

Φαγοκυτταρική ικανότητα και αναπνευστική έκρηξη σε ασθενείς υπό αιμοκάθαρση με δύο διαφορετικές μεμβράνες*

Ι. Γριβέας¹
Π. Πασαδάκης²
Α. Φλέβα³
Η. Θώδης²
Α. Παυλίτου³
Γ. Βισβάρδης¹
Δ. Παπαδοπούλου¹
Β. Βαργεμέζης²
† Γ. Σακελλαρίου¹

¹ Νεφρολογικό Τμήμα,
Γεν. Νοσ/μείο Παπαγεωργίου,
Θεσσαλονίκη,
² Πανεπιστημιακή Νεφρολογική
Κλινική, Δημοκρίτειο
Πανεπιστήμιο Θράκης,
Αλεξανδρούπολη,
³ Ανοσολογικό Εργαστήριο,
Γεν. Νοσ/μείο Παπαγεωργίου,
Θεσσαλονίκη

Περίληψη

Σκοπός: Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν ο έλεγχος της φαγοκυτταρικής ικανότητας (ικανότητα των φαγοκυττάρων να προσλαμβάνουν τα μικρόβια) και της αναπνευστικής έκρηξης (ικανότητα των φαγοκυττάρων να τα θανατώνουν) σε ασθενείς, που υποβάλλονται σε αιμοκάθαρση με δύο διαφορετικές μεμβράνες.

Ασθενείς – Μέθοδοι: Μελετήθηκαν 30 αιμοκαθαιρόμενοι ασθενείς από 47 έως 74 ετών (μέση ηλικία: 60,1±8,7 έτη, M±SD), (διάρκεια αιμοκάθαρσης: 24,1±14,3 μήνες, M±SD). Διενεργήθηκε δοκιμασία ελέγχου φαγοκυττάρωσης (phago test) και αναπνευστικής έκρηξης (burst test) πριν από τη συνεδρία αιμοκάθαρσης, 15 λεπτά μετά και στις 3 ώρες από την έναρξή της, με αιμοφάνη και με πολυακρυλονιτρίλη/νατριούχο μεθαυλοθειική (AN69).

Αποτελέσματα: Κατά τη συνεδρία με αιμοφάνη, η φαγοκυτταρική ικανότητα των μονοκυττάρων παρουσίασε σημαντική αύξηση στα 180 λεπτά ($p<0,05$), ενώ τόσο η φαγοκυτταρική ικανότητα των πολυμορφοπυρήνων όσο και η αναπνευστική έκρηξη των μονοκυττάρων δεν παρουσίασαν σημαντικές μεταβολές. Η αναπνευστική έκρηξη των πολυμορφοπυρήνων αυξήθηκε σημαντικά στα πρώτα 15 λεπτά ($p<0,05$) και στα 180 λεπτά της συνεδρίας ($p<0,05$). Κατά τη συνεδρία με AN69, η φαγοκυτταρική ικανότητα των μονοκυττάρων και των πολυμορφοπυρήνων δεν παρουσίασε σημαντικές μεταβολές. Αντίθετα, η αναπνευστική έκρηξη τόσο των μονοκυττάρων όσο και των πολυμορφοπυρήνων αυξήθηκε σημαντικά στα 15 λεπτά ($p<0,05$) και στα 180 λεπτά της συνεδρίας ($p<0,05$). Η σύγκριση των τιμών των επιμέρους παραμέτρων μεταξύ των δύο μεμβρανών, στις διάφορες χρονικές στιγμές, δεν αποκάλυψε στατιστικά σημαντικές διαφορές.

Συμπεράσματα: Ο έλεγχος της φαγοκυτταρικής ικανότητας και της αναπνευστικής έκρηξης λειτουργεί συμπληρωματικά στην εκτίμηση του βαθμού βιοσυμβατότητας των μεμβρανών αιμοκάθαρσης, ενώ ανοίγει νέους ορίζοντες για περαιτέρω έρευνα στα αίτια, τον επιπολασμό και την κατάληξη των λοιμώξεων σε αιμοκαθαιρόμενους ασθενείς.

* Προφορική Ανακοίνωση στο 14ο Πανελλήνιο Συνέδριο Νεφρολογίας, Πόρτο Καρράς, Χαλκιδική, 31/5-3/6/2006.

Λέξεις κλειδιά: αιμοκάθαρση, αναπνευστική έκρηξη, μεμβράνες αιμοκάθαρσης, φαγοκυτταρική ικανότητα.

Τα πολυμορφοπύρηνα και τα μονοπύρηνα αποτελούν τα σημαντικότερα κύτταρα επιρροής και επίδρασης σε μία σειρά μηχανισμών που συνδέονται με φλεγμονώδεις καταστάσεις. Η συμπεριφορά των πολυμορφοπυρήνων αξιολογείται με το βαθμό αποτελεσματικότητας της άμυνας του οργανισμού έναντι λοιμώξεων, γιατί έχει συνδυασθεί η έλλειψή τους με βαριά λοιμώδη νοσήματα. Για να εκπληρώσουν τον αμυντικό τους ρόλο τα πολυμορφοπύρηνα αναγνωρίζουν την εστία της λοίμωξης, προσκολλώνται στο ενδοθήλιο των τριχοειδών της περιοχής, μεταναστεύουν διαμέσου του αγγειακού τοιχώματος στην περιοχή που φλεγμαίνει και ασκούν τη φαγοκυτταρική τους δράση, καταστρέφοντας τους υπεύθυνους μικροοργανισμούς¹⁻³. Κατά τη διάρκεια αυτής της διαδικασίας, τα πολυμορφοπύρηνα χρειάζονται: α) προστατευτικούς μηχανισμούς, που θα εγγυηθούν την ακεραιότητα τους στο εχθρικό λοιμώδες περιβάλλον, β) απενεργοποίηση των δικών τους τοξικών παραγώγων, έτσι ώστε να αποφευχθεί η βλάβη σε υγιή ιστό και τέλος γ) συνεχή μετανάστευση επιπλέον φαγοκυττάρων⁴⁻⁸.

Η μέτρηση όλων των παραπάνω φυσιολογικών λειτουργιών, δηλαδή της χημειοταξίας, της φαγοκυττάρωσης, της ενδοκυττάριας θανάτωσης των μικροβίων και της απόπτωσης αποτελεί μία από τις πιο σύγχρονες και πολλά υποσχόμενες εφαρμογές της κυτταρομετρίας ροής. Μία σειρά ερευνητών έχει εστιάσει το ενδιαφέρον της σε μεθόδους που αξιολογούν τη φαγοκυτταρική ικανότητα (πολυμορφοπυρήνων, μονοκυττάρων) χρησιμοποιώντας την κυτταρομετρία ροής^{9,10}.

Κεντρικό ρόλο στη αντιμικροβιακή δραστηριότητα έχει η αναπνευστική έκρηξη (oxidative burst), η ικανότητα δηλαδή των φαγοκυττάρων του ανοσιακού μας συστήματος να αυξάνουν την κατανόωση οξυγόνου σε μοριακό επίπεδο μέσα σε διάστημα δευτερολέπτων. Όταν περιορίζεται το φαινόμενο της αναπνευστικής έκρηξης, ελαττώνεται δηλαδή η παραγωγή οξυγόνου σε μοριακό επίπεδο, τότε παράγονται ελεύθερες ρίζες οξυγόνου (reactive oxygen species, ROS) μέσω του συστήματος NADH^{11,12}.

Γενικότερα, η φαγοκυτταρική ικανότητα χαρακτηρίζει την ικανότητα των φαγοκυττάρων να προσλαμβάνουν τα μικρόβια και η αναπνευστική έκρηξη εκφράζει την ικανότητα του φαγοκυττάρου να τα θανατώνει, μετρώντας την παραπάνω κατα-

νόωση οξυγόνου που απαιτείται γι' αυτό το έργο⁹. Είναι αξιοσημείωτο, και πιθανώς να μπορεί να αποτελέσει ένα νέο εύχρηστο δείκτη σύγκρισης και αξιολόγησης των μεμβρανών αιμοκάθαρσης (ΑΜΚ), ο αριθμός των βακτηριδίων που φαγοκυτταρώνονται ανά κύτταρο αλλά και η διαφοροποιημένη οξειδωτική ικανότητα που παρουσιάζει ο πληθυσμός των πολυμορφοπυρήνων/μονοκυττάρων.

Οι αιμοκαθαιρόμενοι ασθενείς θεωρείται ότι είναι πιο επιρρεπείς στις λοιμώξεις από υγιείς μάρτυρες. Οι ελαττωματικοί αμυντικοί μηχανισμοί, που εξηγούν την αυξημένη πιθανότητα λοίμωξης των ουραιμικών ασθενών, έχουν άμεση σχέση με τη λειτουργία των φαγοκυττάρων. Τα φαγοκύτταρα καταστρέφουν τα βακτήρια ακολουθώντας μία αλληλουχία μηχανισμών που περιλαμβάνει προσκόλληση τους στο αγγειακό ενδοθήλιο, μετανάστευσή τους στο χώρο της φλεγμονής, απορρόφηση των βακτηρίων και θανάτωσή τους. Αναγκαία προϋπόθεση για να λειτουργήσει ο παραπάνω μηχανισμός είναι ένα 'φυσιολογικό' μεταβολικό περιβάλλον¹⁴. Τα περισσότερα βιβλιογραφικά δεδομένα συνηγορούν στο ότι οι ασθενείς με χρόνια νεφρική ανεπάρκεια τελικού σταδίου έχουν επηρεασμένη χημειοταξία και διαταραγμένη φαγοκυτταρική ικανότητα και βακτηριοκτόνο δράση.

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν ο έλεγχος της φαγοκυτταρικής ικανότητας (ικανότητα των φαγοκυττάρων να προσλαμβάνουν τα μικρόβια) και της αναπνευστικής έκρηξης (ικανότητα των φαγοκυττάρων να τα θανατώνουν) σε ασθενείς, που υποβάλλονται σε αιμοκάθαρση με δύο διαφορετικές μεμβράνες.

Ασθενείς – Μέθοδοι

Μελετήθηκαν 30 ασθενείς (18 άνδρες και 12 γυναίκες) ηλικίας 47 έως 74 χρονών (μέση ηλικία: 60,1 ± 8,7, M ± SD) με χρόνια νεφρική ανεπάρκεια τελικού σταδίου υπό αιμοκάθαρση. Τα πρωτοπαθή νοσήματα των ασθενών φαίνονται αναλυτικά στον πίνακα 1.

Οι αιμοκαθαιρόμενοι ασθενείς υποβάλλονταν

Πίνακας 1. Πρωτοπαθή νοσήματα ασθενών της μελέτης

| Πρωτοπαθές νόσημα | Αριθμός ασθενών |
|-----------------------------------|-----------------|
| Αρτηριακή υπέρταση/νεφροσκλήρυνση | 20 |
| Χρόνια σπειραματονεφρίτιδα | 5 |
| Πολυκυστική νόσος νεφρών | 5 |

Πίνακας 2. Χαρακτηριστικά μεμβρανών αιμοκάθαρσης

| Όνομασία (Αποστείρωση) | Όγκος (mL) | Επιφάνεια (m ²) | Πάχος (μ) | UF (mL/mmHg/hr) |
|--|------------|-----------------------------|-----------|-----------------|
| 1. Αιμοφάνη (GFS-PLUS 16) (Ατμός) | 95 | 1,7 | 8 | 9,4 |
| 2. AN69 (FILTRAL 16 HF) (γ ακτιν./ETO) | 122 | 1,7 | 50 | 48 |

σε 3 τετράωρες συνεδρίες κλασικής αιμοκάθαρσης (AMK) εβδομαδιαίως, με ροή αίματος 280-300 mL/min, για χρονικό διάστημα 24,1±14,3 μηνών, (M±SD). Όλοι οι ασθενείς είχαν μόνιμη αρτηριοφλεβική επικοινωνία (κριτήριο αποκλεισμού ήταν ο μόνιμος ή ο προσωρινός καθετήρας αιμοκάθαρσης).

Στην μελέτη δε συμπεριελήφθησαν ασθενείς που έπασχαν από κακοήγη νοσήματα, συστηματικό ερυθριματώδη λύκο, σακχαρώδη διαβήτη ή άλλες συστηματικές παθήσεις, και είχαν ενδείξεις οξείας ή χρόνιας φλεγμονής. Από τη μελέτη αποκλείστηκαν, επίσης, ασθενείς που λάμβαναν ανοσοκατασταλτικά φάρμακα και όλοι ήταν σε καλή γενική κλινική κατάσταση. Κατά τη διάρκεια των συνεδριών AMK με διαφορετικές μεμβράνες, οι ασθενείς της μελέτης είχαν σταθερό αιματοκρίτη, ελάμβαναν σταθερή δόση ηπαρίνης και ερυθροποιητίνης και δεν νοσηλεύονταν στο νοσοκομείο για τον οποιοδήποτε λόγο.

Οι μεμβράνες που μελετήθηκαν ήταν οι εξής: 1) αιμοφάνη, 2) πολυακρυλονιτρίλη/νατριούχος μεθαυλοθεική (AN 69). Τα χαρακτηριστικά των μεμβρανών φαίνονται στον πίνακα 2.

Στις δύο μεμβράνες διενεργήθηκε δοκιμασία ελέγχου φαγοκυττάρωσης (phago test) και δοκιμασία ελέγχου αναπνευστικής έκρηξης (burst test), πριν την έναρξη της συνεδρίας, 15 λεπτά μετά και στις 3 ώρες από την έναρξή της. Κάθε ασθενής υποβλήθηκε σε συνεδρία AMK μία φορά με κάθε μία από τις παραπάνω μεμβράνες. Επίσης, πριν την έναρξη της κάθε συνεδρίας, προσδιορίστηκαν τα επίπεδα της C-αντιδρώσας πρωτεΐνης (CRP), έτσι ώστε να αποκλεισθεί η ύπαρξη φλεγμονής σε όλους τους αρρώστους και σε όλη τη διάρκεια του πρωτοκόλλου.

Η φαγοκυτταρική ικανότητα και η διαδικασία της αναπνευστικής έκρηξης στα πολυμορφοπύρηνα και μονοκύτταρα μελετήθηκαν με κυτταρομετρία ροής και εμπορικά kit της εταιρείας ORPEGEN Pharma Germany (phagotest και bursttest αντίστοιχα). Η βασική αρχή βασίζεται στον ενοφθαλμισμό πολυμορφοκυττάρων ή μονοκυττάρων σε φθορίζων υλικό βακτηρίων και μετράται το πο-

σό και η ένταση του φθορισμού, ως ένδειξη φαγοκυτταρικής ικανότητας. Οι μετρήσεις έγιναν *in vivo* (MONO) και με διεγέρτη (high), ώστε να παρατηρηθεί το φαινόμενο τόσο αυθόρμητα όσο και κατόπιν διεγερσης. Η μέση ένταση φθορισμού εκφράζει την ένταση του φαινομένου.

Στατιστική ανάλυση

Η στατιστική ανάλυση των παρατηρήσεων της μελέτης έγινε με το στατιστικό πρόγραμμα SPSS 10.1. Η διαδικασία της στατιστικής ανάλυσης περιλάμβανε:

α) Υπολογισμό για κάθε μεταβλητή της μέσης τιμής (M) και της τυπικής απόκλισης (SD) σε όλα τα στάδια της μελέτης και σε όλα τα χρονικά διαστήματα

β) Οι διαφορές μεταξύ των μέσων τιμών στις διάφορες χρονικές στιγμές αξιολογήθηκαν με το students' t-test για ζεύγη.

Ως όριο στατιστικής σημαντικότητας θεωρήθηκε η τιμή $p < 0,05$.

Αποτελέσματα

Η δοκιμασία ελέγχου φαγοκυττάρωσης (phago test) και δοκιμασία ελέγχου αναπνευστικής έκρηξης (burst test), πριν την έναρξη της συνεδρίας, 15 λεπτά μετά και στις 3 ώρες από την έναρξή της φαίνεται στον πίνακα 3.

Η μέση τιμή της CRP πριν την έναρξη της συνεδρίας AMK, σε όλους τους ασθενείς, με όλες τις μεμβράνες της μελέτης ήταν εντός φυσιολογικών ορίων, υποδηλώνοντας την απουσία οξείας φλεγμονής από τους ασθενείς μας.

Συγκρίνοντας τις μετρήσεις των επιμέρους παραμέτρων μεταξύ των δύο μεμβρανών στις διάφορες χρονικές στιγμές δε διαπιστώθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά.

Αιμοφάνη

Η φαγοκυτταρική ικανότητα των μονοκυττάρων παρουσίασε σημαντική αύξηση στα 180 λεπτά

Πίνακας 3. Έλεγχος της φαρμακοκινητικής ικανότητας και της αναπνευστικής έμφυσης.

| α.α. | Μεμβράνη | PHAGO MONO 1 | MFI MONO 1 | PHAGO MONO 2 | MFI MONO 2 | PHAGO MONO 3 | MFI MONO 3 |
|-------------|-----------------|--------------------------|------------------------|--------------------------|------------------------|--------------------------|------------------------|
| 1 | Αιμοφάνη | 79,38±9,67 | 17,70±1,66 | 78,49±10,9 | 16,27±1,55 | 83,18±8,55 | 19,60±8,29 |
| 2 | AN 69 | 80,46±7,38 | 18,92±5,17 | 83,23±5,63 | 18,50±5,49 | 83,65±6,87 | 20,45±7,82 |
| α.α. | Μεμβράνη | PHAGO NEU 1 | MFI NEU 1 | PHAGO NEU 2 | MFI NEU 2 | PHAGO NEU 3 | MFI NEU 3 |
| 1 | Αιμοφάνη | 92,15±8,23 | 25,37±11,67 | 91,32±8,76 | 24,28±10,40 | 91,26±8,89 | 28,15±12,91 |
| | AN 69 | 94,29±0,97 | 27,29±8,61 | 93,72±1,24 | 26,97±8,20 | 93,41±4,85 | 28,87±8,96 |
| α.α. | Μεμβράνη | BURST MONO 1 | MFI MONO 1 | BURST MONO 1 HIGH | MFI MONO 1 HIGH | BURST MONO 2 | MFI MONO 2 |
| 1 | Αιμοφάνη | 78,55±15,39 | 1,78±0,75 | 91,82±11,73 | 2,89±1,44 | 82,64±14,50 | 2,12±0,80 |
| | AN 69 | 79,83±11,34 | 1,61±0,61 | 91,09±8,03 | 3,35±4,37 | 87,11±7,23 | 1,99±0,77 |
| α.α. | Μεμβράνη | BURST MONO 2 HIGH | MFI MONO 2 HIGH | BURST MONO 3 | MFI MONO 3 | BURST MONO 3 HIGH | MFI MONO 3 HIGH |
| 1 | Αιμοφάνη | 91,29±13,72 | 5,16±9,62 | 83,32±11,92 | 2,24±1,05 | 90,27±12,25 | 2,24±1,05 |
| | AN 69 | 94,26±4,50 | 2,95±1,67 | 87,75±9,30 | 2,65±1,45 | 87,75±9,30 | 2,95±1,67 |
| α.α. | Μεμβράνη | BURST NEU 1 | MFI NEU 1 | BURST NEU 1 HIGH | MFI NEU 1 HIGH | BURST NEU 2 | MFI NEU 2 |
| 1 | Αιμοφάνη | 94,65±4,96 | 8,82±6,50 | 98,27±2,23 | 16,45±10,27 | 97,05±2,94 | 12,90±10,56 |
| | AN 69 | 95,06±5,02 | 7,97±4,72 | 98,03±2,74 | 16,51±11,29 | 97,17±3,34 | 12,22±9,46 |
| α.α. | Μεμβράνη | BURST NEU 2 HIGH | MFI NEU 2 HIGH | BURST NEU 3 | MFI NEU 3 | BURST NEU 3 HIGH | MFI NEU 3 HIGH |
| 1 | Αιμοφάνη | 99,07±0,89 | 23,77±14,37 | 93,46±7,27 | 12,54±12,02 | 98,32±2,44 | 19,96±18,15 |
| | AN 69 | 99,05±0,93 | 23,63±13,86 | 94,01±7,23 | 13,41±12,31 | 98,11±2,90 | 21,98±20,10 |

($p < 0,05$), ενώ στη μέση ένταση φθορισμού δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές.

Η φαγοκυτταρική ικανότητα των πολυμορφοπυρήνων δεν παρουσίασε σημαντικές διαφορές κατά τη διάρκεια της συνεδρίας, όπως και η μέση ένταση φθορισμού.

Ο έλεγχος της αναπνευστικής έκρηξης των μονοκυττάρων και με τη βοήθεια διεγέρτη δε μεταβλήθηκε σημαντικά κατά τη διάρκεια της συνεδρίας. Η μέση ένταση φθορισμού αυξήθηκε στα πρώτα 15 λεπτά σημαντικά ($p < 0,05$), ενώ μετά την επίδραση διεγέρτη δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές.

Ο έλεγχος της αναπνευστικής έκρηξης των πολυμορφοπυρήνων αυξήθηκε σημαντικά στα πρώτα 15 λεπτά ($p < 0,05$), όπως και η μέση ένταση φθορισμού και στα 15 λεπτά ($p < 0,05$) και στα 180 λεπτά ($p < 0,05$). Ο έλεγχος της αναπνευστικής έκρηξης των πολυμορφοπυρήνων με διεγέρτη αυξήθηκε σημαντικά στα πρώτα 15 λεπτά ($p < 0,05$), όπως και η μέση ένταση φθορισμού στο αντίστοιχο διάστημα ($p < 0,05$).

Πολυακρυλονιτρίλη/νατριούχος μεθαλυλοθεική (AN69)

Η φαγοκυτταρική ικανότητα των μονοπυρήνων και των πολυμορφοπυρήνων δεν παρουσίασε σημαντικές διαφορές κατά τη διάρκεια της συνεδρίας, όπως και η μέση ένταση φθορισμού.

Ο έλεγχος της αναπνευστικής έκρηξης των μονοκυττάρων αυξήθηκε σημαντικά και στα 15 λεπτά ($p < 0,05$) και στα 180 λεπτά της συνεδρίας ($p < 0,05$), ενώ παράλληλα, σημαντική ήταν και η αύξηση της μέσης έντασης φθορισμού στους αντίστοιχους χρόνους ($p < 0,05$). Ο έλεγχος της αναπνευστικής έκρηξης των μονοκυττάρων με διεγέρτη αυξήθηκε οριακά στα πρώτα 15 λεπτά ($p = 0,055$).

Ο έλεγχος της αναπνευστικής έκρηξης των πολυμορφοπυρήνων αυξήθηκε σημαντικά στα πρώτα 15 λεπτά ($p < 0,05$), όπως και η μέση ένταση φθορισμού και στα 15 λεπτά ($p < 0,05$) και στα 180 λεπτά ($p < 0,05$). Ο έλεγχος της αναπνευστικής έκρηξης των πολυμορφοπυρήνων με διεγέρτη αυξήθηκε σημαντικά στα πρώτα 15 λεπτά ($p < 0,05$), όπως και η μέση ένταση φθορισμού στο αντίστοιχο διάστημα ($p < 0,05$).

Συζήτηση

Δεν υπάρχουν στη βιβλιογραφία δεδομένα σχετικά με τη φαγοκυτταρική ικανότητα και την

αναπνευστική έκρηξη ασθενών που υποβάλλονται σε αιμοκάθαρση με αιμοφάνη ή AN69. Τα αποτελέσματα μελετών σε άλλες μεμβράνες αφορούν περιορισμένο αριθμό ασθενών ενώ και η μεθοδολογία δεν επιτρέπει τις περισσότερες φορές εκτίμηση και αξιολόγηση πολλών παραμέτρων ταυτόχρονα^{15,16}.

Το 1983, οι Briggs και συν.¹⁷ πρώτοι και στη συνέχεια, οι Haag-Weber και συν. το 1989¹⁸ και το 1991¹⁹ εστίασθηκαν στη διαταραγμένη μεταβολική δραστηριότητα των κυττάρων σε αιμοκαθαιρόμενους ασθενείς. Για τις διαταραχές σε κυτταρικό επίπεδο ευθύνονται η ουραιμία, η κακή θρέψη, η υπερφόρτωση με σίδηρο, το αυξημένο ενδοκυττάριο ασβέστιο, κυκλοφορούντες παράγοντες (circulating plasma factors) και η διαδικασία της αιμοκάθαρσης από μόνη της.

Στη μελέτη μας, διαπιστώθηκε αύξηση της φαγοκυτταρικής ικανότητας των μονοκυττάρων στα 180 λεπτά της συνεδρίας με αιμοφάνη, χωρίς να διαπιστώνονται μεταβολές στην φαγοκυτταρική ικανότητα των πολυμορφοπυρήνων. Κατά τη διάρκεια συνεδρίας με AN69 δεν παρατηρήθηκε μεταβολή στη φαγοκυτταρική ικανότητα τόσο των μονοκυττάρων, όσο και των πολυμορφοπυρήνων. Συγκρίνοντας τα στοιχεία των δύο μεμβρανών, δε διαπιστώσαμε σημαντικές διαφορές στη φαγοκυτταρική ικανότητα των ασθενών, όταν υποβάλλονταν σε συνεδρίες AMK με αιμοφάνη και AN69. Οι Vanholder και συν. το 1992²⁰, συγκρίνοντας τη φαγοκυτταρική δραστηριότητα κατά τη διάρκεια AMK με διαφορετικές μεμβράνες (κουπροφάνη, αιμοφάνη, AN69, PMMA), δε διαπίστωσαν επίσης στατιστικά σημαντικές διαφορές στο μεταβολικό προφίλ της φαγοκυττάρωσης μεταξύ των ασθενών.

Μία από τις σημαντικότερες μελέτες είναι αυτή των Coratelli και συν.²¹, που το 1986 μελέτησαν τη φαγοκυτταρική ικανότητα των λευκών αιμοσφαιρίων κάτω από την επίδραση τριών διαφορετικών μεμβρανών AMK (κουπροφάνη, αναγεννημένη κυτταρίνη, πολυακρυλονιτρίλη). Αρχικά, παρατηρήθηκε μια πτώση της φαγοκυτταρικής ικανότητας (από 49% σε 20% στην κουπροφάνη, από 57% σε 25% στην αναγεννημένη κυτταρίνη και από 51% σε 48% στην πολυακρυλονιτρίλη), που όμως δε διατηρήθηκε για πολύ, αφού οι τιμές της φαγοκυτταρικής δραστηριότητας επανήλθαν στα αρχικά τους επίπεδα λίγα λεπτά από την έναρξη της συνεδρίας. Οι παραπάνω παρατηρήσεις μπορεί να ερμηνεύονται από την ύπαρξη ενός πιο εκλεκτικού μηχανισμού φαγοκυττάρωσης. Είναι πέραν πάσης

αμφιβολίας ότι οι μεμβράνες διαφέρουν μεταξύ τους ως προς τη βιοσυμβατότητά τους. Από την άλλη, δεν έχουν συγκριθεί όλες οι παράμετροι βιοσυμβατότητας, ούτε όλες οι μεμβράνες μεταξύ τους. Ένα τρίτο πρόβλημα αποτελεί ότι τα ευρήματα κάποιων μελετών *in vitro* δε μπορούν να μας δεσμεύσουν για αντίστοιχα ευρήματα *in vivo*²².

Η «υποβαθμισμένη» φαγοκυτταρική δραστηριότητα των αιμοκαθαριζόμενων ασθενών μπορεί γενικά να εξηγηθεί από την ύπαρξη εξωκυττάρων αναστολέων της φαγοκυττάρωσης στο αίμα του πληθυσμού αυτού (granulocyte inhibiting protein I και II, complement factor D) ή από την απουσία «ενισχυτικών» παραγόντων της φαγοκυτταρικής δραστηριότητας. Το φαινόμενο αυτό έχει ήδη αναγνωρισθεί από το 1986 και παρατηρηθεί σε ασθενείς που υποβάλλονται σε ΑΜΚ, ακόμα και με συνθετικές μεμβράνες²³.

Οι παρατηρήσεις, τόσο οι δικές μας όσο και της διεθνούς βιβλιογραφίας, συμφωνούν ότι παρά τη γνωστή διαφορά στη βιοσυμβατότητα μεταξύ των δύο μεμβρανών, η φαγοκυτταρική ικανότητα μάλλον δεν παρουσιάζει σημαντικές διαφορές. Οι Haag Weber το 1994¹⁴ και Vanholder το 1993²⁴, εμβαθύνοντας στο θέμα της βιοσυμβατότητας και συσχετίζοντάς το με τη θνητότητα και τη νοσηρότητα των αιμοκαθαριζόμενων ασθενών, διαπίστωσαν ότι η φαγοκυτταρική ικανότητα των πολυμορφοπυρήνων δεν επηρεάζεται από τον τύπο της μεμβράνης. Οι ίδιοι μελετητές παρατήρησαν ότι, συνήθως, η ενεργοποίηση των πολυμορφοπυρήνων είναι πιο γρήγορη από αυτήν των μονοκυττάρων. Το γεγονός αυτό μπορεί να ερμηνευθεί από την ύπαρξη ενός πιο εκλεκτικού μηχανισμού φαγοκυττάρωσης.

Ελέγχοντας την αναπνευστική έκρηξη, παρατηρήσαμε ότι αυξάνεται στα πολυμορφοπύρηνα στην συνεδρία της αιμοφάνης, ενώ στην συνεδρία με AN69 αυξάνεται τόσο στα πολυμορφοπύρηνα όσο και στα μονοκύτταρα. Συγκρίνοντας όμως τα αποτελέσματα στις διάφορες χρονικές στιγμές και με τις δύο μεμβράνες, δε διαπιστώσαμε σημαντικές διαφορές.

Η διαφορετική συμπεριφορά πολυμορφοπυρήνων και μονοκυττάρων συμφωνεί με τις περιορισμένες βιβλιογραφικές παραμπομπές. Οι Coli και συν.²⁵, το 1999, συγκρίνοντας συνθετικές με μη συνθετικές μεμβράνες, διαπίστωσαν καλύτερη φαγοκυτταρική ικανότητα και αναπνευστική έκρηξη των πολυμορφοπυρήνων με τις συνθετικές μεμβράνες. Αιτία του παραπάνω φαινομένου ενδεχόμενα να είναι το υλικό της μεμβράνης ή η ουδετε-

ροπενία και η ενεργοποίηση του συμπληρώματος που αυτό προκαλεί. Σύμφωνα με τους συγγραφείς, πάντως, ανεξάρτητα από την αιτία, φαίνεται ότι κατά τη διάρκεια συνεδρίας με μεμβράνες από φυσικά πολυμερή, τα πολυμορφοπύρηνα που παγιδεύονται στην πνευμονική κυκλοφορία τα πρώτα λεπτά της συνεδρίας χάνουν και μεγάλο τμήμα της λειτουργικής τους ικανότητας, με αποτέλεσμα, όταν επανέρχονται στη συστηματική κυκλοφορία, να αντιδρούν ασθενώς σε ξένα ερεθίσματα. Χρησιμοποιώντας ως κριτήριο τη φαγοκυτταρική ικανότητα των μονοκυττάρων, τα αποτελέσματα ήταν ακριβώς αντίστροφα. Και στις δύο περιπτώσεις οι όποιες αλλαγές αποκαθίστανται μέχρι το τέλος της συνεδρίας. Με βάση αυτό το εύρημα, πολλοί συγγραφείς αδυνατούν να βρουν στατιστικά σημαντικές διαφορές στην νοσηρότητα και θνητότητα ασθενών από λοιμώξεις, ανάλογα με τον τύπο της μεμβράνης με τον οποίον αιμοκαθαίρονται.

Το 1995 οι Ward και συν.²⁶ μελετώντας βιοασύμβατες μεμβράνες (κουπροφάνη) επέκτειναν τον προβληματισμό. Παρατήρησαν ότι τα πρώτα 15 λεπτά της συνεδρίας ενεργοποιείται ο μηχανισμός της αναπνευστικής έκρηξης, αλλά περιορίζεται δραστικά η φαγοκυτταρική δραστηριότητα. Για την ακρίβεια, οι μεμβράνες από φυσικά παράγωγα προάγουν μεν την αναπνευστική έκρηξη των πολυμορφοπυρήνων, αλλά η δράση τους αυτή καλύπτεται από την ταυτόχρονη σημαντική λευκοπενία που προκαλεί η ενεργοποίηση του συμπληρώματος. Επιβεβαιώνεται, έτσι, ότι όλες οι παράμετροι της διαδικασίας της ΑΜΚ, όπως η μεμβράνη, η διαδικασία αυτή καθ' αυτή αλλά και ο ίδιος ο ασθενής, επηρεάζουν τη βιοσυμβατότητα ως ολοκληρωμένο φαινόμενο.

Μία άλλη παράμετρος που δεν έχει αξιολογηθεί επαρκώς είναι η διάρκεια ΑΜΚ με τη συγκεκριμένη μεμβράνη. Στη δική μας μελέτη, παρατηρήθηκαν οι αλλαγές στη φαγοκυτταρική ικανότητα και στην αναπνευστική έκρηξη με δύο διαφορετικές μεμβράνες σε μία συνεδρία κάθε φορά. Οι περισσότεροι ερευνητές ακολουθούν την ίδια πρακτική. Η πιο σοβαρή μελέτη που θέτει τον προβληματισμό του χρόνου ΑΜΚ είναι αυτή των Pereira και συν.²⁷ το 2004, που έγινε στα πλαίσια της HEMO study, και συνέκρινε κουπροφάνη, πολυσουλφόνη και αναγεννημένη κυτταρίνη. Δε διαπιστώθηκε διαφορά στη φαγοκυτταρική δραστηριότητα, ενώ στο θέμα της αναπνευστικής έκρηξης, η μεμβράνη από αναγεννημένη κυτταρίνη είχε χαμηλότερες επιδόσεις. Δεν υπάρχει, όπως αναφέρθηκε, ικανοποιητικός αριθμός αξιόπιστων ερευνών, αλ-

λά στη μελέτη αυτή τίθεται ο προβληματισμός, χωρίς να μπορεί να δοθεί συγκεκριμένη απάντηση, ότι ο χρόνος των συνεδριών με μία συγκεκριμένη μεμβράνη ίσως να έχει κάποιο ρόλο τόσο στις διαταραχές του μεταβολικού προφίλ όσο και στην αποκατάστασή τους.

Πολλοί παράγοντες ευθύνονται για τα αντικρουόμενα αποτελέσματα των διαφόρων μελετών. Αρχικά, η μεθοδολογία των μετρήσεων δεν είναι παντού η ίδια (π.χ. η χρησιμοποίηση τεχνητού διεγέρτη ή βακτηριδίου)²⁸. Ακόμη, υπάρχουν παράμετροι που μπορεί να ενέχονται στην όλη φαγοκυτταρική διαδικασία και δεν είναι ίδιοι σε όλους τους ασθενείς. Τέτοιοι παράγοντες είναι η υπερφόρτωση με σίδηρο, η κακή θρέψη, η δηλητηρίαση με αλουμίνιο, τα αυξημένα επίπεδα ενδοκυττάρου ασβεστίου, ο υπερπαραθυρεοειδισμός και τα χαμηλά επίπεδα ερυθροποιητίνης^{17,19}. Τέλος, ως μη ξεχνάμε ότι η μεγάλη πλειοψηφία των υπαρχουσών μελετών συμφωνεί ότι οι όποιες αλλαγές στη φαγοκυτταρική ικανότητα και στην αναπνευστική έκρηξη, που παρατηρούνται κάτω από την επίδραση της μεμβράνης ΑΜΚ, αποκαθίστανται πολύ γρήγορα και, συνήθως, πριν το τέλος της συνεδρίας^{25,26}.

Σε προοπτική μελέτη, οι Vanholder και συν.²⁹, μελετώντας τη φαγοκυττάρωση σε ασθενείς με χρόνια νεφρική ανεπάρκεια, διαπίστωσαν ότι αυτή είναι ελαττωμένη κατά το ήμισυ σε σχέση με υγιείς μάρτυρες. Στην ίδια μελέτη, συγκρίνοντας την κουπροφάνη με πιο βιοσυμβατές μεμβράνες, διαπιστώθηκε χαρακτηριστικά ελαττωμένη φαγοκυτταρική δραστηριότητα στους ασθενείς που υποβάλλονταν σε ΑΜΚ με κουπροφάνη. Επίσης, κατά τη διάρκεια μελέτης 24 εβδομάδων, όπου 8 ασθενείς υποβάλλονταν σε πρόγραμμα ΑΜΚ με κουπροφάνη και 7 ασθενείς με πολυσουλφόνη, κανείς από τους ασθενείς της πολυσουλφόνης δεν εμφάνισε σημεία λοίμωξης. Αντίθετα, 3 από τους 8 ασθενείς υπό κουπροφάνη παρουσίασαν λοίμωξη που κατέληξε σε σήψη. Οι Hornberger και συν.³⁰, το 1991, σε μια αναδρομική πολυπαραγοντική μελέτη με 253 ασθενείς, έδειξαν ότι η συνυπάρχουσα νοσηρότητα ήταν μικρότερη στην ομάδα των ασθενών που υποβάλλονταν σε ΑΜΚ με πολυσουλφόνη σε σχέση με τους ασθενείς που ήταν σε πρόγραμμα ΑΜΚ με μεμβράνες κυτταρίνης. Οι υποστηρικτές της θεωρίας ότι οι ασθενείς που υποβάλλονται σε ΑΜΚ με μεμβράνες από παράγωγα κυτταρίνης εμφανίζουν συχνότερα λοιμώξεις έχουν προτείνει να ελέγχεται η ανοσολογική απάντηση του

κάθε ασθενούς *in vitro* πριν καθορισθεί η συνταγή της ΑΜΚ³¹.

Από την άλλη, δεν είναι λίγες και οι μελέτες, όπως αυτές των Bononini και συν.³², οι οποίοι δε μπόρεσαν να δείξουν σημαντικές διαφορές στη νοσηρότητα και στη θνητότητα από λοιμώξεις σε αιμοκαθαρόμενο πληθυσμό ανάλογα με τη χρησιμοποιούμενη μεμβράνη ΑΜΚ (κυτταρίνη-συνθετική).

Συμπερασματικά, έχει γίνει φανερό ότι το διαταραγμένο ανοσολογικό προφίλ των αιμοκαθαρόμενων ασθενών, καθώς και οι μηχανισμοί που ευθύνονται για αυτό, είναι ένα δυναμικό φαινόμενο με πολλούς αποδέκτες, όπως η βιοσυμβατότητα της μεμβράνης και η άμυνα του οργανισμού γενικότερα. Ο βαθμός της σύνδεσης και της αλληλεπίδρασης των παραπάνω φαινομένων είναι σε πολλά σημεία αδιευκρίνιστος και άγνωστος. Ο έλεγχος της φαγοκυτταρικής ικανότητας και της αναπνευστικής έκρηξης λειτουργεί συμπληρωματικά στην εκτίμηση του βαθμού βιοσυμβατότητας, ενώ ανοίγει νέους ορίζοντες για περαιτέρω έρευνα στα αίτια, τον επιπολασμό και την κατάληξη των λοιμώξεων σε αιμοκαθαρόμενους ασθενείς.

Summary

I. Griveas, P. Pasadakis, A. Fleva, E. Thodis, A. Pavlitou, G. Visvardis, D. Papadopoulou, V. Vargemzis, †G. Sakellariou. Phagocytic activity and respiratory burst in patients on dialysis with two different dialysis membranes. *Hellen Nephrol* 2007; 19 (4): 315-323.

Aim: Patients with chronic renal failure have increased susceptibility to various pathogens, especially to bacterial infection. This has been related to alterations in immune response and to disturbances of polymorphonuclear leukocytes (PMN) and monocytes (MO) functions which include chemotaxis, adherence and phagocytic and bacterial activity, especially as the consequence of blood-membrane contact. During ingestion of microorganisms, PMN generate highly reactive oxygen species with increased oxygen consumption, the so-called 'respiratory burst'. The present study was aimed at examining the effects of blood-membrane contact on PMN and MO, with two dialysis membranes. In particular, we studied phagocytosis activation due to contact with the dialysis membranes during hemodialysis sessions. We also evaluated respiratory burst both in PMN and MO.

Patients-Methods: In 30 stable haemodialysis (HD) patients, phagocytosis and respiratory burst were assessed using flow cytometry. Patients with diabetes,

systemic vasculitis, or those showing evidence of infectious complications or malignancy, as well as patients taking immunosuppressive medications were excluded from the study. Cells from this study population were analysed before the start, 15 min thereafter and 3 h from the beginning of HD session, using 2 different dialyzers: haemophan and acrylonitrile and sodium methallylsulfonate polymer (AN69).

Results: During the session with haemophan, phagocytosis of MO increased significantly after 180 min ($p < 0.05$), but phagocytosis of PMN and respiratory burst of MO did not change significantly. On the contrary, burst of PMN increased significantly after 15 min ($p < 0.05$) and after 180 min ($p < 0.05$). During the session with AN69 phagocyte metabolic activity was well maintained. On the other hand, respiratory burst of PMN and MO increased significantly after 15 min ($p < 0.05$) and after 180 min ($p < 0.05$). In general there were no significant differences between the dialyzers under study.

Conclusions: Phagocytosis and oxidative burst activation could indeed have some role as a membrane biocompatibility test and as a possible link between nature of the dialysis membrane and risk of infection in HD patients.

Key words: dialyzers, hemodialysis, phagocytic activity, respiratory burst.

Βιβλιογραφία

- Bergesio F, Monzani G, Manescalchi F, Boccabianca J, Passaleva A, Frizzi V. Leukocytes, eosinophils and complement function during hemodialysis with polysulfone and polymethylmethacrylate membranes: comparison with cuprophane and polyacrylonitrile. *Blood Purif* 1988; 6: 16-26.
- Bosch T, Schmidt B, Samtleben W, Gurland HJ. Biocompatibility and clinical performance of a new modified cellulose membrane. *Clin Nephrol* 1986; 26(Suppl 1): 22-29.
- Brogan TD. Phagocytosis by polymorphonuclear leukocytes from patients with renal failure. *Br Med J* 1967; 3: 596-599.
- Farrel PC. Biological consequences of blood-membrane interactions. In: Smedy LC, Jorstad S, Wideroe TE, eds. *Proc Int Symp Immune and Metabolic Aspects of Blood Purification Systems*. Basel: Karger, 1986: 49-51.
- Ganz T. Neutrophils and host defence. *Ann Intern Med* 1988; 109: 127-142.
- Montomerie JZ, Kalmanson GM, Guze LB. Leukocyte phagocytosis and serum bactericidal activity in chronic renal failure. *Am J Med Sci* 1972; 264: 385-393.
- Abrutyn E, Solomons NW, St Clair L, MacGregor RR, Root RK. Granulocyte function in patients with chronic renal failure: surface adherence, phagocytosis, and bactericidal activity in vitro. *J Infect Dis* 1977; 135: 1-8.
- Markert M, Waridel PA, Heierli C, Wauters JP. Neutrophil functions during hemodialysis. *Contrib Nephrol* 1988; 62: 99-108.
- Lehmann AK, Halstensen A. Phagocytosis: measurement by flow cytometry. *J Immunol Methods* 2000; 243: 229-242.
- Hampton MB, Witherbourn CC. Methods for quantifying phagocytosis and bacterial killing by human neutrophils. *J Immunol Methods* 1999; 232: 15-22.
- Van Eden SF, Klut ME, Walker BAM, Hogg JC. The use of flow cytometry to measure neutrophil function. *J Immunol Methods* 1999; 232: 23-43.
- Dahlgren C, Karlsson A. Respiratory burst in human neutrophils. *J Immunol Methods* 1999; 232: 3-14.
- Hirabashi Y, Koboyashi T, Nishikawa A, et al. Oxidative metabolism and phagocytosis of polymorphonuclear leukocytes in patients with chronic renal failure. *Nephron* 1988; 49: 305-312.
- Haag-Weber M, Horl WH. Effect of biocompatible membranes on neutrophil function and metabolism. *Clin Nephrol* 1994; 42(Suppl 1): S31-S36.
- Griveas I, Visvardis G, Sakellariou G, et al. Biocompatibility study based on differential sequestration kinetics of CD14+CD16+ blood monocyte subsets with different dialyzers. *Ren Fail* 2006; 28: 493-499.
- Moore M, Kaplan D, Picciolo GL, Wallis RR, Kowolik MJ. Effect of cellulose acetate materials on the oxidative burst of human neutrophils. *J Biomed Mater Res* 2001; 3: 257-265.
- Briggs WA, Sillix DH, Mahajan S, McDonald FD. Leukocyte metabolism and function in uremia. *Kidney Int* 1983; 16: 93-96.
- Haag-Weber M, Hable M, Schollmeyer P, Horl WH. Metabolic response of neutrophils to uremia and dialysis. *Kidney Int* 1989; 27: 293-298.
- Haag-Weber M, Harble M, Fielder G, et al. Alterations of polymorphonuclear leukocyte glycogen metabolism and glucose uptake in dialysis patients. *Am J Kidney Dis* 1991; 17: 562-568.
- Vanholder R, Van Landschoot, Waterloos MA, Delanghe J, Van Maele G, Ringoir S. Phagocyte metabolic activity during hemodialysis with different dialyzers not affecting the number of circulating phagocytes. *Int J Artif Organs* 1992; 15: 89-92.
- Coratelli P, Rizzi R, Schena A, Pavone V, Specchia G, Liso V. Neutrophil function during hemodialysis: Effects of three different membranes. In: Smedy LC, Jorstad S, Wideroe TE, eds. *Proc Int Symp Immune and Metabolic Aspects of Therapeutic Blood Purification Systems*. Basel: Karger, 1986: 137-143.
- Smedy LC, Wideroe TE, Balstad T, et al. Biocompatibility aspects of cellophane, cellulose-acetate, polyacrylonitrile, polysulphone and polycarbonate hemodialyzers. *Blood Purif* 1986; 4: 93-101.
- Forman HJ, Thomas MJ. Oxidant production and bactericidal activity of phagocytes. *Ann Rev Physiol* 1986; 48: 669-680.
- Vanholder R, Ringoir SI. Infections morbidity and defects of phagocytic function in end-stage renal disease: a

- review. *J Am Soc Nephrol* 1993; 3: 1541-1554.
25. *Coli L, Tumietto F, De Pascalis A, et al.* Effects of dialysis membrane nature on intradialytic phagocytizing activity. *Int J Artif Organs* 1999; 22: 74-80.
26. *Ward R, McLeish K.* Hemodialysis with cellulose membranes primes the neutrophil oxidative burst. *Artif Organs* 1995; 8: 801-807.
27. *Rao M, Daqing G, Jaber BL, et al.* Dialyzer membrane type and reuse practice influence polymorphonuclear leukocyte function in hemodialysis patients. *Kidney Int* 2004; 65: 682-691.
28. *Gastaldello K, Husson C, Wens R, Vanherweghem JL, Tielemans C.* Role of complement and platelet activating factor in the stimulation of phagocytosis and reactive oxygen species production during haemodialysis. *Nephrol Dial Transplant* 2000; 15: 1638-1646.
29. *Vanholder R, Ringoir, S.* Polymorphonuclear cell function and infection in dialysis. *Kidney Int* 1992; 38: 91-95.
30. *Hornberger JC, Chernew M, Petersen J, Garber AM.* A multivariate analysis of mortality and hospital admissions with high flux dialysis. *J Am Soc Nephrol* 1992; 3: 1227-1237.
31. *Zaoui P, Green W, Hakim RM.* Hemodialysis with cuprophane membrane modulates interleukin-2 receptor expression. *Kidney Int* 1991; 3: 1020-1026.
32. *Bononini V, Coli L, Scolari MP, Stefoni S.* Structure of dialysis membranes and long-term clinical outcome. *Am J Nephrol* 1995; 15: 455-562.

* Παρελήφθη στις 28/3/07

Έγινε αποδεκτή μετά από τροποποιήσεις στις 27/7/07.

Αλληλογραφία:

Ι. Γριβέας

Γορτυνίας 12

152 38, Πάτημα Χαλανδρίου

Αθήνα

Τηλ.: 6932379323

e-mail: giannisgriv@hotmail.com