

616.15-085:615.472

HODNOCENÍ BIOKOMPATIBILITY ČS. HEMOPERFÚZNÍHO SORBENTU SYNACHROMU E-5**I. Klinické a morfologické nálezy**

Plk. MUDr. V. MONHART, CSc., pplk. doc. MUDr. J. FUSEK, CSc.,
RNDr. M. TLUSTÁKOVÁ, CSc., mjr. MUDr. M. BRNDIAR, RNDr. J. HORSKÝ, CSc.
M. NOVÁK

3. oddělení pro nemoci vnitřní s jednotkou dialyzační léčby

Ústřední vojenská nemocnice, Praha

(náčelník: plk. MUDr. V. Monhart, CSc.)

Katedra válečné toxikologie Vojenského lékařského výzkumného a doškolovacího ústavu
JEP, Hradec Králové

(náčelník: plk. prof. MUDr. Vratislav Hrdina, CSc.)

Ústav makromolekulární chemie Československé akademie věd, Praha

(ředitel: prof. ing. Vladimír Kubánek, CSc.)

Katedra válečného vnitřního lékařství Vojenského lékařského výzkumného
a doškolovacího ústavu JEP, Hradec Králové

(náčelník: plk. prof. MUDr. Vladimír Pidrman, DrSc.)

Vojenský ústav hygieny, epidemiologie a mikrobiologie, Praha

(náčelník: plk. MUDr. Vladimír Kotlíř, CSc.)

Hemoperfúze stále hledá nové adsorpční materiály pro efektivní odstraňování exogenních toxinů a nežádoucích endogenních metabolitů z krve. Ideální sorbent by měl splňovat především dva základní požadavky:

1. vysokou účinnost vyjádřenou rychlostí a kapacitou sorpce
2. příznivý stupeň biokompatibility, kdy jak jednorázová, tak ani opakovaná interakce sorbentu s organismem nevyvolá žádné nežádoucí účinky.

Cílem práce bylo posoudit biokompatibilitu čs. vývojového pryskyřičného sorbentu Synachromu E-5 v průběhu experimentálních hemoperfúzí. Zájem o tento sorbent vyplývá ze zjištění, že v pokusech in vitro odstraňuje z roztoku phenobarbital, glutethimid a amitriptylin

v množství rovnocenném účinnosti v současnosti používaných hemoperfúzních sorbentů (2). Synachrom E-5, vyvinutý Ústavem syntetických pryskyřic a laků v Pardubicích, by mohl v případě dobré biokompatibility nahradit dovážené hemoperfúzní sorbenty a stát se alternativní náplní již vyráběné čs. hemoperfúzní kolony Hemasorb.

Hodnocení biokompatibility všech organismu cizích látek, tedy i hemoperfúzních sorbentů, je rozsáhlé a složité a zahrnuje sledování makroskopické, mikroskopické, ale i fyzikálně chemické a mechanické (21). Při provádění experimentálních hemoperfúzí u psů jsme se především zaměřili na zjištění nežádoucích účinků hemoperfúze přes Synachrom E-5 při použití klinického, morfologického a la-

boratorního hodnocení. V první části práce uvádíme výsledky klinického a morfologického sledování.

Materiál a metodika

V pokusech jsme použili 5 psů nestandardního chovu o hmotnosti 15,8 až 27,7 kg. Zvířata byla premedikována plegomazinem v dávce 0,25–1,0 mg · kg⁻¹ i. m. a narkotizována thio-pentalem v úvodní dávce 30 mg · kg⁻¹ i. v. Během pokusu byla narkóza udržována řízenou infúzí roztoku thiopentalu.

Mimotělní krevní oběh pro hemoperfúzi byl zhotoven chirurgickou kanylací stehenní tepny a žíly. Před zahájením hemoperfúzního výkonu zvířata dostala 375 j. heparinu na kg hmotnosti a během pokusu byla antikoagulace udržována na požadované úrovni intermitentním podáním heparinu v dávce 75 j. na kg v intervalech 1–2 hodin.

Plně syntetický pryskyřičný sorbent Synachrom E-5 byl připraven jako kopolymer styrenu s divinylbenzémem s měrným povrchem 700 m² · g⁻¹. Částice sorbentu o průměrné velikosti 0,35 až 0,40 mm měly povrch pokrytý tenkou vrstvou poly(2-hydroxyethylmethakrylátu).

Hemoperfúzní systém byl sestaven z polypropylenové kolony obsahující 400 ml Synachromu E-5 a ze standardní vtokové a výtokové hemodialyzační hadicové soupravy. Každá hemoperfúze probíhala po dobu 5 hodin. Rychlost proudění krve v systému 5 ml · min⁻¹ na 1 kg hmotnosti zvířete zajišťoval hemoperfúzní monitor BMM 10-1 (Gambro).

V průběhu hemoperfúzí byly kontinuálně sledovány hodnoty systolického, středního a diastolického krevního tlaku, tepové a dechové frekvence a dechového minutového objemu. Záznam 12svodového elektrokardiogramu byl pokusným zvířatům pořizován ve zvolených časových intervalech.

Na závěr pokusu byla u všech zvířat provedena patologickoanatomická pitva.

Metodou rastrovací elektronové mikroskopie byl po hemoperfúzi vyšetřen povrch částic Synachromu E-5. Vzorek sorbentu vyňatý z kolony bezprostředně po ukončení výkonu byl fixován v roztoku 2,5% glutaraldehydu ve fosfátovém ústoji, zpracován metodou kritického bodu a pokoven vrstvou zlata. Získané preparáty byly prohlíženy a fotografovány na rastrovacím elektronovém mikroskopu JM — 200 CX při zvětšení v rozsahu 200 až 15 000krát.

Výsledky

Klinická snášenlivost

Všichni psi snášeli relativně dobře hemoperfúzní výkon. V jeho průběhu nedošlo k výraznějším změnám dechové frekvence ani hodnot

dechového minutového objemu. Bylo patrné pouze určité rozkolísání způsobené vlivem tlumivého účinku anestetika, případně jeho vychytáváním na sorbent. Výchozí střední krevní tlak se pohyboval v rozmezí 10–18,6 kPa, do 30 minut od zahájení hemoperfúze poklesl na hodnotu 6,6–10,6 kPa a stabilizoval se na této úrovni až do skončení výkonu. Průvodní tachykardie měla kolísající frekvenci od 116 do 210 · min⁻¹. Po zrušení mimotělního krevního oběhu při ukončení hemoperfúze došlo ihned k normalizaci hodnot krevního tlaku a tepové frekvence. Žádný výkon nebyl provázen krvácivými projevy ani pyretickou reakcí.

Elektrokardiografické změny

Před zahájením výkonu jsme zaznamenali hraniční sinusovou tachykardii o frekvenci 100–110 · min⁻¹ a mírné změny repolarizace — šikmé nebo vodorovné deprese ST úseku a oploštění až negativitu T vlny. Změny byly výraznější ve svodech registrujících potenciály ze zadní stěny levé srdeční komory. Ekg vyšetření provedené opakovaně během pětihodinové hemoperfúze prokázalo sinusovou nebo supraventrikulární tachykardii o frekvenci od 116 · min⁻¹ do 210 · min⁻¹ a zvýraznění depresí ST úseku a negativity T vln. Zjištěné ekg změny se normalizovaly ihned po ukončení výkonu.

Sekční nález

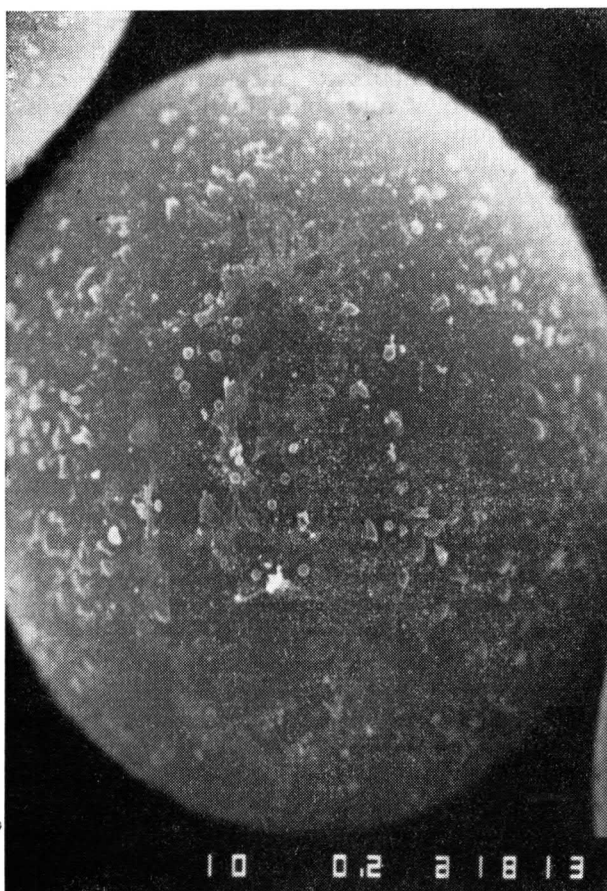
Patologickoanatomická pitva provedená u 2 zvířat bezprostředně po ukončení hemoperfúze a u zbývajících 3 po 4–6denním období přežívání neprokázala žádné změny na srdci, plicích, ledvinách nebo dalších vyšetřovaných orgánech.

Ultrastruktura povrchu sorbentu

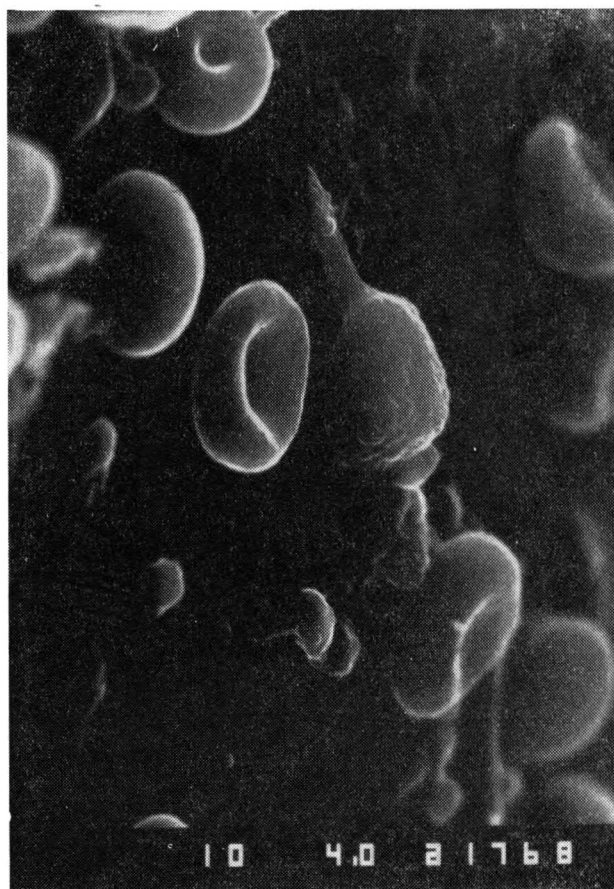
Povrch částic Synachromu E-5 vyšetřovaný po hemoperfúzi rastrovacím elektronovým mikroskopem při zvětšení v rozsahu 200krát až 15 000krát (obr. 1, 2, 3 a 4) ukázal depozici menšího množství erytrocytů, leukocytů, fibrinových vláken a většího množství částic o průměru 1–3 μm, jež byly velikostí i tvarem srovnatelné s trombocyty. Povrch sorbentu i všech deponovaných krevních elementů byl dále pokryt velkým množstvím uniformních kulatých jemných mikročástic o průměru značně menším než 1 μm. Nález ojedinělých trhlinek na vyšetřovaném povrchu nasvědčuje předpokladu, že mikročástice pochází z nitra sorbentu.

Diskuse

Přes dvacetiletý intenzivní rozvoj hemoperfúzní metody léčení závažných akutních intoxikací a metabolických selhání neexistuje v současné době sorbent, který by splňoval



Obr. 1. Povrch částice Synachromu E-5 po hemoperfúzi při zvětšení 200krát: sorbentová částice je disperzně pokryta fibrinovými vlákny a krevními elementy.



Obr. 2. Povrch částice Synachromu E-5 po hemoperfúzi při zvětšení 4000krát: ojedinelé erytrocyty a trombocyty.

všechny požadavky — velkou sorpční účinnost, vysoký stupeň biokompatibility, univerzálnost použití a technologickou nenáročnost přípravy při zachování požadovaných optimálních fyzikálně-chemických charakteristik. Lékaře zabývajícího se hemoperfúzní léčbou kromě účinnosti především zajímá otázka snášenlivosti sorbentu, jakožto „cizího“ nebiologického materiálu, který se na několik hodin dostává do styku s kolující krví.

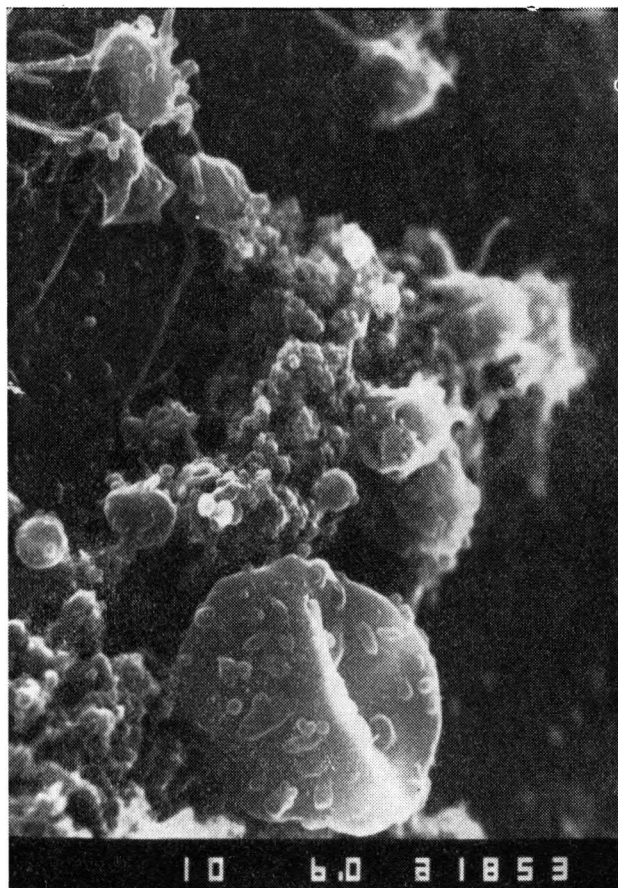
Závažné vedlejší účinky prvních hemoperfúzních sorbentů připravených z aktivního uhlí — výrazná trombocytopenie a mikroembolizace uhelných částic do parenchymatózních orgánů [6, 7] byly odstraněny úpravami adsorpčního materiálu spočívajícími v mikrokapsulaci [11], přímém povlékání povrchu částic [1] nebo v imobilizaci sorbentu uvnitř hemoperfúzní kolony [3]. Obdobně u polystyrenových pryskyřic si poškození formovaných krevních elementů vyžádalo ochranu povrchu částic obdobnými materiály jako u aktivního uhlí [10]. Určitou nevýhodou těchto bezpečnostních úprav je mírné zpomalení rychlosti sorpce a omezení spektra z krve odstraňovaných látek [9, 22].

Dosaženou úroveň biokompatibility v současnosti užívaných hemoperfúzních systémů je

možno ještě dále zvyšovat přípravou dalších adsorpčních materiálů [15], pokrýváním povrchu sorbentových částic novými ochrannými membránami [4, 18], albuminem [12] nebo antikoagulanty [13] či grafitizací povrchu polymerních částic pyrolýzou [16]. Je přitom zřejmé, že problematiku biokompatibility hemoperfúzní léčby nelze redukovat jen na interakci sorbent—organismus. Patří sem i snášenlivost všech polymerů, s nimiž krev kolující v hemoperfúzním systému přichází do styku, tedy i vnitřního povrchu kolony a vtokové i výtokové hadicové soupravy.

Při předklinickém i klinickém zkoušení nových hemoperfúzních systémů se úroveň biokompatibility zpravidla posuzuje podle výskytu nežádoucích účinků. Jejich výčet zahrnuje hypotenzi, alternaci tělesné teploty (hypo- i hypertermii), krvácení, hemolýzu, mikroembolizaci části sorbentu a ovlivnění počtu formovaných krevních elementů i koncentrací řady fyziologických součástí plazmy.

Volbu Synachromu E-5 jako hemoperfúzního sorbentu ovlivnila skutečnost, že jeho chemické složení — kopolymer styrenu s divinylbenzémem — je shodné s amberlitovými pryskyřicemi XAD-2 a XAD-4, které si pro svoji velmi dobrou účinnost získaly nezastupitelné místo



Obr. 3. Povrch částice Synachromu E-5 po hemoperfúzi při zvětšení 6000krát: ojedinelý erytrocyt, četnější trombocyty, bohatší síť fibrinových vláken a větší množství mikročástic na povrchu sorbentu i krvinek.

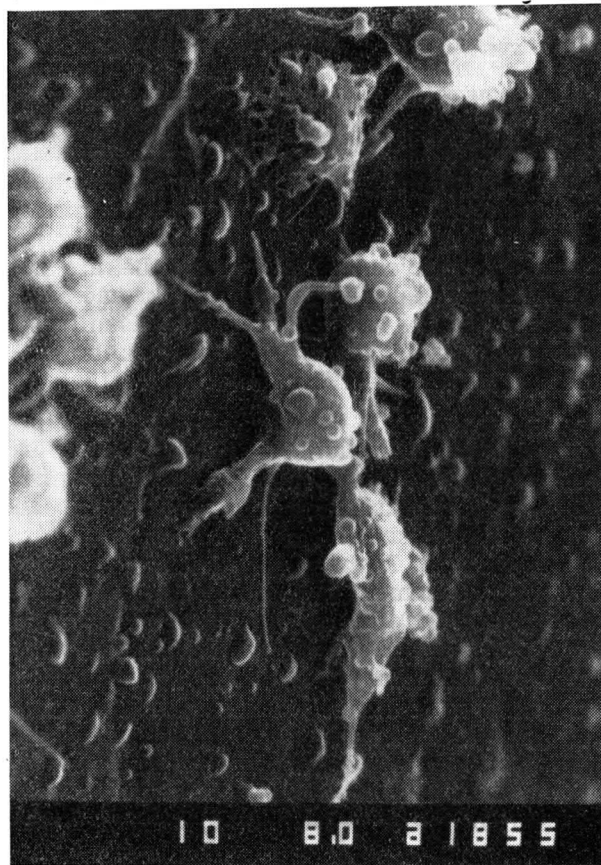
mezi hemoperfúzními sorbenty [17, 19]. Rovněž poly[2-hydroxyethylmethakrylát] použitý k ochraně povrchu částic Synachromu E-5 již prokázal dobrou snášenlivost při opakované hemoperfúzi jak přes uhelnou, tak i pryskyřičnou variantu čs. hemoperfúzní kolony Hema-sorb [10, 14].

U žádné z provedených experimentálních hemoperfúzí s použitím Synachromu E-5 jsme nepozorovali závažnější klinicky zjistitelné nežádoucí účinky. Nedošlo ke krvácivým projevům ani k pyretické reakci. Ukazatelé dýchací funkce zůstaly stabilizovány po celou dobu výkonu. Hemoperfúze byly provázeny hypotenzí a kompenzační tachykardií. Promptní úprava oběhové poruchy s ukončením výkonu ukazuje, že příčinou byla relativní hypovolémie navozená zřízením mimotělního krevního oběhu. Spolu s dalšími možnými příčinami hypotenze souvisejících s hemoperfúzí, jako je sorpce katecholaminů a uvolňování endogenních vázoaktivních látek, nelze vyloučit. I když pokles středního tepenného krevního tlaku spolu s tachykardií nepochybně ovlivnil zásobení srdečního svalu, neprokázalo elektrokardiografické sledování ani sekční vyšetření jeho poškození.

Patologickoanatomická pitva provedená

u všech pokusných zvířat nezjistila v parenchymatózích orgánech žádné změny, které by svědčily pro embolizaci sorbentu nebo krevních sraženin. V této souvislosti je třeba uvést, že v současnosti používaná bezpečnostní úprava sorbentových částic, ať už pokrytím jejich povrchu, nebo uspořádáním do nepohyblivé vrstvy, sice podstatně zmenší tvorbu mikročástic a tím možnost embolizace, ale zcela ji neodstraňuje [20, 22]. Navíc zdrojem nebiologických součástí pro mikroembolizaci může být i materiál součástí mimotělního krevního oběhu, především čerpací segment vtokové hadicové soupravy [20]. Kolující částice, ať už biologického, nebo nebiologického původu, jsou zjistitelné pouze speciálními metodami [23].

Vyšetření ultrastruktury povrchu sorbentu po hemoperfúzi zjistilo depozici korpuskulárních krevních elementů, především trombocytů. Nález je však méně výrazný ve srovnání s výsledky elektromikroskopického vyšetření povrchů uhelných sorbentů po hemoperfúzi [5, 8]. Navíc jsme prokázali na povrchu sorbentu uniformní kulaté mikročástice o průměru značně menším než $1\ \mu\text{m}$, o kterých se domníváme, že pochází ze sorbentu. Přítomnost ojedinelých povrchových trhlinek tento předpoklad podporuje. Nález mikročástic i na povrchu sorbentem zachycených krevních elementů je dokladem, že k jejich uvolňování z nitra sorbentu



Obr. 4. Povrch částice Synachromu E-5 po hemoperfúzi při zvětšení 8000krát: ojedinelé trombocyty a četné mikročástice na povrchu sorbentu i trombocytů.

došlo až během hemoperfúze. Stěží možno rozlišit, zda následkem malé mechanické odolnosti částic vystavených v koloně náporu proudící krve, nebo v důsledku příliš tenkého nebo nestejněmého pokrytí povrchu sorbentových částic poly(2-hydroxyethylmethakrylátem).

Z výsledků práce vyplývá, že:

1. Hemoperfúze přes sorbent Synachrom E-5 nevede ke vzniku závažnějších klinických nežádoucích účinků.
2. Klinicky prokazatelné nežádoucí účinky hemoperfúze (hypotenze, hypotermie a krvácení) nejsou dostatečným kritériem pro hodnocení snášenlivosti hemoperfúzního sorbentu, protože mohou být buď částečné, nebo výlučně vyvolané dočasnou existencí mimotělního krevního oběhu nebo prováděním celkové antikoagulace.
3. Výsledky elektronmikroskopického hodnocení ultrastruktury povrchu Synachromu E-5 ukazují na nutnost modifikace technologie buď přípravy sorbentu, nebo pokrývání částic ochrannou polymerní membránou k prevenci mikroembolizace.

Souhrn

Autoři uvádějí výsledky klinického a morfolického hodnocení biokompatibility čs. vývojového hemoperfúzního sorbentu Synachromu E-5 získané v podmínkách zvířecího experimentu. Kopolymer styrénu s divinylbenzémem o celkové sorpční ploše $700 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$, s průměrnou velikostí částic $0,35\text{--}0,40 \text{ mm}$ a s povrchem pokrytým poly(2-hydroxyethylmethakrylátem) nevedl v průběhu pětihodinové hemoperfúze u psů ke vzniku závažných klinicky prokazatelných nežádoucích účinků. Patologickoanatomická pitva nezjistila embolizaci sorbentu do parenchymatózních orgánů. Elektronmikroskopické vyšetření ultrastruktury povrchu Synachromu E-5 po hemoperfúzi ukázalo kromě výraznější depozice trombocytů i uvolňování mikročástic z nitra sorbentu. Toto zjištění i přes negativní sekční nález poukazuje na nutnost modifikace výroby sorbentu k zajištění ještě účinnější prevence mikroembolizace.

Literatura

1. ANDRADE, J. D. - KUNITOMO, K. - Van WAGENEN, R. - KASTIGIR, B. - GOUGH, D. - KOLFF, W. J.: Coated adsorbents for direct blood perfusion: Hema/activated carbon. Trans. Amer. Soc. artif. intern. Org., 17, 1971, s. 222—228.
2. BALÍKOVÁ, M.: Stanovení časového průběhu extrakčních funkcí syntetických pryskyřic a jejich maximální adsorpční kapacity pro phenobarbital, amitriptylin, glutethimid. [Etapová zpráva hlavního úkolu SPZV č. VII-8-3.] Praha, katedra lékařské chemie I. FVL UK 1983.
3. BARBOUR, B. H.: Charcoal hemodetoxification. A new clinical tool for the treatment of drug poisoning. In: B — Life support systems. Becton, Dickinson & Co. Sharon, 1975.
4. BRUNNER, G. - HARSTICK, K. - HOLLOWAY, C. J.: Agarose-encapsulated adsorbents: a new material for hemoperfusion. Artif. Org., 3, 1979, č. 4, s. 394.
5. BUČEK, J. - MYDLÍK, M.: Ultrastruktura povrchu aktivního uhlí po hemoperfúzi. Čas. Lék. čes., 119, 1980, č. 45, s. 1205—1207.
6. DUNEA, G. - KOLFF, W. J.: Clinical experience with Yatizidis charcoal artificial kidney. Trans. Amer. Soc. artif. intern. Org., 11, 1965, s. 178—182.
7. HAGSTAM, K. E. - LARSSON, L. E. - THYSELL, H.: Experimental studies on charcoal haemoperfusion in phenobarbital intoxication and uraemia including histopathologic findings. Acta med. scand., 180, 1966, č. 5, s. 593—603.
8. HENNEMANN, H. - RICHTER, I. E. - BRUNSWIG, D. - RÖCKEL, A. - KULT, J. - GATTENLÖHNER, W. - HEIDLAND, A.: Hämo-perfusion — Pro und Kontra. Klin. Wschr., 55, 1977, č. 11, s. 533—537.
9. HILL, J. B. - PALADIA, F. L. - McADAMS, J. L. - PALMER, P. J. - SKINNER, J. T. - MARET, S. M.: The rationale for fixed-bed charcoal in hemoperfusion. Kidney int., 10, 1976, Suppl. 7, s. 328—332.
10. HORÁK, J. - TLUSTÁKOVÁ, M. - KÁLAL, J.: Užití hemoperfúzní kolony plněné syntetickou pryskyřicí k náhradě exkrečních jaterních funkcí. In: Polymery v lékařství. Edice Makro K — 36. Praha 1982, Ústav makromolekulární chemie ČSAV, s. 3.8-1 až 3.8-4.
11. CHANG, T. M. S. - GONDA, A. - DIRKS, J. H. - MALAVE, N.: Clinical evaluation of chronic, intermittent and short term hemoperfusions in patients with chronic renal failure using semipermeable microcapsules (artificial cells) formed from membrane-coated activated charcoal. Trans. Amer. Soc. artif. intern. Org., 17, 1971, s. 246—252.
12. CHANG, T. M. S.: Microcapsule artificial kidney: including updated preparative procedures and properties. Kidney int., 10, 1976, Suppl. 7, s. 218—224.
13. CHMIEL, H. - HELLWIG, G. - KERN, P. - KULBE, K.: Surface modification of activated charcoal to achieve improved biokompatibility. Artif. Org., 3, 1979, č. 4, s. 394.
14. MONHART, V. - ŠTĚPÁNKOVÁ, Ch. - TLUSTÁKOVÁ, M. - NAVRÁTIL, J.: Zkušenosti s opakovanou hemoperfúzí přes čs. systém s aktivním uhlím — Hema-sorb C. Vnitřní Lék., 31, 1985, č. 1, s. 83—91.
15. NOSÉ, Y. - MALCHESKY, P. S. - CASTINO, F. - KOSHINO, I. - SCHEUCHER, K. - NOKOFF, R.: Improved hemoperfusion systems for renal-hepatic support. Kidney int., 10, 1976, Suppl. 7, s. 244—247.
16. ROSENBAUM, J. L. - KRAMER, M. S. - RAJA, R.: Hemoperfusion with uncoated Amberlite XE-336 resin in normal and uremic dogs. Nephron, 21, 1978, č. 1, s. 27—37.
17. ROSENBAUM, J. L. - KRAMER, M. S. - RAJA, R. M.: Amberlite hemoperfusion in the treatment of acute drug intoxication. Int. J. artif. Org., 2, 1979, č. 6, s. 316—318.
18. STEFONI, S. - FELICIANGELI, G. - COLI, L. - BONOMINI, V.: Evaluation of a new coated charcoal for hemoperfusion in uremia. Int. J. artif. Org., 2, 1979, č. 6, s. 320—323.
19. TRAFFORD, J. A. P. - JONES, R. H. - EVANS, R. - SHARP, P. - SHARPSTONE, P. - COOK, J.: Haemoperfusion with R-004 Amberlite resin for treating acute poisoning. Brit. med. J., 2, 1977, č. 6100, s. 1453—1456.
20. Van WAGENEN, R. - COLEMAN, D. L. - ANDRADE, J. D.: Adsorbent hemoperfusion: nonbiological particulate matter. Kidney int., 7, 1975, Suppl. 3, s. 397 až 400.
21. WAITZOVÁ, D.: Biokompatibilita a toxikologie polymerů. In: Polymery v lékařství. Edice Makro K — 36. Praha 1982, Ústav makromolekulární chemie ČSAV, s. 2.1-1—2.1-3.
22. WALKER, J. M. - DENTI, E. - Van WAGENEN, R. -

- ANDRADE, J. D.: Evaluation and selection of activated carbon for hemoperfusion. *Kidney int.*, 10, 1976, Suppl. 7, s. 320—327.
23. WESTON, M. J. - HANID, A. - RUBIN, M. H. - LANGLEY, P. G. - MELLON, P. J. - WILLIAMS, R.: Biocompatibility of coated and uncoated charcoal during haemoperfusion in healthy dogs. *Europ. J. clin. Invest.*, 7, 1977, č. 5, s. 401—406.
- Klíčová slova: Hodnocení biokompatibilit; Hemoperfúze; Sorbent; Synachrom E-5.