

WALDEMAR OLSZEWSKI

DOŚWIADCZALNE PRZECHOWYWANIE NARZĄDÓW
DO PRZESZCZEPIENIA

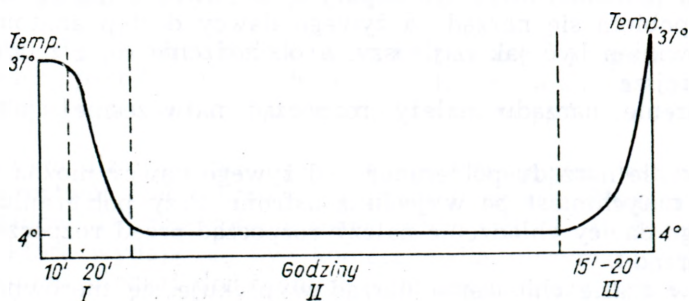
Z Zespołu Chirurgii Doświadczalnej i Transplantologii CMDK PAN w Warszawie
Kierownik Zespołu: prof. dr J. Nielubowicz

Przedstawiono w sposób poglądowy współczesne zasady i metody doświadczalnego przechowywania narządów przed ich przeszczepieniem innemu osobnikowi tego samego gatunku.

Opisano zasady techniki pobierania narządu od dawcy, składy chemiczne płynów stosowanych do przechowywania, rodzaje środków hamujących metabolizm i zapobiegających skurczowi naczyń, technikę oziębiania narządów pobieranych do przeszczepienia, poszczególne metody przechowywania, metody oceny żywotności przechowywanego narządu, oraz aktualne wyniki przechowywania w warunkach doświadczalnych.

1. UWAGI OGÓLNE

Narząd pobrany do przeszczepienia lub też do badań fizjologicznych *ex-vivo* powinien zachować zdolność do wykonywania swojej funkcji. Niedokrwienie, niedotlenienie i manipulacje chirurgiczne powodują, iż narząd zawsze ulega pewnym zmianom wstęcznym. Stosowane obecnie metody przechowywania narządów mają na celu ograniczenie rozwoju zmian w pobieranym narządzie w czasie przechowywania go przez okres wielu godzin. Tak długi czas przechowywania narządu jest niezbędny w transplantologii dla transportu narządu od dawcy do biorcy, a także dla wykonania badań zgodności antygenów transplantacyjnych między dawcą a biorcą. Na ryc. 1 przedstawiono schematycznie okresy oziębiania,



nia, przechowywania i ocieplania narządu. W każdym z tych okresów dochodzi do innego typu zmian w narządzie, a także stosowane są inne metody zapobiegania tym zmianom.

W okresie I obniża się temperaturę narządu z 37° do 4° . Obniża się ją z różną szybkością w zależności od wielkości narządu i sposobu ochładzania. Stosując metodę chłodzenia przepłukiwaniem układu naczyniowego zimnym płynem, temperaturę $6-8^{\circ}$ w środku narządu osiąga się: w wątrobie po 15 minutach, w nerce po 6—8 min., w płucu po 5—6 minutach. W okresie I dochodzi do największych zmian morfologicznych przede wszystkim w śródbłónkach kapilarów, a następnie w komórkach własnych narządu (5). Aby zmiany te były jak najmniejsze — narząd należy oziębić tak szybko jak tylko można. Jest to podstawowa zasada współczesnej transplantologii. Dopuszczalny okres tzw. ciepłego niedokrwienia wynosi dla nerki około 30 minut, dla wątroby zaledwie kilka minut, dla płuca i jelit powyżej 30 minut. O wielkości zmian rozwijających się w tym okresie świadczy przede wszystkim przechodzenie enzymów i potasu wewnątrzkomórkowego do łożyska naczyniowego.

W okresie II ciepłota narządu wynosi $6-8^{\circ}$. Okres ten jest stosunkowo bezpieczny. Dla przechowywania narządu stosuje się tu metodę wypełniania układu naczyniowego płynem konserwującym bez perfuzji lub też metodą stałej hipotermicznej perfuzji. Obydwie metody mogą być połączone z nadciśnieniem tlenowym.

Okres III rozpoczyna się z chwilą przeniesienia narządu z aparatu do przechowywania do ustroju biorcy, połączeniu naczyń narządu z naczyniami biorcy i przywróceniu przepływu normotermicznej krwi. W okresie tym rozwijają się w narządzie bardzo duże zmiany, od których nasilenia zależy czy biorca przeżyje czy nie.

2. ZASADY POBIERANIA NARZĄDU DO PRZECHOWYWANIA

Obowiązują tu te same zasady co w przypadku pobierania narządu do badań fizjologicznych za pomocą normotermicznej perfuzji *ex-vivo*.

a. Zwierzę-dawca narządu nie powinno znajdować się pod wpływem silnych środków anestetycznych, ani w stanie hipotensji. Uogólniona reakcja naczynioskurczowa powoduje niedokrwienie narządu zanim jeszcze zostanie on pobrany do przechowywania.

b. Zaleca się podanie dawcy przed pobraniem narządu leków spazmolitycznych i antyhistaminowych jak benadryl, prokaina lub dibenzylina zapobiegających reakcji naczynioskurczowej, oraz leków stabilizujących błony komórkowe jak chlorpromazyna, fenegan lub sterydy.

c. Dawca powinien otrzymać heparynę w dawce 1 mg/kg wagi ciała.

d. Jeśli pobiera się narząd od żywego dawcy dostęp anatomiczny do narządu powinien być jak najlepszy, a obchodzenie się z narządem jak najdelikatniejsze.

e. Chłodzenie narządu należy rozpocząć najwcześniej jak to jest możliwe.

f. Chłodzenie narządu pobieranego od żywego dawcy można rozpocząć *in situ* lub natychmiast po wyjęciu z ustroju. Przy pobieraniu narządu od martwego dawcy chłodzenie należy rozpocząć przed rozpoczęciem pobierania narządu.

g. Jeśli w czasie chłodzenia narząd wypłukuje się nierówno z krwi, świadczy to o niedrożności części drobnych naczyń, zwykle wskutek skurczu.

h. W czasie pobierania narządu należy unikać uszkodzenia jego naczyń wskutek nadmiernego urażania i pociągania tętnic oraz żył.

i. Pobrany narząd należy natychmiast przenieść do pojemnika z chłodzeniem.

3. PŁYNY DO CHŁODZENIA, PRZECHOWYWANIA I PERFUZJI NARZĄDÓW

Płyny stosowane do przechowywania narządów dzielimy na stosowane do:

- a) chłodzenia narządu,
- b) ochłodzenia narządu i przechowywania go bez perfuzji,
- c) przechowywania bez perfuzji po uprzednim ochłodzeniu innym płynem,
- d) przechowywania za pomocą perfuzji.

W zależności od metody przechowywania płyny te różnią się składem.

3.1. Płyny do chłodzenia

Do szybkiego chłodzenia narządu za pomocą krótkotrwałego przepłukiwania układu naczyniowego najlepiej jest używać płynu elektrolitowego, izo- lub nieznacznie hipertonicznego, o składzie elektrolitowym zbliżonym do składu osocza i pH doprowadzonym do 7.4. Nie należy dodawać do takiego płynu białka, gdyż może ono łączyć się z elementami krwi znajdującej się jeszcze w naczyniach i powodować mechaniczne zatkanie naczyń włosowatych narządu. Nie należy także dodawać do płynów elektrolitowych zbyt dużych ilości dodatkowych substancji jak antybiotyków, dwuwęglanów, glukozy itp. by nadmiernie nie zwiększyć osmolarności. Nie należy także dodawać pełnego osocza, gdyż w niskiej temperaturze wytrącają się z niego fosfolipidy, zamykające mechanicznie światło mikrokrażenia. Płynem najczęściej używanym do chłodzenia jest płyn Ringera, oziębiony do 4° lub nieco poniżej, przy pH doprowadzonym za pomocą dwuwęglanu sodu do 7.4. Należy bardzo dokładnie sprawdzać temperaturę płynu, gdyż nawet krótkie przetrzymanie go w temperaturze pokojowej powoduje jego ocieplenie.

Do chłodzenia powierzchniowego można używać płynu Ringera oziębionego do temp. 1—4°, z kawałkami lodu. Należy jednak uważać, by lód nie dotykał bezpośrednio narządu.

Narządy można także oziębiać przez naczynia, stosując płyny elektrolitowe używane do przechowywania (patrz płyny do przechowywania).

3.2. Płyny do ochładzania narządów i przechowywania bez perfuzji lub przechowywania bez perfuzji po ochłodzeniu innym płynem

Podstawowym dla wszystkich płynów konserwujących jest oczywiście izotoniczny roztwór elektrolitowy, najczęściej roztwór Ringera z dodatkiem mleczanów. Do tego płynu różni autorzy (1, 3, 4) dodają szereg substancji, które wydają się być konieczne dla utrzymania żywotności narządu *ex-vivo*. Rodzaj dodawanych substancji zależy także od czasu przez jaki chcemy przechowywać narząd. Dodaje się więc glukozę, jako źródło energii dla narządu, w którym mimo niskiej temperatury przebiegają w dalszym ciągu procesy metaboliczne, oraz heparynę zapobiegającą krzepnięciu fibrynogenu, którego niewielkie ilości zawsze znajdują

się w łożysku naczyniowym. Przeciętne stężenie glukozy w płynie konserwującym powinno wynosić 200 mg%. Z innych składników dodaje się antybiotyki, środki spazmolityczne jak persantynę, dibenzylinę, prokainę, benadryl i inne środki antyhistaminowe, a także dwuwęglany dla zbliżenia pH do 7.4. Podaje się także leki stabilizujące błony komórkowe jak chlorpromazynę, kortykoidy i dibenzylinę.

Niektórzy uważają, iż stężenie potasu w płynie konserwującym powinno być nieco wyższe niż normalnie w osoczu (4), jeszcze inni (3) stosują płyn o takim stężeniu potasu jaki znajduje się wewnątrz komórek. Skład tych płynów wygląda następująco:

Płyn Largiadiera (4): sól 140 mEq/l, potas 10 mEq/l, wapń 5 mEq/l, magnez 3 mEq/l, chlor 102 mEq/l, octany 50 mEq/l, asparaginiany 6 mEq/l, glukoza 2 g/l, dekstran 40000 50 g/l, heparyna 50 mg/l, 0,3 n TRIS 1,25 ml/l, prokaina 500 mg/l, dwuwęglany 4,8 mEq/l. Płyn ten ma pH 7.4. i osmolarność 310 mmol/l.

Płyn Collinsa (C5) (3): KH_2PO_4 15 mEq/l (2,05 g/l), K_2HPO_4 8,5 mEq/l (9,7 g/l), KCl 15 mEq/l (1,12 g/l), NaHCO_3 10 mEq/l (0,84 g/l), MgSO_4 60 mEq/l (7,38 g/l), chlorowodorek prokainy 0,1 g/l, heparyna 5000 j/l, dibenzylina 0,025 g/l, glukoza 25,0. Siarczan magnezu oraz glukozę należy dodać jako roztwór 50% bezpośrednio przed użyciem płynu.

Uzasadnieniem stosowania wysokiego stężenia jonu potasowego jest obserwacja, z której wynika, że zapobiega ono utracie potasu wewnątrzkomórkowego, co jest powszechnie znanym zaburzeniem towarzyszącym niedokrwieniu.

Dla przechowywania narządu przez okres kilku godzin wydaje się konieczne dodanie do płynu konserwującego substancji wysokocząsteczkowych, trudno przenikających przez ścianę kapilarów i podnoszących ciśnienie onkotyczne. Do takich substancji należy albumina osocza, dekstran, a nawet osocze, jednak bez fosfolipidów. Dodatek tych składników do płynu zapobiega powstawaniu obrzęku narządu. Skład płynu z dodatkiem osocza według Schalma (6) przedstawia się następująco: świeże osocze z heparyną 200 ml, glukoza 5% 4 ml, 2% chlorowodorek prokainy 5 ml, wodny roztwór hydrokortyzonu 5 mg, 1,4% NaHCO_3 10 ml, penicylina 50000 j.

3.3. Płyny do przechowywania za pomocą stałej perfuzji

Na pierwszym miejscu należy tu umieścić rozcieńczoną krew allogenną. Płyn ten stosowany przede wszystkim do przechowywania wątroby, powinien mieć następujący skład (2): 1 część krwi + 1 część buforowanego do 7.4. roztworu elektrolitowego, zawierającego 5 g% dekstranu niskocząsteczkowego, 15 mg% glukozy, 2 mEq/l siarczanu magnezu, 50 mg/l polokainy i 100 mg/l heparyny.

Drugim z kolei zalecanym płynem jest allogenne osocze pozbawione fosfolipidów (1). Technika przygotowania tego płynu jest następująca: zebrane od kilku zwierząt osocze zamraża się do -20° , następnie szybko rozmraża w temp. 45° i filtruje kolejno przez sączi o wymiarze porów 1,2; 0,45 i 0,22 mikrona. Do 1 litra przesącza dodaje się siarczan magnezu w ilości 8,12 mEq/l, 100 mg hydrokortyzonu, 80 j. insuliny, 10 mg fenolsulfataleiny i 200000 j. penicyliny. Osmolarność należy doprowadzić do 300 mOsm/kg wody dodając wodę lub mannitol, stężenie sodu winno wynosić 140 mEq/l, a potasu 5 mEq/l.

4. ŚRODKI HAMUJĄCE METABOLIZM I ZAPOBIEGAJĄCE SKURCZOWI NACZYŃ

Zmniejszenie lub zahamowanie aktywności enzymatycznej wewnątrzkomórkowej za pomocą środków farmakologicznych mogłoby skuteczniej hamować metabolizm niż hipotermia. Jednakże w chwili obecnej nie są znane leki, które w sposób kontrolowany mogłyby obniżyć proces przemian komórkowych. Wg niektórych autorów (3, 6) dodatni wpływ na skuteczność przechowywania mają fenotiazyny, będące lekami stabilizującymi błonę komórkową oraz błony lizosomalne. Należy do nich fenergan i chloropromazyna. Podobne działanie ma dibenzylina. Ten ostatni lek działa także blokująco na zakończenie alfa, zapobiega więc reakcji naczynioskurczowej w narządach pobieranych do przechowywania. Z innych środków należy wymienić fluorek sodu oraz siarczan magnezu, które podane np. do serca przed okresem niedokrwienia znacznie przedłużają tolerancję na niedokrwienie. Sterydy stabilizują błony komórkowe. Mannitol poprawia przepływ krwi przez nerki, stąd zwiększa tolerancję na niedokrwienie.

Ze środków zapobiegających reakcji naczynioskurczowej należy jeszcze wyliczyć prokainę, benadril, persantynę, papawerynę. Wszystkie środki hamujące metabolizm, stabilizujące błony komórkowe i działające spazmolitycznie na naczynia powinny być podawane do krążenia narządu jeszcze w okresie normotermii. W warunkach hipotermii działanie ich zostaje wybitnie obniżone.

5. TECHNIKA OZIĘBIANIA NARZĄDU

W celu szybkiego oziębienia narządu do naczynia doprowadzającego krew do narządu podłącza się zestaw kroplówkowy wypełniony płynem chłodzącym. Płyn ten wypłukuje krew i oziębia narząd od wewnątrz. Powinien on wpływać pod ciśnieniem nie przekraczającym dla nerki 100 cm słupa wody, dla wątroby 40 cm i dla płuca 40—70 cm. Ilość płynu winna wynosić 250 ml/100 g wagi narządu. W czasie wprowadzania kaniuli do naczynia i chłodzenia należy uważać, by nie uszkodzić ściany naczynia.

Narząd, który pobiera się do przeszczepienia, można oziębiać *in situ* w ustroju żywego lub martwego dawcy, lub dopiero po wyjęciu od żywego dawcy. Istnieją dwie podstawowe metody chłodzenia: a) powierzchniowa, w której wyjęty narząd umieszcza się w płynie o temp. 4°, i b) przez układ naczyniowy, przepłukując ten ostatni odpowiednim płynem o temp. 4°.

6. TECHNIKA PRZECHOWYWANIA W HIPOTERMII

Ochłodzony do temp. 6—8° narząd można przechowywać przez okres kilku do kilkudziesięciu godzin, w środowisku o temp. 4°, bez perfuzji układu naczyniowego lub metodą stałej perfuzji. Dodatkowo w każdej z metod można zastosować nadciśnienie tlenowe. Wybór jednej z metod zależy od rodzaju narządu i doświadczenia eksperymentatora.

Metoda przechowywania bez perfuzji polega na tym, iż do układu naczyniowego oziębionego uprzednio narządu wprowadza się płyn elek-

trolitowy z dodatkiem białka, płyn Collinsa, Largiadiera, rozcieńczone lub pełne osocze, albo rozcieńczoną krew. Płyn powinien mieć temp. 4° . Narząd umieszcza się w pojemniku, w którym panuje temp. $2-4^{\circ}$. Pojemnik taki w kształcie łatwej do sterylizacji puszki, ma podwójne dno, w którym krąży ochłodzona do 2° woda. Pojemnik przykrywa się szczelnym wiekiem, najlepiej z przezroczystego materiału, co umożliwia stałą obserwację narządu. Można również umieścić pojemnik w lodówce, w której temperatura będzie utrzymywana w granicach $2-4^{\circ}$. Należy pamiętać, iż temperatura narządu może szybko podnieść się w czasie przenoszenia go do pojemnika, w czasie zdejmowania wieka pojemnika oraz na skutek niedokładności w regulacji temperatury agregatu chłodniczego. Wszystko to może szybko doprowadzić do nieodwracalnego uszkodzenia narządu.

7. TECHNIKA PRZECHOWYWANIA NARZĄDU ZA POMOCĄ HIPOTERMICZNEJ PERFUZJI

Do przechowywania narządu za pomocą stałej lub przerywanej perfuzji potrzebny jest układ perfuzyjny, składający się z chłodzonego pojemnika, wymiennika ciepłego z agregatem chłodniczym, utleniacza i pompy. Urządzenie tego typu jest analogiczne do stosowanego w normotermicznej perfuzji narządów.

Oziębiony do temperatury $6-8^{\circ}$ narząd przenosi się szybko do pojemnika, w którym temperatura nie przekracza 10° i szybko łączy się tętnicą narządu z drenem doprowadzającym płyn perfuzyjny. Jeśli narząd, jak np. wątroba ma podwójne ukrwienie, płyn konserwujący musi także przepływać przez układ wrotny. Płyn konserwujący wypływa z żyły narządu na dno pojemnika, a stąd przez otwór odpływowy do utleniacza. Z utleniacza płyn jest tłoczony pompą rolkową do wymiennika ciepłego. W wymienniku ulega ochłodzeniu płyn perfuzyjny. Wymiennik ciepły może być połączony częścią chłodzącą z pojemnikiem. Temperatura płynu chłodzącego nie może przekraczać 2° . W przeciwnym razie płyn perfuzyjny będzie miał temperaturę znacznie powyżej 4° . Układ perfuzyjny, używany do celów doświadczalnych, powinien posiadać wymiennik ciepły umożliwiający utrzymywanie temperatur zarówno 4° jak i 37° . Normotermia jest bowiem niezbędna dla perfuzji narządu po okresie przechowywania, do sprawdzenia jego funkcji. W zestawie perfuzyjnym powinno używać się pompy typu rolkowego. Daje ona słabą falę tętna i stąd przepływ bardziej fizjologiczny niż przy przepływie stałym. Przewody, przez które płynie płyn konserwujący, powinny być jak najkrótsze, aby uniknąć nadmiaru obcych powierzchni. Najbardziej polecany jest oksygenator membranowy, zapobiegający denaturacji białek znajdujących się w płynie konserwującym. Ciśnienie płynu dopływającego powinno wynosić w tętnicy nerkowej kręzkowej i wątrobowej $40-50$ mmK_g, w t. płucnej 20 mmK_g, w żyłę wrotnej nie powinno przekraczać 10 cm H₂O. Wielkość przepływu nie powinna przekraczać dla nerki $0,5-0,7$ ml/g/min, dla wątroby $0,4$ ml/g/min, dla jelita $0,3$ ml/g/min i dla płuca $0,2$ ml/g/min.

W czasie perfuzji stale powinny być mierzone następujące parametry: temperatura płynu i narządu, pH płynu, pO_2 i pCO_2 , zużycie tlenu, ciśnienie i wielkość przepływu, ciśnienie w linii odpływu oraz niektóre para-

metry biochemiczne, zarówno ogólne, jak i charakterystyczne dla konkretnego narządu. Z ogólnych parametrów biochemicznych należy wyliczyć poziom glukozy, potasu, sodu, kwasu mlekowego, osmolarność, z charakterystycznych dla narządów: aktywność aminotransferaz, dehydrogenazy kwasu mlekowego i poziom glikogenu dla wątroby, dehydrogenazy kwasu mlekowego dla nerki i jelita, aminotransferaz dla serca. Przechowywany narząd powinien być ważony przed i po przechowywaniu. Dopuszczalny przyrost wagi nie może przekroczyć 10%. Większy przyrost wagi świadczy o znacznym uszkodzeniu naczyń włosowatych i nieużyteczności narządu do przeszczepienia.

Typowe zmiany w czasie przechowywania narządu za pomocą hipotermicznej perfuzji to: stały powolny wzrost oporu naczyniowego rozpoznawany, przy stałym przepływie, wzrostem ciśnienia dopływającego płynu konserwującego, obrzęk narządu i przesączenie się przez torebkę narządu płynu perfuzyjnego, obrzęk tkanki łącznej we wnęce narządu, stopniowy spadek pH oraz zużycia tlenu, wzrost stężenia potasu i aktywności enzymów wewnątrzkomórkowych w płynie wypływającym z narządu.

8. TECHNIKA PRZECHOWYWANIA PRZY UŻYCIU NADCIŚNIENIA TLENOWEGO

Niektórzy autorzy (2) polecają przechowywanie narządów połączeniem hipotermicznej perfuzji jak i metody bez perfuzji z nadciśnieniem tlenowym 3 atm. Poglądy na skuteczność nadciśnienia tlenowego są podzielone. Wiadomo, iż tlen znajdujący się pod ciśnieniem 3 atm. może wnikać do tkanki zaledwie na głębokość 4 mm, zaś przy ciśnieniu 8 atm. na głębokość 7 mm. Dotyczy to serca, jelita oraz płuca, natomiast w mniejszym stopniu wątroby i nerki otoczonych grubą torebką włóknistą. Dodatni wpływ tlenu pod ciśnieniem na żywotność narządu można tłumaczyć jego działaniem hamującym oksydację wewnątrzkomórkową. Najbardziej prawdopodobny wydaje się jednak dodatni wpływ nadciśnienia, które zapobiega powstawaniu obrzęku narządu. Stwierdzono to umieszczając narządy w nadciśnieniu, w atmosferze gazów innych niż tlen.

Technika przechowywania w nadciśnieniu tlenowym jest nieco złożona, wymaga bowiem zastosowania komory nadciśnieniowej. W warunkach laboratoryjnych można używać dostosowanego do tego celu autoklawu. Można również zbudować mały pojemnik przenośny wytrzymujący ciśnienie do 15 atm. który umieszcza się w lodówce.

9. TECHNIKA PRZECHOWYWANIA PRZEZ ZAMRAŻANIE

W chwili obecnej można przechowywać w stanie zamrożenia jedynie komórki lub niewielkie fragmenty tkanek. W czasie zamrażania dochodzi do dwojakiego typu zmian: 1) wywoływanych tworzeniem się kryształów lodu na zewnątrz komórki, 2) wywoływanych wewnątrzkomórkowymi kryształami lodu. Przy powolnym chłodzeniu (mrożeniu) z szybkością 1°/min kryształy lodu tworzą się jedynie na zewnątrz komórki. Ponieważ woda zmienia się w kryształy lodu, wewnątrz komórki wzrasta ciśnienie osmotyczne. Kiedy ciśnienie osmotyczne wzrośnie 4—5-krotnie komórka ulega uszkodzeniu. Ulega ona odkurczeniu, a jej

blona pęka. Zmniejsza się ilość potasu w komórce, a na jego miejsce wnika sód. Środki krioprotektywne jak glicerol, glikol, lub tlenek dwumetylosiarki zmniejszają liczbę kryształków tworzących się wokół komórek. Środki te nie są szkodliwe dla komórek, przenikają one do komórek i nie powodują uszkodzenia hipertonicznego. Przenikanie środków krwioochraniających jest jednak powolne, co w niektórych przypadkach może samo prowadzić do efektu osmotycznego.

W przypadku tzw. szybkiego zamrażania (*supercooling*) $100^{\circ}/\text{min}$ woda komórkowa nie jest w stanie opuścić komórki i kryształy lodu tworzą się wewnątrz komórki.

Różnego rodzaju komórki różnie reagują na szybkość zamrażania. Np. komórki drożdży tworzą wewnątrzkomórkowe kryształy lodu przy zamrażaniu $10^{\circ}/\text{min}$, krwinki czerwone dopiero przy zamrażaniu $5000^{\circ}/\text{min}$. Przeżycie komórek przy zamrażaniu zależy więc od szybkości zamrażania oraz twórczenia zewnątrz lub wewnątrz komórkowych kryształów lodu. Każdy narząd jest złożony z różnych komórek różnie reagujących na zamrażanie, stąd trudność a nawet niemożliwość dobrania odpowiedniej szybkości mrożenia dla całego narządu. Problemy związane z badaniami nad zamrażaniem to: 1) droga wprowadzania do narządu środka krioprotektywnego, 2) optymalny środek krioprotektywny, 3) szybkość mrożenia, 4) szybkość odtajenia, 5) usuwanie środka krioprotektywnego z narządu. Obecnie za pomocą zamrażania udaje się przechowywać pełną krew, nabłonek rogówki, komórki przysadki, jajnika, jąder, chrząstkę i skórę.

Technika zamrażania polega na chłodzeniu komórek do temp. 4° , następnie wysyceniu środkiem krioprotektywnym, powolnym mrożeniu do temp. -15° , a następnie szybkim do temp. -196° . Ogrzewanie odbywa się w kąpeli o temp. około 30° , przy czym przed pełnym ogrzaniem usuwa się środek krioprotektywny. Największe nieodwracalne zmiany rozwijają się w narządzie w okresie tajenia. Zewnętrzne warstwy narządu ogrzewają się szybko i stają się izolatorem dla ciepła przechodzącego do wnętrza narządu. Dla równomiernego ogrzewania stosuje się mikrofałę, diatermię krótkofalową oraz perfuzję ciepłym gazem.

10. OCENA ŻYWOTNOŚCI PRZECHOWYWANEGO NARZĄDU

Badania dotyczące skuteczności metod przechowywania obejmują ocenę ilościową i jakościową zaburzeń biochemicznych w komórce narządu, ocenę błony komórkowej, jej badanie ultrastrukturalne i ocenę procesu samouszkodzenia przez układ lizosomalny. Do metod oceny biochemicznej czynności narządu należą dla przykładu: badanie przemiany mleczanów do glukozy, pomiary glukoneogenezy w korze nerki lub wątroby itp. Do metod umożliwiających ocenę uszkodzenia błony komórkowej należy oznaczanie w płynie wypływającym z przechowywanego narządu stężenia jonów, np. potasu, sodu, chloru, które normalnie znajdują się wewnątrz komórki i które uwalniają się lub wchodzą do uszkodzonej komórki. Badanie w mikroskopie elektronowym umożliwia ocenę stopnia uszkodzenia błony komórkowej. Uszkodzenie układu lizosomalnego można rozpoznać badając w płynie wypływającym z przechowywanego narządu aktywność enzymów lizosomalnych jak kwaśna fosfataza czy beta-glukuronidaza. Pod wpływem anoksji i innych czynników błona otaczająca lizosomy ulega pęknięciu i enzymy wydostają się do komórki niszcząc ją.

10.1. Ocena makroskopowa

Już w początkowym okresie chłodzenia narządu można spostrzec gołym okiem, czy narząd wypłukuje się równomiernie z krwi, czy też ma marmurkowane zabarwienie. To ostatnie świadczy o uszkodzeniu narządu. Obrzęk pojawiający się w czasie oziębiania narządu, jak również w czasie przechowywania, świadczy o uszkodzeniu ściany kapilarów i większej ich przepuszczalności.

10.2. Ocena histologiczna

Badanie wycinków w mikroskopie świetlnym nie daje możliwości stwierdzenia zmian komórkowych we wczesnym okresie przechowywania narządu. W tym celu należy wykonać badanie w mikroskopie elektronowym. Stwierdza się wówczas uszkodzenie komórek śródbłonna, obrzęk w przestrzeni okołonaczyniowej oraz nieznaczne uszkodzenie komórek własnych narządu.

10.3. Ocena biochemiczna

Badanie biochemiczne płynu prezerwującego, wypływającego z narządu, stanowi pewien ogólny wskaźnik stopnia uszkodzenia narządu, w żadnym jednak wypadku nie jest dowodem nieodwracalnych zmian w narządzie. Wskutek niedokrwienia narządu dochodzi do wzrostu w łożysku naczyniowym aktywności dehydrogenazy kwasu mlekowego i aminotransferaz, oraz niektórych enzymów lizosomalnych, a także stężenia potasu, kwasu mlekowego, obniżenia się zużycia tlenu i spadku pH.

Do testów żywotności, wykonywanych na wycinku tkanki, należy badanie skrawka narządu w aparacie Warburga oraz test z bromkiem tetrazolium. Ten ostatni test polega na umieszczeniu skrawka tkanki w bezbarwnym roztworze bromku tetrazolium, który przy prawidłowo funkcjonującym układzie dehydrogenaz zmienia zabarwienie na niebieskie. Technika badania jest następująca: 0,25 ml 0,05% roztworu bromku tetrazolium umieszcza się w porcelanowej miseczce z roztworem Hanksa i pokrywa warstwą oleju mineralnego. Fragment tkanki o objętości 1 mm³ umieszcza się w barwniku w temp. pokojowej i mierzy czas do chwili zmiany zabarwienia na niebieskie. Mogą zaistnieć różnice w odczynie czasu między poszczególnymi osobami badającymi, a także w zależności od rodzaju tkanki. Najdłuższe czasy obserwuje się przy badaniu skóry, najkrótsze przy badaniu nerki. Test z tetrazolium posiada większą wartość przy badaniu żywotności tkanki świeżo pobranej niż przy badaniu tkanki przechowywanej. Wg większości autorów czas poniżej 15 s koreluje z przeżyciem przeszczepionej nerki.

Żadna z dotychczas opisanych metod oceny żywotności narządu nie jest w 100% miarodajna. W związku z tym, jedynym testem żywotności jest przeżycie przeszczepionego narządu u biorcy powyżej 3 dni.

11. WYNIKI PRZECHOWYWANIA NARZĄDÓW

Czas skutecznego przechowywania narządu różni się w zależności od rodzaju narządu, metody przechowywania i sposobu oceny czynności prze-

szczepu. Przeciętne czasy przechowywania poza ustrojem przy zachowaniu zdolności podjęcia czynności po przeszczepieniu zostały podane w tabeli I. W poszczególnych laboratoriach osiągnięto pojedyncze rekordowe czasy przechowywania sięgające nawet 72 godzin i więcej. Są to jednak wyjątkowe obserwacje, trudne do powtórzenia w innych ośrodkach, dlatego nie uwzględniono ich w tabeli.

T a b e l a I

Przeciętne czasy skutecznego przechowywania narządów poza ustrojem przy zastosowaniu różnych technik przerzeczacji w warunkach doświadczalnych

Narząd	Prosta hipotermia	Perfuzja hipotermiczna	Hipotermia + nadciśnienie tlenowe	Perfuzja hipotermiczna + nadciśnienie tlenowe
Nerka	8—24 godz.	ok. 24 godz.	ok. 24 godz.	24—48 godz.
Wątroba	2,5 godz.	8 godz.	2,5—4 godz.	8—24 godz.
Jelito	4—8 godz.	8—12 godz.	24 godz.	24 godz.
Płuco	8 godz.	do 24 godz.	24 godz.	do 24 godz.

Jedynym sprawdzianem czy przerzeczacja była skuteczna jest przeżycie narządu i biorcy przez okres co najmniej 3 dni po przeszczepieniu. Oczywiście wynik zależy tu także od tego, czy przechowywany a następnie przeszczepiony narząd musi podtrzymać za pomocą swojej funkcji życie ustroju, czy też jest narządem parzystym, jak np. druga nerka, czy drugie płuco. W tej ostatniej sytuacji przechowywany i przeszczepiony narząd może pozostać przez pewien czas niewydolny, ponieważ jego funkcję spełnia drugi narząd. Właściwie więc aby ocenić skuteczność przechowywania należy zawsze usunąć parzysty narząd.

В. Ольшевски

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ КОНСЕРВИРОВАНИЕ ОРГАНОВ ДЛЯ ТРАНСПЛАНТАЦИИ

Содержание

Наглядным образом представлено современные принципы и методы экспериментальной консервации перед их трансплантацией другой особи одного вида.

Описано принципы техники взятия органа от донора, химический состав жидкостей применяемых к консервации, виды средств тармозящих метаболизм и противоангиоспазматических, технику охлаждения органов браных для трансплантации, отдельные методы трансплантации, методы оценки жизнеспособности консервированного органа, а также актуальные результаты консервирования в экспериментальных условиях.

W. Olszewski

EXPERIMENTAL STORAGE OF TRANSPLANTATION ORGANS

Summary

Contemporary opinions and techniques are presented concerning the storage of organs before homografting procedures. The technique of organs collecting

is described, the chemical composition of storage media is given together with the types of drugs — for metabolism inhibition and vaso-constriction prevention. The technique of cooling of the collected organs is discussed, the storage methods, evaluation of viability of the collected and stored organs and the actual results of storage in experimental conditions are presented.

W. Olszewski

EXPERIMENTELLE AUFBEWAHRUNG DER ORGANE ZUR IMPLANTATION

Zusammenfassung

Es wurden derzeitige Prinzipien und Methoden der experimentellen Aufbewahrung der Organe vor der Implantation einem anderen Homozygot derselben Gattung dargestellt.

Die Prinzipien der Abnahmetechnik des Organs vom Spender, chemische Zusammensetzungen der zur Aufbewahrung angewandten Lösungen, die Arten von Hemmungsmittel gegen Metabolismus und Gefäßkrampf, die Kühlungstechnik der abgenommenen Organe, die Methoden der Aufbewahrung, die Begutachtungsmethoden der Lebenskraft des aufbewahrten Organs sowie aktuelle Ergebnisse der Aufbewahrung unter experimentellen Bedingungen, wurden beschrieben.

PIŚMIENNICTWO

1. Belzer F. O., Ashby B. S., Dunphy J. E.: 24-hour and 72-hour preservation of canine kidneys. *Lancet* 1967, 1, 536. — 2. Brettschneider L. i inni: Conservation of the liver. *Transpl. Proc.* 1969, 1, 132. — 3. Collins G. M., Bravo-Shugartman M., Terasaki P. I.: Kidney preservation for transportation. *Lancet* 1969, 2, 1219. — 4. Largiadier F.: Organ transplantation. Stuttgart G. Thieme 1971. — 5. Olszewski W. i inni: Biochemical and ultrastructural alterations in dog and pig livers procured for transplantation. *Act. Med. Pol.* 1973 (w druku). — 6. Schalm S. W. i inni: A simple method for short-term preservation of a liver homograft. *Transplantation* 1969, 8, 377.

Adres autora: Warszawa, ul. Chałubińskiego 5.