

(19) Országkód

**HU**



**MAGYAR  
KÖZTÁRSASÁG  
ORSZÁGOS  
TALÁLMÁNYI  
HIVATAL**

## **SZABADALMI LEÍRÁS**

(11) Lajstromszám

**200885 B**

(22) Bejelentés napja: 1988. 12. 28. (21) (6634/88)

Bejelentés elsőbbsége: (33) US  
(32) 1987. 12. 29.  
(31) 139 530

(41) (42) Közzététel napja: 1989. 11. 28.

(45) Megadás meghirdetésének dátuma  
a Szabadalmi Közlönyben: 1990. 09. 28.

(51)

NSZO<sub>5</sub>  
A01N 1/00  
A61K 47/00

(72) Feltaláló(k):  
BELZER, Folkert O.,  
SOUTHARD, James H.,  
Madison Wisconsin, US

(73) Szabadalmas:  
Wisconsin Alumni Research Foundation  
Madison Wisconsin, US

### **(54) OLDAT SZERVEK TARTÓSÍTÁSÁRA**

#### **(57) KIVONAT**

A találmány átültetésre szolgáló szervek tárolására alkalmas készítményre vonatkozik, amely 150 000–350 000 molekulatömegű, 0,4–0,7 szubsztitúciós fokú hidroxil-etil-keményítőt, laktobionsavat, raffinózt, allopurinolt, adenozint, glutationt káliumot és nátriumot tartalmaz vizes oldatban.

*A leírás terjedelme: 8 oldal, ábra nélkül*

**HU 200885 B**

A találmány tárgya betegekbe ültetendő szervek tartósítására alkalmas oldat.

A vesék tartósítása – azaz a tetemekből kivett vesék *ex vivo* körülmények között, vagyis élő szervezetten kívül történő tárolása –, viszonylag új tudományterület. A tetemekből kivett és átültetésre váró vesék tárolása a kórházak mindennapi gyakorlatához tartozik; a próbálkozások azonban csupán a „próbaszerencse” típusú kísérletekre korlátozódtak. Bár ez a megközelítés klinikai szempontból részben sikeresnek bizonyult, az e sikerek mögött rejlő tényleges elvek magyarázata azonban még nem ismeretes.

Párhuzamosan azzal a folyamattal, ahogy a vesé-átültetés szűk értelemben vett kutatási eljárásból elfogadott klinikai kezelési módszerré vált a végstádiumban lévő vesebetegek esetén, a vesetartósítás is fejlődött: a laboratóriumi kutatási fázistól eljutott az elfogadott klinikai eljárás stadiumába. Jelenleg a két, legáltalánosabban alkalmazott vesetartósítási módszer az egyszerű hipotermiás (alacsony hőmérsékleten történő) tárolás és a folyamatos perfúzió (átáramoltatás).

A hipotermiás tárolás – a leggyakrabban használt módszer – során a szerveket eltávolítják a donor holttestéből, majd gyorsan lehűtik. Ezt általában oly módon érik el, hogy a külső hűtést kombinálják egy rövid perfúziós periódussal, annak érdekében, hogy a maghőmérséklet a lehető leggyorsabban lecsökkenjen. A veséket ezt követően úgy tárolják, hogy belemérítik egy egyszerű műanyag tartályban lévő átmosó oldatba, és a tartályt jégbe merítve, a hőmérsékletet 0 °C és 4 °C közötti értéken tartják. E módszer előnyének számít egyszerűsége, olcsósága, valamint a szervek szállításának egyszerű volta. Az átmosó oldat összetételét – az optimális biztosítása érdekében – alaposan tanulmányozták.

A vesék tartósítására alkalmas másik eljárás – mely széles körű laboratóriumi vizsgálatokon, valamint klinikai kipróbáláson ment keresztül –, a folyamatos, pulzáló jellegű perfúzió. A folyamatos átáramoltatáshoz szükséges, alapvető összetevők általában a következők: (1) pulzáló áramlás, (2) hipotermia, (3) a membrán oxigénnel való telítése, és (4) mind albumint, mind pedig lipideket tartalmazó perfúziós folyadék.

A folyamatos átáramoltatásnak számos előnye van. Először is, a perfúzió elegendő időt biztosít ahhoz, hogy a tetemből kivett szerv átültetését legalább részben elektív folyamattá lehessen alakítani. Másodszor pedig lehetővé teszi az életképesség vizsgálatát, az implantációt megelőzően. A tetemből kivett vese átültetési eredményeinek szignifikáns javulása lenne várható abban az esetben, ha a tartósítási időt meg lehetne hosszabítani úgy, hogy elérje azt az 5–7 napos időszakot, amely a jelenlegi eljárásokkal a kevert limfocita-tenyésztés vizsgálatához szükséges.

Az emberi vese két-három napig történő, sikeres tartósításának lehetősége – vagy egy intracelluláris elektrolit-oldattal végzett, kezdeti átáramoltatást követő egyszerű, hidegben történő tárolással, vagy pedig egy elektrolit-fehérje oldattal végzett, pulzáló jellegű perfúzióval –, elegendő időt biztosít a donor és a recipiens hisztokompatibilitási vizsgálatára, a veséknek a különböző transzplantációs központok közötti elosztására, a recipiens gondos műtéti előkészítésére,

arra hogy a donor előzetes tenyésztési eredményei elkészülhessenek, valamint arra, hogy az implantációs előtt alkalmassá tegyék a vese ereit átültetésre. Krioprecipitált plazmával végzett, hipotermiás, pulzáló perfúzió segítségével 72 órán keresztül történő tárolás szignifikáns fejlődést jelentett a humán vesetartósítás területén, és ez a módszer volt az előnyös tartósítási eljárás. Jéghideg intracelluláris elektrolitot tartalmazó átmosó oldattal végzett vesetartósítás, amelyet azután egyszerű, hidegben történő tárolás követ, kielégítően jól alkalmazható emberi vesék legfeljebb 61 órán keresztül történő tartósítására.

A szérum-albumint – különböző formáiban – kizárólagos módon alkalmazzák a szükséges ozmotikus nyomás biztosítására, a klinikai szervtartósítások során. A fent említett alkalmazási formák közé sorolhatók a következők: krioprecipitált plazma, a plazma fehérjefrakciója, a humán szérum-albumin, valamint a szilikagéllal kezelt plazma. Mivel azonban ezeket a perfúziós oldatokat természetes eredetű anyagokból állítják elő, az összetétel elkerülhetetlenül változó lehet. Különösen előnyös volna, ha olyan perfúziós oldatot lehetne előállítani, mely valamilyen szintetikus kolloidot tartalmaz.

Korábban a szintetikus kolloid-természetű anyagok széles skáláját próbálták ki kísérleti körülmények között abból a szempontból, hogy hatékonyak lehetnek-e a vesetartósítás során. Ezek közé a kolloidok közé sorolhatók a dextránok, a poli-vinil-pirrolidin, a pluronikumok, hidroxietil-keményítő (HES = hydroxyethyl starch), a Ficoll, az arab mézga és poli-etilén-glikol. Ezek egyike sem bizonyult annyira hatásosnak, mint a szérum-albumin. A HES azonban a tartósítás során 24 – sőt, néhány esetben akár 72 – órán keresztül is megtartotta hatékonyságát. Valamennyi, fent említett kolloid anyagot alapfolyadéként só-oldatot tartalmazó perfúziós oldatban próbálták ki. Nemrégiben kitűnő eredményeket értek el kutyából származó vese 72 órás tartósítása során oly módon, hogy a perfúziós oldatba – a kolloidozmozitikus nyomás biztosítás érdekében – a humán szérum-albumin (HSA) mellett a klorid-ionok helyett glukonát-anionokat alkalmaztak.

Az 1960-as évek végén két fontos vizsgálat eredményei arra utaltak, hogy a vesék 30 órán keresztül biztonságosan tartósíthatók hidegben történő tárolással (1), 72 órán keresztül pedig folyamatos perfúzió (2) segítségével. E két vizsgálat a tetemekből kivett vesék klinikai transzplantációját a csak közvetlen életveszély esetén végzett eljárásból félig elektív eljárássá változtatta. A legtöbb, a veséket hidegben történő tárolással tartósító transzplantációs központban a Collins-oldatot, illetve a módosított Eurocollins-oldatot tartják az előnyösen alkalmazandó oldatnak.

Az 1980-as években a ciklosporinnak immunszuppresszív kezelésbe történt bevonása felébresztette az érdeklődést más szervek – azaz máj, a hasnyálmirigy, a szív, tüdő és szív-tüdő együttes – transzplantációjá iránt. Azok a tartósítási eljárások azonban, amelyek sikeresnek bizonyultak a vesék esetében, a fent említett szervek esetében nem jártak eredménnyel. Ennek következtében a szív, máj, valamint a hasnyálmirigy klinikai tartósítása csak minimális ideig, legfeljebb 6–10 órán keresztül lehetséges. Ezen szervek átültetése több nagyságrenddel bonyolultabb, mint a

vesetranszplantáció, és a műtéteket mindig éjszaka kell végezni, amikor a donor kórházakban a műtők rendelkezésre állnak. A szív és a máj rövid tartósítási periódusa azt is szükségessé teszi, hogy egyszerre két sebész-team dolgozzék; az egyik a donornál, a másik pedig a recipiensnél. Amennyiben e szervek esetében is sikerülne a tartósítási időszakot 30 órára növelni, annak ugyanolyan hatása lenne a szervek transzplantációjára, mint ami a veseátültetés kapcsán tapasztalható volt, nevezetesen, növekedne a szerv hozzáférhetőségének mértéke, csökkenne a szervvesztés, javulna a szervek elosztása a különböző intézetek között és csökkennének a költségek.

Olyan tartósító oldat alkalmazása volna előnyös, mely minden donor szerv esetében felhasználható, mind a donorban „*in situ*” végzett hűtés, mind pedig a szerv kivételét követő, hidegen történő tárolás folyamán.

A találmány tárgya olyan oldat, mely alkalmas betegekbe implantálandó szervek tartósítására és tárolására, és amely tartalmaz laktobionátot, gyakorlatilag etilén-glikolmentes hidroxetil-keményítőt, etilén-klór-hidrint, nátrium-kloridot és acetont, és amelynek a molekulásúlya 150.000 és 350.000 dalton között van. A találmány tárgya továbbá a betegekbe implantálandó szerv tartósítására vonatkozó eljárás is, melynek során az említett szervet a találmány szerinti készítménybe helyezük. Az ilyenfajta készítmény vagy perfúziós oldat 72 órás tartósítást biztosít a hasnyálmirigy esetében, 48 órás tárolást a vese és legalább 24 órás tartósítást a máj esetében.

A szérumbalbumin (HSA) tartalmú perfúziós oldatok legfeljebb három napig biztosítják a vese életképességét. E szervek károsodására utalnak a transzplantációt követően megfigyelhető, emelkedett szérumb kreatininszintek, valamint az az idő, mely szükséges ahhoz, hogy ezen emelkedett értékek visszatérjenek a normál szintre.

Mindezt megelőzőleg nem álltak rendelkezésünkre elfogadható eljárások a vesék tartósítására. A klinikai szempontból hatásosnak talált módszerek csak rövid ideig tartó (három napos) tárolást tettek lehetővé, és e szervek életképessége is szignifikánsan csökkent. A találmány ismerteti annak a perfúziós és tárolásra alkalmas oldatnak a biokémiai összetételét, mely a legelőnyösebbnek bizonyult a hipotermiás eljárás segítségével tartósított szervek esetében, továbbá egy olyan új, szintetikus, kolloidozmotikus hatású szert is bemutat, melynek segítségével szignifikánsan javítható a hosszú ideig történő tartósítás esélye.

A fagyasztás és a folyamatos, aerob perfúzió tekinthető elméletileg az egyedüli lehetőségnek ahhoz, hogy valóban hosszú (egy hónaptól akár évekig terjedő) ideig tartósíthassuk a szerveket. Az egyszerű, hidegen történő tárolásnak megvannak a maga sajátos időbeli korlátai, amelyen túl a szerv többé már nem életképes. A hipotermia csökkenti annak sebességét, ahogyan az intracelluláris enzimek lebontják a szerv életképességéhez nélkülözhetetlen sejtösszetevőket.

Kimutatták, hogy az ischaemiás veséknek hideg vér segítségével történő, egyszerű hűtése révén 12 órán keresztül tartósítható a vese működőképessége. Collins (Lancet, 1969; 2:1219-1222) vizsgálatai szerint megfelelő átmosó oldat használatával háromszorosára növelhető a vesék tárolási ideje (azaz 30 órára). Valószínűleg az anyagcsere szervspecifikus különbségei miatt ez az oldat nem alkalmas más szervek – így a hasnyálmirigy, a máj és a szív – tartósítására.

Az eljárás alkalmas és hatékony voltának biztosítása érdekében az átmosó oldatnak olyan összetételűnek kell lennie, amely a minimálisra csökkenti a hipotermia következtében fellépő sejtduzzadást, megakadályozza az extracelluláris térnek az átmosási időszak folyamán történő megnagyobbodását, megakadályozza az oxigénmentes gyökök okozta károsodásokat elsősorban a reperfúzió során, és szubsztrátokat biztosít a nagyenergiájú foszfátvegyületek reperfúzió alatti regenerálódásához.

A hipotermia okozta sejtduzzadás vízfelhalmozódás következtében jön létre. Ez a tendencia oly módon akadályozható meg, hogy a sejt számára impermeabilis anyagok (impermeánsok) 110-140 mmol-nyi mennyiségét (ami 110-140 mOsm/kg ozmotikus erőnek felel meg) adjuk hozzá a rendszerhez. Az impermeánsok fenti koncentrációja körülbelül megfelel a Collins-féle, hidegen történő tárolásra alkalmas oldatban lévő glükóz koncentrációjának (120 mM), valamint az impermeánsok koncentrációjának a többi, hidegen történő tárolásra használt oldatban. Így tehát a hidegen történő tárolásra alkalmas oldatok sikerének kulcsa valamely hatékony impermeáns megfelelő koncentrációban történő alkalmazása.

A hatékony, hidegen történő átmosásra alkalmas oldatnak meg kell akadályoznia az extracelluláris tér megnagyobbodását, azt a folyamatot, ami felléphet a donor szervek *in situ* történő átmosása során, valamint azt követően is, hogy a szerveket már kivették a donorból. Az extracelluláris tér kiterjedése következtében összenyomódhatnak a kapilláris rendszerhez tartozó erecskék, és emiatt az átmosó oldat nem oszlik el megfelelően az adott szövetben. A legtöbb, hidegen történő tárolásra használt oldat nem tartalmaz olyan anyagokat, (albumint vagy más kolloidokat) amelyek fokozzák az onkotikus nyomást. Ily módon az átmosó oldat összetevői gyorsan szétterjednek az extracelluláris tereken, és szöveti ödémát hoznak létre. Emiatt az ideális *in situ* átmosó oldatnak tartalmaznia kell olyan anyagokat, amelyek kolloidozmotikus nyomást fejtenek ki, és biztosítania kell az átmosó oldat legfontosabb összetevőinek szabadon történő cserélődését anélkül, hogy számolni kellene az extracelluláris tér megnagyobbodásával.

Az egyes szervek – vese, máj, hasnyálmirigy – anyagcseréjében tapasztalható, lényeges különbségek befolyásolhatják, hogy e szervek milyen mértékben tartósíthatók. A sejtduzzadás gátlásához hatékony impermeáns alkalmazására van szükség. A glükóz – a Collins-oldatban lévő, legfontosabb impermeáns – nem hatékony a máj és a hasnyálmirigy esetében, és könnyen belép a sejtekbe (Southard és munkatársai, Cryobiology 1986; 23:477-482). A mannit – egy másik, általánosan használt impermeáns a májban körülbelül ugyanolyan mértékben permeabilis, mint a glükóz. Ily módon, a glükózt vagy mannitot tartalmazó, hidegen történő tárolásra használt oldatok máj és hasnyálmirigy esetében tapasztalt hatástalanságának egyik oka az, hogy ezek az oldatok nem tartalmaznak hatékony impermeánsokat.

A Chemical Abstract 86, 53350W szervek átültetésénél alkalmazható olyan oldatokról számol be,

amelyek glükózt, illetve glükózt és piruvátot vagy glükózt és citrátot tartalmaznak. A Chemical Abstracts 100 82175f glükonát-albumin perfúziós oldatot ismerteti, amely nagy mennyiségű adenzint és foszfátot tartalmaz. Hasonló oldatot írnak le a Chemical Abstracts 107, 141163v szerint is, amely albumin helyett hidroxil-etil-keményítőt tartalmaz kálium-dihidrogénfoszfát, glutation, adenzin, glükóz, HEPES puffer, nátrium- és magnézium-glükonát, kalcium-klorid és fenol-vörös mellett. A szakirodalomban nincs utalás laktobionát alkalmazására.

Találmányunk átültetésre szolgáló szervek tartósítására és tárolására alkalmas olyan készítményre – oldatra – vonatkozik, amely 2–12 t % hidroxil-etil-keményítőt, 1–7 t % laktobionsavat, 0,5–3 t % rafinózt, 0,1–0,3 t % adenzint, 0,01–0,3 t % allopurinolt, 0,0–0,3 t % glutationt, 120–150 m. egyenérték/liter káliumiont és 20–30 m. egyenérték/liter nátriumiont tartalmaz vizes oldatban.

A szervek tartósítására alkalmas találmány szerinti készítmény laktobionát-aniont és előnyösen a sejt számára impermeabilis rafinózt tartalmaz; a készítmény ozmolalitása előnyösen körülbelül 320 mosm/L, a K<sup>+</sup> koncentrációja 120 mM, a Na<sup>+</sup>-é pedig 30 mM. Az előnyösen alkalmazható kolloid egy módosított hidroxil-etil-keményítő, melynek átlagos molekulatömege 150.000 és 350.000 – előnyösen 200.000 és 300.000 – dalton között van, a szubsztitúció foka pedig 0,4 és 0,7 közötti érték. Az előnyös kolloid nem tartalmaz olyan hidroxil-etil-keményítőt, melynek molekulatömege kisebb 50.000 daltonnál.

A találmány szerinti eljárás értelmében a hidroxil-etil-keményítőt desztillált (ionmentesített) vízzel szemben dializáljuk, illetve más módon kezeljük annak érdekében, hogy eltávolítsunk néhány olyan szennyezőanyagot, melyekről korábban még nem tudtuk, hogy hátrányosan befolyásolják a hidroxil-etil-keményítő készítmények hatékonyságát. A dialízis eljárástól az eltávolított anyagok a legkisebb hidroxil-etil-keményítő komponensek, köztük az etilén-glikol, a hidroxietiláció etilén-klór-hidrin melléktermékei, valamint a visszamaradó acetone és nátrium-klóríd. Ismeretes, hogy az etilén-glikol és az etilén-klór-hidron toxikus vegyület. Emiatt még abban az esetben is ajánlatos az eltávolításuk, ha csak kis mennyiségben vannak jelen.

A hidegen történő tárolás sikeressége tekintetében további fontos szempont az intracelluláris acidózis megakadályozása. Az ischaemia – még hidegben is – stimulálja a glikolízist és a glikogenolízist (Pasteur-hatás); fokozza továbbá a tejsavtermelést és növeli a hidrogénionok koncentrációját. A szöveti acidózis következményei végzetesek a sejtekre nézve: lizoszomális instabilitást válthatnak ki, aktiválhatják a lizoszomális enzimeket, és megváltoztathatják a mitochondriumok tulajdonságait. Az intracelluláris acidózis megakadályozása tehát fontos előfeltétele a megfelelő tartósításnak. Egyes vizsgálatok szerint a hidegen történő tárolásra használt oldatok hatékony pufferolása, illetve lúgos pH-jú átmosó oldatok alkalmazása javítja a máj (Lie, TS és munkatársai, Transplant Proc., 1984, 16:134–137) és hasnyálmirigy (Abstract, Am. Soc. of Transplant Surgeons 13th Annual Meeting, May 28–29, 1987) tárolási esélyeit. A találmány szerinti készítmény pH-ja körülbelül 7,4.

A hidegen történő, hatékony tárolás tekintetében további fontos szempont a reperfüzió folyamán az oxigénmentes gyökök okozta károsodás, ezen anyagok pontos szerepe azonban még nem tisztázott. Az általános nézet szerint az oxigénmentes gyököknek az emberi májban és vesében csekély a jelentősége, mivel az endogén xantin-oxidáz aktivitása viszonylag alacsony a szuperoxid-dizmutáz magas endogén aktivitásához viszonyítva. Ez utóbbi enzim távolítja el a szuperoxid-anionokat. Ezzel szemben a tüdő és a belek esetében rendkívül fontos szerepet játszhat az oxigénmentes gyökök által okozott károsodás, mivel ezek a szervek érzékenyek az ilyenfajta sérülésekkel szemben. A találmány szerinti készítmény tehát előnyösen glutationt tartalmaz.

További fontos szempont az energia-metabolizmus kérdése. A hipotermiás tárolás során az adenzin-trifoszfát (ATP) gyorsan bomlik, és e lebomlás olyan végtermékek (adenozin, inozin és hipoxantin) keletkezését eredményezi, amelyek számára a plazmamembrán szabadon átjárható. A szervek reperfüziója szükségessé teszi az ATP-igényes nátrium-pumpa aktivitásának gyors regenerálódását. Az ATP prekursorainak hozzáférhető volta tehát fontos szempont lehet a sikeres szervtartósítás vonatkozásában. Ennek megfelelően, a találmány szerinti készítmény előnyösen adenzint tartalmaz.

A találmány szerinti készítményben a hidroxil-etil-keményítő mennyisége előnyösen 3–8 tömeg %.

A találmány szerinti tartósító oldatban és perfúziós készítményben előnyösen – de nem korlátozó jelleggel – az alábbi összetevők fordulnak elő, körülbelül az itt meghatározott mennyiségben:

1. Táblázat

Anyag	Mennyiség 1 literben
K <sup>+</sup> -laktobionát	100 mmol
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	25 mmol
MGSO <sub>4</sub>	5 mmol
Rafinóz	30 mmol
Adenzin	5 mmol
Glutation	3 mmol
Inzulin	100 E
Bactrim	0,5 ml
Dexametazon	8 mg
Allopurinol	1 mM
Hidroxil-etil-keményítő (molekulatömeg 200.000–300.000 dalton, a szubsztitúció foka 0,4–0,7)	50 g

Az oldatot szobahőmérsékleten 7,4-es pH-ra állítjuk be, nátrium-hidroxid segítségével. A végső koncentrációk a következők: Na<sup>+</sup> = 30 ± 5 mM, K<sup>+</sup> = 120 ± 5 mM, mosm/liter = 320 ± 5. Bactrim = trimetoprim (16 mg/ml, szulfametazol 80 mg/ml.

További előnyös készítmény a következő:

Anyag	Mennyiség 1 literben
Laktobionsav	35,83 g
Kálium-foszfát, egybázisos	3,40 g
Raffinóz, pentahidrát <sup>x</sup>	17,83 g
Magnézium-szulfát, heptahidrát <sup>x</sup>	1,23 g
Adenozin	1,34 g
Allopurinol	0,136 g
Glutation (redukált)	0,922
Pentafrakció <sup>xx</sup>	50,00 g
Kálium-hidroxid (10N)	10,0 ml
Nátrium-hidroxid vagy sósav, a pH beállításához	7,4
Injekciós cétra alkalmas víz a térfogat 1,0 literre törtendő kiegészítésére	1,0 liter

<sup>x</sup> Természetesen más hidrátok is alkalmazhatók, az ekvivalens mennyiség biztosítása érdekében.

<sup>xx</sup> Az 1. példa szerint előállított hidroxil-etil-keményítő.

Az előbbieknél megfelelően, a találmány a korábbinál hosszabb klinikai szervtartósítási időszakot biztosít, és valamilyen szintetikus kolloid alkalmazása a minimálisra csökkenti azokat a változásokat, amelyek a természetes eredetű anyagokból készített perifériás oldatok esetében általában fellépnek.

Az alábbi példák a találmány további szemléltetésére szolgálnak.

### 1. példa

#### A hidroxil-etil-keményítő előállítása

100 g hidroxil-etil-keményítőt oldottunk fel desztillált-ionmentesített vízben, 10 tömeg %-os oldat előállítására céljából. A HES-oldatot – melynek molekulásúlya minimálisan 50.000 dalton volt – dialízis tasakokba (34 mm x 45,7 cm) töltöttük, majd 10–15 liter desztillált (ionmentesített) vizet tartalmazó tartályba helyeztük, és 72 órán keresztül ráztuk. A vizet naponta cseréltük, a HES-t összegyűjtöttük, és felhasználásig -20 °C hőmérsékleten lefagyasztottuk addig, amíg molekulatömege 200.000–300.000 dalton, szubsztitúciós foka pedig körülbelül 0,4–0,5 volt.

### 2. példa

#### Kutya hasnyálmirigyének 72 órás tartósítása

A kísérletek során 15–25 kg tömeg, kevert fajú nősténykutyákat használtunk.

Műtéti eljárás. Az anesztéziát pentotállal kezdtük és halotánál tartottuk fenn. Középvonalbeli metszéken keresztül – az előzőekben leírtaknak megfelelően – kivettük a hasnyálmirigy baloldali szegmentumát (farki részét). Az átültetendő hasnyálmirigyszövetet – a hozzá kapcsolódó léppel együtt – vagy közvetlenül az átmosást követően (kontroll), vagy pedig 48, illetve 72 órás, hidegen történő tárolás után transzplantáltuk az arteria, illetve vena iliaca területére. A hasnyálmirigyvezetékét nyitva hagytuk, hogy biztosítsuk ezáltal a hasnyálmirigy-nedveknek a hasüregbe történő szabad elvezetését. Véralvadástgátló kezelést nem al-

kalmaztunk. A hasnyálmirigy jobboldali szegmentumát a transzplantációval egyidőben eltávolítottuk

#### Kísérleti vizsgálati terv.

- 5 Valamennyi kutyának 0,5 g Mandolt adtunk be intravénásan, a szervkivétel megelőzően, továbbá az átültetés utáni első három nap folyamán. Az állatokat standard kutyaétrenden tartottuk, mely Viokase-t tartalmazott. Az állatokat három csoportra osztottuk. Az 1. csoport (kontroll) esetében a szervkivétel és az átmosás után a szerveket azonnal transzplantáltuk; a 2. csoport esetében 48 órás tárolás történt; a 3. csoportnál pedig 72 órán keresztül tároltuk a szerveket. A vércukor-koncentrációt a transzplantációt követő első héten naponta, később pedig kéthetente határoztuk meg. Az átültetést követően 24 órával, 2 héttel és 4 héttel intravénás glükóz-tolerancia tesztet (IVGTT) végeztünk. Négy hét múlva eltávolítottuk az átültetett szerveket, majd 2–3 nappal ezután 20 IVGTT-t végeztünk. Az IVGTT céljából glükózt (0,5 g/kg testtömeg kg) injiciáltunk az állatnak, majd meghatároztuk a vércukor-értékeket, a beadást követően 1, 5, 10, 20, 30, 60, 90 és 120 perc múlva. A K-értéket az 5–60 perces mérések során megállapított vércukor-koncentrációkból számítottuk ki (9). A több, mint 2 napon keresztül 150 mg %-nál magasabb vércukor- értékeket, valamint az 1,0-nél kisebb K-értékeket diabeteszre utaló jelnek tekintettük.

#### Tartósítás.

- 30 A tartósító oldat összetételét az 1. Táblázat mutatja be. Az eltávolítás után a hasnyálmirigyet körülbelül 250–300 ml atmosó oldattal – 60 cm-es magasságból – átmostuk. Az átültetendő szervet duplafalú műanyag zsákba helyeztük, majd tartósító oldatba merítve jeges vízfürdőbe tettük.

#### Statisztikai elemzés.

- 40 A statisztikai értékelést Student-„T” tesztel végeztük. A megadott értékek a következők: átlag  $\bar{x}$  SEM.

#### Eredmények

- 45 Valamennyi szervet alaposan átáramoltattunk, közvetlenül az átültetést megelőzően. A tartósított szervek esetében 5–10 perccel a reperfüzió után különböző fokú intralobuláris ödéma alakult ki. A lép minden esetben alaposan átáramoltattuk. Amint azt a 2. Táblázatban láthatjuk, öt kutya elpusztult, közülük három a kontroll csoportba tartozott, kettő pedig a 3. csoportba (72 órás tartósítás). A halál oka nem állt összefüggésben az átültetéssel, és valamennyi állat működőképes átültetett szervekkel pusztult el.

- 50 A hasnyálmirigy-eltávolításkor valamennyi átültetendő szerv (még a kontrollok esetében is), különböző fokú fibrózis jeleit mutatta, és a lép esetében is hasonló volt a helyzet. Artériás és vénás trombózis nem volt megfigyelhető az átültetendő szervek egyikében sem.

- 55 A 2. Táblázat feltünteteti minden egyes állat esetében az átültetés utáni vércukor-értékeket, valamint az IVGTT eredményeit. A 2. Táblázatban valamennyi vizsgált csoport átlagértékei ( $\pm$ SEM) is megtalálhatók. A vércukor átlagértéke a transzplantációt követő első héten a 3. csoport esetében volt a legmagasabb (124 $\pm$ 6 mg %), és ez az érték szignifikánsan különbözött ( $p < 0,05$ ) az 1. csoport (94 $\pm$ 7 mg %), illetve

a 2. csoport (107±7 mg %) értékeitől. Az átlagos K-értékek az 1. napon szintén szignifikánsan alacsonyabbak ( $p < 0,05$ ) voltak a 3. csoport esetében (1,85±0,15 %), az 1. csoport (2,44±0,14 %), valamint a 2. csoport (2,53±0,22 %) megfelelő értékeivel összehasonlítva. A 3. csoport esetében a 14. napon vizsgált (1,7±0,1%) és a 28. napon vizsgált (1,61±0,19 %) K-értékek hasonlóak voltak az 1. napon megállapított K-értékeihez ( $p = NS$ ). Az 1. és 2. csoport esetében a K-értékek csökkentek, és az átültetést követően 2 héttel nem volt szignifikáns különbség a három csoport között. A negyedik hétre a 3. csoport K-értékei jobbakk voltak a 2. csoport értékeinél, a kontroll csoporttal összehasonlítva azonban valamelyest alacsonyabbak voltak (szignifikáns statisztikai

különbségeket nem lehetett kimutatni, mivel az 1. csoport elemszáma alacsony volt).

A hasnyálmirigy eltávolítása után valamennyi kutya hiperglikémiássá vált (a vércukor értéke meghaladta a 200 mg %-ot), ami arra utal, hogy az átültetett szerv volt egyedül felelős a glükóz-homeosztázisért. A 3. csoportból négy állatot hosszú időn keresztül megfigyelésünk alatt tartottunk, a tartós túlélés vizsgálata céljából. Egy kutya 7 héttel az átültetést követően tüdőgyulladásban pusztult el, vércukor-értéke azonban normális maradt (normoglikémiai). Két állatot 3, illetve 4 hónap múlva leöltük, egy kutyát azonban 6 hónapon keresztül életben tartottunk. Egyik állaton sem mutatkoztak a diabetesz jelei, és valamennyien normoglikémiások voltak.

2. Táblázat  
A hasnyálmirigy működése transzplantáció után, a szerv tartósítását követően

Kutya sorszáma	Tartósítás	Vércukor 1. hét (mg %)	K-érték: % IVGTT (1 nap)	K-érték: % IVGTT (2 hét)	K-érték: % IVGTT (4 hét)	Megjegyzések
1. csoport:						
1	Kontroll	72,7±6,2	1,97	2,23	–	Elpusztult a 27. napon, pleurális folyadékgyülem következtében
2	Kontroll	113,1±7,7	2,48	1,73	1,33	
3	Kontroll	104,4±16,5	2,65	–	–	Elpusztult az 5. napon, hasüregi tályog miatt
4	Kontroll	93,9±9,8	2,76	1,82	2,76	
5	Kontroll	78,5±16,1	2,38	1,44	–	Elpusztult a 26. napon, bélelzáródás következtében
	Átlag	93,5±7,0	2,44±0,14	1,81±0,16 <sup>b</sup>	2,05±0,71	
2. csoport:						
6	48 ó CS <sup>xx</sup>	95,3±5,6	2,76	1,41	–	Leölés a 14. napon
7	48 ó CS	91,1±7,3	2,65	1,92	–	Leölés a 14. napon
8	48 ó CS	108,3±9,9	2,56	2,15	1,11	
9	48 ó CS	130,4±10,6	1,78	1,82	1,41	
	Átlag	106,5±6,6	2,53±0,22	1,83±0,15 <sup>b</sup>	1,26±0,15	
3. csoport:						
10	72 ó CS <sup>xx</sup>	113,5±11,8	1,47	1,52	2,30	
11	72 ó CS	108,7±9,8	1,73	–	–	Elpusztult a 15. napon, pleurális folyadékgyülem következtében
12	72 ó CS	132,9±10,6	1,15	1,30	1,38	
13	72 ó CS	105,0±9,1	2,55	2,37	1,68	
14	72 ó CS	118,8±5,3	2,02	–	–	Elpusztult az 5. napon, tisztázatlan okból
15	72 ó CS	143,2±4,0	2,16	1,97	2,03	
16	75 ó CS	150,0±8,1	1,92	1,86	1,15	
17	72 ó CS	115,9±11,0	1,77	1,77	1,15	
	Átlag	123,5±5,9 <sup>a</sup>	1,85±0,13 <sup>a</sup>	1,71±0,18	1,62±0,19	

a ( $p < 0,05$ ) szemben az 1. és 2. csoporttal

b ( $p < 0,05$ ) szemben az IVGTT (1 nap múlva) értékkel

CS<sup>xx</sup> – hidegben történő tárolás (CS – cold storage)

### 3. példa

#### 24 órás májtartósítás

A klinikai körülmények között történő májtartósítás legfeljebb 6–10 órás időszakokra korlátozódik. Ezen időtartamnak 24 órára – vagy ennél még hosszabb 5 periódusra – történő meghosszabbítása jelentősen befolyásolhatná a májtranszplantáció lehetőségeit. Izolált, átáramoltatott nyulmáját használtunk annak érdekében, hogy megállapítsuk a tartósítás minőségét, Collins-oldatban, Cambridge plazmafehérje-frakció- 10

ban (PPF), Marshalls-oldatban, valamint a találmány szerinti oldatban végzett, hidegen történt tárolást követően (1. Táblázat). A hidegen tárolt májak normotermiás átáramoltatása alatt az epetermelés bizonyult a leghasznosabb paraméternek az életképesség megállapítására. A táblázat az epetermelés mértékét (ml/100 g/óra ± SD) mutatja be, összehasonlítva a kontrollok és a 24 órán keresztül hidegben tárolt nyulmájak értékeit.

Kontroll	Cambridge PPF	Eurocollins	Marshalls	Tartósító oldat
5,4±1,7	1,8±0,9	1,9±1,3	3,1±0,5	4,4±0,5

Az ismertetett összetételű, találmány szerinti tartósító oldat jobbnak bizonyult a többi, hidegen történt tárolásra alkalmas oldatnál az epetermelés mérésén alapuló vizsgálat során, hidegen (2,4 °C) történő 20 tárolást és normotermiás reperfüziót követően.

A sikeres májtartósítás végső kipróbálási eljárása magán a transzplantációs modellen történik.

A tartósító oldatot tehát ortotópiás májtranszplantációs modellen próbáltuk ki, kutyák esetében. Az oldattal végzett, egyszerű átáramoltatás után egymást 25 követően három kutyamájat tároltunk, 24–26 órás perióduson keresztül. Az átültetéskor úgynevezett kombinált „peremvarrat”-technikát alkalmaztunk. Va-

lamennyi máj külső megjelenése az átültetést követően azonnal kielégítő volt. Mind a három kutya rögtön felébredt a műtét után, és az eljárást követően 4 órán belül már valamennyi állat lábra tudott állni.

A vérelemezkek száma a műtét után 6 órával a normálértéknek felelt meg. Az alábbi táblázat a bilirubin- és enzimértékeket tünteti fel (átlag ±SD), a műtét után 6 órával, valamint a következő 7 nap folyamán. Az adatokból kitűnik, hogy a normális májműködés igen gyorsan helyreállt a transzplantációt követően. Egy kutya pusztult el a műtét utáni 5. napon, bélelzáródás következtében.

	6 óra m.	1. nap	3. nap	5. nap	7. nap
Bilirubin (mg %)	0,6±0,3	0,7±0,6	0,9±0,7	0,5±0,4	0,4±0,2
SGOT	2148±983	1835±1145	61±16	55±40	45±21
Alkalikus foszfatáz	186±14	217±47	273±126	311±64	315±48

### 4. példa

#### Vesetartósítás

Az ismertetett összetételű, hidegen történt tárolásra (CS) alkalmas oldatot vesetartósítás során próbáltuk ki, és megvizsgáltuk hatását a reperfüziót követő veseműködésre: 1) izolált, átáramoltatott vesemodellen, kutyák esetében (IPK – isolated perfused kidney); valamint 2) autotranszplantációs modellen, kutyák esetében. 40

1) A kutyaveséket vagy hidegen tároltuk 48 órán keresztül, Eurocollins (EC) oldatban, vagy pedig az ismertetett összetételű hidegen történt tárolásra (CS – cold storage) alkalmas oldatba helyeztük őket. A veseműködést figyelemmel kísértük az IPK modellel végzett reperfüzió folyamán, oxigénnel telített, módosított, albumint tartalmazó Krebs-Henseleit-oldat felhasználásával, 37 °C hőmérsékleten, 90 percen keresztül. 10 percenként vizeletmintát vettünk és ezeket megvizsgáltuk. Kiszámítottuk a GFR (kreatinin-clearance), a vizelet/plazmafehérje (U/P) arány és a frakcionált nátrium-reabszorpció (% Na) értékét. Az eredményeket a 3. Táblázat tartalmazza, az átlagértékek és a szórások (zárójelben történő) feltüntetésével. 50

Mindkét hidegen tárolt vese-csoport esetében csökkent veseműködés volt megfigyelhető a reperfüzió idején, a kontroll vesékkal összehasonlítva. Az EC-oldatban tárolt vesékkal ellentétben, a hidegen történt tárolásra alkalmas oldatban (CS) tárolt vesék GFR- 60 65

értéke és nátrium-reabszorpciója szignifikánsan javult az IPK folyamán. Ez a funkciójavulás arra utal, hogy a GS-ben tartósított vesék gyorsabban képesek a hideg-okozta ischaemiás károsodás megszüntetésére, mint az EC-ben tárolt vesék.

2) Egymást követően nyolc kutyavesével végeztünk autotranszplantációt, CS-ben történt 48 órás tartósítást követően. Három állatot technikai komplikációk (arteriális trombózis, bélelzáródás) miatt fel kellett áldoznunk. A 4. Táblázat a négy túlélő állat transzplantációt követően meghatározott szérum-kreatinin (átlag ±SD) értékeit mutatja be.

A vizsgálat eredményei arra utalnak, hogy CS-oldattal, 48 órán keresztül, hidegen történt tárolás után a veseműködés megfelelő maradt. Ez az oldat tehát alkalmas a vese, a hasnyálmirigy és a máj tartósítására, és felhasználható mind egyszerű, hidegen történt tárolás, mind pedig folyamatos perfúzió során.

3. táblázat

Percek (IPK)		10	30	60	90
vizelet	C*	12,93 (5,74)	15,15 (3,00)	16,00 (4,44)	12,08 (4,49)
elválasztás	EC	5,84 (1,81)	17,48 (8,77)	24,41 (11,45)	30,31 (19,86)
μl/perc. g	CS	2,52 (1,67)	6,20 (2,45)	6,60 (4,79)	10,53 (4,23)
GFR μl/perc.g	C*	224,98 (88,90)	240,38 (30,70)	210,66 (57,77)	125,48 (31,62)
	EC	8,09 (3,07)	29,60 (13,60)	38,32 (18,53)	37,30 (21,68)
	CS	6,98 (5,46)	27,23 (13,75)	28,06 (23,71)	61,63 (27,20)
U/P arány	C*	0,09 (0,02)	0,10 (0,02)	0,12 (0,06)	0,09 (0,02)
	EC	0,53 (0,19)	0,43 (0,09)	0,35 (0,07)	0,31 (0,16)
	CS	0,43 (0,02)	0,58 (0,16)	0,64 (0,22)	0,59 (0,23)
Na %	C*	98,91 (0,81)	99,15 (0,47)	99,05 (0,44)	98,81 (0,48)
	EC	44,34 (4,93)	55,35 (8,98)	56,52 (0,11)	40,54 (20,52)
	CS	64,09 (21,78)	85,71 (5,76)	86,20 (6,76)	87,78 (12,28)

<sup>x</sup> Kontroll vesék IPK-val történő vizsgálata

4. táblázat

Napok	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Szérum-kreatinin (mg %)	1,3 ±0,2	3,1 ±0,7	2,5 ±1,1	2,4 ±1,0	2,2 ±0,9	2,0 ±0,8	1,6 ±0,5	1,6 ±0,4	1,4 ±0,3	1,4 ±0,3	1,2 ±0,3

## SZABADALMI IGÉNYPOTOK

1. Átültetésre szolgáló szervek tartósítására és tárolására alkalmas, hidroxil-etil-keményítőt és adenzint tartalmazó oldat, *azzal jellemezve*, hogy 2–12 t % hidroxil-etil-keményítőt, 1–7 t % laktobionsavat, a 0,5–3 t % raffinózt, 0,1–0,3 t % adenzint, 0,01–0,3 t % allopurinolt, 0,0–0,3 t % glutationt, 120–150 m. egyenérték/liter káliumiont, 20–30 m. egyenérték/liter nátriumiont és adott esetben foszfát-, szulfát- és magnéziumiont tartalmaz vizes oldatban, és az alkalmazott hidroxil-etil-keményítőt átlagos molekulatömege 150 000–350 000 dalton, szubsztitúciós foka 0,4–0,7, és etilén-glikoltól, etilén-klór-hidrintől, acetontól és nátrium-kloridtól mentes. 35
2. Az 1. igénypont szerinti oldat, *azzal jellemezve*, hogy a glutationt közvetlenül felhasználás előtt hozzáadott formában tartalmazza. 40
3. Az 1. vagy 2. igénypont szerinti oldat, *azzal jellemezve*, hogy az alkalmazott hidroxil-etil-keményítőt gyakorlatilag mentes 50.000 daltonnál kisebb molekulatömegű hidroxil-etil-keményítőtől. 45
4. Az 1–3. igénypontok bármelyike szerinti oldat, *azzal jellemezve*, hogy a hidroxil-etil-keményítőt molekulatömege 200 000–300 000 dalton és szubsztitúciós foka 0,4–0,7. 50
5. Az 1–4. igénypontok bármelyike szerinti oldat, *azzal jellemezve*, hogy 3–8 t % hidroxil-etil-keményítőt tartalmaz. 55
6. Az 1–5. igénypontok bármelyike szerinti oldat, *azzal jellemezve*, hogy egy literre vonatkoztatva 45,0–57,5 g hidroxil-etil-keményítőt, 32,25–41,20 g laktobionsavat, 2,16–2,76 g foszfátot, 0,43–0,55 g szulfátot, 0,11–0,13 g magnéziumot, 16,05–20,50 g raffinóz-pentahidrátot, 1,21–1,54 g adenzint, 0,12–0,16 g allopurinolt, 0,83–1,06 g glutationt tartalmaz 6,8–8,0 pH-értékű vizes oldatban. 55
7. A 6. igénypont szerinti oldat, *azzal jellemezve*, hogy literenként 50 g hidroxil-etil-keményítőt, 35,83 g laktobionsavat, 3,4 g egybázisos kálium-foszfátot, 1,23 g magnézium-szulfát-heptahidrátot, 17,83 g raffinóz-pentahidrátot, 1,34 g adenzint, 0,136 g allopurinolt, 0,922 g glutationt, 7,4 pH-érték beállításához szükséges nátrium-hidroxidot, valamint kálium-hidroxidot tartalmaz vizes oldatban.

Kiadja az Országos Találmányi Hivatal, Budapest  
A kiadásért felel: Dr. Szvoboda Gabriella osztályvezető  
AGUILAR & TÁRSA Kft – GYŐR  
Felelős vezető: Javier Aguilar ügyvezető ig.