustí mechanismus, při kterém se inaktivuje řada fermentů v buňkách [9]. Navíc průtok krve filtrem ovlivní (asi „znečistí“) krev tak, že při vrácení vznikají u dárce nepříjemné reakce [3].

3. **Přerušovaná průtoková separace** — prováděná většinou přístrojem Haemonetics 30, USA [4]. Krev je od dárce odebírána do rotující hlavice. Rotací jsou podle specifické váhy tlačeny erytrocyty na obvod hlavice, blíže k centru vznikne vrstvička leukocytů, ještě centrálněji trombocyty a pak plazma. Jakmile je rotující hlavice naplněna, je odběr krve přerušen, odsají se erytrocyty, leukocyty, trombocyty i plazma (vše je možno buď vrátit dárce, nebo shromažďovat do sběrných vaků). Pak se celý proces opakuje. Hlavice rotuje konstatní rychlostí 1800 otáček za minutu, přístroj je technicky poměrně jednoduchý. S jedním dárce se pracuje obvykle 2 hodiny, ve 4–6 cyklech.

4. **Kontinuální průtoková separace** — prováděná přístrojem Celltrifuge Aminco (dříve přístroje vyráběla firma IBM). S tímto přístrojem pracuje naše skupina; v této publikaci chceme referovat o svých zkušenostech.

Materiál a metodika

Popis činnosti a obsluhy separátoru Aminco: Krev je odebírána dárce nebo nemocnému z periferní žíly (v. cubitalis, ev. i v. femoralis) kanylou z umělé hmoty (Venüle, č. 1 nebo 2, NDR) a prochází trubici přes sítko obdobné jako v čs. infúzních soupravách do centrifugační hlavice. Hlavice rotuje — při odběru plazmy jsme používali rychlosti 1000 otáček za min., při odběru leukocytů 450–600 a při odběru destiček 1800 otáček za minutu. Do

systému je přiváděn heparin (50 j. za minutu) zvláštním čerpadlem. Průběžně je možno odsávat a jímat do sběrné láhve erythrocyty, plazmu, destičky nebo leukocyty. Součást krve, kterou není třeba odebrat, vracíme přes pojistný lapač vzduchu a vodní lázeň 37 °C teplo zpět dárci. Za 4 hodiny proteče přístrojem obvykle 8–10 l krve. U připojeného člověka je nutno sledovat (kromě celkového stavu, krevního tlaku a pulsu) srážlivost krve a při plazmaferézách je velmi žádoucí monitorování osmolality séra. Sami sledujeme 52 dalších parametrů z výzkumných důvodů. Rozdíl oproti přerušované separaci separátorem Haemonetics je v tom, že proces probíhá kontinuálně; odsávání všech zvolených součástí krve za rotace centrifugační hlavice je zajištěno speciální soustavou těsnění. Pro personál je výhodné, že není nutno proces přerušovat, pro připojeného člověka pak to, že mimo tělo je menší objem krve, nežli v případě separátoru Haemonetics 30. Separátor Aminco dává možnost regulace otáček hlavice a tím ovlivnění výtěžnosti separace. S přídatnými čerpadly má 6 rotačních čerpadel, která dovolují bohatě manévrovat a měnit druh a odsávané množství zvolených součástí krve v kterémkoliv okamžiku. Nevýhodou je vyšší pořizovací cena separátoru Aminco, ale provozní náklady jsou nižší nežli při přerušované separaci. Technická náročnost separace přístrojem Aminco je vyšší, ale možnost využití při výzkumné činnosti je bohatší. Při separátoru pracuje skupina, kde je 1 laborantka (při speciálních výkonech 2 laborantky), sestra a lékař. Sestra pečuje o stav nemocného nebo dárce; nutné je i polohování (používali jsme speciálního lůžka, ovládaného elektropneumatickým zařízením firmy Heinen-Medizin, Bonn) a podávání stravy nebo nápojů. Činnost je vázána na dobrou laborator s možností včasného dodání výsledků hematologických sledovaných vyšetření, v případě plazmaferéz výsledků měření osmolality a při výzkumu dalších parametrů. Výhodná je blízkost jednotky intenzivní péče, jak jsme poznali při řešení jediné závažné reakce — hypovolemického šoku u naší nemocné.

Výsledky

Dosud jsme provedli 81 separací. Šlo o tyto indikace:

Poruchy metabolismu lipoproteinů (prováděna „lipoferéza“)	41 separací
Převody leukocytů při sepsích a leukopeniích	10 separací
Leukaferéza a trombocytoferéza	14 separací
Primární biliární cirhóza (prováděna výměna plazmy)	5 separací
Syndrom hyperviskozity při paraproteinémiích	3 separace
Stenokardický syndrom při hyperlipoproteinémiích	8 separací

Ukázalo se, že metodika je v rukou dobře zacvičeného personálu poměrně bezpečná a že vedlejších příhod je minimum. Zaznamenali jsme:

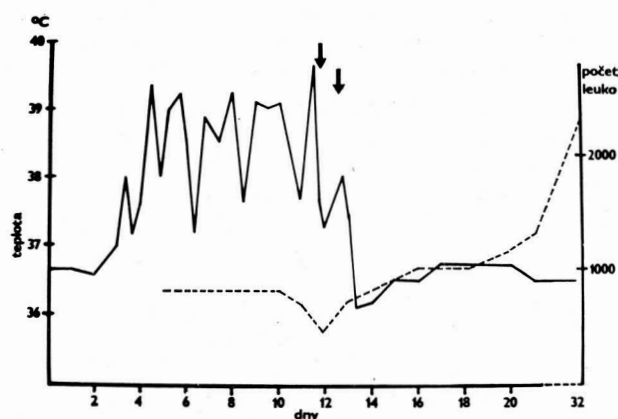
Hypovolemický šok	1krát
Parestézie v končetinách	2krát
Odmítnutí započaté léčby	1krát
Pyretická reakce	1krát
Nesnášenlivost dlouhého ležení	1krát.

Vážnou příhodou byl jen uvedený hypovolemický šok. Je nutno pečlivě dodržovat speciální způsob hrazení odebraných iontů, proteinů, ale i objemu tekutin. Tuto metodiku jsme propracovali [2].

V případech hyperlipoproteinémií jsme dosáhli v řadě případů podstatného zlepšení stavu. Separátorem lze hladce zvládnout hyperlipoproteinemickou krizi, zlepšit subjektivně, ale i co do biochemických ukazatelů řadu dalších nemocných a stav pak delší dobu udržovat medikamentózně a dietou. O těchto výsledcích referujeme jinde [1]. Naše výsledky potvrdily také literární údaje o tom, že převod mohutných dávek leukocytů může vyléčit sepsi, která nereagovala na předchozí léčbu antibiotiky [9]. Těžké je ovlivnit terminální stavy, sepse s bronchopneumoniemi a plicními abscesy. To se nám nezdařilo v žádném případě. Uvedeme stručně některá data úspěšného případu:

18letá dívka M. B. byla na jiné klinice 2 roky léčena pro akutní lymfatickou leukémií. Byla v úplné remisi, ale pak došlo k relapsu choroby. Kombinovaná cytostatická léčba musela být prováděna velkými dávkami cytostatik, takže došlo k těžké pancytopenii. Při ní byly zjištěny první známky nastupující remise. Došlo však k těžké sepsi, pravděpodobně z dentitio difficilis. Ihned byla zahájena léčba trojkombinací antibiotik. 8 dní nebylo možno docílit žádného terapeutického efektu, i když antibiotika byla měněna. Trvala leukopénie kolem $0,7 \times 10^9/l$. V těžkém stavu byla přeložena k nám, aby dostala transfúze leukocytů. Po dvou dávkách leukocytů (na grafu č. 1 vyznačeno šipkami) došlo během 24 hodin k poklesu teplot na normál; bez

Záznam teplot a počet leukocytů nemocné M. B. (Převody leukocytů = ↓)



teplot byla až do konce sledování, ačkoliv počet leukocytů nepřesáhl $1,0 \times 10^9/l$ ještě týden (viz graf č. 1). Druhý den po poklesu teplot nemocná sama chodila, obnovila se chuť k jídlu a za týden žádala propuštění do domácího léčení. Dosud je bez obtíží v úplné remisi, navštěvuje střední školu, je sledována ambulantně jinde.

Naše zkušenosti se 4 leukaferézami k odstranění masy tumorózních buněk (leukocytů při chronické myelóze) ukázaly, že separátor Aminco je schopen snížit tumorózní hmotu až o několik kilogramů. Při léčbě těžké hyperbilirubinémie (hladiny kolem $600 \mu\text{mol/l}$ může zase významně přispět k jejímu snížení) po separacích byla naše nejnižší hodnota $154 \mu\text{mol/l}$, čímž zmírnil i subjektivní obtíže (u naší pacientky se zmenšila intenzivní svědivost, takže mohla spát; nespavost byla její dřívější hlavní subjektivní obtíží a nešla jinak odstranit). Dosud jsme léčili 8krát pacienta s těžkým stenokardickým syndromem při hyperlipoproteinémii. Měl anginózní obtíže i doma při chůzi z pokoje do pokoje. Po léčbě vyjde 3 poschodí bez odpočinku pomalou chůzí, při tom nemá anginózní obtíže. Zlepšení chceme pokud možno objektivizovat (záznam o obtížích a léčbě před separacemi a po nich, ergometrie a chronometrie před půlroční léčbou a po ní, a koronarografií, kromě dalších obvyklých vyšetření) — hodnocení zatím není ukončeno.

Diskuse

V současné době jsou známy výše uvedené čtyři možnosti, jak oddělovat krevní buňky ke klinickému použití. Dostatečně výtěžná, technicky i ekonomicky únosná k získání leukocytů je však jen filtrační leukaferéza a kontinuální nebo přerušovaná separace. Pořizovací náklady jsou nejmenší v případě filtrační leukaferézy. Pomocí ní je však možno získat jen leukocyty (viz tab. č. 1). Dražší je separátor firmy Haemonetics a nejnákladnější přístroj firmy Aminco. Pomocí obou posledních (Haemonetics i Aminco) lze získat leukocyty i trombocyty (viz tab. č. 1). Pro konstantně vysoké otáčky a snad i z jiných důvodů však mají někteří autoři obtíže se získáváním větších množství leukocytů přístrojem Haemonetics, nepoužívají-li agregační látky, jako je hydroxyetylškrob (5). Agregační látky jsou však nebezpečné pro dárce, mohou vyvolávat těžké reakce a hydroxyetylškrob je drahý a těžko dostupný. Technicky nejsložitější a nejnáročnější i na obsluhu je přístroj Aminco. Vzhledem k tomu, že má oddělená čerpadla na odsávání jednotlivých součástí krve nebo podávání náhradních roztoků a možnost široce měnit otáčky centrifugační hlavice, je pro náročnější (zvláště výzkumné) účely podle našich zkušeností nejvhodnější, což je ve shodě s názory některých jiných autorů (7). Významné je i srovnání nákladů na provoz. Ačkoliv pořizovací cena separátoru Haemonetics je

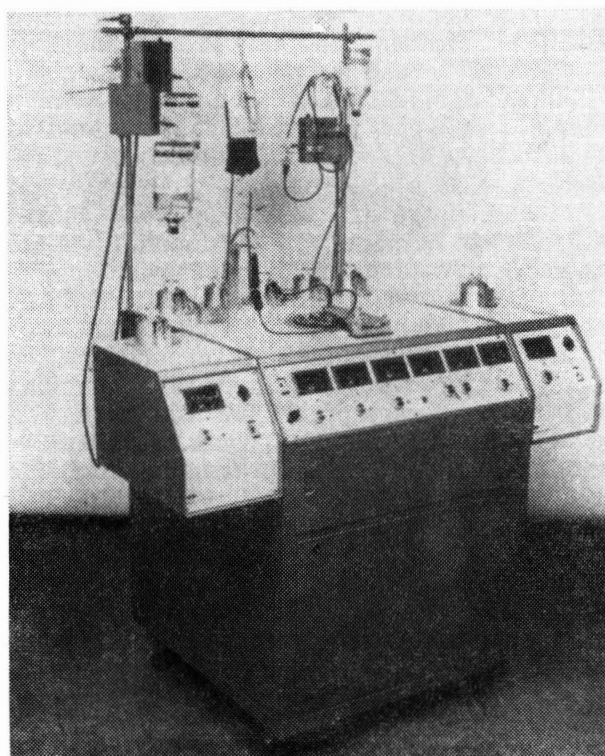
Tab. 1

Dnešní možnosti separace krevních buněk ke klinickým účelům

	TG	TD
Diferenční centrifugace	—	+
Kontinuální průtoková separace	+	+
Intermitentní průtoková separace	+	+
Filtrační leukaferéza	+	—

TG = transfuse granulocytů

TD = transfuse destiček



Obr. 1 Separátor „Celltrifuge“ firmy Aminco, USA

menší nežli separátoru Aminco, je provoz separátoru Haemonetics dražší téměř dvakrát. Za krátkou dobu se tedy náklady na separace při úplném vytížení přístroje vyrovnávají. U přístroje Haemonetics jsou hlavice na jedno použití. To zvyšuje náklady, ale je bezpečnější co do možnosti přenosu antigenu hepatitidy B.

Sami hodnotíme přínos moderního separátoru pro kliniku především jako další významný krok v podpůrné léčbě nemocných chorobami, vedoucími k výrazné leukopenii a septickým stavům. Randomizovaných větších studií bylo dosud provedeno jen několik (přehled viz v 10), ale účinnost převodů leukocytů byla prokázána — lze docílit vyléčení asi $\frac{2}{3}$ sepsí, které před tím antibiotiky nebylo možno zvládnout — 10). To potvrzuje i naše dosavadní zkušenosti, které chceme doplnit o využití přístroje v některých vzácnějších

možných indikací, a tak vyhodnotit přínos této léčebné metody pro vojenskou medicínu.

V budoucnu je třeba hledat možnosti, jak ještě zvýšit výtěžnost separačních metodik, aniž by se poškodily získané buňky (9). Sami pracujeme v současné době na ověření přínosu hydroxyetylškrobu a prověření nejvhodnější dávky a způsobu podání kortikoidů k zvýšení výtěžnosti metodiky. Zajímavou se jeví i možnost získat z periferní krve pomocí separátoru kmenové buňky krvetvorby. Podle některých autorů je možné získat jich tolik, že by mohly postačit k převodům (transplantacím kostní dřeně) ve vhodných indikacích. Také tuto možnost prověřujeme. První pokusy ukázaly, že v odebraných frakcích kolují kmenové buňky krvetvorby, ale dostatečné množství pro převod dospělému člověku se nám dosud nepodařilo získat.

Separátory vyžadují obsluhu zacvičeným týmem a pak jde o relativně bezpečnou léčebnou metodiku. Vedlejší reakce při léčbě však mohou být závažné, i když dosud na světě není známo úmrtí v bezprostřední souvislosti se separací (7). Technická i ekonomická náročnost a další faktory znamenají, že polní použití separátorů by těžko připadlo v úvahu. Přesto je nutno zkoumat jejich možnosti, neboť pro léčbu nemoci z ozáření v hlubokém týlu mají svou významnost.

Souhrn

Autoři popisují svoje zkušenosti s využitím kontinuální průtokové separace pomocí přístroje Celltrifuge Aminco k terapii převody leukocytů, k plazmaferézám a leukaferézám.

Provedli v těchto indikacích celkem 81 separací. Přístroj vyžaduje zacvičený tým obsluhujícího personálu, metodika je technicky náročná. Komplikace léčby nejsou časté. Autoři dosáhli zlepšení stavu při léčbě hyperlipoproteinémií, syndromu hyperviskozity, anginy pectoris, zvládli léčebně sepsi při leukopenii.

Přístroj má význam pro komplexní léčbu hematologické formy nemoci z ozáření v hlubokém týlu, neboť může v krátké době připravit od dárce mohutné dávky leukocytů a destiček.

Literatura

1. Bláha, M. - Zadák, Z. - Vaňásek, J. - Kalinová, M.: Beitrag der klinischen Hämatologie zur Behandlung einigen schweren und akuten metabolischen Störungen in der internen Medizin mit dem Blutzellseparator „Aminco“. 10. sjezd Německé hematologické společnosti, Dresden, 17.—20. 10. 1979.
2. Bláha, M. - Zadák, Z. - Vaňásek, J. - Kalinová, M.: Metodika náhrady žilního objemu při výměně plazmy separátorem „Aminco“ a její biochemická odezva. Sjezd Československé hematologické společnosti, Ústí nad Labem, 11.—13. 10. 1979.
3. Buchholz, D. H. - Schiffer, C. A. - Wiernik, P. H. - Betts, S. W. - Reilly, J. A.: Granulocyte transfusion: donor response to repeated leucapheresis. In: Goldman, J. M. and Lowenthal, R. M.: Leucocytes: separation, collection and transfusion. Academic Press, London—New York—San Francisco, 1975, s. 177—189.
4. Cremerius, R. - Latham, A. - Kingsley, G.: Eine neue Methode zur Sammlung von HL-A-kompatiblen Thrombozyten und Granulozyten für Transfusionszwecke. Wissenschaftliche Informationen Fresenius-Stiftung, 1976, č. 3, s. 166—173.
5. Daszyński, J. - Gaczkowski, A.: Osobní sdělení, Rostock 1978.
6. Djerassi, I. - Kim, J. S. - Mitracul, C. - Suvansri, U. - Cie-silka, W.: Filtration leukopheresis for separation and concentration of transfusable amounts of normal human granulocytes. J. Med. (Basel), 1, 1970, s. 358—369.
7. Goldman, J. M. - Lowenthal, R. M.: Leucocytes: separation, collection and transfusion. London—New York—San Francisco, Academic Press, 1975, 602 s.
8. Hershko, C. - Naparstek, E. - Eldor, A. et al.: Granulocyte transfusion therapy. A clinical trial in patients with acute leukemia and sepsis. Vox Sang., 34, 1978, č. 3, s. 129—135.
9. Schiffer, C. A.: Some aspects of recent advances in the use of blood cell components. Br. J. Haem., 39, 1978, č. 3, s. 289—294.
10. Vogler, W. R. - Winton, E. F.: A controlled study of the efficacy of granulocyte transfusions in patients with neutropenia. Am. J. Med., 63, s. 77, č. 4, s. 548—555.