

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **045517**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.11.30

(51) Int. Cl. *A01N 1/02* (2006.01)

(21) Номер заявки
202192437

(22) Дата подачи заявки
2020.04.12

(54) **СПОСОБ И АППАРАТ ДЛЯ ВОССТАНОВЛЕНИЯ ОРГАНОВ**

(31) 1930123-3; 1930125-8

(32) 2019.04.12

(33) SE

(43) 2022.01.13

(86) PCT/SE2020/050381

(87) WO 2020/209788 2020.10.15

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
УГЛХ РИСЕРЧ АБ (SE)

(72) Изобретатель:
Олауссон Микель (SE)

(74) Представитель:
**Поликарпов А.В., Соколова М.В.,
Путинцев А.И., Черкас Д.А., Игнатьев
А.В., Билык А.В., Дмитриев А.В.,
Бучака С.М., Бельтюкова М.В. (RU)**

(56) US-A-6046046
US-A1-20020197252
EP-A1-0631786
US-A1-20080187901
WO-A1-2012128696

Brommer E.J.P. The level of extrinsic plasminogen activator (t-PA) during clotting as a determinant of the rate of fibrinolysis; Inefficiency of activators added afterwards', in: Thromb. Res. 1984, Vol. 34, pp. 109-115; See Abstract; p. 111: lines 7-11, Table 1; page 111-112: Discussion

(57) В изобретении предложен способ восстановления органа, полученного от донора, причем орган изымают по меньшей мере через два часа после остановки кровообращения у донора. Способ включает введение в орган лиз-плазминогена, содержащегося в первом гиперонкотическом растворе, а затем введение тканевого активатора плазминогена (ТАП), содержащегося во втором гиперонкотическом растворе. Затем на первом этапе восстановления обеспечивают циркуляцию через орган третьей гиперонкотической жидкости, содержащей альбумин и электролиты, и на втором этапе восстановления обеспечивают циркуляцию через орган четвертой гиперонкотической жидкости, содержащей оксигенированные эритроциты. Затем оценивают орган по обычным критериям. Предложены также устройство и жидкость для использования в указанном способе.

B1

045517

045517

B1

Область техники

Изобретение относится к изъятию органов от донора, а также к консервации и оценке органов.

Предпосылки изобретения

В настоящее время банк донорских органов для трансплантации в основном ограничен получением органов от пациентов, которые при умершем мозге все еще находятся на механической вентиляции легких и сердце которых все еще бьется.

Органы пациентов, которые умерли от остановки сердца до или во время транспортировки в больницу, обычно не используются для трансплантации. В редких случаях, такие органы использовали, особенно если время от остановки сердца до изъятия органов мало, например, менее 30-60 мин. Если время от остановки сердца до изъятия органов более 1 ч, такие органы обычно не подходят для трансплантации. Если бы можно было использовать такой второй банк органов, количество доступных для трансплантации органов выросло бы в 10-100 раз.

После остановки сердца, органы подвергаются тепловой ишемии, что приводит к накоплению в органах токсичных конечных продуктов обмена веществ. Это вызвано прекращением циркуляции насыщенной кислородом крови, что приводит к накоплению конечных продуктов обмена веществ.

Сразу после остановки сердца активируется система свертывания крови, и в капиллярных сосудах образуются фибриновые тромбы, что приводит к тромботическим явлениям, устранение которых займет часы или дни если, пациент, например, подвергся реанимации и выживает.

В случае смерти, работа микробного барьера в кишечнике прекращается, что приводит к избыточному бактериальному росту с высвобождением эндотоксинов типа липополисахаридов и цитокинов, которое начинается, в некоторых случаях, в течение 5 мин. Поэтому, использование органов доноров, умерших от остановки кровообращения, считается маргинальным и в большинстве случаев осуществляется в ситуациях, когда остановка кровообращения контролируется. Органы, подвергшиеся тепловой ишемии в течение более чем двух часов, по существу считаются непригодными для трансплантации.

Если органы охладить, обмен веществ замедляется примерно на 6% на градус Цельсия. При 28°C обмен веществ замедляется примерно до 50%, а при 22°C примерно до 25%.

Обычное охлаждение мертвого тела происходит со скоростью до 2°C в 1 ч. Следовательно, через 5 ч тело и органы могут иметь температуру примерно 27°C.

Таким образом, в данной области техники есть необходимость в способе восстановления взятых у донора органов, который даст возможность более широко использовать второй банк донорских органов.

В патентном документе EP0631786A1 (реферат) раскрыт способ лечения ишемии и сопутствующего реперфузионного повреждения, включающий введение плазмينا и плазминообразующих протеинов, включая лиз-плазминоген и аналогичные вещества. Было обнаружено, что лиз-плазминоген, который может быть получен путем протеолитического расщепления глу-плазминогена, оказывает защитное действие на ткань, пострадавшую от ишемии. Введение лиз-плазминогена может использоваться для лечения субъектов во время реперфузии и после реперфузии. Лиз-плазминоген также может быть введен совместно с препаратами для растворения тромба, например, с такими, которые используют тканевый активатор плазминогена, или подобными им. Указано, что ишемические состояния и последующее реперфузионное повреждение, вызванные хирургическими операциями, можно предотвратить или излечить с помощью протеинов, имеющих эффект лиз-плазминогена или предшественников лиз-плазминогена. Такие протеины даже могут оказывать благоприятное воздействие на уже пересаженные донорские органы или ткани, а также на окружающие органы и ткани донора и реципиента. Введение протеинов, имеющих эффект лиз-плазминогена или предшественников лиз-плазминогена позволяет органам и тканям выдерживать более длинные периоды ишемии, а также физиологический стресс, вызванный реперфузией после трансплантации. Повреждение органа или ткани может быть уменьшено или совсем предотвращено путем введения протеинов, имеющих эффект лиз-плазминогена или предшественников лиз-плазминогена, перед началом хирургической операции. В случае трансплантации, протеины можно ввести донору до изъятия органа или ткани. Донор может получать лечение системно или локально в артерию, питающую орган или ткань, перед удалением этого органа или ткани. Аналогично, реципиент органа или ткани может получать лечение перед трансплантацией, чтобы защитить органы и ткани, окружающие область трансплантации, а также орган или ткань, помещаемые в тело реципиента. Также возможно введение протеинов, имеющих эффект лиз-плазминогена или предшественников лиз-плазминогена, во время или после реперфузии. Таким образом, в данном патентном документе раскрыто введение лиз-плазминогена в тело донора или реципиента, в котором присутствует кровоток, иначе результата не будет.

Сущность изобретения

Соответственно, целью настоящего изобретения является уменьшение, частичное или полное устранение одного или более указанных выше недостатков и дефектов отдельно или вместе.

В одном аспекте изобретения предложен способ восстановления органа, полученного от донора, например от донора, умершего от прекращения кровообращения, включающий: взятие органа от донора через по меньшей мере два часа после остановки кровообращения у донора; введение лиз-плазминогена в орган после его взятия, причем лиз-плазминоген содержится в первом гиперонкотическом растворе;

введение тканевого активатора плазминогена (ТАП) одновременно или после введения лиз-плазминогена, причем тканевый активатор плазминогена содержится во втором гиперонкотическом растворе; на первом этапе восстановления обеспечение циркуляции через орган третьей гиперонкотической жидкости, содержащей альбумин и электролиты, при низкой температуре от 5°C до 25°C; на втором этапе восстановления обеспечение циркуляции через орган четвертой гиперонкотической жидкости, содержащей оксигенированные эритроциты, при температуре от 28°C до 37°C; оценку органа по обычным критериям.

В одном варианте выполнения первый этап восстановления может включать: обеспечение циркуляции указанной третьей гиперонкотической жидкости через орган, причем указанная третья гиперонкотическая жидкость содержит альбумин в концентрации от 50 г/л до 120 г/л, при этом давление циркуляции увеличивают, например, от примерно 20 мм рт. ст. до 90 мм рт. ст., в течение 30-75 мин, например, с шагом в 5 мм рт. ст. каждые 5 мин. Второй этап восстановления может включать: обеспечение циркуляции указанной второй гиперонкотической жидкости через орган, причем указанная четвертая гиперонкотическая жидкость содержит альбумин в концентрации от 50 г/л до 120 г/л, при этом давление циркуляции увеличивают, например, от примерно 20 мм рт. ст. до 90 мм рт. ст., в течение 30-75 мин, например, с шагом в 5 мм рт. ст. каждые 5 мин.

В еще одном варианте выполнения способ может дополнительно включать: хранение органа при низкой температуре от 4°C до 16°C, с циркуляцией при этом через орган консервационной жидкости с давлением ниже 30 мм рт. ст. и в течение периода времени от одного часа до 7 ч. Этап хранения может быть выполнен после второго этапа восстановления или между этапами восстановления.

В еще одном варианте выполнения по меньшей мере одна из гиперонкотических жидкостей, первая или вторая, содержит электролиты в физиологической концентрации и альбумин, причем первая гиперонкотическая жидкость и вторая гиперонкотическая жидкость содержат альбумин в концентрации от 50 г/л до 120 г/л.

В еще одном варианте выполнения по меньшей мере одна из гиперонкотических жидкостей, первая, вторая, третья или четвертая, может дополнительно содержать по меньшей мере одно из следующих веществ: ингибитор коагуляции, такой как антитромбин III, прямой ингибитор тромбина, такой как аргатробан, белок С, белок S, и ингибитор тромбоцитов, такой как абциксимаб.

В еще одном варианте выполнения по меньшей мере одна из гиперонкотических жидкостей, третья или четвертая, циркулирует через фильтр лейкоцитов. Кроме того, по меньшей мере одна из гиперонкотических жидкостей, третья или четвертая, может контактировать с поглотителем цитокинов, таким как цитосорбент, для поглощения цитокинов. Помимо этого, по меньшей мере одна из гиперонкотических жидкостей, третья или четвертая, контактирует с поглотителем эндотоксинов, таким как поглотитель липополисахаридов, для поглощения эндотоксинов.

В еще одном варианте выполнения способ может дополнительно включать: взятие у донора органа после остановки у донора кровообращения в течение по меньшей мере трех часов, причем указанные по меньшей мере три часа включают не более двух часов местного охлаждения с помощью холодного физиологического раствора, льда или ледяной шуги, помещенных в брюшную полость донора.

В еще одном варианте выполнения предложен способ восстановления органа, полученного от донора, например, от донора, умершего от остановки сердца, включающий: взятие органа от донора через по меньшей мере четыре часа после остановки кровообращения у донора; введение лиз-плазминогена в орган после его взятия, причем лиз-плазминоген содержится в первом гиперонкотическом растворе, содержащем альбумин в концентрации от 50 г/л до 70 г/л и ингибитор коагуляции, такой как антитромбин III; введение в орган тканевого активатора плазминогена (ТАП) одновременно или после введения лиз-плазминогена, причем тканевый активатор плазминогена содержится во втором гиперонкотическом растворе, содержащем альбумин в концентрации от 50 г/л до 70 г/л и ингибитор коагуляции, такой как анти-тромбин III; на первом этапе восстановления циркуляцию через орган третьей гиперонкотической жидкости, содержащей альбумин в концентрации от 50 г/л до 120 г/л и электролиты и ингибитор коагуляции, такой как анти-тромбин III, при низкой температуре от 5°C до 25°C, при этом давление увеличивают от 20 мм рт. ст. до 70-90 мм рт. ст.; на втором этапе восстановления циркуляцию через орган четвертой гиперонкотической жидкости, содержащей эритроциты, альбумин в концентрации от 50 г/л до 120 г/л и электролиты и ингибитор коагуляции, такой как анти-тромбин III, при температуре от 30°C до 37°C; оценку органа по обычным критериям.

Согласно другому аспекту предложено устройство для восстановления органа, полученного от донора, например, от донора, умершего от остановки кровообращения, содержащее: контейнер для размещения в нем подлежащего обработке органа; соединитель для соединения с артерией органа при открытой вене; циркуляционный насос соединенный между контейнером и указанным соединителем для циркуляции через орган жидкости, имеющейся в контейнере; слив, соединенный с контейнером с помощью сливного клапана; по меньшей мере один мешок, соединенный с контейнером с помощью гидравлических клапанов для подачи жидкости в контейнер; оксигенатор для оксигенации жидкости, перекачиваемой насосом; нагреватель/охладитель для регулирования температуры жидкости, перекачиваемой насосом; фильтр лейкоцитов для удаления лейкоцитов из жидкости, перекачиваемой насосом; поглотитель эндо-

токсинов, выполненный с возможностью удаления эндотоксинов из жидкости контейнера; поглотитель цитокинов, выполненный с возможностью удаления цитокинов из жидкости контейнера, и фильтр лейкоцитов, выполненный с возможностью удаления лейкоцитов из жидкости контейнера.

Согласно еще одному аспекту предложена жидкость для выполнения любого из описанных выше способов, содержащая: лиз-плазминоген, ТАП, электролиты и альбумин в концентрации от 50 г/л до 120 г/л.

Краткое описание чертежей

Другие цели, признаки и преимущества изобретения станут более понятными из следующего подробного описания вариантов выполнения изобретения со ссылкой на прилагаемые чертежи.

Фиг. 1 схематично иллюстрирует две почки, извлеченные вместе путем обрезания аорты и поллой вены.

Фиг. 2 схематично иллюстрирует капиллярные системы почки.

Фиг. 3 схематично иллюстрирует блок-схему варианта выполнения устройства для выполнения способа.

Фиг. 4 схематично иллюстрирует блок-схему другого варианта выполнения устройства для выполнения способа.

Фиг. 5 схематично иллюстрирует блок-схему еще одного варианта выполнения устройства для выполнения способа.

Фиг. 5А схематично иллюстрирует блок-схему еще одного варианта выполнения устройства для выполнения способа.

Фиг. 5В схематично иллюстрирует блок-схему, аналогичную представленной на фиг. 5А для обработки двух почек по отдельности.

Фиг. 6 иллюстрирует диаграмму, показывающую изменение артериального кровотока в примере 1.

Фиг. 7 иллюстрирует диаграмму, показывающую выработку мочи в примере 1.

Фиг. 8 иллюстрирует диаграмму, показывающую артериальный кровоток в почке в примере 2.

Фиг. 9 иллюстрирует диаграмму, показывающую артериальный кровоток в почке в примере 3.

Фиг. 10 иллюстрирует диаграмму, показывающую артериальный кровоток в почке после трансплантации в примере 4.

Фиг. 11 иллюстрирует диаграмму, показывающую артериальный кровоток в почке после трансплантации в примере 6.

Фиг. 12 иллюстрирует диаграмму, показывающую артериальный кровоток в почке после трансплантации в примере 7.

Фиг. 13 иллюстрирует диаграмму, показывающую артериальный кровоток в почке после трансплантации в примере 9.

Фиг. 14 изображает фотографию, показывающую почку в примере 9.

Фиг. 15А-15D изображает фотографии, показывающие трансплантированную почку в соответствии с примером 9.

Фиг. 16А изображает диаграмму, показывающую изменения уровней IL-6 в основном от эритроцитов.

Фиг. 16В изображает диаграмму, показывающую изменения уровней IL-8 также в основном от эритроцитов.

Фиг. 16С изображает диаграмму, показывающую изменения уровней IL-1 β также в основном от эритроцитов.

Фиг. 16D изображает диаграмму, показывающую изменения уровней TNF- α также в основном от эритроцитов.

Фиг. 17 изображает диаграмму, показывающую скорость потока после перфузии модифицированным раствором, с использованием осмолярности примерно 300 мосмолей согласно примеру 12.

Фиг. 18 изображает диаграмму, показывающую давление, скорость потока и сопротивление согласно примеру 14.

Фиг. 19-22 изображают диаграммы, показывающие креатинин до и после трансплантации согласно примеру 16.

Фиг. 23 и 24 изображают фотографии, показывающие почки согласно примеру 16.

Фиг. 25-28 изображают фотографии, показывающие печень согласно примерам 17 и 18.

Фиг. 29 изображает диаграмму, показывающую результаты для печени в примерах 17 и 18.

Подробное описание вариантов выполнения

Ниже будут описаны несколько вариантов выполнения изобретения. Эти варианты выполнения описаны в иллюстративных целях, чтобы дать возможность специалисту реализовать изобретение, и чтобы раскрыть наилучший вариант. Однако, эти варианты выполнения не ограничивают объем изобретения. Кроме того, показаны и описаны некоторые комбинации признаков. Однако, другие комбинации различных признаков возможны в пределах объема изобретения.

Когда сердце перестает биться, циркуляция крови прекращается. Это может привести к каскаду со-

блгий, происходящих в теле, пытающемся поддерживать циркуляцию крови, которые в случае смерти мозга после вклинения мозга называют автономным катехоламиновым штормом, при котором в теле происходит выброс больших количеств адреналина и норадреналина в попытке поддерживать сердечно-сосудистую стабильность. В конце концов это приводит к смерти мозга и остановке сердца. Когда остановка сердца происходит перед вклинением мозга, последует другой каскад событий, затрагивающий систему свертывания крови и систему воспаления, без катехоламинового шторма. Меньше известно о событиях, следующих за смертью по причине остановки сердца и остановки циркуляции.

После остановки сердца и смерти, в течение 15-25 мин происходит процесс, называемый трупной бледностью, при котором кожа бледнеет. Трупную бледность вызывает прекращение капиллярного кровоснабжения в теле.

Затем происходит процесс, называемый трупным охлаждением, при котором тело меняет свою температуру пока не будет достигнута температура окружающей среды. После примерно 4 ч температура тела составляет примерно 27-29°C или ниже, в зависимости от окружающей температуры.

Затем происходит процесс, называемый трупным окоченением или посмертным окоченением, при котором мышцы становятся твердыми. После смерти прекращается дыхание, что истощает источник кислорода, используемого при выработке аденозинтрифосфорной кислоты (АТФ). АТФ необходима для обеспечения разделения актин-миозиновых поперечных мостиков во время расслабления мышцы. Тело подвергается трупному окоченению потому, что не может сломать эти мостики. При трупном окоченении головки миозинов продолжают связываться с активными местами актин протеинов с помощью аденозиндифосфата (АДФ), и мышца не может расслабиться пока другая ферментная активность не разрушит комплекс.

Трупное окоченение начинается примерно через 1-4 ч после остановки сердца и достигает максимума через примерно 12 ч. Оно затрагивает все мышцы тела и все органы.

Когда пациент с остановкой сердца находится далеко от больницы, трудно оценить длительность остановки сердца и ее влияние на органы. Поэтому тела пациентов, подвергшихся остановке сердца далеко от больницы, обычно не используют для трансплантации. Целью данного изобретения является восстановление таких органов, а также регенерация, оценка и хранение таких органов до трансплантации.

Чем раньше органы будут удалены, тем лучше будет результат их использования.

Однако, процесс восстановления согласно вариантам выполнения данного изобретения позволяет восстанавливать органы до трупного окоченения и вплоть до максимума трупного окоченения, с немного худшим результатом использования при значительных промежутках времени после смерти и прекращения кровообращения.

Все указанные выше действия затрагивают органы в теле с остановившимся сердцем.

Остановка сердца может активировать систему свертывания крови, что приводит к прокоагуляционному состоянию, при котором в конце концов образуются микротромбы в капиллярной системе. Мало известно о том, как пониженная температура тела влияет на процессы свертывания крови, на процесс активации и на процесс деактивации процессов свертывания.

Когда работает система кровообращения живого тела, будет ли кровь сворачиваться или нет зависит от баланса между двумя группами веществ, те вещества, которые способствуют сворачиванию, называют прокоагулянтами, а те, которые препятствуют сворачиванию, называют антикоагулянтами. В нормальном потоке крови преобладают антикоагулянты, так что кровь не сворачивается во время циркуляции по кровеносным сосудам.

При прекращении циркуляции крови после остановки сердца, мало известно о том, что происходит с системой свертывания со временем. Без привязки к какой-либо теории, считается, что при остановке кровообращения количество антикоагулянтов снижается, а прокоагулянты активируются, также в зависимости от причины остановки кровообращения. Этот процесс может быть медленным и также зависит от уменьшения температуры со временем.

Известно, что, если кровь собрать в химически чистую стеклянную пробирку, она обычно сворачивается через 6-10 мин, это можно использовать для выявления нарушения свертываемости. Однако, если заменить стеклянную трубку на силиконизированный контейнер, кровь может не сворачиваться в течение часа или более, потому что тромбоциты не активируются. Следовательно, можно предположить, что кровь, оставшаяся в донорском органе, может не свернуться в течение 30 мин, одного часа или более. Существенное сворачивание произойдет через 2-4 ч.

Когда давление сердца прекращается, некоторые кровеносные сосуды, а именно, капилляры, становятся уже, что может способствовать наступлению трупной бледности. Еще через некоторое время, присутствие альбумина и других онкотических веществ в крови вызывает ультрафильтрацию воды из окружающей ткани в кровеносные сосуды, вызывая расширение кровеносных сосудов, а именно артериол и венул и более крупных сосудов. Со временем, эритроциты отделяются и оседают в самой нижней части кровеносных сосудов в реакции осаждения. Лейкоцитарная пленка, содержащая лейкоциты и тромбоциты, образуется над эритроцитами. Лейкоцитарная пленка имеет повышенную концентрацию тромбоцитов и других белков. Расширение кровеносных сосудов может открывать части кровеносных сосудов, взаимодействующие с тромбоцитами, и активирует тромбоциты через примерно 2-4 ч. Помимо этого, так

как нет циркуляции крови, тромбоциты могут также взаимодействовать с эндотелиальными клетками, особенно если есть повреждение сосуда, на поверхности кровеносных сосудов и прикрепляться к эндотелиальным клеткам. Такое взаимодействие может еще более повредить эндотелиальные клетки и в конце концов также может привести к образованию тромбов. Такие тромбы могут образоваться в любой части сосудов, не имеющих циркуляции. Снижение температуры также влияет на систему свертывания крови различными способами. Обычно, пониженная температура будет замедлять химические реакции. Таким образом, через некоторое время, обычно через несколько часов, например, через 1-4 ч, кровеносные сосуды могут иметь множество тромбов большего или меньшего размера, прилипших к стенкам кровеносных сосудов. Эти тромбы невозможно смыть путем промывания кровеносных сосудов органов, что обычно происходит после получения органов от донора. Конечно, если попытаться смыть тромбы с помощью высокого давления и высокоскоростных потоков, возможны повреждения эндотелиальных клеток в местах отрыва тромбов. Вместо этого, эти тромбы остаются во время хранения органов после изъятия и перед трансплантацией. Когда органы, наконец, трансплантируют в реципиента, в кровеносные сосуды попадает кровь реципиента, что может привести к образованию новых тромбов в поврежденных зонах кровеносных сосудов. Таким образом, важно удалить тромбы как можно быстрее, особенно если орган был получен от донора через некоторое время, например, через 2, 3 4 ч или более после остановки кровообращения. Так как такие тромбы образуются через некоторое время после остановки кровообращения, эта проблема увеличивается в органах, полученных от доноров через продолжительный период времени, например, 4 ч или дольше. С другой стороны, этот процесс замедляется при низкой температуре, что означает то, что, если тело донора более быстро охладить перед изъятием органа, это может уменьшить процесс образования тромбов.

Когда образуется тромб, в нем захватывается большое количество плазминогена, а также другие белки плазмы крови. Плазминоген не станет плазмином или не вызовет растворение тромба, пока не будет активирован. В живом теле, пострадавшие ткани и эндотелий сосудов очень медленно вырабатывают мощный активатор, называемый тканевой активатор плазминогена (ТАП), который позднее, наконец, преобразует плазминоген в плазмин, который в свою очередь удаляет оставшийся кровяной тромб. Известно, что многие маленькие кровеносные сосуды, в которых поток крови был заблокирован тромбами, открываются вновь с помощью этого механизма в живом теле. Таким образом, особенно важной функцией плазминовой системы является удаление мельчайших тромбов из миллионов крошечных периферических сосудов, которые были бы заблокированы при отсутствии возможности их очистить.

Захваченный в тромбе плазминоген обычно представляет собой глу-плазминоген, который медленно преобразуется в плазмин при взаимодействии с ТАП. Это вызывает медленный запуск системы. Однако через некоторое время, глу-плазминоген преобразуется в лиз-плазминоген, который значительно быстрее преобразуется в плазмин. Так что, существует положительная система амплификации, которая увеличивает скорость растворения тромба по истечении начального промежутка времени, который может составлять до 48 ч.

После долгих экспериментов, автор пришел к заключению, что образование тромбов в течение первых нескольких часов ишемии может быть губительным для органов. Считают, что тромбоциты активируются благодаря отсутствию потока крови и образовавшиеся тромбы могут влиять на эндотелиальные клетки вблизи тромба и повредить их. Так как после смерти и остановки сердца отсутствует циркуляция крови, тромбы будут длительное время влиять на эндотелиальные клетки, что повредит их.

Эндогенная система растворения может быть использована для растворения микротромбов в донорской почке. Однако, растворение тромбов происходит медленно. Конечно, добавление большого количества ТАП не увеличит скорость активации плазминогена в плазмин.

Однако, было обнаружено, что добавление лиз-плазминогена и добавление ТАП усилит растворение тромба и ускорит процесс. Также можно обратить внимание локальную среду после растворения тромба, для предупреждения повторного тромбообразования, так как локальный эндотелий более уязвим после фибринолитической обработки.

Настоящее изобретение полезно при трансплантации любого органа, такого как печень, почки, поджелудочная железа, панкреатический островок, матка, тонкий кишечник, мультивисцеральный трансплантат.

Далее варианты выполнения изобретения будут описаны на примере трансплантации почек и печени. Однако, варианты выполнения полезны при трансплантации и других органов, как указано выше, и других тканей.

Особенностью почки является то, что она содержит две соединенные последовательно капиллярные системы, клубочковые капилляры и перитубулярные капилляры, с выносящими артериолами, расположенными между этими двумя капиллярными системами, как показано на фиг. 2. Так что микротромбы могут образовываться в обеих капиллярных системах. Кроме того, тромбы большего размера могут образовываться в выносящих артериолах, и переноситься между капиллярными системами. Процесс свертывания крови затронет почки и заблокирует две капиллярные системы и выносящие артериолы между ними. Таким образом, трудно вымыть тромбы из почек, в которых образовались микротромбы.

Для проверки процесса восстановления в экспериментальных целях были использованы почки сви-

ней, подвергшиеся тепловой ишемии в течение 4 ч или более. Имеются доказательства, что почки, подвергшиеся ишемии в течение 6 ч, 8 ч, 10 ч, 12 ч или более могут быть восстановлены. Кроме того, почки, подвергшиеся ишемии в течение одного часа или менее, также могут получить пользу от данного процесса, включая почки от доноров, подвергшихся смерти мозга, которые признаны маргинальными либо по причине длительной тепловой или холодной ишемии, либо из-за других сопутствующих факторов, таких как возраст, гипертензия, диабеты, гипотензия, время в реанимации (ПИТ), анурия, повышенные данные лабораторных анализов, плохо перфузированные почки на инструментальном столе или любая другая причина для первичного отвода донора от трансплантации.

Согласно варианту выполнения настоящего изобретения, почки, подвергшиеся тепловой ишемии в течение длительного и неизвестного времени, восстанавливаются с помощью основных этапов способа, упомянутых далее. Эти этапы не обязательно выполнять точно в такой же последовательности, как указано ниже, как будет объяснено далее.

Первый этап может включать введение лиз-плазминогена и ТАП в артерии почки сразу после изъятия и на инструментальном столе, последовательно или совместно, или же введение возможно с помощью экстракорпорального, ex-vivo перфузионного устройства последовательно или совместно. Лиз-плазминоген содержится в жидкости-носителе, которая представляет собой физиологическую изотоническую электролитную жидкость, возможно содержащую гиперонкотический агент. Может быть введено примерно от 5 до 20 мл лиз-плазминогена (используя от 5 до 100 ед на почку). Лиз-плазминоген приклеится к любым тромбам, имеющимся в кровеносном сосуде почки. Примерно через 15 мин (или одновременно) от 5 до 20 мл ТАП (используя от 0,5 до 10 мг на почку) можно ввести аналогичным образом в артерии. ТАП может содержаться в жидкости-носителе, которая представляет собой физиологическую изотоническую электролитную жидкость, возможно содержащую гиперонкотический агент. Первый этап можно проводить при температуре, равной комнатной или выше, такой как 20-37°C.

Почки можно дополнительно подвергнуть этапу циркуляции или перфузии, при котором почки соединяют с перфузионным устройством путем размещения соединителей в артерии почки и размещения почки в контейнер для сбора жидкости, выходящей из вен. Контейнер может содержать 500-5000 мл циркуляционной жидкости, которая представляет собой физиологическую изотоническую электролитную жидкость и может также содержать гиперонкотический агент, например, альбумин 57 г/л один или в сочетании с дополнительными гиперонкотическими агентами. Циркуляционная жидкость циркулирует через почку при температуре 15-24°C (комнатная температура) в течение 35 мин или дольше, начиная с давления 20 мм рт. ст. и с многократным увеличением давления на 5 мм рт. ст. через каждые 5 мин до максимального значения 70 мм рт. ст., после чего следует 30-минутный период при низком давлении, например, 30 мм рт. ст. Во время этого периода времени, лиз-плазминоген и ТАП также циркулируют в почке и сопротивление прогрессивно уменьшается. Проверяют цвет почки, и обработка при высоком давлении может быть прекращена, чтобы продолжить при низком давлении, когда почка побледнеет.

Возможно добавление одного или более из следующих веществ:

ингибитор тромбина, такой как антитромбин III (АТIII); аргобатран или другой прямой ингибитор тромбина, например, иногатран, мелагатран (и его пролекарственное средство ксимелагатран), дабигатран или гирудин и их производные;

аллостерические ингибиторы;

ингибитор тромбоцитов, такие как антагонисты рецепторов гликопротеина IIb/IIIa (абциксимаб, эптифибатид, тирофибан);

необратимые ингибиторы циклооксигеназы (аспирин, трифлузал);

ингибиторы рецепторов аденозиндифосфата (АДФ) (кангрелор, клопидогрель, прасугрел, тикагрелор, тиклопидин);

ингибитор фосфодиэстеразы (цилостазол);

антагонисты активируемого протеазами рецептора-1 (PAR-1) (ворапаксар);

ингибиторы обратного захвата аденозина (дипиридамол);

ингибиторы тромбосана (ингибиторы синтазы тромбосана, такие как ифетробан, пикотамид и антагонисты рецептора тромбосана, такие как терутробан);

или любой другой ингибитор тромбоцитов, один или в комбинации, для предотвращения повторного тромбообразования обработанных тромбов. Данные вещества могут быть введены во время первого этапа введения или первого этапа циркуляции или на любом другом этапе. Добавление гепарина или низкомолекулярного гепарина является необязательным.

Второй этап процесса включает перфузию и восстановление циркуляционной системы путем циркуляции гиперонкотической жидкости по сосудам почки. Гиперонкотический определяется как давление, вызванное белками плазмы, но также может представлять собой искусственную конструкцию, например, декстран или полиэтиленгликоль (ПЭГ). Общим свойством является то, что вещество должно иметь коллоидно-онкотическое давление больше, чем у окружающей ткани почки, через которую оно протекает. Кроме того, жидкость может быть перфузирована при низкой температуре, например, от 12°C до 24°C, и при низком давлении, например, от 20 мм рт. ст. до 30 мм рт. ст. на одном этапе этапа восстановления, и при более высокой температуре, например, от 18°C до 32°C на другом этапе этапа восстановления, на

котором давление перфузии также может быть более высоким, например, от 25 мм рт. ст. до 70 мм рт. ст. или 90 мм рт. ст. Одна гиперонкотическая жидкость содержит альбумин в высокой концентрации от 40 г/л до 120 г/л, такой как от 50 г/л до 80 г/л, например, от 57 г/л до 72 г/л, но также может содержать другие вещества с аналогичными свойствами или их комбинацию. Гиперонкотическая жидкость может содержать большое количество калия по сравнению с нормальными внеклеточными уровнями, примерно от 10 ммоль до 25 ммоль. Гиперонкотическая жидкость также может содержать непроницаемый агент осмотической мембраны - глюкозат и глюкозу, но может содержать другие агенты с аналогичными свойствами вместо указанного или в комбинации с ним (лактобионат, раффиноза, маннитол). Жидкость может быть окисигенирована путем воздействия газа, содержащего кислород (O_2 20%), диоксид углерода (CO_2 6.5%) и азот (N_2 73.5%) при нормальном атмосферном давлении, причем количество кислорода может быть изменено в соответствии с нуждами обмена веществ после анализа газа крови. Гиперонкотическая жидкость удаляет воду из интерстициальной ткани почки и восстанавливает капиллярную систему. Кроме того, токсичные продукты неисправного процесса обмена веществ вымываются и восстанавливается уровень pH с использованием буферной системы, такой как бикарбонат, но может дополнительно или альтернативно содержать другие агенты или вещества с аналогичным действием (фосфат, гистидин/гистидин HCl).

Так как почка подверглась ишемии в течение длительного периода времени, запасы гликогена были исчерпаны, что привело к недостатку АТФ. Так что, клеточные ионные насосы не работают и баланс Na/K внутри и снаружи клеток нарушен. Уровень pH уменьшается, лактат и пируват вырабатываются и накапливаются в ткани. Гиперонкотическая жидкость содержит глюкозу и/или аденин как субстрат обмена веществ, но может дополнительно или альтернативно содержать другие агенты с аналогичным действием (α -кетаглутарат, гистидин, глутаминовая кислота). Однако, скорость обмена веществ очень мала при такой низкой температуре.

Циркуляцию выполняют при пониженном давлении насоса. Во время циркуляции, сосудистое сопротивление постепенно уменьшается, и циркуляция продолжается пока сосудистое сопротивление не будет достаточно малым, что может занять несколько часов.

Третий этап процесса включает дополнительное восстановление микросреды и оценку почки. Температуру увеличивают примерно до 32°C и давление увеличивают до 30 мм рт. ст. или до 70 мм рт. ст.. Отмытые эритроциты (ККТ) добавляют до гематокритного числа от 3 до 20, такого как от до 10, например, от 6 до 8. Проводят оксигенацию с помощью оксигенатора с увеличенными уровнями кислорода. Обычно почка начинает вырабатывать мочу и в качестве показателя работы измеряют способность накапливать креатинин. В раствор может быть добавлено известное количество креатинина в качестве маркера фильтрационной способности почек. Кроме того, почку оценивают визуально. Если почка имеет (большие) темные области, это может говорить об отказе почки. Кроме того, оценивают сосудистое сопротивление почки.

Если почка признается годной для трансплантации, почку сразу трансплантируют или охлаждают до низкой температуры от 4 до 15°C и хранят до трансплантации.

Период хранения также возможен между вторым и третьим этапом.

Различные этапы могут быть различным образом модифицированы.

Первый этап может быть модифицирован путем выполнения одного или более первых этапов после второго этапа. Например, можно перфузировать гиперонкотическую жидкость в течение одного часа, после чего добавляют лиз-плазминоген и ТАП и возможно АТШ и перфузия может быть продолжена в течение еще одного часа, после чего опять добавляют лиз-плазминоген и ТАП и возможно АТШ и так далее.

Второй этап может быть модифицирован путем перфузии гиперонкотической жидкости во время первого периода в течение примерно одного часа, а затем понижают коллоидно-онкотическое давление, например, путем снижения концентрации альбумина от, например, 72 г/л до, например, 57 г/л и циркулируют жидкость еще в течение одного-трех часов. Гиперонкотическая жидкость может дополнительно содержать декстран 40 в дозе от 0,1 до 10%, один или в сочетании с альбумином или любым другим гиперонкотическим агентом.

Третий этап может быть модифицирован путем добавления ингибитора коагуляции и/или ингибитора тромбоцитов для предотвращения повторного тромбообразования обработанных тромбов. Можно использовать те же вещества, что описаны выше в отношении первого этапа. Вещества можно добавить в эритроцитарную суспензию перед ее добавлением в почку на третьем этапе, в перфузионный раствор перед добавлением эритроцитов, или в оба указанных раствора. Считается, что тромбы, образовавшиеся в микроциркуляционной системе и сосудах, являются липкими и прилипают к эндотелиальным клеткам. Когда тромбы растворяются, они оставляют повреждение на эндотелиальных клетках и гликокаликсе. Это повреждение будет активировать возможные тромбоциты и факторы свертываемости в эритроцитарной суспензии, которые остаются, несмотря на отмывание эритроцитов. Такая активация может привести к образованию новых тромбов в том же месте, чего следует избегать. Антитромбин III, или любой другой прямой ингибитор тромбина, будет вступать в реакцию с тромбином и деактивировать и удалять тромбин. Абциксимаб, или любой другой ингибитор тромбоцитов, предотвращает слипание тромбоцитов

вместе и их прилипание к поврежденным эндотелиальным клеткам. Добавление гепарина или низкомолекулярного гепарина является необязательным.

Третий этап может быть модифицирован путем выполнения при температуре от 28 до 37°C и при давлении от 30 до 90 мм рт. ст.

Этапы промывания могут выполняться между этапами и во время этапов. Промывочная жидкость проходит через почку и затем утилизируется. Таким образом, промывочная жидкость не циркулирует через почку.

Изъятие почек производят как можно быстрее, при этом неизвестно как долго почки были подвержены ишемии по причине прекращения кровообращения или другим причинам, но время ишемии более 2 ч, такое как примерно 3 ч или 4 ч или более. Изъятие почки производят путем освобождения почек, аорты и полую вены, перерезают аорту и полую вену выше и ниже артерий почек и вен почек, как показано на фиг. 1. Комплект кладут на инструментальный стол и остатки аорты и полую вену очищают от видимых тромбов.

Как можно быстрее лиз-плазминоген (от 5 до 1000 ед) вводят в артерии почки с помощью иглы и шприца, причём артерию почки сжимают перед шприцом, чтобы обеспечить попадание всего лиз-плазминогена в артерии почки и в почку. Когда жидкость покидает вены почки, это говорит о том, что почки были перфузированы лиз-плазминогеном. Лиз-плазминоген взаимодействует с тромбами в кровеносных сосудах и связывается с тромбами и фибринов в тромбах. Затем, вены почки зажимают, а также обе артерии почки, пока не наступит время для введения ТАП.

Далее вводят ТАП таким же образом, что и лиз-плазминоген. Однако вены можно оставить закрытыми, так, чтобы внутри почки образовалось небольшое избыточное давление. Затем аорту канюлируют на одном конце и зажимают на другом конце, подготавливая систему к машинной ex-vivo перфузии. Оба мочеточника канюлируют, обеспечивая возможность контроля мочи.

Ингибитор тромбина, такой как антитромбин III (АТIII) или аргобатран, можно добавить вместе с лиз-плазминогеном и/или вместе с ТАП.

Следует отметить, что введенный объем лиз-плазминогена, примерно 10 мл, соответствует примерно половине объема крови, обычно имеющейся в почке, который составляет примерно от 15 до 30 мл на почку (если почка имеет вес 150 г) (от 10 до 20 мл на 100 г почки). Объем ТАП также составляет примерно 10 мл и доза составляет от 0,5 до 10 мг на почку.

В конце концов, почки кладут в закрытый контейнер, при этом почки подвешены на остатке аорты и соединены с циркуляционной системой, как показано на фиг. 3. Нижний конец полую вены открыт, так что жидкость может свободно вытекать из почек, в то время как жидкость подается в аорту циркуляторной системой контейнера.

Иногда почки обрабатывают по отдельности, при этом аорту делят в продольном направлении на две части и катетеры соединяют с артериями почек, которые все еще проходят от разделенного участка аорты, как показано на фиг. 3, что позволяет обрабатывать несколько артерий как одну и дает возможность контролировать каждую почку по отдельности. У людей, в более чем 30% всех почек, можно видеть больше одной артерии на почку. С предложенной технологией это не вызовет никаких проблем.

Как показано на фиг. 3, остаток 33 аорты почки 35 соединен с соединителем 32, имеющимся в контейнере 31. Полая вена 34 открыта для выпуска жидкости на дно 37 контейнера 31, как показано пунктирной линией 36. Уровень 36 жидкости может находиться ниже почки или выше почки, или между этими уровнями, последний вариант показан на фиг. 3.

Дно 37 контейнера соединено с дренажным мешком 41 с помощью клапана 42. Дно также соединено с насосом 43 с помощью первого переключающего клапана 44. Первый переключающий клапан 44 соединяет вход насоса 43 либо с пакетом 45 с промывающей жидкостью, либо с дном 37 контейнера 31, первое из данных положений показано на фиг. 3.

Выход насоса 43 соединен с нагревателем/охладителем 48, который регулирует температуру жидкости, проходящей через насос. Выход нагревателя/охладителя 48 проходит через второй переключающий клапан 46 к оксигенатору 47 и фильтру 49 лейкоцитов, или напрямую к соединителю 32 и к почке, первое из указанных положений показано на фиг. 3. В показанном положении, жидкость оксигенируется только путем взаимодействия с окружающей атмосферой (кислород, растворенный в жидкости).

Таким образом, жидкость, имеющаяся на дне контейнера 37, циркулирует через первый переключающий клапан 44 в насос 43 и далее через нагреватель/охладитель 48 ко второму переключателю 46 и к соединителю 32. Жидкость далее проходит от соединителя 32 к аорте и к почке и через сосуды почки и далее к венам почки и наконец выходит на дно контейнера.

Насос 43 представляет собой управляемый давлением насос, так что давление насоса регулируют до нужного значения, например, 20 мм рт. ст., и скорость потока зависит от сопротивления почки.

Жидкость, находящаяся на дне 37 контейнера 31 подается через несколько мешков 50, 51, 52, 53 и 54, как показано на фиг. 3. Каждый мешок соединен с контейнером 31 с помощью клапанов 55, 56, 57, 58 и 59. Путем открытия клапанов, содержимое мешков транспортируется на дно контейнера самотеком.

В одном варианте выполнения работа происходит следующим образом.

После того, как почки подверглись воздействию лиз-плазминогена и ТАП на инструментальном

столе после изъятия почек, почки перемещают в контейнер 31 и остаток аорты соединяют с соединителем 32, так, чтобы почки висели внутри контейнера 31. Открывают вены и дают жидкости стечь прямо вниз на дно 37 контейнера. Почки могут располагаться на опоре (не показана), например, на сетке, и могут иметь различные углы расположения относительно горизонтальной оси. Температуру в контейнере устанавливают на желаемую начальную величину, например, от 18°C до 28°C. Циркуляционная жидкость, содержащая электролиты и, возможно, альбумин в концентрации 57 г/л может подаваться в контейнер 31 из мешка 50 с циркуляционной жидкостью путем открытия соответствующего клапана 55. Затем почки перфузируют, начиная с давления 20 мм рт. ст. в течение 5 мин, затем повышают давление на 5 мм рт. ст. каждые 5 мин до достижения давления от 50 мм рт. ст. до 90 мм рт. ст., которое было выбрано заранее. Затем давление можно понизить, например, до 20-30 мм рт. ст. и провести перфузию в течение дополнительного периода времени, выбранного заранее. Соппротивление почек уменьшилось и теперь почки нормального бледного цвета, темные зоны отсутствуют совсем или имеются лишь маленькие. Это говорит о том, что тромбы в кровеносных сосудах почек растворились и исчезли. Теперь жидкость внутри контейнера проходит к сливу 41 путем открытия сливного клапана 42.

Без привязки к какой-либо теории, считается, что темные зоны в почке показывают зоны с отсутствием циркуляции, что может быть вызвано тромбами или другими причинами. Если позднее в этих темных зонах будет достигнута циркуляция, почки смогут восстановить эти зоны до функциональной ткани.

На этапе перфузии, сливной клапан 42 закрывают и 1000 мл перфузионной жидкости 51 проходит в контейнер 31 под действием силы тяжести путем открытия клапана 56. Уровень жидкости в контейнере возрастет выше линии 36 когда 1000 мл жидкости накопится на дне контейнера, после чего клапан 56 закрывают. Первый переключающий клапан 44 находится в первом положении, показанном на фиг. 3, насос запускается и качает с давлением 20 мм рт. ст. Нагреватель/охладитель 48 регулирует температуру от 12 до 18°C. Жидкость на дне контейнера циркулирует с давлением от 20 до 30 мм рт. ст. в течение нескольких часов, например, от одного до четырех часов. В время этапа перфузии, химический состав почки восстанавливается и токсичные продукты удаляются. Теперь насос останавливают и выполняют промывание. Этап перфузии можно повторить с другим составом перфузионного раствора после этапов промывания, во время периода гипотермической перфузии или перфузию можно также продолжить при более высокой температуре, с эритроцитами или без них.

На этапе оценки, можно использовать тот же раствор с этапа перфузии после открытия сливного клапана 42 для слива содержимого контейнера на клапан 41, или сливной клапан 42 закрывают после двух этапов промывания, описанных выше, и 500 мл оценочной жидкости 52 проходит в контейнер 31 самотеком с помощью открытия клапана 57. После того, как 500 мл жидкости поступили, клапан 57 закрывают. Первый переключающий клапан 44 находится в первом положении, показанном на фиг. 3, и насос запускается и качает при давлении 20 мм рт. ст. Нагреватель/охладитель 48 увеличивает температуру до 28-32°C. Через 5-30 мин, в течение которых проверяют pH и окружающую среду, добавляют эритроцитарную суспензию из мешка 53 путем открытия клапана 58 до достижения гематокритного числа от 5 до 10, после чего клапан 58 закрывают. Второй переключающий клапан 46 перемещают во второе положение, содержащее оксигенатор 47 в контуре для оксигенации жидкости и эритроцитов. Циркуляция продолжается в течение 1-4 ч с давлением 30 мм рт. ст. пока почку не признают годной для трансплантации. Почки теперь оценивают при температуре 32-37°C и давлении 70-90 мм рт. ст. в течение 15 мин, отмечая сосудистое сопротивление, скорость потока и внешний вид чтобы определить насколько хорошо перфузированы почки. Хирург решает были ли почки перфузированы хорошо, средне или плохо, причем средне означает, что имеется несколько синих/черных пятен, а плохо означает, что имеется несколько больших темно-синих или черных зон, которые не перфузированы. Измеряют мочеотделение и регистрируют поток в единицах мл/мин на 100 г ткани почки. Теперь насос останавливают и открывают сливной клапан 42, чтобы слить всю жидкость на дне контейнера в слив 41.

Любой этап промывания может быть выполнен путем перемещения первого переключающего клапана 44 во второе положение, соединяющее насос 43 с мешком 45 для промывочной жидкости. Насос активируется и циркулирует примерно 200 мл в почки. Жидкость, покидающая почки и проходящая на дно контейнера, проходит далее к сливу 41 через открытый клапан 42. Таким образом, все эритроциты вымыты из почки и в слив. Такие этапы промывания можно выполнять несколько раз и между другими этапами.

На этапе консервации, сливной клапан 42 закрывают и 500 мл консервационной жидкости 54 проходит в контейнер 31 под действием силы тяжести и с помощью открытия клапана 59. Когда 500 мл жидкости поступили, клапан 59 закрывают. Первый переключающий клапан 44 находится в первом положении, показанном на фиг. 3, насос запускается и качает при давлении от 20 до 30 мм рт. ст. Нагреватель/охладитель 48 регулирует температуру до 6-18°C, например, 12-15°C. Жидкость на дне контейнера циркулирует при давлении 20-30 мм рт. ст. в течение нескольких часов, до 48 ч или более, пока не будет найден реципиент и почки не подготовят для пересадки реципиенту. Насос останавливают, сливной клапан 42 открывают, чтобы слить всю жидкость на дне контейнера в слив 41. Почку удаляют из соединителя 32.

Жидкости, используемые для варианта выполнения, показанного на фиг. 3, могут представлять со-

бой жидкости, указанные в табл. А.

Во время процедуры на инструментальном столе, лиз-плазминоген добавляют в жидкость-носитель, которая может быть идентична базовому раствору в табл. А.

В варианте выполнения, жидкость-носитель, промывающая жидкость, перфузионная жидкость и консервационная жидкость могут иметь одинаковые основные компоненты. Эти компоненты содержат натрий от 113 до 129 ммоль, калий от 5 до 25 ммоль, магний от 2,5 до 5 ммоль и кальций от 1 до 5 ммоль. Помимо указанных выше электролитов, возможно содержание одного или более из следующих веществ: альбумин в концентрации от 10 до 120 г/л, такой как от 40 до 75 г/л, например, от 57 до 72 г/л; необязательно декстран 40 от 0 до 100 г/л, гидроксипропилкрахмал (ГЭК) от 0 до 70 г/л, полиэтиленгликоль (ПЭГ 20) от 0 до 25 г/л или ПЭГ 35 от 0 до 3 г/л, по одиночке или в комбинации. Также необязательны декстроза 5 ммоль и бикарбонат от 10 до 35 ммоль. Кроме того, аминокислоты, такие как L-аргинин (предшественник оксида азота (NO), регулятор давления крови во время физиологического стресса), L-лейцин (синтез белка), L-глутамин (синтезирует L-аргинин, необходимый для производства аминокислоты) или другие, по одиночке или в комбинации, могут быть добавлены в обычных концентрациях (см. табл. А). Другие вещества, которые можно добавить, следующие: I-инозитол (стабилизатор мембранного потенциала), аденин и рибоза (производит аденозин- часть АТФ). Также можно добавить микроэлементы (кофакторы и витамины), такие как указаны в табл. А. Могут быть добавлены гормоны природного происхождения, такие как новорапид, Т3, Т4, прогестерон и эстроген, в физиологических концентрациях (табл. А). Могут быть добавлены антибиотики, такие как тиенам. Такая базовая жидкость согласно табл. А может использоваться в качестве по меньшей мере одного из следующего: жидкости-носителя, промывочной жидкости, циркуляционной жидкости, перфузионной жидкости и консервационной жидкости.

ТАБЛИЦА А		Витамины		ммоль
КОМПОНЕНТ		L-аскорбиновая кислота • Na		0-2
Неорганические соли		ммоль	D-биотин	0.005
CaCl ₂ • 2H ₂ O	0-5	Холина хлорид		0-0.05
MgSO ₄ (безводный)	0-10	Фолиевая кислота		0-0.01
KH ₂ PO ₄	0-60	Мио-инозитол		0-0.1
KCl	0-25	Никотинамид		0-0.1
NaHCO ₃	0-80	D-пантотеновая кислота • ½Ca		0-0.01
NaCl	0-140	Пиридоксина гидрохлорид		0-0.01
Na ₂ HPO ₄ (безводный)	0-5	Рибофлавин		0-0.001
Глюконат Na	0-110	Тиамин • HCl		0-0.01
Глюконат K	0-25	Витамин B12		0-0.01
Глюконат Mg	0-10	Гормоны		
Лактобионат Na	0-110	T3		0-0.0000030
Лактобионат K	0-25	T4		0-0.0000030
Лактобионат Ca	0-10	Кортизол		0-0.0000166
Аминокислоты		Инсулин новорапид (U)		0-40
L-аланин	0-1	Прогестерон		0-0.0100
L-аргинин • HCl	0-1	Эстроген		0-0.1004
L-аспарагин • H ₂ O	0-1	Другое		
L-аспарагиновая кислота	0-1	Аденозин		0-5
L-цистеин • HCl • H ₂ O	0-0.1	Цитидин		0-0.1
L-цистин • 2HCl	0.5	2'-дезоксаденозин		0-0.1
L-глутаминовая кислота/кетоглутарат	0-5	2'-дезоксцитидин • HCl		0-0.1
L-глутамин	0-15	2'-дезоксигуанозин		0-0.1
Глутатион	0-5	Гуанозин		0-0.1
Глицин	0-5	Пировиноградная кислота		0-5
L-гистидин • HCl • H ₂ O	0-210	Тиоктовая кислота		0-0.01
L-изолейцин	0-1	Тимидин		0-0.1
L-лейцин	0-1	Уридин		0-0.1
L-лизин • HCl	0-1	Аллопуринол		0-5
L-метионин	0-1	Декстроза		0-200
L-фенилаланин	0-1	D-рибоза		0-10
L-пролин	0-1	Раффиноза		0-60
L-серин	0-0.02	Маннитол		0-120
L-треонин	0-2	Гиперонкотическая жидкость		
L-триптофан	0-4	ГЭК		0-5
L-тирозин • 2Na • 2H ₂ O	0-1	ПЭГ 35		0-0.5
L-валин	0-2	Альбумин (г/л)		0-120
Лекарственные средства		Декстран 40/70 (%)		0-15
Верапамил				
Гепарин	0-10000 ед			
Минирин	0-000000009			

Перфузионная жидкость может иметь высокое онкотическое давление, что достигается путем добавления гиперонкотического раствора, такого как альбумин в концентрации от 70 до 120 г/л, например, 72 г/л, и возможно декстран 40 (или декстран 70) в концентрации от 0 до 150 г/л, или любой другой известной гиперонкотической жидкости.

Уровень калия может поддерживаться выше, чем в обычной плазме, в диапазоне от 13 до 25 ммоль, например, от 17 до 22 ммоль, например, 18 ммоль. Альтернативно, концентрация калия может быть мала, например, 1-13 ммоль. Уровни калия и натрия будут изменяться во время этапа эритроцитов благодаря нормализации физиологической среды и рН.

Оценочная жидкость может также содержать ингибитор коагуляции, такой как аргобатран (или другой прямой ингибитор тромбина, например, иногатран, мелагатран (и его пролекарственное средство ксимелагатран), дабигатран или гирудин и их

производные, или аллостерические ингибиторы; и

ингибиторы тромбоцитов, такие как антагонисты рецепторов гликопротеина Пв/Ша (абциксимаб, эптифибатид, тирофибан);

необратимые ингибиторы циклооксигеназы (аспирин, трифлузал);

ингибиторы рецепторов аденозиндифосфата (АДФ) (кангрелор, клопидогрель, прасугрел, тикагрелор, тиклопидин);

ингибитор фосфодиэстеразы (цилостазол);

антагонисты активируемого протеазами рецептора-1 (PAR-1) (ворапаксар);

ингибиторы обратного захвата аденозина (дипиридамол);

ингибиторы тромбосана (ингибиторы синтазы тромбосана, такие как ифетробан, пикотамид и антагонисты рецептора тромбосана, такие как терутробан);

или любой другой ингибитор тромбоцитов, один или в комбинации, для предотвращения повторного тромбообразования обработанных тромбов.

Добавление гепарина, белка С и белка S является необязательным.

Также может быть добавлен верапамил.

На фиг. 4 показан другой вариант выполнения. Данный вариант выполнения может использоваться в местной больнице, имеющей условия для изъятия почек. Почки проходят предварительную обработку в данной местной больнице и затем транспортируются в центральную больницу, ответственную за пересадку реципиенту.

В местную больницу подвергшийся остановке сердца пациент, донор, поступает по прошествии неизвестного промежутка времени с момента смерти, но менее 12 ч, 10 ч, 8 ч, 6 ч или 4 ч. Как только донор поступает, тело можно охладить, чтобы замедлить в теле вредные процессы, а именно обмен веществ и свертывание крови. Такое охлаждение может быть наружным, при котором тело помещают в охлаждаемую комнату или помещение, например, имеющее температуру воздуха примерно 0°C. Другим способом охлаждения может быть размещение ледяной шуги вокруг тела или в брюшной полости, или введение холодной жидкости в брюшную полость и/или в грудную полость.

Если в местной больнице имеется бригада для изъятия органов, изъятие можно произвести как можно скорее, с охлаждением или без.

Во время изъятия почек выполняют обычные процедуры и почки помещают на инструментальный стол, либо вместе, либо каждую почку по отдельности. На инструментальном столе выполняют первый этап введения лиз-плазминогена в артерии почек. Лиз-плазминоген оставляют в кровеносных сосудах почки примерно на 15 мин или более, причем в это время почку дополнительно подготавливают путем присоединения соединителя к артериям почки или к аорте.

Примерно через 15 мин, или как можно быстрее, почки перекладывают в контейнерное устройство 60, показанное на фиг. 4. Соединитель 63 почки 61 соединяют с соответствующим соединителем 34 вверху контейнера 62, при этом почка 61 подвешена внутри контейнера 61, как показано на фиг. 4. Вена почки открыта непосредственно внутрь контейнера 61.

Когда соединитель 64 все еще открыт, соединяют шприц 75 и примерно 10 мл ТАП (алтеплаза) вводят в артерии почки через соединитель 64. Следует отметить, что введение лиз-плазминогена может альтернативно быть выполнено с помощью шприца, соединенного с соединителем 64, перед введением ТАП и вместо введения на инструментальном столе. Опять же альтернативно, лиз-плазминоген и ТАП могут быть введены одновременно с помощью шприца через соединитель 64 или введены одновременно на инструментальном столе.

Вместо алтеплазы можно использовать другой ТАП, такой как стрептокиназа, урокиназа, ретеплаза и теноктеплаза.

Затем трубку 65 присоединяют к соединителю 64. Трубка 65 установлена в спиральной конфигурации и соединяет вакуумный мешок 66 с соединителем 64. Вакуумный мешок 66 поддерживается стойкой 67 на заданной высоте, например, на 27 см выше контейнера 64 (что соответствует давлению 20 мм рт. ст.). Положение вакуумного мешка 66 по высоте регулируется вдоль стойки 67 с помощью мотора 68 с червячной передачей. Спиральная конфигурация трубки 65 позволяет разместить трубку 65 в нужном положении по высоте. Изначально мешок пустой.

Мешок 76 для циркуляционной жидкости содержит циркуляционную жидкость, содержащую электролиты и гиперонкотический агент, такой как альбумин (табл. А). Циркуляционную жидкость в мешке 76 вводят в контейнер 62 как показано стрелкой 77. Используется примерно 1 л циркуляционной жидкости и объем контейнера 62 примерно 1,3 л, что означает, что контейнер 62 почти полностью заполнен циркуляционной жидкостью. Циркуляционную жидкость оксигенируют с помощью оксигенатора с использованием смеси газов O₂, CO₂ и N₂ со скоростью 1 л/мин. Операцию выполняют при комнатной температуре. Циркуляционная жидкость циркулирует в системе вместе с лиз-плазминогеном и ТАП.

Количество циркуляционной жидкости может быть меньше 1 л, но должно быть больше, чем объем трубок и насосов (за исключением контейнера) и почек. Кроме того, необходимо, чтобы небольшой объем находился в контейнере. Такой объем может составлять 10 мл, 20 мл, 50 мл или более. Таким образом, может использоваться от 150 до 1000 мл циркуляционной жидкости.

Насос 69 соединен с контейнером 62 с помощью трубки 70 и качает циркуляционную жидкость из контейнера 62 в вакуумный мешок 66. Датчик 71 уровня запускает насос 69, когда уровень жидкости в контейнере 62 достигает заданного значения. Насос может представлять собой перистальтический насос, имеющий расход жидкости, соответствующий частоте вращения насоса. Нет необходимости в регулировке насоса по давлению.

Насос 69 может работать со скоростью, например, 75 мл/мин в течение одной минуты, при этом 75 мл жидкости передается из контейнера 62 в вакуумный мешок 66. Расход насоса выбирают в соответствии с желаемой скоростью потока через почку, которая говорит о том, что сопротивление почки достаточно мало. Скорость потока 50 мл/мин на 100 г почки обычно считается достаточной. Обычная почка взрослого мужчины весит примерно 150 г.

Так как вакуумный мешок расположен на высоте примерно 27 см выше контейнера 62, поток циркуляционной жидкости проходит через почку при указанном давлении 27 см водяного столба, что соответствует 20 мм рт. ст. Если сопротивление почки велико, такое давление 27 см водяного столба может привести к скорости потока через почку, например, 7,5 мл/мин, что означает, что уровень жидкости в контейнере 62 возвращается до значения датчика 71 уровня через 10 мин. Затем насос 69 запускается датчиком 71 уровня и процедура повторяется.

Вакуумный мешок может быть перемещен в более высокое положение с помощью мотора 68 с червячной передачей. В варианте выполнения, мотор 68 с червячной передачей увеличивает высоту вакуумного мешка на 1 см в 1 мин. Когда давление увеличивается, например, через 10 мин до 35 см водяного столба, поток через почки увеличивается, например, до 15 мл/мин. Это означает, что насос 69 включается снова через 5 мин. Когда давление увеличилось настолько, что скорость потока через почку составила 75 мл/мин, насос 69 будет работать непрерывно. Это свидетельствует о том, что сопротивление почки достаточно низкое. Увеличение высоты расположения вакуумного мешка 66 теперь будет остановлено.

Максимальная высота расположения вакуумного мешка может быть, например, 95 см, что соответствует давлению 70 мм рт. ст. Если желаемая скорость потока (75 мл/мин для почки 150 г) была достигнута до размещения вакуумного мешка в самом верхнем положении (через 70 мин максимум), процедуру прерывают. Если желаемая скорость потока не была достигнута, операцию продолжают еще 30 мин при давлении 70 мм рт. ст. (95 см водного столба).

До данного момента операция проводилась при комнатной температуре от 18 до 28°C.

Контейнер 62 имеет рубашку 72, покрывающую большую нижнюю часть контейнера. Теперь в рубашку можно поместить ледяную шугу для охлаждения контейнера 62 до температуры примерно 5-18°C, например, 12-15°C. Вакуумную камеру опускают до 25 см и включают насос для циркуляции циркуляционной жидкости через почку. Контейнер с рубашкой и вакуумным мешком может быть расположен в изоляционном корпусе (не показан) и все устройство транспортируют в главную больницу, отвечающую за длительное хранение. Почку можно хранить в таком состоянии длительное время, до 48 ч или дольше.

В главной больнице, в которой может быть выполнена трансплантация, почку обрабатывают далее. Почку можно оставить в том же контейнере 62 или переместить в другой контейнер 82, как показано на фиг. 5. Контейнер 82 имеет соединитель 84, с которым соединена почка. Насос 89 качает жидкость из контейнера 82 по трубке 87 во входную артерию почки и жидкость выходит из контейнера 82 по вене, как описано ранее. Насос 89 представляет собой управляемый давлением насос и удерживает давление на желаемом уровне, например, 20-30 мм рт. ст. Нагреватель/охладитель (не показан) поддерживает температуру на желаемом уровне, например, 12-32°C, во время перфузии и консервации. Сливной мешок 85 соединен с дном контейнера 82 с помощью клапана 86.

Устройство согласно фиг. 5 также содержит мешок 91 для эритроцитарной суспензии. Мешок для эритроцитарной суспензии соединен с циркуляционной системой, содержащей три насоса 92, 93, 94, соединенные параллельно. Фильтр 95 цитокинов установлен последовательно с насосом 92, фильтр 96 эндотоксинов установлен последовательно с насосом 93 и оксигенатор 97 и фильтр 98 лейкоцитов установлены последовательно с насосом 94. Когда открыт клапан 99 суспензии, расположенный после мешка 81 для эритроцитарной суспензии, эритроцитарная суспензия циркулирует с помощью насосов 92, 93, 94 через соответствующие фильтры 95, 96, 98 и через оксигенатор 97. Циркуляцию можно выполнять в течение примерно 30 мин при комнатной температуре. Таким образом, эритроцитарная суспензия проходит обработку с удалением эндотоксинов, цитокинов и лейкоцитов. Кроме того, эритроцитарная суспензия оксигенируется.

Оценочный раствор находится в мешке 101 и соединен с контейнером 82 с помощью клапана 102. Когда клапан открыт, оценочный раствор самотеком проходит в контейнер 82, который перед этим был опустошен через слив 85 путем открытия клапана 86. Оценочный раствор нагрет до температуры примерно 32°C. Оценочный раствор циркулирует через почку с помощью насоса 89, при этом почка принимает температуру 32°C. Затем эритроцитарную суспензию вводят в контейнер путем открытия клапана 99 и других двух клапанов 103 и 104, как показано на фиг. 5. После того, как суспензия самотеком переместилась в контейнер 82, клапан 99 эритроцитарной суспензии закрывают.

Теперь насосы 92, 93, 94 качают имеющуюся в контейнере 82 жидкость через открытые клапаны 104 и 103 и через фильтры 95, 96, 98 и через оксигенатор 97. Таким образом, обеспечивают отсутствие в

оценочной жидкости каких-либо эндотоксинов, цитокинов и лейкоцитов. Кроме того, эритроциты оксигенируются. Теперь почку можно оценить, например, путем измерения параметров "крови", таких как парциальное давление кислорода, парциальное давление углекислого газа, HCO_3 , насыщение кислородом, гемоглобин, гематокрит, лактат, глюкоза, pH и другие. Кроме того, почку можно осмотреть визуально. Сопротивление можно вычислить по данным насоса. Можно проверить выработку мочи, включая концентрацию креатинина, если креатинин добавлен в оценочную жидкость. Таким образом, оценивают пригодность почки для трансплантации.

Затем содержимое контейнера 82 отводят в слив 85 путем открытия клапана 86. Консервационную жидкость 105 вводят в контейнер 82 путем открытия клапана 106. Консервационная жидкость циркулирует с помощью насоса 89 при давлении от 20 до 30 мм рт. ст. и низкой температуре 12-15°C для удаления всех эритроцитов. Кроме того, случается, что почка увеличивает свой вес, и консервационная жидкость содержит альбумин для удаления избыточной воды, накопившейся в почке. После периода хранения до 7 дней (или дольше), почку трансплантируют.

Еще один вариант выполнения показан на фиг. 5А. Аппарат содержит устройство 110 для промывки эритроцитарной суспензии (не показано подробно). Отмытые эритроциты в мешке 111 поступают в кондиционирующий контейнер 114 по трубке 112 и через клапан 113. Контейнер 114 имеет контур 115 кондиционирования, содержащий первый насос 116,

оксигенатор 117, поглотитель 118 цитокинов, фильтр 118 лейкоцитов, первый клапан 120 и второй клапан 121. Кроме того, первый соединитель 122 с клапаном соединен с первым клапаном 120, и второй соединитель 123 с клапаном соединен со вторым клапаном 121.

Когда первый и второй клапаны 120, 121 открыты и клапаны в соединителях 122, 123 закрыты, контур кондиционирования работает с обеспечением кондиционирования жидкости в контейнере 114 путем циркуляции находящейся внутри контейнера 114 жидкости с помощью насоса 116 через оксигенатор 117, фильтр 119 лейкоцитов и поглотитель 118 цитокинов, чтобы удалить лейкоциты и цитокины в эритроцитарной суспензии, имеющейся внутри контейнера 114. Когда циркуляция уже имела место в течение по меньшей мере 30 мин, например, 60 мин или более, эритроцитарная суспензия готова.

Система 130 обработки показана справа на фиг. 5А. Система обработки содержит контейнер 131 для обработки, имеющий третий соединитель 132 с клапаном, который может быть соединен с первым соединителем 122 с клапаном, и четвертый соединитель 133 с клапаном, который может быть соединен со вторым соединителем 123 с клапаном.

Контейнер 131 для обработки имеет три мешка 134, 135, 136 с жидкостью, которые соединены с контейнером 131 по трубкам, имеющимся в клапанах. Путем открытия таких клапанов, жидкость из соответствующего мешка с жидкостью может быть вылита в контейнер для обработки. Мешок 137 для отходов соединен с дном контейнера для обработки с помощью трубки, имеющейся в клапане. Путем открытия клапана, жидкость в контейнере 131 может быть отведена в мешок 137 для отходов.

Забранная почка 140 (почки) содержат соединитель 141 почки, соединенный с остатком аорты или с артерией (артериями) почки. Соединитель 141 почки может быть соединен с соединителем 142, имеющимся в контейнере. Соединитель 142 контейнера соединен с циркуляционной системой почки, содержащей циркуляционный насос 143 и оксигенатор 144. Насос 143 циркулирует жидкость в контейнере для обработки из нижней его части через указанный насос и оксигенатор в указанный соединитель 142 и к артерии почки 140. Жидкость, выходящая из вены почки, остается внутри контейнера для дальнейшей циркуляции.

Система кондиционирования содержит второй насос 145, соединенный с дном контейнера 131 для обработки, для перекачки жидкости в контейнере 131 для обработки через поглотитель 146 эндотоксинов и фильтр 147 лейкоцитов и обратно в контейнер для обработки.

Две медицинских инфузионных помпы 148, 149 имеются для инфузии медицинских средств в поток артерии почки. Инфузионные помпы могут представлять собой шприцевые насосы. Медицинские средства, подлежащие инфузии, могут представлять собой лиз-плазминоген, ТАП, АТШ, ингибитор тромбоцитов, ингибитор тромбина, ингибитор коагуляции и другие. Медицинские инфузионные помпы 148, 149 могут быть заменяемыми, так, что можно присоединить дополнительные шприцевые насосы.

Нагреватель/охладитель 150 установлен для нагрева/охлаждения жидкости, выходящей из контейнера для обработки.

Система может работать следующим образом.

Эритроцитарную суспензию промывают в системе 110 промывки согласно известным способам. Когда промывка закончена, эритроцитарную суспензию самотеком передают в кондиционирующий контейнер 114 путем открытия клапана 113.

Жидкость в кондиционирующем контейнере 114 циркулирует с помощью насоса 116 с помощью открытия клапанов 120 и 121 и работы насоса 116, перекачивающего жидкость через фильтр 119 лейкоцитов и поглотитель 118 цитокинов, тем самым удаляя оставшиеся лейкоциты и цитокины.

Тем временем, почку 140 забирают от донора и помещают в контейнер 131 для обработки и соединяют с соединителем 142 контейнера с помощью соединителя 141 почки. Эту операцию можно провести на удалении от левой части системы, показанной на фиг. 5А, например, в удаленной больнице.

Контейнер 131 для обработки имеет обрабатывающую жидкость из мешков 134, 135, 136 по необходимости. Исползованную жидкость отводят в мешок 137 для отходов путем открытия сливного клапана.

Второй циркуляционный насос 145 включают для перекачки жидкости в контейнере для обработки через фильтр 147 лейкоцитов и поглотитель 146 эндотоксинов для непрерывного удаления лейкоцитов и эндотоксинов.

Циркуляционный насос 143 включают для перекачки жидкости из контейнера через оксигенатор 144 и в артерию почки и далее через вену почки обратно в контейнер для обработки почки, как описано выше.

Насосы 148, 149 для медицинских средств могут быть использованы для введения медицинских средств.

Затем, систему 130 обработки соединяют с системой 115 кондиционирования путем соединения соединителя 122 с клапаном с соединителем 132 с клапаном и соединения соединителя 123 с клапаном с соединителем 133 с клапаном и путем открытия клапанов, кроме клапана 123. Первый клапан 120 закрывают и второй клапан 121 открывают, при этом насос 116 работает и перекачивает жидкость в кондиционирующем контейнере 114 через соединители 122, 132 в контейнер для обработки. Затем, второй клапан 121 закрывают и клапан 123 открывают, при этом насос 116 перекачивает обрабатывающую жидкость в контейнере 131 для обработки через оксигенатор 117, фильтр 119 лейкоцитов и поглотитель 118 цитокинов.

Обработку можно выполнять в соответствии с любым из методов, описанных выше.

Как показано на фиг. 5В, контейнер 151 для обработки может быть модифицирован для обработки двух почек по отдельности, хотя почки также могут быть размещены в виде блока. Две почки имеют два соединителя 161, 171 почек, соединенных с соединителями 162, 172 контейнера, которые соединены с циркуляционными насосами 163, 173 как показано. Оксигенатор 164 установлен в общей линии двух циркуляционных систем как показано. С помощью такой системы, каждая отдельная почка может снабжаться отдельными медицинскими средствами с помощью медицинских инфузионных помп 168, 169 и 178, 179 для проведения различных обработок.

Все ex-vivo перфузионное устройство целиком может быть адаптировано для различных органов. Например, печень имеет больший размер, чем почки, и может потребовать больше жидкости.

Пример 1.

Процедура перед изъятием почки: 30 свиньям дали анестезию и обеспечили у них нормовентиляцию, после чего вентилятор выключили. Сердечная недостаточность и остановка кровообращения появились через 15 мин. Через два часа при комнатной температуре в брюшную и грудную полости поместили холодный физиологический раствор, после чего в течение одного часа никаких действий более не предпринимали.

Изъятие почки: через три часа после прекращения кровообращения, начали операцию по изъятию почек, что занимает в среднем 45 мин.

Процедура на инструментальном столе: на инструментальном столе почки были промыты через артерию почек с помощью СОЛТРАН (жидкость для перфузии почек, производитель Бакстер Хелскеа) после введения примерно 500 единиц гепарина в 10 мл лидокаина 0,5-1% разбавленного до 20 мл с использованием 0,9% физиологического раствора, на одну почку.

Процедура обработки: почки были поделены на две группы: группа А 11 свиней, группа В 13 свиней, группа С по одной почке от каждой из 6 свиней и группа D по оставшейся одной почке от тех же 6 свиней.

Группа А подверглась холодному хранению в течение 2 ч, после чего была проведена трансплантация.

ТАБЛИЦА В						
КОМПОНЕНТ	г/л	ммоль		Витамины	г/л	ммоль
Неорганические соли				L-аскорбиновая кислота • Na	0,05	0,284
CaCl ₂ • 2H ₂ O	0,263	2,3698		D-биотин	0,0001	0,00041
MgSO ₄ (безводный)	0,09767	0,81144		Холина хлорид	0,001	0,00716
KCl	0,4	5,36543		Фолиевая кислота	0,001	0,00227
NaHCO ₃	4,72	56,18606		Мио-инозитол	0,002	0,0111
NaCl	6,8	116,35269		Никотинамид	0,001	0,00819
Na ₂ HPO ₄ (безводный)	0,122	0,8594		D-пантотеновая кислота • ½Ca	0,001	0,00210
Аминокислоты				Пиридоксина гидрохлорид	0,001	0,00486
L-аланин	0,025	0,2806		Рибофлавин	0,0001	0,000266
L-аргинин • HCl	0,126	0,72329		Тиамин • HCl	0,001	0,00296
L-аспарагин • H ₂ O	0,05	0,37845		Витамин B12	0,00136	0,00136
L-аспарагиновая кислота	0,03	0,22539		Другое		
L-цистеин • HCl • H ₂ O	0,1	0,00186		Аденозин	0,01	0,03742
L-цистин • 2HCl	0,0313	0,0999		Цитидин	0,01	0,04112
L-глутаминовая кислота	0,075	0,50975		2'-дезоксаденозин	0,01	0,0698
L-глутамин	0,292	2,00		2'-дезоксцитидин • HCl	0,011	0,04841
Глицин	0,05	0,66607		2'-дезоксигуанозин	0,01	0,03742
L-гистидин • HCl • H ₂ O	0,042	0,200		Гуанозин	0,11	0,03531
L-изолейцин	0,052	0,396		Пировиноградная кислота	0,11	1,249
L-лейцин	0,052	0,396		Тиоктовая кислота	0,0002	0,00097
L-лизин • HCl	0,0725	0,397		Тимидин	0,01	0,04111
L-метионин	0,015	0,101		Уридин	0,01	0,04095
L-фенилаланин	0,032	0,194		Гормоны		
L-пролин	0,04	0,34743		T3	0,00000001953	0,000000030
L-серин	0,025	0,0002356		T4	0,0000000233	0,000000030
L-треонин	0,048	0,403		Кортизол	0,000006	0,0000166
L-триптофан	0,01	0,0490		Инсулин новорапид	5 ед	
L-тирозин • 2Na • 2H ₂ O	0,0519	0,199		Миниприн	0,00000001	0,000000009
L-валин	0,046	0,393		Лекарственные средства		
				Верапамил	0,005	
				Тиенам	0,050	
				Гепарин	500 ед	

Группа В подверглась холодному хранению в течение 2 ч, после чего в течение 90 мин проведено восстановление при 37°C с помощью раствора, имеющего состав в соответствии с табл. В, и смешанного с отмытыми эритроцитами до достижения гематокрита примерно 15, после чего была проведена трансплантация.

Группа С была обработана путем гипотермической перфузии в течение 4 ч непосредственно после изъятия почки с помощью устройства для переноски почек Лайфпорт и раствора для перфузии почек (РПП) в соответствии с инструкциями производителя (производитель Орган Рековери Системс), после чего была проведена трансплантация.

Группа D содержит почки от тех же доноров, что и группа С, но была обработана путем холодного хранения в течение 2 ч, после чего была проведена трансплантация.

Фиг. 6 иллюстрирует изменение артериального кровотока (мл/мин) после реперфузии и при наблюдении в течение 90 мин после трансплантации.

Фиг. 7 иллюстрирует среднее мочеотделение в мл/мин через 90 мин после трансплантации. С использованием U-критерия Манна-Уитни, поток был лучше в прошедшей восстановлению группе В при перфузии ($p < 0,05$) (фиг. 6) и в прошедшей восстановлению группе В также было лучше мочеотделение ($p < 0,05$) через 90 мин после трансплантации (фиг. 7).

Пример 2.

6 свиньям дали анестезию и обеспечили у них нормовентиляцию, после чего вентилятор выключили. Сердечная недостаточность появилась через 15 мин. Через два часа при комнатной температуре в брюшную и грудную полости поместили холодный консервационный раствор (физиологический раствор).

Изъятие почек начали через 4 ч после смерти.

Почки были промыты на инструментальном столе с помощью холодного раствора Рингера после введения примерно 500 единиц гепарина в 10 мл лидокаина 0,5-1% разбавленного до 20 мл с использованием 0,9% физиологического раствора, на одну почку, через артерию почки.

Почки соединили с ex-vivo перфузионным устройством, аналогичным показанному на фиг. 3. Через артерию почки ввели 0,4 мг ТАП (альтеплаза) и 150 единиц апиразы (пуринаергическое лекарственное средство CD39/CD73, производитель Сигма Альдрих). Состав раствора показан в табл. С.

Раствор был перфузирован в течение 30 мин при температуре 15°C и давлении 20 мм рт. ст. без ок-

сигенации. Температуру повысили до 32°C, давление до 30 мм рт. ст., и перфузию продолжили еще в течение 90 мин на этапе восстановления. Затем были введены отмытые эритроциты с удаленными лейкоцитами и перфузию продолжили еще в течение 90 мин во время оценки.

Затем была проведена трансплантация почки.

Фиг. 8 иллюстрирует почечный кровоток после реперфузии и через 90 мин. Микроциркуляция в почках не очистилась полностью и на поверхности почек видны перфузионные дефекты. Фибринолитические лекарственные средства, а также пуриnergические лекарственные средства (апираза CD39/CD73) добавленные в ex-vivo систему, значительно не улучшили сосудистое сопротивление и поток.

ТАБЛИЦА С					
КОМПОНЕНТ	г/л	ммоль		г/л	ммоль
Неорганические соли			Витамины		
CaCl ₂ • 2H ₂ O	0,6732	4,95	Холина хлорид	0,001	0,00716
Глюконат магния (безводный)	1,13	5,00	Фолиевая кислота	0,001	0,00227
Фосфат калия (однозамещенный)	0,68	5,00	Мио-инозитол	0,002	0,0111
NaHCO ₃	4,15	49,40	Никотинамид	0,001	0,00819
Глюконат натрия	21,80	100,00	D-пантотеновая кислота • ½Ca	0,001	0,00210
Аминокислоты			Пиридоксина гидрохлорид		
L-глутамин	0,292	2,00	Рибофлавин	0,0001	0,000266
L-аргинин • HCl	0,105	0,603	Тиамин • HCl	0,001	0,00296
L-цистин • 2HCl	0,0313	0,0999	Другое		
L-гистидин • HCl • H ₂ O	0,042	0,200	Аденин	0,68	5,00
L-изолейцин	0,052	0,396	Декстроза	1,00	5,55
L-лейцин	0,052	0,396	D-рибоза	0,75	5,00
L-лизин • HCl	0,0725	0,397	Альбумин	72	
L-метионин	0,015	0,101	Минириин	0,00000001	
L-фенилаланин	0,032	0,194	Верапамил	0,005	
L-пролин	0,04115	0,100	Тиснам	0,050	
L-треонин	0,048	0,403	Гепарин	500 ед	
L-триптофан	0,01	0,0490	Апираза	150 ед	
L-тирозин • 2Na • 2H ₂ O	0,0519	0,199	Альтеплаза	0,4 мг	
L-валин	0,046	0,393	Гормоны		
			T3	0,000000001953	0,000000030
			T4	0,00000000233	0,000000030
Стерильная вода			Кортизол	0,000006	0,0000166
			Инсулин новорапид	5 ед	
			Прогестерон	0,00315	0,001002
			Эстроген	0,00001	0,00004

Пример 3.

В другом эксперименте был повторен протокол примера 2, но не была введена апираза. Вместо этого в перфузионный раствор был добавлен лидокаин. Идея состояла в поиске стабилизирующего действия во время этапа восстановления, в результате доказанного эффекта от воздействия лидокаина на натрий-калиевый насос. Состав раствора показан в табл. D.

ТАБЛИЦА D					
КОМПОНЕНТ	г/л	ммоль		г/л	ммоль
Неорганические соли			Витамины		
CaCl ₂ • 2H ₂ O	0,6732	4,95	Холина хлорид	0,001	0,00716
Глюконат магния (безводный)	1,13	5,00	Фолиевая кислота	0,001	0,00227
Фосфат калия (однозамещенный)	0,68	5,00	Мио-инозитол	0,002	0,0111
NaHCO ₃	4,15	49,40	Никотинамид	0,001	0,00819
Глюконат натрия	21,80	100,00	D-пантотеновая кислота • ½Ca	0,001	0,00210
Аминокислоты			Пиридоксина гидрохлорид		
L-глутамин	0,292	2,00	Рибофлавин	0,0001	0,000266
L-аргинин • HCl	0,105	0,603	Тиамин • HCl	0,001	0,00296

L-цистин • 2HCl	0,0313	0,0999	Другое		
L-гистидин • HCl • H ₂ O	0,042	0,200	Аденин	0,68	5,00
L-изолейцин	0,052	0,396	Декстроза	1,00	5,55
L-лейцин	0,052	0,396	D-рибоза	0,75	5,00
L-лизин • HCl	0,0725	0,397	Альбумин	72	
L-метионин	0,015	0,101	Минирин	0,00000001	
L-фенилаланин	0,032	0,194	Верапамил	0,005	
L-пролин	0,04115	0,100	Тиенам	0,050	
L-тресонин	0,048	0,403	Гепарин	500 ед	
L-триптофан	0,01	0,0490	Лидокаин	0,060	0,256
L-тирозин • 2Na • 2H ₂ O	0,0519	0,199	Гормоны		
L-валин	0,046	0,393	T3	0,000000001953	0,000000030
			T4	0,00000000233	0,000000030
			Кортизол	0,000006	0,0000166
Стерильная вода			Инсулин новорапид	5 ед	
			Прогестерон	0,00315	0,001002
			Эстроген	0,00001	0,00004

Фиг. 9 иллюстрирует поток без изменений в течение первых 90 мин, причем обычно поток уменьшается. Кроме того, изменение веса было минимальным между различными этапами восстановления, несмотря на тот факт, что осмолярность составила 330 мосмолей и уровень калия составил примерно 5 ммоль/л. В примере 2 почки значительно более прибавили в весе от начала перфузии и до конца через 90 мин реперфузии.

Пример 4.

7 свиньям дали анестезию и обеспечили у них нормовентиляцию, после чего вентилятор выключили. Сердечная недостаточность появилась через 15 мин. Через два часа при комнатной температуре в брюшную и грудную полости поместили холодный физиологический раствор.

Изъятие обеих почек от каждой свиньи начали через 4 ч после смерти.

Почки были промыты на инструментальном столе с помощью холодного раствора Рингера после введения примерно 500 единиц гепарина в 10 мл лидокаина 0,5-1% разбавленного до 20 мл с использованием 0,9% физиологического раствора, на одну почку, через артерию почки как описано в примере 2. Состав раствора показан в табл. Е.

ТАБЛИЦА Е					
КОМПОНЕНТ	г/л	ммоль		г/л	ммоль
Неорганические соли			Витамины		
CaCl ₂ • 2H ₂ O	0,6732	4,95	Холина хлорид	0,001	0,00716
Глюконат магния (безводный)	1,13	5,00	Фолиевая кислота	0,001	0,00227
Фосфат калия (однозамещенный)	0,68	5,00	Мио-инозитол	0,002	0,0111
NaHCO ₃	4,15	49,40	Никотинамид	0,001	0,00819
Глюконат натрия	21,80	100,00	D-пантотеновая кислота • ½Ca	0,001	0,00210
Аминокислоты			Пиридоксина гидрохлорид	0,001	0,00486
L-глутамин	0,292	2,00	Рибофлавин	0,0001	0,000266
L-аргинин • HCl	0,105	0,603	Тиамин • HCl	0,001	0,00296
L-цистин • 2HCl	0,0313	0,0999	Другое		
L-гистидин • HCl • H ₂ O	0,042	0,200	Аденин	0,68	5,00
L-изолейцин	0,052	0,396	Декстроза	1,00	5,55
L-лейцин	0,052	0,396	D-рибоза	0,75	5,00
L-лизин • HCl	0,0725	0,397	Альбумин	72	
L-метионин	0,015	0,101	Минирин	0,00000001	
L-фенилаланин	0,032	0,194	Верапамил	0,005	
L-пролин	0,04115	0,100	Тиенам	0,050	
L-тресонин	0,048	0,403	Гепарин	500 ед	
L-триптофан	0,01	0,0490	Гормоны		
L-тирозин • 2Na • 2H ₂ O	0,0519	0,199	T3	0,000000001953	0,000000030
L-валин	0,046	0,393	T4	0,00000000233	0,000000030
			Кортизол	0,000006	0,0000166
			Инсулин новорапид	5 ед	
Стерильная вода			Прогестерон	0,00315	0,001002
			Эстроген	0,00001	0,00004

Почки были перфузированы ex-vivo в течение 30 мин при температуре 15°C и давлении 20 мм рт. ст. Затем перфузионный раствор был оксигенирован сначала с использованием газовой смеси O₂ (20%), CO₂ (5,6%) и N₂ (74,4%). Через один час раствор был заменен на новый раствор, имеющий со-

став согласно табл. Е, температуру подняли до 32°C и давление установлено 30 мм рт. ст. Затем были введены отмые эритроциты с удаленными лейкоцитами и достигнут гематокрит примерно 10-15, после чего перфузию продолжили еще в течение 5 ч. Одну почку забрали из перфузионной системы, пересадили (n=7) в свинью реципиента и наблюдали в течение периода от 90 мин до 8 ч. Остальные почки в ex-vivo перфузионной системе были перфузированы еще 90 мин для сравнения.

Фиг. 10 иллюстрирует артериальный кровоток почки после трансплантации. Почки продолжали функционировать, вырабатывать мочу, в течение более чем десяти часов (n=3). Только за несколькими животными наблюдение длилось до десяти часов, что объясняет увеличенный разброс потоков. По завершении испытания, свиньи все еще находились под анестезией.

Пример 5.

В другом испытании, обработка проводилась в соответствии с тем же протоколом, что и пример 4 (n=5), но перфузия ex-vivo продолжалась в течение 11 ч вместо 6 ч. Скорость потока составила 104 мл/мин при реперфузии и 109 мл/мин через 14,5 ч после реперфузии. Таким образом, даже увеличение продолжительности перфузии может привести к значительной скорости потока, что обеспечивает запас времени для транспортировки почек и ожидания прибытия реципиентов.

ТАБЛИЦА F						
КОМПОНЕНТ	г/л	ммоль		г/л	ммоль	
Неорганические соли			Витамины			
CaCl ₂ • 2H ₂ O	0,6732	4,95	Холина хлорид	0,001	0,00716	
Глюконат магния (безводный)	1,13	5,00	Фолиевая кислота	0,001	0,00227	
Фосфат калия (однозамещенный)	0,68	5,00	Мио-инозитол	0,002	0,0111	
NaHCO ₃	4,15	49,40	Никотинамид	0,001	0,00819	
Глюконат натрия	21,80	100,00	D-пантотеновая кислота • ½Ca	0,001	0,00210	
Аминокислоты			Пиридоксина гидрохлорид			
L-глутамин	0,292	2,00	Рибофлавин	0,0001	0,000266	
L-аргинин • HCl	0,105	0,603	Тиамин • HCl	0,001	0,00296	
L-цистин • 2HCl	0,0313	0,0999	Другое			
L-гистидин • HCl • H ₂ O	0,042	0,200	Аденин	0,68	5,00	
L-изолейцин	0,052	0,396	Декстроза	1,00	5,55	
L-лейцин	0,052	0,396	D-рибоза	0,75	5,00	
L-лизин • HCl	0,0725	0,397	Альбумин	80		
L-метионин	0,015	0,101	Минирин	0,0000001		
L-фенилаланин	0,032	0,194	Верапамил	0,005		
L-пролин	0,04115	0,100	Тиенам	0,050		
L-треонин	0,048	0,403	Гепарин	500 ед		
L-триптофан	0,01	0,0490	Гормоны			
L-тирозин • 2Na • 2H ₂ O	0,0519	0,199	T3	0,00000001953	0,000000030	
L-валин	0,046	0,393	T4	0,0000000233	0,000000030	
			Кортизол	0,000006	0,0000166	
			Инсулин новорапид	5 ед		
			Прогестерон	0,00315	0,001002	
Стерильная вода			Эстроген	0,00001	0,00004	

Пример 6.

В другом эксперименте 7 свиней были умерщвлены в соответствии с тем же протоколом, что и в примере 4. Время теплой ишемии (ВТИ) составило от 4 до 6 ч.

Изъятие обеих почек от каждой свиньи начали через 4 ч после смерти.

Перфузию ex-vivo начали при 15°C. В течение первого часа было использовано 72 г альбумина на 1 л (раствор в соответствии с табл. Е) и давление во время перфузии составило 20 мм рт. ст. Оксигенацию начали через 30 мин. Через 1 ч раствор слили и был использован новый раствор с 80 г альбумина на 1 л (раствор в соответствии с табл. F) в течение 2 ч после повышения температуры до 32°C, давления до 30 мм рт. ст. и добавления эритроцитов.

Фиг. 11 иллюстрирует артериальный кровоток почки после трансплантации. Все семь почек показали хорошую скорость потока в течение 4 ч (118,7±15,0 мл/мин) и 8 ч (85,0±10,5 мл/мин) после трансплантации почек и поддерживали выработку мочи. Испытания завершились через 8 ч на свиньях, которые все еще находились под анестезией. Хотя скорость потока и ухудшалась в течение времени наблюдения, почки по-прежнему имели хорошую скорость потока в конце наблюдения. Из этических соображений свиньи разбужены не были.

ТАБЛИЦА G						
КОМПОНЕНТ	г/л	ммоль			г/л	ммоль
Неорганические соли			Витамины			
CaCl ₂ • 2H ₂ O	0,6732	4,95	Холина хлорид	0,001	0,00716	
Глюконат магния (безводный)	1,13	5,00	Фолиевая кислота	0,001	0,00227	
Фосфат калия (однозамещенный)	0,68	5,00	Мио-инозитол	0,002	0,0111	
NaHCO ₃	4,15	49,40	Никотинамид	0,001	0,00819	
Глюконат натрия	21,80	100,00	D-пантотеновая кислота • ½Ca	0,001	0,00210	
Аминокислоты			Пиридоксина гидрохлорид			
L-глутамин	0,292	2,00	Рибофлавин	0,0001	0,000266	
L-аргинин • HCl	0,105	0,603	Тиамин • HCl	0,001	0,00296	
L-цистин • 2HCl	0,0313	0,0999	Другое			
L-гистидин • HCl • H ₂ O	0,042	0,200	Аденин	0,68	5,00	
L-изолейцин	0,052	0,396	Декстроза	1,00	5,55	
L-лейцин	0,052	0,396	D-рибоза	0,75	5,00	
L-лизин • HCl	0,0725	0,397	Альбумин	57		
L-метионин	0,015	0,101	Минирин	0,00000001		
L-фенилаланин	0,032	0,194	Верапамил	0,005		
L-пролин	0,04115	0,100	Тиенам	0,050		
L-треонин	0,048	0,403	Гепарин	500 ед		
L-триптофан	0,01	0,0490	Гормоны			
L-тирозин • 2Na • 2H ₂ O	0,0519	0,199	T3	0,00000001953	0,000000030	
L-валин	0,046	0,393	T4	0,0000000233	0,000000030	
			Кортизол	0,000006	0,0000166	
			Инсулин новорапид	5 ед		
Стерильная вода			Прогестерон	0,00315	0,001002	
			Эстроген	0,00001	0,00004	

Пример 7.

В другом эксперименте 4 свиньи были умерщвлены в соответствии с тем же протоколом, что и в примере 4. Местное охлаждение с помощью льда в брюшной полости было проведено через 2 ч, в результате чего температура тела изменилась с 37°C до примерно 20°C, по сравнению с 25-29°C с использованием жидкости в качестве охладителя.

Почки извлекли, при этом ВТИ составило от 4 до 5 ч.

Почки были промыты раствором, имеющим состав, указанный в табл. G с 57 г альбумина на 1 л в качестве гиперонкотического агента. Почки были промыты в устройстве ex-vivo с давлением от 20 до 70 мм рт. ст., с увеличением давления на 5 мм рт. ст. каждые 5 мин, и при температуре 18°C пока почки не станут белыми. Для получения хорошо перфузируемых почек в среднем требуется от 2 до 3 л раствора и до 50 мин времени.

При использовании такого же раствора, температуру уменьшили до 12°C и почки перфузировали в течение 1 ч при давлении 20 мм рт. ст. Раствор затем заменили на раствор, содержащий 80 г альбумина на 1 л, как показано в табл. F, при температуре 28°C и давлении 30 мм рт. ст. Были добавлены эритроциты для получения в итоге гематокрита примерно 10-15. Этим раствором почки перфузировали примерно 2 ч. Затем температуру повысили до 32°C и почки перфузировали еще один дополнительный час, прежде чем опустошить систему и вновь добавить раствор, содержащий 57 г альбумина на 1 л, использовавшийся вначале. С этим раствором перфузию продолжили 30 мин при 15°C и давлении 20 мм рт. ст. прежде чем трансплантировать.

Фиг. 12 иллюстрирует артериальный кровоток почки после трансплантации. Высокие скорости потока после реперфузии могут быть достигнуты после тщательного промывания почек после их изъятия. Мочеотделение может поддерживаться в реципиентах в течение длительного времени, но уменьшается по истечении длительного времени наблюдения, что говорит о том, что промывание объемом в несколько литров может негативно повлиять на конечный результат по причине активации эндотелия. В итоге, через 4 ч (145,7±29,3 мл/мин) и через 8 ч (96,73±12,8 мл/мин) поток был лучше, чем при местном охлаждении холодным консервационным раствором, помещенным в брюшной и грудной полостях, как в предыдущих примерах 1-5, где достигалась температура 25-29°C. По этическим соображениям, по завершении испытания, свиньи все еще находились под анестезией.

Пример 8.

В другом эксперименте, 8 свиней были умерщвлены в соответствии с тем же протоколом, что и в примере 4, однако не было проведено местного охлаждения.

Изъятие почек был произведен через 4 ч после смерти, почки были перфузированы на инструментальном столе с использованием от 200 до 500 мл лекарственного средства перфадекс. Все почки показали плохую или умеренно плохую перфузию и плохое очищение.

Затем почки немедленно трансплантировали нефрэктомизированным свиньям. Средняя скорость потока при реперфузии составила 14,15 мл/мин и через 90 мин 36,8 мл/мин. Все почки выглядели посиневшими/черными через 90 мин, выработка мочи отсутствовала в итоге. Данный эксперимент был контрольным, показывающим, что без какой-либо процедуры охлаждения и другой обработки, например, согласно вариантам выполнения настоящего изобретения, ВТИ, равное 4 см, приводит к плохому приживанию трансплантата в соответствии с предыдущим опытом.

Пример 9.

В другом эксперименте были умерщвлены 6 свиней согласно описанному протоколу. Местное охлаждение с помощью ледяной шуги в брюшной полости было проведено через 2 ч, в результате чего температура тела изменилась с 37°C до примерно 10-12°C, по сравнению с 25-29°C с использованием жидкости в качестве охладителя и с 20°C при использовании льда.

Почки извлекли, при этом ВТИ составило от 4 до 5 ч.

На инструментальном столе, после извлечения, было введено 20 мл раствора, содержащего 72 г/л раствора альбумина (табл. I), смешанного с 10 единицами лиз-плазминогена и 200 единицами антитромбина III (АТIII) в каждую почку через почечную артерию после зажима вен, а затем и артерий после того, как раствор был введен.

Почки были помещены в ex-vivo устройство. Через 15 мин, в каждую почку было введено 1 мг ТАП (альтеплаза) и 100 единиц АТIII, поделенные на 4 порции по 5 мл после разбавления до 20 мл раствора, содержащего 72 г/л раствора альбумина (табл. I). ТАП был введен в почечную артерию с интервалом 5 мин при температуре 20°C, начиная с давления 20 мм рт. ст. и увеличивая каждый раз на 5 мм рт. ст.

ТАБЛИЦА Н					
КОМПОНЕНТ	г/л	ммоль		г/л	ммоль
Неорганические соли			Витамины		
CaCl ₂ • 2H ₂ O	0,6732	4,95	Холина хлорид	0,001	0,00716
Глюкокат магния (безводный)	1,13	5,00	Фолиевая кислота	0,001	0,00227
Фосфат калия (однозамещенный)	0,68	5,00	Мио-инозитол	0,002	0,0111
NaHCO ₃	4,15	49,40	Никотинамид	0,001	0,00819
Глюкокат натрия	17,451	80,00	D-пантотеновая кислота • ½Ca	0,001	0,00210
Глюкокат калия	4,685	20,00	Пиридоксина гидрохлорид	0,001	0,00486
Аминокислоты			Рибофлавин	0,0001	0,000266
L-глутамин	0,292	2,00	Тиамин • HCl	0,001	0,00296
L-аргинин • HCl	0,105	0,603	Другое		
Гормоны			Аденин	0,68	5,00
T3	0,00000001953	0,000000030	Декстроза	1,00	5,55
T4	0,0000000233	0,000000030	D-рибоза	0,75	5,00
Инсулин новорапид	5 ед		Альбумин	57	
Прогестерон	0,00315	0,001002	Тиенам	0,050	
Эстроген	0,00001	0,00004	Стерильная вода		

По окончании инфузии ТАП, почки были перфузированы раствором, содержащим 72 г альбумина на 1 л и давление увеличивали каждые 5 мин на 5 мм рт. ст. до достижения 50-70 мм рт. ст. или пока почки не очистятся, что наступит раньше. Температуру затем уменьшили до 12°C и перфузию продолжили еще 1 ч при давлении 20 мм рт. ст.

После промывания раствором, содержащим 57 г/л альбумина (табл. Н), ввели вторую дозу лиз-плазминогена, после чего ТАП и АТIII с разбавлением раствором 57 г альбумина на 1 л и последовательной подачей через артерию как описано выше.

Затем перфузию продолжили 30 мин при давлении 20 мм рт. ст. и температуре 12°C. Температуру увеличили до 28°C и давление до 30 мм рт. ст., затем добавили эритроциты для получения гематокрита от 5 до 10. Перед добавлением в раствор, эритроциты были предварительно обработаны в течение 2 ч с помощью внешнего насоса и были проведены через фильтр лейкоцитов. Это было сделано для обеспечения уменьшения количества лейкоцитов перед контактом с почками. Перфузия с помощью комбинированного раствора альбумина (57 г альбумина на 1 л, табл. Н) и эритроцитов продолжалась 1 ч. Температуру затем повысили до 37°C и давление до 70-90 мм рт. ст. на один час во время оценки. После промывки почек от содержащего эритроциты раствора, заполнения новым раствором альбумина 57 г/л и понижением температуры до 15°C, была проведена трансплантация.

Трансплантация была проведена у двух свиней, у которых их собственные почки были нефрэктомизированы сразу перед трансплантацией почки. Трое животных были разбужены из анестезии (из этических соображений обеспечено десять дней наблюдения). У одного животного на третий день проверили печень и взяли новый анализ крови. Иммуносупрессия заключалась только в подаче стероидов при реперфузии. Почки выглядели хорошо, креатинин в крови составлял 615 мкмоль/л. Другую свинью проверили на 4-й день, почки также выглядели хорошо, креатинин в крови составил 884 мкмоль/л. У третьей свиньи взяли кровь на 5-й день и затем продолжали всего 8 дней. Все три свиньи имели признаки отсроченной

функции трансплантата (ОФТ), что в одном случае привело к уремии и смерти через 8 дней, в двух других случаях животные были умерщвлены на 3 день и 4 день с повышенным уровнем креатинина в крови и высоким креатинином в моче, что говорило о способности концентрировать мочу.

Фиг. 13 иллюстрирует артериальный кровоток для каждой из шести свиней после реперфузии и через 90 мин. Добавление лиз-плазминогена и ТАП очистило почки лучше, чем когда-либо прежде, в результате чего уменьшилось сопротивление и улучшилась микроциркуляция.

Фиг. 14 иллюстрирует, что у некоторых почек имелись на поверхности пятна после реперфузии, которые иногда разрастались с получением синих/черных плохо перфузируемых почек через несколько часов после трансплантации, что говорит либо о повторном тромбообразовании из-за системы свертывания крови или из-за индуцированного действия тромбоцитов/эритроцитов на эндотелий.

Пример 10.

У еще трех свиней был повторен протокол согласно примеру 9 с некоторыми отличиями.

После изъятия почек и на инструментальном столе было выполнено введение лиз-плазминогена как описано выше. Через 15 мин почки были промыты с использованием 2 мг ТАП (альтеплаза) в 500 мл раствора, содержащего 57 г альбумина на 1 л (табл. Н), после чего почки поместили в ex-vivo устройство.

В устройстве ex-vivo почки перфузировали раствором, содержащим 72 г/л альбумина (табл. I) при 24°C и при увеличении давления от 20 до 50-70 мм рт. ст. С использованием того же раствора перфузию продолжили в течение 2 ч при 12°C и давлении 20 мм рт. ст.

После опустошения и промывки, был введен раствор, содержащий 57 г альбумина на 1 л (табл. Н) вместе с отмытыми эритроцитами для достижения гематокрита от 5 до 10, температуру изменили до 28°C, давление до 30 мм рт. ст. Была введена новая доза лиз-плазминогена, 2 мг ТАП и 200 единиц АТIII, температуру увеличили до 32°C, после чего проводили перфузию 15 мин при давлении 70 мм рт. ст. для оценки. После промывки и отмывания, был добавлен раствор, содержащий 57 г/л альбумина, а температуру уменьшили до 15°C. Всех трех свиней вывели из анестезии и наблюдали. Двое животных прожили 10 дней, с уровнем креатинина в крови у одного 166 мкмоль/л, а у другого 174 мкмоль/л, в конце эксперимента почки выглядели нормально. Третья свинья была умерщвлена на 6-й день с отсроченной функцией трансплантата и уровнем креатинина в крови 1231 мкмоль/л и уровнем креатинина в моче более 2000, что говорило о способности концентрировать мочу. В качестве единственного средства для иммуносупрессии все реципиенты получали только стероиды. Были взяты образцы для гистологического изучения алло-отторжения.

Фиг. 15а иллюстрирует нормального вида трансплантат почки через 10 дней после трансплантации. Нет макроскопических признаков отторжения.

Фиг. 15В иллюстрирует поверхность разреза трансплантированной печени, показанной на фиг. 15а, с нормальным макроскопическим строением.

Фиг. 15С иллюстрирует поверхность второй почки, работавшей 10 дней и имеющей зоны черных пятен, показывающие нарушение микроциркуляции.

Фиг. 15D иллюстрирует поверхность разреза трансплантированной печени, показанной на фиг. 15С, имеющей темные зоны с нарушенной циркуляцией в нижнем полюсе. Данные говорят о том, что обработка может восстановить и работу и структуру, хотя остается риск локального нарушения микроциркуляции.

Пример 11.

В еще одном эксперименте с 19 свиньями, у трех групп были измерены уровни цитокинов. В группе А (n=5), содержащей почки живых доноров, перфузированные с использованием раствора альбумина 72 г/л (табл. I) без какого-либо поглотителя цитокинов, были взяты образцы при начале перфузии, через 3 ч и в конце при 37°C. В группе В (n=5), содержащей почки живых доноров, перфузированные с использованием раствора альбумина 57 г/л (табл. Н) без какого-либо поглотителя цитокинов, были взяты образцы при начале перфузии, через 3 ч и в конце при 37°C. В группе С (n=9), содержащей почки доноров, умерших от остановки сердца, прошедшие перфузию с использованием раствора альбумина 72 г/л в течение 90 мин и раствора альбумина 57 г/л в течение 90 мин перед добавлением эритроцитов и перфузией при 37°C, причем в течение всего этого использовался поглотитель цитокинов (цитосорб, цитосорбенты). Для анализа использовали набор для иммуноферментного анализа (набор для иммуноферментного анализа Квантикин, производитель Р&Д Биосистемс). Значения ниже пределов обнаружения принимались равными нулю, и были вычислены средние значения для измеренных значений для каждой группы.

Фиг. 16А иллюстрирует диаграмму, показывающую изменения уровней IL-6 в основном из-за эритроцитов. Поглотитель (группа С) эффективно удалил все следы IL-6.

Фиг. 16В иллюстрирует диаграмму, показывающую изменения уровней IL-8, также в основном из-за эритроцитов и в меньшей мере из-за раствора альбумина 57 г/л вместо 72 г/л. Поглотитель удалил IL-8 (группа С).

Фиг. 16С иллюстрирует диаграмму, показывающую изменения уровней IL-1 β также в основном из-за эритроцитов. Поглотитель опять удалил все признаки цитокинов, полученных либо от самой почки, либо от введенных эритроцитов.

Фиг. 16D иллюстрирует диаграмму, показывающую изменения уровней TNF- α , также в основном

из-за эритроцитов. Поглотитель опять удалил все признаки цитокинов, полученных либо от самой почки, либо от введенных эритроцитов. Непоказанные данные включают анализ уровней IL-10, при котором не было возможности определить какие-либо уровни в любой из групп.

Пример 12.

В другом эксперименте, свиньи были умерщвлены согласно указанному выше протоколу, использовалось местное охлаждение ледяной шугой через 2 ч, изъятие почки началось через 4 ч.

Почки были получены с ВТИ от 4,5 до 5 ч.

ТАБЛИЦА I					
КОМПОНЕНТ	г/л	ммоль		г/л	ммоль
Неорганические соли			Витамины		
CaCl ₂ • 2H ₂ O	0,6732	4,95	Холина хлорид	0,001	0,00716
Глюкокат магния (безводный)	1,13	5,00	Фолиевая кислота	0,001	0,00227
Фосфат калия (однозамещенный)	0,68	5,00	Мио-инозитол	0,002	0,0111
NaHCO ₃	4,15	49,40	Никотинамид	0,001	0,00819
Глюкокат натрия	21,80	100,00	D-пантотеновая кислота • ½Ca	0,001	0,00210
Аминокислоты			Пиридоксина гидрохлорид		
L-глутамин	0,292	2,00	Рибофлавин	0,0001	0,000266
L-аргинин • HCl	0,105	0,603	Тиамин • HCl	0,001	0,00296
Гормоны			Другое		
T3	0,000000001953	0,000000030	Аденин	0,68	5,00
T4	0,00000000233	0,000000030	Декстроза	1,00	5,55
Инсулин новорапид	5 ед		D-рибоза	0,75	5,00
Прогестерон	0,00315	0,001002	Альбумин	72	
Эстроген	0,00001	0,00004	Тиенам	0,050	
			Стерильная вода		

На инструментальном столе в почки ввели 10 единиц лиз-плазминогена и 2 мг ТАП, каждый в растворе 15 мл.

Почки были помещены в ex-vivo устройство и перфузированы. Перфузионный раствор содержал ингредиенты, показанные в табл. J с альбумином в концентрации 57 г/л и с увеличением давления от 20 до 70 мм рт. ст., на 5 мм рт. ст. каждые 5 мин. Во время этапа перфузии (20°C) было использовано 600 единиц АТШ вместе с 2 мг абциксимаба (ингибитор тромбоцитов).

ТАБЛИЦА J					
КОМПОНЕНТ	г/л	ммоль		г/л	ммоль
Неорганические соли			Витамины		
CaCl ₂ • 2H ₂ O	0,6732	4,95	Холина хлорид	0,001	0,00716
Глюкокат магния (безводный)	1,13	5,00	Фолиевая кислота	0,001	0,00227
Фосфат калия (однозамещенный)	0,68	5,00	Мио-инозитол	0,002	0,0111
NaHCO ₃	4,15	49,40	Никотинамид	0,001	0,00819
Глюкокат натрия	17,451	80,00	D-пантотеновая кислота • ½Ca	0,001	0,00210
Глюкокат калия	3,982	17,00	Пиридоксина гидрохлорид	0,001	0,00486
Аминокислоты			Рибофлавин		
L-глутамин	0,292	2,00	Тиамин • HCl	0,001	0,00296
L-аргинин • HCl	0,105	0,603	Другое		
Гормоны			Аденин		
Инсулин новорапид	5 ед		Аденин	0,68	5,00
			Декстроза	1,00	5,55
			D-рибоза	0,75	5,00
			Альбумин	57 г/л	
			Тиенам	0,050	
			Стерильная вода		

После опустошения промывания дважды с использованием 250 мл раствора согласно табл. J с 57 г альбумина на 1 л, перфузию продолжили с раствором в соответствии с табл. J с 57 г альбумина на 1 л при 15°C в течение 2 ч.

Затем давление увеличили до 30 мм рт. ст. и температуру до 28°C, после чего провели перфузию 30 мин, при этом были добавлены эритроциты. Эритроциты были предварительно обработаны с использованием 800 единиц АТШ вместе с 2 мг абциксимаба, и перфузированы через фильтр лейкоцитов перед смешиванием с раствором. Благодаря такой обработке почки были полностью очищены без пятен или нарушений циркуляции.

Почки были трансплантированы и две свиньи прожили 7 дней, прежде чем были умерщвлены. У одной свиньи была инфекция. Обе свиньи имели повышенный креатинин на 7-й день, содержание креатинина в крови составило 1115 мкмоль/л, 1305 мкмоль/л, в моче 1790 мкмоль/л, 4530 мкмоль/л - что может быть интерпретировано как признаки отсроченной функции трансплантата, но улучшенной функции

концентрации мочи.

Фиг. 14 иллюстрирует диаграмму, показывающую скорости потока после перфузии с раствором, имеющим осмолярность примерно 300 мосмолей, с добавлением АТШ и ингибитора тромбоцитов. Диаграмма показывает более высокие начальные скорости потока при реперфузии, чем в предыдущих экспериментах.

Пример 13.

В еще одном примере был использован протокол, аналогичный примеру 12.

На инструментальном столе в почки ввели 15 единиц лиз-плазминогена и 3 мг ТАП, каждый в растворе 15 мл.

Почки были помещены в ex-vivo устройство и перфузированы с использованием раствора, содержащего ингредиенты, показанные в табл. J с альбумином в концентрации 57 г/л. Во время этапа перфузии (20°C) было использовано 600 единиц АТШ вместе с 3 мг абциксимаба. Давление было увеличено от 20 до 70 мм рт. ст., на 5 мм рт. ст. каждые 5 мин.

После опустошения промывания дважды с использованием 250 мл раствора согласно табл. J с 57 г альбумина на 1 л, перфузию продолжили с раствором в соответствии с табл. J с 57 г альбумина на 1 л при 15°C в течение 2 ч. Во время данного этапа была введена дополнительная доза 600 единиц АТШ вместе с 3 мг абциксимаба.

Затем давление увеличили до 30 мм рт. ст. и температуру до 28°C, после чего провели перфузию 30 мин, при этом были добавлены эритроциты. Эритроциты были предварительно обработаны с использованием 800 единиц АТШ и 3 мг абциксимаба, и перфузированы через фильтр лейкоцитов перед смешиванием с раствором.

После перфузии в течение 2,5 ч, скорость потока при давлении 30 мм рт. ст. уменьшилась со 147 мл/мин до 138 мл/мин и сопротивление увеличилось. В раствор еще раз добавили 800 единиц АТШ и 3 мг абциксимаба. Скорость потока и сопротивление оставались неизменными в течение 30 мин, после чего скорость потока увеличилась и сопротивление уменьшилось.

Пример 14

В еще одном эксперименте с использованием 6 свиней был использован следующий протокол.

Сначала правую почку живого донора удалили и утилизировали, а левую почку донора оставили работать.

Затем левую почку реципиента удалили и непосредственно пересадили живому донору на место удаленной правой почки.

Брюшную полость реципиента зашили и оставили реципиента спать в ожидании последующей трансплантации, при этом правая почка реципиента по-прежнему работала.

В живом доноре левая почка реципиента, пересаженная донору, была реперфузирована с использованием крови донора и наблюдалась, пока не стала вырабатывать мочу. Брюшную полость донора зашили.

Затем была вызвана остановка сердца донора как в предыдущих примерах.

Левая почка реципиента, которая была пересажена донору, была удалена по прошествии ВТИ от 4,5 до 5 ч.

На инструментальном столе в почки ввели 20 единиц лиз-плазминогена и 600 единиц АТШ, причем артерии и вены были зажаты. Через 15 мин было введено 4 мг ТАП вместе с еще одной дозой 600 единиц АТШ. Через 15 мин почки соединили с ex-vivo перфузионным устройством.

ТАБЛИЦА К					
КОМПОНЕНТ	г/л	ммоль		г/л	ммоль
Неорганические соли			Витамины		
CaCl ₂ • 2H ₂ O	0,6732	4,95	Холина хлорид	0,001	0,00716
Глюконат магния (безводный)	1,13	5,00	Фолиевая кислота	0,001	0,00227
Фосфат калия (однозамещенный)	0,68	5,00	Мно-инозитол	0,002	0,0111
NaHCO ₃	4,15	49,40	Никотинамид	0,001	0,00819
Глюконат натрия	17,451	80,00	D-пантотеновая кислота • ½Ca	0,001	0,00210
Глюконат калия	3,982	17,00	Пиридоксина гидрохлорид	0,001	0,00486
Аминокислоты			Рибофлавин	0,0001	0,000266
L-глутамин	0,292	2,00	Твямин • HCl	0,001	0,00296
L-аргинин • HCl	0,105	0,603	Другое		
Гормоны			Аденин	0,68	5,00
Инсулин новорапид	40 ед		Декстроза	1,00	5,55
			D-рибоза	0,75	5,00
			Альбумин	57 г/л	
			Тиснам	0,050	
			Стерильная вода		

В ex-vivo перфузионном устройстве почки перфузировали с использованием раствора в соответст-

вии с табл. К с 57 г альбумина на 1 л. После перфузии в течение 5 мин при давлении 70 мм рт. ст., перфузионное давление уменьшили до 30 мм рт. ст. и провели перфузию почек 30 мин. Затем давление уменьшили до 20 мм рт. ст., а температуру до 15°C, и почки перфузировали 2 ч.

Параллельно с этим, отмые эритроциты циркулировали через внешний фильтр лейкоцитов в течение 1 ч при комнатной температуре. К циркулирующим эритроцитам добавили 1000 единиц АТШ, 3 мг абциксимаба и 4 мг аргатробана (прямой антитромбиновый ингибитор).

Поглощающий цитокины фильтр Цитосорб и поглощающий эндотоксины фильтр Алтеко были промыты NaCl и раствором в соответствии с табл. К, и затем подключены к перфузионному устройству.

Температуру перфузионного раствора увеличили до 28°C, а давление увеличили до 30 мм рт. ст. на 30 мин. Указанные выше эритроциты были добавлены в раствор и фильтры были подключены, например, как показано на фиг. 5. После стабилизации среды при 28°C, температуру увеличили до 32°C. Почки перфузировали при этой температуре в течение 3 ч.

Затем в раствор добавили 1000 единиц АТШ, 3 мг абциксимаба и 8 мг аргатробана. После перфузии в течение 1,5 ч при 32°C, в раствор было добавлено 1,5 мг абциксимаба, 4 мг аргатробана и 1000 единиц АТШ. Температуру затем уменьшили до 15°C, давление до 20 мм рт. ст. и почки перфузировали в течение 30 мин.

Затем почки извлекли и почку реципиента трансплантировали обратно реципиенту, а оставшуюся собственную почку реципиента удалили. Значения скорости потока и сопротивления можно видеть на фиг. 18.

Пример 15.

В еще одном эксперименте с использованием 9 свиней был использован тот же протокол, что для примера 14.

Левая почка реципиента, которая была пересажена донору, была удалена по прошествии ВТИ от 4,5 до 5 ч.

На инструментальном столе в почки ввели 30 единиц лиз-плазминогена и 600 единиц АТШ, причем и артерии и вены были зажаты. Через 15 мин было введено 6 мг ТАП вместе с еще одной дозой 600 единиц АТШ. Через 15 мин почки соединили с ex-vivo перфузионным устройством.

В ex-vivo перфузионном устройстве почки перфузировали с использованием раствора в соответствии с табл. К с 57 г альбумина на 1 л. После перфузии в течение 5 мин при давлении 75 мм рт. ст., перфузионное давление уменьшили до 25 мм рт. ст. и провели перфузию почек 30 мин. Затем давление уменьшили до 20 мм рт. ст., а температуру до 15°C, и почки перфузировали 2 ч.

Параллельно с этим, отмые эритроциты циркулировали через внешний фильтр лейкоцитов в течение 1 ч при комнатной температуре. К циркулирующим эритроцитам добавили 1000 единиц АТШ, 3 мг абциксимаба и 4 мг аргатробана.

Поглощающий цитокины фильтр Цитосорб и поглощающий эндотоксины фильтр Алтеко были промыты NaCl и раствором в соответствии с табл. К, и затем подключены к перфузионному устройству.

Температуру перфузионного раствора увеличили до 28°C, а давление увеличили до 30 мм рт. ст. на 30 мин. Указанные выше эритроциты были добавлены в раствор и фильтры были подключены. После стабилизации среды при 28°C, температуру увеличили до 32°C. Почки перфузировали при этой температуре в течение 3 ч.

Затем в почки ввели 1000 единиц АТШ, 3 мг абциксимаба и 8 мг аргатробана. После перфузии в течение 1,5 ч при 32°C, в почки ввели 1,5 мг абциксимаба, 4 мг аргатробана и 1000 единиц АТШ.

Пример 16.

В еще одном примере с использованием 8 свиней, аналогично эксперименту 15, свиньи прошли тот же протокол, что и в предыдущих примерах 14 и 15. После трансплантации свиней разбудили от анестезии и наблюдали за ними до трех месяцев. Содержание креатинина в плазме через 10 дней и через три месяца, а также содержание креатинина в моче в те же моменты, соответствовали данным, показанным на фиг. 19-22. Креатинин нормализовался в течение первой недели и оставался нормальным в течение трех месяцев без необходимости в диализе. Фиг. 23 иллюстрирует типовую почку, использовавшуюся 3 месяца после восстановления и трансплантации, хорошо перфузируемую и без признаков фиброза или атрофии. На фиг. 24 проиллюстрирована почка, которая была удалена и разрезана по контуру, чтобы показать нормальную паренхиму почки.

Пример 17.

Одной свинье дали анестезию и обеспечили у них нормовентиляцию, после чего вентилятор выключили. Сердечная недостаточность появилась примерно через 15 мин. Через два часа при комнатной температуре в брюшную полость поместили дробленый лед.

Изъятие одной печени начали через 4 ч после смерти.

На инструментальном столе печень промыли с использованием 500 мл холодного раствора Сторепротект через портальную вену. В каждый из сосудов, в печеночную артерию и в портальную вену, ввели 60 единиц лиз-плазминогена и 1200 единиц АТШ, после чего зажали артерию, портальную вену и полую вену на 15 мин.

Печень соединили с ex-vivo перфузионным устройством и провели ее перфузию с использованием

раствора согласно табл. L с 72 г альбумина на 1 л. Затем в печеночную артерию и в портальную вену ввели 12 мг ТАП и 1200 единиц АТШ, после чего печень была соединена с перфузионным устройством, и перфузия была начата.

ТАБЛИЦА L					
КОМПОНЕНТ	г/л	ммоль		г/л	ммоль
Неорганические соли			Витамины		
CaCl ₂ • 2H ₂ O	0,6732	4,95	Холина хлорид	0,001	0,00716
Глюконат магния (безводный)	1,13	5,00	Фолиевая кислота	0,001	0,00227
Фосфат калия (однозамещенный)	0,68	5,00	Мио-инозитол	0,002	0,0111
NaHCO ₃	4,15	49,40	Никотинамид	0,001	0,00819
Глюконат калия	3,98	17,00	D-пантотеновая кислота • ½Ca	0,001	0,00210
Лактобионат натрия	30,46	100,00	Пиридоксина гидрохлорид	0,001	0,00486
Аминокислоты			Рибофлавин		
L-глутамин	0,292	2,00	Тиамин • HCl	0,001	0,00296
L-аргинин • HCl	0,105	0,603	Другое		
Гормоны			Аденин		
Инсулин новорапид	10 ед		Декстроза		
			D-рибоза		
			Альбумин		
			Тиенам		
			Стерильная вода		

Перфузию начали в портальную вену при скорости 0,75 мл/мин на грамм веса печени и в артерию при 0,25 мл/мин/г, при температуре 24°C. Портальную вену сначала промыли в течение 10 мин перед включением артериального потока, раствор был полностью оксигенирован.

В артерию и в портальную вену ввели 12 мг ингибитора тромбоцитов, содержащего абциксимаб и 16 мг прямого ингибитора тромбинов, содержащего аргатробан. Давление было увеличено от 20 мм рт. ст. до 90 мм рт. ст., на 5 мм рт. ст. каждые 5 мин. После того, как печень очистилась, давление уменьшили до 30 мм рт. ст. и печень была перфузирована еще 30 мин при температуре 22°C-24°C. Температуру затем уменьшили до 15°C, с сохранением скорости потока 0,75 мл/мин/г в портальной вене и 0,25 мл/мин/г в артерии в течение 2 ч. Температуру увеличили до 33°C, добавили эритроциты и давление увеличили до 75 мм рт. ст. Перфузию проводили 3 ч с добавлением каждый час и в артерию и в портальную вену 24 мг абциксимаба и 32 мг аргатробана. В конце эксперимента печень имела дефекты перфузии, как показано на фиг. 25 и 26.

Пример 18.

Трем свиньям дали анестезию и обеспечили у них нормовентиляцию, после чего вентилятор выключили. Сердечная недостаточность появилась примерно через 15 мин. Через два часа при комнатной температуре в брюшную полость поместили дробленый лед.

Изъятие печени начали через 4 ч после смерти.

На инструментальном столе печень промыли с использованием 500 мл холодного раствора Сторепротект через портальную вену. В каждый из сосудов, в печеночную артерию и в портальную вену, ввели 60 единиц лиз-плазминогена и 1200 единиц АТШ, после чего зажали артерию, портальную вену и полую вену на 15 мин. Затем в печеночную артерию и в портальную вену ввели 12 мг ТАП и 1200 единиц АТШ. Через 15 мин ожидания, печень соединили с перфузионным устройством.

ТАБЛИЦА М					
КОМПОНЕНТ	г/л	ммоль		г/л	ммоль
Неорганические соли			Витамины		
CaCl ₂ • 2H ₂ O	0,6732	4,95	Холина хлорид	0,001	0,00716
Глюконат магния (безводный)	1,13	5,00	Фолиевая кислота	0,001	0,00227
Фосфат калия (однозамещенный)	0,68	5,00	Мио-инозитол	0,002	0,0111
NaHCO ₃	1,26	15,00	Никотинамид	0,001	0,00819
Глюконат натрия	10,90	50,00	D-пантотеновая кислота • ½Ca	0,001	0,00210
Лактобионат натрия	24,37	80,00	Пиридоксина гидрохлорид	0,001	0,00486
Аминокислоты			Рибофлавин		
L-глутамин	0,292	2,00	Тиамин • HCl	0,001	0,00296
L-аргинин • HCl	0,105	0,603	Другое		
Гормоны			Аденин		
Инсулин новорапид	40 ед		Декстроза	1,00	5,55
			D-рибоза	0,75	5,00
			Альбумин	72 г/л	
			Тиенам	0,050	
			Стерильная вода		

Перфузию проводили с раствором согласно табл. М. Перфузию начали в портальную вену при скорости 0,75 мл/мин/г и в артерию при 0,25 мл/мин/г, при температуре 24°C. Портальную вену сначала промыли в течение 10 мин перед включением артериального потока, раствор был полностью оксигенирован. В артерию и в портальную вену ввели 12 мг абциксимаба и 16 мг аргатробана. Давление было увеличено от 20 мм рт. ст. до 90 мм рт. ст., на 5 мм рт. ст. каждые 5 мин. После того, как печень очистилась, давление уменьшили до 30 мм рт. ст. и печень была перфузирована еще 30 мин при температуре 22°C-24°C. Температуру затем уменьшили до 15°C, с сохранением скорости потока 0,75 мл/мин/г в портальной вене и 0,25 мл/мин/г в артерии в течение 2 ч. Температуру увеличили до 33°C, добавили эритроциты и давление увеличили до 75 мм рт. ст. Перфузию проводили 3 ч с добавлением каждый час и в артерию и в портальную вену 24 мг абциксимаба и 32 мг аргатробана.

Фиг. 29 иллюстрирует скорости потока в артерии во время эксперимента. Печень очистилась от пятен на паренхиме.

Обсуждение.

В примере 1 были исследованы основные принципы восстановления почек от донора, подвергшегося тепловой ишемии в течение более 4 ч после остановки кровообращения, с помощью раствора, содержащего минимальную питательную среду (МПС) и с альбумином в качестве гиперонкотического агента. Нормометрическая перфузия ex-vivo привела к значительно лучшему потоку крови и производству мочи по сравнению со средствами консервации ЛайфПорт (ЛП) или холодное хранение (ХХ).

В примере 2 длительное промывание почек, полученных от донора с остановкой сердца, после применения гепарина, апиразы - пуринергического ингибитора, удаляющего АТФ из ткани - и ТАП (альтеплазы), введенных и в артерию и в перфузионный раствор, немного улучшило сосудистое сопротивление и поток крови и не очистило полностью почки с использованием аналогичного по составу перфузионного раствора. Апиразу можно ввести в почки после очистки микроциркуляции от фибриновых сгустков.

В примере 3 был добавлен лидокаин, что улучшило поток крови через 90 мин, что указывает на стабилизированную функцию мембраны, возможно благодаря подавлению натрий-калиевого насоса.

В примере 4 было также замечено, что продолжительное время перфузии с использованием эритроцитов возможно при 32°C, за некоторыми почками наблюдали в течение 8 ч после трансплантации в свиной-реципиента, и в следующем примере 5 время перфузии увеличили до 11 ч с обеспечением работы пересаженной почки.

В примере 6 было обнаружено, что агент с более высоким коллоидным онкотическим давлением - альбумин 80 г/л - обеспечивает в почках хорошую скорость потока выше 115 мл/мин при ВТИ от 4 до 6 ч. Реципиенты наблюдались в течение 8 ч после трансплантации.

В примере 7 местное охлаждение было заменено на лед вместо холодного раствора Рингера через 2 ч после смерти. Это позволило достичь центральной температуры тела 20°C, в сравнении с 25-29°C при использовании холодного раствора Рингера. Поток крови значительно улучшился и через 4 и через 8 ч после трансплантации.

Свиньи, не получившие местного охлаждения, см. пример 8, и получившие только перфузию на инструментальном столе, не показали хорошей скорости потока при реперфузии (14.15 мл/мин) или через 90 мин (36.8 мл/мин).

В примерах 9 и 10 изменялись температура и коллоидное онкотическое давление, а также вместо обычного льда использовали ледяную шугу. Теперь перед извлечением можно добиться температуры тела от 10 до 12°C. Благодаря обработке почек лиз-плазминогеном в сочетании с ТАП, почки были очищены гораздо лучше и сосудистое сопротивление было значительно улучшено. Мы использовали альте-

плазу, но можно использовать любой фибринолитический агент, например, стрептокиназу, урокиназу, ретеплазу и теноктеплазу. Данная модификация очистила почки лучше, чем в предыдущих примерах. Некоторые из этих почек продолжали работу 10 дней с функционирующими почками после нефрэктомии собственных почек донора, выполненной в момент трансплантации, что доказало возможность использования почек от доноров после остановки сердца через 4 ч после смерти. Было обнаружено, что обработка эритроцитов во время периода оценки может помочь освободить цитокины, такие как IL-6, IL-8, IL-1 β and TNF- α , которые все участвуют в воспалительных процессах и реперфузии ишемии.

Путем использования специального поглотителя (цитосорб), эти цитокины могут быть полностью удалены, см. пример 11.

В последующих примерах 12 и 13 мы заметили, что ингибитор тромбоцитов, такой как абциксимаб, добавленный в консервационный раствор и к эритроцитам перед их смешиванием с перфузионным раствором, обеспечивают очень хорошую скорость потока. Кроме того, признаки увеличенного сосудистого сопротивления во время длительной перфузии с эритроцитами могут быть улучшены путем добавления АТШ и абциксимаба в раствор, что говорит о том, что желательно предотвратить повторный тромбоз, вызванный как системой свертывания крови, так и прилипанием тромбоцитов по завершении фибринолиза. Доза АТШ была увеличена в данных примерах по сравнению с предыдущими примерами.

В примерах 14 и 15 результаты были еще более улучшены путем добавления прямого ингибитора тромбинов, такого как аргатробан, что исключило риск уменьшения потока и увеличения сосудистого сопротивления во время этапа эритроцитов.

В примере 16 мы успешно трансплантировали почки, восстановленные в соответствии с примерами 14 и 15, и наблюдали их в течение 3 месяцев, доказав при этом, что восстановленные почки также были функциональны в соответствующих клинических условиях. Новые модели трансплантации, использованные в примерах 14, 15 и 16, означают, что механизмы алло-отторжения устранены благодаря факту, что почки, первоначально трансплантированные, были забраны у реципиента и пересажены донору перед тем, как была вызвана остановка сердца. Свиньи выжили без необходимости в диализе, несмотря на факт, что восстановленная почка одна работала у свиньи-реципиента.

В примере 17 были исследованы основные принципы восстановления печени, подтверждающие наши эксперименты на почках, полученной от донора, подвергшегося тепловой ишемии дольше 4 ч после смерти по причине прекращения кровотока. Раствор имел состав, аналогичный раствору, показавшему эффективность в случае почек, с альбумином в качестве гиперонкотического агента, но с использованием натриевой соли лактобионической кислоты вместо глюконата. Первоначальное промывание и перфузия при 24°C в значительной мере очистили паренхиму печени, но в конце оценки после введения эритроцитов печень имела перфузионные дефекты.

В примере 18 ТАП и АТШ были введены на инструментальном столе, аналогично протоколу для почек. Ex-vivo нормотермическая перфузия привела к очистке паренхимы, и лучшей скорости потока и меньшему сопротивлению по сравнению с контрольными образцами печени, полученными от доноров, умерших от прекращения кровоснабжения.

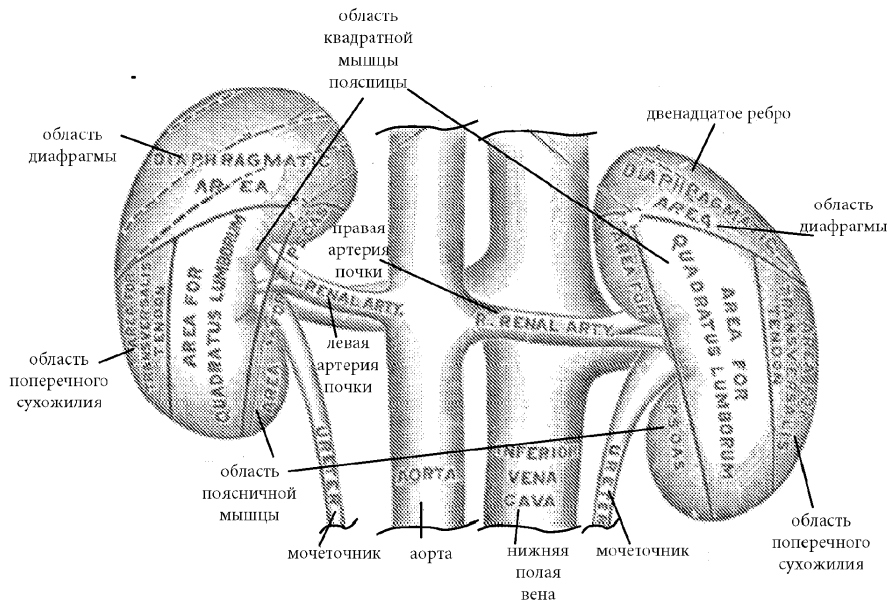
Мы заметили выработку желчи и меньшие уровни лактата по сравнению с контрольными животными через 6,5 ч перфузии, и печень выглядела хорошо перфузированной без дефектов.

В формуле изобретения термины "содержит" и/или "содержащий" не исключают наличия других элементов или этапов. Кроме того, хотя и описаны по отдельности, множество средств, элементов или этапов способа могут быть выполнены в виде, например, единого блока. Также, хотя отдельные признаки могут быть включены в различные пункты формулы или варианты выполнения, они возможно могут предпочтительно быть скомбинированы, и указание в различных пунктах формулы не подразумевает, что комбинация признаков не может быть реализована и/или не является преимущественной. Кроме того, единственное число не исключает множественного числа. Термины, характеризующие единственное число, "первый", "второй" и другие не исключают возможность множественного числа. Номера позиций указаны в формуле только для большей ясности и не могут каким-либо образом ограничивать объем формулы изобретения.

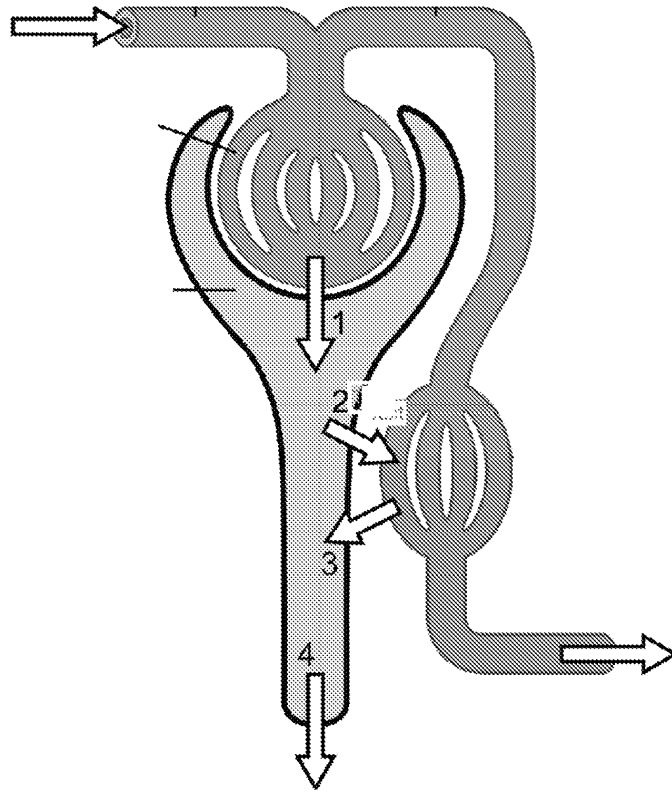
Хотя настоящее изобретение было описано выше со ссылкой на конкретные варианты выполнения и эксперименты, оно не ограничивается приведенными выше конкретными формами. Напротив, изобретение ограничено только прилагаемой формулой изобретения и другие варианты выполнения, отличные от описанных выше, одинаково возможны в пределах объема данной приложенной формулы изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

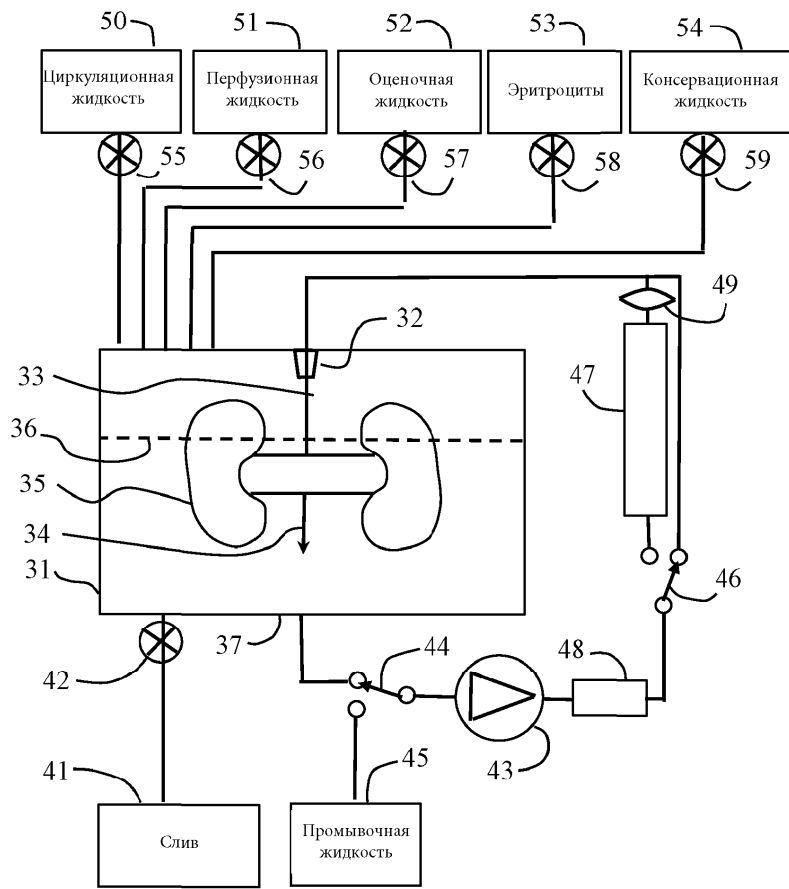
1. Способ восстановления органа, полученного от донора, включающий взятие органа от донора по меньшей мере через 2 ч после остановки кровообращения у донора, введение лиз-плазминогена в орган после его изъятия, причем лиз-плазминоген содержится в первом гиперонкотическом растворе, введение тканевого активатора плазминогена (ТАП) одновременно с введением лиз-плазминогена или после него, причем тканевый активатор плазминогена содержится во втором гиперонкотическом растворе, на первом этапе восстановления, обеспечение циркуляции через орган третьей гиперонкотической жидкости, содержащей альбумин и электролиты, при низкой температуре от 5 до 25°C, на втором этапе восстановления, обеспечение циркуляции через орган четвертой гиперонкотической жидкости, содержащей оксигенированные эритроциты, при температуре от 28 до 37°C, оценку органа на пригодность для трансплантации.
2. Способ по п.1, где донор представляет собой донора, умершего от прекращения кровоснабжения.
3. Способ по п.1 или 2, в котором на указанном первом этапе восстановления обеспечивают циркуляцию указанной третьей гиперонкотической жидкости через орган, причем указанная третья гиперонкотическая жидкость содержит альбумин в концентрации от 50 до 120 г/л, при этом давление циркуляции увеличивают в течение 30-75 мин.
4. Способ по любому из пп.1-3, в котором на указанном втором этапе восстановления обеспечивают циркуляцию указанной четвертой гиперонкотической жидкости через орган, причем указанная четвертая гиперонкотическая жидкость содержит альбумин в концентрации от 50 до 120 г/л, при этом давление циркуляции увеличивают в течение 30-75 мин.
5. Способ по любому из пп.1-4, в котором по меньшей мере одна из гиперонкотических жидкостей, первая, вторая, третья или четвертая, содержит по меньшей мере одно из следующих веществ: ингибитор коагуляции; прямой ингибитор тромбина; белок С; белок S и ингибитор тромбоцитов.
6. Способ по любому из пп.1-5, в котором обеспечивают циркуляцию по меньшей мере одной из третьей и четвертой гиперонкотических жидкостей через фильтр лейкоцитов.
7. Способ по любому из пп.1-6, в котором обеспечивают контакт по меньшей мере одной из третьей и четвертой гиперонкотических жидкостей с поглотителем цитокинов для поглощения цитокинов.
8. Способ по любому из пп.1-7, в котором обеспечивают контакт по меньшей мере одной из третьей и четвертой гиперонкотических жидкостей с поглотителем эндотоксинов для поглощения эндотоксинов.



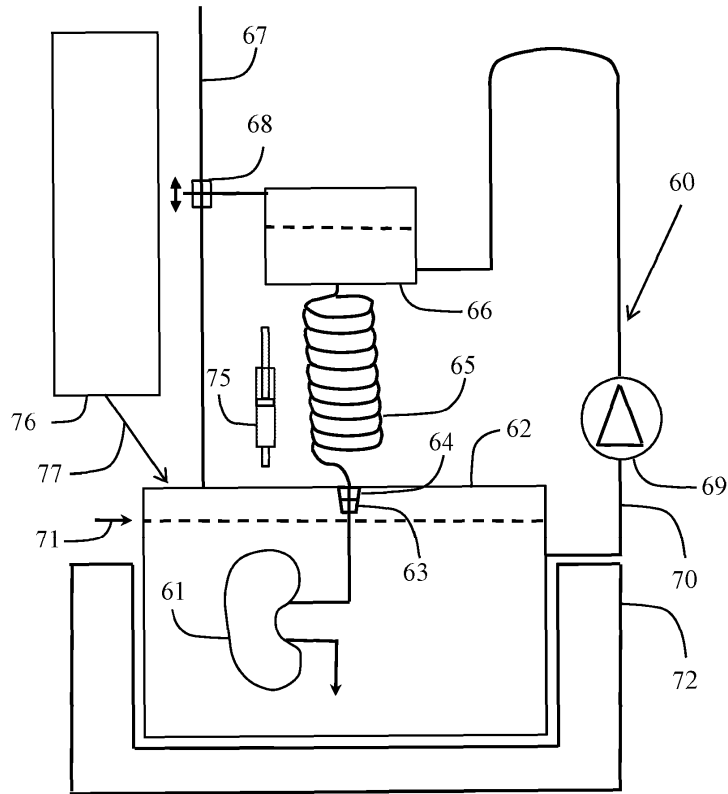
Фиг. 1



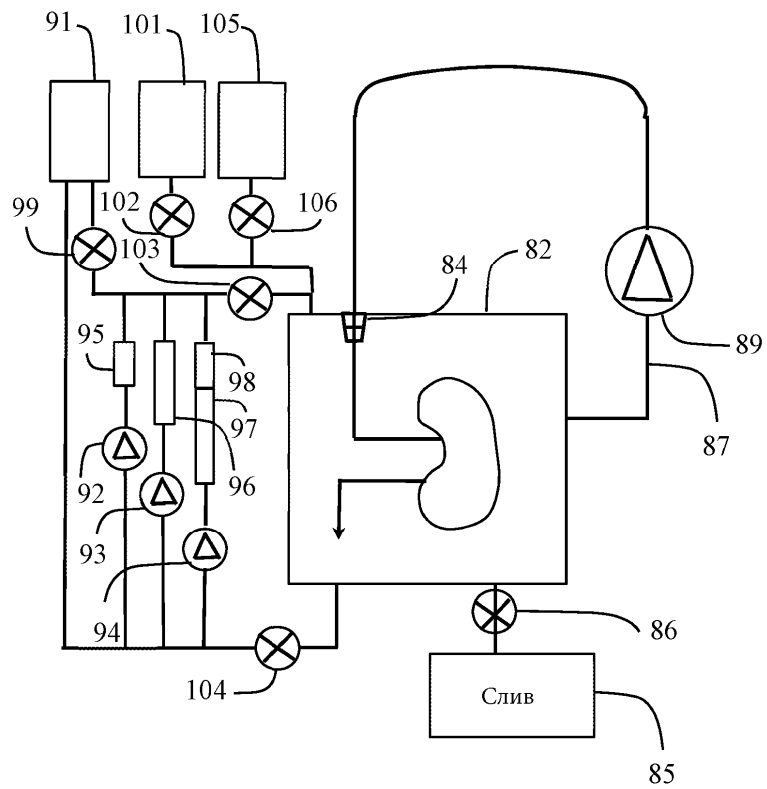
Фиг. 2



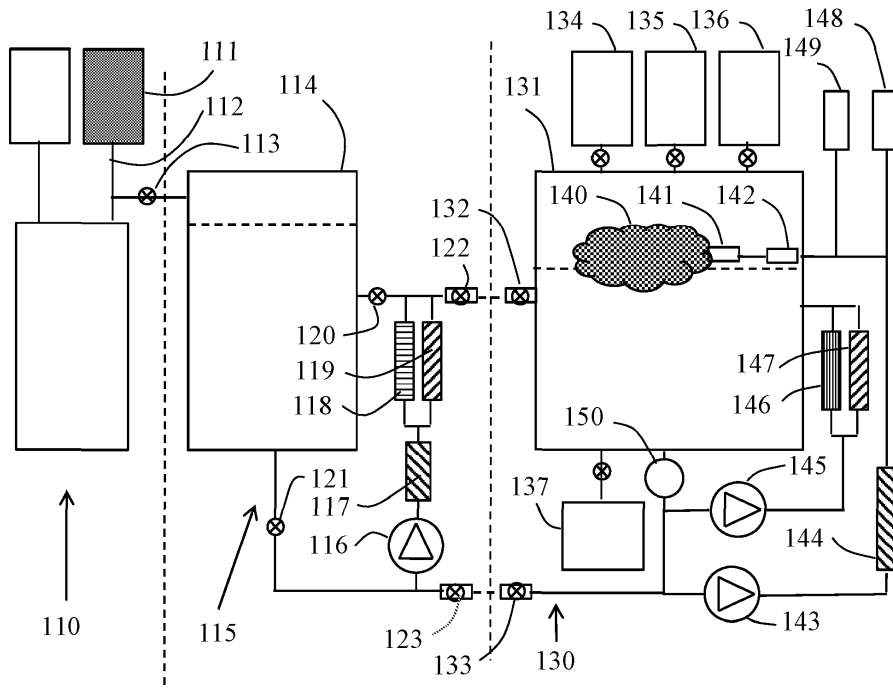
Фиг. 3



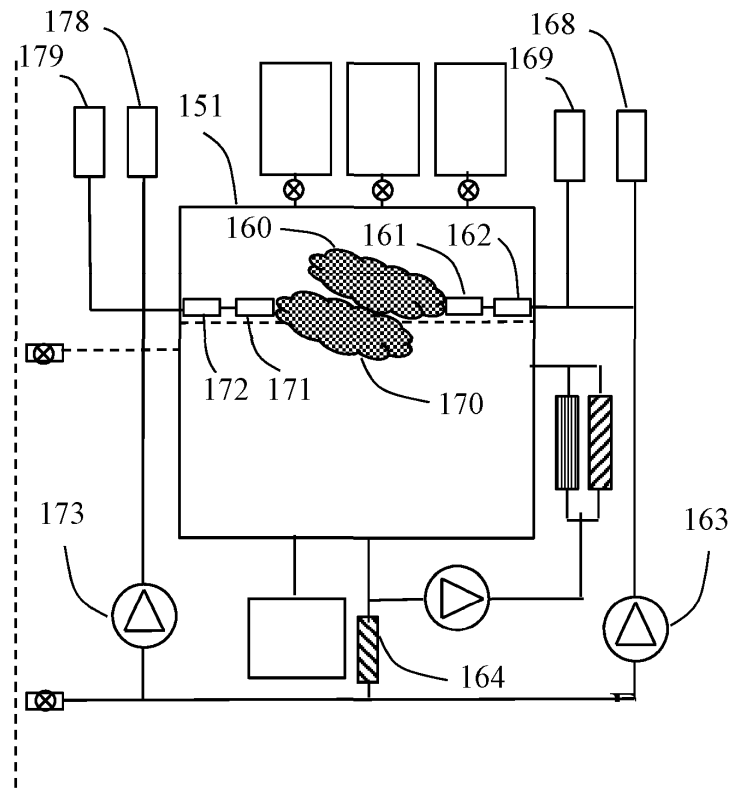
Фиг. 4



Фиг. 5



Фиг. 5А



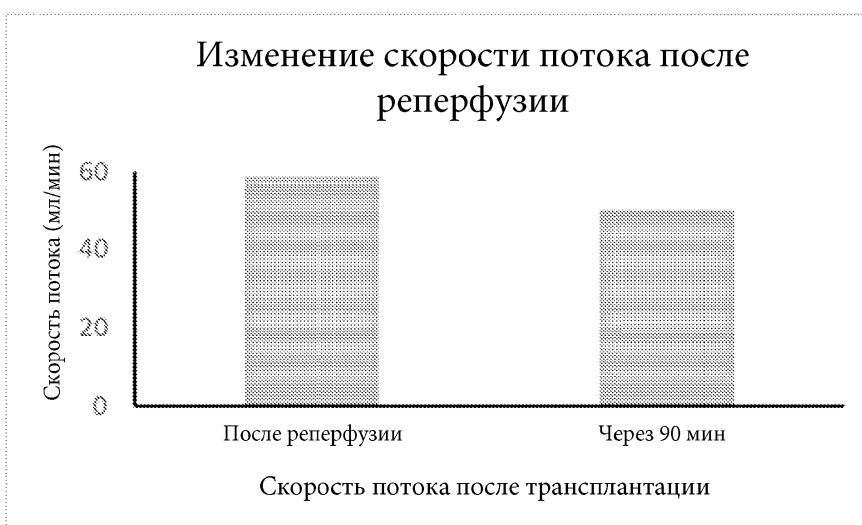
Фиг. 5В



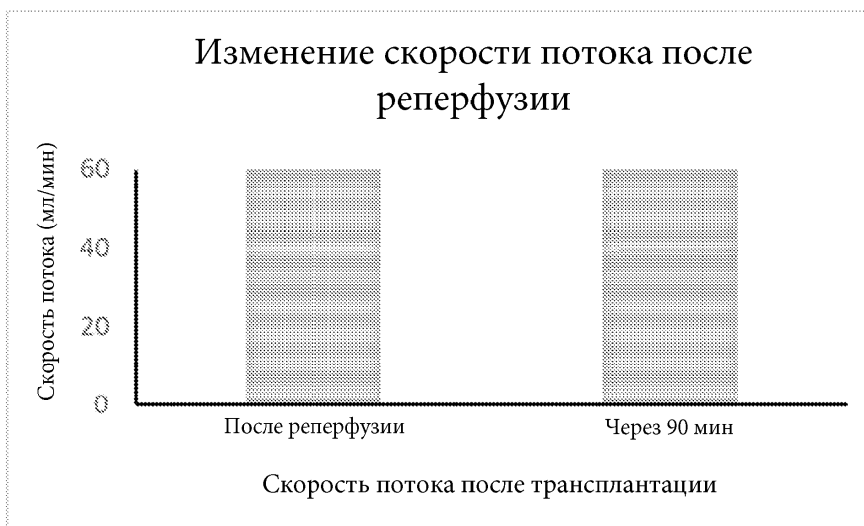
Фиг. 6



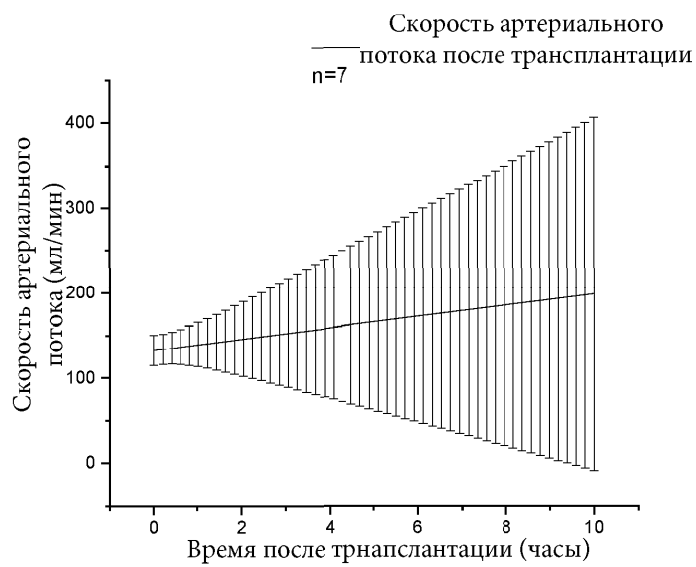
Фиг. 7



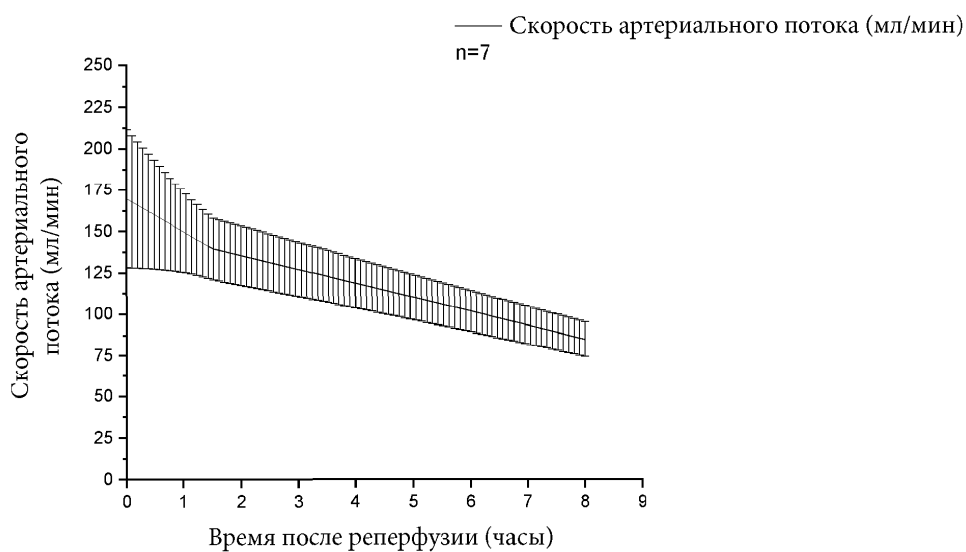
Фиг. 8



Фиг. 9



Фиг. 10



Фиг. 11



Фиг. 12



Фиг. 13



Фиг. 14



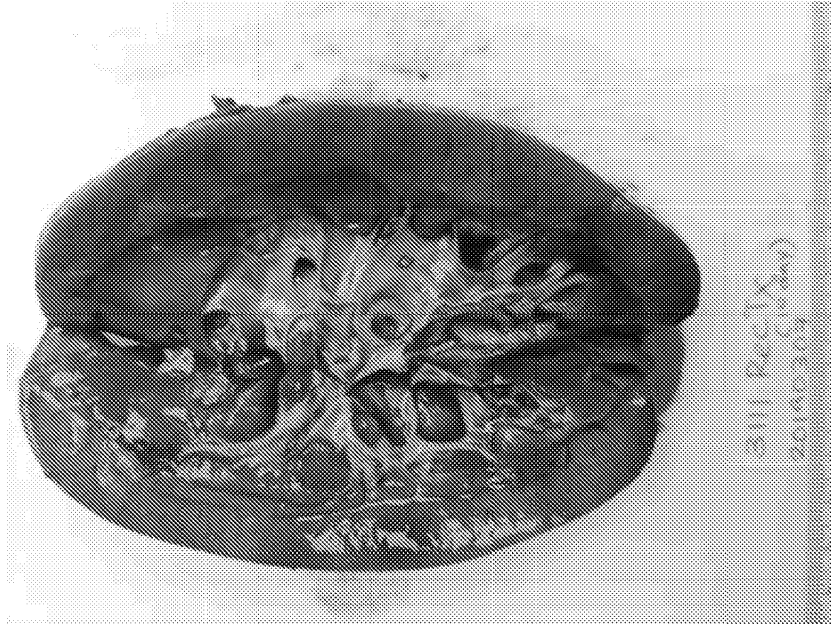
Фиг. 15А



Фиг. 15В



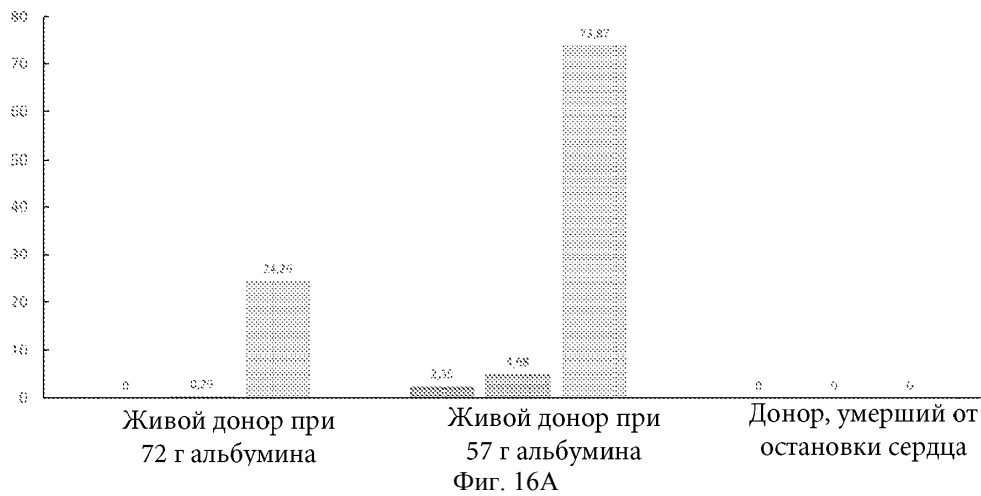
Фиг. 15С



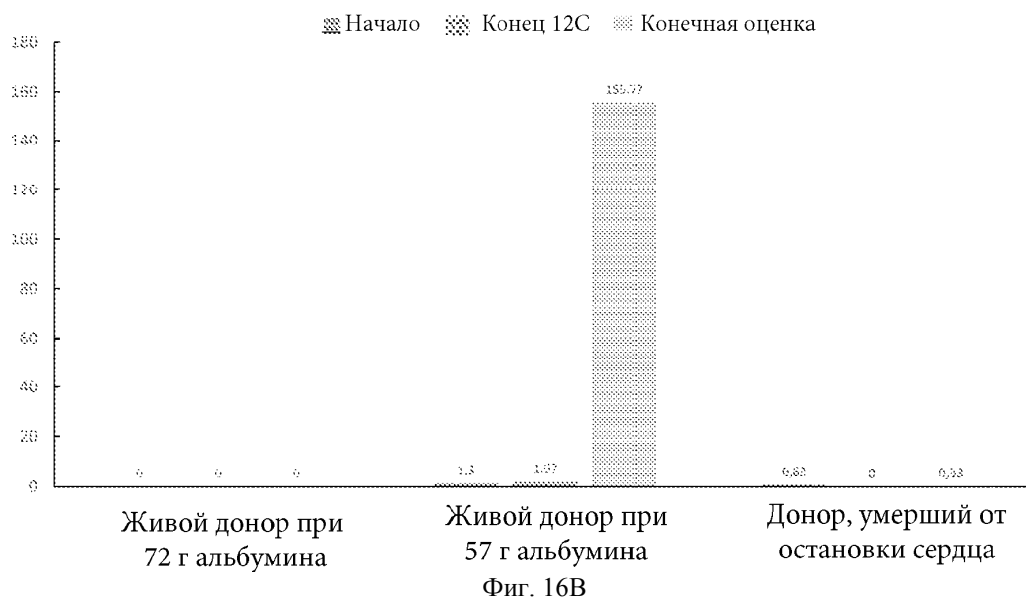
Фиг. 15D

Изменения уровней IL-6

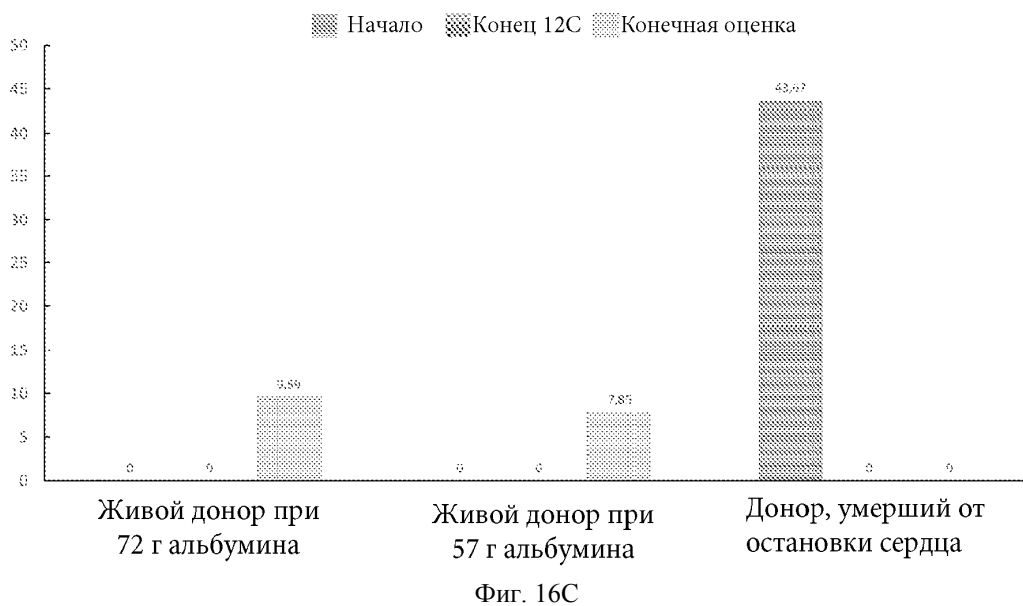
▨ Начало ▩ Конец 12С ▧ Конечная оценка



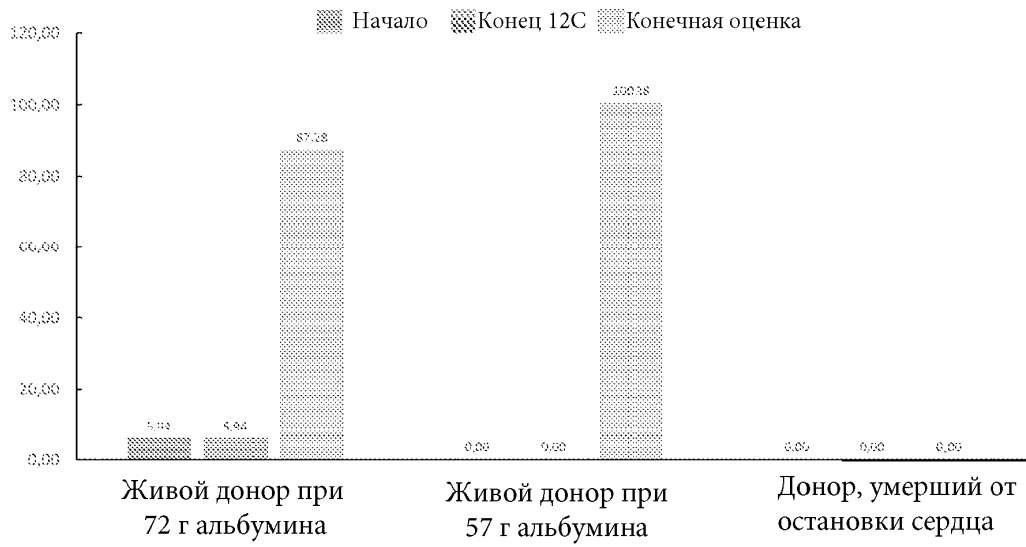
Изменения уровней IL-8



Изменения уровней IL-1β

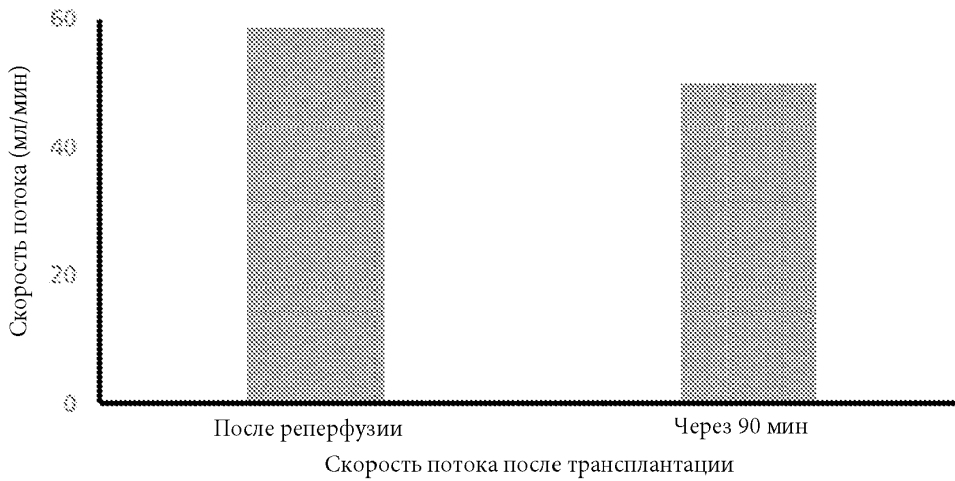


Изменения уровней TNF-α

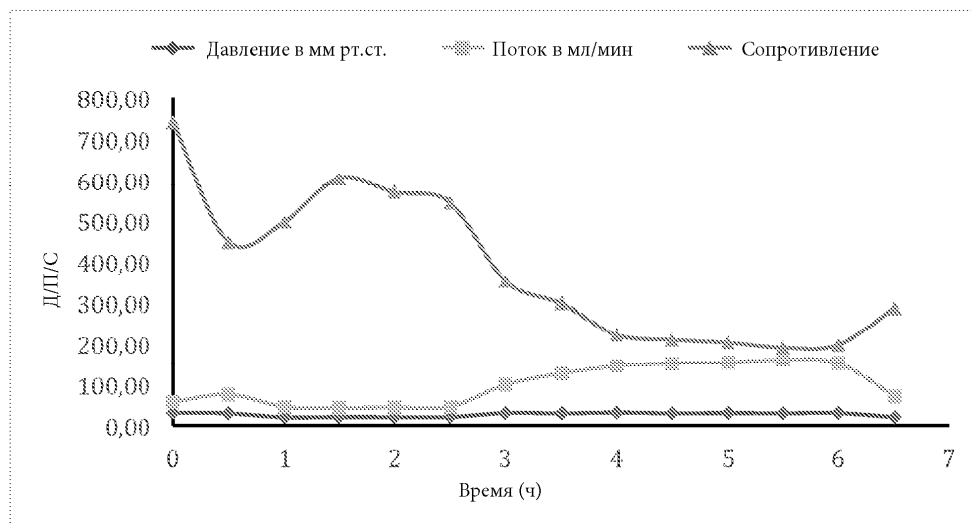


Фиг. 16D

Изменение скорости потока после реперфузии

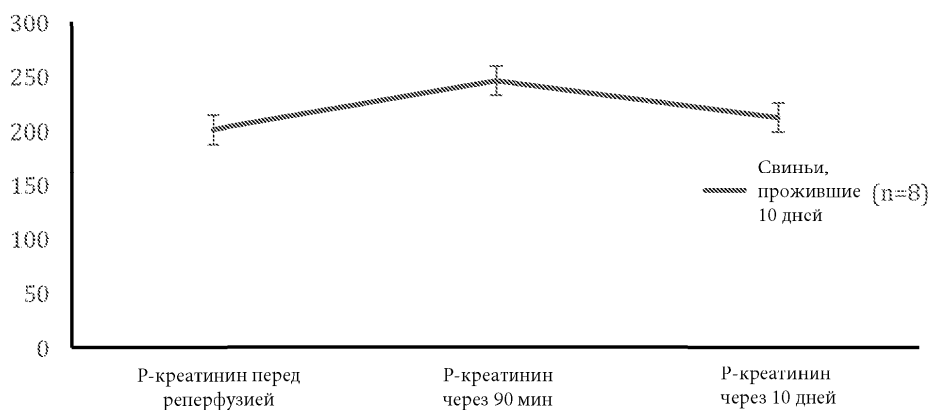


Фиг. 17



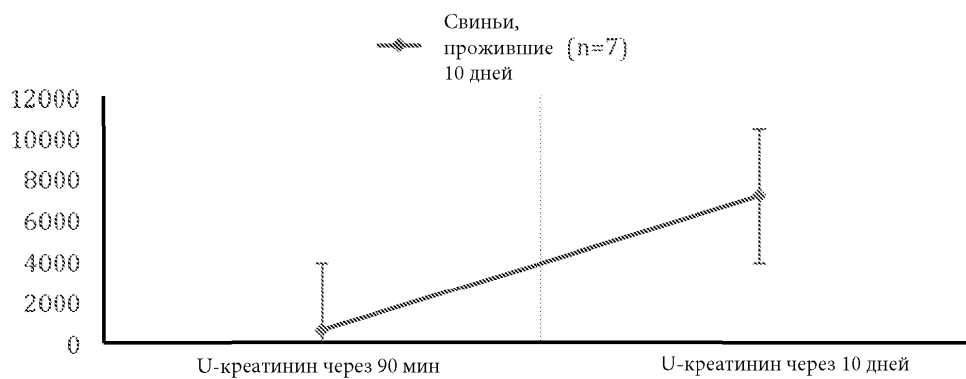
Фиг. 18

Креатинин до и после трансплантации



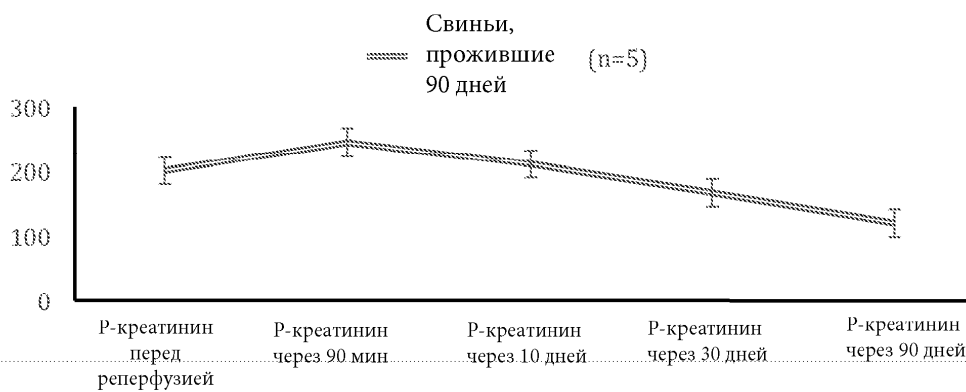
Фиг. 19

Креатинин в моче после трансплантации

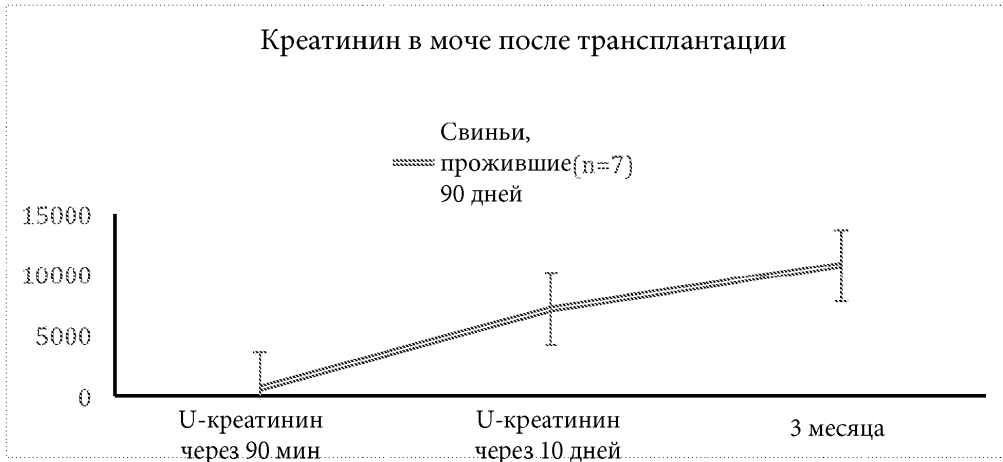


Фиг. 20

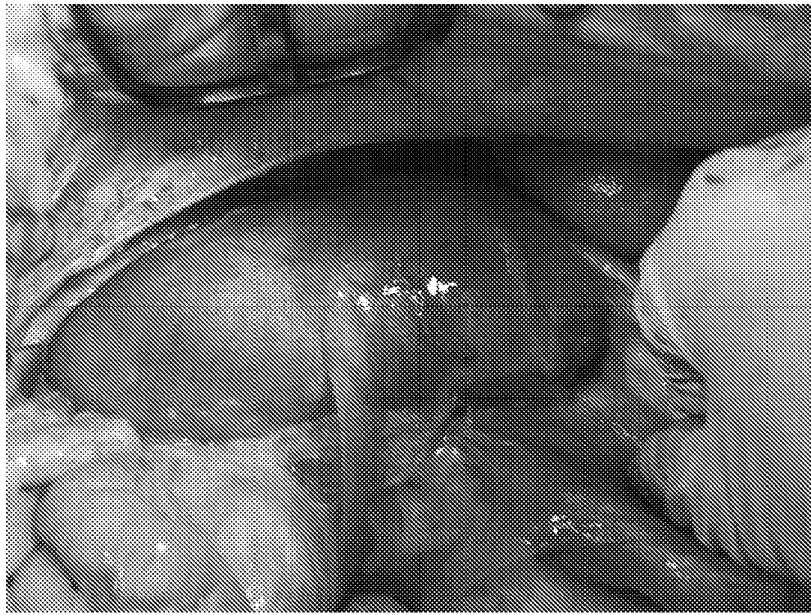
Креатинин до и после трансплантации



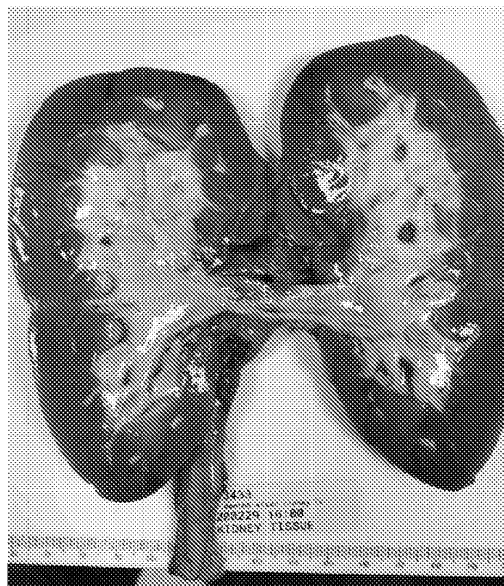
Фиг. 21



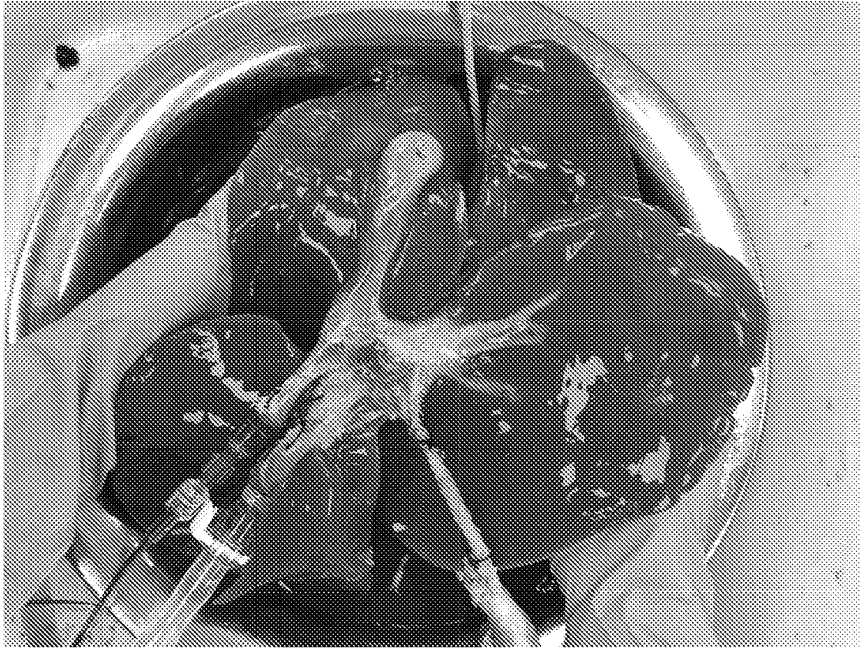
Фиг. 22



Фиг. 23



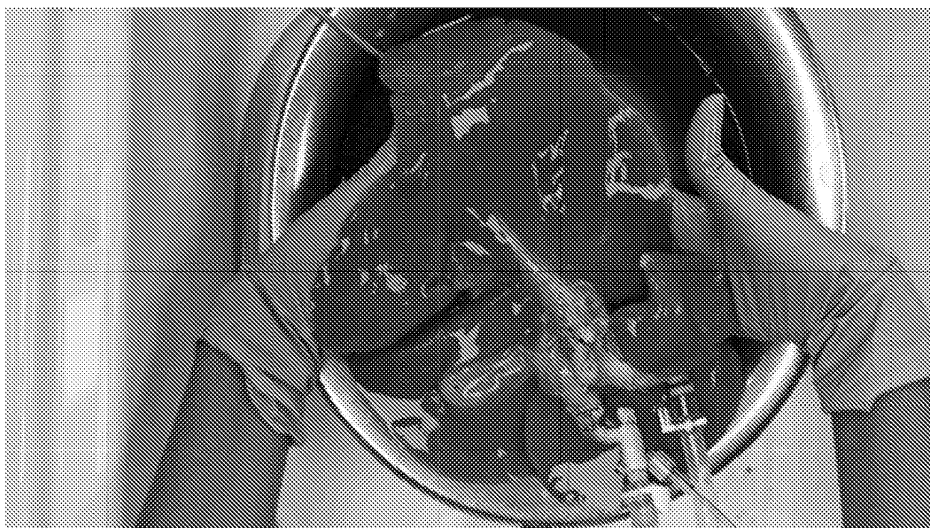
Фиг. 24



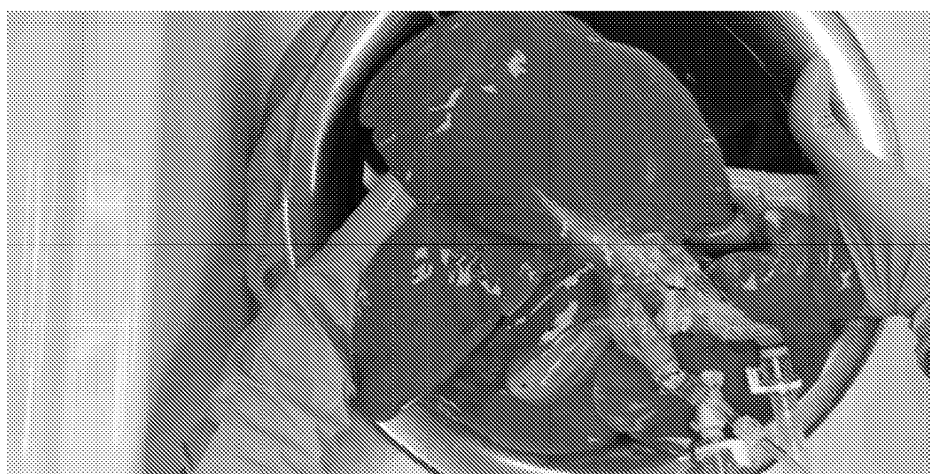
Фиг. 25



Фиг. 26

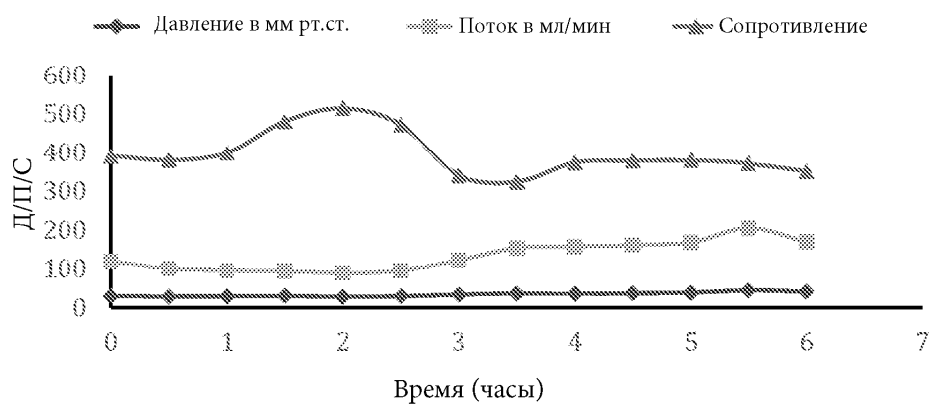


Фиг. 27



Фиг. 28

С раствором, в случае смерти от остановки
кровообращения



Фиг. 29



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2