

Ферментативный метод удаления мочевины из отработанного диализирующего раствора

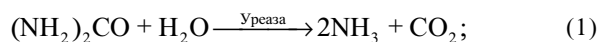
Аннотация

Статья посвящена исследованию возможностей регенерации отработанного диализирующего раствора комбинацией ферментативного и сорбционного методов. В качестве фермента используется уреаза, иммобилизованная на твердофазный носитель. Представлены результаты экспериментальной апробации комплексной сорбционной колонки, реализующей данные методы, а также перспективы ее использования в составе блока регенерации носимого аппарата «искусственная почка».

На сегодняшний день основным способом поддержания жизни людей, страдающих хронической почечной недостаточностью, является искусственное очищение крови. Основными методами искусственного очищения являются гемодиализ и перитонеальный диализ. Однако они не в полной мере позволяют восполнить функции почки, проходят с использованием массивного оборудования и только два-три раза в неделю, вследствие чего возникают значительные колебания концентраций веществ во внутренней среде организма [1].

В последние десятилетия сохраняется устойчивый интерес к разработке носимого аппарата «искусственная почка» (НАИП). НАИП имеет перспективы существенно повысить мобильность пациента и обеспечить его непрерывной низкопоточной заместительной почечной терапией, осуществляя постоянную корректировку гомеостаза. НАИП может быть выполнен на основе процедуры гемодиализа или перитонеального диализа. В обоих подходах возникает необходимость очищения отработанного диализирующего раствора от метаболитов в портативном внешнем устройстве для постоянного восстановления его химического состава. Целью рассматриваемой работы является исследование возможностей удаления мочевины из диализирующего раствора путем ее гидролиза в присутствии иммобилизованной уреазы.

Гидролиз мочевины происходит в соответствии со следующим уравнением:



при этом образуются вещества, которые необходимо дополнительно удалять из раствора: аммиак, ионы водородистого натрия, ацетат-ионы.

Принцип регенерации и вторичного использования диализата реализуется в колонках системы REDY (англ. REcirculating DialYsis) [2] и в системе AWAK (Automated wearable artificial kidney) [3], которые способны удалять из организма мочевины, креатинин, мочевую кислоту и другие азотсодержащие продукты метаболизма.

Принцип колонки основан на гидролизе мочевины путем ферментативной реакции в присутствии уреазы. Колонка состоит из фосфата циркония (ZrP), окиси циркония (ZrO₂) активированного угля и уреазы (рис. 1). Отработанный диализирующий раствор последовательно проходит через следующие слои: уреазы, фосфат циркония, оксид циркония и активированный уголь. На первом этапе происходит ферментативный гидролиз мочевины с выделением ионов аммония. После этого диализат проходит через слой фосфата циркония, где аммоний и другие катионы поглощаются и обмениваются на ионы водородистого натрия. Эти ионы замещаются ацетат-ионами при прохождении диализата через оксид циркония. Конечный компонент колонки – активированный уголь, который адсорбирует органические соединения. Азотистые уремические метаболиты, за исключением аминокислот с низкой молекулярной массой, полностью адсорбируются из диализата [4].

Уреаза может находиться в свободной или иммобилизированной

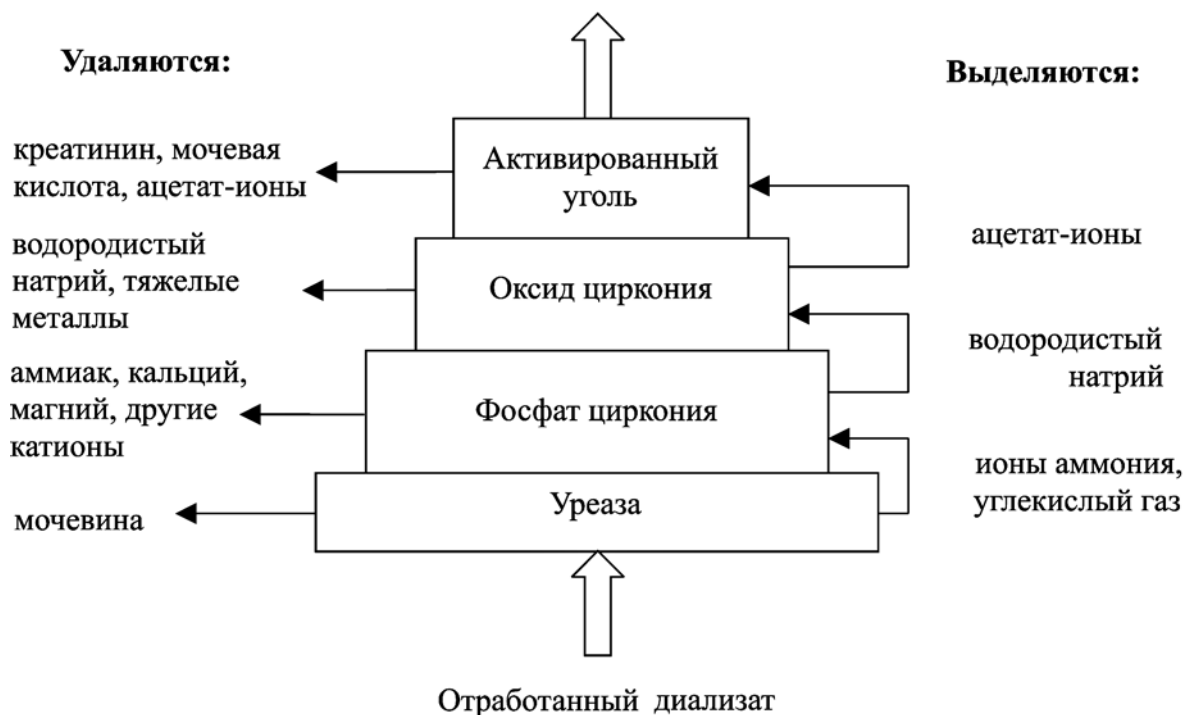


Рис. 1. Структурная схема сорбционной колонки REDY

ванной форме. В случае использования свободной уреазы скорость гидролиза прямо пропорциональна ее концентрации [5], кроме того, ее использование возможно только однократно. Имобилизованная уреаса остается в сорбционной колонке, при этом гидролиз протекает только на поверхности ее твердофазного носителя, что позволяет контролировать удаление продуктов разложения и повысить каталитическую активность уреазы в разы.

В качестве твердофазного носителя для иммобилизации уреазы подходят несколько смол. В табл. 1 приведена активность иммобилизованной уреазы на некоторых твердофазных носителях.

Таблица 1
Активность иммобилизованной уреазы на некоторых твердофазных носителях

Сорбент, способ иммобилизации	Активность, мг/(мл·мин)
Леватит TP 207 с использованием EDC, NHS	0,07
Леватит VP OC 1065, глутаровый альдегид	0,1
Сефароза CL-4В, окисленная периодатом натрия	0,1
Леватит VP OC 1065, аскорбиновая кислота	2
Сефароза CL-4В, DADEG, аскорбиновая кислота	4,6

Из всех способов иммобилизации уреазы при иммобилизации на сефарозу активность уреазы изначально была самой высокой.

Для определения оптимальных условий хранения иммобилизованной уреазы была измерена ее активность через 4 и 7 дней после иммобилизации при разных температурах. Результаты приведены в табл. 2.

Таблица 2
Активность иммобилизованной уреазы при различных температурах хранения

Время хранения, дни	Активность при температуре		
	2...4 °С	20 °С	37 °С
0	4,6	4,6	4,6
4	1,8	1,4	1,6
7	1,6	1,4	1,2

Таким образом, наилучшим условием хранения иммобилизованной уреазы является температурный режим 2...4 °С.

Для исследования возможностей использования иммобилизованной уреазы в составе сорбционной колонки для удаления всех необходимых маркеров диализа (креатинина, мочевины, мочевой кислоты) были изготовлены комплексная сорбционная колонка и экспериментальная установка для ее испытания (рис. 2).

Наполнение комплексной сорбционной колонки проводится путем последовательного послойного наложения ее компонентов друг на друга. Активированный уголь позволяет эффективно поглощать мочевую кислоту и креатинин, в то время как уреаса ускоряет гидролиз мочевины. Продукты реакции гидролиза удаляются фосфатом и оксидом циркония.

Экспериментальная схема представляет собой замкнутый контур с термостатированной емкостью для диализата (температура диализата поддерживалась равной 37 °С) и испытываемой сорбционной колонкой, через которую проходит отработанный диализирующий раствор. Подача диализирующего раствора в колонку осуществляется перистальтическим насосом «Watson Marlow 120U» со скоростью 100 мл/мин. Для количественной оценки скорости удаления метаболитов из

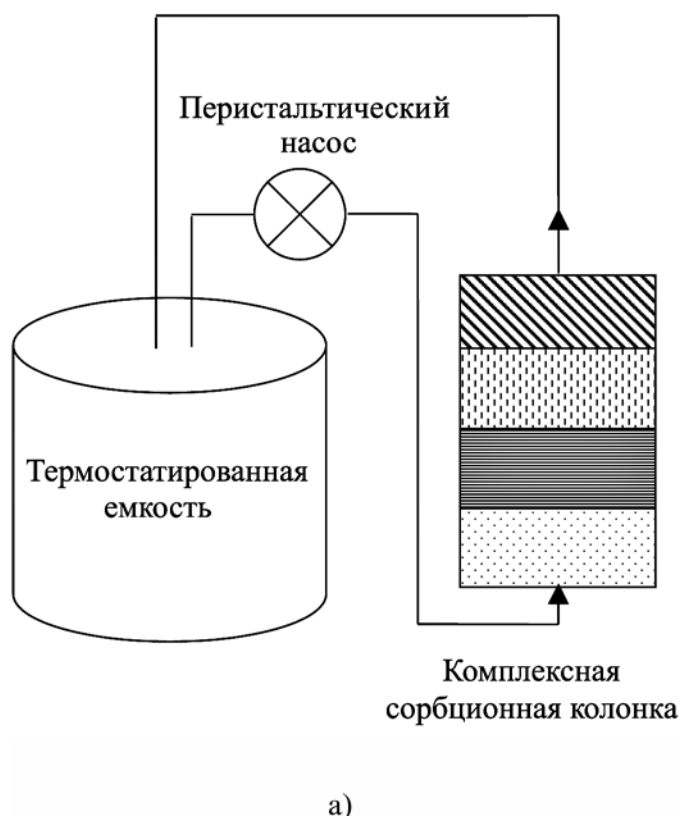


Рис. 2. Схема эксперимента для исследования гидролиза мочевины (а) и структура комплексной сорбционной колонки (б)

раствора были проведены измерения ее концентрации в растворе с помощью биохимического анализатора «Stat Fax 3300». Динамика концентраций креатинина и мочевой кислоты представлена на рис. 3 и 4.

Как видно из приведенных экспериментальных данных, убывание носит экспоненциальный характер как для креатинина, так и для мочевой кислоты. Креатинин и мочевая кислота одинаково хорошо сорбируются активированным углем и впоследствии не переходят обратно в раствор.

В ходе работы сорбционной колонки также наблюдалось

убывание мочевины. Динамика концентрации мочевины представлена на рис. 5.

Для оценки средней и пиковой скорости удаления метаболитов можно использовать формулы (2) и (3):

$$v = \frac{\mu \cdot \Delta c \cdot V}{T}, \quad (2)$$

где v – массовая скорость удаления вещества из диализата, г/ч; μ – молярная масса вещества, г/моль: $\mu_{\text{мочевина}} = 60$ г/моль, $\mu_{\text{мочеваякислота}} = 168$ г/моль, $\mu_{\text{креатинин}} = 670$ г/моль; Δc – измене-

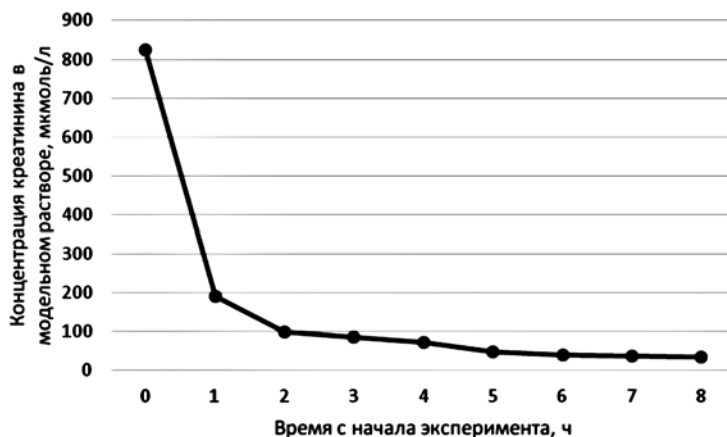


Рис. 3. Динамика концентрации креатинина в модельном растворе при испытании комплексной сорбционной колонки

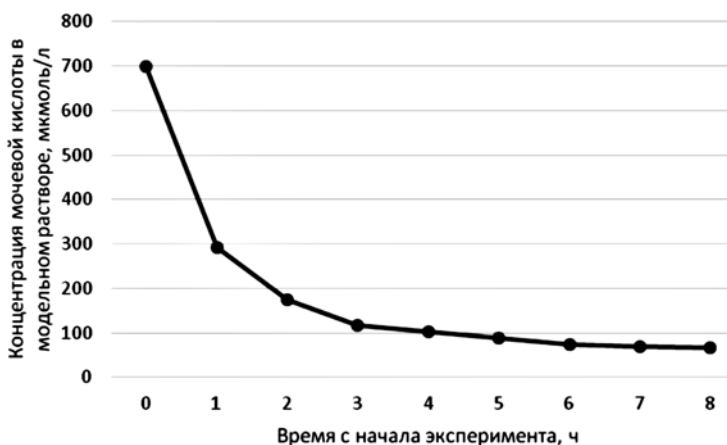


Рис. 4. Динамика концентрации мочевой кислоты в модельном растворе при испытании комплексной сорбционной колонки

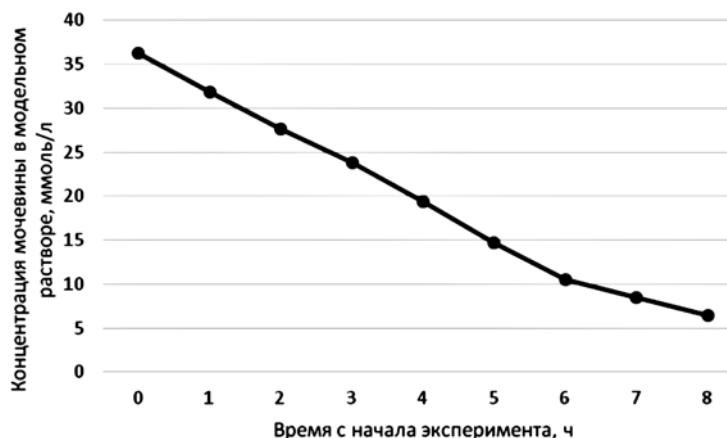


Рис. 5. Динамика концентрации мочевины в модельном растворе при испытании комплексной сорбционной колонки

ние концентрации вещества в диализате за период T ; V – объем диализата, который использовался в эксперименте.

$$v_{\text{пик}} = \frac{\mu \cdot \Delta c \cdot V}{\Delta t}, \quad (3)$$

где $v_{\text{пик}}$ – пиковая массовая скорость удаления вещества из диализата, г/ч; $\Delta t = 1$ ч.

В соответствии с приведенными выше формулами, массовая скорость удаления креатинина за 8 ч эксперимента составляет 0,26 г/ч, при этом пиковая массовая скорость в первый час эксперимента составляет 1,69 г/ч. Массовая скорость удаления мочевой кислоты за 8 ч эксперимента составляет 0,05 г/ч, при этом пиковая скорость удаления мочевой кислоты составляет 0,27 г/ч. Масса мочевины, удаленной за 8 ч эксперимента с помощью КСК, составляет 7,15 г.

По результатам проведенных исследований можно сделать следующие выводы:

- 1) ферментативный метод может использоваться для регенерации отработанного диализирующего раствора, а комплексная сорбционная колонка позволяет удалить из модельного раствора отработанного диализата все необходимые маркеры диализа с физиологически допустимыми скоростями;
- 2) активность иммобилизированной уреазы уменьшается почти в три раза в течение недели после ее изготовления, что указывает на значительную сложность ее хранения;
- 3) вследствие разницы температур хранения и использования фермента требуется его предварительная подготовка перед использованием.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (соглашение № 14.578.21.0011 от 5 июня 2014 г., уникальный идентификатор проекта – RFMEFI57814X0011).

Список литературы:

1. Kooman O.P., Joles J.A., Gerritsen K.G. Creating a wearable artificial kidney: Where are we now? // Expert Review of Medical Devices. 2015. Vol. 12. № 4. PP. 373-376.
2. AWAK Technologies. Los Angeles, 2015 / <http://www.awak.com>. (January 20, 2016).
3. Agar J.W.M. Review: Understanding sorbent dialysis systems // Nephrology. 2010. Vol. 15. № 4. PP. 406-411.
4. Blumenkrantz M.J., Gordon A., Roberts M., Lewin A.J., Pecker E.A., Moran J.K., Coburn J.W., Maxwell M.H. Applications of the REDY sorbent system to hemodialysis and peritoneal dialysis // Artificial Organs. 1979. Vol. 3. № 3. PP. 230-236.
5. Fidaleo M., Lavecchia R. Kinetic Study of Enzymatic Urea Hydrolysis in the pH Range 4–9 // Chemical and Biochemical Engineering Quarterly. 2003. Vol. 17. № 4. PP. 311-318.

*Николай Александрович Базаев,
канд. техн. наук, ст. научный сотрудник,*

*Игорь Олегович Бизюков,
студент,*

*Наталья Ивановна Дорофеева,
студент,*

*Борис Михайлович Путря,
аспирант,*

кафедра биомедицинских систем,

*Национальный исследовательский университет «МИЭТ»,
г. Москва, г. Зеленоград,*

e-mail: bazaev-na@yandex.ru

С.С. Харченко, Р.В. Мещеряков, Д.А. Вольф, Л.Н. Балацкая, Е.Л. Чойнзонов

Программный комплекс речевой реабилитации онкологических больных после резекции гортани

Аннотация

В статье рассматривается разработанный программный комплекс, предназначенный для использования в процессе реабилитационных тренировок у пациентов после полной или частичной потери звучной речи в результате ларингоэктомии. Представлены структура разработанного программного комплекса, алгоритм его работы, и описаны результаты функционального тестирования. Также показаны результаты первичной апробации комплекса на группе здоровых дикторов.

Введение

Одними из наиболее тяжелых последствий хирургического лечения злокачественных новообразований гортани являются полная утрата звучной речи и нарушение дыхательной функции. При этом остро возникает проблема речевого общения пациентов наиболее трудоспособного возраста – от 40 до 60 лет, осложняя и ограничивая их возможности в социальном, трудовом и профессиональном планах. В связи с этим восстановление голосовой функции – одно из приоритетных направлений реабилитации больных. Существует три метода восстановления голосовой функции больных, перенесших ларингоэктомию: логопедический – формирование нового фонационного органа в первом физиологическом сужении пищевода, трахеопищеводное шунтирование с установкой голосовых протезов и использование голосовых аппаратов [1].

По мнению многих авторов [2]-[4], основным методом восстановления речи у больных после полного удаления гортани считается логопедический – формирование псевдоголоса. Эта методика является наиболее физиологичной и потому наиболее распространенной. При такой речи структура, имитирующая работу гортани, образуется в области первого физиоло-

гического сужения пищевода. Формирование пищеводной речи основывается на использовании выработанных в процессе жизни артикуляционных рефлексов речи взрослого человека и компенсаторных возможностей организма [5].

Совершенно оправданным является стремление ученых на современном уровне и на стыке смежных дисциплин комплексно решать проблему улучшения качества жизни онкологических больных, которое во многом зависит от того, насколько успешно прошел процесс голосовой реабилитации [6]. Использование программных средств на основе биологической обратной связи позволяет повысить эффективность голосовой реабилитации и сократить сроки до 3...4 недель в сравнении с традиционной методикой, занимающей 2...4 месяца [7].

Реабилитация пациента наряду с работой психолога и логопеда включает в себя три упражнения для увеличения:

- силы звука;
- длительности фонаций;
- тембра голоса.

Целью настоящей работы является ускорение реабилитационных процессов за счет автоматизации процедуры реабилитации. Автоматизация каждого из упражнений решается как отдельная задача.