

## **Płyn do perfuzji i prezerwacji narządów i sposób jego wytwarzania**

Przedmiotem wynalazku jest płyn do perfuzji i prezerwacji narządów i tkanek znajdujący zastosowanie do pobierania, płukania i przechowywania narządów i tkanek przeznaczonych do przeszczepień i sposób jego wytwarzania.

5           Znane są płyny do pobierania, perfuzji i prezerwacji narządów typu wewnątrzkomórkowego zawierające w składzie wysokie stężenie potasu, magnezu, fosforanów lub typu zewnątrzkomórkowego zawierające wysokie stężenie jonów sodowych, chlorków, a niskie stężenie jonów potasowych. W skład płynów wchodzi także substancje  
10           osmotycznie i onkotycznie czynne w postaci hydroksyetylowanej skrobi, dekstranu, polietylenoglikolu, rafinozy, sacharozy czy mannitolu, zapobiegające obrzękowi komórek oraz przestrzeni zewnątrzkomórkowej, układy buforujące w postaci fosforanów, węglanów utrzymujące wartość pH w granicach 7,2 – 7,5, substancje  
15           będące źródłem energii w postaci glukozy, fruktozy, sacharozy, substraty ATP w postaci adenozyiny, adeniny, rybozy, antyoksydanty np. glutation, witaminy C i E, cysteina i jej pochodne, a także hormony – insulina, deksametazon, tyroksyna.

          Znany z opisu patentowego nr PL205012 płyn do perfuzji,  
20           prezerwacji i reperfuzyji narządów i tkanek zawiera w składzie dekstran 70, glukozę, cytrynian trisodu, edytynian sodu, chlorek potasu, fumaran magnezu, wodorowęglan sodu, chlorek wapnia jest płynem zewnątrzkomórkowym zawiera bowiem 110 mmoli jonów sodowych i 10 mmoli jonów potasowych o osmolarności 330 mOsm/l oraz pH 7,4.

Jako substancję stymulującą skuteczne działanie płynu zawiera prolaktynę świńską w ilości 50 – 5000 µg/litr.

Znany jest również komercyjny preparat o nazwie Biolasol (Biocheffa, Polska) zawierający w składzie dekstran 70 kDa – 0,7 mmol; glukozę  
5 bezwodną – 167 mmol; cytrynian tri-sodu dwuwodny – 30 mmol; edetynian di-sodu – 5 mmol; chlorek potasu – 10 mmol; fumaran magnezu czterowodny – 5 mmol; wodorowęglan sodu – 5 mmol; chlorek wapnia sześciowodny – 0,5 mmol.

Płyn do perfuzji i prezerwacji narządów i tkanek według wynalazku  
10 zawiera dekstran 70 kDa, glukozę, cytrynian trisodu, edetynian disodu, chlorek potasu, fumaran magnezu, wodorowęglan sodu, chlorek wapnia oraz substancję stymulującą wybraną spośród rekombinowanej ludzkiej somatotropiny, ludzkiej choriogonadotropiny albo prolaktyny w ilości od 0,01 do 49 µg/litr oraz albuminę w ilości od 1 do 100 mg/litr. Korzystnie,  
15 płyn zawiera ludzką rekombinowaną somatotropinę w ilości od 0,1 do 10 µg/litr i/lub ludzką albuminę w ilości od 1 do 100 mg/litr. Zawartość ludzkiej rekombinowanej prolaktyny wynosi korzystnie od 0,01 do 10 µg/litr płynu, a jeszcze korzystniej od 0,1 do 5 µg/litr płynu. Prolaktyna świńska może znajdować się w płynie w ilości od 0,1 do 50 µg/litr płynu,  
20 a korzystniej w ilości od 0,5 do 5 µg/litr płynu, przy czym w tym korzystnym przykładzie wykonania zawartość albuminy wynosi od 5 do 50 mg/litr płynu. Korzystna zawartość ludzkiej choriogonadotropiny wynosi od 0,01 do 10 µg/litr płynu, a bardziej korzystnie od 0,1 do 5 µg/litr płynu przy czym w tym korzystnym przykładzie wykonania  
25 dodatek albuminy wynosi od 5 do 50 mg/litr płynu, a dekstranu 70 od 5,0 do 25 g/litr.

Sposób wytwarzania płynu do perfuzji i prezerwacji narządów i tkanek według wynalazku polega na rozpuszczeniu składników w wodzie do iniekcji, w warunkach zapewniających jałowość i nieobecność endotoksyn, doprowadzeniu roztworu do wartości pH 7,1-7,5, korzystnie przez dodanie wodorotlenku sodu lub wodorotlenku potasu lub kwasu solnego, oraz poddanie roztworu sterylnej filtracji. Tak sporządzony płyn przechowuje się w warunkach chroniących przed światłem w temperaturze 2 – 8°C w ciągu 24 miesięcy lub w temperaturze 12 – 25°C w ciągu 12 miesięcy. Osmolarność płynu wynosi od 290 do 340 mmoli/l.

10 Zaletą wynalazku jest zmniejszenie stosowanego stężenia hormonu do 0,1 – 1 µg/litr płynu, a także zapewnienie trwałości substancji stymulującej w płynie oraz skuteczności jej działania leczniczego dzięki zastosowaniu w składzie albuminy.

Wstępne doniesienia wskazują, że terapia substancją stymulującą wybraną spośród rekombinowanej ludzkiej somatotropiny, ludzkiej choriogonadotropiny albo ludzkiej prolaktyny może poprawić regenerację wątroby oraz być pomocną przy transplantacji trzustki u chorych na cukrzycę typu I. Badania modelowe na izolowanych nerkach świni wykazały, że wzbogacenie płynu Biolasol – somatotropiną w połączeniu z albuminą zwiększa skuteczność perfuzji i prezerwacji nerek, w tym zmniejsza obrzęk narządu o 11%, zwiększa zdolność komórek do transportu glukozy. Jednocześnie w procesie perfuzji obserwuje się spadek stężenia enzymów (ALT, AST, LDH) uwalnianych po destrukcji narządu jako skutek jego niedokrwienia i niedotlenienia. Po zastosowaniu somatotropiny, obniżenie uwalnianych enzymów będących również enzymami mitochondrialnymi, świadczy o zachowaniu integralności błon tych organelli co umożliwia przywrócenie

15

20

25

funkcji narządu po jego wszczepieniu dawcy. Dodatek hormonu polepsza dynamikę płukania pobranego narządu. Drożność naczyń zostaje zachowana. Ponadto somatotropina sprzyja wewnątrzkomórkowemu mechanizmowi ochrony niedotlenionych komórek przed destrukcyjnym działaniem enzymów i oksydantów. Zastosowanie somatotropiny: leczenie substytucyjne karłowatości przysadkowej, przyspieszenie gojenia ran pooperacyjnych, leczenie odleżyn, poparzeń, złamania kości, zespół Turner'a i w wieku podeszłym. Somatotropina jest swoista gatunkowo, współdziała z IGF-1. Aktywność biologiczna somatotropiny – 5 IU/mg; a 1 IU hGH = 200 µg. Somatotropina wpływa na przemianę białek, węglowodanów, lipidów, nukleotydów, przemianę mineralną, a w szczególności w kościach. Zwiększa przyswajanie fosforanów, sodu, potasu i chloru. Odkłada wapń w kościach. Zmniejsza zużycie glukozy, wzmacnia lipolizę, pobudza diurezę, zwiększa wydzielanie insuliny, pobudza wydzielanie mleka i spermatogenezę.

Zaletą płynu jest zwiększona funkcjonalność płynu w prezerwacji narządów oraz większe bezpieczeństwo stosowania dla biorcy narządów.

Skuteczność proponowanych rozwiązań polegająca na dodaniu do płynu niskiego stężenia substancji stymulującej wybranej spośród somatotropiny, choriogonadotropiny albo prolaktyny oraz niskiego stężenia albuminy pokazano w badaniach modelowych na izolowanych nerkach w obniżeniu uwalniania wybranych markerów oraz zmniejszeniu obrzęku narządu. Skuteczność opracowanej modyfikacji badano w procesie 30 minutowej perfuzji, 24 godzinnej prezerwacji i 30 minutowej reperfuzy płynem Biolasol zawierającym w składzie różne

stężenia somatotropiny lub somatotropiny i albuminy lub różne stężenia albuminy.

Wynalazek przedstawiono w poniższych przykładach wykonania.

Przykład I.

- 5 Do 1 litra płynu Biolasol dodawano ludzka rekombinowana somatotropinę w ilości 1,0  $\mu\text{g}$  lub 0,1  $\mu\text{g}$  lub 0,01  $\mu\text{g}$  lub bez dodatku. Świeżo pobrane nerki preparowano, płukano i przechowywano w płynie Biolasol bez dodatku hormonu (grupa kontrolna) lub płynem zawierającym odpowiednio 1,0  $\mu\text{g}$  somatotropiny na 1 litr (grupa badana
- 10 1) lub 0,1  $\mu\text{g}$  somatotropiny (grupa badana 2) lub 0,01  $\mu\text{g}$  somatotropiny (grupa badana 3), przy czym użyto po sześć nerek w każdej z grup. Próby perfundatów (płynu zebranego podczas płukania nerek) pobierano w czasie: P0; P5 i P30 minut, a następnie po 24 godzinnej przerwy (P24 h) i w czasie reperfuzji (R0 i R30 minut) i w perfundatach oznaczano
- 15 aktywność enzymów: ALT, AST i LDH, stężenie jonów sodu i potasu oraz kreatyninę i wartość pH. Wykazano, że optymalne działanie wywiera dodanie 0,1  $\mu\text{g}$  somatotropiny do płynu Biolasol, w tym obniżenie wszystkich parametrów badanych markerów co świadczy o skuteczności dodania somatotropiny do płynu Biolasol. Wyniki
- 20 zestawiono w tabeli 1.

Tabela 1. Wpływ dodatku somatotropiny do płynu Biolasol na wybrane markery w perfundatach nerek

PŁYN BIOLASOL + 1,0 $\mu\text{g/l}$ SOMATOTROPINY							
Czas	ALT [U/l]	AST [U/l]	LDH [U/l]	Kreatynina [mg/dl]	Na [mmol/l]	K [mmol/l]	pH

P0'	33±8	140±2 0	682±21 5	2,8±1,3	67±6	14±2	7,2±0, 1
P5'	39±1 2	66±14	569±25 2	2,3±1,0	72±21	14±4	7,1±0, 1
P30 ,	33±8	36±10	229±12 0	0,4±0,2	65±6	11±1	7,3±0, 0
P24 h	40±1 1	27±8	169±98	0,4±0,2	100±8	11±1	7,4±0, 0
R0'	67±9	90±32	360±48	0,3±0,1	118±8	13±1	7,2±0, 1
R30 ,	58±7	42±11	1186±3 63	0,3±0,3	128±14	14±3	7,4±0, 0
PŁYN BIOLASOL + 0,1 µg/l SOMATOTROPINY							
Cza s	ALT [U/l]	AST [U/l]	LDH [U/l]	Kreatyni na [mg/dl]	Na [mmol/l]	K [mmo l/l]	pH
P0'	36±7	44±7	521±44 3	4,6±5,1	60±10	13±2	7,2±0, 1
P5'	35±1 2	59±17	399±17 8	2,8±2,3	59±8	11±2	7,1±0, 1
P30 ,	23±1 1	32±23	193±12 5	0,3±0,3	53±4	10±2	7,3±0, 1
P24 h	29±8	35±10	119±27	0,5±0,1	131±17	12±2	7,5±0, 1
R0'	33±9	48±24	630±34 0	0,8±0,7	137±18	14±2	7,2±0, 0

R30	23±1	38±21	324±83	0,2±0,1	135±9	14±4	7,4±0,1
0							
PŁYN BIOLASOL + 0,01 µg/l SOMATOTROPINY							
Czas	ALT [U/l]	AST [U/l]	LDH [U/l]	Kreatynina [mg/dl]	Na [mmol/l]	K [mmol/l]	pH
P0'	22±1	25±5	393±20	2,4±0,3	115±5	13±3	7,3±0,1
	0		7				
P5'	87±6	60±16	395±24	2,5±0,6	120±10	12±2	7,3±0,1
			8				
P30	34±1	28±4	177±11	1,9±0,5	124±18	13±2	7,3±0,1
0			9				
P24h	56±1	41±11	164±61	1,8±0,3	116±10	13±2	7,5±0,0
	9						
R0'	27±4	29±7	497±18	0,8±0,1	130±15	13±4	7,3±0,1
			3				
R30	27±3	22±6	274±10	0,6±0,1	107±32	10±1	7,3±0,1
0			4				

### Przykład II.

Do płynu Biolasol dodawano ludzką rekombinowaną somatotropinę (rh-GH) w ilości 1,0 µg/l (grupa badana 1) lub mieszaninę somatotropiny w 5 1,0 µg/l i 10 mg/l albuminy (grupa badana 2) lub Biolasol bez dodatków (grupa kontrolna). Świeżo pobrane nerki od świń (w rzeźni) płukano schłodzonym do temperatury 4°C odpowiednim płynem. Perfundaty pobierano po czasie: P0; P5 i P30 minut po perfuzji, po 24 godzinach prezerwacji w temperaturze 4°C oraz w czasie reperfuzy: R0 i R30 minut.

W perfundatach oznaczano wartość pH, aktywność enzymów ALT, AST, LDH oraz stężenie jonów sodu i potasu. Masę nerek określano przed perfuzją i po reperfuzji w celu określenia wielkości obrzęku. Uzyskane wyniki wskazują, że zastosowanie do perfuzji i prezerwacji nerek mieszaniny somatotropiny z albuminą jest najbardziej skuteczne. Obrzęk nerek w badanej grupie 2 wynosił tylko 27%. Zawartość uwolnionego enzymu AST obniżyła się do 14,4%, a LDH do 22,8%. Stężenie sodu i potasu oraz wartość pH nie ulegały istotnym statystycznie zmianom. Uzyskane wyniki zestawiono w tabelach 2 - 8

10 Tabela 2. PŁYN BIOLASOL + SOMATOTROPINA + ALBUMINA (obrzęk nerek)

Czas	Biolasol	+ 1µg/l rh-GH	+ 1µg/l rh-GH + 10 mg/l Albumina
Obrzęk [%]	39±21	45±2	28±9

Tabela 3. PŁYN BIOLASOL + SOMATOTROPINA + ALBUMINA (ALT)

Czas	Biolasol	+ 1µg/l rh-GH	+ 1µg/l rh-GH + 10 mg/l Albumina
P0'	4,0±1,0	8,5±2,5	4,4±3,2
P5'	4,3±3,0	3,5±1,4	5,5±4,3
P30'	3,4±1,0	2,6±0,5	5,6±3,1
P24 h	2,9±1,4	7,7±6,7	6,2±1,2

R0'	13,5±1,5	14,4±2,1	4,8±2,0
R30'	15,0±2,4	13,4±9,8	4,1±1,2

5 Tabela 4. PŁYN BIOLASOL + SOMATOTROPINA + ALBUMINA (AST)

Czas	Biolasol	+ 1µg/l rh-GH	+ 1µg/l rh-GH + 10 mg/l Albumina
P0'	38,0±21,0	58,8±25,7	55,9±30,8
P5'	22,0±10,7	17,0±8,5	30,0±24,1
P30'	9,2±4,5	5,7±2,8	13,6±12,6
P24 h	11,5±7,4	12,8±1,0	15,3±1,0
R0'	29,4±2,3	39,8±20,0	33,4±9,0
R30'	26,5±3,3	71,1±50,6	8,2±6,4

Tabela 5. PŁYN BIOLASOL + SOMATOTROPINA + ALBUMINA (LDH)

Czas	Biolasol	+ 1µg/l rh-GH	+ 1µg/l rh-GH + 10 mg/l Albumina
P0'	574±120	482±102	514±255
P5'	478±204	512±181	264±129

P30'	364±92	245±81	150±104
P24 h	354±144	459±42	194±117
R0'	603±279	587±113	321±96
R30'	293±220	553±166	117±1,4

Tabela 6. PŁYN BIOLASOL + SOMATOTROPINA + ALBUMINA  
(JONY SODU)

Czas	Biolasol	+ 1µg/l rh-GH	+ 1µg/l rh-GH + 10 mg/l Albumina
P0'	61,3±15,1	71,2±2,3	51,2±7,3
P5'	59,1±10,6	70,0±5,5	53,6±10,7
P30'	59,5±14,1	70,9±7,2	58,0±10,7
P24 h	58,0±12,3	66,1±8,4	58,5±8,8
R0'	59,5±10,3	61,3±3,2	53,2±0,5
R30'	59,0±17,2	64,4±3,3	48,7±6,1

5 Tabela 7. PŁYN BIOLASOL + SOMATOTROPINA + ALBUMINA  
(JONY POTASU)

Czas	Biolasol	+ 1µg/l rh-GH	+ 1µg/l rh-GH + 10 mg/l Albumina
P0'	4,6±1,8	4,9±0,4	5,6±1,2
P5'	4,2±1,1	3,7±0,3	4,4±0,7
P30'	3,6±1,2	3,5±0,3	3,9±0,8
P24 h	4,8±1,8	4,2±0,6	4,4±0,5

R0'	5,4±0,8	4,4±0,5	5,7±0,9
R30'	4,0±1,1	4,1±0,5	3,7±0,6

Tabela 8. PŁYN BIOLASOL + SOMATOTROPINA + ALBUMINA  
(WARTOŚĆ pH)

Czas	Biolasol	+ 1µg/l rh-GH	+ 1µg/l rh-GH + 10 mg/l Albumina
P0'	6,9±0,2	6,8±0,1	7,2±0,1
P5'	6,8±0,2	6,8±0,0	7,0±0,1
P30'	7,1±0,5	7,1±0,1	6,9±0,1
P24 h	6,9±0,3	7,1±0,2	6,9±0,0
R0'	6,6±0,4	6,7±0,0	6,8±0,1
R30'	6,9±0,5	6,9±0,1	6,9±0,0

### 5 Przykład III.

Do płynu Biolasol dodawano albuminę ludzką w ilości 1,0 mg/l płynu lub 10 mg/l lub 100 mg/l lub płyn bez dodatku albuminy (grupa kontrolna). Po procedurze płukania i 24 godzinnej przerwy nerek świńskich (przygotowanych zgodnie z metodyką) oznaczano zmiany masy nerek. Stwierdzono, że najmniejszy obrzęk (45%) uzyskano przy płukaniu i przechowywaniu nerek w płynie z albuminą w stężeniu 10 mg/l płynu. Uzyskane wyniki były istotnie znamienne statystycznie. Również szybkość płukania nerek była najszybsza co świadczy o dobrych parametrach płynu. Optymalne były także wartość pH i

osmolarności przy zawartości albuminy na poziomie 10 mg/l płynu Biolasol. Uzyskane wyniki zestawiono w tabelach 9 – 11.

Tabela 9. PŁYN BIOLASOL + ALBUMINA (obrzęk nerek)

Czas	Biolasol	+ 1 mg/ml Albumina	+ 10 mg/ml Albumina	+ 100 mg/ml Albumina
Obrzęk [%]	66±16	53±21	45±15	67±20

- 5 Tabela 10. PŁYN BIOLASOL + ALBUMINA (wartość pH perfundatów)

Czas	Biolasol	+ 1 mg/ml Albumina	+ 10 mg/ml Albumina	+ 100 mg/ml Albumina
P0'	7,4±0,3	7,3±0,2	7,5±0,4	6,9±0,1
P5'	7,4±0,2	7,3±0,2	7,3±0,3	7,0±0,1
P30'	7,6±0,2	7,5±0,2	7,5±0,3	7,2±0,1
P24 h	7,4±0,1	7,4±0,1	7,2±0,2	7,0±0,1
R0'	7,2±0,3	7,1±0,1	7,4±0,5	6,8±0,1
R30'	7,5±0,1	7,4±0,2	7,4±0,3	7,1±0,1

Tabela 11. PŁYN BIOLASOL + ALBUMINA (osmolarność)

Czas	Biolasol	+ 1 mg/ml Albumina	+ 10 mg/ml Albumina	+ 100 mg/ml Albumina
P0'	347±5	348±9	351±3	350±13
P5'	340±12	338±5	341±5	344±8
P30'	334±5	335±3	339±3	339±5

P24 h	336±4	337±2	340±4	323±22
R0'	347±6	346±5	346±6	334±16
R30'	332±3	334±3	333±5	332±4

#### Przykład IV.

Badano dynamikę zmian zawartości ludzkiej rekombinowanej somatotropiny (rh-GH) dodanej do płynu Biolasol (grupa kontrolna) lub rh-GH z ludzką albuminą odpowiednio w ilości 1 µg/l rh-GH i 10 mg/l ludzkiej Albuminy (grupa badana) w procesie 30 minutowej perfuzji, 24 godzinnej przerwy i 30 minutowej reperfuzy świńskich izolowanych ex vivo nerek przygotowanych jak opisano w przykładzie I. Zawartość rh-GH oznaczano metodą IRMA przy czułości metody 100 pg/ml.

Wykazano, że w grupie kontrolnej w procesie perfuzji wchłania się tylko ~14% hormonu, a w grupie badanej ponad 87%. Po 24 godzinach przerwy wchłania się w grupie kontrolnej poniżej 1% rh-GH, a w grupie badanej 91% tego hormonu. W czasie reperfuzy w grupie kontrolnej wchłanianie hormonu jest na poziomie 60%, a w grupie badanej wynosi 95%. Uzyskane wyniki wskazują, że chociaż rh-GH jest hormonem swoistym gatunkowo to jednak nerka świńska jest zdolna do jego wychwytu szczególnie w obecności ludzkiej albuminy. Uzyskane wyniki zestawiono w tabeli 12.

Tabela 12. Zawartość ludzkiej rekombinowanej somatotropiny (rh-GH) w perfundatach nerek płukanych zmodyfikowanym płynem Biolasol [%]

Czas	+ 1 $\mu\text{g/l}$ rh-GH	+ rh-GH + 10 mg/l ludzkiej Albumina
P0'	100,00	9,03
P5'	88,55	12,58
P30'	96,77	12,10
P24 h	99,35	9,03
R0'	42,74	7,74
R30'	39,35	4,68

#### Przykład V.

18 świeżo pobranych nerek z rzeźni preparowano, płukano i przechowywano w płynie „Biolasol”. Do płynu „Biolasol” dodawano choriogonadotropinę w ilości 1,0  $\mu\text{g/l}$  litr (grupa badana 1) lub 0,1  $\mu\text{g/l}$  litr (grupa badana 2) płynu. Próby perfundatów (z płukania nerek) pobierano w czasie: P0'; P5' i P30', a następnie po 24 h prezerwacji (P24 h), w czasie reperfuzji (R0' i R30'), po 48 h prezerwacji (P48 h) oraz powtórnej reperfuzji (R0'; R30') (tylko grupa badana 1). W pobranych próbkach oznaczano aktywność wybranych enzymów – ALT, AST, LDH, stężenie jonów sodu i potasu oraz kreatyninę i wartość pH. Uzyskane wyniki przedstawiono w tabeli 1.

Tabela 1. Wpływ dodatku hCG do płynu „Biolasol” na wybrane markery w perfundatach nerek

PŁYN BIOLASOL (KONTROLA)
--------------------------

Czas	ALT [U/l]	AST [U/l]	LDH [U/l]	Na [mmol/l]	K [mmol /l]	pH
P0'	4,0±1,0	38,0±21, 0	574±12 0	61,3±15,1	4,6±1, 8	6,9±0, 2
P5'	4,3±3,0	22,0±10, 7	478±20 4	59,1±10,6	4,2±1, 1	6,8±0, 2
P30'	3,4±1,0	9,2±4,5	364±92	59,5±14,1	3,6±1, 2	7,1±0, 5
P24 h	2,9±1,4	11,5±7,4	354±14 4	58,0±12,3	4,8±1, 8	6,9±0, 3
R0'	13,5±1, 5	29,4±2,3	603±27 9	59,5±10,3	5,4±0, 8	6,6±0, 4
R30 '	15,0±2, 4	26,5±3,3	293±22 0	59,0±17,2	4,0±1, 1	6,9±0, 5
PŁYN BIOLASOL + 1µg/l hCG						
Czas	ALT [U/l]	AST [U/l]	LDH [U/l]	Na [mmol/l]	K [mmol /l]	pH
P0'	29±8	38±8	554±22 5	135±14	22±10	7,6±0, 3
P5'	29±10	50±32	310±21 2	125±15	12±9	7,8±0, 3
P30'	18±5	26±4	195±54	117±14	18±7	8,0±0, 2
P24 h	27±3	30±11	143±10 6	119±5	13±1	7,6±0, 3

R0'	30±12	29±1	462±28 0	125±7	15±0	7,4±0, 4
R30'	25±10	20±1	155±14 7	115±17	15±1	7,5±0, 2
PŁYN BIOLASOL + 0,1µg/l hCG						
Czas	ALT [U/l]	AST [U/l]	LDH [U/l]	Na [mmol/l]	K [mmol/l]	pH
P0'	65±21	38±11	202±29	69±6	9±0	7,7±0, 1
P5'	98±23	75±8	2410±9	76±6	8±1	7,5±0, 2
P30'	56±11	58±20	178±69	61±1	8±1	7,6±0, 2
P24 h	47±17	36±4	53±17	80±22	10±1	7,6±0, 0
R0'	48±14	48±1	134±40	66±16	11±0	7,3±0, 2
R30'	30±14	35±6	87±72	72±11	9±0	7,5±0, 0

Jak wynika z tabeli 1 dodanie 1,0 µg/l hCG do płynu „Biolasol” wykazuje stabilizujące działanie na struktury komórkowe nerek. W przypadku LDH jego uwalnianie jest 4-krotnie niższe, a enzymów – ALT i AST – 1,5 – 2 razy niższe. Stężenie jonów sodu i wartość pH utrzymują się na stałym poziomie, natomiast stężenie potasu się podwyższa nawet o 50%. Dawka 0,1 µg hCG na 1 liter płynu „Biolasol” obniża 2-krotnie

uwalnianie ALT, ponad 2-krotnie LDH oraz o 40% sodu, a nie wpływa na wartość pH oraz stężenie potasu.

Przykład VI.

- 5 Do płynu „Biolasol” dodawano hCG w ilości 1,0  $\mu\text{g/l}$  (grupa badana 1) lub mieszaninę hCG w 1,0  $\mu\text{g/l}$  i 10 mg/l albuminy ludzkiej (grupa badana 2) lub Biolasol bez dodatków (grupa kontrolna). Świeżo pobrane nerki od świń (w rzeźni) płukano schłodzonym do temperatury 4<sup>0</sup>C odpowiednim płynem. Perfundaty pobierano po czasie: P0’; P5’ i P30’  
 10 minut po perfuzji, po 24 godzinach prezerwacji w temperaturze 4<sup>0</sup>C oraz w czasie reperfuzy: R0 i R30 minut. W perfundatach oznaczano wartość pH, aktywność enzymów ALT, AST, LDH oraz stężenie jonów sodu i potasu. Uzyskane wyniki wskazują, że zastosowanie do perfuzji i prezerwacji nerek mieszaniny hCG z albuminą jest najbardziej  
 15 skuteczne. Obrzęk nerek w badanej grupie 2 wynosił tylko 28%. Uzyskane wyniki zestawiono w tabelach 2 - 8

Tabela 2. PŁYN BIOLASOL + hCG (obrzęk nerek)

	Biolasol	+ 1 $\mu\text{g/l}$ hCG	+ 1 $\mu\text{g/l}$ hCG + 10 mg/l Albumina
Obrzęk [%]	39 $\pm$ 16	50 $\pm$ 36	28 $\pm$ 9

- 20 Tabela 3. PŁYN BIOLASOL + hCG (ALT)

Czas	Biolasol	+ 1 µg/l hCG	+ 1 µg/l hCG + 10 mg/l Albumina
P0'	4,0±1,0	2,8±0,7	5,3±1,7
P5'	4,3±3,0	3,6±1,8	4,6±2,2
P30'	3,4±1,0	4,7±2,8	3,0±0,2
P24 h	2,9±1,4	4,6±0,8	3,6±1,8
R0'	13,5±1,5	7,5±3,4	3,6±1,5
R30'	15,0±2,4	3,2±1,1	2,7±0,5

Tabela 4. PŁYN BIOLASOL + hCG (AST)

Czas	Biolasol	+ 1 µg/l hCG	+ 1 µg/l hCG + 10 mg/l Albumina
P0'	38,0±21,0	39,7±3,4	27,4±5,6
P5'	22,0±10,7	28,4±2,0	11,7±6,4
P30'	9,2±4,5	16,9±3,9	14,8±8,7
P24 h	11,5±7,4	14,0±1,3	17,2±7,0
R0'	29,4±2,3	76,2±28,1	26,5±12,8
R30'	26,5±3,3	29,8±14,2	23,2±14,0

Tabela 5. PŁYN BIOLASOL + hCG (LDH)

Czas	Biolasol	+ 1 µg/l hCG	+ 1 µg/l hCG + 10 mg/l Albumina
P0'	574±120	835±233	612±75
P5'	478±204	691±236	394±198
P30'	364±92	370±64	319±242
P24 h	354±144	470±150	444±122

R0'	603±279	796±176	388±125
R30'	293±220	400±150	266±172

Tabela 6. PŁYN BIOLASOL + hCG (JONY SODU)

Czas	Biolasol	+ 1 µg/l hCG	+ 1 µg/l hCG + 10 mg/l Albumina
P0'	61,3±15,1	66,0±2,4	64,2±4,6
P5'	59,1±10,6	65,4±2,5	63,4±5,7
P30'	59,5±14,1	65,7±3,5	68,5±8,2
P24 h	58,0±12,3	65,1±2,8	72,5±1,6
R0'	59,5±10,3	66,8±4,4	65,2±5,4
R30'	59,0±17,2	62,7±5,3	63,3±4,2

Tabela 7. PŁYN BIOLASOL + hCG (JONY POTASU)

Czas	Biolasol	+ 1 µg/l hCG	+ 1 µg/l hCG + 10 mg/l Albumina
P0'	4,6±1,8	4,5±0,5	5,3±1,6
P5'	4,2±1,1	4,3±0,3	3,6±0,1
P30'	3,6±1,2	3,8±0,3	4,2±1,0
P24 h	4,8±1,8	4,0±0,4	4,8±1,0
R0'	5,4±0,8	3,7±0,6	5,1±1,2
R30'	4,0±1,1	3,7±0,4	3,7±1,2

5

Tabela 8. PŁYN BIOLASOL + hCG (WARTOŚĆ pH)

Czas	Biolasol	+ 1 $\mu\text{g/l}$ hCG	+ 1 $\mu\text{g/l}$ hCG + 10 mg/l Albumina
P0'	6,9 $\pm$ 0,2	6,9 $\pm$ 0,1	6,6 $\pm$ 0,1
P5'	6,8 $\pm$ 0,2	7,1 $\pm$ 0,1	6,6 $\pm$ 0,1
P30'	7,1 $\pm$ 0,5	7,4 $\pm$ 0,1	6,7 $\pm$ 0,1
P24 h	6,9 $\pm$ 0,3	6,8 $\pm$ 0,3	6,4 $\pm$ 0,1
R0'	6,6 $\pm$ 0,4	6,7 $\pm$ 0,3	6,3 $\pm$ 0,1
R30'	6,9 $\pm$ 0,5	7,1 $\pm$ 0,1	6,3 $\pm$ 0,2

#### Przykład VII.

W celu określenia mechanizmu działania choriogonadotropiny na nerki sprawdzono stopień wiązania hormonu przez komórki narządu. Stwierdzono, że po dodaniu 1 $\mu\text{g}$  hCG do 1 litra płynu „Biolasol”, wiązanie hormonu jest w granicach 62 – 77% (bez albuminy). Dodanie natomiast do płynu albuminy skutkuje dalszym wychwytem hormonu – do 86% w czasie reperfuzji. Jest to potwierdzeniem wysokiego powinowactwa hormonu do graftu. Uzyskane wyniki zestawiono w tabeli 12.

Tabela 12. Zawartość choriogonadotropiny (hCG) w perfundatach nerek płukanych zmodyfikowanym płynem „Biolasol” [%]

Czas	+ 1 $\mu\text{g/l}$ rh-GH	+ 1 $\mu\text{g/l}$ rh-GH + 10 mg/l Albumina
P0'	27,9	23,2
P5'	28,4	27,9

P30'	38,3	27,9
P24 h	23,9	21,1
R0'	30,3	15,7
R30'	29,9	21,6

#### Przykład VIII.

Do 1 litra płynu „Biolasol” dodawano prolaktynę świńską w ilości 0,001  $\mu\text{g}$  lub 0,01  $\mu\text{g}$  lub 0,1  $\mu\text{g}$  lub 1,0  $\mu\text{g}$  lub 10  $\mu\text{g}$  lub 100  $\mu\text{g}$ . Nerki do badań pobierano w rzeźni od tuczników o masie  $100 \pm 10$  kg. Pobrane nerki umieszczano w schłodzonym pojemniku w płynie „Biolasol” i przewożono do Zakładu, a następnie preparowano. Nerki po zważeniu płukano schłodzonym do 4 – 5°C płynem „Biolasol” zawierającym odpowiednie ilości prolaktyny świńskiej. Próbkę perfundatów pobierano w czasie: 0; 5 i 30 minut, a następnie po 24 h prezerwacji oraz po reperfuzji (czas: 0 i 30 minut). W pobranych perfundatach oznaczano aktywność enzymów: ALT, AST i LDH, zawartość sodu i potasu oraz wartość pH i osmolarność. Z przedstawionych danych można wnioskować, że optymalne stężenie prolaktyny w płynie „Biolasol” jest w granicach 0,1 – 1  $\mu\text{g}$ / litr płynu. W tabeli 1 przedstawiono wyniki z badania wpływu stężenia prolaktyny w płynie „Biolasol” na stopień obrzęku nerek po 24 h prezerwacji. Wyniki badań wskazują, że najmniejszy obrzęk jest przy stężeniu PRL – 1  $\mu\text{g}$ / 1 litr płynu „Biolasol”. W tabeli 2 przedstawiono wpływ dawki PRL w płynie „Biolasol” na wybrane markery biochemiczne w perfundatach.

Uzyskane wyniki zestawiono w tabeli 1.

Tabela 1. PŁYN BIOLASOL + PRL (obrzęk nerek)[%]

Płyn	Obrzęk [%]
Biolasol	39±16
Biolasol + 0,001 µg/l PRL	134±5
Biolasol + 0,01 µg/l PRL	88±9
Biolasol + 0,1 µg/l PRL	62±10
Biolasol + 1 µg/l PRL	30±9
Biolasol + 10 µg/l PRL	47±6
Biolasol + 100 µg/l PRL	75±11

Tabela 2. Wpływ dodatku PRL do płynu Biolasol na wybrane markery w perfundatach nerek

PŁYN BIOLASOL (KONTROLA)						
Czas	ALT [U/l]	AST [U/l]	LDH [U/l]	Na [mmol/l]	K [mmol/l]	pH
P0'	4,0±1,0	38,0±21, 0	574±12 0	61,3±15, 1	4,6±1,8	6,9±0,2
P5'	4,3±3,0	22,0±10, 7	478±20 4	59,1±10, 6	4,2±1,1	6,8±0,2
P30'	3,4±1,0	9,2±4,5	364±92	59,5±14, 1	3,6±1,2	7,1±0,5

P24 h	2,9±1,4	11,5±7,4	354±14 4	58,0±12, 3	4,8±1,8	6,9±0,3
R0'	13,5±1, 5	29,4±2,3	603±27 9	59,5±10, 3	5,4±0,8	6,6±0,4
R30 ,	15,0±2, 4	26,5±3,3	293±22 0	59,0±17, 2	4,0±1,1	6,9±0,5
PŁYN BIOLASOL + 100 µg/l PRL						
Cza s	ALT [U/l]	AST [U/l]	LDH [U/l]	Na [mmol/l]	K [mmol/l ]	pH
P0'	74±21	67±7	415±16 6	132±8	15±1,0	7,83±0, 1
P5'	35±9	42±12	657±11 2	129±3	13±1,0	7,76±0, 1
P30'	26±2	30±5	209±12 3	120±3	11±0,8	8,0±0,1
P24 h	24±5	31±8	213±14 1	132±6	15±2,1	7,75±0, 1
R0'	27±7	38±11	507±12 7	118±11	14±2,5	7,54±0, 2
R30 ,	20±4	25±6	381±57	119±10	9±1,9	7,65±0, 2
PŁYN BIOLASOL + 10 µg/l PRL						
Cza s	ALT [U/l]	AST [U/l]	LDH [U/l]	Na [mmol/l]	K [mmol/l ]	pH

P0'	43±2	54±11	526±26 3	101±47	15±2,0	7,38±0, 5
P5'	34±2	42±23	746±15 5	104±36	13±0,7	7,39±0, 5
P30'	44±15	35±2	511±29 6	85±28	12±0,9	7,60±0, 5
P24 h	36±4	32±3	451±72	85±50	12±2,0	7,58±0, 5
R0'	50±2	75±5	689±12 7	87±16	12±1,0	6,51±0, 7
R30 ,	32±2	42±6	299±31	89±13	10±0,7	6,61±0, 8
PŁYN BIOLASOL + 1 µg/l PRL						
Cza s	ALT [U/l]	AST [U/l]	LDH [U/l]	Na [mmol/l]	K [mmol/l ]	pH
P0'	44±28	53±22	421±31 1	101±31	19±9,0	7,22±0, 1
P5'	52±11	65±13	388±25 5	94±39	16±9,0	7,09±0, 1
P30'	29±3	51±20	194±15 6	87±43	13±7,0	7,30±0, 1
P24 h	45±17	37±11	222±87	68±4	11±3,0	7,36±0, 0
R0'	30±7	34±11	108±17	69±7	8±1,0	7,51±0, 0

R30 ,	28±9	26±6	90±21	67±5	9±0,9	7,44±0, 1
PŁYN BIOLASOL + 0,1 µg/l PRL						
Cza s	ALT [U/l]	AST [U/l]	LDH [U/l]	Na [mmol/l]	K [mmol/l ]	pH
P0'	55±22	28±6	368±70	113±15	11±3,0	7,13±0, 1
P5'	24±3	28±5	100±48	92±8	10±2,0	7,10±0, 1
P30'	22±7	21±8	176±48	95±9	8±2,0	7,17±0, 1
P24 h	66±12	58±9	342±22 2	79±13	8±1,0	8,15±0, 1
R0'	28±18	44±19	295±64	90±13	12±4,0	8,03±0, 2
R30 ,	30±14	50±37	119±31	99±20	10±1,0	7,84±0, 1
PŁYN BIOLASOL + 0,01 µg/l PRL						
Cza s	ALT [U/l]	AST [U/l]	LDH [U/l]	Na [mmol/l]	K [mmol/l ]	pH
P0'	26±12	31±11	225±12 1	84±12	9±3,0	7,38±0, 3
P5'	43±18	43±10	214±12 0	90±28	9±1,0	7,40±0, 3

P30'	39±20	36±7	271±12 5	84±24	9±1,0	7,55±0, 2
P24 h	40±5	27±8	248±11 5	82±13	9±2,0	8,65±0, 4
R0'	41±5	25±10	107±37	70±12	12±1,0	8,25±0, 2
R30 ,	37±6	29±8	329±20	88±11	10±1,0	8,46±0, 4

#### Przykład XIX.

Do płynu „Biolasol” dodawano ludzką rekombinowaną prolaktynę (rh-PRL) w ilości 1,0 µg/ 1 litr (grupa badana 1) lub 1,0 µg/ 1 litr rh-PRL z 10 mg albuminy (grupa badana 2) lub płyn „Biolasol” bez dodatku (grupa kontrolna). Świeżo pobrane nerki od świń z rzeźni płukano schłodzonym do temperatury 4°C odpowiednio zmodyfikowanym płynem. Próbkę perfundatów pobierano w czasie: 0; 5 i 30 minut oraz po 24 h prezerwacji i po reperfuzji (czas: 0 i 30 minut). W pobranych perfundatach oznaczano aktywność enzymów: ALT, AST i LDH, wartość pH. Uzyskane wyniki zestawiono w tabeli 3. Przedstawione wyniki sugerują, że najskuteczniejszy jest dodatek rh-PRL z albuminą do płynu „Biolasol”. Obrzęk nerek badano ważąc masę nerek przed prezerwacją i po reperfuzji w płynie „Biolasol” z odpowiednim dodatkiem (tabela 4). Uzyskane wyniki potwierdziły skuteczność dodawania albuminy do płynu „Biolasol”, gdyż w tej grupie obrzęk nerek jest najmniejszy (~28%).

Tabela 3. Wpływ dodatku rh-PRL do płynu Biolasol na wybrane markery w perfundatach nerek

PŁYN BIOLASOL						
Czas	ALT [U/l]	AST [U/l]	LDH [U/l]	Na [mmol/l]	K [mmol/l]	pH
P0'	4,0±1,0	38,0±21, 0	574±12 0	61,3±15, 1	4,6±1,8	6,9±0,2
P5'	4,3±3,0	22,0±10, 7	478±20 4	59,1±10, 6	4,2±1,1	6,8±0,2
P30'	3,4±1,0	9,2±4,5	364±92	59,5±14, 1	3,6±1,2	7,1±0,5
P24 h	2,9±1,4	11,5±7,4	354±14 4	58,0±12, 3	4,8±1,8	6,9±0,3
R0'	13,5±1, 5	29,4±2,3	603±27 9	59,5±10, 3	5,4±0,8	6,6±0,4
R30 '	15,0±2, 4	26,5±3,3	293±22 0	59,0±17, 2	4,0±1,1	6,9±0,5
PŁYN BIOLASOL + 1 µg/l rh-PRL						
Czas	ALT [U/l]	AST [U/l]	LDH [U/l]	Na [mmol/l]	K [mmol/l]	pH
P0'	7±3	66±31	812±25 3	59±11	5±1,0	7,0±0,2
P5'	5±3	34±20	665±24 8	60±12	4±0,6	6,9±0,2
P30'	4±0	15±9	458±27 4	58±9	4±0,8	7,1±0,2

P24 h	4 $\pm$ 2	12 $\pm$ 9	495 $\pm$ 28 3	55 $\pm$ 7	6 $\pm$ 2,8	7,0 $\pm$ 0,1
R0'	5 $\pm$ 2	25 $\pm$ 17	407 $\pm$ 37 1	59 $\pm$ 10	5 $\pm$ 2,0	6,7 $\pm$ 0,3
R30 ,	3 $\pm$ 1	16 $\pm$ 7	459 $\pm$ 25 0	56 $\pm$ 11	5 $\pm$ 1,9	7,0 $\pm$ 0,1
PŁYN BIOLASOL + 1 $\mu$ g/l rh-PRL + 10 mg/l Albumina						
Cza s	ALT [U/l]	AST [U/l]	LDH [U/l]	Na [mmol/l]	K [mmol/l ]	pH
P0'	5 $\pm$ 2	15 $\pm$ 9	363 $\pm$ 10 4	52 $\pm$ 2	4 $\pm$ 1,2	6,5 $\pm$ 0,1
P5'	4 $\pm$ 2	9 $\pm$ 4	172 $\pm$ 29	58 $\pm$ 3	4 $\pm$ 0,9	6,5 $\pm$ 0,1
P30'	3 $\pm$ 1	5 $\pm$ 2	118 $\pm$ 52	54 $\pm$ 2	3 $\pm$ 0,3	6,9 $\pm$ 0,1
P24 h	3 $\pm$ 1	12 $\pm$ 5	244 $\pm$ 32	52 $\pm$ 1	5 $\pm$ 1,3	6,4 $\pm$ 0,1
R0'	4 $\pm$ 2	33 $\pm$ 5	429 $\pm$ 23 1	57 $\pm$ 5	4 $\pm$ 2,1	6,3 $\pm$ 0,0 4
R30 ,	3 $\pm$ 1	21 $\pm$ 3	298 $\pm$ 89	57 $\pm$ 4	4 $\pm$ 0,9	6,4 $\pm$ 0,2

Tabela 4. PŁYN BIOLASOL + rh-PRL (obrzęk nerek)[%]

Czas	Biolasol	+ 1 $\mu$ g/l rh-PRL	+ 1 $\mu$ g/l rh-PRL + 10 mg/l Albumina
Obrzęk [%]	39 $\pm$ 16	40 $\pm$ 6	28 $\pm$ 9

## Przykład X.

Badano dynamikę zmian zawartości ludzkiej rekombinowanej prolaktyny (rh-PRL) dodawanej do płynu „Biolasol” (grupa kontrolna) lub rh-PRL z dodatkiem ludzkiej albuminy (10 mg/1 litr płynu) (grupa badana). Izolowane ex vivo nerki świń przygotowano jak opisano w przykładowie I. Zawartość rh-PRL w pobranych próbkach oznaczano metodą IRMA przy czułości metody 10 pg/ml. Wykazano, że w grupie kontrolnej po 30 minutach perfuzji ilość PRL w perfundacie zwiększyła się do 142%, a w procesie 24 h prezerwacji pozostaje bez zmian (97%), a podczas reperfuzji zwiększa się nieznacznie do 113% po 5 minucie. Dodatek do płynu „Biolasol” albuminy manifestuje się wiązaniem PRL przez nerki tak, że w perfundacie po 5 minutach jest tylko 40% hormonu, a 78% w 30 minucie. Obecność albuminy w płynie „Biolasol” stymuluje procesy wychwytu hormonu przez narząd. Uzyskane wyniki zestawiono w tabeli 8.

Tabela 8. Zawartość prolaktyny w perfundatach nerek płukanych zmodyfikowanym płynem Biolasol [%]

Czas	+ 1 µg/l rh-PRL	+ 1 µg/l rh-PRL + 10 mg/l Albumina
P0'	100,0	100,0
P5'	103,0	39,4
P30'	141,9	78,5
P24 h	97,2	47,5
R0'	113,4	40,9

R30'	98,6	49,3
------	------	------