

Univerzita Karlova v Praze

Lékařská fakulta v Plzni



Autoreferát disertační práce

**MOŽNOSTI ZLEPŠENÍ VLASTNOSTÍ
LEDVINNÝCH ŠTĚPŮ OD NEBIJÍCÍCH DÁRCŮ POMOCÍ IHNED ZAHÁJENÉ
MECHANICKÉ PULZATILNÍ PERFUZE**

**Perfusion of a kidney graft from a donor after cardiac death based on
immediately started pulsatile machine perfusion**

Václav Opatrný

Plzeň 2018

Disertační práce byla vypracována v rámci doktorského studijního programu Chirurgie na Chirurgické klinice FN Plzeň a LF UK v Plzni.

Uchazeč: MUDr. Václav opatrný, Chirurgická klinika LF UK a FN Plzeň

Školitel: doc. MUDr. Jiří Moláček, PhD., Chirurgická klinika LF UK a FN Plzeň

Konzultant: prof. MUDr. Vladislav Třeška, DrSc., Chirurgická klinika LF UK a FN Plzeň

Oponenti:

Autoreferát byl rozeslán dne:

Obhajoba disertační práce před komisí pro obhajobu disertačních prací studijního programu

Chirurgie

se koná dne:

Místo obhajoby: Chirurgická klinika FN Plzeň, Alej Svobody 80, Plzeň

S disertační prací je možno se seznámit na děkanátu Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Plzni, Husova 3, Plzeň.

prof. MUDr. Vladislav Třeška, DrSc.

předseda komise pro obhajobu disertačních prací studijního programu Chirurgie

Chirurgická klinika LF UK a FN Plzeň

Obsah

1.	Abstrakt	4
2.	Summary.....	7
3.	Úvod.....	10
4.	Cíl disertační práce	12
5.	Pracovní hypotéza	13
5.1	Retrográdní oxygenová persuflace (ROP).....	13
5.2	Ihned zahájená, intraarteriální mechanická perfúze ledvinných štěpů	13
6.	Retrográdní oxygenová persuflace – experiment na velkém zvířeti.....	14
6.1	Metodika.....	14
6.2	Výsledky	15
6.2.1	Vyhodnocení sérových hladin ury:	15
6.2.2	Histopatologické vyhodnocení bioptických vzorků:	17
7.	Ihned zahájená pulzatická perfúze – experiment na malém zvířeti.....	20
7.1	Metodika.....	20
7.2	Výsledky	21
8.	Experiment na velkém zvířeti	24
8.1	Metodika.....	24
8.2	Výsledky	25
8.2.1	Srovnání maximálního a středního průtoku, poklesu teploty a diurézy mezi skupinami A a B u pokusných zvířat	25
8.2.2	Srovnání histologického vyšetření mezi skupinami A a B	27
8.2.3	Porovnání laboratorních parametrů v 6 hodinách.....	27
8.2.4	Porovnání průběhu poklesu teploty, průtoku, tlaku a odporu mezi skupinami A a B	28
8.2.5	Srovnání vývoje markerů poškození ledvin	33
9.	Diskuze.....	36
10.	Závěr	41
11.	Literatura	42
12.	Publikační činnost autora	43

1. Abstrakt

Možnosti zlepšení vlastností ledvinných štěpů od nebijících dárců pomocí ihned zahájené mechanické pulzatilní perfuze

Opatrný V.

Chirurgická klinika FN Plzeň a LF UK v Plzni

Úvod: Množství ledvin dostupných k transplantaci stále nedosahuje počtu pacientů na čekací listině, jež se každoročně prodlužuje. Přitom je transplantace ledvin jedinou šancí pacientů na dlouhodobé přežití s dobrou kvalitou života. Proto jsou v poslední době využívány i orgány od tzv. marginálních dárců, mezi něž patří též zemřelí dárce po nezvratné zástavě oběhu (DCD – donors after cardiac death). Nejčastější příčinou smrti těchto dárců je závažné trauma, zejména kraniocerebrální, či náhlá srdeční zástava s následnou neúspěšnou resuscitační péčí. Po konstatování smrti jedince dle přesně daných kritérií, je možno přistoupit k odběru ledvin. Při tom dochází nejprve k promytí štěpů v těle dárce pomocí perfuzního roztoku a následně k jejich vyjmutí a uchování zvolenou prezervační metodou. V oblasti DCD je nejčastěji využívána mechanická pulzatilní perfuze pomocí speciálního přístrojového vybavení. I přes dobré dlouhodobé výsledky štěpů od DCD, je tato skupina zatížena větším počtem opožděného nástupu funkce štěpu (DGF) i primární afunkce štěpu (PNF).

Cíl: Shrnutí základních poznatků o DCD a jejich následné využití v experimentální práci. Kvalitu štěpu od DCD významně určuje období těsně po zástavě oběhu dárce a následná perfuze štěpu. S využitím perfuzoru vlastní konstrukce jsme nejprve prozkoumali metodu ROP – retrográdní oxygenové perfuze. Tento experiment nás přivedl na myšlenku mechanického promývání ledvin konzervačním roztokem ještě v těle dárce. Cílem je po opětovné transplantaci štěpu příjemci dosáhnout snížení výskytu opožděného nástupu funkce štěpu či jeho primární afunkce.

Metodika: Metoda ROP byla testována na souboru 10 zvířat (prase) rozdělených do dvou skupin. U všech zvířat proběhla simulace teplé ischemie po dobu 20 min. V první skupině (n=5) byla následně po explantaci k uchování štěpu využita metoda ROP, ve druhé (n=5) mechanická přístrojová perfuze, u obou skupin po dobu 60 min. Následně byl orgán transplantován zpět původnímu zvířeti. V daných časových intervalech po dobu 2 hodin byly odebírány vzorky žilní krve ke stanovení hladiny urey. Stejně tak bylo provedeno vyhodnocení bioptických vzorků tkáně ledvin odebraných v průběhu a na konci experimentu. Následující experiment se již zabýval ihned zahájenou pulzatilní perfuzí. První část spočívala v pokusu na malém zvířeti (králík). Opět byla u všech zvířat simulována teplá ischemie po dobu 30 minut. Následně byla v první skupině (n=5) jedna ledvina v těle zvířete promyta zvykle užitím hydrostatického tlaku a ve druhé skupině (n=5) pak pomocí mechanického perfuzoru po dobu 30 minut. Byly zaznamenávány parametry průtoku ledvinou a teplota uvnitř orgánu. Po ukončení pokusu bylo provedeno histologické vyšetření promývaných ledvin. Druhý experiment hodnotící

ihned zahájenou pulzatilní perfuzi již probíhal opět na velkém zvířeti (prase). 7 zvířat prodělalo simulaci teplé ischemie jedné ledviny po dobu 30 min. Následně byly v první skupině (n=3) tyto promyty opět užitím hydrostatického tlaku a ve druhé (n=4) mechanickým perfuzorem po dobu 60 minut. Byly měřeny parametry průtoku a pokles teploty v orgánu. Následně byl obnoven původní krevní průtok a takto autotransplantovány. Po dobu dalších 6 hodin byla sledována diuréza, měřeny biochemické hodnoty a markery ledvinného poškození v séru a moči. Po promytí a na konci pokusu byly odebírány vzorky k histologickému vyšetření.

Výsledky: V experimentu zkoumajícím ROP jsme nezjistili rozdíl naměřených hodnot sérové urey v žilní krvi odebírané po autotransplantaci orgánu ($p=0,843$). Stejně tak nebyl statisticky významný rozdíl v kvalitě promytí ledvinných štěpů při vyšetření patologem v čase I, II, III ($p=1,00$). Obě metody byly tedy rovnocenné. První experiment s ihned zahájenou perfuzí na malém zvířeti prokázal signifikantně vyšší maximální průtok při užití mechanické perfuze, než u kontrolní skupiny při užití pouze hydrostatického tlaku ($p=0,004$). Stejně tak jsme pozorovali statisticky významný rozdíl v poklesu teploty štěpu ve prospěch mechanické perfuze ($p < 0,001$). Statisticky významné bylo i kvalitativní histopatologické hodnocení proplachu štěpů opět ve prospěch mechanické perfuze ($p = 0,005$). Ve druhém experimentu na velkém zvířeti jsme mechanickou perfuzí jsme opět dosáhli statisticky významnějšího rozdílu mezi oběma skupinami, a to jak pro vrcholový průtok, tak pro průtok ve srovnání s maximálním průtokem u hydrostatické perfuze ($p=0,007$, resp. $0,019$). Co se týče poklesu měřené teploty orgánu, nebylo těsně dosaženo úrovně statistické významnosti ($p=0,071$). Stejně tak nebyla významně rozdílná ani diuréza po transplantaci ($p=0,602$). Srovnání sledovaných biochemických markerů a markerů poškození ledvinného parenchymu v séru a moči se v žádném z časů 0,1,3,6 hod. významně nelišilo.

Diskuze: Výsledky prokazují identickou kvalitu štěpů prezervovaných jak klasickou intraarteriální perfuzí, tak retrográdní oxygenovou persufací. Nenalezli jsme signifikantní rozdíly jak v histopatologickém hodnocení odebraných štěpů, tak v hodnotách urey u zvířat po transplantaci daných štěpů. Uvedené výsledky jsou v souladu s literaturou. Nepotvrdili jsme názor některých autorů, že ROP může být dokonce superiorní ve srovnání s klasickou perfuzí event. s „cold storage“. Prokázali jsme ale bez pochyby, že i prostá ROP dokáže parenchym ochránit. Otázkou podle našeho názoru není nahrazení zvyklé intraarteriální perfuze retrográdní persufací, nabízí se však možnost určité kombinace obou metod. V prvním experimentu s ihned zahájenou mechanickou perfuzí je patrné statisticky významné rychlejší zchlazení ledvinných štěpů u přístrojové perfuze, stejně tak i statisticky významně vyšší průtok perfuzního roztoku ledvinou za minutu. Za stejnou časovou jednotku je tak orgán propláchnut větším množstvím perfuzátu. Dosud užívaná metoda pracuje s chladným perfuzátem, který se však již při podávání do těla zemřelého ohřívá od okolní pokojové teploty. Díky zapojení chladiče média v našem perfuzoru až těsně před vstup do těla dárce jsme mohli dosáhnout velmi nízké teploty perfuzátu kolem 4 st. C. Proto je následné zchlazení orgánu účinnější. Prokázali jsme pomocí histologického vyšetření, že

promytí ledviny pomocí mechanického perfuzoru v těle zvířete je výrazně lepší než při použití hydrostatického tlaku. Na histologických preparátech nebyly v glomerulech přítomny krevní elementy u ledviny promyté perfuzorem. Zdá se, že řízená mechanická perfuze je schopna z ledviny odstranit i drobné již vytvořené mikrotromby a zachovat maximum cévního řečiště pro obnovení krevního průtoku. Ve druhém experimentu na velkém zvířeti jsme mechanickou perfuzí opět dosáhli statisticky významnějšího rozdílu mezi oběma skupinami, a to jak pro vrcholový průtok u mechanické pulzatilní perfuze (průtok na vrcholu systoly čerpadla), tak pro průtok střední (vypočítaný identicky jako v klinické praxi) ve srovnání s maximálním průtokem u hydrostatické perfuze ($p=0,007$, resp. $0,019$). Při srovnání sledovaných markerů poškození ledvinného parenchymu obě skupiny významně nelišily. Z výše uvedeného se domníváme, že ihned zahájená pulzatilní perfuze štěpů v těle dárce po nezvratné zástavě oběhu štěpy lépe promyje, tím zachová větší počet nepoškozených glomerulů a nefronů v parenchymu. Efektivnějším zchlazením lze dosáhnout časnějšího zastavení již probíhajících ischemických změn a po následné transplantaci snížit procento výskytu PNF a DGF. Jako ideální by se jevila tato metoda v následné kombinaci s možným využitím ROP před transplantací příjemci.

Závěr: Dárci ledvin po nezvratné zástavě oběhu jsou v dnešní době nedílnou součástí transplantální medicíny. Jejich využití může výrazně navýšit počet orgánů využitelných k transplantaci a tím zlepšit kvalitu života řadě nemocných v terminální fázi renálního selhání. Jedná se též o nejnáročnější skupinu dárců z pohledu organizace a provedení orgánového odběru, spojenou s řadou nejen logistických, ale i společensky a eticky citlivých otázek. K uchování orgánů odebraných DCD je dnes ve valné většině využívána přístrojová perfuze, jež garantuje nejlepší funkční výsledky po následné transplantaci příjemci. Proto se jako příhodné jeví využití co nejčasnější zahájení přístrojové perfuze již v těle zemřelého dárce. V našem experimentu jsme ověřili účinnost retrogradní oxygenové persuflace ve shodě s literárními daty. Dále jsme ve dvou experimentálních modelech prokázali možnost lepšího zchlazení a promytí ledvinného štěpu v těle dárce. Ideálním cílem našeho výzkumu by bylo zavedení nové metodiky, resp. algoritmu perfuze ledviny odebrané od marginálního dárce. Zavedení do klinické praxe jistě vyžaduje ještě významný kus práce na experimentálním poli, přesto finanční i logistická nenáročnost této metody je příslibem do budoucna.

2. Summary

Introduction: The number of kidneys available for transplantation still does not match the number of patients on the waiting list, which gets longer every year. At the same time, kidney transplantation is the only chance for the long-term survival of patients with good quality of life. Therefore, organs from marginal donors, including donors after cardiac death (DCD), have recently been used. The most common cause of death of these donors is severe trauma, especially craniocerebral trauma, or sudden cardiac arrest, followed by unsuccessful resuscitation. Kidneys can be harvested once an individual is declared dead according to the exact criteria. This involves initial washing of the grafts in the donor's body using a perfusion solution, followed by their removal and storage using selected preservation method. Mechanical pulsatile perfusion using special instrumentation is the most frequently used technique in the area of DCD. Despite of good long-term outcomes of grafts from DCDs, this group is burdened by a greater number of delayed graft function (DGF) and primary nonfunction (PNF).

Objective: To summarize the essential knowledge about DCD and its subsequent use in experimental work. Graft quality from DCD donors is significantly determined by the period just after the donor's circulatory arrest and subsequent graft perfusion. Using a perfusion system of our own design, we first explored the ROP (retrograde oxygen persufflation) technique. This experiment led us to the idea of mechanical perfusion of the kidneys with a preservation solution already in the donor's body. The aim is to reduce the incidence of delayed onset of graft function or its primary nonfunction after graft transplantation.

Methodology: The ROP methodology was tested in a population of 10 animals (pigs) divided into two groups. All animals were subjected to simulated warm ischemia for 20 minutes. Immediately after the explantation, the ROP method was used in the first group (n = 5) and mechanical machine perfusion in the second group (n = 5) to preserve the graft, for a period of 60 minutes in both groups. Subsequently, the organ was re-transplanted to the original animal. Venous blood samples were collected at given time intervals over a period of 2 hours to determine the urea level. Biopsy samples of kidney tissue taken during and at the end of the experiment were also evaluated. The subsequent experiment studied the immediately initiated pulsatile perfusion. The first part consisted of an experiment on a small animal (rabbit). Again, all the animals were subjected to simulated warm ischemia for 30 minutes. Subsequently, one kidney in the animal body was routinely perfused using hydrostatic pressure in the first group (n = 5) and using a mechanical perfusion pump in the second group (n = 5), in both groups for 30 minutes. The kidney flow parameters and the temperature inside the organ were recorded. Histological examination of the perfused kidneys was performed after ending the experiment. The second experiment, evaluating the immediately initiated pulsatile perfusion, was conducted on a large animal (pig). Seven (7) animals were subjected to simulated warm ischemia of one kidney for 30 minutes. Subsequently, the kidneys in the animal body were routinely perfused under hydrostatic pressure in the first group (n = 3) and using a mechanical perfusion pump in the second group (n = 5) for 60 minutes. The flow parameters and the temperature decrease in the organ were measured. Subsequently, the original blood flow was restored and

autotransplantation was performed. Over the next 6 hours, diuresis was monitored and biochemical values and markers of renal damage in the serum and urine were measured. After perfusion and at the end of the experiment, samples were taken for histological examination.

Results: In an experiment to examine ROP, we found no difference in serum urea levels in venous blood taken after organ autotransplantation ($p=0.843$). Similarly, no statistically significant difference was found in the quality of renal graft perfusion when examined by a pathologist at times I, II, and III ($p=1.00$). Both methods were therefore equivalent. The first experiment with the immediately initiated perfusion on a small animal showed a significantly higher maximum flow rate when using mechanical perfusion compared to the control group using only hydrostatic pressure ($p=0.004$). Similarly, we observed a statistically significant difference in graft temperature decrease in favor of mechanical perfusion ($p<0.001$). The qualitative histopathological evaluation of the graft perfusate was also statistically significant, again in favor of mechanical perfusion ($p=0.005$). In the second experiment on a large animal, we again achieved a statistically significant difference between the two groups when using mechanical perfusion, for both peak flow and flow compared to the maximum flow rate in hydrostatic perfusion ($p=0.007$ and 0.019 , respectively). Concerning the decrease in the measured organ temperature, the level of statistical significance ($p=0.071$) was closely not reached. Similarly, diuresis after the transplantation was not significantly different, either ($p=0.602$). Comparison of the observed biochemical markers and markers of renal parenchymal damage in the serum and urine showed no significant difference at any of the time points of 0, 1, 3, and 6 hours.

Discussion: The results confirm the identical quality of grafts preserved by classical intraarterial perfusion and retrograde oxygen persufflation. We found no significant differences in either the histopathological evaluation of the grafts taken or the urea levels in the animals after transplantation of the respective grafts. The results are in accordance with the literature data. We did not confirm the opinion of some authors that the ROP may even be superior to conventional perfusion or to "cold storage". However, we undoubtedly confirmed that even simple ROP can protect the kidney parenchyma. In our opinion, the aim is not to replace the usual intra-arterial perfusion with retrograde persufflation, but there is a possibility of a certain combination of both methods. In the first experiment with immediately started mechanical perfusion, we observed statistically significant faster cooling of the kidney grafts with machine perfusion, as well as a statistically significantly higher perfusion solution flow rate per minute through the kidney. In this way, the organ can be perfused with a greater amount of perfusate during the same time. The method used so far uses cold perfusate, which, however, warms up from ambient room temperature when administered to the body of a deceased donor. In our perfusion system, we were able to achieve a very low perfusate temperature of about 4 degrees Centigrade by incorporating a special cooler of the medium just before the entrance to the donor's body. Therefore, subsequent cooling of the organ is more effective. We demonstrated by histological examination that kidney perfusion using a mechanical perfusion system in the animal's body is significantly better than perfusion under hydrostatic pressure. Histological

preparations did not contain blood elements in the glomeruli of a kidney perfused with the perfusion pump. Controlled mechanical in-situ perfusion appears to be able to remove even small microthrombi already formed in the kidney and preserve maximum of kidneys microcirculation. In the second experiment on a large animal, mechanical perfusion again achieved a statistically significant difference between the two groups, both for the peak flow in mechanical pulsatile perfusion (flow at peak systole of the pump) and for the mean flow (calculated identically as in clinical practice) compared to the maximum flow rate under hydrostatic perfusion ($p=0.007$ and 0.019 , respectively). When comparing the markers of renal parenchymal damage, neither groups differed significantly. We conclude from the above that pulsatile graft perfusion immediately initiated in a donor's body after irreversible circulatory arrest is better able to perfuse the graft, thus preserving a greater number of undamaged glomeruli and nephrons in the parenchyma. More efficient cooling can result in early arrest of ongoing ischemic changes and reduce the percentage occurrence of PNF and DNF after the transplantation. This method would seem to be optimal when combined with ROP prior to the transplantation to the recipient.

Conclusion: Kidney donors after irreversible circulatory arrest are an integral part of transplantation medicine today. Their use can significantly increase the number of organs that can be used for transplantation, thereby improving the quality of life of many patients in the terminal phase of renal failure. It is also the most challenging group of donors in terms of organization and performance of the organ removal, as it is associated with a number of logistical, social and ethically sensitive issues. In the vast majority of cases, machine perfusion is currently used to preserve organs from DCD donors, which guarantees the best functional results after subsequent transplantation to the recipient. Therefore, it is advisable to initiate machine perfusion as soon as possible, already in the body of the deceased donor. In our experiment, we examined the efficacy of retrograde oxygen persufflation in line with the literature data. Further, we demonstrated the possibility of better cooling and washing of the kidney graft in the donor's body in two experimental models. The optimal goal of our research would be to introduce a new methodology, a perfusion algorithm for kidneys removed from marginal donors. Its introduction into clinical practice certainly requires a significant amount of work to be done in the experimental field, yet the low financial and logistics requirements of this method are promising for the future.

3. Úvod

Transplantace ledviny je pro pacienty v terminálním stadiu renálního selhání jedinou šancí na udržení dobré kvality života a snížení rizika komplikací vyplývajících z dlouhodobé peritoneální dialýzy nebo hemodialýzy. Počet čekatelů na transplantaci se však v České republice v posledních letech neustále zvyšuje, z cca 700 v r. 2006 až k téměř 1000 v r. 2014, do budoucna lze nadále předpokládat další pozvolný nárůst tohoto počtu[1]. Naproti tomu celkový roční počet transplantací zůstává již několik let spíše neměnný, okolo 500-600 ročně v České Republice[1]. Tato situace proto vyžaduje akceptování i tzv. marginálních dárců neboli extended criteria donors – ECD, tedy dárců s horšími vlastnostmi štěpu. Kvalitní perioperační a pooperační péče se dokáže s riziky spojenými s transplantací těchto štěpů vyrovnat. Jedním z typických příkladů těchto marginálních dárců jsou dárce s nebijícím srdcem – donors after cardiac death – DCD. Rozšiřování programu DCD má z dlouhodobého hlediska zásadní důležitost pro navýšení počtu transplantací orgánů, zejména pak ledvin. Na Chirurgické klinice LF UK a FN v Plzni tento program funguje od roku 2002 a byl zahájen jako první v České republice[2].

Problematika DCD, na kterou se soustředí tato disertační práce se zabývá pacienty, u kterých dochází primárně k selhání kardiopulmonálních funkcí. Ty se nepodařilo přes účinnou resuscitaci trvajících alespoň 30 minut obnovit. Nejčastější příčinou je polytrauma, infarkt myokardu či devastující kraniocerebrální poranění neslučitelné se životem. DCD jsou dále děleny, podle tzv. Maastrichtské klasifikace (MK), do 5 skupin. Klasifikace zohledňuje, kde a za jakých okolností došlo k zástavě oběhu a je-li zaznamenána přesná doba srdeční zástavy. V zásadě existují dva možné postupy odběru orgánů od nebijícího dárce. První se výrazně neliší od klasického odběru u zemřelého dárce s mozkovou smrtí – DBD (donor after brain death). Je využíván hlavně u nemocných III. skupiny Maastrichtské klasifikace a spočívá v zavedení perfuzních kanyl cestou pánevních cév po laparotomii na operačním sále po konstatování nevratné srdeční zástavy a uplynutí tzv. non-touch intervalu. Druhou možností, využívanou zejména u II. skupiny DCD je kanylace abdominální aorty cestou femorální tepny za pomoci DBTL (double balloon, triple lumen) katetru. V obou případech je následně provedeno promytí ledvin studeným perfuzním roztokem za užití hydrostatického tlaku. Ten je generován zavěšením vaku s perfuzátem do výše alespoň jednoho metru nad lůžko pacienta. Cílem je vymytí krve z ledviny, její zchlazení, tím snížení metabolismu a konzervace parenchymu.

Po dostatečném promytí jsou ledviny vyjmuty z těla a nejčastěji napojeny na mechanický pulzatilní perfuzor, ve kterém jsou dále promývány roztokem a chlazeny. Na perfuzoru jsou sledovány funkční parametry jako průtok ledvinou a její cévní rezistence, dále je možné odebírat vzorky perfuzátu ke stanovení markerů poškození ledvinového parenchymu. Na základě těchto parametrů je rozhodnuto o použití či vyloučení štěpu k transplantaci. Dále je štěp indikovaný k transplantaci pulzatilně promýván perfuzním roztokem až do opětovného transplantování příjemci. Alternativou přístrojové perfuze je pouze uchování ve studeném prostředí, tzv. „cold storage“ [3]. I přes dobré dlouhodobé výsledky štěpů od DCD, je tato skupina zatížena

větším počtem opožděného nástupu funkce štěpu (DGF) i primární afunkce štěpu (PNF) [4–6].

4. Cíl disertační práce

Cílem této disertační práce je shrnout základní fakta v oblasti dárců k transplantaci ledvin, zejména pak týkající se dárců po nezvratné zástavě oběhu (donors after cardiac death – DCD). Následně pak tyto informace využít v experimentální práci s cílem ozřejmit možnosti zlepšení vlastností štěpů odebraných právě těmto dárcům.

Hypotéza, ze které vychází naše experimentální práce, se zakládá na předpokladu, že důležitou roli hraje období těsně po zástavě oběhu dárce a následná perfuze štěpu. Proto jsme nejprve prozkoumali možnost uchování orgánu pomocí retrogradní oxygenové perfuze. Tento experiment s využitím perfuzoru vlastní konstrukce nás přivedl na myšlenku mechanického promývání ledvin konzervačním roztokem ještě v těle dárce. Další hypotézou tedy bylo, že při okamžitém zahájení promývání ledvin perfuzním roztokem za užití mechanického perfuzoru (namísto pouhého hydrostatického tlaku) ještě v těle dárce, dojde k lepšímu promytí štěpů, jejich účinnějšímu zchlazení a tím kvalitnější prezervaci. Cílem je po opětovné transplantaci štěpu příjemci dosáhnout snížení výskytu opožděného nástupu funkce štěpu či jeho primární afunkce. Dalším přínosem by mohla být záchrana – resp. určitá rekondice štěpů, výrazněji poškozených déle trvající teplou ischemií u nekontrolovaných DCD. Tím by bylo možno zvýšit počet získaných orgánů od DCD.

Pro ověření této hypotézy jsme v první fázi experimentální studie provedli pokus na malém zvířeti k ověření metodiky. V další fázi jsme provedli experiment na větším laboratorním zvířeti – praseti domácím a sledovali funkční parametry štěpu po opětovné transplantaci.

5. Pracovní hypotéza

5.1 Retrogradní oxygenová persuflace (ROP)

Jde o možnou alternativou rekondice ledvinného štěpu poškozeného teplou ischemií. Jedná se o metodu technicky nenáročnou, nevyžadující speciální perfuzní roztoky. Hypotézou v tomto experimentu bylo, že štěp ošetřený po proběhlé teplé ischemii pomocí ROP, bude po autotransplantaci vykazovat stejnou či lepší funkci než při ošetření mechanickou hypotermní perfuzí.

5.2 Ihned zahájená, intraarteriální mechanická perfúze ledvinných štěpů

V další fázi experimentu se naše pozornost obrací k in situ intraarteriální perfúzi ledvinných štěpů. V běžné klinické praxi je při odběru ledvin od DCD technikou in-situ perfúze realizován proplach viscerálního segmentu abdominální aorty prostřednictvím DBTL katetru. Perfúzní tlak roztoku k promývání je generován výškou zavěšení vaku s roztokem nad lůžkem dárce, většinou ve výšce cca 1 metru. Jedná se tedy o tlakem řízenou perfúzi, kde se průtok mění jen v závislosti na odporu kladeném cévním řečištěm ledviny. Naše hypotéza je následující. Užitím mechanického perfúzoru k promytí ledvin cestou DBTL katetru již v těle dárce, užitím průtokem řízené perfúze, by mohlo dojít k lepšímu proplachu orgánu, čímž by zůstalo zachováno větší množství funkčních glomerulů. Zároveň by došlo k účinnějšímu chlazení orgánu již v těle dárce při užití aktivního chlazení perfúzního roztoku před vstupem do katetru a těla dárce. To by ve výsledku mohlo vést k lepším funkčním vlastnostem transplantovaných štěpů, snížení výskytu DGF eventuálně PNF. Mohlo by být též dosaženo rekondice štěpů které byly déle vystaveny teplé ischemii. Tím bychom mohli dosáhnout užití většího množství orgánů od dárců I. a II. skupiny MK.

6. Retrográdní oxygenová persuflace – experiment na velkém zvířeti

6.1 Metodika

Jako experimentální zvíře bylo použito prase domácí o hmotnosti cca 30 kg. Vlastní provedení bylo následující.

Ve skupině A (N=5 zvířat) bylo experimentální zvíře uvedeno po premedikaci (Atropin, Stresnil) do celkové anestézie (Thiopental, Calypsol, Fentanyl), střední laparotomií jsme pronikli do retroperitonea, byl vypreparován ledvinný hilus pravé ledviny, cévní stopka ledviny byla na 20 min. uzavřena cévní svorkou (simulace teplé ischemie). Poté byl proveden odběr této ledviny. V tento moment je odebrán první vzorek biopsie ledviny (biopsie – IA). Bioptický vzorek je odebírán jako klínovitá excize parenchymu ledviny zahrnující kůru i dřeň. Ledvinný štěp byl po explantaci napojen na endosuflátor, pomocí kterého byl štěp retrográdně promýván zvlhčeným plynným kyslíkem pod tlakem 18 mm rtuťového sloupce. Jedná se o retrográdní promývání, kanyla je zavedena do renální žíly. Štěp je při tom umístěn v chladném perfuzním roztoku (Custodiol) při teplotě + 4 st. C. Bylo nutné udělat jehlou do parenchymu ledviny několik perforačních otvorů pro únik plynného kyslíku. Promývání trvalo 60 minut, na konci tohoto intervalu byl odebrán druhý vzorek biopsie ledviny (biopsie-IIA). Poté byl ledvinný štěp opět transplantován identickému zvířeti a zároveň byla provedena druhostranná (levostranná) nefrektomie. Při transplantaci byla anastomozována renální tepna na aortu (end to side anastomóza) a renální žíla na dolní dutou žílu (end to side anastomóza). Obě anastomózy provedeny pokračujícím polypropylenovým stehem 7/0. Po obnovení průtoku štěpem byl každých 30 minut z renální žíly natransplantované ledviny odebrán vzorek žilní krve pro stanovení markerů renálních funkcí. Po 120 minutách byl štěp opět explantován, odebrán třetí vzorek biopsie ledviny (biopsie-IIIA) a pokusné zvíře usmrceno kardioplegickým roztokem. Vše probíhalo v pokračující celkové anestézii.

Ve skupině B (N=5 zvířat) byla opět simulována ischemie ledviny 20 min. klampáží cévní stopky, poté byl ledvinný štěp po nefrektomii zvykle intraarteriálně perfundován perfuzním roztokem pomocí hydrostatického tlaku Custodiolem. Kanyla byla zavedena zvykle do renální tepny. Vlastní dialyzát byl chlazen na teplotu 4 °C pomocí laboratorního termostatu s chlazením, ale z důvodu jeho recirkulace a prvotním ohřátím orgánem byla teplota po dobu experimentu v rozmezí 3,9 – 6,4 °C. Teplota orgánu klesla na teplotu cca. 5,2 °C měřené na povrchu. Promývání trvalo stejně jako ve skupině A 60 minut. Stejným způsobem byla ledvina poté autotransplantována a rovněž byla provedena druhostranná nefrektomie. Vzorky krve byly odebírány opět z renální žíly v identických časových intervalech jako ve skupině A. Stejně tak byly identicky odebírány bioptické vzorky z ledviny (biopsie IB-IIIB). Po 120 minutách bylo opět zvíře usmrceno pomocí kardioplegie.

Histopatologické vyšetření bioptických vzorků štěpů bylo provedeno zkušeným patologem, který hodnotil obecně míru poškození nefronu (na základě stupnice uvedené ve výsledcích). Byla hodnocena míra propláchnutí glomerulu, přítomnost mikrotrombů a event. přítomnost akutní tubulární nekrózy. Pro patologa byla studie zaslepena. Ze vzorků žilní krve byla vyhodnocována sérová hladina urey.

6.2 Výsledky

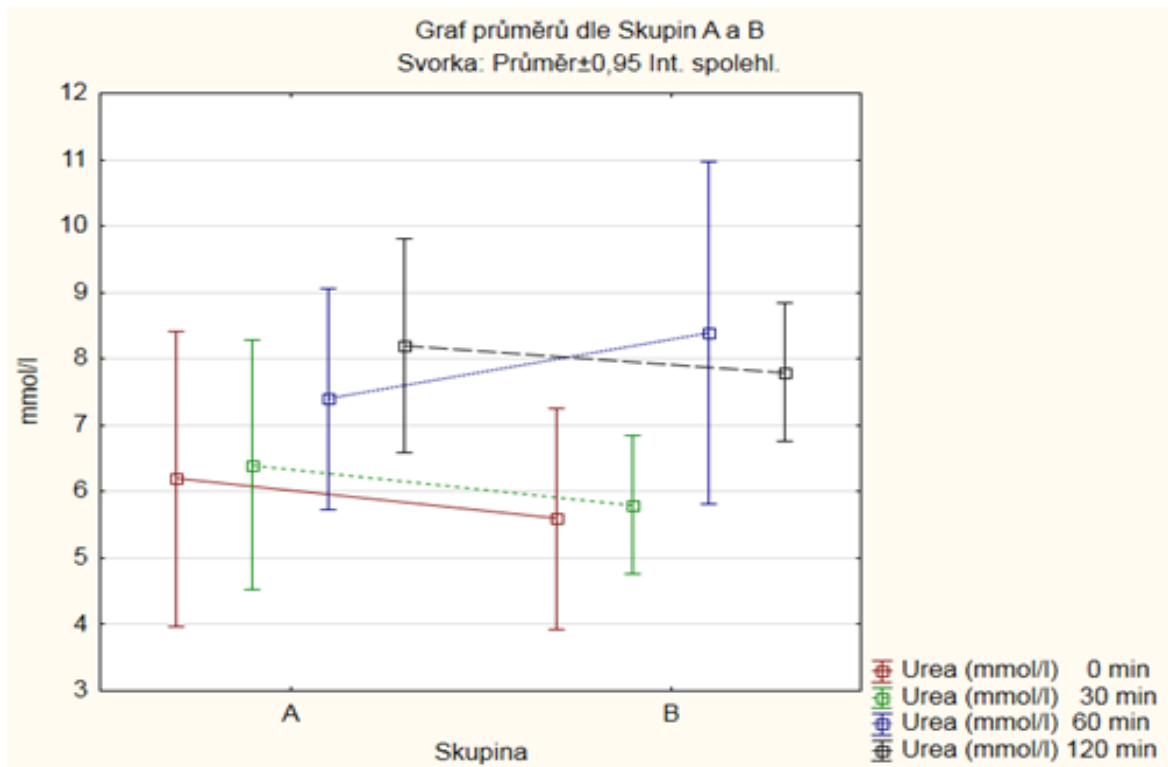
U žádného z prezentovaných experimentálních zvířat se neobjevily technické problémy s perfuzí štěpu či s vlastní transplantací. Ve dvou případech (jeden případ v každé skupině) došlo k horšímu segmentálnímu promytí orgánu při přerušení pólové tepny.

6.2.1 Vyhodnocení sérových hladin urey:

Tabulka 1 ukazuje hodnoty urey v krvi odebrané z renální žíly po natransplantování ledviny v jednotlivých intervalech (0, 30, 60, 120 minut).

Číslo zvířete (skupina)	Urea (mmol/l)			
	0 min	30 min	60 min	120 min
1 (A)	4	4	6	7
2 (A)	5	6	6	7
3 (A)	8	8	8	10
4 (A)	8	7	9	9
5 (A)	6	7	8	8
6 (B)	5	5	7	7
7 (B)	7	7	8	9
8 (B)	4	6	12	8
9 (B)	7	6	8	8
10 (B)	5	5	7	7

Tab. 1 - Hladina urey v mmol/l u jednotlivých zvířat v časech 0-120 min.



Graf 1. Hladina urey v mmol/l u jednotlivých zvířat v časech 0-120 min.

Výsledná p hodnota Repeated measure ANOVA testu pro rozdíly mezi skupinami A a B je $p = 0,843$, mezi skupinou A a B tedy nebyly zjištěny statisticky významné rozdíly.

6.2.2 Histopatologické vyhodnocení bioptických vzorků:

Tabulka 2 ukazuje vyhodnocení odebraných vzorků patologem:

Vzorky byly hodnoceny dle níže uvedené stupnice 1-4, bylo provedeno celkové zhodnocení kvality parenchymu (přítomnost mikrotrombů, akutní tubulární nekrózy), byla hodnocena míra kvality propláchnutí nefronu.

Stupnice hodnocení kvality

Stupeň 1 ... kompletní promytí, bez erytrocytů v kapilárách, bez mikrotrombů

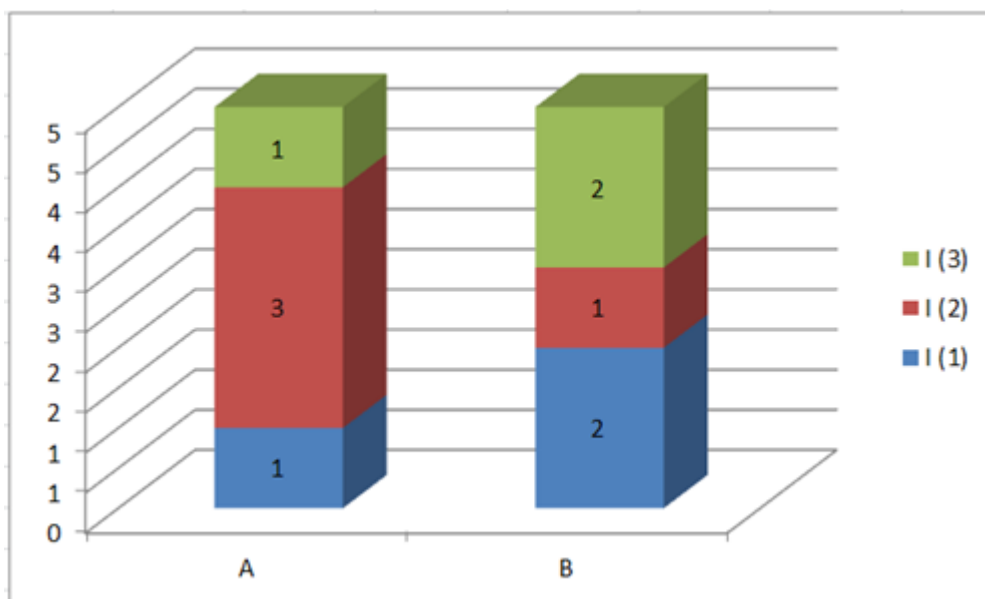
Stupeň 2 ... neúplné promytí, občasné skupiny erytrocytů v kapilárách (zejména glomerulu), občasné mikrotromby

Stupeň 3 ... adekvátně nepromyté ledviny (fyziologický obraz)

Stupeň 4 ... nepromyté ledviny, přítomnost akutní tubulární nekrózy

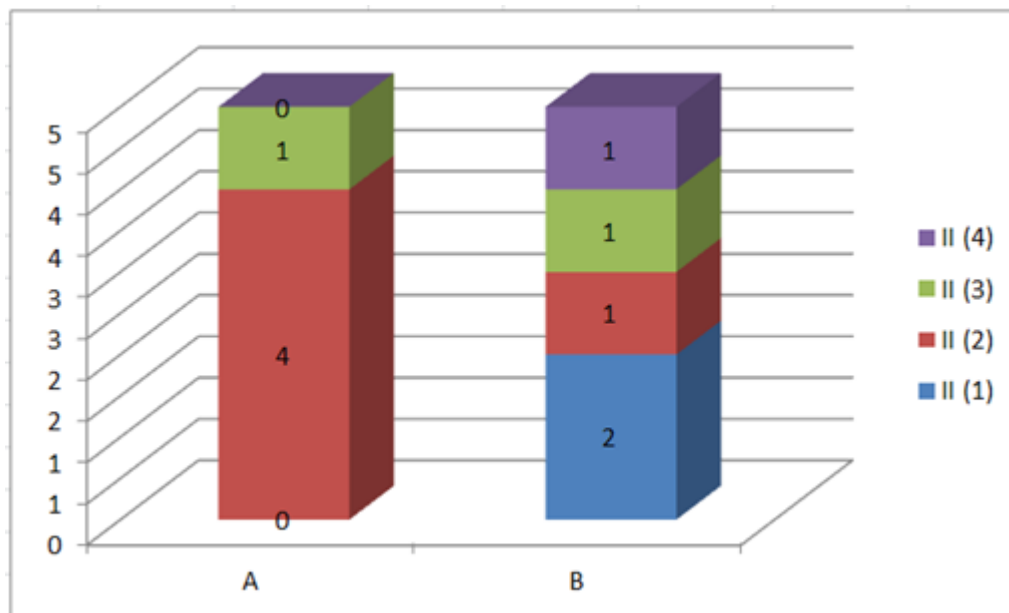
Zvíře (skupina) / Vzorek	I	II	III
1 (A)	2	2	3
2 (A)	3	2	2
3 (A)	1	2	1
4 (A)	2	3	2
5 (A)	2	2	3
6 (B)	2	1	3
7 (B)	3	2	2
8 (B)	3	3	2
9 (B)	1	1	2
10 (B)	1	4	3

Tab. 2 – Histologické vyhodnocení odebraných vzorků



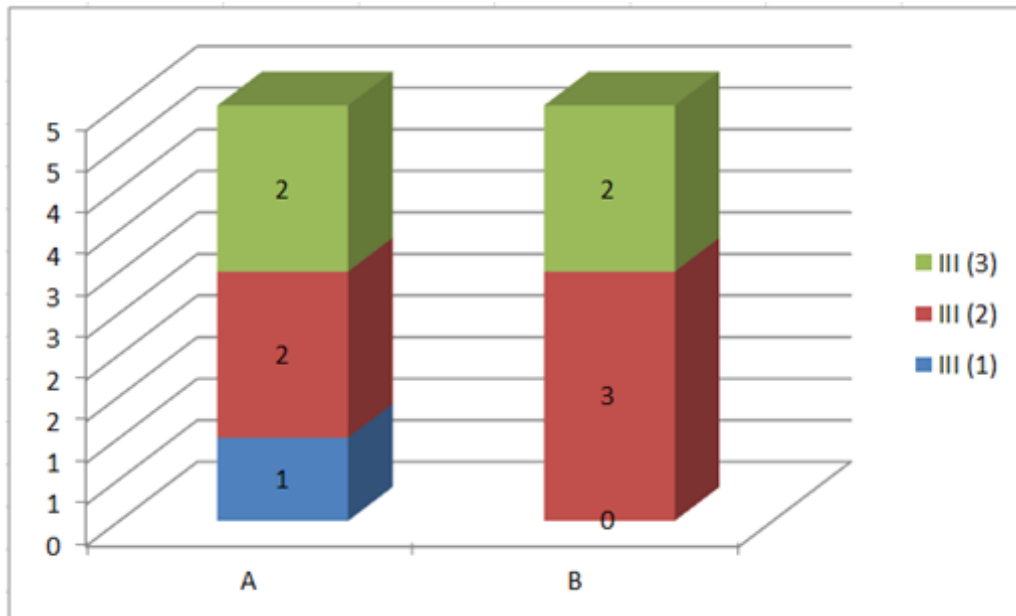
Graf 2 - Vyjádření kvality propláchnutí ledvin Fisherova exaktního testu pro čas I.

Hodnota signifikance dle Fisherova exaktního testu pro čas I vyšla $p = 1,00$, tedy větší než $0,05$. Stupeň propláchnutí ledviny 1,2,3, případně 4 se tedy mezi skupinami A a B statisticky významně neliší.



Graf 3 - Vyjádření kvality propláchnutí ledvin Fisherova exaktního testu pro čas II.

Hodnota signifikance dle Fisherova exaktního testu pro čas II vyšla $p = 1,00$, tedy větší než $0,05$. Stupeň propláchnutí ledviny 1,2,3, případně 4 se tedy mezi skupinami A a B statisticky významně neliší.



Graf 4 -Vyjádření kvality propláchnutí ledvin Fisherova exaktního testu pro čas III.

Hodnota signifikance dle Fisherova exaktního testu pro čas III vyšla $p = 1,00$, tedy větší než 0,05. Stupeň propláchnutí ledviny 1,2,3, případně 4 se tedy mezi skupinou A a B statisticky významně neliší.

Výsledky prokazují identickou kvalitu štěpů prezervovaných jak klasickou intraarteriální perfuzí, tak retrográdní oxygenovou persufací. Nenalezli jsme signifikantní rozdíly jak v histopatologickém hodnocení odebraných štěpů, tak v hodnotách urey u zvířat po transplantaci daných štěpů. Uvedené výsledky jsou v souladu s literaturou. Nepotvrdili jsme názor některých autorů, že ROP může být dokonce superiorní ve srovnání s klasickou perfuzí event. s „cold storage“ [7]. Prokázali jsme ale bez pochyby, že i prostá ROP dokáže parenchym ochránit. Otázkou podle našeho názoru není nahrazení zvyklé intraarteriální perfuze retrográdní persufací, nabízí se však možnost určité kombinace obou metod.

7. Ihned zahájená pulzatilní perfuze – experiment na malém zvířeti

7.1 Metodika

První fáze tohoto experimentu byla realizována na malém laboratorním zvířeti (králík domácí). Důvodem byla potřeba ověřit v praxi funkčnost experimentálního perfuzoru a měřících jednotek, k čemuž bylo malé laboratorní zvíře zcela dostačující. Cílem bylo porovnat zejména promytí a zchlazení ledviny v těle dárce.

Pracovali jsme opět s 10 experimentálními zvířaty, ta byla rozdělena do dvou skupin po pěti kusech. V obou skupinách bylo zvíře premedikováno (midazolam i.m.), poté uvedeno do celkové anestezie (ketamin i.v.). Byla provedena střední laparotomie, proniknuto do retroperitonea a vypreparována abdominální aorta, dolní dutá žíla a cévní stopka levé ledviny. Ledvinný hilus byl na 30 minut klampován, čímž byla simulována teplá ischemie levé ledviny – to odpovídá obvyklé hranici maximální délky teplé ischemie v klinické praxi. Poté byl proveden podvaz aorty nad odstupem levostranných ledvinných cév a nad bifurkací, do aorty byl zaveden tenký perfuzní katetr. Identicky byl zaveden katetr do dolní duté žíly k odvádění perfuzátu z ledviny.

V první skupině (skupina A, N=5) byl štěp promýván zvykle za užití hydrostatického tlaku pomocí vaku zavěšeného ve standardní výšce nad operačním stolem. Ve druhé skupině (skupina B, N=5) byla ledvina promývána za užití přístrojového mechanického perfuzoru za definovaných poměrů. Doba promývání byla u obou skupin 30 minut. Byly měřeny parametry průtoku ledvinou a teplota orgánu pomocí čidla zavedeného do ledvinného parenchymu. Poté bylo zvíře usmrceno pomocí kardioplegického roztoku a ledvina odebrána k histologickému vyšetření. Patologem byla objektivně hodnocena míra promytí ledviny a stupeň poškození parenchymu dle standardizované již výše uvedené stupnice.

Jako parametry kvality prezervace štěpu byla hodnocena teplota ledvinného parenchymu (resp. rychlost jejího poklesu), objem průtoku perfuzního roztoku a kvalita promytí štěpu hodnocena patologem, pro něhož byla studie zaslepena. Byla identicky jako v předchozím experimentu hodnocena míra propláchnutí glomerulu, přítomnost mikrotrombů a event. přítomnost akutní tubulární nekrózy.

Stupeň 1... kompletní promytí, bez erytrocytů v kapilárách, bez mikrotrombů

Stupeň 2... neúplné promytí, občasné skupiny erytrocytů v kapilárách (zejména glomerulu), ojedinělé mikrotromby

Stupeň 3... adekvátně nepromyté ledviny (fyziologický obraz)

Stupeň 4... nepromyté ledviny, přítomnost akutní tubulární nekrózy

Tato klasifikace je na našem pracovišti běžně užívána společně s Remuzziho klasifikací.

7.2 Výsledky

V průběhu experimentu nedošlo k technickým obtížím ani k peroperačním komplikacím.

Tabulka 3 popisuje naměřené parametry u jednotlivých zvířat.

Zvíře	Skupina	Průtok max. (ml/min)	Pokles teploty (st. C)	Promytí (1-4)
1	A (kontrolní)	8,7	3,7	3
2	A (kontrolní)	6,9	2,4	3
3	A (kontrolní)	1,26	3,46	3
4	A (kontrolní)	5,7	3,3	3
5	A (kontrolní)	8,5	4	3
6	B (mech. perfuze)	14,15	19,53	1
7	B (mech. perfuze)	12,08	17	2
8	B (mech. perfuze)	9,74	14,3	1
9	B (mech. perfuze)	15,25	20	2
10	B (mech. perfuze)	13,82	16,9	2

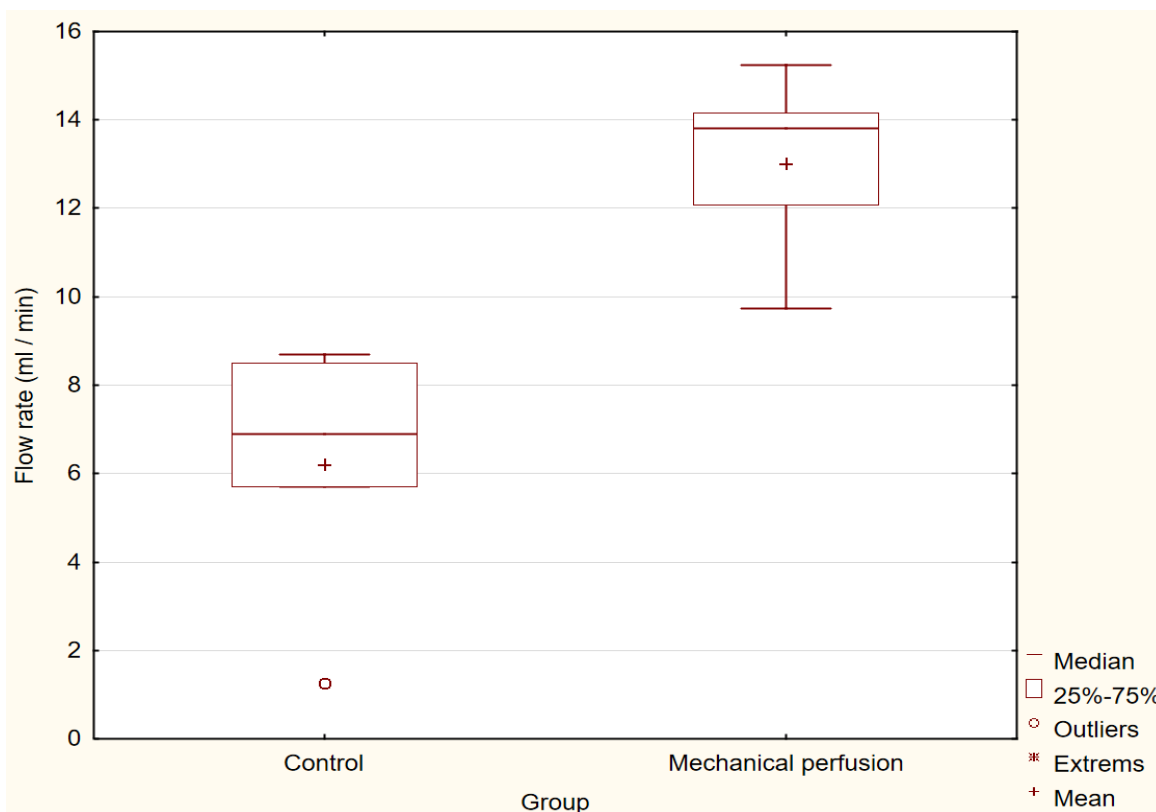
Tab. 3 - Hodnocené parametry u jednotlivých zvířat

Tabulka 4 popisuje statistické zhodnocení jednotlivých veličin.

	Skupina	N	Průměr	SD	Medián	Min	Max	t-test
Průtok max.	A (kontrolní)	5	6,212	3,028	6,900	1,260	8,700	p = 0,004
	B(mech.perf.)	5	13,008	2,152	13,820	9,740	15,250	
Snížení teploty	A(kontrolní)	5	3,372	0,604	3,460	2,400	4,000	p <0,001
	B(mech.perf.)	5	17,546	2,303	17,000	14,300	20,000	
Promytí	A (kontrolní)	5	3,000	0,000	3,000	3,000	3,000	p = 0,005
	B(mech.perf.)	5	1,600	0,548	2,000	1,000	2,000	

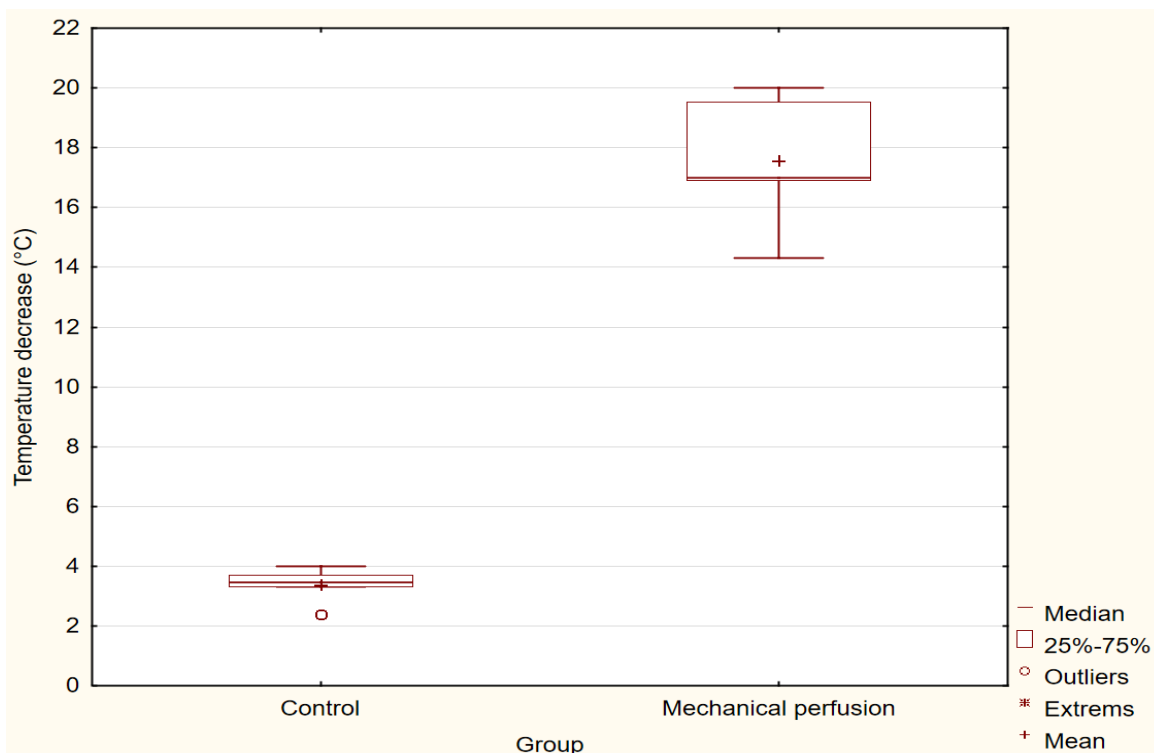
Tab. 4 – Statistické vyhodnocení naměřených hodnot

I u takto malého souboru zvířat jsme našli jasný signifikantní rozdíl v maximálním průtoku, kdy u skupiny mechanicky perfundovaných zvířat byl max. průtok signifikantně vyšší než u kontrolní skupiny při užití pouze hydrostatického tlaku viz graf 5 ($p=0,004$).



Graf 5 - Maximální průtok v ml/min u jednotlivých skupin

Stejně tak jsme pozorovali statisticky významný rozdíl v poklesu teploty štěpu ve prospěch pulzatilní perfuze viz graf 6 ($p < 0,001$).



Graf 6 - Pokles teploty ve st. C v průběhu perfuze u jednotlivých skupin

Statisticky významné bylo i kvalitativní histopatologické hodnocení proplachu štěpů opět ve prospěch pulzatilní perfuze ve skupině B ($p = 0,005$).

Výsledky tedy ukazují jak statisticky významné rychlejší zchlazení ledvinných štěpů u přístrojové perfuze, tak i statisticky významně vyšší průtok perfuzního roztoku ledvinou za minutu. Za stejnou časovou jednotku je tak orgán propláchnut větším množstvím perfuzátu. Dosud užívaná metoda pracuje s chladným perfuzátem, který se však již při podávání do těla zemřelého ohřívá od okolní pokojové teploty. Díky zapojení chladiče média v našem perfuzoru až těsně před vstup do těla dárce jsme mohli dosáhnout velmi nízké teploty perfuzátu kolem 4 st. C. Proto je následné zchlazení orgánu účinnější.

Rovněž objektivní hodnocení kvality propláchnutí štěpu vyznívá jednoznačně pro mechanickou pulzatilní perfuzi.

Prokázali jsme pomocí histologického vyšetření, že promytí ledviny pomocí mechanického perfuzoru v těle zvířete je výrazně lepší než při použití hydrostatického tlaku. Na histologických preparátech nebyly v glomerulech přítomny krevní elementy u ledviny promyté perfuzorem. Zdá se, že řízená mechanická perfuze je schopna z ledviny odstranit i drobné již vytvořené mikrotromby a zachovat maximum cévního řečiště pro obnovení krevního průtoku.

8. Experiment na velkém zvířeti

8.1 Metodika

Po prvotním ověření naší hypotézy a funkčnosti experimentálního perfuzoru v pokusu na malém zvířeti, jsme jako další model vybrali prase domácí. Důvodem byla větší velikost ledvin a cévních struktur a tím pádem snazší kanylace renálních cév. Zvířata jsme opět rozdělili do dvou skupin, celkem bylo použito 7 zvířat.

Po premedikaci (Stresnil i.m.) a následném uvedení do celkové anestezie (Propofol 2 % i.v.) bylo zvíře orotracheálně intubováno a ponecháno na umělé plicní ventilaci. Anestezie byla vedena jako totální intravenózní užitím 2 % Propofolu podávaného kontinuálně. K analgezii byl užit Nalbufin 1 % rovněž i.v. kontinuálně s eventuálním bolusovým navýšením dávky dle potřeby.

Po zvyklé přípravě operačního pole byla vedena kompletní střední laparotomie, vypreparován oboustranně ledvinový hilus a průběh ureteru. Podle příhodnější cévní anatomie byla zvolena ledvina k provedení vlastního experimentu. Často bylo přítomno zdvojení renální žíly, které by výrazně ztížilo zavedení drenážního katetru k odvodu perfuzátu. Na straně zvolené k experimentu byly poté nasazeny cévní svorky na renální tepnu co nejbližší k odstupu z abdominální aorty a na renální žílu před soutokem se suprarenálními žilami a žilními spojkami z retroperitonea. Cílem bylo zabránit pronikání perfuzátu do žilního řečiště zvířete a tím snížení rizika tekutinového přetížení a iontového rozvratu. Svorky byly ponechány po dobu 30 minut k simulaci délky teplé ischemie, opět ve shodě s maximální délkou trvání užívanou v klinické praxi. V této době byl ještě do vypreparovaného a přerušeno ureteru zaveden katetr k měření diurézy. Po uplynutí doby simulace teplé ischemie, byla provedena příčná arteriotomie a zaveden perfúzní katetr do lumen a. renalis. Zde byl fixován připravenou ligaturou. Identicky byl umístěn drenážní katetr do v. renalis. Poté byl zahájen proplach ledviny.

V první skupině (skupina A, N=3) bylo promytí provedeno shodně s klinickou praxí použitím vaku zavěšeného do výše 1 m nad operačním stolem. Tím byl generován hydrostatický tlak cca 73,5 torr. Vak byl uskladněn v chladničce při teplotě 5 stupňů Celsia. Ve druhé skupině (skupina B, N=4) byl k proplachu ledviny opět užit mechanický perfuzor s pulzatickým režimem toku. Perfuzát před vstupem do těla zvířete procházel chladičem, ve kterém měl na výstupu teplotu + 4 stupně Celsia. Perfuzor byl ovládán pomocí počítačové řídicí jednotky. Hlavním parametrem, podle kterého jsme perfuzi řídili, byl průtok ledvinou. Zprvu jsme průtok udržovali nižší (3-6 ml/min) a postupně jej zvyšovali (14-16 ml/min) v závislosti na odezvě promývaného orgánu, zejména na úrovni tlaku v cévním řečišti ledviny.

V obou případech trvalo promývání 1 hodinu. Po tuto dobu byly zaznamenávány hodnoty průtoku a tlaku v perfúzním katetru umístěném v renální tepně. Teplotním čidlem zavedeným do parenchymu ledviny byla snímána teplota uvnitř orgánu. Teplota na povrchu byla snímána termokamerou.

Na konci promývání byl odebrán první histologický vzorek (I) za pomoci klínovité excize z okraje ledviny, místo odběru bylo přešito jednotlivými polypropylenovými stehy. Katetry z renálních cév byly odstraněny a arterio- a venotomie uzavřena pokračující cévní suturou polypropylenovým stehem 6/0.

Následně došlo k sejmutí cévních svorek a obnovení průtoku krve ledvinou. Ihned nato byla provedena kontralaterální nefrektomie. Zvíře bylo ponecháno v pokračující celkové anestezii a ventilované. Laparotomie byla uzavřena a katetr z ureteru ponechané ledviny byl vyveden v jejím distálním pólu a napojen na sběrný vak s měřicí škálou. Sledování laboratorních hodnot a diurézy probíhalo po dobu 6 hodin. Na konci experimentu bylo zvíře usmrceno kardioplegickým roztokem KCl a odebrána ledvina k histologickému vyšetření (vzorek II).

Sledované laboratorní hodnoty z moči a séra byly stanoveny nejprve po úvodu do anestezie a dále na konci 1., 3. a 6. hodiny po obnovení průtoku ledvinou. Dále byl zaznamenán objem moči na konci 6. hodiny. V séru byly stanovovány Na⁺, K⁺, Cl⁻, Urea, Kreatinin, stejně tak v moči. Ve všech vzorcích séra byla stanovena hladina lipokalinu asociovaného s gelatinázou neutrofilů – neutrophil gelatinase associated lipocalin (NGAL), stejně jako pi-GST (pi-glutathion-S-transferase) jako markerů poškození ledvinného parenchymu. Tento marker byl též stanoven v moči.

Histologické vyšetření bylo shodné jako u prvního experimentu, pro patologa byly vzorky zaslepeny. Hodnocení bylo opět provedeno na 4 stupňové škále.

V průběhu experimentu nedošlo k technickým obtížím ani k peroperačním komplikacím.

8.2 Výsledky

V následujících tabulkách a grafech jsou znázorněny naměřené hodnoty z průběhu perfuze ledvin u jednotlivých zvířat, naměřené laboratorní hodnoty a jejich statistické zhodnocení.

Statistické zpracování bylo provedeno v software STATISTICA 10 (Statsoft, USA). Všechny testy byly provedeny na hladině spolehlivosti 5 %. Pro srovnání různých veličin u dvou skupin byl použit dvou výběrový t test. Pro srovnání veličin na začátku a na konci studie mezi dvěma skupinami byl spočten rozdíl mezi posledním a prvním měřením a na ten aplikován dvou výběrový t test. Grafické porovnání bylo provedeno pomocí bodových a spojnicových grafů.

8.2.1 Srovnání maximálního a středního průtoku, poklesu teploty a diurézy mezi skupinami A a B u pokusných zvířat

8.2.1.1 Vstupní data

K dispozici byly od skupiny A tři měření a od skupiny B čtyři měření parametrů průtok maximální (maximální průtok ledvinou), střední průtok, pokles teploty a diuréza viz následující tabulka č. 5.

	Skupina	Diuréza celkem [ml]	Max. průtok [ml/min]	Střední průtok [ml/min]	Teplota začátek [°C]	Teplota konec [°C]	Pokles teploty [°C]
A1	A	20	8.5		31.2	24	7.2
A2	A	20	9.4		29.9	26	3.9
A3	A	100	8.4		32.1	23.5	8.6
B1	B	0	17.6	11.7	31.9	23.8	8.1
B2	B	100	15.6	11.9	29.2	18.5	10.7
B3	B	250	25.4	16.8	32.3	19.1	13.2
B4	B	0	20.3	15.0	27.4	17.5	9.9

Tab. 5 – Naměřené veličiny u skupiny A a B

8.2.1.2 Srovnání měřených parametrů mezi skupinami A a B

Pro srovnání parametrů průtok max., pokles teploty, průtok maximální u A se středním průtokem skupiny B a diurézy byl kromě standardních popisných statistik průměr, SD, medián, min. a max. použit dvou výběrový t test (two sample t test). Metoda testuje nulovou hypotézu, že mezi oběma skupinami není rozdíl oproti alternativní hypotéze, že se obě skupiny v rámci daného parametru významně liší. Je-li hodnota významnosti v posledním sloupci tabulky menší než 0.05, hovoříme o statisticky významné rozdílnosti mezi skupinami.

	Skupina	N	Průměr	SD	Medián	Min	Max	t-test
Průtok max	A	3	8.767	0.551	8.5	8.4	9.4	p = 0.007
	B	4	19.725	4.245	19.9	15.6	25.4	
Pokles teploty	A	3	6.567	2.413	7.2	3.9	8.6	p = 0.071
	B	4	10.475	2.117	10.3	8.1	13.2	
Průtok max. u A. střední u B	A	3	8.767	0.551	8.5	8.4	9.4	p = 0.019
	B	4	13.850	2.480	13.5	11.7	16.8	
Diuréza celkem	A	3	46.667	46.188	20	20	100	p = 0.602
	B	4	87.500	118.145	50	0	250	

Tab. 6 – Statistické vyhodnocení naměřených veličin

Z uvedené tabulky popisných statistik a p hodnot dvou výběrových t testů plyne, že se oba parametry týkající se průtoku statisticky významně liší, přičemž u obou testů dopadla lépe skupina B. Pokles teploty ani diuréza se statisticky významně nelišily u jednotlivých skupin.

8.2.2 Srovnání histologického vyšetření mezi skupinami A a B

Zvíře (skupina)	Vzorek	
	I (po perfuzi)	II (po 6 hodinách po „Tx“)
1 (A)	3	3
2 (A)	3	3
3 (A)	3	3
1 (B)	2	3, kongesce v parenchymu
2 (B)	2	3
3 (B)	2	3
4 (B)	2	3, kongesce v parenchymu

Tab. 7 – Histologické vyhodnocení odebraných vzorků

Proplach byl hodnocen na stupnici 1 až 4 viz předchozí experimenty. Všechna zvířata ze skupiny A měla proplach u vzorku (I) hodnocen stupněm 3 a zvířata ze skupiny B měla proplach ve vzorku (I) po perfuzi hodnocen stupněm 2. Zde nebyla provedena žádná statistika ani krabicové grafy, neboť máme nulový rozptyl.

8.2.3 Porovnání laboratorních parametrů v 6 hodinách

8.2.3.1 Vstupní data

K dispozici byly od skupiny A tři měření a od skupiny B čtyři měření parametrů Na, Cl, K, Urea a Kreat v 6. hodině po obnovení průtoku ledvinou.

Zvíře	Skupina	Na v 6 hod.	Cl v 6 hod.	K v 6 hod.	Urea v 6 hod.	Kreat v 6 hod.
A1	A	130	92	7.0	4.1	125
A2	A	141	101	4.9	4.6	91
A3	A	141	101	5.2	4.9	121
B1	B	144	100	4.2	2.3	93
B2	B	134	92	4.4	5.4	95
B3	B	134	100	5.6	5.9	124
B4	B	136	98	9.8	4.8	126

Tab. 8 – Naměřené laboratorní parametry v 6. hodině po obnovení průtoku

8.2.3.2 Srovnání měřených laboratorních parametrů mezi skupinami

Pro srovnání laboratorních parametrů byl kromě standardních popisných statistik průměr, SD, medián, min a max použit dvou výběrový t test.

	Skupina	N	Průměr	SD	Medián	Min	Max	t-test
Na v 6 hod.	A	3	137.33	6.35	141	130	141	p = 0.94
	B	4	137.00	4.76	135	134	144	
Cl v 6 hod.	A	3	98.00	5.20	101	92	101	p = 0.89
	B	4	97.50	3.79	99	92	100	
K v 6 hod.	A	3	5.70	1.14	5.2	4.9	7.0	p = 0.86
	B	4	6.00	2.61	5.0	4.2	9.8	
Urea v 6 hod.	A	3	4.53	0.40	4.6	4.1	4.9	p = 0.95
	B	4	4.60	1.60	5.1	2.3	5.9	
Kreat v 6 hod.	A	3	112.33	18.58	121	91	125	p = 0.85
	B	4	109.50	17.94	109.5	93	126	

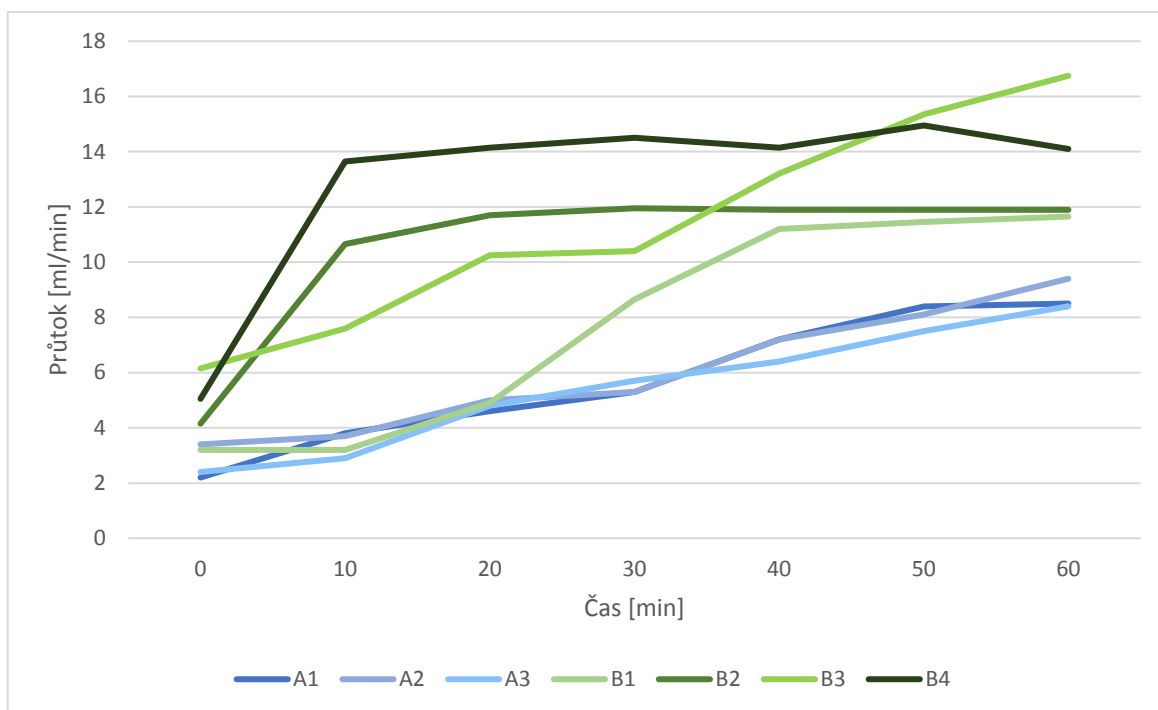
Tab. 8 – Statistické zhodnocení laboratorních parametrů v 6. hodině po obnovení průtoku

Z uvedené tabulky (tab. 8) popisných statistik a p hodnot dvou výběrových t testů plyne, že ani jeden laboratorní parametr nevyšel statisticky významný.

8.2.4 Porovnání průběhu poklesu teploty, průtoku, tlaku a odporu mezi skupinami A a B
K dispozici byly od skupiny A tři měření a od skupiny B čtyři měření v časech 0, 10, 20, 30, 40, 50 a 60 min. Měřil se průtok [ml/min], teplota [°C], tlak [mmHg] a odpor [mmHg.min/l].

Čas [min]	Průtok [ml/min]						
	0	10	20	30	40	50	60
A1	2.2	3.8	4.6	5.3	7.2	8.4	8.5
A2	3.4	3.7	5.0	5.3	7.2	8.1	9.4
A3	2.4	2.9	4.8	5.7	6.4	7.5	8.4
B1	3.2	3.2	4.9	8.7	11.2	11.5	11.7
B2	4.2	10.7	11.7	12.0	11.9	11.9	11.9
B3	6.2	7.6	10.3	10.4	13.2	15.4	16.8
B4	5.1	13.7	14.2	14.5	14.2	15.0	14.1

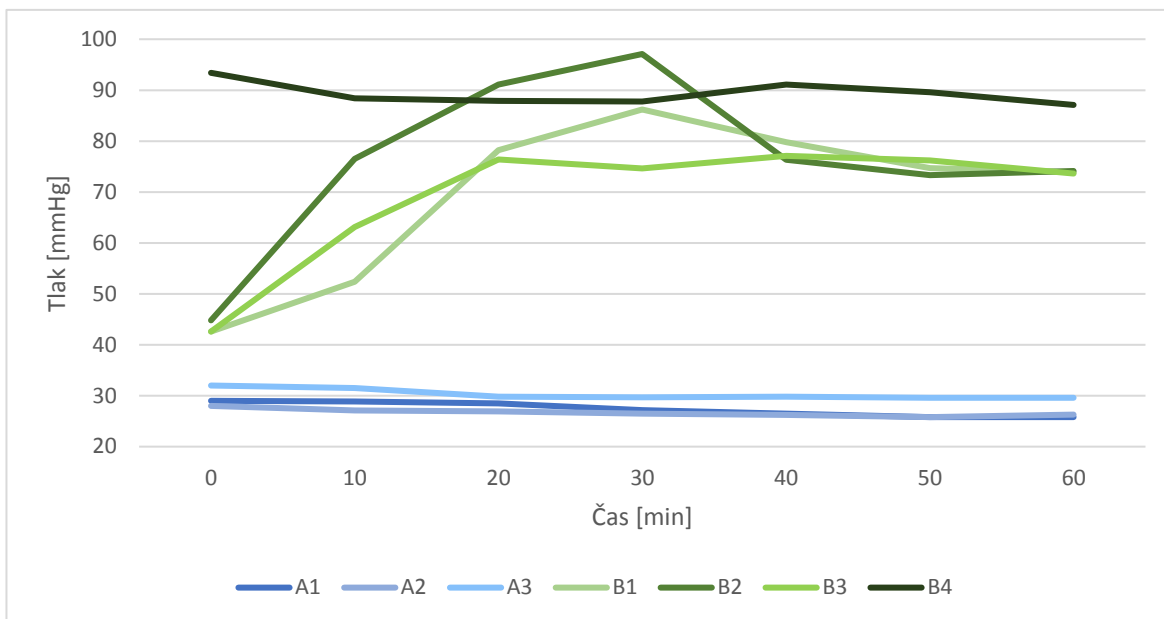
Tab. 9 - Hodnoty průtoku ledvinou v ml/min v jednotlivých časových intervalech



Graf 7 – Srovnání hodnot průtoku ledvinou v ml/min v čase mezi oběma skupinami

Čas [min]	Tlak [mmHg]						
	0	10	20	30	40	50	60
A1	29.0	28.9	28.5	27.2	26.5	25.8	25.8
A2	28.0	27.1	26.9	26.5	26.2	25.8	26.3
A3	32.0	31.5	29.8	29.7	29.8	29.6	29.6
B1	42.6	52.4	78.2	86.2	79.8	74.7	73.9
B2	44.8	76.5	91.1	97.1	76.3	73.3	74.1
B3	42.6	63.1	76.4	74.6	77.1	76.2	73.6
B4	93.4	88.4	87.9	87.8	91.1	89.6	87.1

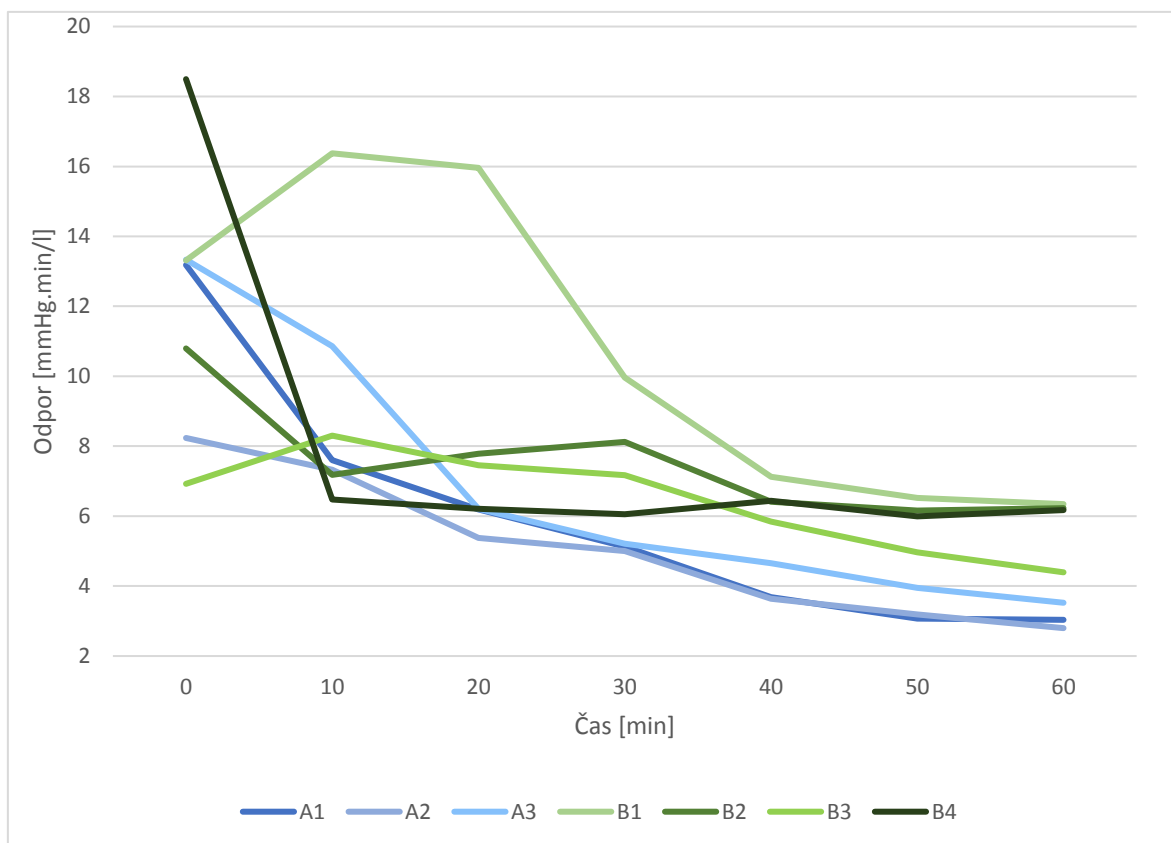
Tab. 10 - Hodnoty perfuzního tlaku v mmHg v jednotlivých časových intervalech



Graf 8 - Srovnání hodnot perfúzního tlaku v mmHg v čase mezi oběma skupinami

Odpor [mmHg.min/l]							
Čas [min]	0	10	20	30	40	50	60
A1	13.2	7.6	6.2	5.1	3.7	3.1	3.0
A2	8.2	7.3	5.4	5.0	3.6	3.2	2.8
A3	13.3	10.9	6.2	5.2	4.7	3.9	3.5
B1	13.3	16.4	16.0	10.0	7.1	6.5	6.3
B2	10.8	7.2	7.8	8.1	6.4	6.2	6.2
B3	6.9	8.3	7.5	7.2	5.8	5.0	4.4
B4	18.5	6.5	6.2	6.1	6.4	6.0	6.2

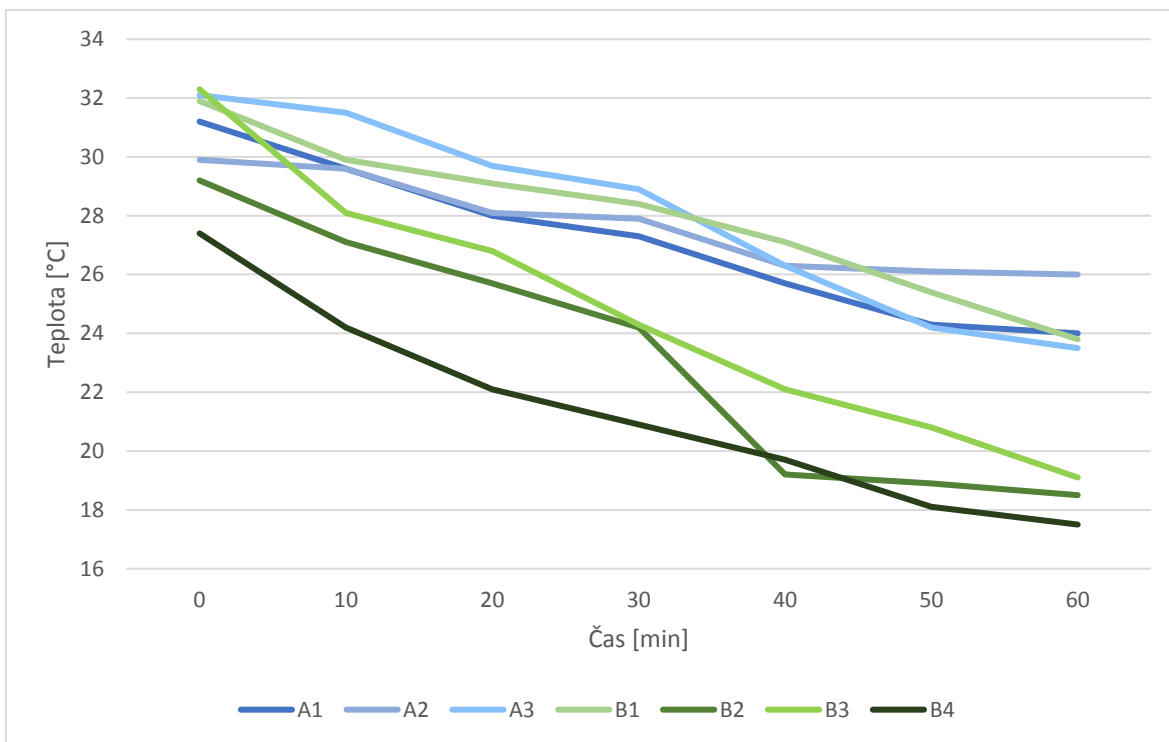
Tab. 11 - Hodnoty cévního rezistence v jednotlivých časových intervalech



Graf 9 - Srovnání hodnot cévní rezistence uvnitř orgánu v čase mezi oběma skupinami

Teplota [°C]							
Čas [min]	0	10	20	30	40	50	60
A1	31.2	29.6	28	27.3	25.7	24.3	24.0
A2	29.9	29.6	28.1	27.9	26.3	26.1	26.0
A3	32.1	31.5	29.7	28.9	26.3	24.2	23.5
B1	31.9	29.9	29.1	28.4	27.1	25.4	23.8
B2	29.2	27.1	25.7	24.2	19.2	18.9	18.5
B3	32.3	28.1	26.8	24.3	22.1	20.8	19.1
B4	27.4	24.2	22.1	20.9	19.7	18.1	17.5

Tab. 12 - Hodnoty naměřené teploty v parenchymu v jednotlivých časových intervalech



Graf 10 - Srovnání hodnot teploty uvnitř orgánu ve °C v čase mezi oběma skupinami

8.2.5 Srovnání vývoje markerů poškození ledvin

Hodnoty nad hranicí měřitelnosti u markerů plazma pi-GST a moč pi-GST z důvodu zachování dostatečného počtu dat nahrazeny expertním odhadem v blízkosti hodnoty 30. Identicky bylo postupováno u hodnot pi-GST v moči u ledvin, které nenastoupily diurézu. Hodnota je dostatečně vysoká k vyjádření výrazného poškození ledvinného parenchymu, bez jejího využití by nebylo statistické zhodnocení této veličiny možné.

K dispozici byly od skupiny A tři měření a od skupiny B čtyři měření v každém čase (Tab. 13).

Prase	Náběr	NGAL-plazma	GSTpí-plazma	GSTpí-moč
A1	0	30,2	31,00	8,68
A1	1	23,1	30,00	9,89
A1	3	24,3	29,00	15,93
A1	6	24,4	32,00	18,40
A2	0	32,4	15,18	2,05
A2	1	25,4	16,55	9,38
A2	3	26,0	12,58	11,35
A2	6	31,6	15,87	5,93
A3	0	24,4	9,89	6,00
A3	1	18,6	12,28	9,08
A3	3	37,2	8,50	11,96
A3	6	29,8	10,06	20,32
B1	0	36,5	8,31	10,73
B1	1	26,0	9,38	31,00
B1	3	28,4	7,17	29,00
B1	6	31,9	14,47	30,00
B2	0	24,9	11,35	5,80
B2	1	22,8	10,87	15,30
B2	3	23,7	16,41	12,08
B2	6	27,8	14,47	7,00
B3	0	28,6	9,89	6,24
B3	1	31,4	6,57	21,54
B3	3	30,3	7,94	16,17
B3	6	35,9	12,73	18,26
B4	0	34,1	8,31	7,44
B4	1	34,1	8,31	31,00
B4	3	23,8	8,85	30,00
B4	6	35,0	10,22	29,00

Tab. 13 – Hodnoty sledovaných markerů poškození ledvinného parenchymu

Čas 0	Půměr A	Průměr B	Sm.odch A	Sm.odch B	Počet A	Počet B	p
NGAL-plazma	29,008	31,013	4,124	5,265	3	4	0,611
GSTpí-plazma	18,688	9,466	10,985	1,459	3	4	0,147
GSTpí-moč	5,573	7,552	3,334	2,231	3	4	0,386
Čas 1	Půměr A	Průměr B	Sm.odch A	Sm.odch B	Počet A	Počet B	p
NGAL-plazma	22,354	28,549	3,472	5,117	3	4	0,133
GSTpí-plazma	19,608	8,783	9,250	1,813	3	4	0,065
GSTpí-moč	9,449	24,711	0,408	7,697	3	4	0,020
Čas 3	Půměr A	Průměr B	Sm.odch A	Sm.odch B	Počet A	Počet B	p
NGAL-plazma	29,164	26,549	7,042	3,344	3	4	0,536
GSTpí-plazma	16,691	10,096	10,853	4,267	3	4	0,308
GSTpí-moč	13,081	21,813	2,490	9,041	3	4	0,172
Čas 6	Půměr A	Průměr B	Sm.odch A	Sm.odch B	Počet A	Počet B	p
NGAL-plazma	28,584	32,655	3,753	3,691	3	4	0,211
GSTpí-plazma	19,307	12,975	11,370	2,012	3	4	0,311
GSTpí-moč	14,883	21,064	7,815	10,778	3	4	0,442

Tab. 14 - Hodnoty uvedených markerů v čase 0 až 6 hodin

Dobrou představu o vývoji sledovaných parametrů je možné získat z grafického znázornění pomocí spojnicových grafů (graf 7-10).

Během perfuze jsme opět porovnávali měřené parametry průtoku a zchlazení orgánu v těle zvířete. Mechanickou perfuzí jsme opět dosáhli statisticky významnějšího rozdílu mezi oběma skupinami, a to jak pro vrcholový průtok u mechanické pulzatilní perfuze (průtok na vrcholu systoly čerpadla), tak pro průtok střední (vypočítaný identicky jako v klinické praxi) ve srovnání s maximálním průtokem u hydrostatické perfuze ($p=0,007$, resp. $0,019$). Z grafu č. 8, který zobrazuje hodnoty naměřeného tlaku v ledvině a grafu č. 9, kde jsou znázorněny hodnoty cévní rezistence v čase, je patrný rozdílný průběh perfuze při užití hydrostatického tlaku (modře) a mechanické perfuze (zeleně). Je zřejmé, že u klasického proplachu hydrostatickým tlakem je tento konstantní, zatímco při užití mechanického perfuzoru je tlak závislou veličinou podle zvolené hodnoty průtoku. Průtok jsme zprvu nastavili na nižší hodnoty 3-6 ml/min, a poté postupně zvyšovali, cílem bylo nepřekročit hodnotu 90 mmHg.

Z grafu č. 9 je potom patný postupný pokles cévního odporu, což se domníváme, že je způsobeno postupným uvolněním většího množství cévního řečiště. V grafu č. 10 je poté patrný výraznější pokles teploty v parenchymu ledviny a jeho nižší hodnoty. Přesto co se týče poklesu měřené teploty orgánu, nebylo těsně dosaženo úrovně statistické významnosti ($p=0,071$).

Srovnání sledovaných markerů poškození ledvinného parenchymu je patrné z tabulky 14. Z výsledných p hodnot vyplývá, že v žádném z časů 0,1,3,6 hod. se skupiny A a B statisticky významně nelišily s výjimkou času 1 u markeru pi-GST moč. Statistická nevýznamnost ale samozřejmě může být způsobena malým počtem hodnot u skupin A a B. I z grafického znázornění je patrné, že vývoj markerů je v časech 0,1,3,6 pro obě skupiny A a B dosti podobný.

9. Diskuze

Terminální stadium selhání ledvin znamená pro nemocné postižené tímto onemocněním zásadní změny v dosavadním životě. To je způsobeno zejména nutností zajištění náhrady ledvinných funkcí. Tyto je možno zajistit pravidelnou hemodialýzou či dialýzou peritoneální. Obě tyto metody však z dlouhodobého hlediska znamenají pro nemocné nejen vyšší rizika zejména kardiovaskulární morbidity a mortality, ale i možné komplikace spojené jak s hemodialýzou, tak s peritoneální dialýzou. Výraznou limitací jsou i změny v oblasti sociální. Metodou zajišťující nejfyziologičtější náhradu funkce ledviny je její transplantace, která znamená pro nemocného návrat do běžného života. V našem regionu je dárcovství od žijícího dárce zastoupeno spíše okrajově. Hlavním zdrojem orgánů k transplantaci jsou dárči zemřelí se smrtí mozku. Množství čekatelů na ledvinu však dlouhodobě převyšuje množství dostupných orgánů. To vedlo ve světě i u nás k ustanovení programu zemřelých dárců po nezvratné zástavě oběhu. Dvě hlavní podskupiny těchto DCD označujeme jako kontrolované a nekontrolované. Kritériem tohoto dělení je, zdali se jedná o zástavu oběhu očekávanou, či náhlou. S tím souvisí i způsob odběru a následná prezervace ledvinných štěpů. Po konstatování nezvratné zástavy oběhu a uplynutí non-touch intervalu následuje odběr orgánů k transplantaci. U dárců nekontrolovaných je většinou užívána metoda in situ perfuze s použitím katetru zavedeného do abdominální aorty k proplachu viscerálního segmentu pomocí speciálních roztoků, jež mají za cíl zabránit iontovým přesunům na buněčné membráně a tím stabilizovat vnitřní prostředí buňky. Taktéž jsou nositelem hypotermie, jež snižuje metabolické nároky orgánu. Na některých pracovištích je užívána ECMO, a to buď v nastavení normotermním, či hypotermním. Tato metoda je však nákladná a vyžaduje zvláštní přístrojové vybavení. U dárců kontrolovaných je možno užít metodu rychlé laparotomie s přímým promytím viscerálních orgánů cestou abdominální aorty, jako při odběru z DBD. Druhou možností je též zprvu in situ perfuze užitím trojcestného katetru, s následnou laparotomií a odběrem ledvin. Co se týče následného uchovávání štěpů po jejich vyjmutí z těla dárce, je u DCD zlatým standardem metoda mechanické pulzatilní perfuze. „cold storage“ je možno užít zejména u dárců kontrolovaných s minimální dobou teplé ischemie, odebraných metodou rychlé laparotomie. Zvláště u dárců nekontrolovaných, pakliže bylo delší trvání teplé ischemie, je mechanická pulzatilní perfuze cestou ke zhodnocení vlastností odebraného štěpu. Teplá ischemie je specifikem právě DCD. Počíná již při neefektivním krevním oběhu v době tzv. agonální fáze u dárců kontrolovaných, při poklesu systolického TK pod 70 torrů. U dárců nekontrolovaných v době náhlé srdeční zástavy. V jejím průběhu dochází k patofyziologickým změnám zapříčiněným zástavou buněčného metabolismu v mitochondriích při nedostatečném přísunu kyslíku a metabolických substrátů pro oxidativní pochody zajišťující tvorbu ATP. Tím je zastavena činnost membránových ATP-áz. Důsledkem jsou přesuny iontů po prostém koncentračním gradientu v obou směrech přes buněčnou membránu. Stejně tak dochází k uvolnění nitrocelulárních zásob kalcia, jež má významné signalizační dopady uvnitř buňky. Výsledkem je edém a lýza buňky, její zánik. Množství uvolněných výhradně nitrobuněčných enzymů je možno měřit v průběhu mechanické perfuze. V praxi užívaným je zejména t-GST z oblasti tubulárního aparátu ledviny. Dalším faktorem ke zhodnocení je úroveň renální

vaskulární rezistence. Čím nižší je míra odporu kladeného cévním systémem štěpu, tím větší je šance na dobrý funkční výsledek po transplantaci.

Dalšími možnými přístupy v oblasti prezervace ledvinných štěpů před transplantací je užití perfuze s užitím teplot perfuzátu pod úrovní fyziologické normy, či přímo teploty shodné jako v lidském těle. Cílem je umožnit orgánu před vlastní transplantací určitou restituci energetických zásob a tím zajistit časný nástup funkce. Jedná se zatím o metody spíše experimentální, bez většího užití v klinické praxi. Zvláštní metodou je retrográdní oxygenová persuflace. Zde je plynný kyslík katetrem persuflován cestou renální žíly do odebraného orgánu. Pozitivní experimentální výsledky vedly k užití metody i v klinické praxi, zejména však v oblasti transplantace jater.

Dárci po nezvratné zástavě oběhu se postupem času ukázali jako velmi významný přínos v orgánových transplantacích. V některých zemích, např. ve Spojeném království dnes znamenají až padesátiprocentní podíl na celkovém počtu zemřelých dárců. Jedná se zejména o dárce kontrolované. Naproti tomu ve Španělsku je velmi dobře zaveden program DCD nekontrolovaných, s velmi dobrými výsledky. K programu DCD však neoddiskutovatelně patří vyšší procento výskytu PNF, jež je odrazem tíže proběhlé teplé ischemie, eventuálně poškození orgánu v době agonální fáze před odběrem. Výskyt PNF u DCD je v rozmezí 2-19 %, zatímco u štěpů odebraných DBD se pohybuje mezi 1-9 %. Výrazněji diskutovanou problematikou DCD je DGF, jež se vyskytuje v širokém rozmezí 39-77 %. Vyšší procento je možno očekávat u dárců nekontrolovaných. Opožděný nástup funkce štěpu však nemá větší dopad na dlouhodobou funkci štěpu. Znamená však prodloužení hospitalizace a vyšší náklady na léčbu v období po transplantaci.

Naším cílem tedy bylo prozkoumat možnosti perfuze ledvinného štěpu a v experimentu se pokusit odhalit možnou cestu ke zlepšení vlastností štěpu odebraného z DCD.

První experimentálně testovanou cestou k dosažení tohoto cíle bylo porovnání ROP a promytí ledvinného štěpu hydrostatickým tlakem. Persuflátor byl konstruován konkrétně pro tento experimentální projekt. Technicky se jedná o velmi snadnou a finančně nenáročnou proceduru. Pro hodnocení kvality štěpu jsme zvolili histopatologickou analýzu štěpu (jak po vlastní prezervaci, tak po následné transplantaci). Naše vlastní škála kvality štěpu (1-4) je na našem pracovišti dlouhodobě užívána (vedle zvyklé Remuzziho klasifikace) při hodnocení štěpů od DCD. Druhým hodnotícím faktorem byla funkce natransplantované ledviny, která byla objektivizována pravidelnými odběry žilní krve z vlastního štěpu. Jako marker funkce štěpu jsme stanovili hladinu urey (při kontralaterální nefrektomii). Jsme si vědomi určitého zjednodušujícího pohledu (zejména krátká doba sledování), avšak naším cílem bylo zjištění, zdali ROP může být určitou alternativou při rekondici ledvinného štěpu.

Výsledky prokazují identickou kvalitu štěpů prezervovaných jak klasickou intraarteriální perfuzí, tak retrográdní oxygenovou persuflací. Nenalezli jsme signifikantní rozdíly jak v histopatologickém hodnocení odebraných štěpů (bylo testováno pomocí Fisherova exaktního testu v kontingenční tabulce (Fisher's exact test) pro každý z časů I, II a III samostatně), tak v hodnotách urey u zvířat po transplantaci daných štěpů. Uvedené

výsledky jsou v souladu s literaturou. Nepotvrdili jsme názor některých autorů, že ROP může být dokonce superiorní ve srovnání s klasickou perfuzí event. s „cold storage“. Prokázali jsme ale bez pochyby, že i prostá ROP dokáže parenchym ledviny ochránit, resp. restaurovat. Eventuální přínos této metody vidíme spíše v možné kombinaci s jinými perfuzními mechanismy v rámci rekondice orgánů postižených teplou ischemií.

Dále jsme si položili otázku, zdali by nebylo možné dosáhnout záchrany většího množství glomerulů a rychlejšího zchlazení orgánu již v těle dárce. Již do jisté míry využívanou možností je užití ECMO, která je však přístrojově velmi komplikovanou a nákladnou metodou. V našem experimentu jsme tedy navrhli in situ promytí viscerálního segmentu pomocí zavedeného katetru do abdominální aorty, za užití hypotermní pulzatilní perfuze. Hypotermie logicky snižuje nároky buňky na kyslík zpomalením enzymových reakcí. Udává se 50 % redukce metabolismu na 10 st. C zchlazení. Hypotermie sice parciálně zvyšuje renální vaskulární rezistenci, ale dle recentních literárních dat prodlužuje životnost štěpu a omezuje DGF i při delším času studené ischemie. Jako experimentální zvíře v této fázi studie byl zvolen králík domácí, zejména vzhledem ke snazší logistice a manipulaci.

Statistické zhodnocení bylo provedeno pomocí dvou výběrového t-testu. Výsledky naší iniciální práce na malém zvířeti prokázaly statisticky významně lepší zchlazení ledvinných štěpů u přístrojové perfuze ($p < 0,001$), zatímco in situ proplach hydrostatickým tlakem snížil teplotu průměrně o 3,5 st. C, proplach mechanický průměrně o 17,5 st. C. Statisticky významně vyšší byl i maximální dosažený průtok perfuzního roztoku orgánem za minutu ($p=0,004$). Za stejnou časovou jednotku je tak orgán propláchnut větším množstvím perfuzátu. Rutinně užívaná metoda pracuje s chladným perfuzátem proudícím z vaku, ve kterém je uskladněn při teplotě asi 8st. C. Tento se však již při podávání do těla dárce ohřívá od okolní pokojové teploty v instrumentáriu, ve kterém je veden. Díky zapojení chladiče média v našem perfuzoru až těsně před vstup do těla dárce jsme mohli dosáhnout velmi nízké teploty perfuzátu kolem 4 st. C. Proto následné zchlazení orgánu je účinnější. Rovněž objektivní hodnocení kvality propláchnutí štěpu vyznívá jednoznačně pro mechanickou pulzatilní perfuzi. Prokázali jsme pomocí histologického vyšetření, že promytí ledviny pomocí mechanického perfuzoru v těle zvířete je výrazně lepší než při použití hydrostatického tlaku. Na histologických preparátech nebyly v glomerulech přítomny krevní elementy u ledviny promyté perfuzorem. Kontrolní skupina měla celkově výrazně horší promytí ledvin i makroskopickým pozorováním. Zdá se, že řízená mechanická perfuze je schopna z ledviny odstranit i drobné již vytvořené mikrotromby a zachovat maximum cévního řečiště pro obnovení krevního průtoku. Jsme si rovněž vědomi limitací tohoto experimentu, zejména v malém počtu zvířat a v měření pouze tří základních ukazatelů. Jednalo se o pilotní projekt, který měl prokázat funkčnost modelu in situ perfuze a též použitelnost experimentálního perfuzoru.

Pro další fázi experimentální práce jsme tedy zvolili větší zvíře, prase domácí. Cílem bylo opět prokázat superioritu mechanické in situ perfuze nad prostým proplachem hydrostatickým tlakem, k tomu posloužilo zejména následné pozorování v šesti hodinách po „autotransplantaci“ orgánu zvířeti. Během perfuze jsme opět porovnávali měření

parametry průtoku a zchlazení orgánu v těle zvířete. Mechanickou perfuzí jsme opět dosáhli statisticky významnějšího rozdílu mezi oběma skupinami, a to jak pro vrcholový průtok u mechanické pulzatilní perfuze, tak pro průtok střední ve srovnání s maximálním průtokem u hydrostatické perfuze ($p=0,007$, resp. $0,019$). Co se týče poklesu měřené teploty orgánu, zde nebylo těsně dosaženo úrovně statistické významnosti ($p=0,071$). V tomto případě je však nutno uvažovat o chybě způsobené statistickým hodnocením malého souboru. Ledviny byly obklopeny okolními orgány natolik, nakolik to dovolovalo zavedení perfuzních kanyl. Byla tedy simulována reálná situace proplachu v těle zemřelého, kdy je výrazný teplotní gradient z okolních orgánů.

Co se týče sledování funkce orgánu po obnovení průtoku ledvinou, byla průměrná diuréza téměř dvakrát vyšší ve skupině mechanické perfuze. Při statistickém vyhodnocení však rozdíl nebyl na hladině významnosti ($p=0,602$). Srovnání měřených laboratorních hodnot séra a moči (urea, kreatinin, Na^+ , K^+ , Cl^-) v 6. hodině po obnovení průtoku nevykazovalo rozdíl v obou skupinách. Stejně tak hodnocení vlastnosti transplantované ledviny pomocí markerů ledvinného poškození, neukázalo významný rozdíl mezi oběma skupinami. Všechny 3 markery (NGAL v plazmě, pi-GST v plazmě, pi-GST v moči) nevykazovaly statisticky významný rozdíl v žádném čase po opětovné „autotransplantaci“.

Histologické vyšetření odebrané po proplachu orgánu prokazovalo signifikantně lepší promytí orgánu pomocí mechanické perfuze. Všechny preparáty promyté mechanicky byly hodnoceny 2/4, zatímco při promytí hydrostatickým tlakem 3/4. Opět se tedy potvrdila naše domněnka, že je možné při užití mechanické perfuze odstranit i drobné trombotické hmoty na úrovni kapilárního řečiště, jež by jinak odstraněny nebyly.

V našem experimentu jsme učinili určité pozorování v oblasti tlakových poměrů uvnitř promývaného orgánu. Obecně můžeme říci, že perfuze hydrostatickým tlakem je řízena v podstatě pouze tlakem, který je generován výškou zavěšení vaku nad lůžkem dárce a stupněm renální rezistence. Jedná se tedy o tlakem řízenou perfuzi. Tento tlak byl v našem měření v rozmezí 25,8 – 32 torrů. Pakliže tedy v orgánu tekutina narazí na okrsek s vyšším odporem, nemůže jej dále překonat a proudí okrsky, kde tento odpor není přítomen. Průtok poté tedy zůstává konstantní, nelze jej dále uměle navýšit, jak je vidět v grafickém znázornění. Naopak v případě mechanické perfuze lze ovládat oba dva parametry, jak perfuzní tlak, tak průtok. Naším cílem bylo dosáhnout vyššího průtoku orgánem při omezení rizika edému tkáně. Výhodou průtokem řízené perfuze je, že je do orgánu vždy vpraveno dané množství média, které pokud narazí na místo vyššího odporu, např. mikrotrombus, má snahu jej překonat zvýšením tlaku v systému. Naše měření v průběhu promývání zahajovala na úrovni 40 torrů, s rostoucím průtokem však rostl i odpor v ledvině, bylo tedy nutno perfuzní tlak zvýšit, většinou na zhruba 70 torrů. Závislost však nebyla lineární. Mohlo se tedy s velkou pravděpodobností jednat o postupné vymývání mikrotrombů z parenchymu ledviny, nebo o prostou autonomní reakci cévního řečiště. V čase však odpor postupně výrazně klesl až na třetinové hodnoty oproti počátečnímu stavu. Konečná cévní rezistence byla téměř dvojnásobná oproti hydrostatické perfuzi (6 resp. 3 mmHg.min/l), což může být na vrub zachované autoregulace ledviny která na vyšší

průtok reaguje zvýšením vaskulární rezistence. V negativním případě by se mohlo jednat o odpor způsobeným edémem orgánu, jež se však makroskopicky ani mikroskopicky nezdál přítomen. Tato výše cévní rezistence by jistě neuspěla v rámci hodnocení orgánu k přijetí k transplantaci, kde je hraniční hodnota 0,5 mmHg.min/l. Avšak v tomto experimentu byly orgány výrazně ischemicky poškozeny, čemuž bychom přičítali přítomnou vyšší renální rezistenci i při promytí hydrostatickým tlakem. Cévní rezistenci je samozřejmě možno ovlivnit i farmakologicky podáním vazoaktivních látek. V klinické praxi se při odběru orgánu od DCD podává fentolamin i.v., jež má zabránit cévním spazmům při hypoxii orgánu. V našem experimentu jsme tyto látky neužívali z důvodu zkreslení měření cévní rezistence a nemožnosti následného porovnání obou skupin.

Z výše uvedeného se domníváme, že ihned zahájená pulzatilní perfuze štěpů v těle dárce po nezvratné zástavě oběhu štěpy lépe promyje, tím zachová větší počet nepoškozených glomerulů a nefronů v parenchymu. Efektivnějším zchlazením lze dosáhnout časnějšího zastavení již probíhajících ischemických změn a po následné transplantaci snížit procento výskytu PNF a DNF. Jako ideální by se jevila tato metoda v následné kombinaci s možným využitím ROP před transplantací příjemci.

Finanční náročnost při zavedení této metody by nebyla jistě vysoká, komerční přístrojové perfuzory jsou již běžně na trhu a naprostá většina transplantačních center s nimi pracuje. V dalších fázích experimentu bychom chtěli použít opět experimentální model prasete domácího, ovšem s dlouhodobým přežíváním po autotransplantaci mechanicky promytého orgánu v časovém období několika týdnů. Mohli bychom tak lépe hodnotit stav štěpů zejména ve smyslu přítomnosti akutní tubulární nekrózy.

10. Závěr

Dárci ledvin po nezvratné zástavě oběhu jsou v dnešní době nedílnou součástí transplantací medicíny. Jejich využití může výrazně navýšit počet orgánů využitelných k transplantaci a tím zlepšit kvalitu života řadě nemocných v terminální fázi renálního selhání. Jedná se též o nejnáročnější skupinu dárců z pohledu organizace a provedení orgánového odběru, spojenou s řadou nejen logistických, ale i společensky a eticky citlivých otázek. K uchování orgánů odebraných DCD je dnes ve valné většině využívána přístrojová perfuze, jež garantuje nejlepší funkční výsledky po následné transplantaci příjemci. Proto se jako příhodné jeví využití co nejčasnější zahájení přístrojové perfuze již v těle zemřelého dárce. V našem experimentu jsme ověřili účinnost retrogradní oxygenové perfuze ve shodě s literárními daty. Dále jsme ve dvou experimentálních modelech prokázali možnost lepšího zchlazení a promytí ledvinného štěpu v těle dárce. Ideálním cílem našeho výzkumu by bylo zavedení nové metodiky, resp. algoritmu perfuze ledviny odebrané od marginálního dárce. Zavedení do klinické praxe jistě vyžaduje ještě významný kus práce na experimentálním poli, přesto finanční i logistická nenáročnost této metody je příslibem do budoucna.

11. Literatura

- [1] *Rok 2015 | Koordinační středisko transplantací* [online]. [vid. 2017-02-06]. Dostupné z: <http://www.kst.cz/statistiky/domaci/rok-2015/>
- [2] TRESKA, V., D. HASMAN, M. CECHURA, T. REISCHIG, J. RACEK, L. TREFIL, O. HES, S. HADRAVSKÁ a P. MUKENSNÁBL. [Initial experience with transplantation of a kidney from a non-beating heart donor (NHBD)]. *Rozhledy V Chirurgii: Mesicnik Ceskoslovenske Chirurgicke Spolecnosti*. 2002, **81**(11), 582–586. ISSN 0035-9351.
- [3] WATSON, C. J. E., A. C. WELLS, R. J. ROBERTS, J. A. AKOH, P. J. FRIEND, M. AKYOL, F. R. CALDER, J. E. ALLEN, M. N. JONES, D. COLLETT a J. A. BRADLEY. Cold machine perfusion versus static cold storage of kidneys donated after cardiac death: a UK multicenter randomized controlled trial. *American Journal of Transplantation: Official Journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* [online]. 2010, **10**(9), 1991–1999. ISSN 1600-6143. Dostupné z: [doi:10.1111/j.1600-6143.2010.03165.x](https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2010.03165.x)
- [4] NISHIKIDO, M., M. NOGUCHI, S. KOGA, H. KANETAKE, F. MATSUYA, M. HAYASHI, T. HORI a K. SHINDO. Kidney transplantation from non-heart-beating donors: analysis of organ procurement and outcome. *Transplantation Proceedings* [online]. 2004, **36**(7), 1888–1890. ISSN 0041-1345. Dostupné z: [doi:10.1016/j.transproceed.2004.06.030](https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2004.06.030)
- [5] DAEMEN, J. H., B. DE VRIES, A. P. OOMEN, J. DEMEESTER a G. KOOTSTRA. Effect of machine perfusion preservation on delayed graft function in non-heart-beating donor kidneys--early results. *Transplant International: Official Journal of the European Society for Organ Transplantation*. 1997, **10**(4), 317–322. ISSN 0934-0874.
- [6] SALAZAR MEIRA, F., J. ZEMIACKI, A. E. FIGUEIREDO, L. VILIANO KROTH, D. SAUTE KOCHHANN, D. O. D'AVILA, M. TRAESEL, D. SAITOVITCH a C. E. POLI-DE-FIGUEIREDO. Factors Associated With Delayed Graft Function and Their Influence on Outcomes of Kidney Transplantation. *Transplantation Proceedings* [online]. 2016, **48**(7), 2267–2271. ISSN 1873-2623. Dostupné z: [doi:10.1016/j.transproceed.2016.06.007](https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2016.06.007)
- [7] TRECKMANN, Jürgen, Manfred NAGELSCHMIDT, Thomas MINOR, Fuat SANER, Stefano SAAD a Andreas PAUL. Function and quality of kidneys after cold storage, machine perfusion, or retrograde oxygen persufflation: results from a porcine autotransplantation model. *Cryobiology* [online]. 2009, **59**(1), 19–23. ISSN 1090-2392. Dostupné z: [doi:10.1016/j.cryobiol.2009.03.004](https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2009.03.004)

12. Publikační činnost autora

Opatrný V., Třeška V., Moláček J., Tupý R.: Gigantické aneuryzma abdominální aorty a pánevních tepen, Rozhl. Chir., 2016, roč. 95, č. 3, s. 123-125

Opatrný V., Šulc R., Moláček J., Třeška V., Čertík B., Houdek K., Zeithaml J.: Aneuryzma vena poplitea, Rozhl. Chir., 2017, roč. 96, č. 2, s. 88-91.

Třeška V., Duras P., Mírka H., Skalický T., Vyčítal O., Brůha J., **Opatrný V.**, Liška V., Sutnar A.: Transarteriální chemoembolizace pomocí „drug eluting beads“ (TACE DEB) u nemocných s radikálně neodstranitelným hepatocelulárním karcinomem (HCC), Rozhl. Chir., 2014, roč. 93, č. 2, s. 63-69

Moláček J., Třeška V., Baxa J., **Opatrný V.**: Neurogenní tumory retroperitonea, Rozhl. Chir., 2014, roč. 93, č. 5, s. 274-277

Šmíd D., Novák P., Fichtl J., **Opatrný V.**, Bludovský D.: Cerebral salt wasting syndrom (CSWS) – nezvyklá kazuistika z chirurgického pracoviště, Rozhl. Chir., 2014, roč. 93, č. 11, s. 549-553

Moláček J., **Opatrný V.**, Matějka R., Baxa J., Třeška V.: Retrograde Oxygen Persufflation of Kidney – Experiment on an Animal, In Vivo. 2016 11-12;30(6):801-805. **IF 0,953**

Moláček J., Brůha J., Baxa J., **Opatrný V.**, Třeška V.: Extragenitální Mülleriánský karcinosarkom infiltrující dolní dutou žílu – kazuistika, Rozhl. Chir., 2016, roč. 95, č. 1, s. 45-47

Třeška V., Reischig T., Hasman D., Čertík B., Moláček J., Šulc R., Čechura M., Kielberger L., Houdek K., **Opatrný V.**: Dárci ledvin po nezvratné zástavě oběhu (DCD) – zkušenosti jednoho centra, Rozhl. Chir., 2016, roč. 95, č. 4, s. 147-150

Moláček J., Třeška V., Čertík B., Čechura M., Šulc R., **Opatrný V.**, Reischig T.: Duální transplantace ledvin – zkušenosti jednoho centra, Rozhl. Chir., 2017, roč. 96, č. 7, s. 291-295

Černá M., **Opatrný V.**, Nosek J., Geiger J., Třeška V., Boudová L., Buriánek V.: Koincidence lymfomu tračníku a biliárního ileu – kazuistika, Rozhl. Chir., 2016, roč. 95, č. 9, s. 377-382

Moláček J., Třeška V., Čertík B., Čechura M., Šulc R., **Opatrný V.**, Reischig T.: Duální transplantace ledvin – zkušenosti jednoho centra, Rozhl. Chir., 2017, roč. 96, č. 7, s. 291-295

Černá M., **Opatrný V.**, Nosek J., Geiger J., Třeška V., Boudová L., Buriánek V.: Koincidence lymfomu tračníku a biliárního ileu – kazuistika, Rozhl. Chir., 2016, roč. 95, č. 9, s. 377-382

Moláček J., Třeška V., Čertík B., Čechura M., Šulc R., **Opatrný V.**, Reischig T.: Klady a rizika duální transplantace ledvin, Čas. Lék. čes., 2017, 156, 361-363

Moláček J., Třeška V., Čertík B., Čechura M., Šulc R., **Opatrný V.**, Reischig T.: Duální transplantace ledvin – zkušenosti jednoho centra, Rozhl. Chir., 2017, roč. 96, č. 7, s.291-295