

血液灌流清除慢性肾病代表性毒素频度和效果的研究

安梦瑶^{1,2}, 葛鹏², 胡雷², 钟飞², 周博宇², 刘昌孝^{1,2,3*}

(1. 天津大学化工学院制药工程, 天津 300072; 2. 天津天诚新药评价有限公司, 天津 300301;
3. 天津药物研究院, 释药技术与药物代谢动力学国家重点实验室, 天津 300193)

摘要: 通过使用特殊定制血液灌流器, 评价在相同实验周期不同频次下血液灌流 (hemoperfusion, HP) 对慢性肾病 (chronic kidney disease, CKD) 比格犬治疗的安全性和有效性。动物实验方案由天津药物研究院新药评价有限公司伦理委员会审核并批准 (IACUC 批准号为 2019071501)。CKD 比格犬随机分为两组: 低频率治疗组 (7天/次, $n = 6$) 和高频率治疗组 (3天/次, $n = 6$), 均进行两次 HP 治疗。评价比格犬血液学、血清生化、凝血功能、电解质、呼吸、心电图和血压等指标。高频率 HP 治疗可以明显减少毒素在 CKD 比格犬体内蓄积。血液学、凝血功能、电解质、肝功能、呼吸、心电图和血压等指标证明了使用特制血液灌流器进行 HP 治疗是一种安全的方法, 且高频率治疗组对机体的各指标影响与低频率组比较无显著差异, 所以, 3天1次 HP 治疗在动物实验水平是安全的。实验证明, 比临床推广方案 (7天1次 HP 治疗) 更高频率的3天1次治疗未造成机体实质性危害, 未出现安全隐患, 且更利于毒素清除, 利于患者预后。

关键词: 慢性肾病; 比格犬; 尿毒素; 血液灌流; 血液净化

中图分类号: R963 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2020)12-2924-10

Safety and effectiveness of hemoperfusion on the removal of uremic toxins in chronic kidney disease

AN Meng-yao^{1,2}, GE Peng², HU Lei², ZHONG Fei², ZHOU Bo-yu², LIU Chang-xiao^{1,2,3*}

(1. Department of Pharmaceutical Engineering, School of Chemical Engineering and Technology, Tianjin University, Tianjin 300072, China; 2. Tianjin Tiancheng New Drug Evaluation Research Co., Ltd., Tianjin 300301, China;
3. State Key Laboratory of Drug Delivery Technology and Pharmacokinetics, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China)

Abstract: The goal of the present study was to determine the effectiveness and safety of hemoperfusion (HP) in beagle dogs with chronic kidney disease (CKD). The experimental protocol was approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of Tianjin Institute of Pharmaceutical Research New Drug Evaluation Research (IACUC2019071501). Twelve CKD model beagles were randomly divided into two groups: a low-frequency treatment group ($n = 6$) and a high-frequency treatment group ($n = 6$). The dogs in the high- and low-frequency groups received HP treatment every 3 days and once per week, respectively, for two treatments, with each session lasting 2 h. The test results showed that high-frequency HP treatment significantly decreased the accumulation of toxins in the CKD beagles. Hematology, coagulation function, electrolytes and liver function indicated that the HP treatment was safe. The body index effects were consistent between the low- and high-frequency treatment groups. Therefore, HP treatment once every 3 days was safe at the animal level. Multiple HP treatments every 3 days were more conducive than weekly treatments to the removal of uremic toxins with better prognosis and had no associated

收稿日期: 2020-09-24; 修回日期: 2020-10-16.

基金项目: 国家科技重大新药创制项目 (2015ZX09501004); 天津市科技计划项目 (16PTGCCX00090).

*通讯作者 Tel: 86-22-23006860, E-mail: liuchangxiao@163.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2020-1533

safety hazards.

Key words: chronic kidney disease; beagle dog; uremic toxin; hemoperfusion; blood purification

慢性肾病 (chronic kidney disease, CKD) 是一组多种病因所致的以慢性进展性肾功能丧失为特征的疾病群, 能显著增加终末期肾病、心血管疾病及死亡的发生风险^[1]。伴随肾功能进一步衰退, CKD 患者体内各种毒素分泌和代谢紊乱, 大量有害物质蓄积, 尿素氮 (BUN)、肌酐 (CREA) 等小分子水溶性物质、 β_2 微球蛋白 (β_2 -MG)、甲状旁腺激素 (PTH) 等中、大分子毒素和蛋白类结合毒素等, 这些物质称为尿毒素^[2]。作为一种强促炎因子, 尿毒素能加剧功能性肾损伤、肾纤维化及氧化应激^[3], 累及多器官^[4], 加速 CKD 疾病进展。

近几年, 体外血液净化疗法发展迅速, 主要是用于去除外源性和内源性毒素。常规血液透析通过超滤和半透膜的溶质弥散作用能够较好清除 BUN 和 CREA 等小分子水溶性物质, 但对于 β_2 -MG 和 PTH 等中、大分子毒素清除效果不佳^[5]。与普通血液透析相比, 血液灌流应用吸附剂清除患者体内内源性和外源性的毒素, 不仅能高效清除 CREA 和 BUN 等小分子毒物, 而且能清除多种中、大分子和蛋白结合类毒素, 且血液灌流具有较好的生物相容性。

血液灌流广泛用于慢性病及维持性血液透析相关并发症^[6,7]、中毒^[8]、自身免疫性疾病^[9]和危重症等炎症反应性疾病^[10,11]。对 CKD 及相关并发症的治疗, 临床目前推行的治疗方案为 1 次/周, 每次 2 h^[12]。

慢性肾病动物模型是目前对于实验基础研究 CKD 的一种常用手段, 能够有效地认识疾病的发生、发展变化规律和研究防治措施。到目前为止, 尚未见文献研究多次 HP 对 CKD 犬的治疗效果和安全性。血

液灌流器在慢性肾病比格犬身上经过多次血液灌流是否也能安全呢? 如果比目前临床使用的治疗频率高能否顺利进行呢? 不同治疗频率对毒素清除效果是否有不同? 这些问题值得进一步探讨。

本研究目的是在相对稳定、标准的比格犬慢性肾病模型上, 通过使用特殊定制版血液灌流器, 在相同实验周期不同频次下评价血液灌流对犬的安全性和有效性, 解决以下问题: ① 比较不同治疗频次可能引起的临床不良反应, 包括不良反应的性质、程度和可逆性等; ② 推测临床试验的适宜治疗次数, 为后续临床试验提供安全治疗频度; ③ 为临床不良反应监测及防治提供参考。

材料与方 法

仪器耗材、试剂 实验室特殊定制的小型血液灌流器由苯乙烯-二乙烯基苯共聚物制成的中性大孔树脂构成 (图 1A、B)。树脂珠的平均直径为 0.80 mm, 树脂装量 26 mL, 血室容量 38.7 mL, 容积 55.6 mL, 灌流器两滤网之间容积 44.6 mL。ML203 电子天平, 梅特勒托利多仪器上海有限公司; OCS-W-100kg 无线吊钩秤, 昆山钰恒电子衡量器有限公司; ADVIA2120 血液分析仪, 德国 Siemens 公司; ACL9000 凝血分析仪, 美国贝克曼库尔特公司; 7180 全自动生化分析仪, 日本日立公司; EX-180 电解质分析仪, 日本常光株式会社; ITF64-BNC 动物生理信号遥测系统/TLE-E03-US 心电图采集盒, 法国 Emka 公司; JA-600A 血泵, 健帆生物科技

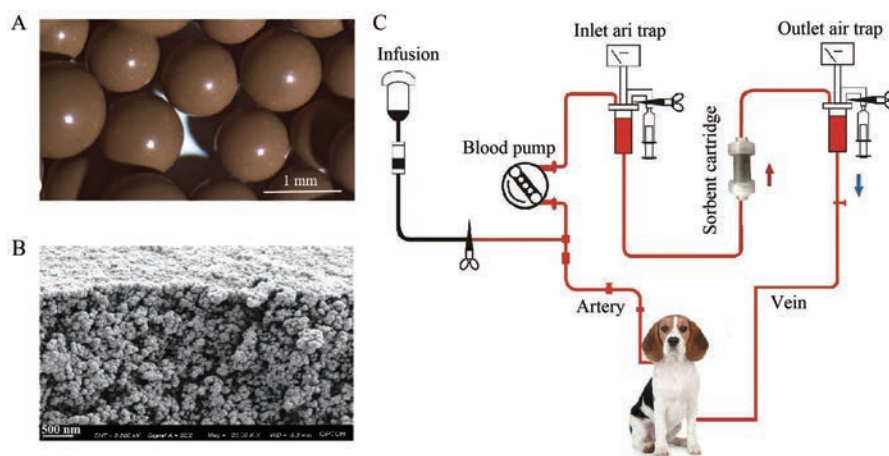


Figure 1 Working principle diagram of hemoperfusion. A: Neutro-macroporous resin adsorbing beads made of styrene-divinylbenzene copolymer; B: Picture made by transmission electron microscopy (TEM) of beads surface with the pore; C: Hemoperfusion (HP) on beagle dogs with chronic kidney disease (CKD)

集团股份有限公司; 一次性使用无菌血液透析导管及附件, 广东百合医疗科技股份有限公司; 血液净化装置的体外循环管路, 大连JMS医疗器具有限公司。

动物 12只CKD比格犬, 18~30月, 14~17 kg, 供应单位: 天津药物研究院新药评价有限公司, 生产许可证: SCXK-2019-002, 实验动物质量合格证编号: 190715、190817。实验方案遵循美国国家卫生研究院出版的“实验动物护理和使用指南”(NIH Publication, 2011年修订)。按照国际实验动物饲养管理评估与认证协会(AAALAC)的指导方针对所有实验动物进行人道关怀。IACUC(实验动物伦理委员会)负责动物福利方面的监督、审查和指导工作, 所有动物的使用均经过IACUC批准。IACUC批准号为: 2019071501。

实验分组 参考CKD模型犬血液学和血清生化等结果, 采用体重随机分组的方法, 将动物分成HP治疗1组(低频率组)和HP治疗2组(高频率组), 每组6只。治疗1组($n=6$), 给予血液灌流治疗, 每7天1次, 每次2 h, 连续治疗2次; 治疗2组($n=6$), 给予血液灌流治疗, 每3天1次, 每次2 h, 连续治疗2次。

CKD比格犬模型制备 动物称重, 依照体重注射硫酸阿托品, 15 min后3%戊巴比妥钠麻醉。参考肾大部分切除法^[13]分两次手术切除3/4肾组织(左肾切1/2, 2周后右肾全切)。所有动物手术结束后放于加热垫上(维持其基础代谢功能)待其苏醒, 观察其状态良好后放回于饲养笼。由实验人员及饲养人员密切观察其情况直至其完全清醒。每次手术后, 所有动物肌注镇痛剂以缓解手术带来的疼痛, 并给予抗生素和止血药, 必要时可进行静脉补液。术后2 h提供饮水, 6 h提供流质饮食, 定时观察实验犬恢复的情况, 记录相应的指标数据如食欲和精神状态等。术后5天内均肌肉注射氨苄西林钠(每只每次1.0 g), 切口涂擦碘伏防止感染。

HP治疗方法 如图1C所示, 同“CKD比格犬模型制备”将动物麻醉后采取仰卧位保定。颈动脉近心端予动脉夹夹闭后, 持预先充满肝素的Y型中央导管自远心端插入动脉, 松开动脉夹。Y型管路动脉端(红色)连接透析管路引流出血液进入血液灌流器, 静脉端(蓝色)则用于血液灌流后的血液回输。于灌流前5 min给予犬首剂肝素($1\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)。开启血泵, 从比格犬颈动脉端引流出血流, 通过血液灌流器, 经静脉回路回输至比格犬前肢静脉。灌流速度为 $46\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, 灌流时间为2 h。治疗期间, 每30 min追加肝素5.0 mg。在治疗过程中, 若发现动物有苏醒的迹象, 则可通过灌流系统在静脉端追加1~2 mL 3%戊巴比妥钠, 使比格犬在灌流过程中保持麻醉状态。

治疗过程中动态监测动物的体温、呼吸、心率和血

压, 观察是否有血液灌流常见不良反应, 包括灼热、呼吸困难, 高/低血压; 心律失常; 溶血, 表现为静脉血路中血液呈葡萄酒色; 肌肉痉挛; 血栓; 出血, 表现为口、鼻、眼等部位出血情况, 必要时解剖观察皮下出血情况。治疗结束后, 用鱼精蛋白进行对抗肝素化($1\text{ mg}:100\text{ U}$, 8 h内)。

所有动物手术结束后放于加热垫上(维持其基础代谢功能)待其苏醒, 观察其状态良好后放回于饲养笼。由实验人员及饲养人员密切观察其情况直至其完全清醒。术后2 h提供饮水, 6 h提供流质饮食, 定时观察实验犬恢复的情况, 记录相应的指标数据如食欲、精神状态等。

观察指标 HP治疗前、后每天上、下午各对犬进行1次临床观察(外观、精神、活动和动物饮食情况等); HP治疗前、治疗后每周进行1次体重检查; 治疗前(pre-HP)、治疗后0 h(post-HP-0 h)、2 h(post-HP-2 h)、24 h(post-HP-24 h)、72 h(post-HP-72 h)和1周(post-HP-1 w), 均进行血液学、凝血功能、血清生化和电解质指标检查。

血液学指标: 红细胞计数(RBC)、血红蛋白(HGB)、红细胞容积(HCT)、平均红细胞容积(MCV)、平均红细胞血红蛋白(MCH)、平均红细胞血红蛋白浓度(MCHC)、网织红细胞(Retic)、白细胞(WBC)及其分类[中性粒细胞(neutrophil)、淋巴细胞(lymphocyte)、单核细胞(monocyte)和嗜酸性粒细胞(eosinophil)]、血小板计数(PLT); 凝血功能指标: 凝血酶原时间(PT)、活化部分凝血活酶时间(APTT)。血清生化指标: 丙氨酸氨基转移酶(AST)、天门冬氨酸氨基转移酶(ALT)、碱性磷酸酶(ALP)、BUN、CREA、总蛋白(TP)、白蛋白(ALB)、肌酸磷酸激酶(CK)、 β_2 -MG、PTH; 电解质: 血清钾(K^+)、钠(Na^+)、氯(Cl^-)、钙(Ca^{2+})、磷(P^{5+})离子。

统计学方法 所有数据均表示为平均值 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$), n 表示动物数量。使用AcqKnowledge 4.1软件分析处理记录得到的心电图。使用GraphPad Prism 6.0和OriginPro 8.0软件图形进行绘制。运用SPSS 26.0版进行统计学分析, 两两比较采用配对 t 检验; 多组比较采用单因素方差分析(ANOVA), 方差齐时, 采用LSD法、SNK法检验; 方差不齐时, 采用Dunnett T3检验。以 $\alpha=0.05$ 为检验水平, $P<0.05$ 表示有统计学差异, $P<0.01$ 表示统计学差异显著。

结果

1 一般观察

CKD比格犬在HP治疗后6 h内均苏醒, 饮食饮水正常, 活动正常, 精神状态良好, 其他临床观察指标未

见异常。

2 体重

CKD 比格犬 HP 治疗后, 体重与治疗前无统计学差异 ($P>0.05$)。

3 不同 HP 治疗频率对 CKD 比格犬体内肝功能指标影响

两次 HP 治疗后, ALT 水平变化如表 1 所示, 与治疗前相比, 治疗 1 组和治疗 2 组分别在两次 HP 治疗后 2 h、0 h 时间点开始异常升高, 均在 24 h 时水平最高 ($P<0.05$ vs pre-HP), 72 h 开始下降, 1 周后恢复至正常水平, 两组变化趋势一致。与治疗前 AST 水平相比, 两组均在 24 h 时间点出现 AST 异常升高 ($P<0.01$ vs pre-HP), 但随之下降, 72 h AST 恢复至正常水平, 详见表 1。以上 ALT 和 AST 的水平异常考虑是插管手术创伤造成的应激性反应。

两组 TP 水平均轻微降低, 但在正常范围内, 24 h 后恢复至治疗前水平。两组差异较小, 且治疗 2 组降低 TP 水平比例低于治疗 1 组。治疗 1 组与治疗 2 组相比, TP 下降比例在 0 h 时间点: $18.33\% \pm 3.20\%$ vs $14.70\% \pm 2.18\%$; 2 h 时间点: $10.29\% \pm 2.81\%$ vs $8.02\% \pm 2.08\%$ 。治疗 1 组和治疗 2 组 ALB 水平轻微下降, 略低于正常水平, 治疗 1 组与治疗 2 组相比, ALB 下降比例在 0 h 时间点: $19.22\% \pm 1.95\%$ vs $19.34\% \pm 2.27\%$; 2 h 时间点: $12.28\% \pm 2.38\%$ vs $13.48\% \pm 2.05\%$, 24 h 之后恢复至治疗前水平。两组间无统计学差异, 结果如表 1 所示。

4 不同 HP 治疗频率对 CKD 比格犬体内电解质指标影响

如图 2A 所示, 经过两次 HP 治疗后, 两种 HP 治疗模式均对 K^+ 的影响较大, 0 和 2 h 时间点水平较低, 且与治疗前相比有统计学意义 ($P<0.05$ vs pre-HP)。两次 HP 治疗后, 治疗 1 组在 0 h 时间点会轻微降低 Ca^{2+}

水平, 之后恢复至治疗前水平 (图 2B)。HP 治疗对 Na^+ 、 Cl^- 和 P^{5+} 水平无显著性影响; 治疗 1 组与治疗 2 组无差异, 未引起安全问题, 结果如图 2C~E 所示。

5 不同 HP 治疗频率对 CKD 比格犬体内血常规指标影响

如图 3A~C 所示, 两种 HP 治疗均可造成 RBC、HGB 和 HCT 在治疗后水平降低, 且三者变化趋势一致, 24 h 后基本恢复, 与治疗前无统计学差异。在 HP 治疗后 0 h, 与治疗前水平相比, 治疗 1 组降低 RBC 水平 $31.48\% \pm 1.52\%$, 降低 HCT 比例 $31.03\% \pm 1.14\%$, 降低 HGB 水平 $31.38\% \pm 0.83\%$; 治疗 2 组降低 RBC 水平 $33.10\% \pm 3.90\%$, 降低 HCT 比例 $33.30\% \pm 3.70\%$, 降低 HGB 水平 $33.25\% \pm 3.32\%$, 两组影响差异较小。HP 治疗后 0 h 引起 WBC 一过性降低 (治疗 1 组 $69.92\% \pm 5.32\%$ vs 治疗 2 组 $39.29\% \pm 7.68\%$), 而后 24 h WBC 出现瀑布式升高 (治疗 1 组 $132.55\% \pm 49.49\%$ vs 治疗 2 组 $108.72\% \pm 16.60\%$), 经抗生素治疗后, 72 h 后基本恢复至正常范围 (图 3D)。HP 治疗后 0 h, 能显著降低 PLT 水平 (治疗 1 组 $45.32\% \pm 9.35\%$ vs 治疗 2 组 $41.77\% \pm 5.83\%$), 且与治疗前相比有统计学意义 ($P<0.05$ vs pre-HP)。治疗 2 h 后恢复至正常水平, 随后缓慢上升。治疗 2 组 72 h 后 PLT 水平明显高于治疗前 ($P<0.05$ vs pre-HP), 两组在两次 HP 治疗 1 周后的 PLT 水平均显著高于治疗前 ($P<0.05$ vs pre-HP) (图 3E)。HP 治疗前后血液学其他指标 (MCV、MCH、MCHC 和 Retic) 未见异常 ($P>0.05$ vs pre-HP)。

6 不同 HP 治疗频率对 CKD 比格犬体内凝血指标影响

HP 治疗对 APTT 影响较大, 与治疗前相比, 0 h 均显著升高, 2 h APTT 水平开始下降, 24 h 后恢复至正常水平。两个治疗组 PT 值在治疗前后没有统计意义变化, 结果见图 4。

Table 1 Effects of different frequency HP treatments on liver function indexes in CKD beagles. $n = 6$, $\bar{x} \pm s$. * $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs pre-HP. ALT: Alanine aminotransferase; AST: Aspartate aminotransferase; TP: Total protein; ALB: Albumin

Group	ALT/U·L ⁻¹	AST/U·L ⁻¹	TP/g·L ⁻¹	ALB/g·L ⁻¹
Group 1 ($n = 6$)				
Pre-HP	29.45 ± 1.07	24.66 ± 1.46	63.39 ± 1.31	26.84 ± 0.66
Post-2-HP-0 h	35.25 ± 3.39	19.87 ± 1.04*	51.87 ± 2.19**	21.92 ± 0.78**
Post-2-HP-2 h	53.75 ± 17.76	39.55 ± 15.75	56.85 ± 1.03*	23.75 ± 0.60**
Post-2-HP-24 h	67.13 ± 13.97*	161.82 ± 28.07**	59.83 ± 1.88	25.32 ± 0.81
Post-2-HP-72 h	51.15 ± 6.12*	29.57 ± 4.10	60.78 ± 2.07	25.12 ± 0.74
Post-2-HP-1 w	40.03 ± 5.14	24.98 ± 1.90	63.88 ± 1.68	27.48 ± 1.26
Group 2 ($n = 6$)				
Pre-HP	30.04 ± 5.00	29.03 ± 1.11	62.60 ± 1.59	27.25 ± 0.75
Post-2-HP-0 h	42.14 ± 8.32	27.90 ± 4.11	53.37 ± 1.77**	21.93 ± 0.60**
Post-2-HP-2 h	46.16 ± 8.86	37.20 ± 5.52	57.47 ± 1.16*	23.52 ± 0.41**
Post-2-HP-24 h	62.72 ± 15.61*	145.95 ± 42.53**	60.00 ± 1.50	26.00 ± 1.07
Post-2-HP-72 h	50.18 ± 11.08*	36.58 ± 5.61	60.60 ± 2.11	26.40 ± 1.16
Post-2-HP-1 w	38.30 ± 8.40	27.12 ± 1.77	61.87 ± 1.22	26.65 ± 0.67

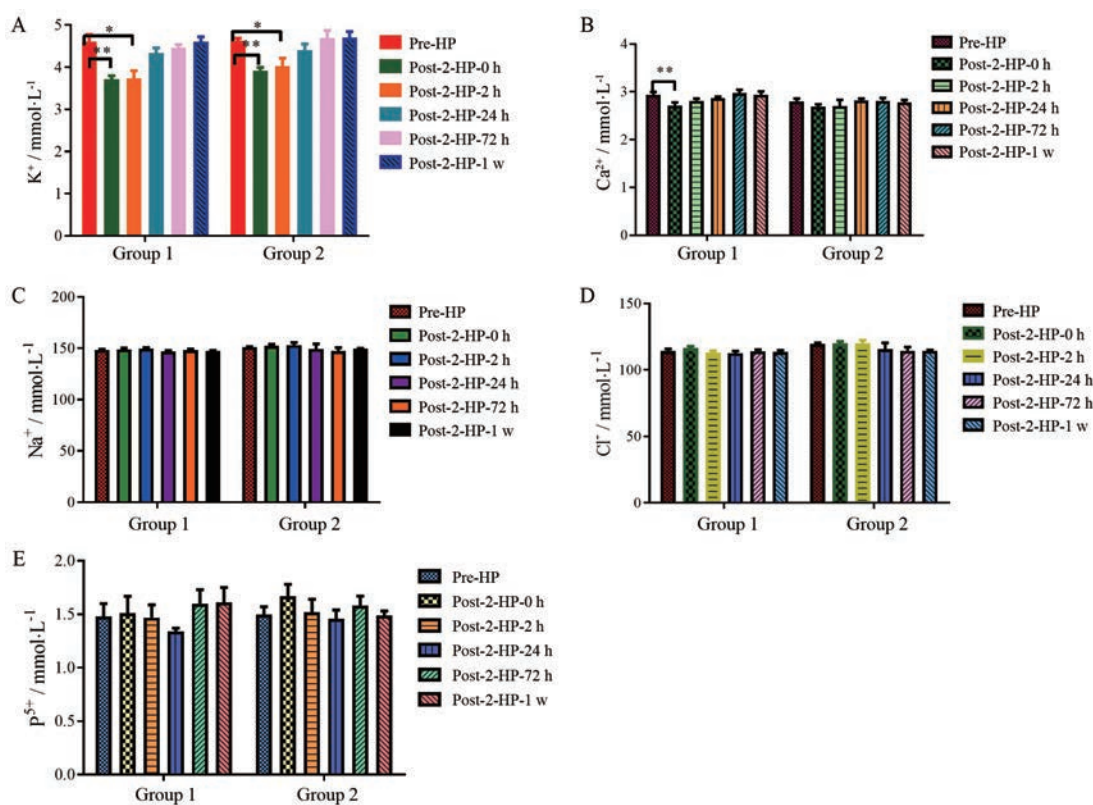


Figure 2 Effects of different frequency HP treatments on electrolytes in CKD beagles. A: K⁺; B: Ca²⁺; C: Na⁺; D: Cl⁻; E: P⁵⁺. *n* = 6, $\bar{x} \pm s$. **P*<0.05, ***P*<0.01

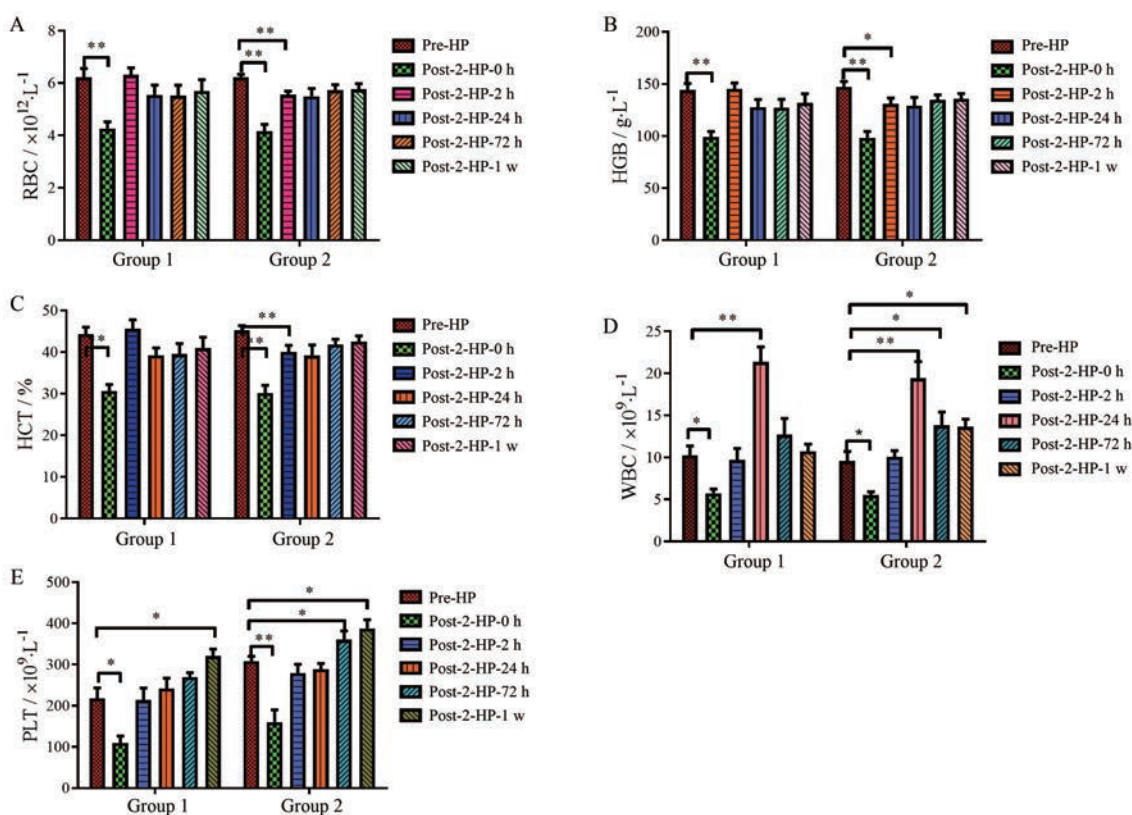


Figure 3 Effects of different frequency HP treatments on hematology in CKD beagles. A: Red blood cell (RBC) count; B: Hemoglobin (HGB); C: Hematocrit (HCT); D: White blood cell (WBC) count; E: Platelet (PLT). *n* = 6, $\bar{x} \pm s$. **P*<0.05, ***P*<0.01

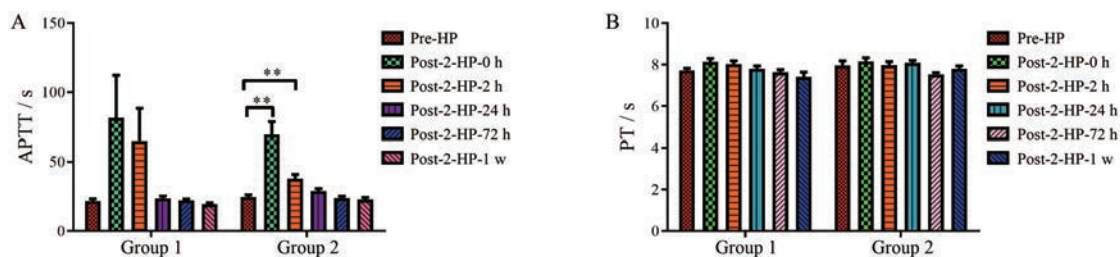


Figure 4 Effects of different frequency HP treatments on coagulation function indexes in CKD beagles. A: Activated partial thromboplastin time (APTT); B: Prothrombin time (PT). $n = 6, \bar{x} \pm s$. ** $P < 0.01$

7 不同HP治疗频率对CKD比格犬呼吸、心电图和血压的影响

每次HP治疗均对各麻醉状态下的CKD比格犬进行呼吸、心电图和血压监测。对HP治疗前、治疗开始后10 min、1 h、2 h时间点采样分析,结果如下:如表2所示,治疗1组、治疗2组在两次HP治疗中,各组动物HP治疗中10 min、1 h和2 h各时间点的呼吸频率、呼吸幅度与HP治疗前相比均没有统计学意义的变化($P > 0.05$ vs pre-HP);两组动物在HP开始后10 min、1 h、2 h,收缩压和舒张压均有不同程度的升高,且均与治疗前数值相比有统计学意义($P < 0.05$ vs pre-HP);两次HP治疗,两组动物在HP治疗进行至2 h时,心率均有不同程度的降低,且均与治疗前数值有统计学意义($P < 0.05$ vs pre-HP),其余心电图指标与治疗前无差异。

8 不同HP治疗频率对CKD比格犬体内毒素清除效果比较

如图5所示,第一次HP治疗后,两组BUN水平变化基本一致,第二次HP治疗后,在各时间点,治疗2组对BUN清除率明显比治疗1组增大。两次HP治疗1周后,治疗2组CKD比格犬体内BUN水平更低。同样,如图6所示,两次HP治疗后,两组CKD比格犬

CREA水平变化与以上BUN变化一致,在各时间点,治疗2组对CREA清除率明显比治疗1组高。两次HP治疗1周后,治疗2组CREA水平仍低于治疗前水平($P < 0.05$ vs pre-HP),但治疗1组在2次HP治疗后72 h时已达到治疗前水平($P > 0.05$ vs pre-HP)。

如图7和8所示,第一次HP治疗后,两组 β_2 -MG和PTH水平变化基本一致。第二次HP治疗后,治疗2组对 β_2 -MG和PTH清除率明显比治疗1组高,在各时间点 β_2 -MG均低于治疗前水平且有统计学差异($P < 0.05$ vs pre-HP);而治疗1组各时间点(0、2、24和72 h)与治疗前水平相比无统计学差异,且治疗后72 h达到治疗前水平($P > 0.05$ vs pre-HP),1周时 β_2 -MG水平高于治疗前水平($P < 0.05$ vs pre-HP)。治疗1组在两次HP后72 h,PTH水平已与治疗前水平相比无统计学差异($P > 0.05$ vs pre-HP);而治疗2组仍低于治疗前水平($P < 0.05$ vs pre-HP),但1周时,与治疗前水平无统计学差异。所以,高频率HP治疗能明显减少PTH体内蓄积。

讨论

本课题主要是通过一个稳定、长期的CKD比格犬模型,探究使用小型血液灌流器在相同实验周期不同

Table 2 Effects of different frequency HP treatments on blood pressure and indicators of ECG in CKD beagles. $n = 6, \bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs pre-HP. DBP: Diastolic blood pressure; SBP: Systolic blood pressure; QTc: QTc interval; HR: Heart rate

Time	Group	DBP/mmHg	SBP/mmHg	QTc/ms	HR/bpm
Pre-1-HP	Group 1	70.74 ± 6.59	109.94 ± 7.75	362.51 ± 5.78	156.39 ± 6.59
	Group 2	78.43 ± 9.43	118.40 ± 11.18	369.30 ± 5.32	155.95 ± 9.99
Post-1-HP-10 min	Group 1	96.78 ± 5.16**	142.84 ± 6.28**	373.46 ± 9.72	160.57 ± 7.11
	Group 2	105.62 ± 4.42*	153.93 ± 3.97*	383.13 ± 6.18**	166.83 ± 9.82
Post-1-HP-1 h	Group 1	96.30 ± 3.82**	142.23 ± 4.50**	389.80 ± 6.02**	151.94 ± 7.84
	Group 2	101.08 ± 3.35*	149.42 ± 2.12*	391.57 ± 7.07*	160.02 ± 9.32
Post-1-HP-2 h	Group 1	97.95 ± 3.53**	144.97 ± 3.66**	394.66 ± 6.03**	137.90 ± 7.73*
	Group 2	101.37 ± 3.25	149.32 ± 2.79*	395.93 ± 6.57**	142.75 ± 9.95
Pre-2-HP	Group 1	65.77 ± 2.43	104.46 ± 4.90	370.73 ± 6.03	157.09 ± 3.77
	Group 2	63.85 ± 1.76	101.73 ± 4.82	371.72 ± 7.04	155.42 ± 4.00
Post-2-HP-10 min	Group 1	98.59 ± 6.60**	145.40 ± 8.19**	384.30 ± 5.21*	150.54 ± 6.51
	Group 2	97.35 ± 7.67**	144.08 ± 9.56**	386.05 ± 5.81*	153.35 ± 6.95
Post-2-HP-1 h	Group 1	94.07 ± 4.42**	140.79 ± 6.04**	393.77 ± 7.46*	135.70 ± 9.33
	Group 2	95.35 ± 5.01**	143.03 ± 6.63**	397.75 ± 7.47*	140.75 ± 9.28
Post-2-HP-2 h	Group 1	90.33 ± 3.47**	138.07 ± 4.35**	399.77 ± 5.52**	127.46 ± 8.17*
	Group 2	90.83 ± 4.06**	138.70 ± 5.10	401.57 ± 6.18**	131.90 ± 8.11*

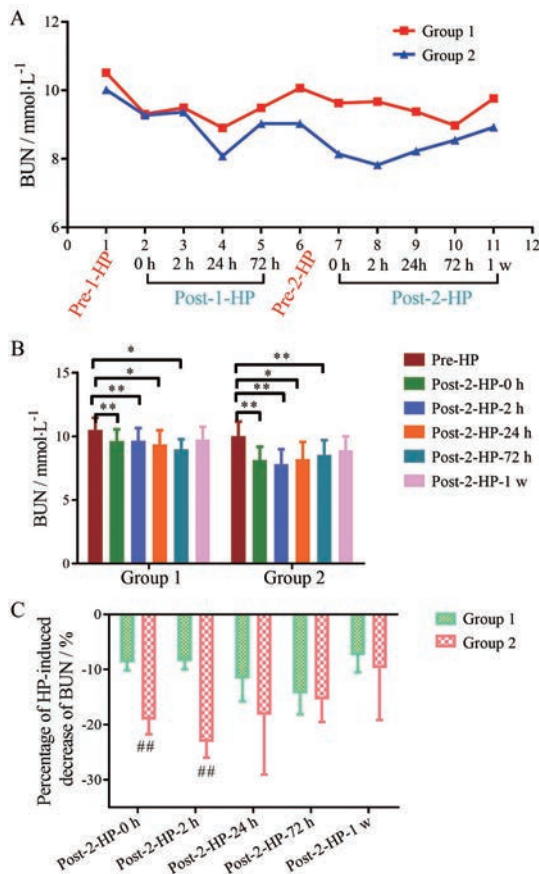


Figure 5 Effects of different frequency HP treatments on blood urea nitrogen (BUN) clearance in CKD beagles. A: Changes in BUN levels in the two groups after two HP treatments; B: Compared with the levels before HP treatment, changes in BUN after the second HP treatment in the two groups; C: At each time point, the HP-induced percentage decrease in BUN after the second HP treatment. $n = 6, \bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; ## $P < 0.01$ vs group 1

频率下多次 HP 治疗对其体内尿毒症毒素的清除效果以及安全性问题。

犬科动物的 CKD 模型与人类 CKD 病情进展相似, 有助于研究者对人类以及犬类疾病生理和病理的理解。因犬循环血量较大, 利于操作, 犬已经被广泛用于肾脏病护理的发展研究, 尤其是在透析和移植中^[14,15], 故选用比格犬 CKD 模型用于 HP 治疗的评价实验研究。

在 CKD 患者体内, 尤其是尿毒症患者, CREA 和 BUN 的升高水平是与病情严重程度一致的。目前, 临床上主要通过血液透析对其进行清除。过高的 PTH 在体内蓄积会对机体产生毒性作用, 损伤中性粒细胞和 B 淋巴细胞, 引起免疫功能下降, 还可以抑制红细胞生成, 加重尿毒症患者的贫血, 引发尿毒症心肌病^[16], 因此 PTH 已被确认为尿毒症临床症状的重要毒性物质。研究已经证实 β_2 -MG 作为尿毒症毒素的临床意义^[17,18]。大孔吸附树脂是吸附性和分子筛性原理相结合的分

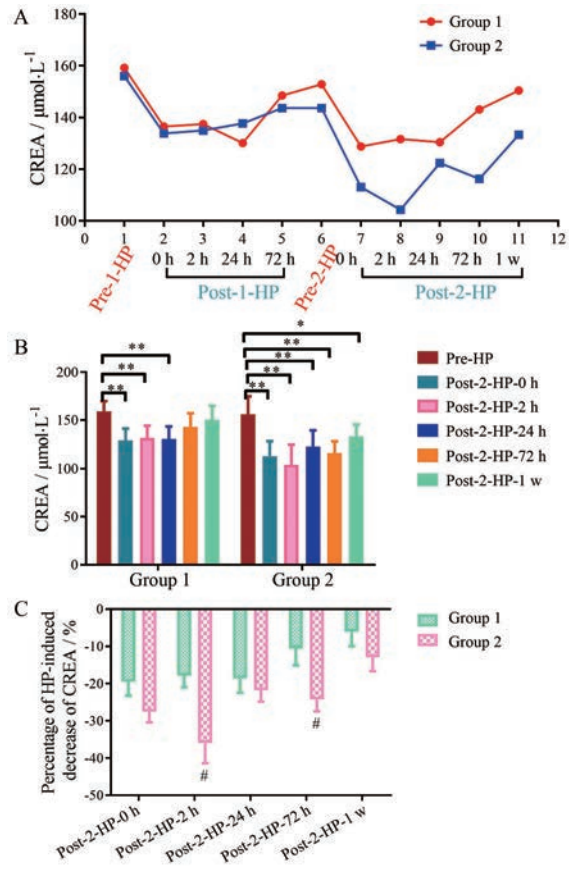


Figure 6 Effects of different frequency HP treatments on creatinine (CREA) clearance in CKD beagles. A: Changes in CREA levels in the two groups after two HP treatments; B: Compared with the levels before HP treatment, changes in CREA after the second HP treatment in the two groups; C: At each time point, the HP-induced percentage decrease in CREA after the second HP treatment. $n = 6, \bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; # $P < 0.05$ vs group 1

材料。吸附性是由于范德华引力或产生氢键的结果, 分子筛性是由于其本身多孔性结构所决定的。本实验所用血液灌流器大孔树脂的孔径分布为 50 D~40 kD, BUN、CREA、PTH 和 β_2 -MG 的分子质量分别为 60 D、113 D、9 300 D 和 11.8 kD, 均在大孔树脂的允许吸附范围内。在本实验中, 两个治疗组在每次 HP 治疗后均能显著降低 CKD 犬体内 BUN、CREA、 β_2 -MG 和 PTH 水平, 3 天 1 次治疗更能有效降低 CKD 比格犬体内毒素水平, 减少毒素在体内的蓄积。不管是小分子毒素 (BUN、CREA), 还是中、大分子毒素 (PTH、 β_2 -MG), 均出现 HP 治疗后体内水平反弹的现象, 文献也曾报道过此现象^[19]。这与循环血量、毒素在体内房室分布及房室间的转移、生成速度和半衰期等因素有关^[20-23]。在 CKD 患者体内, 由于肾脏功能受损, 肾清除率下降, 当肾外清除率、残肾清除率以及半衰期低于毒素生成量时, 毒素在体内的产生和清除不能达到平衡使得毒素

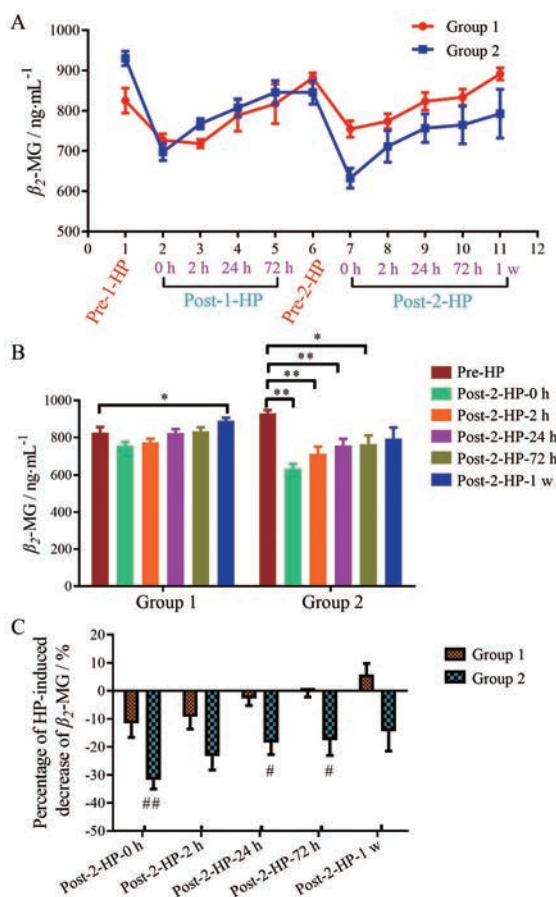


Figure 7 Effects of different frequency HP treatments on beta-2-microglobulin (β_2 -MG) clearance in CKD beagles. A: Changes in β_2 -MG levels in the two groups after two HP treatments; B: Compared with the levels before HP treatment, changes in β_2 -MG after the second HP treatment in the two groups; C: At each time point, the HP-induced percentage decrease in β_2 -MG after the second HP treatment. $n = 6$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; # $P < 0.05$, ### $P < 0.01$ vs group 1

在体内蓄积。其中,在本实验中,肾外清除率受HP治疗频率和治疗时长的影响,固定HP治疗时长为2h,从实验结果可以看出,高频率HP治疗可以明显减少毒素在CKD比格犬体内蓄积。以上4种毒素属于半衰期较短、生成速率较快的物质,结合实验结果,根据临床血液透析治疗情况(因临床上血液灌流需与血液透析联合使用),本研究推荐1周2次(每3天1次)HP治疗方案,对毒素清除效果更佳。

两次不同频率HP治疗后,对血液学检查结果进行如下评价。第二次HP治疗后,两组RBC、HCT和HGB均略有减少,但是,这不需要任何治疗,也没有发现溶血的迹象,并在HP治疗后24h即达到治疗前水平。在两次HP治疗后0h,出现PLT减少症,在之前的文献报道中^[24],平均而言,任何吸附柱的血小板计数都比其基线值减少20%~50%^[25-28],本实验结果约40%左右,但是,

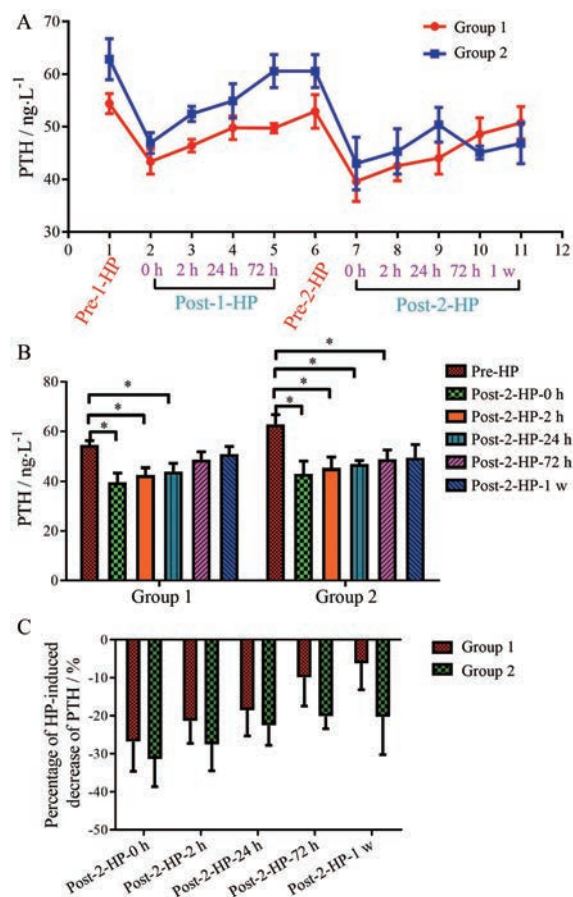


Figure 8 Effects of different frequency HP treatments on parathyroid hormone (PTH) clearance in CKD beagles. A: Changes in PTH levels in the two groups after two HP treatments; B: Compared with the levels before HP treatment, changes in PTH after the second HP treatment in the two groups; C: At each time point, the HP-induced percentage decrease in PTH after the second HP treatment. $n = 6$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$

血小板数量的减少是暂时的,没有出现出血并发症,并在HP治疗后2h恢复至HP治疗前水平。HP治疗后导致WBC减少的现象并不确定,在某些研究中据报道高达50%,而在其他研究中则完全没有^[25,28,29]。本实验出现短暂性WBC减少症,HP治疗后2h开始回升,这与临床上血液透析期间,与发生在人的血液灌注过程中所观察到的现象相似^[10],可能是HP色谱柱的非特异性吸附、白细胞的边缘化和表面接触补体激活的结果^[30,31]。

抗凝仍然是使用血液灌流的主要问题。在本研究中,通过适当的抗凝方案有效控制了肝素激活的APTT暂时延长,未出现血栓和出血并发症等不良反应,未出现严重不良事件。

HP治疗后,两组均出现血钾水平降低,在治疗后24h即恢复至治疗前水平。临床使用时合并血液透析可以改善此情况。HP治疗对其他电解质影响不大。

两组在 HP 治疗后,对肝功能指标 ALT、AST、ALB 和 TP 的影响都是短暂的,在 72 h 均可恢复至治疗前水平。临床应用时,对本身肝功能异常、营养不良的患者应密切监测相关指标。HP 治疗对各组动物呼吸均未造成影响。在 HP 治疗期间,两组均出现一定程度的 QTc 间期延长,因此临床 HP 治疗应注意监测心电图和血压,避免心律失常和高血压等不良反应。

本实验所用的特殊定制小型血液灌流器不仅能清除小分子毒素,也能解决常规血液透析不能清除中、大分子毒素的问题。评价多次 HP 治疗对 CKD 比格犬的安全性和有效性,与临床推广方案(7天1次)相比,更高频率的3天1次治疗未造成机体实质性危害,未出现安全隐患,且更利于毒素清除,利于患者预后。具体临床应用推广还需考虑患者依从性、国家医保政策以及患者经济能力等其他因素。

这项研究的局限性在于仅选择了几种代表性的小分子水溶性和中等分子毒素,例如 CREA、BUN、PTH 和 β 2-MG,来评价 HP 对这些尿毒症毒素的清除效果,对蛋白质结合类尿毒症毒素(如酚类和吡啶类化合物)及其他毒素的清除效果需要进一步研究。另外,由于动物实验的不易操控性,不能建立动静脉瘘进行持续性多次 HP 治疗,仅产生了两次 HP 治疗,治疗周期短可能导致结果受限。本研究中的小样本量可能是另一个重大限制,因此还需要更大的样本进行深入研究。此外,本实验结果统计采用的是治疗前后自身对照,未设立正常动物组和常规血液透析组阳性对照组,在后期研究中会增设,进一步探究 HP 治疗的现实临床意义。

作者贡献: 安梦瑶、刘昌孝、葛鹏和胡雷负责实验方案设计和技术难点解决;安梦瑶、葛鹏、钟飞和周博宇负责具体实验和数据分析;安梦瑶和刘昌孝负责论文书写、修改。

利益冲突: 所有作者声明不存在利益冲突。

References

- [1] Di Lullo L, Rivera R, Barbera V, et al. Sudden cardiac death and chronic kidney disease: from pathophysiology to treatment strategies [J]. *Int J Cardiol*, 2016, 217: 16-27.
- [2] McMahon GM, Waikar SS. Biomarkers in nephrology: core curriculum 2013 [J]. *Am J Kidney Dis*, 2013, 62: 165-178.
- [3] Lekawanvijit S, Kompa AR, Wang BH, et al. Cardiorenal syndrome: the emerging role of protein-bound uremic toxins [J]. *Circ Res*, 2012, 111: 1470-1483.
- [4] Lisowska-Myjak B. Uremic toxins and their effects on multiple organ systems [J]. *Nephron Clin Pract*, 2014, 128: 303-311.
- [5] Gejyo F, Kawaguchi Y, Hara S, et al. Arresting dialysis-related amyloidosis: a prospective multicenter controlled trial of direct hemoperfusion with a beta2-microglobulin adsorption column [J]. *Artif Organs*, 2004, 28: 371-380.
- [6] Li DY, Chen YM, Li M. Effect of hemodialysis and hemoperfusion combined therapy on micro-inflammatory factor and calcium phosphorus metabolism of patients with long-term hemodialysis [J]. *Med Recapitv (医学综述)*, 2013, 19: 1493-1496.
- [7] Lu W, Jiang GR, HD/HP versus HD trial Group. Randomised, open-label, multicentre trial comparing haemodialysis plus haemoperfusion versus haemodialysis alone in adult patients with end-stage renal disease (HD/HP vs HD): study protocol [J]. *BMJ Open*, 2018, 8: e022169.
- [8] Liu YY, Wu DS, Pan L, et al. Clinical effect of hemoperfusion (HA230 combined HA330) on acute paraquat poisoning [J]. *Chin J Gen Pract (中华全科医学)*, 2015, 13: 50-51, 141.
- [9] Xing YD, Wang HJ, Kong XD, et al. The efficacy of immunoadsorption with infliximab therapy on the modulation of disease activity in patients with severe rheumatoid arthritis [J]. *Natl Med J Chin (中华医学杂志)*, 2018, 98: 1849-1853.
- [10] Huang Z, Wang SR, Su W, et al. Removal of humoral mediators and the effect on the survival of septic patients by hemoperfusion with neutral microporous resin column [J]. *Ther Apher Dial*, 2010, 14: 596-602.
- [11] Ebihara I, Hirayama K, Nagai M, et al. Angiotensin balance in septic shock patients with acute kidney injury: effects of direct hemoperfusion with polymyxin B-immobilized fiber [J]. *Ther Apher Dial*, 2016, 20: 368-375.
- [12] Chen SJ, Jiang GR, Shan JP, et al. Combination of maintenance hemodialysis with hemoperfusion: a safe and effective model of artificial kidney [J]. *Int J Artif Organs*, 2011, 34: 339-347.
- [13] Vaneerdeweg W, Buysse N, De Winne T, et al. A standardized surgical technique to obtain a stable and reproducible chronic renal failure model in dogs [J]. *Eur Surg Res*, 1992, 24: 273-282.
- [14] Rosenbaum JL, Kramer MS, Raja R. Hemoperfusion with uncoated amberlite XE-336 resin in normal and uremic dogs [J]. *Nephron*, 1978, 21: 27-37.
- [15] Takada K, Palm CA, Epstein SE, et al. Assessment of canine pancreas-specific lipase and outcomes in dogs with hemodialysis-dependent acute kidney injury [J]. *J Vet Intern Med*, 2018, 32: 722-726.
- [16] Ma YL, Yang XL, Tang ZY. Impact of hemoperfusion combined with hemodialysis on left ventricular function in patients with maintenance hemodialysis [J]. *Chin J Blood Purif (中国血液净化)*, 2013, 12: 175-179.
- [17] Stefanovic V, Kostic S, Djordjevic V, et al. Beta 2-microglobulin elimination in end-stage renal disease patients on renal replacement therapy [J]. *Perit Dial Int*, 1993, 13 Suppl 2: S520-S522.
- [18] Winchester JF, Salsberg JA, Levin NW. Beta-2 microglobulin in ESRD: an in-depth review [J]. *Adv Ren Replace Ther*, 2003, 10: 279-309.
- [19] Maeda K, Shinzato T, Ota T, et al. Beta-2-microglobulin generation rate and clearance rate in maintenance hemodialysis patients

- [J]. *Nephron*, 1990, 56: 118-125.
- [20] Floege J, Bartsch A, Schulze M, et al. Clearance and synthesis rates of beta 2-microglobulin in patients undergoing hemodialysis and in normal subjects [J]. *J Lab Clin Med*, 1991, 118: 153-165.
- [21] Odell RA, Slowiaczek P, Moran JE, et al. Beta 2-microglobulin kinetics in end-stage renal failure [J]. *Kidney Int*, 1991, 39: 909-919.
- [22] Leypoldt JK. Kinetics of beta2-microglobulin and phosphate during hemodialysis: effects of treatment frequency and duration [J]. *Semin Dial*, 2005, 18: 401-408.
- [23] Roberts DM, Buckley NA. Pharmacokinetic considerations in clinical toxicology: clinical applications [J]. *Clin Pharmacokinet*, 2007, 46: 897-939.
- [24] Winchester JF. Sorbent hemoperfusion in end-stage renal disease: an in-depth review [J]. *Adv Ren Replace Ther*, 2002, 9: 19-25.
- [25] Falkenhagen D, Gottschall S, Esther G, et al. *In vitro* assessment of charcoal and resin hemoadsorbents [J]. *Contrib Nephrol*, 1982, 29: 23-33.
- [26] Mamdani B, Dunea G, Siemsen AW. Long-term hemoperfusion with coated activated charcoal [J]. *Clin Toxicol*, 1980, 17: 543-546.
- [27] Mydlik M, Bucek J, Derzsiova K, et al. Influence of charcoal haemoperfusion on platelet count in acute poisoning and during regular dialysis treatment [J]. *Int Urol Nephrol*, 1981, 13: 387-389.
- [28] Stein G, Sperschneider H, Borner A, et al. Influence of hemoperfusion with XAD-4 resin on the concentration of biologic constituents in the blood [J]. *Int J Artif Organs*, 1982, 5: 105-109.
- [29] Koffler A, Bernstein M, LaSette A, et al. Fixed-bed charcoal hemoperfusion. Treatment of drug overdose [J]. *Arch Intern Med*, 1978, 138: 1691-1694.
- [30] Ghannoum M, Bouchard J, Nolin TD, et al. Hemoperfusion for the treatment of poisoning: technology, determinants of poison clearance, and application in clinical practice [J]. *Semin Dial*, 2014, 27: 350-361.
- [31] Craddock PR, Fehr J, Brigham KL, et al. Complement and leukocyte-mediated pulmonary dysfunction in hemodialysis [J]. *N Engl J Med*, 1977, 296: 769-774.