© Коллектив авторов, 2010
УДК 616.61-089.843:616.61-005.4-08:616.12-78

О.Н. Резник, А.Е. Скворцов, А.Н. Ананьев, И.В. Логинов, С.Ф. Багненко

НОРМОТЕРМИЧЕСКАЯ ПЕРФУЗИОННАЯ РЕАБИЛИТАЦИЯ ДОНОРСКИХ ОРГАНОВ IN SITU ПОСЛЕ 90-МИНУТНОЙ ПЕРВИЧНОЙ ТЕПЛОВОЙ ИШЕМИИ

ГУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт скорой помощи им. И.И.Джанелидзе»
(дир. — чл.-кор. РАМН проф. С.Ф.Багненко)

Ключевые слова: аппаратная перфузия, реабилитация донорских органов, трансплантация почек, асистолические доноры.

Введение. На этапе разработки хирургической техники и решения вопроса преодоления тканевой совместимости трансплантологи преодолевали естественные и решаемые проблемы, которые закономерно проходит каждое новое направление. Оказалось, что дальнейшее развитие трансплантологии как науки и практического вида хирургической помощи, полностью зависит от достаточного числа донорского материала. Дефицит донорских органов как основная проблема современной трансплантологии характеризуется неуклонным ростом разницы между потребностью в донорских органах и числом пациентов, нуждающихся в пересадке, и, как следствие, носит глобальный характер [5, 27] и ограничивает доступность трансплантаций.

На начальных этапах развития трансплантации гарантия положительного исхода пересадок обеспечивалась идеальным качеством донорского органа и самого донора. По понятным причинам все трансплантаты не могут быть идеального качества, и с середины 90-х годов появляются критерии отбора и приемлемости трансплантатов, изменяется стратегия их дооперационной селекции, заготовки, распределения и консервации. Недостаточное количество доноров со смертью мозга и возрастающая потребность в донорских органах в целом создают в настоящее время предпосылки для использования альтернативных источников донорских органов [8, 9, 12, 14]. В литературе такие органы также называют «organs from the expanded criteria donors» или «органы от доноров с необратимой остановкой сердечной деятельности», или «асистолических доноров» (АСД) [6, 28].

Наиболее важными являются разработанные критерии асистолических доноров и их классификация, принятая в Маастрихте в 1993 г. [20, 21] на Европейском съезде трансплантологов, посвященном проблеме получения донорских органов от пациентов с необратимой остановкой кровообращения: смерть до прибытия в стационар — I категория; безуспешная реанимация в стационаре — II категория; ожидаемая (контролируемая) остановка сердечной деятельности — III категория; остановка сердца при установленном диагнозе смерти мозга — IV категория. Критерии классификации определяют врачебную тактику, этические и другие аспекты обеспечения изъятия органов [21]. Доноров I, II и IV категорий принято считать «неконтролируемыми», III — «контролируемыми». Это означает, что каждая категория доноров предопределяет свой алгоритм действий персонала, хотя он может и отличаться в деталях в зависимости от места действия эксплантационных бригад (смерть донора в стационаре, в отделении интенсивной терапии и т.д.), трансплантационного центра и страны [13, 28].

Потенциал доноров с остановившимся сердцем оценивается исследователями следующим образом: Terasaki (цит. по [24]) считает, что увеличение числа таких доноров в год до 700 приведет за 14 лет к дополнительным 10 000 пересадкам почек, H.Nathan и соавт. в 1991 г. считали (цит. по [20, 24]), что ежегодно в донорском ареале Pennsylvania DSA можно идентифицировать до 4,5 тыс. доноров в год.

В контексте развития трансплантологической помощи в России, наряду с увеличением числа доноров со смертью мозга, перспективным представляется работа с донорами с внезапной необратимой остановкой кровообращения, т.е. «неконтролируемых» доноров» (I и II класс асистолических доноров по Маастрихтской клас-

сификации [21]), появляющихся вне и в пределах стационара до момента оповещения трансплантационной службы.

Решающее значение при использовании данной категории доноров имеют время первичной тепловой ишемии, время, прошедшее от остановки кровообращения до начала консервации, «время без кровообращения», предопределяющее последующий каскад ишемически-реперфузионных повреждений трансплантатов [19, 30]. Эту модель М.В.Гринёв [2] считает наиболее демонстративным примером механизма развития критических состояний. Автор указывает, что «…при этом опасность развития необратимых процессов…и функциональных расстройств… создается не только ишемией, но и следующей за ней реперфузией после подключения трансплантата к кровотоку, что усложняет restitutio ad integrum…».

Отсутствие почечного кровотока, недостаток кислорода приводят к прекращению аэробного окисления глюкозы и жирных кислот, дефосфориляции нуклеотидов и катаболизм аденозинмонофосфата до аденозина, инозина и гипоксантина, происходит истощение всего пула нуклеотидов [3, 16], что ведет к угнетению деятельности калий-натриевой помпы, — нарушается внутриклеточный баланс жидкостей и ионов. Возникают отек и набухание клетки, а возрастание концентрации внутриклеточного кальция активирует фосфолипазу А, лизирующую клеточные мембраны. Возрастает концентрация лактата и других недоокисленных продуктов вследствие возникающего анаэробного гликолиза, что также приводит к снижению клеточного pH и нарушению целости лизосомальных мембран с высвобождением лизосомальных ферментов. В течение нескольких минут в ишемизированных тканях накапливается большое количество гипоксантина (продукта распада АТФ) и ксантиноксидазы, из которых после запуска кровотока под катализирующим влиянием высвобожденных молекул железа и меди, и ионов кальция происходит интенсивное образование активных форм кислорода, супероксид анион-радикалов, синглетного кислорода, радикалов гидроксила, являющихся основными повреждающими агентами для клеточных мембран и структур [19].

При определении характера нашего исследования основное внимание уделялось ведущей роли лейкоцитарной агрессии и лейкоцитарно-эпителиальной адгезии в ишемически-реперфузионном повреждении трансплантата при критической тепловой ишемии у доноров [15, 23, 25]. Роль лейкоцитов при ишемии-реперфузии достаточно полно изучалась кардиохирургами [10, 18], в то время как большинство публикаций трансплантологов посвящены вопросам сохранения и поддержания обмена веществ в удаленном из тела донора органе [26, 30]. Взаимосвязь между ишемией и причинами адгезии лейкоцитов к эндотелию показана в недавней публикации M. Figura и соавт. [11]. Показано, что при гипоксии происходит угнетение калиевых каналов (АТФ-регулируемые калиевые каналы), вызывающее ионный дисбаланс, что приводит к активации SAPK/JNK (стресс-активируемая протеинкиназа/киназа NH2-конца c-Jun). Активированная SAPK/JNK вызывает перемещение телец Weibel—Palade к поверхности эндотелия и к выбросу из них кластеров E- и P- селектинов. Селектины связываются с лигандами на поверхности лейкоцитов, приводя к замедлению скорости их перемещения, роллингу и последующей адгезии к стенкам сосудов [11]. Кроме того, в условиях гипоксии и прекращении продукции АТФ нарушается работа и других мембранных АТФ-зависимых ионных каналов, что приводит к резкой деполяризации и дезинтеграции мембран клеток, ведущих к отеку и набуханию эндотелиоцитов, что вызывает также блок микроциркуляции [3, 19].

Идея использования экстракорпоральной перфузии изолированного абдоминального региона с трансмембранной оксигенацией не нова [22, 31], однако ее авторы применяют низкотемпературные режимы перфузии либо не учитывают ключевую роль лейкоцитов в развитии ишемически-реперфузионных повреждений. В литературе есть только две работы M. Nicholson [4, 24], в эксперименте показывающие важную роль удаления лейкоцитов при проведении перфузии почечных трансплантатов цельной кровью [15]. Активно используются лейкоцитарные фильтры для проведения перфузии легких ex vivo, полученных от асистолических доноров, группой исследователей во главе с S.Steen [7, 29]. Работами этих авторов показаны возможность улучшения качества легочного трансплантата с помощью перфузионных технологий и хорошие результаты пересадки таких органов [17]. Группа канадских исследователей проводит длительную «терапевтическую» перфузию уже изъятых у донора с расширенными критериями легких с помощью аппаратной перфузии для улучшения их качества и последующей пересадки [7].

Возможность такого «лечебного» воздействия на донорский орган, на наш взгляд, определяется тем, что основной причиной необратимых посмертных изменений донорского органа является блок микроциркуляции лейкоцитарными конгломератами, образующимися в агональном периоде донора, при критическом замедлении и

остановке кровотока в тканях. После трансплантации кровотока кровь реципиента не поступает в дистальные, блокированные отделы микроциркуляции органа (no reflow syndrome), возникает шунтирующий кровоток, усугубляющий повреждение [23].

В целом, в доступной литературе нам не удалось найти описание такого метода получения донорских органов, при котором попытка не сохранения, а восстановления их жизнеспособности после перенесенного длительного периода тепловой ишемии предпринималась бы до осуществления изъятия. Обеспечить такой подход к «лечению и реабилитации» донорских органов может лишь применение перфузионных технологий, сочетающих: 1) нормотермию, как принцип сохранения метаболизма тканей при проведении перфузии их кровью донора; 2) удаление лейкоцитов и их конгломератов из крови донора, как основного фактора повреждения тканей; 3) проведение перфузии «in situ» до начала изъятия в теле донора.

При проведении исследования мы рассматривали удаление лейкоцитов при помощи пульсативной перфузии и лейкоцитарного фильтра, включенного в контур экстракорпоральной гемоперфузии, как основной фактор восстановления проходимости русла микроциркуляции. Возобновление снабжения кислородом донорского органа (после «санации» микроциркуляторного русла от лейкоцитарных масс) способно привести к восстановлению его функционального резерва за счет возобновления синтеза АТФ, к восстановлению работы калий-натриевых мембранных насосов, к редукции отека эндотелиоцитов и инактивации молекул адгезии. Эти теоретические предпосылки, данные мировой литературы и собственный опыт применения перфузионных технологий [1] легли в основу разработанного протокола действий с донорами с внезапной необратимой остановкой кровообращения.

Задачи предпринятого исследования — определение максимально приемлемого интервала первичной тепловой ишемии у доноров с необратимой внезапной остановкой кровообращения, разработка оптимального протокола перфузинной консервации органов у данной категории доноров и определение возможности проведения полной перфузионной реабилитации трансплантатов, перенесших ишемическое повреждение.

Материал и методы. Применение данного перфузионного протокола проводилось в соответствии с решением ученого совета СПбНИИСП им.И.И.Джанелидзе № 7 от 30.06.2009 г. о создании научного направления «Использование перфузионных технологий в органном донорстве для клинической трансплантации» и протоколом заседания этического комитета СПбНИИСП им.И.И.Джанелидзе № 6 от 15.07.2009 г. Согласно протоколу решения этического комитета, потенциальными донорами почек, у которых можно выполнять предложенный перфузионный протокол, являются пациенты, погибшие от черепно-мозговой травмы, нарушений мозгового кровообращения, не старше 55 лет, не рассматривавшиеся как потенциальные доноры, с внезапно развившейся остановкой кровообращения, с проведенным полным комплексом мероприятий сердечно-легочной реанимации и при безуспешности последнего, с констатированной смертью. После констатации смерти пациента, заполнения соответствующих документов, согласно протоколу, оповещается трансплантационная служба. Перфузионная и эксплантационная бригады прибывают в стационар, перемещают тело умершего (рассматриваемого теперь как потенциального донора) в операционную, где начинают мероприятия по восстановлению кровообращения в органах брюшной полости с помощью экстракорпорального контура перфузии.

Объектами исследования явились 8 асистолических доноров с внезапной остановкой кровообращения, главной особенностью которых явилось то обстоятельство, что смерть от остановки сердечной деятельности у этих доноров была констатирована до извещения донорской службы о наличии потенциального донора, а изъятие не начиналось до прибытия судебно-медицинского эксперта, что определяло критические сроки первичной тепловой ишемии. Работа с одним донором была остановлена в ходе проведения экстракорпоральной перфузии в связи с выявлением у последнего антител к гепатиту С. Не учитывались данные работы с донором с выраженным атеросклерозом абдоминального отдела

Таблица 1

Характеристики доноров

Доноры	Возраст, лет	Причина смерти	Время тепловой ишемии, мин	Время проведения ЭКНП, мин	Лейкоциты в начале перфузии, $\times 10^9$/л	Лейкоциты в конце перфузии, $\times 10^9$/л
1-й	47	ОНМК	45	120	16	2,4
2-й	22	ЗЧМТ	68	120	19,4	0,4
3-й	55	ЗЧМТ	75	150	21	0,1
4-й	51	ЗЧМТ	78	150	13,4	0,6
5-й	44	ОНМК	90	150	23,6	0,8
6-й	48	ЗЧМТ	91	130	12,3	1,01

Примечание. ЗЧМТ — закрытая черепно-мозговая травма; ОНМК — острое нарушение мозгового кровообращения; ЭКПН — экстракорпоральная нормотермическая перфузия in situ.

аорты, при котором не удалось добиться адекватной перфузии абдоминального региона.

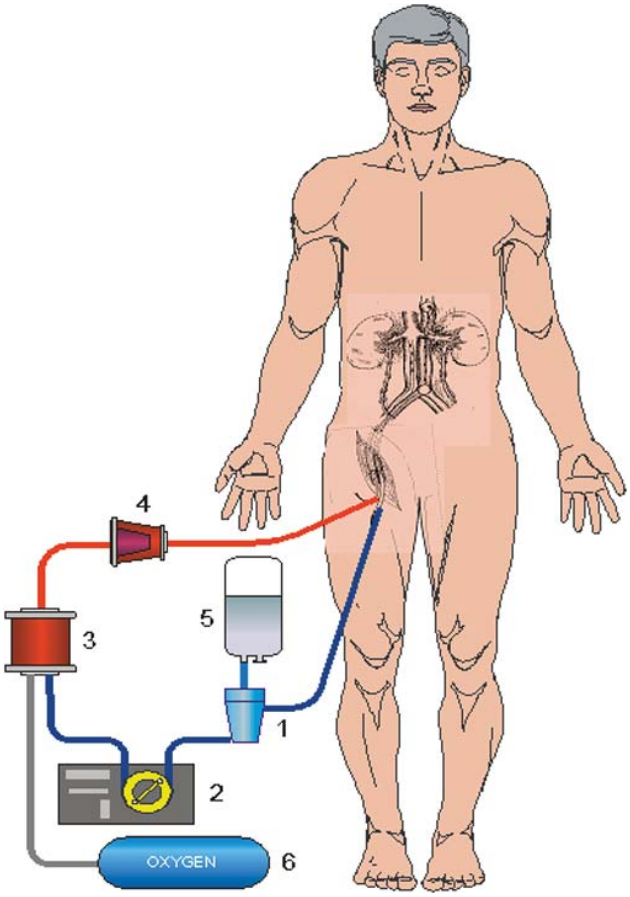
Характеристики доноров приведены в табл. 1. Среди доноров были 2 женщины, 4 — мужчин, средний возраст — (44,5±11,6) года, среднее время первичной тепловой ишемии — (74,5±16,9) мин (45–91 мин), среднее время проведения экстракорпоральной нормотермической перфузии абдоминальных донорских органов in situ с трансмембранной оксигенацией и удалением лейкоцитов составило (136,7±15,1) мин (120–160 мин).

Реципиентами почек стали 12 пациентов, находившихся на заместительной почечной терапии различными видами диализа. Средний возраст пациентов составил (53,3±8,5) лет, 6 — мужчин и 6 — женщин. Типичные операции пересадок почек выполняли реципиентам с письменным заполнением ими бланка информированного согласия в соответствии с решением этического комитета СПбНИИСП им.И.И.Джанелидзе. Схемы иммуносупрессии включали 3 компонента — ингибиторы кальциневрина, препараты микофеноловой кислоты и глюкокортикоиды в стандартных дозах.

Протокол проведения изолированной абдоминальной продолженной нормотермической перфузии in situ с трансмембранной оксигенацией и удалением лейкоцитов из перфузионного контура. Для проведения экстракорпоральной нормотермической перфузии с трансмембранной оксигенацией и удалением лейкоцитов использовали следующие материалы и устройства (рисунок): 1) двухбаллонный трехпросветный катетер, 16F («Balton Ltd.», Польша); 2) фильтр лейкоцитарный Pall, Leukoguard-6 («Палл ГмбХ», Германия); 3) мехатронный перфузионный модуль «МАРС» (Государственный научный центр России «ЦНИИ робототехники и технической кибернетики», Санкт-Петербург); 4) портативный источник кислорода с системой понижающих редукторов (ЗАО «Альтернативная наука», Санкт-Петербург); 5) венозный резервуар емкостью 4,4 л и оксигенатор объемом 280 мл (технические данные: скорость потока 8 л/мин, минимальный рабочий объем 200 мл) для проведения искусственного кровообращения («Gish Vision Biomedical, Inc.», USA); 6) систему экстракорпоральных перфузионных трубок диаметром $^1/_2$ и $^1/_4$ дюйма для проведения искусственного кровообращения («Tianjin Plastics Research Institute», Tianjin, China).

Нормотермическую перфузию проводили модифицированной кровью асистолического донора. Перфузат включал в себя следующие компоненты: 1) кустодиол 2 л; 2) гепарин 25 000 ЕД; 3) стрептокиназа 1,5 млн ЕД; 4) перфторан 400 мл; 5) солумедрол 500 мг; 6) изоптин 5 мг; 7) нитроглицерин 5 мг.

После прибытия трансплантационной хирургической бригады и получения разрешения на изъятие органов от администрации больницы выполняли транспортировку асистолического донора в операционную. Осуществляли доступ к бедренным сосудам справа, в аорту устанавливали трехпросветный двухбаллонный катетер для изоляции бассейна абдоминальной перфузии по общепринятой методике доступом через бедренную артерию, через бедренную вену осуществляли канюляцию нижней полой вены, после чего к артериальному и венозным портам присоединяли перфузионный контур. Первичное заполнение контура выполняли 2 л неохлажденного кустодиола. Начальная скорость потока — 500 мл/мин с увеличением до 1200 мл/мин к середине перфузионного цикла, поток пульсативный, скорость потока кислорода — 200–250 мл/мин, температура раствора — 27–30 °С. Последовательно в контур



Общая схема проведения изолированной абдоминальной продолженной нормотермической перфузии in situ.

1 — резервуар; 2 — мехатронный модуль «МАРС»; 3 — оксигенатор; 4 — лейкоцитарный фильтр; 5 — емкость с раствором кустодиола; 6 — устройство подачи кислорода.

вводили гепарин — 25 000 ЕД, стрептокиназу — 1,5 млн ЕД, перфторан — 400 мл, солумедрол — 500 мг, изоптин — 5 мг, нитроглицерин — 5 мг. Из контура отбирали пробы крови на инфекционную диагностику, содержание газов, биохимические и клинические анализы.

Операцию изъятия органов начинали после прибытия судебно-медицинского эксперта и получения его разрешения на изъятие. Решение о времени начала изъятия принимали также на основании результатов исследования содержания лейкоцитов в перфузионном контуре, при достижение значения в 1×10^9/л и ниже результаты проведения перфузии признавались удовлетворительными. В целом для элиминации лейкоцитов из контура кровообращения было достаточно 120 мин. Операцию эксплантации выполняли при продолжении проведения перфузии, которая заканчивалась непосредственно перед извлечением органов. Как правило, цвет и консистенция органов брюшной полости соответствовали прижизненным, отмечалась перистальтика кишечника и мочеточников в ответ на механические стимулы, у двух доноров было отмечено выделение мочи до 100 мл в ходе выполнения эксплантации. Консервацию органов осуществляли у первых 2 доноров (4 трансплантата) с использованием аппаратной перфузии (LifePort™ , «ORS», USA), в последую-

Таблица 2

Характеристики реципиентов

Реципиенты	Доноры	Возраст реципиента, лет	Функция трансплантата (срок восстановления функции, дни)	Креатинин через 2 нед, ммоль/л	Креатинин через 6 нед, ммоль/л	Креатинин через 3 мес, ммоль/л
1	1а	59	ОФТ (36)	469	213	110
2	1б	61	ОФТ(21)	203	136	128
3	2а	67	НФТ	204	96	85
4	2б	58	НФТ	182	112	105
5	3а	36	НФТ	351	151	153
6	3б	42	НФТ	300	124	115
7	4а	55	ОФТ(4)	346	146	173
8	4б	49	НФТ	256	118	101
9	5а	53	ОФТ(15)	454	124	–
10	5б	49	НФТ	343	115	–
11	6а	52	ОФТ(12)	673	153	–
12	6б	59	ОФТ(18)	545	204	–

Примечание. Реципиенты в соответствии с порядковым номером и порядковым номером донора; ОФТ — отсроченная функция трансплантата; НФТ — немедленная функция трансплантата.

щем от ее применения решено было воздержаться в связи с объективизацией состояния почечных трансплантатов в ходе проведения операции эксплантации.

Результаты и обсуждение. Сроки наблюдения результатов пересадок почек от доноров с критическим временем первичной тепловой ишемии, полученных с использованием описанного протокола, ограничиваются у 8 реципиентов 3 мес, у 4 — 6 нед после выполненных пересадок. У 50% реципиентов наблюдалась немедленная функция трансплантата. Сводные данные, характеризующие реципиентов и течение послеоперационного периода, представлены в табл. 2.

Среднее время восстановления функции трансплантатов у реципиентов с отсроченной функцией составило (17,7±10,7) дня (4–36 дней). Среднее значение креатинина к 6-й неделе после трансплантации составило (141±35,8) ммоль/л — у 12 реципиентов, к 3-му месяцу после трансплантации — (121,3±28,9) ммоль/л — у 8.

Представленные результаты применения экстракорпоральной нормотермической изолированной абдоминальной гемоперфузии in situ с трансмембранной оксигенацией и удалением лейкоцитов являются предварительными и требуют дальнейшего анализа и сравнения с другими категориями доноров и реципиентов. Данный протокол представляется перспективным, так как позволяет использовать почки от доноров с временем первичной тепловой ишемии до 90 мин.

Выводы. 1. Для трансплантации могут успешно использоваться почки от асистолических доноров с первичной тепловой ишемией до 90 мин.

2. При получении для трансплантации почек от доноров с внезапной необратимой остановкой кровообращения и длительным периодом первичной тепловой ишемии методом выбора является продолженная изолированная абдоминальная нормотермическая перфузия с трансмембранной оксигенацией и удалением лейкоцитов из перфузионного контура in situ (в теле донора, до выполнения эксплантации).

3. Применение изолированной абдоминальной нормотермической перфузии с трансмембранной оксигенацией и удалением лейкоцитов из перфузионного контура in situ позволяет достичь полной реабилитации функционального резерва почечных трансплантатов и результатов трансплантаций, сопоставимых с результатами, полученными при работе с органами от доноров со смертью мозга.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Багненко С.Ф. Мойсюк Я.Г., Резник О.Н и др. Аппаратная перфузия почечных трансплантатов: эволюция представлений о технологии, собственные практические результаты и перспективы применения // Вестн. трансплантологии и искусственных органов.—2008.—№ 2.—С. 21–31.
2. Гринёв М.В. Патогенетические аспекты критических состояний в неотложной хирургии // Вестн. хир.—2009.—№ 1.—С. 9–13.
3. Иванов К. П., Мельникова Н. Н. Роль лейкоцитов в динамике микроциркуляции в норме и при патологии // Журн. общ. биол.—2004.—№ 3.—С. 3–13.
4. Bagul A., Hosgood S.A., Nicholson M. et al. Experimental renal preservation by normothermic resuscitation perfusion with antologous blood // Brit. J. Surg.—2008.—Vol. 95.—P. 111–118.
5. Cantarovich F. Public opinion and organ donation suggestions for overcoming barriers // Ann. Transplant.—2005.—Vol. 10, № 1.—P. 22–25.
6. Chang G. J. Mahanty H.D., Ascher N.L. et al. Expanding the donor pool: can the Spanish model work in the United States? // Am. J. Transplant.—2003.—Vol. 3, № 10.—P. 1259–1263.
7. Cypel M., Rubacha M., Yeung J. et al. Normothermic ex vivo perfusion prevents lung injury compared to extended cold preservation for transplantation // Am. J. Transplant.—2009.—Vol. 9, № 10.—P. 2262–2269.
8. D'Alessandro A.M., Hoffmann R.M., Belzer F.O. et al. Non-heart-beating donors: one response to the organ shortage // Transplant. Rev.—1995.—Vol. 9.—P. 168–176.
9. Delmonico F. L., Harmon W. E. Use of expanded criteria donors in solid organ transplantation // Cur. Opinion Organ Transplant.—2000.—Vol. 5, № 3.—P. 227–231.
10. De Vries A. J., Gu Y.J., Post W.J. et. al. Leucocyte depletion during cardiac surgery: a comparison of different filtration strategies // Perfusion.—2003.—Vol. 18.—P. 31.