

血液透析器中空纤维体外血液相容性的评价*

许建霞, 奚廷斐

In vitro hemocompatibility of hollow fiber in hemodialyzer

Xu Jian-xia, Xi Ting-fei

Abstract

BACKGROUND: The hollow fiber in hemodialyzer has a large-scale and long-time contact with the blood of the renal dialysis patients. The evaluation of the hollow fiber's hemocompatibility is very important.

OBJECTIVE: The evaluation method of *in vitro* hemocompatibility of the hemodialyzer was primarily established by twice evaluating hollow fiber's hemocompatibility in a hemodialyzer.

METHODS: The hollow fiber of the sample hemodialyzer was cut into 3-cm length, and 100 hollow fibers were put into the silicified glass tube as a sample. In this experiment, the sample hemodialyzer was tested twice with two different commercially available hemodialyzers as controls. The similar surface-area hollow fiber of the control hemodialyzers was disposed in the same way. 1.2 mL fresh human blood was added into every silicified glass tube, then all tubes was put onto the slightly sloping rotary incubator at 37 °C and rotated at the speed of 30 r/min for 30 minutes. Finally, the blood in all silicified glass tubes was detected for blood cell analysis, coagulation analysis and serum total complements activity determination respectively.

RESULTS AND CONCLUSION: Different parameters exhibited significant differences between the sample hollow fiber and two control hollow fibers. But the remarkable consume of fibrinogen and platelet was similar in the two tests, and the “[(parameter of sample-parameter of control)/parameter of control ×100%]” was far greater than 15%. So the difference on the hemocompatibility between the sample hollow fiber and control hollow fibers is not acceptable, which indicates that the *in vitro* hemocompatibility evaluation method has a good reproducibility.

National Institute for the Control of Pharmaceutical and Biological Products, Beijing 100050, China

Xu Jian-xia ★, Master, Assistant investigator, National Institute for the Control of Pharmaceutical and Biological Products, Beijing 100050, China
xujianxia@nicpbp.org.cn

Received: 2010-06-09
Accepted: 2010-07-16

Xu JX, Xi TF. In vitro hemocompatibility of hollow fiber in hemodialyzer. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2010;14(38): 7091-7094. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景: 血液透析器中的中空纤维与肾透析患者的血液有大面积长时间的接触, 对其进行血液相容性评价尤为重要。

目的: 通过对一种透析器中空纤维血液相容性的 2 次评价, 拟初步建立透析器体外血液相容性评价的方法。

方法: 将样品透析器中的中空纤维截为 3 cm 长, 取 100 根置于硅化玻璃管中, 作为一个样品。两次评价试验中, 选用不同的已经上市的血液透析器的中空纤维作为对照, 对照中空纤维取与样品中空纤维相近表面积的数量, 同样处理。每个硅化玻璃管中加入新鲜全血 1.2 mL, 放在置于 37 °C 隔水培养箱的略倾斜的旋转培养器上, 以 30 r/min 的速率旋转。30 min 后取各硅化玻璃管中的全血, 用于血细胞分析、凝血分析及血清总补体的检测。

结果与结论: 与两个对照透析器中空纤维相比, 样品透析器中空纤维在不同指标上显示出一定差异, 但样品透析器对纤维蛋白原和小板的巨大消耗作用在 2 次试验中均有充分体现, 且与对照参数差值的绝对值相对于对照参数的百分比远大于 15%, 可以认为样品透析器中空纤维与对照透析器中空纤维之间血液相容性的差异不被接受, 说明实验中所使用的体外血液相容性评价方法具有很好的重现性。

关键词: 血液透析器; 中空纤维; 体外评价; 方法; 血液相容性

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2010.38.015

许建霞, 奚廷斐. 血液透析器中空纤维体外血液相容性的评价[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(38):7091-7094. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

0 引言

血液透析器中的中空纤维与肾透析患者的血液有大面积长时间的接触, 对其进行血液相容性评价具有非常重要的意义。体外血液相容性评价常用于对透析器中空纤维进行初筛, 但在国内, 生物材料及器械体外血液相容性评价多局限于血小板黏附、蛋白黏附、体外动态凝血时间及溶血这几方面。

实验通过对一种透析器中空纤维血液相容性的两次评价, 拟初步建立透析器体外血液相容性评价的方法。

1 材料和方法

设计: 开放性实验。

时间及地点: 于 2007-12/2008-03 在中国药品生物制品检定所医疗器械检验中心完成。

材料:

仪器	来源
JT12A 型数字式投影仪	贵阳新天光电科技有限公司
GH4000B 型恒温隔水式培养箱	天津泰斯特仪器有限公司
himac CR21G 型低温离心机、7080 型生化分析仪	Hitachi

中国药品生物制品检定所, 北京市 100050

许建霞 ★, 女, 1976 年生, 山西省运城市人, 汉族, 2003 年中国药品生物制品检定所毕业, 硕士, 助理研究员, 主要从事医疗器械生物学评价方面的研究。
xujianxia@nicpbp.org.cn

中图分类号: R318
文献标识码: B
文章编号: 1673-8225 (2010)38-07091-04

收稿日期: 2010-06-09
修回日期: 2010-07-16
(20100521003/ZS-Y)

实验用试剂:

试剂	来源
血细胞分析仪用试剂	Sysmex
凝血酶原时间、活化部分凝血酶时间、纤维蛋白原检测试剂	Dade Behring Marburg
CH50 检测试剂	日本和光

实验方法: 实验所要检测的透析器A(聚砜膜)是还未上市的产品, 作为样品透析器, 需要以批准上市的同类产品作为对照。试验在不同时间分2次进行, 第1次以已经上市的透析器B(聚砜膜)作为对照, 第2次以已经上市的透析器C(纤维素双乙酸酯膜)作为对照。

锯开透析器, 取出中间部分的空心纤维。用数字式投影仪检测测试透析器与对照透析器内中空纤维的直径。A, B, C血液透析器内中空纤维的直径分别为0.293 1, 0.314 1, 0.228 8 mm。

取A血液透析器中的中空纤维, 在加有生理盐水的平皿中数取100根。截取3 cm长, 用50 mL的生理盐水分3次冲洗后, 置于3 mL的硅化玻璃采血管中作为一个样品, 制备重复样5个。分别取对照B, C血液透析器中空纤维93, 128根, 同法处理。

健康志愿者来源于中国药品生物制品检定所, 抽取其肘静脉新鲜血20 mL, 3.8%柠檬酸钠溶液1: 9抗凝。

每个采血管中注入1.2 mL血液, 两个空的硅化玻璃采血管中加等量血液作为阴性对照。共17个硅化玻璃采血管, 放在置于37 °C隔水培养箱中略倾斜(约20°)的旋转培养器上, 以30 r/min的速率旋转。30 min后取出所有硅化玻璃采血管, 吸出其中的血液。部分血液用于血细胞分析, 其余血液于4 °C 2 000 g离心10 min后, 吸取上层血浆, 用凝血仪检测凝血酶原时间、活化部分凝血酶时间、纤维蛋白原, 用生化分析仪检测血清总补体活性。

设计、实施、评估者: 实验设计、干预实施、结果评估均为文章作者, 全部经过系统培训, 未使用盲法评估。

统计学分析: 由第一作者采用SPSS 12.0进行处理, 采用单因素方差分析(ANOVA), 各总体方差相等, 以 $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 与透析器A, B的中空纤维接触后, 血浆凝血酶原时间、活化部分凝血酶时间及纤维蛋白原质量浓度的变化 血液与透析器A, B中的中空纤维接触后, 血浆凝血酶原时间无明显差异, 而活化部分凝血酶时间及纤维蛋白原质量浓度差异有显著性意义($P < 0.05$), 其中透析器A的活化部分凝血酶时间更接近于空白对照,

提示透析器A优于B; 而透析器B的纤维蛋白原质量浓度更接近于空白对照, 提示透析器B优于A; 关于纤维蛋白原质量浓度, 透析器A与B之间差值的绝对值相对于透析器B的百分比为32.4%。见表1。

表1 与A, B两种透析器的中空纤维接触后, 血浆凝血酶原时间、活化部分凝血酶时间及纤维蛋白原质量浓度的比较

Table 1 PT, APTT and fibrinogen of plasma after contacted with hollow fiber of hemodialyzers A and B

Hemodialyzer	PT (s)	APTT (s)	Fibrinogen (mg/L)
B	12.38	34.18 ^a	1 030.8 ^a
A	13.42	30.98 ^a	696.4 ^a
Blank control	10.8	30.1	2 310.0

PT: prothrombin time; APTT: activated partial thromboplastin time; ^a $P < 0.05$

2.2 与透析器A, B的中空纤维接触后, 血液白细胞、红细胞、血小板及血清总补体浓度的变化 血液与透析器A, B中的中空纤维接触后, 血液中的白细胞、红细胞、血小板、血清总补体浓度差异均有显著性意义($P < 0.05$), 其中透析器A的白细胞、红细胞、血清总补体浓度更接近于空白对照, 提示透析器A优于B; 而透析器B的血小板数量更接近于空白对照, 提示透析器B优于A; 关于血小板数量, 透析器A与B之间差值的绝对值相对于透析器B的百分比为23.7%。见表2。

表2 与A, B两种透析器的中空纤维接触后, 血液白细胞、红细胞、血小板及血清总补体浓度的比较

Table 2 Concentration of WBC, RBC, PLT and CH50 in blood after contacted with hollow fiber of hemodialyzers A and B

Hemodialyzer	WBC (10 ^{E9} /L)	RBC (10 ^{E12} /L)	PLT (10 ^{E9} /L)	CH50 (U/mL)
B	6.55 ^a	3.74 ^a	209.6 ^a	23.25 ^a
A	7.09 ^a	3.92 ^a	160.0 ^a	28.28 ^a
Blank control	8.71	4.42	279.0	34.5

WBC: white blood cell; RBC: red blood cell; PLT: platelet; CH50: total hemolytic complement activity; ^a $P < 0.05$

2.3 与透析器A, C的中空纤维接触后, 血浆凝血酶原时间、活化部分凝血酶时间及纤维蛋白原质量浓度的变化 血液与透析器A, C中的中空纤维接触后, 血浆的凝血酶原时间、活化部分凝血酶时间及纤维蛋白原质量浓度差异均有显著性意义($P < 0.05$), 其中透析器C的凝血酶原时间、纤维蛋白原质量浓度更接近于空白对照, 提示透析器C优于A; 而透析器A的活化部分凝血酶时间更接近于空白对照, 提示透析器A优于C; 关于凝血酶原时间、纤维蛋白原质量浓度, 透析器A与C之间差值的绝对值相对于透析器C的百分比分别为

10.8%, 51.5%。见表3。

表3 与A、C两种透析器的中空纤维接触后血浆凝血酶原时间、活化部分凝血活酶时间及纤维蛋白原质量浓度的比较

Table 3 PT, APTT and fibrinogen of plasma after contacted with hollow fiber of hemodialyzers A and C

Hemodialyzer	PT (s)	APTT (s)	Fibrinogen (mg/L)
C	11.34 ^a	31.02 ^a	2 331.6 ^a
A	12.56 ^a	29.66 ^a	1 131.6 ^a
Blank control	10.1	28.95	2 995.0

PT: prothrombin time; APTT: activated partial thromboplastin time
^a $P < 0.05$

2.4 与透析器A、C的中空纤维接触后, 血液白细胞、红细胞、血小板及血清总补体浓度的变化 血液与透析器A、C中的中空纤维接触后, 血液中的白细胞数量无明显差异, 而红细胞、血小板数量及血清总补体浓度差异均有显著性意义($P < 0.05$), 其中透析器A的红细胞数量、血清总补体浓度更接近于空白对照, 提示透析器A优于C; 而透析器C的血小板数量更接近于空白对照, 提示透析器C优于A; 关于血小板数量, 透析器A与C之间差值的绝对值相对于透析器C的百分比为27.7%。见表4。

表4 与A、C两种透析器的中空纤维接触后血液白细胞、红细胞、血小板及血清总补体浓度的比较

Table 4 Concentration of WBC, RBC, PLT and CH50 in blood after contacted with hollow fiber of hemodialyzers A and C

Hemodialyzer	WBC (10 ⁹ /L)	RBC (10 ¹² /L)	PLT (10 ⁹ /L)	CH50 (U/mL)
C	4.87	4.54 ^a	192.0 ^a	31.64 ^a
A	5.02	4.74 ^a	138.8	33.40 ^a
Blank control	5.35	5.00	206.0 ^a	39.50

WBC: white blood cell; RBC: red blood cell; PLT: platelet; CH50: total hemolytic complement activity; ^a $P < 0.05$

3 讨论

3.1 对照透析器的选取 实验中透析器A是还未上市的产品, 而透析器B和C是已经上市的产品。因为血液的不稳定, 血液相容性的检测中需要设置对照组。在没有规定的特定产品或材料作为对照的情况下, 选取已经上市的、没有不良事件报道的同类产品作为对照。

3.2 中空纤维表面积的计算 中空纤维的表面积可以通过内外径来计算, 但实际工作中有时很难得到内外径的具体数据。实验把中空纤维想象成一个实心的圆柱体, 忽略内径对表面积的影响。用数字投影仪检测中空纤维外径, 并以此来估算其表面积。实际工作中发现, 通过这种方式所计算出来的样品与对照中空纤维表面

积的比例与用内外径具体数据计算出来的两者的比例基本一致。

3.3 血液-材料接触方式 与Erlenkötter等^[1]用整个透析器做体外血液相容性评价的方法相比, 实验中所用的血液-材料接触方式简单方便, 容易操作, 使整个试验过程得以流畅快速进行, 缩短试验的时间, 这一点对体外血液相容性试验具有很大的意义。另外样品和对照交叉进行试验更保证了两者试验条件的平行性。

试验材料之外的影响因素很小, 唯一试验材料外的影响因素是硅化玻璃管。硅化玻璃管本身具有良好的血液相容性, 与试验用的中空纤维的表面积相比, 它与血液的接触面积也相对很小。

在略倾斜的旋转培养器上, 以30 r/min的速度旋转, 这个速度可以保证血液与中空纤维是动态接触, 又不至于有太大的机械力影响。作者认为在无法很好模拟血流动态的情况下, 应减少机械力的影响。将硅化玻璃管保持一定的倾斜度, 保证血液与中空纤维充分接触的同时, 又避免了血液与硅化玻璃管及采血管胶塞额外不必要的接触。

3.4 检测指标 实验对中空纤维的血液相容性从血细胞、凝血系统以及补体3个方面进行评价。

白细胞、红细胞、血小板的浓度显示了中空纤维对血细胞的破坏作用, 其中血小板是较为敏感的指标, 样品与对照容易显示出统计学差异。

活化部分凝血活酶时间与凝血酶原时间的不同在于前者在试剂中加了足够的活化剂, GB/T16886.4中建议血液相容性评价中以部分凝血活酶时间作为评价指标而非活化部分凝血活酶时间, 原因是加入的活化剂会掩盖检测样品对凝血系统的激活作用。但活化部分凝血活酶时间作为临床常用的检测项目, 检测非常方便, 又有商业化的试剂。实际工作中发现活化部分凝血活酶时间是比较敏感的指标。待试品与血液接触0.5 h后, 对凝血系统的激活作用越大, 活化部分凝血活酶时间越长, 这可能与血浆中剩余有活性的凝血因子量有关。纤维蛋白原也是非常敏感的指标, 用实验所述方法进行的中空纤维体外血液相容性评价中, 通常空白对照的活化部分凝血活酶时间、凝血酶原时间最短, 而纤维蛋白原最大。

补体系统激活作用的评价, 通常用C3a、C5a多一些, 这两个指标的检测方法多用酶联免疫法, 而血清总补体活性是用生化分析仪来检测, 更方便快捷客观。血清总补体活性也是较为敏感的指标, 空白对照的血清总补体活性通常最大。

3.5 结果判定 因为血液的复杂性, 血液相容性的评定通常要综合所有的指标来评定。如欧盟采用了评分法^[2], 以最后的总分数来评定待试品的血液相容性^[2]。

作者已经用这种方式对很多种已经上市的透析器中的中空纤维进行了互为对照的体外血液相容性评价,

发现: ①在这些检测指标中, 活化部分凝血活酶时间、纤维蛋白原、血小板、血清总补体活性这4个指标相对比较敏感。②样品与对照会显示出统计学差异, 但通常数值差别不大, 样品与对照的百分比通常在85%~115%。

因此, 可以考虑初步使用这样的评判标准, 对一个新的透析器中空纤维的评价, 因对照(已经上市的同类产品)的不确定性, 对结果的判定可以分为以下3种情况:

①样品与对照无统计学差异。②样品与对照有统计学差异但样品优于对照。③样品与对照有统计学差异且劣于对照, 但 $|(样品参数-对照参数)|/对照参数 \leq 15\%$ 。如样品的所有指标均能够满足这3个条件中的任何1条, 则可以认为样品的血液相容性与对照之间的差别可以接受。

实验中, 样品透析器A与对照透析器B相比, 结果如下: ①凝血酶原时间, 样品与对照之间无统计学差异。

②活化部分凝血活酶时间、白细胞、红细胞、血清总补体, 样品与对照之间有统计学差异, 样品优于对照。③纤维蛋白原、血小板, 样品与对照之间有统计学差异, 样品劣于对照。且 $|(样品参数-对照参数)|/对照参数$ 分别为32.4%, 23.7%。与对照透析器C相比的结果如下:

①白细胞, 样品与对照之间无统计学差异。②活化部分凝血活酶时间、红细胞、血清总补体, 样品与对照之间有统计学差异, 样品优于对照。③凝血酶原时间、纤维蛋白原、血小板, 样品与对照之间有统计学差异, 样品劣于对照。且 $|(样品参数-对照参数)|/对照参数$ 分别为10.8%, 51.5%, 27.7%。

可以看出, 与两个对照透析器相比, 样品透析器在不同指标上显示出差异。但样品对纤维蛋白原和血小板的巨大消耗在2次试验中均有充分体现, 且与对照参数差值的绝对值相对于对照参数的百分比远大于15%, 可以认为样品透析器中空纤维与对照透析器中空纤维之

间血液相容性的差异不被接受。

3.6 不足 实验中缺少对血小板激活作用的评价。如果能以某种上市的同类产品作为血液相容性评价的固定对照, 则试验之间更具有可比性, 结果的判定标准也可以进一步细化。另外如能将评价结果与血液透析器的临床使用情况相结合, 并作对比, 则更完善。

4 参考文献

- [1] Erlenkötter A, Endres P, Nederlof B, et al. Thoughts and Progress. Artificial Organs. 2008;32(12):962-969.
- [2] Seyfert UT, Biehl V, Schenk J. In vitro hemocompatibility testing of biomaterials according to the ISO 10993-4. Biomolecular Engineering. 2002;19:91-96.

来自本文课题的更多信息--

利益冲突: 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

课题的创新点: 接触模型, 也就是血液与材料的接触方式。

课题评估的“金标准”: 对一个新的透析器中空纤维的评价, 因对照(已经上市的同类产品)的不确定性, 对结果的判定可以分为以下3种情况: ①样品与对照无统计学差异。②样品与对照有统计学差异但样品优于对照。③样品与对照有统计学差异且劣于对照, 但 $|(样品参数-对照参数)|/对照参数 \leq 15\%$ 。如样品的所有指标均能够满足这3个条件中的任何1条, 则可以认为样品的血液相容性与对照之间的差别可以接受。

课题的偏倚与不足: 缺少阳性对照。

提供临床借鉴的价值: 作者认为在无法很好模拟血流动态的情况下, 应减少机械力的影响。将硅化玻璃管保持一定的倾斜度, 保证血液与中空纤维充分接触的同时, 又避免了血液与硅化玻璃管及采血管胶塞额外不必要的接触。