



Wpływ składników płynów do przechowywania narządów na ich trwałość i właściwości biochemiczne

Florian Ryszka¹, Aneta Ostróżka-Cieślak², Barbara Dolińska

¹Farmaceutyczny Zakład Naukowo-Produkcyjny „Biocheffa”, Sosnowiec

²Katedra Farmacji Stosowanej i Technologii Leków,
Śląska Akademia Medyczna, Sosnowiec

The influence of components for stability and biochemical properties on the organs' preservation solutions

Summary

Organs transplantation has become a routine treatment method for patients with terminal organs incapacity. Organs preservation solutions are the key elements of transplantation success. The ideal preservation fluid should be characterized as follows: it contains compounds of the ATP regeneration, minimizes creation of free radicals and cell swelling, prevents intracellular oxidosis, secures specific oncotic pressure and longer storage time (2-3 days or more). The standard preservation solutions used in Poland are: ViaSpan (Belzer solution, UW), HTK (Bretschneider solution, Custodiol), EuroCollins solution and more seldom Celsior.

Key words:

organ preservation solutions: ViaSpan® (Belzer solution, University of Wisconsin – UW), HTK (Bretschneider solution, Custodiol®), EuroCollins solution, Celsior®.

Adres do korespondencji

Florian Ryszka,
FZNP „Biocheffa”,
ul. Kasztanowa 3,
41-200 Sosnowiec;
e-mail: info@biocheffa.pl

W ostatnich kilkunastu latach obserwuje się ogromny postęp w dziedzinie transplantologii narządów: serca, wątroby, nerek, trzustki i płuc. Standaryzacja technik pobierania i przeszczepiania narządów, stosowanie nowych środków immunosupresyjnych oraz opracowanie coraz to skuteczniejszych płynów do perfuzji i przechowywania narządów powoduje, że przeszczep stał się w wielu krajach rutynowym sposobem leczenia pacjentów ze schyłkową niewydolnością narządów.

W okresie ischemii tzn. po zatrzymaniu krążenia, w transplantologii nazywanym okresem ciepłego niedokrwienia (WIT) dochodzi do nieodwracalnego uszkodzenia narządu. Podstawowym sposobem minimalizacji skutków ciepłego niedokrwienia jest hipotermia, która zmniejsza szybkość procesów przemiany materii oraz ogranicza działanie enzymów wewnątrzkomórkowych niszczących elementy komórki (1-4). Zgodnie z zasadą van Hoffa obniżenie temperatury o 10°C zmniejsza szybkość procesów przemiany materii dwukrotnie. Spadek temperatury wpływa jednak na zmniejszenie zasobów związków wysokoenergetycznych ATP oraz obniżenie pH komórkowego. Płyny do przechowywania narządów mają na celu zminimalizować skutki szkodliwego działania niskiej temperatury, zabezpieczać narząd przed następstwami niedokrwienia oraz skutkami działania wolnych rodników, które nasilają swoją aktywność w trakcie przywracania krążenia w tzw. reperfuzji (1-4). Pod względem medycznym znaczące jest również, aby organy można było przechowywać w płynie do prezerwacji przez 2-3 dni, a nawet dłużej. Jest to czas niezbędny do wykonania odpowiednich badań dawcy oraz biorcy, w celu podjęcia ważnych decyzji przedoperacyjnych.

Idealny płyn do przechowywania narządu powinien: zawierać substraty umożliwiające regenerację fosforanowych związków wysokoenergetycznych – ATP, zmniejszać tworzenie wolnych rodników i nadtlenków lub je neutralizować, zapobiegać kwasicy wewnątrzkomórkowej, zmniejszać obrzęk komórek i zapewniać odpowiednie ciśnienie onkotyczne (4,5). W składzie stosowanych obecnie płynów można wyróżnić:

1. Elektrolity. Stężenia elektrolitów są zbliżone do oznaczonych w ustrojowym płynie zewnątrzkomórkowym, charakteryzującym się wysokim stężeniem sodu i niskim potasu. Niska zawartość potasu umożliwia dokładne wypłukanie narządu bez zwiększonego ryzyka obrzęku komórek. Jony sodu są najczęściej wprowadzane w postaci glukonianu sodu o stężeniu 50-150 mM, natomiast potasu jako KH_2PO_4 o stężeniu 10-50 mM. Dodawane są również jony Ca^{2+} w postaci CaCl_2 (0,1-0,5 mM) i jony Mg^{2+} jako glukonian magnezu (1-10 mM), które działają stabilizująco na błony komórkowe. Ponieważ jony Cl^- mają tendencję do swobodnego przenikania przez błonę komórkową do wnętrza komórki, często zastępuje się je nieprzenikającymi anionami: siarczanowym (VI), fosforanowym, laktobionowym, cytrynianowym lub glukonianowym (4,5).

2. Układy buforowe. Płyn do prezerwacji i przechowywania narządów powinien zawierać co najmniej jeden układ buforowy, w celu zapobiegania kwasicy wewnątrzkomórkowej. Najczęściej stosowanymi są: wodorowęglanowy (mieszanina kwaśnego NaHCO_3 i H_2CO_3), fosforanowy (zawierający KH_2PO_4 i K_2HPO_4), cytrynianowy (zawierający $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ i $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$) i histydynowy (zawierający histydynę $\cdot \text{HCl}$ i L-histydynę). Stężenie buforu(ów) powinno być wystarczające do utrzymania pH płynu w granicach 7,4-7,8 przy temperaturze 10°C i najczęściej wynosi 5-200 mM (4-6).

3. Substancje przeciwdziałające obrzękom komórek. Do tej grupy zaliczane są substancje osmotycznie czynne i koloidy zapewniające optymalną siłę onkotyczną. Rafinoza, sacharoza, mannitol, glukoza, chelaty cytrynianów, a także nieprzepuszczalne aniony w postaci laktobionatu i glukonianu mają działanie osmotyczne. Stosuje się je w stężeniach 1-100 mM. Często stosowanymi substancjami onkotycznymi są: skrobia hydroksyetylowana, cyklodekstryny, polietyloglikole, albuminy i dekstran 30, 40 lub 50. Płyny zawierają najczęściej 1-10% substancji onkotycznie czynnych (4,5).

4. Źródła energii. Płyn powinien zawierać jedno lub więcej źródeł energii. Do najczęściej stosowanych należą: glukoza, fruktoza, sacharoza i dekstran w stężeniach 1-20 mM (5).

5. Substraty ATP. Regenerację fosforanowych związków wysokoenergetycznych umożliwiającą wprowadzane do płynów w stężeniu 1-10 mM adenozyne, adenina lub ryboza (5).

6. Antyoksydanty. Funkcję stabilizatorów trwałości płynów mogą pełnić: glutation, witamina C, witamina E, deferoksamina, N-acetylocysteina, katalaza i peroksydaza (4,5,7). Są to substancje wydłużające znacznie trwałość produkowanych płynów. Skuteczność ich działania można ocenić testem „przyspieszonego starzenia”.

7. Substancje wpływające na metabolizm komórek. W tej dużej grupie składników płynów znajdują się m.in. prekursorzy nukleotydów, np. adenina, adenozyne, fosforany; inhibitory enzymów, np. allopurinol (inhibitor oksydazy ksantynowej); hormony: insulina, sterydy (deksametazon). Zapobiegają one uszkodzeniu struktury komórki i przemieszczaniu się enzymów komórkowych (4,5).

8. Substancje tworzące trwałe kompleksy chelatowe z wielowartościowymi jonami metali, przez co znoszą katalityczny wpływ tych jonów na reakcje rozkładu substancji chemicznych (np. wersenian sodu).

Niezwykle istotna jest technologia sporządzania płynów do przeszczepów. Muszą one spełniać bezwzględne wymagania dla leków parenteralnych tzn. jałowość, apirogenność, brak cząstek nierozpuszczalnych i brak substancji przeciwdrobnoustrojowych. Ponadto powinny być izohydryczne i izojoniczne.

Obecnie stosuje się dwa sposoby przechowywania narządów: w prostej hipotermii oraz metodą ciągłej perfuzji pulsacyjnej w hipotermii. Pierwszy sposób polega na wypłukaniu naczyń zimnym płynem konserwującym i przechowaniu w nim narządu w obniżonej temperaturze, natomiast drugi dodatkowo wymaga zastosowania pompy z przepływem pulsacyjnym (1,8). Standardowymi roztworami stosowanymi obecnie w Polsce do płukania i przechowywania narządów są płyny: ViaSpan® (płyn Belzera, University of Wisconsin – UW), HTK (płyn Bretschneidera, Custodiol®), płyn Collinsa (EuroCollins) i rzadziej Celsior®.

Jednym z pierwszych płynów opracowanych do przechowywania narządów w prostej hipotermii był roztwór EuroCollins (1). Przypomina on płyn wewnątrzkomórkowy (tab.), ze względu na wysokie stężenie potasu i niskie sodu. W swoim składzie zawiera m.in. diwodoro- i wodorofosforan potasu, które stanowią skutecz-

nie działający bufor jonu wodorowego (1). Płyn ten pozwala na skuteczne przechowywanie nerek w hipotermii do 48 godzin. Jest mało skuteczny w przypadku perfuzji i reperfuzji dużych narządów, ze względu na naczynioskurczowe działanie wysokiego ładunku potasu (100-130 mM) (4). Również zawarta w płynie glukoza wpływa negatywnie na przechowywanie wątroby, gdyż przenika do hepatocytów, gdzie proces fosforylacji do glukozy-6-fosforanu jest aktywowany przez glukokinazę. W efekcie enzym ten nie jest hamowany przez glikozy-6-fosforan i glukoza zostaje zmetabolizowana do kwasu mlekowego (2). Płyn EuroCollins jest powszechnie stosowany w Europie do przechowywania nerek (4), a przede wszystkim płuc (15).

Stosunkowo uniwersalnym płynem jest roztwór HTK (Custodiol) (tab.) opracowany przez Bretschneidera. Jego nazwa pochodzi od pierwszych trzech liter związków wchodzących w skład płynu (histrydyna, tryptofan, kwas α -ketoglutarynowy). Płyn zawiera niskie stężenie jonów potasu i sodu (odpowiednio 9 i 15 mM), natomiast duże stężenie jonów chloru (50 mM). Ma niską lepkość, dzięki czemu łatwo przenika do mikrokążeń. Początkowo był stosowany do kardioplegii, a obecnie wykorzystywany jest do pobrania wielonarządowych, w tym przede wszystkim nerek i wątroby. Znalazł również zastosowanie do przechowywania przeszczepów żylnych (do pomostowania naczyń wieńcowych). Pozwala na bezpieczne przechowywanie nerek pobranych od dawców z bijącym sercem do 48 godzin, a wątroby do 12 godzin. Udowodniono, że przechowywanie nerki w Custodiolu daje lepsze rezultaty niż w płynie EuroCollins. Jest skuteczniejszy w zapobieganiu spadkowi ATP oraz wzrostowi stężenia mleczanów. Ponadto konserwacja nerek w płynie EuroCollins może powodować zmiany w kłębuszkach nerkowych i skurcz naczyń (4).

Stosunkowo uniwersalne działanie wykazuje opracowany w 1986 r. przez zespół Belzera i Southarda płyn UW (ViaSpan) (tab.). Jest to roztwór wewnątrzkomórkowy, w którym priorytetowymi i wcześniej nie stosowanymi w płynach składnikami są skrobia hydroksyetylowana-HES (osmotyczny koloid, utrzymujący płyn w przestrzeni wewnątrznaczyniowej), mleczan potasu i rafinoza (czynniki działające przeciw obrzękowi komórek) (4). HES jest hydroksylovanym polimerem glukozy o masie cząsteczkowej równej 150 000-350 000 D. Jej główną zaletą jako koloidu jest mniejsza zmiana w śródbłonku naczyń organu w trakcie perfuzji w porównaniu z płynami zawierającymi albuminy (1). Negatywnym czynnikiem natomiast w porównaniu do albumin jest jej stosunkowo wysoka cena, co podnosi koszt płynu o blisko 30% (4). Jest jednak kilka prac w których autorzy twierdzą, że brak tego koloidu w płynie ViaSpan nie pogarsza jakości przeżycia przechowywanych organów (4). Płyn ten jest stosowany do prezerwacji wątroby, trzustki, nerek, jelita cienkiego i serca. Jednak jego wykorzystywanie w kardioplegii jest dosyć dyskusyjne. Na podstawie przeprowadzonych badań dowiedziono, że zastosowanie go do prezerwacji w warunkach laboratoryjnych daje bardzo dobre wyniki, natomiast osiągnięte w warunkach klinicznych rezultaty nie są zadowalające (16). Jedną z potencjalnych przyczyn jest być może wysokie stężenie potasu, mogące powodować uszkodzenie śródbłonka naczyń wieńcowych (17). Wykazuje jednak wysoką skuteczność w prezerwacji nerek

w porównaniu z EC lub HTK. Od blisko 15 lat jest najczęściej stosowanym płynem do przerwacji i perfuzji wątroby (9).

Płyn Celsior (tab.) jest wykorzystywany w kardioplegii. Umożliwia on przechowywanie serca przez 4-6 godzin (4). Może być stosowany do przerwacji organu wyłącznie metodą prostej hipotermii (10). Celsior jest roztworem zewnątrzkomórkowym, charakteryzującym się dużą pojemnością buforową (kwasowa w przybliżeniu 11 mmol, zasadowa 7 mmol) (10). Jego skład umożliwia zahamowanie wzrostu stężenia jonów wapnia w mięśniu sercowym, przeciwdziałanie obrzękom komórek, zapobieganie kwasicy wewnątrzkomórkowej i ochronę przed szkodliwym działaniem wolnych rodników (4). Wykonano badania, z których wynika, że jego skuteczność w przerwacji serca jest porównywalna z Custodiolem (HTK) (10). Przeprowadzono szereg prób przechowywania wątroby i nerek w tym płynie, jednak EuroCollins, HTK i ViaSpan, jak się okazało, były skuteczniejsze (4).

Mimo wielu sukcesów osiągniętych w dziedzinie sporządzania płynów do przeszczepów, nadal prowadzone są badania nad ustaleniem optymalnego składu płynu, który zapewniłby dłuższy czas przeżycia graftu w jak najlepszej formie, poprzez minimalizację skutków niedokrwiennego uszkodzenia organów i skutecznego podjęcia funkcji w ustroju biorcy.

W naszym zespole prowadzone są intensywne badania nad innowacyjnym płynem Biolasolem BM. Podstawą okazało się wprowadzenie do naszego płynu hormonu w postaci prolaktyny, jonów magnezu w postaci fumaranu magnezu oraz cysteiny. Dokonano porównania jego skuteczności z płynem Celsior na izolowanym sercu świni. Stwierdzono, że skuteczność obu płynów w czasie przerwacji tego organu jest podobna.

Wykonano również szereg badań na izolowanej wątrobie świni i królika. Stwierdzono, że zawarta w płynie prolaktyna istotnie wpływa na poprawę wskaźników biochemicznych i funkcjonalnych narządu. Na podstawie analizy statystycznej wyników badań wykazano, że spowalnia ona proces cytolizy komórek wątrobowych, co może świadczyć o jej właściwościach hepatoprotekcyjnych.

Składy prezentowanych płynów do przerwacji przedstawiono w tabeli (10-14).

Tabela

Skład płynów do przerwacji [mM]

	EuroCollins	HTK	UW	Celsior
1	2	3	4	5
adenozyna	–	–	5	–
allopurinol	–	–	1	–
chlorek magnezu	–	4	–	13
chlorek potasu	15	9	–	15
chlorek sodu	–	15	–	–
chlorek wapnia	–	0,015	–	0,25

deksametazon (mg/l)	–	–	8	–
glutation		–	3	3
1	2	3	4	5
glukoza	195	–	–	–
HES (g/l)	–	–	50	–
histrydyna □ HCl □ H ₂ O	–	18	–	–
L-histrydyna	–	180	–	30
insulina (U/l)		–	100	–
jednozasadowy fosforan potasu	15	–	5	–
dwuzasadowy fosforan potasu	42,5	–	20	–
jednozasadowy węglan sodu	10	–	–	–
kwasy L-glutaminowy	–	–	–	20
kwasy laktobionowy	–	–	100	80
kwasy α-ketoglutarynowe	–	1	–	–
D-mannitol	–	30	–	60
penicylina (U/l)	–	–	200	–
D-rafinoza □ 5H ₂ O	–	–	30	–
siarczan magnezu □ 7H ₂ O	–	–	10	–
L-tryptofan	–	2	–	–
wodorotlenek sodu	–	–	–	100
wodorotlenek potasu	–	–	100	–
pH	7,3	7,2	7,4	7,3
osmolarność (mOsm/l)	375	310	320	320-360

Literatura

1. Orłowski T., (1995), *Przeszczepianie nerek*, PZWL, Warszawa.
2. Wolf P., Boudjema K., Ellero B., Cinqualbre J., (1993), *Transplantacja narządów*, Wyd. Volumed, Wrocław.
3. Zapalski S., Chęciński P., (1998), *Kliniczne aspekty niedokrwienia i reperfuzji*, Wyd. α-Medica Press, Bielsko-Biała.
4. Danielewicz R., (2000), *Zastosowanie ciągłej perfuzji pulsacyjnej w hipotermii do przechowywania nerek przed przeszczepieniem*, Wyd. AM, Warszawa.
5. Murphy N., et al., (2004), *Transplant media*, U.S. Pat. Nos. 6,696,238.
6. Ahmad N., Hostert L., et al., (2004), *Kidney Int.*, 66, 77-90.
7. Menasche M., et al., (1996), *Solutions for the perfusion, preservation and reperfusion of organs*. U.S. Pat. Nos. 5, 498, 427.
8. Kayser O., Müller R. H., (2003), *Biotechnologia farmaceutyczna*, PZWL, Warszawa.
9. Upadhy G., Strasberg S., (2000), *Hepatology*, 31, 1115-1122.
10. www.sangstat.com/docs/celsior_PL.pdf.
11. Abrahamse S., Dinant S., Pfaffendorf M., Gulik T., (2002), *Fundamental & Clinical Pharmacol.*, 16, 503-511.
12. Warnecke G., Strüber M., et al., (2002), *Eur. J. Cardiothorac Surg.*, 21, 1073-1079.
13. White S., Contractor H., et al., (1996), *Br. J. Surg.*, 83, 1350-1355.
14. Dittert K., et al., (1997), *J. Urol.*, 157, 1064-1069.
15. Charrueau C., Blonde-Cynober F., et al., (2000), *J. Gastroenterology and Hepatology*, 15, 1199-1210.