

Μελέτη της βιοσυμβατότητας των μεμβρανών αιμοκάθαρσης μέσω της κινητικής των μονοκυττάρων (CD14⁺CD16⁺)*

I. Γριβέας¹
Π. Πασαδάκης²
Α. Φλέβα³
Η. Θώδης²
Γ. Βιοβάρδης¹
Α. Παυλίτου³
Β. Βαργεμέζης²
† Γ. Σακελλαρίου¹

¹ Νεφρολογικό Τμήμα,
Γ.Ν. Παπαγεωργίου,
Θεσσαλονίκη
² Πανεπιστημιακή Νεφρολογική
Κλινική, Δημοκρίτειο
Πανεπιστήμιο Θράκης,
Αλεξανδρούπολη,
³ Ανοσολογικό Εργαστήριο,
Γ.Ν. Παπαγεωργίου,
Θεσσαλονίκη

Περίληψη

Σκοπός: Η επαφή των στοιχείων του αίματος με τη μεμβράνη της αιμοκάθαρσης ενεργοποιεί τα μονοκύτταρα για να εκκρίνουν φλεγμονώδεις κυτταροκίνες. Ο υποπληθυσμός CD14⁺CD26⁺ των μονοκυττάρων παρουσιάζει χαρακτηριστική ελάττωση στην περιφερική κυκλοφορία, στα πρώτα λεπτά της αιμοκάθαρσης. Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η αξιολόγηση της βιοσυμβατότητας των μεμβρανών αιμοκάθαρσης μέσω της κινητικής των μονοκυττάρων.

Ασθενείς – Μέθοδοι: Μελετήθηκαν 30 αιμοκαθαιρόμενοι ασθενείς από 47 έως 74 ετών (μέση ηλικία: M±SD 60,1±8,7 έτη.). Οι μεμβράνες που μελετήθηκαν ήταν οι εξής: 1) αιμοφάνη, 2) πολυμεθυλομετακρυλική (PMMA), 3) τριοξεική κυτταρίνη, 4) κουπροφάνη επικαλυπτόμενη με βιταμίνη E και 5) πολυακρυλονιτρίλη/νατριούχος μεθαυλοθειική (AN69). Σε όλους τους ασθενείς, προσδιορίστηκαν ο απόλυτος αριθμός των λευκών αιμοσφαιρίων, πολυμορφοπυρήνων, λεμφοκυττάρων και μονοκυττάρων, οι υποπληθυσμοί των μονοκυττάρων CD14⁺, CD14⁺CD16⁺ καθώς και τα επίπεδα των φυσικών κυτταροκτόνων κυττάρων (natural killer cells, NK) (CD3-CD16+56+) και των κυττάρων που προσομοιάζουν με φυσικά κυτταροκτόνα (NK-like) (CD3+CD16+56+) με τη μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής. Από κάθε ασθενή, ελήφθησαν δείγματα αίματος πριν την έναρξη της συνεδρίας αιμοκάθαρσης (t=0), 30 λεπτά μετά (t=30) και στο τέλος της (t=240).

Αποτελέσματα: Ως κριτήριο βιοσυμβατότητας χρησιμοποιήθηκε ο υποπληθυσμός CD14⁺CD16⁺ των μονοκυττάρων. Στα πρώτα 30 λεπτά της συνεδρίας, διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική μείωση του υποπληθυσμού αυτού, σε όλες τις μεμβράνες της μελέτης. Αξίζει να σημειωθεί, ότι ο μεγαλύτερος βαθμός μείωσης παρατηρήθηκε στην αιμοφάνη, ενώ ο μικρότερος στην AN69.

Συμπεράσματα: Ο υποπληθυσμός CD14⁺CD16⁺ των μονοκυττάρων αποτελεί έναν πολύ ευαίσθητο δείκτη κυτταρικής ενεργοποίησης και μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως περισσότερο ακριβές κριτήριο από το σύστημα του συμπληρώματος, για την αξιολόγηση της βιοσυμβατότητας των μεμβρανών αιμοκάθαρσης.

Λέξεις κλειδιά: βιοσυμβατότητα, μεμβράνες αιμοκάθαρσης, CD14⁺CD16⁺ μονοκύτταρα.

Εισαγωγή

Από την εποχή των Kolff και Berk, οι οποίοι, στις αρχές της δεκαετίας του 1940, κατασκεύασαν μεμβράνη αιμοκάθαρσης (AMK) από αναγεννημένη κυτταρίνη που, στην πραγματικότητα, δεν ήταν τίποτα περισσότερο από εμπορική πλαστική θήκη για συσκευασία κρέατος της εποχής, έχει συντελεσθεί μεγάλη πρόοδος στο υλικό των μεμβρανών AMK. Η AN69 είναι η πρώτη συνθετική μεμβράνη, που παρουσιάστηκε από τους Rhone-Poulenc, στις αρχές της δεκαετίας του 1970. Πρόκειται για ένα συμπολυμερές από ακρυλονιτρίλη και άλας του σουλφονικού οξέος. Η πολυσουλφόνη και η πολυαμίδη παρουσιάστηκαν ως υλικά μεμβρανών AMK πολύ αργότερα, στα τέλη της δεκαετίας του 1970.

Κάθε μεμβράνη χαρακτηρίζεται από την απόδοσή της, την ικανότητά της δηλαδή να απομακρύνει ουραιμικές τοξίνες και υγρά από τον ανθρώπινο οργανισμό, χωρίς την απώλεια απαραίτητων ουσιών, και από την βιοσυμβατότητά της, δηλαδή την ικανότητά της να προκαλεί τις λιγότερες δυνατές ανεπιθύμητες αλληλεπιδράσεις κατά την επαφή της με τα στοιχεία του αίματος. Η ιδανική μεμβράνη AMK έχει υψηλή απόδοση και πολύ καλή βιοσυμβατότητα¹.

Η αξιολόγηση της βιοσυμβατότητας γίνεται με τον προσδιορισμό των ακόλουθων παραμέτρων: ενεργοποίηση του συμπληρώματος, διαταραχές της λειτουργίας των λευκών αιμοσφαιρίων, παραγωγή κυτταροκινών, ενεργοποίηση του μηχανισμού πήξης κ.ά.^{2,3}. Κατά την επαφή του αίματος με τη μεμβράνη αιμοκάθαρσης, ενεργοποιούνται χυμικά συστήματα, όπως αυτά της πήξης και του συμπληρώματος, αλλά και κυτταρικοί μηχανισμοί. Έχει αποδειχθεί η ενεργοποίηση των λευκών αιμοσφαιρίων, με έκφραση μορίων προσκόλλησης και απελευθέρωση πρωτεασών, ενδοκυττάρων ενζύμων, ριζών οξυγόνου και λευκοτριενών καθώς και των αιμοπεταλίων. Η ενεργοποίηση αυτή οδηγεί σε έκλυση θρομβοξάνης B2 και σεροτονίνης και σε απελευθέρωση ιντερλευκίνης-1 (IL-1) και παράγοντα νέκρωσης των όγκων (TNF)^{4,7}.

Τα μονοκύτταρα του περιφερικού αίματος δεν είναι ένας ομοιογενής πληθυσμός, αλλά διακρίνεται σε διάφορους υποπληθυσμούς, ανάλογα με τους μεμβρανικούς δείκτες, που καθέναν από αυτούς φέρει. Η μεγάλη πλειοψηφία των μονοκυττάρων (90%) είναι θετικά στο δείκτη CD14⁺ (μία

γλυκοπρωτεΐνη 55Kd) και αρνητικά στο δείκτη CD16⁺. Το CD14⁺ δεν εκφράζεται στους μονοβλάστες, αλλά αρχίζει να εμφανίζεται με την έναρξη της διαδικασίας της ωρίμανσης, έχει μεγάλο επιπολασμό στα μακροφάγα του περιτοναίου και μικρό στα μακροφάγα του πνεύμονα^{8,9}.

Ένας μικρός υποπληθυσμός εκφράζεται ταυτόχρονα με το δείκτη CD16⁺ και το δείκτη CD14⁺ και περιγράφεται ως CD14⁺CD16⁺ μονοκύτταρα. Σε υγιή πληθυσμό, ο υποπληθυσμός των CD14⁺CD16⁺ μονοκυττάρων αντιπροσωπεύει περίπου το 7-10% του συνόλου των μονοκυττάρων του περιφερικού αίματος. Ωστόσο, σε λοιμώδη νοσήματα ή φλεγμονώδεις παθήσεις, όπως το AIDS, η σηψαιμία και η φυματίωση, αλλά και σε άλλες καταστάσεις, όπως η νεφρική ανεπάρκεια, το άσθμα και η υπερλιπιδαιμία, ο υποπληθυσμός των CD14⁺CD16⁺ κυττάρων αυξάνεται^{8,9}.

Στη διεθνή βιβλιογραφία, υπάρχουν αναφορές σχετικές με την καλύτερη βιοσυμβατότητα των συνθετικών μεμβρανών AMK σε σχέση με εκείνη των μεμβρανών από κυτταρίνη. Η ενεργοποίηση του συμπληρώματος και η παραγωγή κυτταροκινών είναι λιγότερο έντονες στην AMK με συνθετικές μεμβράνες⁶. Η παγίδευση του υποπληθυσμού CD14⁺CD16⁺ των μονοκυττάρων, ενός ευαίσθητου δείκτη επίδρασης της εξωσωματικής κυκλοφορίας στα μονοκύτταρα, είναι λογικό να μπορεί να αποτελεί κριτήριο και για τη βιοσυμβατότητα των μεμβρανών AMK¹⁰. Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η αξιολόγηση της βιοσυμβατότητας των μεμβρανών AMK μέσω της κινητικής των μονοκυττάρων.

Ασθενείς – Μέθοδοι

Μελετήθηκαν 30 αιμοκαθαιρόμενοι ασθενείς από 47 έως 74 ετών (μέση ηλικία: $M \pm SD$ 60,1 \pm 8,7 έτη). Τα πρωτοπαθή νοσήματα των ασθενών της μελέτης φαίνονται αναλυτικά στον πίνακα 1.

Οι αιμοκαθαιρόμενοι ασθενείς υποβάλλονταν σε 3 τετράωρες συνεδρίες κλασικής αιμοκάθαρσης εβδομαδιαίως, με ροή αίματος 280-300 ml/min, για χρονικό διάστημα 24,1 \pm 14,3 μηνών ($M \pm SD$).

Πίνακας 1. Πρωτοπαθή νοσήματα των ασθενών της μελέτης

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

Οι ασθενείς δεν έπασχαν από κακοήθη νοσήματα, συστηματικό ερυθριματώδη λύκο, σακχαρώδη διαβήτη ή άλλες συστηματικές παθήσεις και δεν είχαν ενδείξεις οξείας ή χρόνιας φλεγμονής κατά την περίοδο της μελέτης. Κανένας από τους ασθενείς δεν ελάμβανε ανοσοκατασταλτικά φάρμακα και όλοι ήταν σε καλή γενική κλινική κατάσταση.

Οι μεμβράνες που μελετήθηκαν ως προς τη βιοσυμβατότητά τους ήταν οι εξής: 1) αιμοφάνη, 2) πολυμεθυλομετακρυλική (PMMA), 3) τριοξεική κυτταρίνη, 4) κουπροφάνη επικαλυπτόμενη με βιταμίνη Ε και 5) πολυακρυλονιτρίλη/νατριούχος μεθαλλοθειική (AN69).

Σε όλους τους ασθενείς, προσδιορίστηκαν ο απόλυτος αριθμός των λευκών αιμοσφαιρίων, πολυμορφοκυττάρων, λεμφοκυττάρων και μονοκυττάρων, οι υποπληθυσμοί των μονοκυττάρων CD14⁺, CD14⁺CD16⁺ καθώς και τα επίπεδα των φυσικών κυτταροκτόνων κυττάρων (natural killer cells, NK) (CD3-/CD16⁺56⁺) και των κυττάρων που προσομοιάζουν με φυσικά κυτταροκτόνα (NK-like) (CD3+/CD16⁺56⁺) με τη μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής. Από κάθε ασθενή, ελήφθησαν δείγματα αίματος πριν την έναρξη της συνεδρίας αιμοκάθαρσης (t=0), 30 λεπτά μετά (t=30) και στο τέλος της (t=240). Επίσης, πριν από την έναρξη της κάθε συνεδρίας προσδιορίστηκαν τα επίπεδα της C-αντιδρώσας πρωτεΐνης (CRP).

Για τη μελέτη, χρησιμοποιήθηκαν μονοκλωνικά αντισώματα της εταιρίας Immunotech, Coulter και οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν σε κυτταρομετρητή ροής Epics Elite ESP Coulter. Ως κριτήριο βιοσυμβατότητας χρησιμοποιήθηκε ο υποπληθυσμός CD14⁺CD16⁺ των μονοκυττάρων.

Τα αποτελέσματα αξιολογήθηκαν ως μέσες τιμές ±SD. Οι διαφορές μεταξύ των μέσων τιμών στις διάφορες χρονικές στιγμές αξιολογήθηκαν με το students' t-test. Για την στατιστική ανάλυση, χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό πρόγραμμα SPSS και το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας τοποθετήθηκε στο p<0,05.

Αποτελέσματα

Στον πίνακα 2, παρουσιάζονται ο απόλυτος αριθμός των λευκών αιμοσφαιρίων, το ποσοστό των πολυμορφοκυττάρων, των λεμφοκυττάρων και των μονοκυττάρων, οι δείκτες επιφανείας των μονοκυττάρων CD14⁺, CD14⁺CD16⁺, καθώς και τα επίπεδα των NK και των NK-like κυττάρων, όπως καταμετρήθηκαν με τη μέθοδο της κυτταρομετρίας

ροής. Στον ίδιο πίνακα, φαίνεται η μέση τιμή της CRP πριν την έναρξη της συνεδρίας ΑΜΚ, σε όλους τους αρρώστους, με όλες τις μεμβράνες της μελέτης. Οι φυσιολογικές τιμές της CRP υποδηλώνουν την απουσία οξείας φλεγμονής από τους ασθενείς μας. Η διακύμανση της πορείας των CD14⁺CD16⁺ στη διάρκεια της συνεδρίας με κάθε μία μεμβράνη ΑΜΚ φαίνεται στο σχήμα 1.

Αιμοφάνη

Ο αριθμός των λευκών αιμοσφαιρίων μειώθηκε στατιστικά σημαντικά (p<0,05) στα πρώτα 30 λεπτά της συνεδρίας ΑΜΚ και, στη συνέχεια, αυξήθηκε προοδευτικά, έτσι ώστε στο τέλος της συνεδρίας, δεν υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των τιμών των λευκών αιμοσφαιρίων (p=0,421).

Το ποσοστό των μονοκυττάρων μειώθηκε, επίσης, στα πρώτα 30 λεπτά της συνεδρίας (p= 0,123) και προοδευτικά αυξήθηκε μέχρι το τέλος της (p= 0,233), χωρίς να φθάσει όμως στις αρχικές τιμές.

Το ποσοστό των CD14⁺CD16⁺ μονοκυττάρων μειώθηκε στατιστικά σημαντικά στα πρώτα 30 λεπτά της συνεδρίας (p<0,05) και στη συνέχεια, αυξήθηκε φθάνοντας, στο τέλος της συνεδρίας, σε επίπεδα που εξακολουθούσαν να εμφανίζουν στατιστικά σημαντική διαφορά από την αρχική τιμή (p<0,05). Ο υποπληθυσμός των CD14⁺CD16⁺ μονοκυττάρων ήταν μειωμένος κατά το 82,84% της αρχικής τιμής στα 30 λεπτά της συνεδρίας ΑΜΚ, ενώ στα 240 λεπτά, παρέμεινε μειωμένος κατά το 57,89% της αρχικής τιμής.

Το ποσοστό των NK κυττάρων μειώθηκε στατιστικά σημαντικά (p<0,05) και παρέμεινε χαμηλό μέχρι το τέλος της συνεδρίας.

PMMA

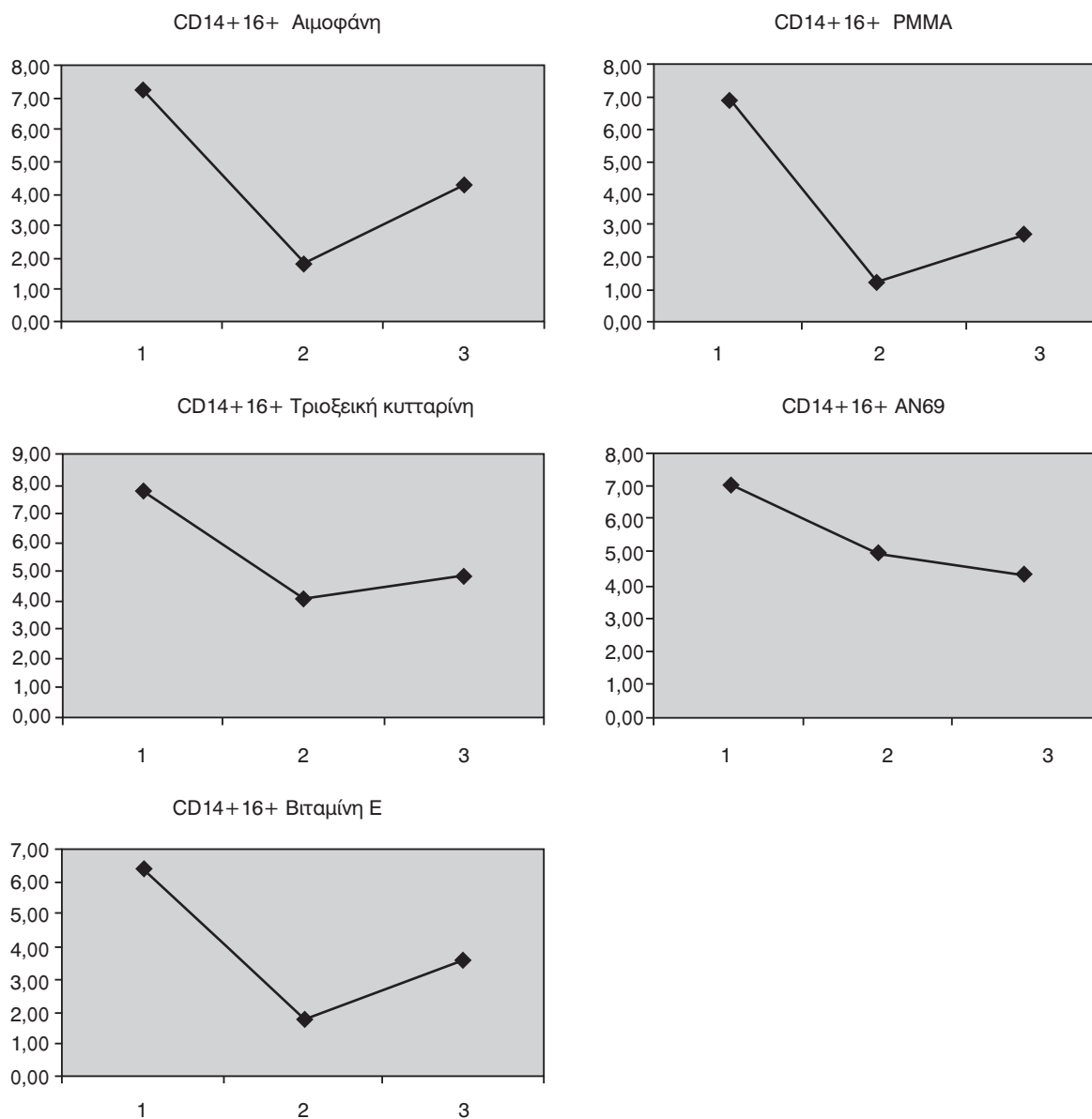
Ο αριθμός των λευκών αιμοσφαιρίων μειώθηκε στατιστικά σημαντικά (p<0,05) στα πρώτα 30 λεπτά της συνεδρίας και στη συνέχεια, αυξήθηκε προοδευτικά, έτσι ώστε στο τέλος της συνεδρίας, να μην υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των τιμών των λευκών αιμοσφαιρίων (p= 0,728).

Το ποσοστό των μονοκυττάρων μειώθηκε, επίσης, σημαντικά (p<0,05) στα πρώτα 30 λεπτά της συνεδρίας και προοδευτικά αυξήθηκε μέχρι το τέλος της (p=0,084), χωρίς να φθάσει στις αρχικές τιμές.

Το ποσοστό των CD14⁺CD16⁺ μονοκυττάρων μειώθηκε στατιστικά σημαντικά στα πρώτα 30 λεπτά της συνεδρίας (p<0,05) και στη συνέχεια,

Πίνακας 2. Μέση τιμή (\pm SD) της CRP, των λευκίων αιμοσφαιρίων (WBC), του ποσοστού των πολυμορφονυφίλων (NEU), των λεμφοκυττάρων (LYM), των μονοκυττάρων (MONO) και των δεικτών επιφανείας των μονοκυττάρων CD14+, CD14+CD16+, σε χρόνους πριν την έναρξη της συνεδρίας (1), 30 λεπτά μετά την έναρξη (2) και στο τέλος της (3) καθώς και των NK και των NK-like κυττάρων, σε χρόνους πριν από την έναρξη της συνεδρίας (1) και στο τέλος της (3)

| Τύπος μεμβράνης | CRP | WBC(1) | WBC(2) | WBC(3) | NEU(1) | NEU(2) | NEU(3) | LYM(1) | LYM(2) | LYM(3) | |
|---------------------|----------|----------|----------|-------------|-------------|-------------|------------|--------|--------|--------|--|
| Αιμοφάνη | MEAN | 6274 | 4676 | 5930 | 56,71 | 60,37 | 61,49 | 26,37 | 28,79 | 24,55 | |
| | SD | 0,35 | 1069 | 1664 | 10,21 | 7,05 | 12,83 | 7,65 | 5,8 | 6,17 | |
| PMMA | MEAN | 0,42 | 6953 | 4503 | 63 | 55,05 | 66 | 24,05 | 34,27 | 22,63 | |
| | SD | 0,45 | 2670 | 1725 | 6,55 | 12,27 | 6,95 | 5,03 | 10,95 | 6,13 | |
| Τριοξείκη κυτταρίνη | MEAN | 0,44 | 7395 | 6110 | 62,32 | 60 | 61,9 | 24,37 | 27,28 | 27,33 | |
| | SD | 0,42 | 1616 | 1446 | 7 | 7,41 | 7,8 | 5,76 | 6,4 | 6 | |
| Βιταμίνη - E | MEAN | 0,41 | 7417 | 4722 | 61,25 | 53 | 60 | 24,18 | 33,46 | 26,9 | |
| | SD | 0,5 | 2150 | 1882 | 7,43 | 12,63 | 11,3 | 7,26 | 13,17 | 6,17 | |
| AN69 | MEAN | 0,26 | 6685 | 5792 | 60,47 | 59,2 | 58,27 | 26,4 | 27,16 | 30,9 | |
| | SD | 0,13 | 1801 | 1530 | 7,72 | 6,11 | 5,58 | 6,34 | 5 | 5 | |
| Τύπος μεμβράνης | MONO(1) | MONO(2) | MONO(3) | NK(1) | NK(3) | NK-LIKE(1) | NK-LIKE(3) | | | | |
| Αιμοφάνη | MEAN | 9,91 | 4,86 | 6,16 | 16,61 | 12,11 | 4,71 | 3,09 | | | |
| | SD | 12,28 | 1,2 | 1,27 | 7,46 | 5,74 | 5,52 | 3,38 | | | |
| PMMA | MEAN | 9,91 | 5,22 | 7,04 | 16,18 | 12,90 | 4,91 | 3,34 | | | |
| | SD | 6,36 | 1,51 | 1,87 | 6,67 | 7,14 | 5,37 | 4,19 | | | |
| Τριοξείκη κυτταρίνη | MEAN | 6,67 | 7,74 | 6,49 | 16,11 | 13,01 | 5,04 | 3,96 | | | |
| | SD | 1,3 | 2,2 | 2 | 6,73 | 6,20 | 5,60 | 5,21 | | | |
| Βιταμίνη - E | MEAN | 9,22 | 5,75 | 6,97 | 13,32 | 10,93 | 4,57 | 3,18 | | | |
| | SD | 11,55 | 1,55 | 2,14 | 5,98 | 8,02 | 4,73 | 4,75 | | | |
| AN69 | MEAN | 6,5 | 8 | 6,36 | 18,03 | 12,90 | 4,74 | 3,04 | | | |
| | SD | 1,06 | 2 | 2,84 | 7,19 | 6,17 | 4,78 | 3,44 | | | |
| Τύπος μεμβράνης | CD14+(1) | CD14+(2) | CD14+(3) | CD14+16+(1) | CD14+16+(2) | CD14+16+(3) | | | | | |
| Αιμοφάνη | MEAN | 73,03 | 85,72 | 83,06 | 7,19 | 1,85 | 4,30 | | | | |
| | SD | 6,49 | 5,07 | 4,85 | 2,51 | 1,20 | 1,75 | | | | |
| PMMA | MEAN | 74,97 | 84,26 | 88,01 | 6,90 | 1,27 | 2,71 | | | | |
| | SD | 8,26 | 6,75 | 4,21 | 2,54 | 0,84 | 1,58 | | | | |
| Τριοξείκη κυτταρίνη | MEAN | 73,18 | 85,08 | 79,71 | 7,76 | 4,07 | 4,79 | | | | |
| | SD | 7,33 | 6,47 | 6,60 | 3,47 | 2,87 | 2,20 | | | | |
| Βιταμίνη - E | MEAN | 74,90 | 85,21 | 83,71 | 6,38 | 1,78 | 3,61 | | | | |
| | SD | 7,10 | 5,47 | 6,31 | 2,80 | 1,53 | 1,74 | | | | |
| AN69 | MEAN | 74,07 | 80,01 | 76,53 | 6,98 | 4,92 | 4,25 | | | | |
| | SD | 4,93 | 6,04 | 4,55 | 2,79 | 2,58 | 2,13 | | | | |



Σχ. 1. Η διακύμανση της πορείας των $CD14^+CD16^+$ μονοκυττάρων στη διάρκεια της συνεδρίας AMK, με κάθε μία από τις μεμβράνες της μελέτης πριν την έναρξη της συνεδρίας (1), 30 λεπτά μετά την έναρξη της συνεδρίας (2) και στο τέλος της συνεδρίας (3).

αυξήθηκε φθάνοντας, στο τέλος της συνεδρίας, σε επίπεδα που εξακολουθούσαν να εμφανίζουν στατιστικά σημαντική διαφορά από την αρχική τιμή ($p < 0,05$). Ο υποπληθυσμός των $CD14^+CD16^+$ μονοκυττάρων εμφανίστηκε μειωμένος κατά το 73,70% της αρχικής τιμής στα 30 λεπτά της συνεδρίας AMK, ενώ στα 240 λεπτά, παρέμεινε μειωμένος κατά το 55,64% της αρχικής τιμής.

Το ποσοστό των NK κυττάρων μειώθηκε στατιστικά σημαντικά ($p < 0,05$), μέχρι το τέλος της συνεδρίας.

Τριοξεική κυτταρίνη

Ο αριθμός των λευκών αιμοσφαιρίων μειώθηκε στατιστικά σημαντικά ($p < 0,05$) στα πρώτα 30 λεπτά της συνεδρίας και στη συνέχεια, αυξήθηκε προοδευτικά. Μέχρι το τέλος της συνεδρίας, παρέμεινε η στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των τιμών των λευκών αιμοσφαιρίων ($p < 0,05$).

Το ποσοστό των μονοκυττάρων όχι μόνο δε μειώθηκε, αλλά αυξήθηκε σημαντικά ($p < 0,05$) στα πρώτα 30 λεπτά της συνεδρίας και στη συνέχεια, μειώθηκε προοδευτικά μέχρι το τέλος της

($p=0,526$), φθάνοντας σχεδόν στις αρχικές τιμές.

Το ποσοστό των $CD14^+CD16^+$ μονοκυττάρων μειώθηκε στατιστικά σημαντικά στα πρώτα 30 λεπτά της συνεδρίας ($p<0,05$) και στη συνέχεια, αυξήθηκε φθάνοντας, στο τέλος της συνεδρίας, σε επίπεδα που εξακολουθούσαν να διαφέρουν στατιστικά σημαντικά από την αρχική τιμή ($p<0,05$). Ο υποπληθυσμός των $CD14^+CD16^+$ μονοκυττάρων εμφανίστηκε μειωμένος κατά το 23,47% της αρχικής τιμής στα 30 λεπτά της συνεδρίας AMK, ενώ στα 240 λεπτά, παρέμενε μειωμένος κατά το 13,04% της αρχικής τιμής.

Το ποσοστό των NK κυττάρων μειώθηκε στατιστικά σημαντικά ($p<0,05$), μέχρι το τέλος της συνεδρίας.

Κουπροφάνη επικαλυπτόμενη με βιταμίνη E

Ο αριθμός των λευκών αιμοσφαιρίων μειώθηκε στατιστικά σημαντικά ($p<0,05$) στα πρώτα 30 λεπτά της συνεδρίας και στη συνέχεια, αυξήθηκε προοδευτικά. Μέχρι το τέλος της συνεδρίας, παρέμενε η στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των τιμών των λευκών αιμοσφαιρίων ($p<0,05$).

Το ποσοστό των μονοκυττάρων μειώθηκε επίσης, στα πρώτα 30 λεπτά της συνεδρίας ($p=0,177$) και προοδευτικά αυξήθηκε μέχρι το τέλος της ($p=0,378$), χωρίς να φθάσει στις αρχικές τιμές.

Το ποσοστό των $CD14^+CD16^+$ μονοκυττάρων μειώθηκε στατιστικά σημαντικά στα πρώτα 30 λεπτά της συνεδρίας ($p<0,05$) και στη συνέχεια, αυξήθηκε φθάνοντας, στο τέλος της συνεδρίας, σε επίπεδα που εξακολουθούσαν να εμφανίζουν στατιστικά σημαντική διαφορά από την αρχική τιμή ($p<0,05$). Ο υποπληθυσμός των $CD14^+CD16^+$ μονοκυττάρων εμφανίστηκε μειωμένος κατά το 70% της αρχικής τιμής στα 30 λεπτά της συνεδρίας AMK, ενώ στα 240 λεπτά, παρέμενε μειωμένος κατά το 50% της αρχικής τιμής.

Το ποσοστό των NK κυττάρων μειώθηκε στατιστικά σημαντικά ($p<0,05$), μέχρι το τέλος της συνεδρίας.

Πολυακρυλονιτροΐλη/νατριούχος μεθαλυλοθειική (AN69)

Ο αριθμός των λευκών αιμοσφαιρίων μειώθηκε στατιστικά σημαντικά ($p<0,05$) στα πρώτα 30 λεπτά της συνεδρίας και, στη συνέχεια, αυξήθηκε προοδευτικά. Μέχρι το τέλος της συνεδρίας, παρέμενε η στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των τιμών των λευκών αιμοσφαιρίων ($p<0,05$).

Το ποσοστό των μονοκυττάρων όχι μόνο δε μειώθηκε, αλλά αυξήθηκε σημαντικά ($p<0,05$) στα πρώτα 30 λεπτά της συνεδρίας και στη συνέχεια, μειώθηκε προοδευτικά μέχρι το τέλος της ($p=0,778$), φθάνοντας σχεδόν στις αρχικές τιμές.

Το ποσοστό των $CD14^+CD16^+$ μονοκυττάρων μειώθηκε στατιστικά σημαντικά στα πρώτα 30 λεπτά της συνεδρίας ($p<0,05$) και στη συνέχεια, μειώθηκε ελάχιστα φθάνοντας, στο τέλος της συνεδρίας, σε επίπεδα που εξακολουθούν να εμφανίζουν στατιστικά σημαντική διαφορά από την αρχική τιμή ($p<0,05$). Ο υποπληθυσμός των $CD14^+CD16^+$ μονοκυττάρων εμφανίστηκε μειωμένος κατά το 20,63% της αρχικής τιμής στα 30 λεπτά της συνεδρίας AMK, ενώ στα 240 λεπτά, παρέμενε μειωμένος κατά το 25,04% της αρχικής τιμής.

Το ποσοστό των NK κυττάρων μειώθηκε στατιστικά σημαντικά ($p<0,05$), μέχρι το τέλος της συνεδρίας.

Με βάση τα παραπάνω ευρήματα, είναι φανερό ότι ο υποπληθυσμός $CD14^+CD16^+$ των μονοκυττάρων παρουσίασε στατιστικά σημαντική μείωση στα πρώτα 30 λεπτά της συνεδρίας AMK, με όλες τις μεμβράνες της μελέτης. Ο μεγαλύτερος βαθμός μείωσης παρατηρήθηκε με τη χρήση της αιμοφάνης και ο μικρότερος με τη χρήση της AN69.

Συζήτηση

Οι περισσότερες μελέτες, προκειμένου να διερευνηθεί το φαινόμενο της βιοσυμβατότητας, εστιάζονται στις μεταβολές των πολυμορφοκυττάρων κατά τη διάρκεια της συνεδρίας αιμοκάθαρσης. Τα τελευταία χρόνια, όλο και μεγαλύτερη ερευνητική δραστηριότητα εστιάζεται στις ιδιαιτερότητες της λειτουργίας των μονοκυττάρων, όπως είναι η συμπεριφορά των μεμβρανικών τους δεικτών, η σχέση τους με την κινητική των κυτταροκινών κ.ά⁵. Υπάρχουν, μάλιστα, μελέτες που αναφέρουν ότι ο υποπληθυσμός $CD14^+CD16^+$ είναι αυτός που κυρίως απομακρύνεται από τη συστηματική κυκλοφορία¹⁰.

Δεν πρέπει να μας διαφεύγει το γεγονός ότι, στην εκτίμηση της βιοσυμβατότητας, εμφανίζονται τα εξής συγκεκριμένα προβλήματα: α) υπάρχουν πολλά συστήματα αξιολόγησης της βιοσυμβατότητας των μεμβρανών AMK και κάθε ένα απ' αυτά έχει τα μειονεκτήματά του, β) δεν υπάρχουν πολλές μελέτες που να συγκρίνουν μεγάλο αριθμό μεμβρανών μεταξύ τους, γ) για λόγους τεχνικούς, οι μελέτες αυτές δεν περιλαμβάνουν μεγάλο αριθμό

μό αρρώστων, δ) η εκτίμηση του φαινομένου της βιοσυμβατότητας και η επίδρασή του στην κλινική κατάσταση των ασθενών δεν είναι πλήρως κατανοητές και ε) ως φαινόμενο, η βιοσυμβατότητα δεν είναι μονοσήμαντη και επομένως, τα όποια συμπεράσματα, σε πολλές περιπτώσεις, ελέγχονται.

Η επαφή των στοιχείων του αίματος με τη μεμβράνη της αιμοκάθαρσης ενεργοποιεί τα μονοκύτταρα για να εκκρίνουν φλεγμονώδεις κυτταροκίνες, ενώ ο υποπληθυσμός $CD14^+CD16^+$ παρουσιάζει χαρακτηριστική ελάττωση στην περιφερική κυκλοφορία στα πρώτα λεπτά της αιμοκάθαρσης. Η ενεργοποίηση του συμπληρώματος και η παραγωγή των αναφυλατοξινών C3a και C5a, φαίνεται να έχουν σημαντικό ρόλο¹¹. Το φαινόμενο αυτό, όμως, δε μπορεί να ερμηνευθεί μόνον από τις παραπάνω διεργασίες, αφού υπάρχουν μελέτες που το περιγράφουν σε συνεδρίες AMK με συνθετικές μεμβράνες, οι οποίες, όπως είναι γνωστό, ενεργοποιούν πολύ λιγότερο το σύστημα του συμπληρώματος. Επιπρόσθετα, ο υποπληθυσμός $CD14^+CD16^+$ είναι λιγότερο ευαίσθητος στην επίδραση του συμπληρώματος, εξαιτίας του μικρότερου αριθμού υποδοχέων που φέρει (CD11b/CD18, CD35)^{12,13}.

Υπάρχουν δεδομένα, που δείχνουν ότι η παγίδευση των μονοκυττάρων στην πνευμονική κυκλοφορία σπάνια διαρκεί περισσότερο από το χρόνο ενεργοποίησης του συμπληρώματος (περίπου 120 λεπτά). Η παρατήρηση αυτή μπορεί, αρχικά, να δημιουργήσει την εντύπωση ότι το όλο φαινόμενο της παγίδευσης των μονοκυττάρων στην πνευμονική κυκλοφορία έχει μικρή συμβολή στη δημιουργία του φαινομένου της χρόνιας φλεγμονής. Το γεγονός, όμως, ότι τα μονοκύτταρα επιστρέφουν στη συστηματική κυκλοφορία με αυξημένη έκφραση των μορίων προσκόλλησης CD11b, CD11c και CD86 δείχνει ότι, το σύστημα ενεργοποίησης των μονοκυττάρων αποτελεί έναν από τους παράγοντες που ενέχονται στο φαινόμενο της χρόνιας φλεγμονής¹⁴.

Στη μελέτη μας, με βάση την κινητική των μονοκυττάρων $CD14^+CD16^+$, αξιολογήθηκαν οι εξής μεμβράνες AMK: 1) αιμοφάνη, 2) πολυμεθυλομετακρυλική (PMMA), 3) τριοξεική κυτταρίνη, 4) κουπροφάνη επικαλυπτόμενη με βιταμίνη E και 5) πολυακρυλονιτρίλη/νατριούχος μεθαυλοθειική (AN69). Ο αριθμός των μεμβρανών και ο αριθμός των αρρώστων που συμμετείχαν στη μελέτη ήταν δύο πολύ μεγάλα μεγέθη για τα δεδομένα της βιβλιογραφίας. Παρατηρήσαμε ότι ο υποπληθυσμός

των μονοκυττάρων $CD14^+CD16^+$ παγιδεύθηκε σημαντικά στα πρώτα 30 λεπτά της συνεδρίας με όλες τις μεμβράνες και ότι μέχρι το τέλος της συνεδρίας, αν και άρχισε να αυξάνεται, δεν έφθασε στα πριν από την έναρξη της συνεδρίας επίπεδα. Την ίδια παρατήρηση σε πολυαμίδη και πολυσουλφόνη επιβεβαίωσαν τα ευρήματα των Nockher και συν.¹⁵. Το γεγονός αυτό δε μπορεί να εξηγηθεί μόνο με την ενεργοποίηση του συμπληρώματος. Και αυτό γιατί, και στη δική μας και στην άλλη μελέτη, χρησιμοποιήθηκαν και συνθετικές μεμβράνες, οι οποίες, όπως είναι γνωστό, ενεργοποιούν λιγότερο το συμπλήρωμα, αλλά και γιατί, όπως έχει ήδη αναφερθεί, ο υποπληθυσμός των $CD14^+CD16^+$ κυττάρων επηρεάζεται πολύ λίγο από το σύστημα του συμπληρώματος^{15,16}. Μία εξήγηση για την αυξημένη ευαισθησία των $CD14^+CD16^+$ είναι ότι φέρουν στην επιφάνειά τους περιοχές με διαφορετικές πυκνότητες, οι οποίες εκφράζουν μόρια προσκόλλησης, που δε συναντάμε στον υπόλοιπο πληθυσμό των κυττάρων αυτών. Η μοναδικότητά τους αυτή εξηγεί την πιο έντονη και παρατεταμένη προσκόλληση και παγίδευσή τους στο ενδοθήλιο των αγγείων^{14,15,17}. Η παραπάνω θεωρία έχει αποδειχθεί σε πειραματικό επίπεδο από το 1998¹⁷. Συμπληρωματικά, άλλοι ερευνητές έχουν αναφερθεί και σε ενδοκρινολογικές διαταραχές, όπως τα επίπεδα των κατεχολαμινών και των γλυκοκορτικοστεροειδών στο αίμα των ασθενών, τα οποία είναι πιθανό να εμπλέκονται στην παγίδευση των $CD14^+CD16^+$ μονοκυττάρων στην πνευμονική κυκλοφορία^{15,18}.

Η ευαισθησία του $CD14^+CD16^+$ υποπληθυσμού των μονοκυττάρων ως δείκτη βιοσυμβατότητας των μεμβρανών AMK υποστηρίχθηκε και από τους Sester και συν¹⁰. Οι ερευνητές αυτοί ασχολήθηκαν με την κινητική των μονοκυττάρων κάτω από την επίδραση αιμοφάνης, πολυσουλφόνης, αιμοφάνης επικαλυπτόμενης με βιταμίνη E και πολυαμίδης. Τόσο η λιγότερο βιοσυμβατή αιμοφάνη, όσο και η πολύ πιο βιοσυμβατή πολυαμίδη, μέσα σε διάστημα 30 λεπτών από την έναρξη της συνεδρίας, απομάκρυναν το μεγαλύτερο ποσοστό των $CD14^+CD16^+$ μονοκυττάρων από την κυκλοφορία. Στην ίδια μελέτη, επισημάνθηκε, επίσης, ότι η απομάκρυνση του $CD14^+CD16^+$ υποπληθυσμού ήταν ομοιόμορφη και εντυπωσιακή για όλους τους ασθενείς και για όλες τις μεμβράνες της μελέτης σε σχέση με το σύνολο των μονοκυττάρων. Οι παρατηρήσεις αυτές συμφωνούν και με τα δικά μας ευρήματα.

Εξάλλου, οι Kawanaka και συν.¹⁹, με κριτήριο τον υποπληθυσμό CD14⁺CD16⁺ των μονοκυττάρων, συνέκριναν την αναγεννημένη κυτταρίνη με την πολυσουλφόνη. Η παγίδευση στην πνευμονική κυκλοφορία παρατηρήθηκε και στις δύο μεμβράνες, αλλά σε μικρότερο βαθμό στην πολυσουλφόνη.

Φαίνεται, όμως, ότι τα μόρια προσκόλλησης των λευκών αιμοσφαιρίων CD11/CD18 έχουν σημαντικό ρόλο στη λειτουργία τόσο των πολυμορφοκυττάρων όσο και των μονοκυττάρων στη διαδικασία της χρόνιας φλεγμονής. Υπάρχουν δεδομένα, που εστιάζονται στο ρόλο της L-σελεκτίνης και στην αλλαγή του σχήματος των πολυμορφοκυττάρων, ως φαινόμενα που εμπλέκονται στη διαδικασία των ουδετεροφίλων να μεταναστεύουν και να προσκολληθούν στα αγγεία του ενδοθηλίου²⁰. Πειραματικά δεδομένα καταδεικνύουν ότι, σε ασθενείς σε AMK με μη βιοσυμβατές μεμβράνες, η παραπάνω διαδικασία παρατηρείται και στα μονοπύρνα^{15,20}. Συγκεκριμένα, η L-σελεκτίνη, ως βασικός παράγοντας για την προσκόλληση των μονοκυττάρων στο ενδοθήλιο, εκφράζεται σε μεγαλύτερο βαθμό στα μονοκύτταρα ασθενών που υποβάλλονται σε AMK με κουπροφάνη σε σχέση με αυτούς που υποβάλλονται σε AMK με πολυσουλφόνη.

Συνδέοντας τα εισαγωγικά μας στοιχεία με τα ευρήματα της μελέτης μας αλλά και άλλων μελετών, θα λέγαμε ότι ο υποπληθυσμός CD14⁺CD16⁺ των μονοκυττάρων αποτελεί έναν πιο αυθεντικό δείκτη τοπικής φλεγμονής, που είναι στην ουσία η κλινική έκφραση της βιοσυμβατότητας, από τους άλλους υποπληθυσμούς των μονοκυττάρων. Ας μη ξεχνάμε ότι, το θέμα της βιοσυμβατότητας μπορεί να διαχωριστεί σε δύο ειδών αλληλεπιδράσεις: α) την αλληλεπίδραση αίματος και μεμβράνης στο σύστημα εξωσωματικής κυκλοφορίας και β) την αλληλεπίδραση αίματος και ενδοθηλίου. Ο διαχωρισμός αυτός υπενθυμίζει το ότι μόνον όταν η αλληλεπίδραση αίματος και ενδοθηλίου διαταραχθεί, γίνονται αντιληπτές οι όποιες διαταραχές από την αλληλεπίδραση αίματος και μεμβράνης αιμοκάθαρσης. Ο υποπληθυσμός CD14⁺CD16⁺ των μονοκυττάρων διαφέρει ως προς την έκφραση των μορίων προσκόλλησης από τα υπόλοιπα μονοκύτταρα: χαμηλότερα επίπεδα CD11b, CD33 και CD64 και υψηλότερα επίπεδα MHC class II, VLA-4 και ICAM-1¹⁵. Τα κύτταρα αυτά παράγουν IL-1 και TNF, ενώ δεν παράγουν την αντιφλεγμονώδη IL-10. Το παραπάνω ανοσολογικό προφίλ των CD14⁺CD16⁺ τους προσδίδει τη δυνατότητα να μεταναστεύουν στους ιστούς και να προσκολλώνται στο ενδοθήλιο σε πολύ μεγά-

λο βαθμό.

Οι παραπάνω παρατηρήσεις αναπόφευκτα μας οδηγούν στο συμπέρασμα ότι ο υποπληθυσμός CD14⁺CD16⁺ των μονοκυττάρων μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως περισσότερο ακριβές κριτήριο από το σύστημα του συμπληρώματος, για την αξιολόγηση της βιοσυμβατότητας των μεμβρανών AMK. Μεμβράνες που, με το σημερινό σύστημα αξιολόγησης, φαίνονται πιο «φιλικές» προς το χρήστη, με ένα πιο αξιόπιστο κριτήριο, αποκαλύπτουν τις αδυναμίες τους και ανοίγουν το δρόμο για την κατασκευή πραγματικά περισσότερο βιοσυμβατών μεμβρανών.

Αιμοφάνη

Αξιολογώντας την αιμοφάνη, την κουπροφάνη και την ανασυνδυασμένη κυτταρίνη, με κριτήριο το βαθμό ενεργοποίησης του συμπληρώματος και τα επίπεδα της IL-1, οι Varela και συν.²¹ διαπίστωσαν ότι η ανασυνδυασμένη κυτταρίνη είναι περισσότερο βιοσυμβατή μεμβράνη από την αιμοφάνη και την κουπροφάνη, εύρημα που συμφωνεί και με τις δικές μας παρατηρήσεις. Οι δύο τελευταίες μεμβράνες δεν παρουσίασαν στατιστικά σημαντική διαφορά ως προς το βαθμό ενεργοποίησης του συμπληρώματος. Οι Skroeder και συν.²², μελετώντας αιμοφάνη, κουπροφάνη και πολυαμίδη, με βάση το συμπλήρωμα και το βαθμό παγίδευσης των λευκών αιμοσφαιρίων στην πνευμονική κυκλοφορία, κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η βιοσυμβατότητα επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες, που καθιστούν τη μελέτη της εξαιρετικά δύσκολη για κάθε άρρωστο. Αξίζει να σημειωθεί ότι, ήδη από το 1991, οι Kjellstrand και συν.²³ έχουν χαρακτηρίσει το φαινόμενο της παγίδευσης των λευκών αιμοσφαιρίων στην πνευμονική κυκλοφορία ως όχι ιδιαίτερα ευαίσθητο και αξιόπιστο δείκτη για την εκτίμηση της βιοσυμβατότητας των μεμβρανών αιμοκάθαρσης. Σύμφωνα με τους παραπάνω ερευνητές, η απομάκρυνση των λευκών αιμοσφαιρίων από τη συστηματική κυκλοφορία δεν επηρεάζεται μόνον από χημικούς παράγοντες, που συσχετίζονται με το υλικό της μεμβράνης, αλλά και από μηχανικούς παράγοντες, που αφορούν το σχεδιασμό της κατασκευής της. Τα δικά μας ευρήματα από όλες τις μεμβράνες, όπου η συμπεριφορά του CD14⁺CD16⁺ υποπληθυσμού των μονοκυττάρων δεν ακολουθούσε πάντα την κινητική του ολικού αριθμού των λευκών αιμοσφαιρίων αλλά και των μονοκυττάρων, συμφωνεί με την παραπάνω παρατήρηση. Όπως φάνηκε στη μελέτη μας, η ιδιαίτερη

κινητική των CD14⁺CD16⁺ σε κάθε άρρωστο με ξεχωριστή μεμβράνη επιβεβαιώνει το ότι τα εξατομικευμένα χαρακτηριστικά κάθε συνεδρίας και κάθε αρρώστου συμμετέχουν με μοναδικό και ιδιαίτερο τρόπο στο φαινόμενο της βιοσυμβατότητας.

Σε πρόσφατη μελέτη τους, οι Petrovic και συν.²⁴ εκτίμησαν τη βιοσυμβατότητα της αιμοφάνης, της αναγεννημένης κυτταρίνης και της πολυακρυλονιτρίλης, με βάση το βαθμό ενεργοποίησης του συμπληρώματος, και τοποθέτησαν την αιμοφάνη και την τριοξεική κυτταρίνη στα ίδια επίπεδα. Η καλύτερη βιοσυμβατότητα της πολυακρυλονιτρίλης επιβεβαιώθηκε και από αυτούς τους ερευνητές.

PMMA

Οι Memoli και συν.²⁵, συγκρίνοντας το PMMA με την κουπροφάνη, με βάση το ρυθμό παραγωγής ιντερλευκινών από τα μονοκύτταρα, απέδειξαν την καλύτερη βιοσυμβατότητα του PMMA. Οι Niwa και συν.²⁶ συνέκριναν την πολυακρυλονιτρίλη, το PMMA και την αναγεννημένη κυτταρίνη, με βάση το ρυθμό παραγωγής IL-8 από τα μονοκύτταρα. Στη μελέτη αυτή, η πολυακρυλονιτρίλη εμφάνισε την καλύτερη βιοσυμβατότητα, παρατήρηση που συμφωνεί και με τα δικά μας ευρήματα. Ακολουθούσε το PMMA και, στη συνέχεια, η αναγεννημένη κυτταρίνη. Οι περισσότερες μελέτες τοποθετούν το PMMA σε καλύτερη θέση από την τριοξεική κυτταρίνη στην κλίμακα αξιολόγησης της βιοσυμβατότητας²⁷.

Άλλοι ερευνητές, χρησιμοποιώντας την κυτταρομετρία ροής, παρατήρησαν ότι διαταραχές της κυτταρικής ανοσίας, ως πιθανώς πιο ευαίσθητος δείκτης βιοσυμβατότητας, εμφανίζονταν σε όλους τους τύπους των μεμβρανών αιμοκάθαρσης (PMMA, πολυσουλφόνη, τριοξεική κυτταρίνη, πολυακρυλονιτρίλη, κουπροφάνη)^{15,28}. Η βασική αρχή αυτού του συμπεράσματος συμφωνεί και με τα δικά μας ευρήματα.

Τριοξεική κυτταρίνη

Όλες οι μελέτες δε συγκλίνουν στα ίδια συμπεράσματα, γιατί το κριτήριο αξιολόγησης δεν είναι πάντα το ίδιο, αλλά και γιατί υπάρχουν διάφοροι περιορισμοί, στους οποίους έχουμε αναφερθεί παραπάνω. Οι Schaefer και συν.²⁹, σε αντίθεση με τα παραπάνω ευρήματα, δε διαπίστωσαν διαφορά στη βιοσυμβατότητα μεταξύ PMMA και τριοξεικής (αναγεννημένης) κυτταρίνης.

Η βιοσυμβατότητα των αναγεννημένων κυτ-

ταρινών έχει προκαλέσει το ενδιαφέρον των ερευνητών. Οι Bonomini και συν.³⁰ απέδειξαν ότι η αντικατάσταση των υδροξυλικών ομάδων βελτιώνει τη βιοσυμβατότητα της μεμβράνης, αλλά μόνη της δεν είναι αρκετή. Η δομή και το μοντέλο κατασκευής του φίλτρου φαίνεται να έχουν, επίσης, σημαντικό ρόλο. Συγκεκριμένα, η σύγκριση κουπροφάνης, αιμοφάνης, οξεικής και τριοξεικής κυτταρίνης, όπου ο βαθμός αντικατάστασης των υδροξυλικών ομάδων ποικίλλει από 1% έως 80%, απέδειξε ότι ο αριθμός των υδροξυλικών ομάδων δε συσχετίζεται σημαντικά με τη βιοσυμβατότητα. Φαίνεται ότι οι υδροξυλικές ομάδες διαφέρουν ποιοτικά, με αποτέλεσμα να επιδρούν με διαφορετικό τρόπο η κάθε μία στο φαινόμενο της βιοσυμβατότητας.

Η βελτίωση που προσφέρεται με τη μεμβράνη από αναγεννημένη κυτταρίνη επιβεβαιώνεται από βιβλιογραφικά δεδομένα, που της αποδίδουν βιοσυμβατότητα ανάλογη με εκείνη της πολυσουλφόνης³¹.

Κουπροφάνη επικαλυπτόμενη με βιταμίνη E

Η μεμβράνη κουπροφάνης που επικαλύπτεται με βιταμίνη E αποτελεί μία σχετικά νέα προσέγγιση περισσότερο βιοσυμβατής μεμβράνης. Τα βιβλιογραφικά δεδομένα της προσδίδουν πολύ καλές επιδόσεις. Οι Girdnt και συν.³², στην πιο σημαντική αξιολόγησή της, τη συνέκριναν με την αιμοφάνη και την πολυαμίδη, με βάση το ρυθμό παραγωγής ιντερλευκινών. Στη μελέτη αυτή, η μεμβράνη, αν και έχει ως βασικό υλικό την κουπροφάνη, εμφανίζεται πιο βιοσυμβατή από την αιμοφάνη και με παρόμοια επίδοση με την πολυαμίδη. Αντίστοιχα, τα δικά μας ευρήματα τοποθετούν τη μεμβράνη κουπροφάνης που επικαλύπτεται με βιταμίνη E ανάμεσα στην αιμοφάνη και τις συνθετικές μεμβράνες.

Οι Senatore και συν.³³ προχώρησαν ακόμα περισσότερο και διαπίστωσαν ότι, εκτιμώντας τόσο την απόδοση όσο και την βιοσυμβατότητά της, με βάση το συμπλήρωμα C3 και την ενεργοποίηση των πολυμορφοκυττάρων, η μεμβράνη κουπροφάνης που επικαλύπτεται με βιταμίνη E αποδεικνύεται καλύτερη τόσο από την πολυσουλφόνη, όσο και από την πολυακρυλονιτρίλη.

Πολυακρυλονιτρίλη/νατριούχος μεθαυλοθειική (AN69)

Γίνεται φανερό από τις παραπάνω μελέτες ότι, στις περισσότερες περιπτώσεις, η AN69 έχει

την καλύτερη βιοσυμβατότητα σε σύγκριση τόσο με τις συνθετικές όσο και με τις μη συνθετικές μεμβράνες. Το συμπέρασμα αυτό είναι ανεξάρτητο από το κριτήριο, με το οποίο αξιολογείται η βιοσυμβατότητα των μεμβρανών AMK⁶.

Το πολυμερές της μεμβράνης είναι υδρόφοβο και λιπόφιλο. Τα υλικά που τη συνθέτουν δημιουργούν μια «αφρώδη κατασκευή (foam-liked structure)», με διακριτές και ξεχωριστές περιοχές νερού και πολυμερούς. Η παραπάνω δομική κατασκευή έχει ανοσολογικά αδρανή χαρακτήρα, γεγονός που περιορίζει στο ελάχιστο την ενεργοποίηση του συμπληρώματος. Η AN69 έχει αυξημένη πολικότητα, που της προσδίδει επίσης μεγάλη ικανότητα απορρόφησης πρωτεϊνών. Ειδικότερα, η AN69 έχει πολύ χαμηλό βαθμό κρυσταλλικότητας, σε αντίθεση με την κυτταρίνη που φαίνεται να έχει το μεγαλύτερο. Είναι η μεμβράνη με το μεγαλύτερο αριθμό ιοντικών ομάδων, δε δημιουργεί καθόλου δεσμούς υδρογόνου, ενώ συγκαταλέγεται μεταξύ των μεμβρανών με αυξημένη πολικότητα και εκσεσημασμένη υδροφοβία³⁴.

Οι Jankowski και συν.³⁵, μελετώντας την ενδοκυττάρια συγκέντρωση του διαδενοσικού πενταφωσφορικού [diadenosine pentaphosphate, (Ap(5) A), ενός υδρόφιλου ανιόντος με χαμηλό μοριακό βάρος, που αθροίζεται συνήθως στα αιμοπετάλια και αυξάνεται με την ενεργοποίησή τους, απέδειξαν ότι η AN69 έχει βιοσυμβατότητα καλύτερη από εκείνη της πολυσουλφόνης. Οι David και συν.³⁶, αξιολογώντας το βαθμό ενεργοποίησης των μονοκυττάρων, τοποθέτησαν την AN69 σε καλύτερα επίπεδα βιοσυμβατότητας από την αναγεννημένη κυτταρίνη.

Φυσικά κυτταροκτόνα κύτταρα

Τα φυσικά κυτταροκτόνα κύτταρα (natural killer cells, NK) αποτελούν υποπληθυσμό των T-κυττάρων. Τα καθοριστικά στοιχεία ενός NK κυττάρου είναι ότι φέρει στην επιφάνειά του T-κυτταρικούς υποδοχείς (TCR), καθώς και μόρια-δείκτες των NK κυττάρων, όπως το CD161 και το CD122, και έχει τη δυνατότητα να παράγει κυτταροκίνες, κυρίως IL-4 και IFN- γ . Διαταραχή της φυσιολογικής κατανομής των NK κυττάρων του περιφερικού αίματος ή επηρεασμένη κυτταροτοξική δραστηριότητά τους έχει αναφερθεί σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις, όπως ο καρκίνος, οι λοιμώξεις και τα αυτοάνοσα νοσήματα³⁷.

Σε αιμοκαθαριζόμενους ασθενείς, ο αριθμός

των κυκλοφορούντων λεμφοκυττάρων είναι γενικά ελαττωμένος, ενώ έχει αναφερθεί η συνύπαρξη λειτουργικής ανεπάρκειας και σημείων ενεργοποίησης των κυττάρων³⁸.

Στην μελέτη μας, τα NK κύτταρα μειώθηκαν στατιστικά σημαντικά κατά τη συνεδρία AMK με όλες τις μεμβράνες. Ήδη από το 1987, οι Kay και συν.³⁹ έχουν αναφέρει το φαινόμενο, μελετώντας τη μεμβράνη από κουπρασμώνιο. Και άλλες μελέτες συνηγορούν στο ίδιο συμπέρασμα, τονίζοντας την ελαττωμένη κυτταρολυτική δραστηριότητα των NK κυττάρων, ιδιαίτερα στις μη συνθετικές μεμβράνες. Το 1993, σε μελέτη *in vitro*³⁷, αποδείχθηκε η ελαττωμένη κυτταρολυτική δραστηριότητα των NK κυττάρων σε καταστάσεις ανοσοανεπάρκειας, όπως είναι η χρόνια νεφρική ανεπάρκεια. Η δραστηριότητα αυτή μειώνεται ακόμα περισσότερο από τη χρόνια χρήση λιγότερο βιοσυμβατών μεμβρανών.

Σε άλλη μελέτη διαπιστώθηκε ότι, η ελάττωση του αριθμού των NK κυττάρων είναι πιο εντυπωσιακή όταν χρησιμοποιείται κουπροφάνη στη θέση της πολυσουλφόνης. Οι ερευνητές προτείνουν τη μέτρηση των NK κυττάρων 15 λεπτά μετά την έναρξη της συνεδρίας ως δείκτη βιοσυμβατότητας⁴⁰.

Δε λείπουν, βέβαια, και οι μελέτες, όπου τα συμπεράσματα είναι αντικρουόμενα^{41,42}. Έχει αναφερθεί ότι τα NK κύτταρα σε αιμοκαθαριζόμενους ασθενείς είναι φυσιολογικά ή και αυξημένα. Οι περισσότερες αναφορές συγκλίνουν στην άποψη του αυξημένου αριθμού NK κυττάρων σε ασθενείς υπό αιμοκάθαρση. Ακόμα όμως και σε αυτή την περίπτωση, οι ερευνητές έχουν επισημάνει το ρόλο της μεμβράνης της αιμοκάθαρσης. Η συνεδρία με κουπροφάνη επιτείνει το φαινόμενο της ανώμαλης κατανομής των NK κυττάρων. Παράλληλα, η κυτταροτοξική τους δραστηριότητα ελαττώνεται σημαντικά με λιγότερο βιοσυμβατές μεμβράνες.

Είναι χαρακτηριστικό ότι οι Bonomini και συν.⁴³, χρησιμοποιώντας την κυτταρομετρία ροής για να διαπιστώσουν το βαθμό ενεργοποίησης της κυτταρικής ανοσίας ανάλογα με το υλικό της μεμβράνης AMK, επιβεβαίωσαν τη δυσκολία αυτής της ταξινόμησης των μεμβρανών με βάση τη βιοσυμβατότητά τους. Οι κυτταρικοί μηχανισμοί ενεργοποιούνται με όλους τους τύπους των μεμβρανών⁴⁴. Οι συνθετικές θεωρούνται και με αυτό το κριτήριο περισσότερο βιοσυμβατές, ενώ οι μεμβράνες από αναγεννημένη κυτταρίνη είναι

σαφώς περισσότερο βιοσυμβατές από τα φυσικά πολυμερή.

Κατά τη διάρκεια των τελευταίων ετών οι τεχνολογικοί νεωτερισμοί έχουν βελτιώσει τη βιοσυμβατότητα των μεμβρανών ΑΜΚ. Έρευνες τόσο σε πειραματικό όσο και σε κλινικό επίπεδο έχουν βοηθήσει στην καλύτερη κατανόηση των φαινομένων που παρατηρούνται από την αλληλεπίδραση στοιχείων του αίματος με το υλικό της μεμβράνης. Η πρόοδος όμως αυτή έχει περιπλέξει τα κριτήρια αξιολόγησης σε πολλές περιπτώσεις. Μέσα από την πολυπλοκότητα όλων των μηχανισμών που αναφέραμε γίνεται κατανοητό ότι η βιοσυμβατότητα αξιολογείται επαρκώς μελετώντας την κινητική του υποπληθυσμού CD14⁺CD16⁺ των μονοκυττάρων. Υποπληθυσμός ο οποίος αποτελεί έναν πολύ ευαίσθητο δείκτη κυτταρικής ενεργοποίησης και μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως περισσότερο ακριβές κριτήριο από το σύστημα του συμπληρώματος, για την αξιολόγηση της βιοσυμβατότητας των μεμβρανών αιμοκάθαρσης.

Summary

I. Griveas, P. Pasadakis, A. Fleva, H. Thodis, G. Vissardis, A. Pavlitou, V. Vargemzis, †G. Sakellariou. **Biocompatibility study based on differential sequestration kinetics of CD14⁺CD16⁺ blood monocyte subsets with different dialyzers.** *Hellen Nephrol* 2008; 20 (1): 67-79.

Aim: Blood-membrane contact leads to an increased cellular activation and sequestration into the capillary bed of the lung. The influence of the sequestration on the number of mature monocytes was studied by analyzing the fate of monocytes and particularly of the CD14⁺CD16⁺ subpopulation during haemodialysis (HD) treatment.

Patients – Methods: In 30 stable haemodialysis (HD) patients, the distinct cell populations were determined by differential blood counts and 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, 30 minutes thereafter and at the end of HD session, using every time a different dialyzer: haemophan, methylmethacrylate (PMMA), triacetate membrane, cuprophan/vitamin E, acrylonitrile and sodium methallylsulfonate polymer (AN69).

Results: The CD14⁺CD16⁺ subset decreased at 30 minutes and remained suppressed during the

course of dialysis. The decrease from the first 30 minutes till the end of HD treatment was significant ($p < 0.05$), very uniform and sharp in all patients and was, also, independent of membrane type.

Conclusions: In conclusion, the CD14⁺CD16⁺ monocyte subpopulation showed increased and longer margination from the blood circulation during HD. Given the fact that CD14⁺CD16⁺ monocytes represent a sensitive marker for cellular activation, depletion of these cells may offer an easily accessible parameter for biocompatibility studies.

Key words: *Biocompatibility, dialyzers, CD14⁺CD16⁺ monocytes.*

Βιβλιογραφία

1. *Kaplow LS, Goffinet JA.* Profound neutropenia during the early phase of hemodialysis. *JAMA* 1968; 203: 1135-1137.
2. *Graddock PR, Freh J, Dalmaso AP, Grighm KL, Jacobs HS.* Hemodialysis leukopenia: pulmonary vascular leukostasis resulting from complement activation by dialyzer cellophane membranes. *J Clin Invest* 1977; 59: 879-888.
3. *Stuard S, Carreno M-P, Poinet J-L, Albertazzi A, Haeflner-Cavaillon N.* A major role for CD62P/CD15s interaction in leukocyte margination during hemodialysis. *Kidney Int* 1995; 48: 93-102.
4. *Kaupke CJ, Zhang J, Cesario T, Yoursefi S, Akeel N, Vaziri ND.* Effect of hemodialysis on leukocyte adhesion receptor expression. *Am J Kidney Dis* 1996; 27: 244-252.
5. *Tabor B, Geissler B, Odell R, Schmidt B, Blumenstein K.* Dialysis neutropenia. The role of the cytoskeleton. *Kidney Int* 1998; 53: 783-789.
6. *Combe C, Pourteim M, de Precigout V, et al.* Granulocyte activation and adhesion molecules during hemodialysis with cuprophan and a high flux biocompatible membrane. *Am J Kidney Dis* 1994; 24: 437-442.
7. *Passlick B, Flieger D, Ziegler-Heitbrock HWL.* Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood. *Blood* 1989; 74: 2527-2534.
8. *Ziegler-Heitbrock HWL.* Heterogeneity of human blood monocytes: the CD14⁺CD16⁺ subpopulation. *Immunol Today* 1996; 17: 424-428.
9. *Ziegler-Heitbrock HWL, Fingerle G, Strobel M, et al.* The novel subset of CD14⁺CD16⁺ blood monocytes exhibit features of tissue macrophages. *Eur J Immunol* 1993; 23: 2053-2058.
10. *Sester U, Sester M, Kaul H, Girndt M, Kohler H.* Strong depletion of CD14⁺CD16⁺ monocytes during haemodialysis treatment. *Nephrol Dial Transplant* 2001; 16: 1402-1408.
11. *Ando M, Lundkvist I, Bergstrom J, Lindholm B.* Enhanced scavenger receptor expression in monocyte-macrophages in dialysis patients. *Kidney Int* 1996; 49: 773-780.

12. Mege JL, Capo C, Purgus R, Olmer M. Monocyte production of transforming growth factor beta in long-term hemodialysis: modulation by hemodialysis membranes. *Am J Kidney Dis* 1996; 28: 395-399.
13. Girndt M, Sester U, Kaul H, Koehler H. Production of proinflammatory and regulatory monokines in hemodialysis patients shown at a single-cell level. *J Am Soc Nephrol* 1998; 9: 1689-1696.
14. Gibbons RAS, Martinez OM, Garovoy MR. Altered monocyte function in uremia. *Clin Immunol Immunopathol* 1990; 56: 66-80.
15. Nockher WA, Wiemer J, Scherberich JE. Haemodialysis monocytopenia: differential sequestration kinetics of CD14⁺CD16⁺ and CD14⁺ blood monocyte subsets. *Clin Exp Immunol* 2001; 123: 49-55.
16. Toren M, Goffinet JA, Kaplow LS. Pulmonary bed sequestration of neutrophils during hemodialysis. *Blood* 1970; 36: 337-340.
17. Steppich B, Ziegler-Heirtbrock HWL. Preferential localization of CD14⁺CD16⁺ monocytes in the marginal pool. *Immunobiology* 1998; 199: 555.
18. Steppich B, Dayyani F, Gruber R, Lorenz R, Mack M, Ziegler-Heirtbrock HWL. Selective mobilization of CD14⁺CD16⁺ monocytes by exercise. *Am J Physiol Cell Physiol* 2000; 279: C578-C586.
19. Kawanaka N, Nagake Y, Yamamura M, Makino H. Expression of Fc Gamma Receptor III (CD16) on monocytes during hemodialysis in patients with chronic renal failure. *Nephron* 2002; 90: 64-71.
20. Kawabata K, Nagake Y, Shikata K, Makino H, Ota Z. The changes of Mac-1 and L-selectin expression on granulocytes and soluble L-selectin level during hemodialysis. *Nephron* 1996; 73: 573-579.
21. Varella MP, Kimmel PL, Phillips TM, Mishkin GL, Lew SQ, Bosch JP. Biocompatibility of hemodialysis membranes: interrelations between plasma complement and cytokine levels. *Blood Purif* 2001; 19: 370-379.
22. Skroeder NR, Kjellstrand P, Holmquist B, Kjellstrand CM, Jacobson SH. Individual differences in biocompatibility responses to hemodialysis. *Int J Artif Organs* 1994; 17: 521-530.
23. Kjellstrand P, Okmark P, Odselius R, Thysell H, Riede G, Holmquist B. Adherence of blood cells to dialyzer membranes as a measure of biocompatibility. *Int J Artif Organs* 1991; 14: 698-702.
24. Germin Petrovic D. Comparison of biocompatibility of hemophane, cellulose diacetate and acrylonitrile membranes in hemodialysis. *Acta Med Croatica* 2004; 58: 31-36.
25. Memoli B, Postiglione L, Cianciaruso B, et al. Role of different dialysis membranes in the release of interleukin-6-soluble receptor in uremic patients. *Kidney Int* 2000; 58: 417-424.
26. Niwa T, Miyazaki T, Sato M, et al. Interleukin 8 and biocompatibility of dialysis membranes. *Am J Nephrol* 1995; 15: 181-185.
27. Bergesio F, Monzani G, Manescalchi F, Boccabianca I, Passaleva A, Frizzi V. Leukocytes, eosinophils and complement function during hemodialysis with polysulphone and polymethylmethacrylate membranes: comparison with cuprophane and polyacrylonitrile. *Blood Purif* 1988; 6: 16-26.
28. Castiglione A, Pagliaro P, Romagnoni M, et al. Flow cytometric analysis of leukocytes eluted from haemodialysers. *Nephrol Dial Transplant* 1991; 6: 31-35.
29. Schaefer RM, Huber L, Gilge U, Bausewein K, Vienken J, Heidland A. Clinical evaluation of a new high-flux cellulose acetate membrane. *Int J Artif Organs* 1989; 12: 85-90.
30. Bonomini M, Siroli V, Settefrati N, et al. Surface antigen expression and platelet neutrophil interactions in haemodialysis. *Blood Purif* 1999; 17: 107-117.
31. Putz D, Barnas U, Luger A, Mayer G, Woloszczuk W, Graf H. Biocompatibility of high-flux membranes. *Int J Artif Organs* 1992; 15: 456-460.
32. Girndt M, Lengler S, Kul H, Sester U, Sester M, Kohler H. Prospective crossover trial of the influence of vitamin E-coated dialyzer membranes on T-cell activation and cytokine induction. *Am J Kidney Dis* 2000; 35: 95-104.
33. Senatore M, Nicoletti A, Rizzuto G. Is the bioreactivity of vitamin-E-modified dialyzer an expression of increased plasmatic vitamin E concentration? *Nephron* 2002; 92: 487-489.
34. Berland Y, Brunet P, Dussol P. Ultrafiltration and depurative parameters. In: Bononini V, Berland Y, eds. *Dialysis Membranes: Structures and Predictions*. Contrib Nephrol. Basel: Karger, 1995: 113: 45-59.
35. Jankowski J, Schluter H, Henning L, et al. The AN69 hemofiltration membrane has a decreasing effect on the intracellular diadenosine pentaphosphate concentration of platelets. *Kidney Blood Press Res* 2003; 26: 50-54.
36. David S, Tetta C, Camussi G, et al. Adherence of human monocytes to haemodialysis membranes. *Nephrol Dial Transplant* 1993; 8: 1223-1227.
37. Zaoui P, Hakim R. Natural killer cell function in hemodialysis patients: effect of the dialysis membrane. *Kidney Int* 1993; 43: 1298-1305.
38. Grooteman MPC, Nube MJ, van Limbeek J, Schoorl M, van Houte AJ. Lymphocyte subsets in dialyzer eluates: a new parameter of biocompatibility? *Nephrol Dial Transplant* 1996; 11: 1073-1078.
39. Kay NE, Raij L. Differential effect of hemodialysis membranes on human lymphocyte natural killer function. *Artif Organs* 1987; 11: 165-167.
40. Liszka M, Moszczulski D, Zukowska-Szczzechowska E, Grzeszczak W, Religa Z. The effect of repeated use of cuprophane and polysulfone dialyzers during hemodialysis on the count of natural killer cells in blood. *Pol Arch Med Wew* 1997; 97: 224-231.
41. Charpentier B, Lang PH, Martin B, Moury J, Mathieu D, Freis D. Depressed polymorphonuclear leucocyte functions associated with normal cytotoxic functions of T and natural killer cells: during chronic hemodialysis. *Clin Nephrol* 1983; 19: 288-294.
42. Pisa P, Jira M, Horry J, Strejcek J, Valek A. Depression in spontaneous cell-mediated cytotoxicity occurs during hemodialysis. *Clin Nephrol* 1987; 27: 289-292.
43. Stefoni S, Nanni-Costa A, Buscaroli A, et al. Cellular im-

munology in regular dialysis: a biological model for biocompatibility evaluation. *Nephrol Dial Transplant* 1991; 6: 4-9.

44. Griveas I, Visvardis G, Fleva A, et al. Comparative analysis of immunophenotypic abnormalities in cellular immunity of uremic patients undergoing either hemodialysis or continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Ren Fail* 2005; 27: 279-282.

* Παρελήφθη στις 12/12/06.

Έγινε αποδεκτή μετά από τροποποιήσεις στις 1/7/07.

Αλληλογραφία:

Ι. Γριβέας

Γορτυνίας 12

Πάτημα Χαλανδρίου

152 38 Αθήνα

Fax: 21060 17832

Κιν. 6932379323

e-mail: giannisgriv@hotmail.com