

Н. М. Яковец¹, А. М. Федорук¹, О. О. Руммо¹, Е. А. Назарова¹,
Е. Г. Оганова¹, С. И. Кривенко¹, О. А. Юдина²

ВЛИЯНИЕ ГИПОТЕРМИЧЕСКОЙ МАШИННОЙ ПЕРФУЗИИ РАСТВОРОМ «КУСТОДИОЛ» НА ВЫДЕЛЕНИЕ ОСТРОВКОВЫХ КОМПЛЕКСОВ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

УЗ «9-я городская клиническая больница» г. Минска,
РНПЦ Трансплантации органов и тканей¹,
Минское городское патологоанатомическое бюро²

Известно, что сохранение жизнеспособности и функциональной активности изолированных островковых комплексов во многом зависит от применяемого способа консервации поджелудочной железы.

Гипотермическая машинная перфузия раствором «Кустодиол», обеспечивая достаточную эффективную доставку трофических факторов и вымывание продуктов метаболизма из клеток органа, оказывает положительное влияние на выделение островковых комплексов поджелудочной железы по сравнению со статической холодовой консервацией.

Ключевые слова: поджелудочная железа, гипотермическая машинная перфузия, выделение островков Лангерганса, трансплантация.

***H. M. Yakovets, A. M. Fedoruk, O. O. Rummo,
E. A. Nazarova, E. G. Oganova, S. I. Krivenko, O. A. Yudina***

INFLUENCE OF HYPOTHERMAL MACHINE PERFUSION BY KUSTODIOL SOLUTION ON ALLOCATION OF INSULAR COMPLEXES OF A PANCREAS

Preservation of viable and functional active isolated islets is depends on the process of conservation of the pancreas.

Hypothermic machine perfusion with solution «Custodiol», providing efficient delivery of trophic factors and washout of metabolic products of cells, has a positive effect on the release of pancreatic islets in compare with static cold preservation.

Key words: pancreas, hypothermic machine perfusion, islet isolation, transplantation.

Начиная с 1969 года самым распространенным методом сохранения жизнеспособных органов является статическая холодовая консервация (СХК) [3]. Для снижения ишемического повреждения, поддержания целостности клеток и сохранения функции органов были разработаны различные

консервирующие растворы и добавки в них. СХК экономически оправдана, однако этот метод имеет ряд недостатков в виде дефицита функционирования микроциркуляторного русла, ограниченной доставки энергетических субстратов, накопления продуктов метаболизма. Развитие трансплантационных

□ Оригинальные научные публикации

технологий наряду с нехваткой донорских органов закономерно привело к увеличению количества пациентов в листах ожидания, что побудило разработать подходы к использованию так называемых «маргинальных» донорских органов.

Одним из способов сохранения жизнеспособности донорского органа является машинная перфузия (МП). Она основана на использовании непрерывного потока консервирующего раствора, способствующего тщательному удалению клеточных элементов донорской крови из микроциркуляторного русла, стабилизации параметров интерстициальной жидкости, улучшению доставки кислорода и питательных веществ, удалению токсичных метаболитов. Ряд исследований доказали клиническую эффективность и экономическую обоснованность МП почек [8]. Также имеется положительный опыт МП печени [2].

Первые исследования по МП поджелудочной железы были проведены в 1970-е годы на собаках и показали, что методика вызывала повреждение хрупкого сосудистого эндотелия, что приводило к субкапсулярным кровотечениям, тромбозу микроциркуляторного русла и геморрагическому некрозу после реперфузии органа [4]. Полученные результаты приостановили применение МП для консервации поджелудочной железы.

Интерес к этой теме возобновился после разработки и внедрения в клиническую практику методов выделения из ткани поджелудочной железы островковых комплексов с их последующей трансплантацией. Исследования на эту тему ведутся во многих центрах по всему миру [1]. СХК по сей день является методом выбора при подготовке поджелудочной железы к выделению островковых клеток. Но, несмотря на сложность и высокую стоимость, проводятся исследования и по применению МП поджелудочной железы. Так Leeser D. B. и соавт. на малой выборке (4 поджелудочные железы человека) была показана эффективность низкопоточковой перфузии поджелудочной железы в виде повышения жизнеспособности и роста индекса секреции инсулина в культуре островковых клеток [7]. В экспериментах Taylor M. J. на поджелудочной железе свиней было выявлено, что умеренная степень отека, индуцированная перфузией, благоприятно влияла на количество выделенных островковых клеток [10].

Необходимо отметить, что в приведенных выше и ряде других исследований в качестве перфузионного раствора использовался раствор Бельцера с некоторыми добавками. Раствор «Кустодиол» для перфузии поджелудочной железы не применялся.

«Кустодиол» впервые был предложен Bretschneider H. J. в 1980 году как кардиоплегический раствор для операций на открытом сердце и с успехом применяется в качестве консерванта для органных трансплантаций. Он содержит буфер – гистидин, мембранный стабилизатор – триптофан и энергетический субстрат – кетоглюторат. Кроме того, раствор обла-

дает низкой вязкостью в связи с отсутствием в составе высокомолекулярных коллоидов, а также низкой концентрацией калия.

По данным университета штата Иллинойс (США) количество выделяемых островковых комплексов при СХК растворами Бельцера и «Кустодиол» статистически не различалось [9].

В связи с вышеизложенным экспериментальная оценка влияния гипотермической машинной перфузии (ГМП) раствором «Кустодиол» на выделение островковых комплексов поджелудочной железы представляет научный интерес и практическое значение.

Цель исследования – провести сравнительный анализ влияния СХК и ГМП поджелудочной железы человека раствором «Кустодиол» на выделение островковых клеток.

Материалы и методы

В ходе проспективного рандомизированного исследования у 16 доноров со смертью мозга и бьющимся сердцем со стандартизированными критериями (возраст от 18 до 55 лет, $21 \leq \text{ИМТ} \leq 35$, отсутствие эпизодов гипотонии и остановки сердца) после флешинга десятью литрами холодного раствора «Кустодиол» (Dr. F. Kohler Chemie GmbH, Германия) проводили эксплантацию комплекса 12-перстная кишка – поджелудочная железа – селезенка по классической методике. Органокомплекс в условиях СХК доставляли в Республиканский научно-практический центр трансплантации органов и тканей.

В экспериментальной группе (8 случаев) проводили взвешивание органокомплекса, отмечали температуру консервирующего раствора перед началом эксперимента, производили взятие биопсии из трех участков железы (головка, тело, хвост), а также забор пробы консерванта для определения кислотности основного состояния (КОС). После канюляции верхнебрыжеечной и селезеночной артерий проводили ГМП раствором «Кустодиол» без дополнительной оксигенации (поток 100 мл/мин) перистальтическим насосом Masterflex® L/S (Cole-Parmer, США), внутренний диаметр использованных для насоса трубок составил 4,8 мм. Перфузат свободно вытекал из воротной вены, его забор проводили из емкости, в которой находился орган. Общий объем перфузата составил 2000 мл. Для поддержания целевой температуры (4–8 °С) в процессе эксперимента применяли обкладывание органокомплекса льдом. Температуру контролировали цифровым термометром Checktemp® (Hanna, США). Устройство для ГМП поджелудочной железы представлено на рисунках 1 и 2.

Оценку КОС (pH, PaO₂, PaCO₂, лактат, глюкоза, K, Na, Ca, Cl) и биохимических параметров (липаза, ЛДГ, инсулин) эффлюэнта проводили через 2 и 4 часа от начала перфузии с использованием биохимического (Konelab 60, США) и КОС анализаторов (Radiometer ABL800 Flex, Дания). Через 4 часа ГМП



Рисунок 1. Общий вид устройства для гипотермической машинной перфузии поджелудочной железы

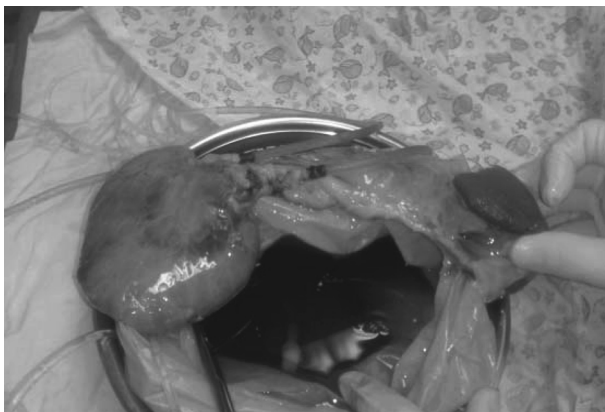


Рисунок 2. Гипотермическая машинная перфузия: канюлированы верхнебрыжеечная и селезеночная артерии

производили взятие биоптатов из трех участков поджелудочной железы и повторное взвешивание органокомплекса. Поджелудочную железу, отделенную от селезенки, сосудов и 12-перстной кишки, после ГМП передавали в лабораторию клеточных биотехнологий для выделения островковых клеток.

В контрольной группе (8 случаев) проводили аналогичные исследования. Однако вместо ГМП для консервации органа использовали СХК при тех же температурных условиях. При морфологическом исследовании биоптатов поджелудочной железы до и после

консервации оценивали целостность клеточной стенки ацинарных и островковых клеток, наличие повреждения их структурных элементов, размеры межацинарных пространств (окраска гематоксилин-эозином).

Статистический анализ проводили с использованием сертифицированных программ «Statistica 8.0» (StatSoft, Tulsa, USA).

Результаты и обсуждение

Сравнительная характеристика основных параметров доноров в группах с применением СХК и ГМП поджелудочной железы статистически значимых различий не выявила (таблица 1).

Через 4 часа ГМП раствором «Кустодиол» наблюдали статистически значимый ($p = 0,001$) прирост массы органокомплекса, который составил 60,5 г или 16% от первоначальной массы.

В процессе кондиционирования в обеих группах отмечали накопление в консервирующем растворе лактата как показателя анаэробного метаболизма. При этом через 4 часа эксперимента уровень его был статистически значимо ($p = 0,04$) выше в экспериментальной группе (ГМП), хотя исходные уровни этого показателя были одинаковыми.

Достоверных различий в ионном составе, уровнях инсулина, липазы и ЛДГ консервирующего раствора в группах не обнаружено.

Для морфологической картины поджелудочной железы после 4 часов ГМП было характерно сохранение структуры ткани, её архитектоники, целостности клеточной стенки и ядер как клеток островкового комплекса, так и ацинарных клеток, протокового эпителия и сосудов. Кроме того, бала сохранена дифференцировка гранулярного компонента клеток. После 4 часов СХК в ткани поджелудочной железы выявлены участки некроза ацинарных клеток, их гомогенизация и повышенная базофилия, гидропическая трансформация клеток, обнажение цитоскелета, разрушение клеточной стенки и ядер островковых клеток.

Количество выделенных островковых комплексов в группе ГМП было на порядок выше и состави-

Таблица 1. Сравнительная характеристика отдельных параметров в группах с применением статической холодной консервации и гипотермической машинной перфузии поджелудочной железы

Исследуемые показатели	СХК, n = 8 Me [25; 75]	ГМП, n = 8 Me [25; 75]	p
Пол донора (м /ж)	3/5	5/3	0,60
Возраст донора (лет)	39,6(25;55)	46,8(40;50)	0,22
ИМТ донора	26(23;31)	25(21;33)	0,57
Длительность ИВЛ донора (часы)	81(40;160)	81(20;160)	0,60
Глюкоза крови донора (ммоль/л)	11(6;22)	13(11;19)	0,29
Амилаза крови донора (Ед/л)	76,6(20;180)	67,6(20;140)	0,67
Исходная масса органокомплекса донора (г)	399,5(300;560)	437(320;565)	0,60
Температура (°С) органокомплекса, конец флашинга	10,5(9;13)	10,8(10;12)	0,46
Температура (°С) органокомплекса, конец транспортировки	7(3;9)	6(3;10)	0,91
Общее время холодной ишемии (минуты)	360 (300;600)	450 (300;660)	0,24

□ Оригинальные научные публикации

ло 110528 (150;213433), а в группе СХК – 10310 (300;33112), $p = 0,01$. Количество островковых комплексов в пересчете на 1 г ткани поджелудочной железы было статистически значимо больше ($p = 0,01$) в группе ГМП по сравнению с группой СХК и составило 1083 (2;2808) и 96 (31;349) соответственно.

Жировая дистрофия и фиброз поджелудочной железы, обнаруженные визуально при заборе органокомплекса, не оказали статистически значимого влияния на количество выделенных островковых комплексов ($p = 0,63$).

Большинство экспериментальных исследований, касающихся МП поджелудочной железы, выполнено на органах животных (крысы, кролики, собаки, свиньи) [6, 10]. Проведенное исследование представляет особый интерес с одной стороны изучением ГМП поджелудочных желез человека, с другой – применением для МП поджелудочной железы консервирующего раствора «Кустодиол».

Полученные результаты показали, что ГМП поджелудочной железы раствором «Кустодиол» способствовала поддержанию в функциональном состоянии микроциркуляторного русла органа и метаболизма островковых клеток.

Выявленный рост уровня лактата в группе ГМП с одной стороны указывает на эффективную доставку клеткам поджелудочной железы энергетического субстрата в виде кетоглутаровой кислоты, что обеспечивало синтез энергетического фосфата и образование молочной кислоты, с другой – на эффективную элиминацию из клеток поджелудочной железы продуктов метаболизма, накапливающихся в процессе анаэробного гликолиза.

Как и в исследованиях на свиньях отмечен прирост массы перфузируемого органокомплекса (12-перстная кишка – поджелудочная железа – селезенка), обусловленный отеком. По мнению Taylor M. J. и соавт., возникающая при этом дезинтеграция ацинусов может благоприятно сказываться при дальнейшей ферментативной обработке ткани поджелудочной железы и может способствовать более эффективному выделению островковых комплексов [10]. Другого мнения придерживаются Kaddis J. S. и соавт., считающие подобные изменения негативно влияющими на выделение островковых комплексов [5].

Вместе с тем, применение раствора Бельцера для ГМП свинных поджелудочных желез характеризовалось схожими значениями числа островковых комплексов, выделенных на 1 г железы [10].

Стандартизация качества поджелудочной железы при визуальной оценке во время операции мультиорганного забора органов отсутствует. Вместе с тем, из поджелудочных желез, имеющих при визуальной оценке во время операции мультиорганного забора органов признаки жировой дистрофии и/или фиброза независимо от метода консервации, удалось выделить сопоставимое количество островковых комплексов по сравнению с не имеющими указанных

признаков органами. Эти данные согласуются с результатами других исследователей [5].

Полученные при морфологическом исследовании результаты подчеркивают сохранение структурной целостности ацинарного и инсулярного аппаратов ткани поджелудочной железы через 4 часа ГМП раствором «Кустодиол», а выявленные повреждения клеточных структур поджелудочной железы существенно меньше, чем в исследовании Karcz H. и соавт. [6].

Полученные при выполнении исследования данные указывают на эффективность ГМП поджелудочной железы человека с использованием раствора «Кустодиол» для консервации органа перед выделением островковых комплексов.

Таким образом, результаты проведенного исследования позволяют сделать выводы о возможности использования консервирующего раствора «Кустодиол» для ГМП поджелудочной железы человека. Показано положительное влияние ГМП раствором «Кустодиол» на выделение островковых комплексов поджелудочной железы по сравнению с применением СХК.

Литература

1. *Alejandro, R.* Update from the Collaborative Islet Transplant Registry / R. Alejandro et al. // *Transplantation*. – 2008. – Vol. 86. – P. 1783–1788.
2. *Brassil, J.* Machine perfusion of the liver: past, present and future // *Curr Opin Organ Transplant*. – 2010 Apr. – Vol. 15, N 2. – P. 160–66.
3. *Collins, G. M.* Kidney preservation for transportation. Initial perfusion and 30 hours' ice storage / G. M. Collins et al. // *Lancet*. – 1969. – Vol. 2. – P. 1219–22.
4. *Florack, G.* Preservation of canine segmental pancreatic autografts: cold storage versus pulsatile machine perfusion / G. Florack et al. // *J. Surg. Res.* – 1983. – Vol. 34. – P. 493–504.
5. *Kaddis, J. S.* Multicenter analysis of novel and established variables associated with successful human islet isolation outcomes / J. S. Kaddis et al. // *Am. J. Transplant.* – 2010. – Vol. 10(3). – P. 646–656.
6. *Karcz, M. H.* An Ex-Vivo Model for Hypothermic Pulsatile Perfusion of Porcine Pancreata: Hemodynamic and Morphologic Characteristics / Karcz M. H. et al. // *Experimental and Clinical Transplantation*. – 2012. – Vol. 10 (2)P.87–100.
7. *Leeser, D. B.* Pulsatile pump perfusion of pancreata before human islet cell isolation. / D. B. Leeser et al. // *Transplant Proc.* – 2004. – Vol. 36. – P. 1050–1051.
8. *Moers, C.* Machine Perfusion or Cold Storage in Deceased-Donor Kidney Transplantation / C. Moers et al. // *N. Engl. J. Med.* – 2009. – Vol. 360. – P. 7–19.
9. *Paushter, D. H.* HTK and UW solution demonstrate equal effectiveness in the preservation of human pancreata intended for islet isolation: a large-scale, single-center experience / D. H. Paushter et al. // *Cell Transplantation*. – 2013. – Vol. 22(7). – P. 1113–1121.
10. *Taylor, M. J.* Twenty-Four Hour Hypothermic Machine Perfusion Preservation of Porcine Pancreas Facilitates Processing for Islet Isolation / M. J. Taylor et al. // *Transplant Proc.* – 2008 – Vol. 40. – P. 480–482.

Поступила 18.12.2015 г.