

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 dárci 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 transplantační 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 persuface 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.