



(10)申请公布号 CN 108366552 A

(43)申请公布日 2018.08.03

(21)申请号 201680046574.X

(74) 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司
72002

(22)申请日 2016.06.09

代理人 过晓东

(30) 优先权数据

(51) Int.Cl.

62/173,184 2015.06.09 US

A01N 1/00(2006.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

A01N 1/02(2006.01)

2018.02.07

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2016/036738 2016.06.09

(87)PCT国际申请的公布数据

W02016/201126 EN 2016.12.15

(71)申请人 哈佛学院董事会

地址 美国马萨诸塞州

申请人 美国政府退伍军人事务部

(72)发明人 H·塔特

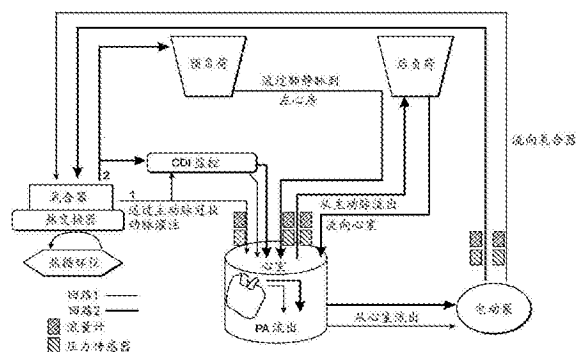
权利要求书8页 说明书53页 附图44页

(54)发明名称

在环境温度和亚常温下保存组织的组合物与方法

(57)摘要

本文提供了用于在环境温度下长达24小时的复苏、储存和保存器官和组织的功能完整性的方法和组合物。通过维持ATP水平,线粒体功能,预防水肿,以及调节钙离子,钠离子,钾离子,镁离子和氯离子来维持代谢功能。



1. 一种用于保存或复苏生物组织或器官的组合物,其包含:生理盐溶液,谷胱甘肽,抗坏血酸和腺苷,其中所述生理盐溶液包含至少20mM钾离子和至少37mM镁离子。

2. 一种用于保存哺乳动物器官的组合物,其包含:生理盐溶液,谷胱甘肽,抗坏血酸和腺苷,其中所述组合物保持在 $10-21 \pm 4^{\circ}\text{C}$ 。

3. 权利要求1中的组合物,其中组合物的温度维持在 $10-21 \pm 4^{\circ}\text{C}$ 。

4. 权利要求2中的组合物,其中组合物的生理盐溶液包含至少20mM钾离子和至少37mM镁离子。

5. 权利要求1-4中任一项所述的组合物,其进一步包含胰岛素。

6. 权利要求5中的组合物,其中胰岛素在使用前加入到组合物中。

7. 权利要求1-6中任一项所述的组合物,其中的生理盐溶液包括选自磷酸钾、氯化钾、氯化钠、碳酸氢钠、氯化钙、磷酸钠、氯化镁、硫酸镁的一种或多种盐。

8. 权利要求1-7中任一项所述的组合物,包含0.4-10mM磷酸钾。

9. 权利要求1-7中任一项所述的组合物,包含4-65mM氯化钾。

10. 权利要求1-7中任一项所述的组合物,包含80-135mM氯化钠。

11. 权利要求1-7中任一项所述的组合物,包含2-25mM碳酸氢钠。

12. 权利要求1-7中任一项所述的组合物,包含0-1.5mM氯化钙。

13. 权利要求1-7中任一项所述的组合物,包含0.15-30mM磷酸钠。

14. 权利要求1-7中任一项所述的组合物,包含0.5-45mM氯化镁。

15. 权利要求1-7中任一项所述的组合物,包含0.5-1.5mM硫酸镁。

16. 权利要求1-15中任一项所述的组合物,更包含2.5-5mM肌酸。

17. 权利要求1-16中任一项所述的组合物,包含0.001-0.5mM二氯乙酸。

18. 权利要求1-17中任一项所述的组合物,包含0.5-2mM乳清酸。

19. 权利要求1-18中任一项所述的组合物,包含11-25mM糖。

20. 权利要求19所述的组合物,其中的糖是葡萄糖或右旋糖。

21. 权利要求1-20中任一项所述的组合物,更包含2-10mM精氨酸。

22. 权利要求1-21中任一项所述的组合物,包含0.001-10mM苹果酸。

23. 权利要求1-22中任一项所述的组合物,更包含1-10mM瓜氨酸。

24. 权利要求1-21中任一项所述的组合物,更包含0.001-10mM瓜氨酸苹果酸。

25. 权利要求1-24中任一项所述的组合物,更包含5-10mM肌肽。

26. 权利要求1-25中任一项所述的组合物,更包含5-10mM肉碱。

27. 一种用于储存,保存或复苏生物组织或器官的方法,包括使所述生物组织或器官与权利要求1-26中任一项所述的组合物接触。

28. 权利要求27中的方法,其中组合物的温度维持在 $10-21 \pm 4^{\circ}\text{C}$ 。

29. 权利要求27或28所述的方法,其中所述生物组织或器官被储存或保存长达24小时。

30. 权利要求27-29中任一项所述的方法,其中所述生物组织或器官选自心、肾、肝、胃、脾、皮肤、胰腺、肺、脑、眼、肠和膀胱。

31. 权利要求27-29中任一项所述的方法,其中与未接触该组合物的生物组织或器官相比,保存或复苏后的生物组织或器官中高能量磷酸盐的含量较高。

32. 权利要求27-30中任一项所述的方法,其中所述器官是心脏。

33. 权利要求32中所述方法,其中与未接触该组合物的生物组织或器官相比,保存或复苏后的生物组织或器官中冠状血流量较高。

34. 权利要求32中所述方法,其中保存或复苏后心脏的切面百分比变化、射血分数和/或心搏量中的一个或多与未接触组合物的的心脏相比有所增加。

35. 一种生产用于储存、保存或复苏生物组织或器官的组合物,包含:生理盐溶液,谷胱甘肽,抗坏血酸和腺苷,其中所述生理盐溶液包含至少20mM钾离子和至少37mM镁离子。

36. 权利要求35所述的方法,还包括将所述组合物与胰岛素组合。

37. 权利要求36中所述的方法,其中胰岛素在使用前加入到组合物中。

38. 权利要求35-37中任一项所述的方法,其中组合物的温度维持在 $10-21 \pm 4^{\circ}\text{C}$ 。

39. 权利要求35-38中任一项所述的方法,其中的生理盐溶液包括选自磷酸钾、氯化钾、氯化钠、碳酸氢钠、氯化钙、磷酸钠、氯化镁、硫酸镁的一种或多种盐。

40. 权利要求35-39中任一项所述的方法,其中生理盐溶液包含0.44-10mM磷酸钾。

41. 权利要求35-39中任一项所述的方法,其中生理盐溶液包含4-65mM氯化钾。

42. 权利要求35-39中任一项所述的方法,其中生理盐溶液包含80-135mM氯化钠。

43. 权利要求35-39中任一项所述的方法,其中生理盐溶液包含2-25mM碳酸氢盐。

44. 权利要求35-39中任一项所述的方法,其中生理盐溶液包含0-1.5mM氯化钙。

45. 权利要求35-39中任一项所述的方法,其中生理盐溶液包含0.15-30mM磷酸钠。

46. 权利要求35-39中任一项所述的方法,其中生理盐溶液包含0.5-45mM氯化镁。

47. 权利要求35-39中任一项所述的方法,其中生理盐溶液包含0.5-1.5mM硫酸镁。

48. 权利要求35-47中任一项所述的方法,更包含2.5-5mM肌酸。

49. 权利要求35-48中任一项所述的方法,更包含0.5-2mM乳清酸。

50. 权利要求35-49中任一项所述的方法,更包含11-25mM糖。

51. 权利要求50所述的组合物,其中的糖是葡萄糖或右旋糖。

52. 权利要求36-51中任一项所述的方法,更包含2-10mM精氨酸。

53. 权利要求36-52中任一项所述的方法,更包含0.001-10mM苹果酸。

54. 权利要求36-53中任一项所述的方法,更包含1-10mM瓜氨酸。

55. 权利要求36-52中任一项所述的方法,更包含0.001-10mM瓜氨酸苹果酸。

56. 权利要求36-55中任一项所述的方法,更包含5-10mM肌肽。

57. 权利要求36-55中任一项所述的方法,更包含5-10mM肉碱。

58. 一种试剂盒,其包含:生理盐溶液,谷胱甘肽,抗坏血酸,腺苷,其中生理盐水溶液包含至少20mM钾离子和至少37mM镁离子。

59. 权利要求58中的试剂盒,其进一步包含胰岛素。

60. 权利要求59中的试剂盒,其进一步包括用于在使用由所述试剂盒的组分制备的器官保存溶液之前组合胰岛素的书面说明书。

61. 权利要求58-60中任一项所述的试剂盒,其中的生理盐溶液包括选自磷酸钾、氯化钾、氯化钠、碳酸氢钠、氯化钙、磷酸钠、氯化镁、硫酸镁的一种或多种盐。

62. 权利要求58-61中任一项所述的试剂盒,其进一步包含肌酸。

63. 权利要求58-62中任一项所述的试剂盒,其进一步包含乳清酸。

64. 权利要求58-63中任一项所述的试剂盒,其进一步包含糖。
65. 权利要求64所述的试剂盒,其中的糖是葡萄糖或右旋糖。
66. 权利要求58-65中任一项所述的试剂盒,其进一步包含精氨酸。
67. 权利要求58-66中任一项所述的试剂盒,其进一步包含苹果酸。
68. 权利要求58-67中任一项所述的试剂盒,其进一步包含瓜氨酸。
69. 权利要求58-66中任一项所述的试剂盒,其进一步包含瓜氨酸苹果酸。
70. 权利要求58-69中任一项所述的试剂盒,其进一步包含肌肽。
71. 权利要求58-70中任一项所述的试剂盒,其进一步包含肉碱。
72. 权利要求58-71中任一项所述的试剂盒,其进一步包含二氯乙酸。
73. 一种用于储存,保存或复苏生物组织或器官的组合物,其包含:20毫摩/升氯化钾、0.44毫摩/升磷酸钾、37氯化镁、0.5毫摩/升硫酸镁、125毫摩/升氯化钠、5毫摩/升碳酸氢钠、1.3毫摩/升氯化钙、0.19毫摩/升磷酸钠,11毫摩/升D-葡萄糖、1.5毫摩/升谷胱甘肽,1毫摩/升抗坏血酸,5毫摩/升L-精氨酸、1毫摩/升L-瓜氨酸苹果酸、2毫摩/升腺苷、0.5毫摩/升肌酸,2毫摩/升一水合肌酸,10毫摩/升L-肌肽,10毫摩/升L-肉碱,0.5毫摩/升二氯乙酸。
74. 如权利要求73中的组合物,其进一步包含100units/L胰岛素。
75. 权利要求74中的组合物,其中胰岛素在使用前加入到组合物中。
76. 权利要求73-75中任一项所述的组合物,其中组合物的温度维持在 $10-21\pm 4^{\circ}\text{C}$ 。
77. 所述心麻痹溶液用于心脏直视手术期间的心脏停搏或用于移植的供体心脏其中包括:生理盐溶液,谷胱甘肽,抗坏血酸和腺苷,其中所述生理盐水溶液包含至少20mM钾离子。
78. 权利要求77中的组合物,其中组合物的生理盐溶液包含至少20mM氯化钾。
79. 权利要求77或78中的溶液温度维持在 $4-21\pm 10^{\circ}\text{C}$ 。
80. 权利要求77或78中的溶液,其中生理盐溶液包含至少37mM镁离子。
81. 权利要求80中的溶液,其中的生理盐溶液包含至少37mM氯化镁。
82. 权利要求80或81中的溶液温度维持在 $10-25^{\circ}\text{C}$ 。
83. 权利要求77或78中的溶液,其中的生理盐溶液包含至少25mM钾离子和至少37mM镁离子。
84. 权利要求83中的溶液,其中的生理盐溶液包含至少45mM氯化钾和至少37mM氯化镁。
85. 权利要求83或84中的溶液温度维持在 $25-37^{\circ}\text{C}$ 。
86. 所述心麻痹溶液用于心脏直视手术期间的心脏停搏或用于移植的供体心脏其中包括:生理盐溶液,谷胱甘肽,抗坏血酸和腺苷,其中所述生理盐水溶液包含4-65mM钾离子和1.5-45mM镁离子。
87. 权利要求86中的溶液,其中的生理盐溶液包含37mM镁离子。
88. 权利要求86或87中的溶液,其中的生理盐溶液包含氯化镁。
89. 权利要求86中的溶液,其中的生理盐溶液包含20mM钾离子。
90. 权利要求86或89中的溶液,其中的生理盐溶液包含氯化钾。
91. 权利要求86-90中任一项所述的溶液,其中溶液的温度维持在 $4-37^{\circ}\text{C}$ 。
92. 一种用于保存移植用的供体肺的溶液,其包含:生理盐溶液,谷胱甘肽,抗坏血酸和腺苷,其中所述生理盐溶液包含4-65mM钾离子和1.5-45mM镁离子。
93. 权利要求93中的溶液,其中的生理盐溶液包含2mM镁离子。

94. 权利要求92或93中的溶液,其中的生理盐溶液包含氯化镁。
95. 权利要求92中的溶液,其中的生理盐溶液包含7.5mM钾离子。
96. 权利要求92或95中的溶液,其中的生理盐溶液包含氯化钾。
97. 权利要求92-96中任一项所述的溶液,其中溶液的温度维持在4-37℃。
98. 权利要求77-97中任一项所述的溶液,其进一步包含肌酸。
99. 权利要求77-98中任一项所述的试剂盒,其进一步包含乳清酸。
100. 权利要求77-99中任一项所述的溶液,其进一步含糖。
101. 权利要求100所述的溶液,其中的糖是葡萄糖或右旋糖。
102. 权利要求77-101中任一项所述的溶液,其进一步包含精氨酸。
103. 权利要求77-102中任一项所述的溶液,其进一步包含苹果酸。
104. 权利要求77-103中任一项所述的溶液,其进一步包含瓜氨酸。
105. 权利要求77-102中任一项所述的溶液,其进一步包含瓜氨酸苹果酸。
106. 权利要求77-106中任一项所述的溶液,其进一步包含肌肽。
107. 权利要求77-107中任一项所述的溶液,其进一步包含肉碱。
108. 权利要求77-108中任一项所述的溶液,其进一步包含二氯乙酸。
109. 在心脏开心手术或心脏供体切除手术期间诱导心脏停搏的方法,所述方法包括使心脏与权利要求77-91或98-108中任一项所述的溶液接触。
110. 在移植手术前保存供体肺的方法,所述方法包括使肺与权利要求92-108中任一项所述的溶液接触。
111. 权利要求19的组合物,权利要求50的方法,权利要求64的试剂盒和权利要求100的溶液,其中所述糖包含己糖或戊糖。
112. 一种生物组织或器官保存溶液,包括:

成分	数量
蒸馏水	1L
氯化钾	至少 20 毫摩钾离子与偏磷酸钾相结合
磷酸钾	至少 20 毫摩钾离子与氯化钾相结合
氯化镁	至少 37 毫摩镁离子与硫酸镁相结合
硫酸镁	至少 37 毫摩镁离子与氯化镁相结合
氯化钠	100-115 毫摩
碳酸氢钠	5-15 毫摩
磷酸钠	10-40 毫摩
谷胱甘肽	1.5-5.0 毫摩
抗坏血酸	1.0-5 毫摩
腺苷	2-5 毫摩

113. 一种生物组织或器官保存溶液,包括:

成分	数量
蒸馏水	1L
氯化钾	4-65 毫摩
磷酸钾	0.44-10 毫摩
氯化镁	0.5-65 毫摩
硫酸镁	0.5-1.5 毫摩
氯化钠	80-135 毫摩
碳酸氢钠	2-25 毫摩
磷酸钠	0.15-30 毫摩
氯化钙	0-1.5 毫摩
D-葡萄糖	5-25 毫摩
谷胱甘肽	0.5-3 毫摩
抗坏血酸	0.5-3 毫摩
精氨酸	0.5 毫摩到 7 毫摩
苹果酸	0 毫摩到 7 毫摩 (任选)
腺苷	1-4 毫摩
乳清酸	0.5-2 毫摩
肌酸	2-5 毫摩
肌肽	5-15 毫摩
肉碱	5-15 毫摩
二氯乙酸	0.1-2.5 毫摩
胰岛素	10 毫克-100 毫克/毫 升/公升或 100-1000 单位/升

其中在使用溶液之前选择性加入胰岛素

114. 一种生物组织或器官保存溶液, 包括:

成分	数量
蒸馏水	1L
氯化钾	4-65 毫摩
磷酸钾	0.44-10 毫摩

氯化镁	0.5-65 毫摩
硫酸镁	0.5-1.5 毫摩
氯化钠	80-135 毫摩
碳酸氢钠	2-25 毫摩
磷酸钠	0.15-30 毫摩
氯化钙	0-1.5 毫摩
D-葡萄糖	5-25 毫摩
谷胱甘肽	0.5-3 毫摩
抗坏血酸	0.5-3 毫摩
精氨酸	0.5 毫摩到 7 毫摩
苹果酸	0 毫摩到 7 毫摩 (任选)
腺苷	1-4 毫摩
乳清酸	0.5-2 毫摩
肌酸	2-5 毫摩
肌肽	5-15 毫摩
肉碱	5-15 毫摩
二氯乙酸	0.1-2.5 毫摩

115. 一种生物组织或器官保存溶液,包括:

成分	mM
氯化钾	7.00
磷酸钾	0.44
氯化钙	1.30mM
氯化镁	0.5
硫酸镁	0.503
氯化钠	125.00
碳酸氢钠	5.00
磷酸钠	0.19
D-葡萄糖	11.00
谷胱甘肽	1.50
抗坏血酸	1.00
精氨酸	5.00
瓜氨酸	5.00
苹果酸	1.00
腺苷	2.00

乳清酸	0.50
肌酸	2.50
肌肽	10.00
肉碱	10.00
二氯乙酸	0.5
胰岛素	100 单位/升

其中在使用溶液之前选择性加入胰岛素

116. 一种生物组织或器官保存溶液, 包括:

成分	mM
氯化钾	7.00
磷酸钾	0.44
氯化钙	1.30mM
氯化镁	0.5
硫酸镁	0.503
氯化钠	125.00
碳酸氢钠	5.00
磷酸钠	0.19
D-葡萄糖	11.00
谷胱甘肽	1.50
抗坏血酸	1.00
精氨酸	5.00
瓜氨酸	5.00
苹果酸	1.00
腺苷	2.00
乳清酸	0.50
肌酸	2.50
肌肽	10.00
肉碱	10.00
二氯乙酸	0.5

在环境温度和亚常温下保存组织的组合物与方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求享有申请日为2015年6月9日的No.62/173,184美国临时申请的优先权, 上诉申请均完整的在此引入作为参考。

[0003] 政府权益

[0004] 本发明在政府支持下取得, 获得美国退伍军人事务部颁发的优秀奖, 编号BX000817-01A1, 政府对此发明拥有一定权力。

技术领域

[0005] 本发明主要涉及长时间在环境温度下, 保存生物组织和器官的组合物及方法。

背景技术

[0006] 器官移植的主要障碍在于供体器官的可利用性有限以及供体器官的质量不好, 这种质量不好归因于在储存过程中的退化。这一点在心脏供体中尤为明显, 其体外保存时间的极限是4-6个小时。目前使用的体外心脏保存液是在4℃或接近4℃的条件下低温贮藏, 用以防止水肿和减缓新陈代谢(代谢变性)。然而, 如此低的温度保存, 不可避免地造成了组织和细胞损伤, 而且近6小时的储存使损伤不可逆。

发明内容

[0007] 本文所述的组合物和方法与现行的来自心脏搏动供体(BHD), 临界供体(DCD), 及心脏死亡捐献(DCD)供体的器官存储和/或保存相比, 有显著的进步及优越性。例如, 在改进的储存/保存溶液中, 改良的Somah保存液(亦称iSomah), 允许在环境温度(25℃)以及在亚环境温度(>4和<25℃)中存储和灌注器官。将器官(例如心脏)暴露于低于体温的温度下会导致器官受损甚至损坏。此外, 正常体温下(36.4-37.1℃, 例如, 36.4℃, 36.5℃, 36.6℃, 36.7℃, 36.8℃, 36.9℃, 37℃, 或37.1℃)活体心脏过渡到低温的(例如, 4℃)心脏停搏供体, 对心脏组织也会产生压力。然而, 如果一个心脏继续缓慢地收缩或移动到一个新的有利于室温储存的溶液, 例如大约20℃(21℃+4℃), 它将耗尽细胞储备的高能磷酸盐(ATP+CP)并持续心跳而不是在4℃时由于低体温完全停滞, 这会导致发生相关的退行性改变, 例如细胞稳态丧失、钙超载和诱导细胞凋亡和/或坏死, 导致被称为“石心”的不可移植器官。因此, 本文所述的溶液中的钾离子和镁离子的浓度在亚常温储存(例如10-25℃)期间增加(与其它储存或心麻痹溶液相比)以诱导心脏组织的暂时性麻痹, 同时维持HEP合成, 细胞内稳态, 一氧化氮生成(另外通过螯合转氨酶反应产生的有毒铵离子, 见图33)。这导致一氧化氮合成途径在所有组织和器官中的活性增加, 并伴随着对水肿的生理控制。

[0008] 心脏停搏是心脏活动的刻意、暂时中断。这种心跳的暂时停止由诸多原因造成, 例如通过注射或灌注诸如使心脏停搏液的化学物质。例如, 以心脏手术的方式使心脏停搏。这种手术包括旁路手术、心脏瓣膜置换、主动脉修复手术和心脏移植等。

[0009] 除了改善/保持病情(例如减少心脏组织的组织损伤)之外, 所述溶液还提供了其

它优点,例如降低了成本,对心脏的内皮和组织造成最小损伤因此可能降低对移植后免疫抑制的需求,减少对正性肌力的支持(例如,药物不需要增加心脏收缩)和持续的转换以保持窦性心脏功能正常、减少体外循环时间,以及减少留在ICU和住院时间(因此降低成本)。此外,使用本文提供的器官保存溶液致使患者发病率降低并且改善长期预后,因此最重要的是使用该溶液提高了患者的生活质量。一旦从溶液中取出心脏,在手术期间将溶液冲出心脏组织。然后器官进入窦性转化,在血液再灌注后恢复搏动,并在体外复温;或在移植后和在使患者复温至正常体温期间释放交叉钳。

[0010] 本文提供的是专门用于在环境温度下保存或复苏生物组织或器官的组合物,方法和试剂盒。

[0011] 因此,在一些方面,本文提供了用于保存或复苏生物组织或器官的组合物,其包含:生理盐水,5-10mM的葡萄糖(或其他糖,如乳糖,麦芽糖和/或核糖)(例如约5mM,6mM,7mM,8mM,9mM或10mM),以及一种或多种谷胱甘肽,抗坏血酸,精氨酸,瓜氨酸苹果酸(或任选的瓜氨酸或其盐和/或苹果酸或其盐),腺苷,肌酸(例如肌酸乳清酸或一水合肌酸或其盐),乳清酸(或其盐),肌肽(例如L-肌肽),肉碱(例如L-肉碱),乳清酸和/或二氯乙酸,浓度为0mM至约5mM,其中所述生理盐溶液包含至少20mM钾离子和至少37mM镁离子。本文所述的器官储存溶液含有至少20mM钾离子和/或至少37mM镁离子,在不同储存条件下(例如,温度),例如心脏储存中或者诸如心脏停搏的手术期间,保护和保存器官都明显的优于先前描述的器官储存溶液(参见美国专利号8,211,628,其公开内容通过引用并入本文)。因此,本文公开的储存溶液被称为“改良Somah保存液,亦称iSomah”。

[0012] 从其他方面讲,本文所述用于保存哺乳动物器官的组合物含有:生理盐溶液、一个或多个五或六碳糖(如核糖、葡萄糖或右旋糖)、谷胱甘肽、抗坏血酸,精氨酸,瓜氨酸(如瓜氨酸苹果酸)、苹果酸、腺苷、肌酸(如肌酸乳清酸、一水肌酸或盐),肌肽(如L-肌肽),肉碱(如L-肉碱),乳清酸,和/或二氯乙酸,其中成分或器官的温度保持在 $21 \pm 4^{\circ}\text{C}$ 。

[0013] 在本文所述的所有实施例里,有一些实施例中的组合物或器官保持在 $21 \pm 4^{\circ}\text{C}$ 的温度下。在本文所述的所有实施例里,有一些实施例中的生理盐溶液包含至少20mM钾离子和至少37mM镁离子。在本文所述的所有实施例里,有一些实施例中的组合物还包括胰岛素成分。在本文所述的所有实施例里,有一些实施例里,胰岛素在使用前加入到组合物中。在本文所述的所有实施例里,有一些实施例里,生理盐溶液包括选自磷酸钾、氯化钾、氯化钠、碳酸氢钠、氯化钙、磷酸钠、氯化镁、硫酸镁的组成的组中的一种或多种盐。在本文所述的所有实施例里,有一些实施例中的组合物包含0.44-10mM的磷酸钾。在本文所述的所有实施例里,有一些实施例中的组合物包含4-65mM的氯化钾。在本文所述的所有实施例里,有一些实施例中的组合物包含80-135mM的氯化钠。在本文所述的所有实施例里,有一些实施例中的组合物包含2-25mM的碳酸氢钠。在本文所述的所有实施例里,有一些实施例中的组合物包含0-1.5mM的氯化钙。在本文所述的所有实施例里,有一些实施例中的组合物包含0.15-30mM的磷酸钠。在本文所述的所有实施例里,有一些实施例中的组合物包含0.5-45mM的氯化镁。在本文所述的所有实施例里,有一些实施例中的组合物包含0.5-1.5mM的硫酸镁。

[0014] 例如,除了储存和/或保存液、生理相容性溶液(改良Somah保存液),本文所述的是一种心脏停搏液,可用于在所遇温度范围内,保证开心手术期间和心脏移植期间,供体和受体心脏停止跳动。在 $4-10^{\circ}\text{C}$ 下应用,该溶液包含20mM钾离子,例如,20mM氯化钾,最终浓度;

在10-25℃时,溶液中含有20mM钾离子,例如,20mM氯化钾和37mM镁离子,例如,37mM氯化镁,最终浓度;在25-37℃,溶液中含有45mM钾离子,例如,45mM氯化钾和37mM镁离子,例如,37mM氯化镁。在其他实施例中,25-37℃下,溶液中含有25mM钾离子,如25mM氯化钾和37mM镁离子,如37mM氯化镁。

[0015] 下列,器官停搏的温度范围(例如,心脏停搏)以及器官储存(例如,心,肺,或其他器官体外储存)以及钾离子和镁离子的浓度(例如,氯化钾和氯化镁的浓度)。

[0016] 在一个实施例中,使用4-37℃下含有20mM氯化钾(范围4.0-65mM)和37mM氯化镁(范围1.5-45mM)的Somah停搏液使心脏停搏且保存在同一溶液在4-37℃条件下准备移植。在另一实施例中,将肺保存在含有7.5mM氯化钾和2mM氯化镁的改良Somah保存液中,保存在4-37℃条件下,并且在含有20mM氯化钾(范围4.0-65mM)和37mM氯化镁(范围1.5-45mM)的Somah保存液中准备移植。

[0017] 从其他方面讲,本文所述方法用于储存、保存和复苏生物组织或器官,包括使所述生物组织或器官与任何本文所述组合物接触。在部分实施例中,组合物的温度维持在10-21±4℃。在本文公开的所有实施例里,有一些实施例中,将生物组织或器官储存或保存24-72小时。在本文公开的所有实施例里,有一些实施例中,生物组织或器官选自心、肾、肝、胃、脾、皮肤、胰腺、肺、脑、眼、肠和膀胱组成的组。在本文公开的所有实施例里,有一些实施例中,与未接触该组合物的生物组织或器官相比,保存或复苏后的生物组织或器官中高能量磷酸盐的含量较高。在本文所述的所有实施例里,有一些实施例中的器官为心脏。在本文所述的所有实施例里,有一些实施例中,与未接触该组合物的生物组织或器官相比,保存或复苏后的生物组织或器官中冠状血流量较高。在本文所述的所有实施例里,有一些实施例中,保存或复苏后心脏的切面百分比变化、射血分数和/或心搏量和心脏输出量中的一个或多与未接触组合物的的心脏相比有所增加。

[0018] 从其他方面讲,本文所述方法用于储存、保存和复苏生物组织或器官,包括生理盐溶液和一个或多个葡萄糖(11-25mM)、谷胱甘肽、抗坏血酸、精氨酸、瓜氨酸(如瓜氨酸苹果酸)、腺苷、肌酸(如肌酸或肌酸乳清酸或其盐(0.5-10mM))、乳清酸(0.5-2.5mM),肌肽(如L-肌肽)(如,L-肉碱),和/或二氯乙酸,其中生理盐溶液包括至少20mM的钾离子和至少37mM的镁离子。在一些实施例中,该方法还包括组合物与胰岛素结合。在一些实施例中,胰岛素在使用前就与组合物结合。在本文公开的所有实施例里,有一些实施例中的组合物保持在10-21±4℃的温度下。在本文公开的所有实施例里,有一些实施例中,生理盐溶液包括选自磷酸钾、氯化钾、氯化钠、碳酸氢钠、氯化钙、磷酸钠、氯化镁、硫酸镁的组成的一种或多种盐。在本文公开的所有实施例里,有一些实施例中的生理盐溶液包含0.44-10mM的磷酸钾。在本文公开的所有实施例里,有一些实施例中的生理盐溶液包含4-65mM的氯化钾。在本文公开的所有实施例里,有一些实施例中的生理盐溶液包含80-135mM的氯化钠。在本文公开的所有实施例里,有一些实施例中的生理盐溶液包含2-25mM升的碳酸氢钠。在本文公开的所有实施例里,有一些实施例中的生理盐溶液包含0-1.5mM的氯化钙。在本文公开的所有实施例里,有一些实施例中的生理盐溶液包含0.15-30mM的磷酸钠。在本文公开的所有实施例里,有一些实施例中的生理盐溶液包含0.5-45mM的氯化镁。在本文公开的所有实施例里,有一些实施例中的生理盐溶液包含0.5-1.5mM的硫酸镁。

[0019] 另一方面,所述试剂盒中含有:生理盐溶液和一个或多个葡萄糖、谷胱甘肽、抗坏

血酸、精氨酸、瓜氨酸(如瓜氨酸苹果酸)、腺苷、肌酸(如肌酸乳清酸或一水合肌酸或盐),肌肽(如L-肌肽)、乳清酸、肉碱(如:L-肉碱),二氯乙酸,和/或胰岛素,其中的生理盐溶液包括至少20mM的钾离子和至少37mM的镁离子。在一些实施例里,生理盐溶液包括选自磷酸钾、氯化钾、氯化钠、碳酸氢钠、氯化钙、磷酸钠、氯化镁、硫酸镁的组成的组的一种或多种盐。在本文公开的所有实施例里,有一些实施例中的试剂盒含有0.4-10mM的磷酸钾。在本文公开的所有实施例里,有一些实施例中的试剂盒含有4-65mM的氯化钾。在本文公开的所有实施例里,有一些实施例中的试剂盒含有80-135mM的氯化钠。在本文公开的所有实施例里,有一些实施例中的试剂盒含有

[0020] 2-25mM的氯化钠。在本文公开的所有实施例里,有一些实施例中的试剂盒含有0-1.5mM的氯化钙。在本文公开的所有实施例里,有一些实施例中的试剂盒含有0.15-0.30mM的磷酸钠。在本文公开的所有实施例里,有一些实施例中的试剂盒含有0.5-45mM的氯化镁。在本文公开的所有实施例里,有一些实施例中的试剂盒含有0.5-1.5mM的硫酸镁。

[0021] 在其他方面,本文所述组合物用于储存、保存和复苏生物组织或器官包括:7mM氯化钾、0.44mM磷酸钾(一价的)、0.5氯化镁(六水)、0.5mM硫酸镁(七水)、125mM氯化钠、5mM碳酸氢钠、1.3mM氯化钙、0.19mM磷酸钠(二价;七水),11mM D-葡萄糖、1.5mM谷胱甘肽(还原型),1mM抗坏血酸,5mM L-精氨酸、1mM L-瓜氨酸苹果酸、2mM腺苷、0.5mM肌酸,2.0mM一水合肌酸或盐,10mM L-肌肽,10mM L-肉碱,和0.5mM二氯乙酸。在一些实施例里,组合物还包括100units/L胰岛素。在一些实施例里,胰岛素在使用前加入到组合物中。在本文所述的所有实施例里,有一些实施例中的组合物保持在 $21 \pm 4^{\circ}\text{C}$ 的温度下。

[0022] 本文所述改进的器官保存液的优点包括:(1)本保存液在低温(4°C)下对心脏保存效果优于目前临床上使用的Celsior与UWS保存液;(2)该保存液在室温下使心脏保持全功能状态,而临床上使用的保存液(如Celsior和UWS)无法做到;(3)该保存液在 $4-25^{\circ}\text{C}$ 范围使心脏保持极佳状态;别的保存液不能(在此温度范围内,心脏的新陈代谢和内稳态能保持平衡或加剧,但在其他的保存液中不能);(4)由于高能量磷酸盐在储存温度范围内保存与合成,所以复苏心脏只需极小的刺激,这在其他的保存液中不能实现;(5)有利于保护(心脏搏动供体)BHD与(心脏死亡供体)DCD的功能,即在温度范围内,心脏死亡后24小时或其它器官死亡72小时以上,而其他溶液不能。

[0023] 除非明确地或清楚地从实施例或方面的上下文中排除,否则这里描述的每个方面和实施例能够一起使用。

[0024] 在整个说明书中,引用了各种专利,专利申请和其他类型的出版物(例如期刊文章,电子数据库记录等)。出于所有目的,本文引用的所有专利,专利申请和其他出版物的公开内容全部引用作为参考。

[0025] 附图的简要说明

[0026] 图1描绘了Somah装置,其使用了专门为体外心脏复苏设计的定制装置。准备两个循环,第一个在心脏的初始再灌注期间通过主动脉顺行灌注冠状动脉,第二个为在工作心脏中通过肺静脉(PV)灌注心脏。简而言之,在回路1(绿色)中,从心脏泵送灌注液腔室到充氧器-热交换器系统,并最终进入主动脉灌注冠状动脉。通过肺动脉(PA)将灌注液返回心腔,完成了该回路。在回路2(红色)中,从心脏腔室泵送到氧合器-热交换器系统的血液被收集在预加载袋中,借助重力排入PV中。压力/流量通过改变预载袋的高度进行调整。这个回

路被分成两个部分。第一部分是进入冠状动脉并通过PA返回心腔的灌注液。第二种成分是通过灌注液形成的,该灌注液通过主动脉继续进入装载后的腔室,从那里灌注液通过重力返回心腔。除了氧合器-换热器系统之外,还将CDI监测器结合到系统中,用于实时监测灌注液pH,温度,氧分压(PO_2),二氧化碳分压(PCO_2),钾离子(K^+)和碳酸氢根(HCO_3^-)的变化。在两个回路的不同点记录了压力和流量。压力和流量数据通过专门为Somah设备(Comdel, Inc., Wahpeton, ND)编写的计算机和HMI软件实时采集和监控。DAS, 数据采集系统。Somah设备的视频和工作的心脏可以在<https://www.youtube.com/watch?v=PTga7aeuVzk>看到。

[0027] 图2描绘了显示实验设计的流程图。图示显示了本研究的一般实验设计,从用于心脏骤停的术中心脏停搏开始到离体心脏再灌注实验结束。

[0028] 图3描述了储存过程中的高能磷酸盐。该图显示了在Somah, Celsior和UWS组心脏中储存5小时期间HEP水平的改变。星号:显着高于对照;匕首:显着低于对照。

[0029] 图4A和图4B描述了再灌注后的心肌酶。在图4A与图4B中分别描绘了用Somah装置再灌注心脏时心脏酶肌酸激酶和肌钙蛋白I释放到离体循环中的图示。星号:与其他组相比显着更高。

[0030] 图5A和图5B描绘再灌注时的代谢变化。在图5A和图5B中分别描绘了在Somah, Celsior和UWS组中在再灌注30分钟内心脏中的心肌耗氧量和乳酸比例改变的图示。星号:显着高于基线。

[0031] 图6A,图6B,图6C和图6D描绘了在体外灌注期间显示功能参数的二维超声心动图分析:图6A中描绘了百分比面积变化;在图6B中描绘了射血分数;每搏输出量如图6C所示。心输出量由Somah, Celsior和UWS组的心脏二维超声心动图推断。图6D描绘了Somah心脏再灌注后左心室前壁和室间隔壁厚度的变化,Celsior和UWS组。星号:显着低于Somah组。

[0032] 图7描绘了实验设计的流程图。图示显示本研究的一般实验设计,从术中心脏停搏至心脏停搏至离体心脏再灌注实验结束。

[0033] 图8描绘了5小时心脏储存过程中的水肿评估。通过电子显微镜(EM)获得心脏活组织检查以评估水肿和缺血性改变(上图;放大倍数:8000 $\times$;在第一张EM图像中插图显示在所有三组中可见典型的发生可逆变化的心肌细胞核,表明染色质材料在核膜下的部分缩合)和4 $^{\circ}C$ (左),13 $^{\circ}C$ (中心)和21 $^{\circ}C$ (右)组心脏组织病理学图像(中图,放大400倍);代表性图像。下面的曲线图显示了三组的储存后心脏自摘取之前重量的变化。M,线粒体;SR,肌质网;G,糖原颗粒。

[0034] 图9A和图9B描绘了工作心脏中的心脏代谢。图9A中描绘了心肌氧耗量(MV02),在图9B中描绘了在4 $^{\circ}C$,13 $^{\circ}C$ 和21 $^{\circ}C$ 下储存的心脏灌注后的乳酸比例。MV02和乳酸盐比例由流出和流入灌注样品中各自参数的差异确定。基线=在血液动力学稳态下再灌注60分钟后;30分钟=再灌注后90分钟时的峰值性能。每个长条分别代表每个Somah的n=6和Celsior组的n=5的平均值 $\pm$ SEM。 $\ddagger$ Celsior与Somah组在相应的时间点的显着变化;*从基线发生显着变化($p<0.05$)。

[0035] 图10A和图10B描绘再灌注后肌酸激酶(CK)和心肌肌钙蛋白-I(cTnI)的释放。在4 $^{\circ}C$,13 $^{\circ}C$ 和21 $^{\circ}C$ 储存的心脏的再灌注开始后,于5分钟和90分钟(峰值性能)中测定在灌流液中的CK(图10A)和cTnI(图10B);每个Somah组为6例,Celsior组为5例。Celsior组有显著性变化($p<0.05$)。

[0036] 图11描绘了在使用经食管超声心动图 (TEE) 探针的体外实验期间采集的二维超声心动图 (2D回声)。使用TEE探针获取离体实验期间的回声图像。图像显示4℃ (左列)、13℃ (中央列) 或21℃ (右列) 体外冠状动脉再灌注心脏峰值机能时, 舒张末期 (左上图) 和收缩末期 (下图) 用TEE探针在左心室乳头肌水平获得的图像 (短轴视图)。独立实验的代表性图像 (每组n=6)。

[0037] 图12A, 图12B和图12C描绘了被存储的心脏的生存力评估。在摘取时 (如图12A所示; 对照) 或之前 (如图12B所示) 或之后 (如图12C所示), 立即摘取心脏活组织检查样品, 在4℃, 10℃, 21℃或37℃下保存在Somah中的心脏循环死亡后捐献的心脏再灌注24小时。绿色荧光 (下图) 指示细胞存活力; 红色荧光 (上图), 损伤的心肌细胞。在Somah中保存24小时的心脏中 (如图12B所示), 在所有温度组中均观察到强烈的活细胞绿色荧光。在4℃、10℃和37℃观察到红色荧光。独立实验的典型图像; 放大320x。

[0038] 图13A, 图13B, 图13C, 图13D和图13E描绘了储存的心脏中的线粒体膜极化。图13A描绘了对照中的线粒体膜极化; 在图13B中描绘了在不同温度下保存24小时Somah中的心脏循环死亡后捐献的心脏; 或图13C描绘了再灌注后。在储存24小时 (如图13D所示) 和再灌注 (如图13E所示) 后, 在各温度组之间以及在再灌注之后极化与去极化的线粒体 (每组n=3) 的比例均未改变。在所有温度组中线粒体极化处于平衡。代表性图像, 320x放大倍数。

[0039] 图14A和图14B描绘了心脏中储存的高能磷酸盐合成。图表显示于不同温度下在Somah储存24小时和模拟再灌注后, 三磷酸腺苷 (ATP; 在图14A中描绘) 和磷酸肌酸 (CP; 在图14B示出) 在摘取 (对照组) 心脏循环死后供体心脏中的浓度。在Somah储存24小时后, 在37℃以下的所有温度组中, ATP和CP合成均显著增 (P<.005)。再灌注时, 储存在4℃和10℃的心脏表现出ATP合成减少 (P<0.005), 但CP合成不变。在21℃和37℃保存的心脏中, 再灌注导致ATP合成增加 (P<0.001) 且在21℃时显著增加, 而CP合成仅在21℃时显著增加 (P<.005)。误差线表示平均值的标准误差。*对照组显著变化。‡预灌注 (24小时储存) 水平的显著变化。

[0040] 图15描绘了心肌细胞的结构和收缩成分。在再灌注之前, 于4℃, 10℃, 21℃或37℃下, 心脏循环死亡后捐献的心脏在Somah中保存24小时。在模拟再灌注之前 (术前) 和之后 (术后) 取左心室活组织检查。研究肌球蛋白重 (H) 和轻 (L), 肌动蛋白, 肌动蛋白和肌钙蛋白C的分辨率。摘取心脏后立即进行对照活检。结构蛋白和收缩蛋白在21℃下保存良好, 但在其他温度组中发生差异性失活。在21℃组再灌注后, 肌球蛋白轻链蛋白迁移至比正常更高的水平, 可能指示磷酸化。

[0041] 图16描绘了实验设计的流程图。图示显示本研究的通用实验设计, 从术中心脏停搏至心脏停搏, 最后到离体心脏再灌注实验结束。

[0042] 图17A, 图17B和图17C是描绘在SOMAH中停搏和储存的心脏中的高能磷酸盐水平。从心脏左心室取组织活检以确定4℃和21℃下SOMAH心麻痹组在心脏储存前5小时和储存5小时后, 包括ATP和CP在内的HEP水平。在一个温度下, 心脏内会随着HEP浓度的增加依赖性地增加心脏停搏的概率。图17A描述了对照组的情况; 图17AB描绘了5小时存储的情况; 图17C描述了标准化值 (相对于0小时为5小时)。每条代表每组n=5的平均值±SEM。*与4℃心麻痹组心脏显著不同。

[0043] 图18A, 图18B和图18C描述再灌注后肌酸激酶和心肌肌钙蛋白-I的释放。CK (在图18A中描绘)、AST (在图18B中描绘) 和cTnI (描绘于图18C) 的水平取决于4℃和21℃下, 心脏

停搏后开始再灌注5分钟和90分钟(峰值性能)时的灌注液;每个SOMAH组 $n=5$ 。*5分钟显著变化($p<0.05$);与相同时间点的4℃心脏停搏液组心脏有显著差异。

[0044] 图19A和图19B是描绘工作心脏中的心脏代谢的条形图。图19A描绘心肌耗氧量,而图19B描绘4℃和21℃下灌注后停搏心脏中的乳酸盐比率(B)。心肌耗氧量和乳酸盐比率取决于各自流出和流入灌注液样品的参数差。基线=在血液动力学稳态下再灌注后60分钟;90分钟=峰值性能。每条代表每组 $n=5$ 的平均值 $\pm$ SEM。

[0045] 图20描述了储存在UWS或Somah溶液中的肝脏的总体外观。DCD肝脏的形态。储存在UWS中的肝脏在储存1小时内显示明显的变色。相比之下,储存在Somah的肝脏在整个72小时储存期间保持其原有颜色和形态。所有肝脏均进行逐步活检进一步分析。代表性图像:UWS $n=7$;Somah $n=6$

[0046] 图21描述了在威斯康星大学(University of Wisconsin)溶液(UWS)和Somah溶液中储存的6小时,24小时和72小时的肝脏的组织病理学表现。注意,胆小管显示储存在UWS中的肝脏发生粘膜溃疡和紊乱、扩大、浓缩的细胞核。这些变化可在早至6小时就被观测到。相比之下,在Somah中储存72小时的肝脏在门静脉区域呈现正常的管腔清楚、圆润均匀的胆小管,和有规则细胞核的完整粘膜。还注意到在上图中,一些门静脉肝细胞呈现出气球样变性和凋亡核(箭头),而在Somah中存储的肝脏中(箭头)的门静脉周围肝细胞呈现正常的细胞边界和异色、开放的有核仁的细胞核。星号表示不同直径的胆管和小管(所有图像,x200)。

[0047] 图22描绘了从在UWS和Somah中冷藏6小时的肝脏上取的胆管的高倍视图(x400)。注意在0小时(箭头,左图)观察到在中等大小的胆管中规则排列的基底细胞核和清楚的管腔。相比之下,注意到在UWS储存的肝脏3点钟位置处的管状核的多色外观,包括一些凝聚核和反应性(增殖)核的变化。注意脱落的物质阻塞肠腔和粘膜的不均匀的染色和锯齿状外观。相比之下,Somah中储存的肝脏胆小管结构正常,粘膜完整。这些变化在不同直径(星号)的胆管中均被观测到。绿色星号表示门静脉/小静脉(x400)。

[0048] 图23A和图23B是描绘储存过程中肝脏中pH、乳酸盐和葡萄糖水平变化的条形图。图形显示DCD肝脏的体外储存期间UWS在溶液(图23A)和Somah溶液(图23B)溶液中pH(上图)、乳酸盐(中图)和葡萄糖(下图)中的时间依赖性变化。在4℃下UWS和Somah中DCD肝脏体外储存72小时期间,对储存溶液中的新陈代谢参数进行即时评估。

[0049] 图24A和图24B描绘了储存的肝脏中的氧气消耗和二氧化碳的产生。图24A显示了氧气消耗的程度,图24B显示了肝脏在UWS和Somah溶液的体外储存期间,在0、6、24小时和72小时的时间点二氧化碳的生成。*Somah的基线水平有显著的变化。

[0050] 图25描绘了显示储存的肝脏中的总磷酸盐。图解显示在DCD肝脏的长期体外储存期间,UWS(上)和Somah(下)中肝组织中的ATP、CP和总磷酸盐水平的时间依赖性变化。* $p<0.05$,与1小时相比。

[0051] 图26描绘了显示器官储存期间肝脏酶的释放。在DCD肝脏的体外保存过程中,在0、6、24和72小时测定UWS或Somah溶液中肝酶的释放。对谷丙转氨酶(上)(ALT),天冬氨酸转氨酶(中)(AST)和肌酸激酶(下)(CK)水平进行评估。

[0052] 图27描绘了显示再灌注诱导的肝酶释放的柱状图。在体外再灌注DCD Somah肝期间,于0(单程)、0.5和2小时测定灌注液(HV)中肝酶的释放。对ALP,GGT,AST,ALT和CK水平进行评估。由于重建的灌注液中72小时储存血液中的酶的内部变异性,将数据标准化为时间0

小时值;独立实验平均值 $\pm$ SEM。

[0053] 图28描绘了显示72小时内贮存在Somah中的肝再灌注诱导的合成和释放白蛋白的条形图。Somah肝脏在灌流液(HV)中即时合成并释放白蛋白。在0.5小时($P<0.03$)和2小时($P<0.01$)白蛋白的合成显著增加。数值代表独立实验的平均值 $\pm$ SEM。

[0054] 图29A和图29B描绘了储存在UW(图29A)或Somah(图29B)中的肾脏的总体形态。将肾脏储存72小时,在4℃体外保存下于0、6、24和72小时取像对整体形态进行评估、取活检并进行组织病理学检查。在所有的时间点,用UW冲洗的肾显示出有不规则斑点的斑块外观(a)。用Somah冲洗的Kidneys显示均匀的颜色和光滑的形态,没有斑块变化(d)。在所有研究的时间点,UW(b,200X;c,400X)和Somah(e,200X;f,400X)储存的DCD肾脏中组织学检查显示没有间质水肿。与Somah肾(f)相比,在6、24和72小时的时间点,较高放大倍数显示UW肾的肾小管上皮细胞有更大倾向发生细胞核染色过度(c)。

[0055] 图30A,图30B,图30C,图30D和图30E描绘了显示储存72小时期间DCD肾脏的UW或Somah溶液中代谢参数改变的条形图。图30A显示pH;图30B显示葡萄糖;图30C显示乳酸盐;图30D显示了pO₂,图30E显示了pCO₂。

[0056] 图31描绘了显示72小时体外保存期间UW(左)和Somah(右)储存的DCD肾脏中能量代谢改变的线图。*与时间0显著不同($p<0.05$)。

[0057] 图32描绘了显示在72小时内储存在UW或Somah溶液中的DCD肾脏中小窝蛋白,内皮一氧化氮合酶(eNOS),血管性血友病因子(vWF)和促红细胞生成素(EPO)蛋白的表达的时间依赖性改变的条形图。

[0058] 图33是描述暴露于Somah的细胞中氨产生和利用的图表。

[0059] 详细描述

[0060] 本领域迫切需要一种器官储存溶液,有助于在大面积的亚常温下(4-25℃)保存来自各种供体组的器官,从而防止由于在极低温(4℃)下储存所致的移植前组织损伤。溶液的组分应该通过提供离子平衡,能量基质,氨的螯合物为一氧化氮合成酶的底物,代谢调节用于产生高能磷酸盐(HEP),清除自由基,抗氧化剂,还原剂,胞内和胞外H⁺螯合作用,以及通过调节半通道和水通道蛋白,来减弱水肿现象,从而在储存过程中,保存心脏(和其他器官)的结构和功能。储存溶液还应该通过选择性地预加载减弱局部缺血再灌注损伤(IRI),在缺氧储存期间协同组分以抵消最初高氧状态后再灌注的有害作用,并且因此防止再灌注损伤,并且永久性地平稳快速过渡到常氧状态,有氧代谢和最佳机械功能。一种理想的保存液应协同1)缺血性储存期间保存器官;2)用代谢产物引发器官从高氧迅速转化为常氧状态,在再灌注时持续机电作用;和3)预防缺血再灌注(IR)损伤。这种溶液将有可能在捐献器官移植入受体之前,极大地延长其体外保存时间。

[0061] 本文所述的发明,尤其提供了用于保存哺乳动物器官和组织的组合物,以及使用该组合物的方法和试剂盒。虽然任何哺乳动物器官或组织都能保存在当前所述方法所制备的组合物中,但对体外储存心脏尤为有利。与目前可用的用于保存体外心脏的组合物和技术相比,在移植到受体之前,本发明的组合物和方法允许在从供体取出后离体储存24-72小时。再进一步,与目前可用于心脏保存的组合物相比,其需要在接近冰点的温度下储存,而本发明的组合物和方法可以在环境温度下储存心脏,不发生大量水肿现象,并且不存在由低温贮存引起的典型性心脏冷介导组织和细胞损伤。增加的储存时间与在储存期间将心脏

维持在环境温度的能力相结合,将使供体心脏在显著增加的时间段内运输更长的距离,并且不需要使用当前所述的组合物进行冷藏。由于,心脏捐献供应短缺,本发明的组合物和方法可能使心脏到达比目前可能的距离更远的合适移植的受体。

[0062] I. 定义

[0063] 如本文所用,术语“生理盐”是指当在给定浓度的水溶液中,为细胞或生理功能提供所需的任何盐。生理盐的实例包括但不限于碱金属、碱土金属氯化物、磷酸盐和硫酸盐,如KCl、NaCl、MgCl₂、MgSO₄及其混合物。

[0064] “受试者”可以是脊椎动物,哺乳动物或人。哺乳动物包括但不限于家畜、走兽、宠物、灵长类、小鼠和大鼠。在一方面,一位受试者是指一个人。

[0065] 本文所用的“正常温度”是指在约36.4-37.1℃,例如36.4℃,36.5℃,36.6℃,36.7℃,36.8℃,36.9℃,37℃或37.1℃的范围内的任何温度。本文所用的,“环境温度”或“亚常温下的温度”是指在10-21±4℃范围内的温度,或在其它实施例中,在21±2℃范围内的温度,如约6℃,7℃,8℃,9℃,10℃,11℃,12℃,13℃,14℃,15℃,16℃,17℃,18℃,19℃,20℃,21℃,22℃,23℃,24℃或25℃。“过低温度”或“低温”是指温度在大约0℃到大约5℃之间,例如大约0℃,1℃,2℃,3℃,4℃,或5℃。

[0066] 除非另有定义,否则文中所用的所有技术及科学术语具有本发明所属领域的一般技术者通常理解的含义

[0067] 本文所使用的,除非上下文另有明确指示,否则单数术语“一”(“a”),“一个”(“an”)和“该”(“the”)包括复数指代。

[0068] 与“包括”,“包含”或“特征在于”等同的过渡性术语“包含”是包含性的或开放性的,并且不排除额外的,未陈述的要素或方法步骤。相比之下,过渡性短语“由.....组成”排除了权利要求中未指定的任何要素,步骤或成分。过渡性短语“基本上由.....组成”将权利要求的范围限制为指定的材料或步骤以及不会实质上影响本发明公开的基础和新颖性。

[0069] II. 发明的成分

[0070] 目前可用于储存器官(如供体心脏)的技术和组合物在发生不可逆的冷介导组织和细胞损伤之前,仅允许约4-6小时的储存。本发明的组合物用于在约10-21±4℃,如约4℃,5℃,6℃,7℃,8℃,9℃,10℃,11℃,12℃,13℃,14℃,15℃,16℃,17℃,18℃,19℃,20℃,21℃,22℃,23℃,24℃或25℃,包括所有位于此温度及其区间的值(比如在10-25℃之间),保存或复苏生物组织或器官。组织或器官可以在本文所述的组合物中储存约24-72小时,例如约1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,21,22,23,24,25,26,27,28,29,30,31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42,43,44,45,46,47,48,49,50,51,52,53,54,55,56,57,58,59,60,61,62,63,64,65,66,67,68,69,70,71,72或更多小时,细胞高能磷酸盐的量没有显著降低,或没有显著的水肿增加。与当前使用的器官保存溶液中储存的心脏相比,储存在本发明组合物中的心脏,在移植到有需要的受试者中之前,增加了心脏再生时诸如冠状动脉血流量,部分面积变化百分比,射血分数和/或每搏输出量的生理测量。

[0071] 任何器官或生物组织可以储存在本文所述的组合物中,例如心脏,肾脏,肝脏,胃,脾脏,皮肤,胰腺,肺,脑,眼睛,肠或膀胱,这些中的任一种。在某些实施例中,储存的是心

脏。

[0072] A.生理盐水溶液

[0073] 本发明的组合物可以是水溶液(即水基的)或粉末状固体(在使用前用蒸馏水重构)或其组合溶液,其包括一种或多种生理盐溶液,葡萄糖,谷胱甘肽,抗坏血酸,精氨酸,瓜氨酸苹果酸,腺苷,肌酸乳清酸,一水合肌酸或其盐,乳清酸,苹果酸,肌肽,肉碱和/或二氯乙酸,其中所述生理盐溶液包含至少20mM钾离子和至少37mM镁离子。生理盐溶液,可以包括任何盐,在给定浓度的水溶液中,帮助或提供生理功能所需,例如维持生物组织或器官内部和外部的离子浓度以及控制穿过细胞膜的水量。生理盐溶液的成分也可以帮助缓冲并维持适当的pH值。本发明中可使用的天然盐类包括但不限于氯化钾,磷酸钾,氯化镁,硫酸镁,氯化钙,氯化钠,碳酸氢钠和磷酸钠。

[0074] 本文公开的任何组合物的生理盐溶液都可以含有钠离子源。钠离子可以钠盐的形式加入到生理盐溶液中,例如选自 NaAlO_2 , NaBO_2 , NaCl , NaClO , NaClO_2 , NaClO_3 , NaClO_4 , NaF , Na_2FeO_4 , NaHCO_3 , NaH_2PO_4 , NaHSO_3 , NaHSO_4 , NaI , NaMnO_4 , NaNH_2 , NaNO_2 , NaNO_3 , NaOH , NaPO_2H_2 , NaSH , Na_2MnO_4 , Na_3MnO_4 , $\text{Na}_2\text{N}_2\text{O}_2$, Na_2O_2 , Na_2SO_3 , Na_2SO_4 , $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$, Na_2SeO_3 , Na_2SeO_4 , Na_2SiO_3 , $\text{Na}_2\text{Si}_2\text{O}_5$, Na_4SiO_4 , $\text{Na}_2\text{Ti}_3\text{O}_7$, $\text{Na}_2\text{Zn}(\text{OH})_4$, $\text{NaH}_2\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$, 和 Na_3PO_4 组成的组的一种或多种钠盐。在一些实施例中,生物组织和器官储存组合物中的钠离子的浓度可为约80–145mM,诸如约80mM,约81mM,约82mM,约83mM,约84mM,约85mM,约86mM,约87mM,约88mM,约89mM,约90mM,约91mM,约92mM,约93mM,约94mM,约95mM,约96mM,约97mM,约98mM,约99mM,100mM,约101mM,约102mM,约103mM,约104mM,约105mM,约106mM,约107mM,约108mM,约109mM,约110mM,约111mM,约112mM,约113mM,约114mM,约115mM,约116mM,约117mM,约118mM,约119mM,约120mM,约121mM,约122mM,约123mM,约124mM,约125mM,约126mM,约127mM,约128mM,约129mM,约130mM,约131mM,约132mM,约133mM,约134mM,约135mM,约136mM,约137mM,约138mM,约139mM,约140mM,约141mM,约142mM,约143mM,约144mM或约145mM,包括所有这些值及其范围内的值。

[0075] 在本文公开的组合物其它实施例中,生理盐溶液含有氯化钠。储存生物组织和器官的组合物中氯化钠的浓度可以在约80–135mM之间,诸如约80mM,约81mM,约82mM,约83mM,约84mM,约85mM,约86mM,约87mM,约88mM,约89mM,约90mM,约91mM,约92mM,约93mM,约94mM,约95mM,约96mM,约97mM,约98mM,约99mM,100mM,约101mM,约102mM,约103mM,约104mM,约105mM,约106mM,约107mM,约108mM,约109mM,约110mM,约111mM,约112mM,约113mM,约114mM,约115mM,约116mM,约117mM,约118mM,约119mM,约120mM,约121mM,约122mM,约123mM,约124mM,约125mM,约126mM,约127mM,约128mM,约129mM,约130mM,约131mM,约132mM,约133mM,约134mM或约135mM,包括所有这些值及其范围内的值。在另一个实施例中,储存生物组织和器官的组合物可以含有约7.3g/L氯化钠。

[0076] 在本文公开组合物的进一步实施例中,生理盐溶液中含有磷酸钠。储存生物组织和器官的组合物中磷酸钠的浓度可以在约0.15–30mM之间,例如约0.15mM,约0.16mM,约0.17mM,约0.18mM,约0.19mM,约0.2mM,约0.21mM,约0.22mM,约0.23mM,约0.24mM,约0.25mM,约0.5mM,约1mM,约2mM,约3mM,约4mM,约5mM,约6mM,约7mM,约8mM,约9mM,约10mM,约11mM,约12mM,约13mM,约14mM,约15mM,约16mM,约17mM,约18mM,约19mM,约20mM,约21mM,约22mM,约23mM,约24mM,约25mM,约26mM,约27mM,约28mM,约29mM或约30mM,包括所有这些值及其范围

内的值。在另一个实施例中,储存生物组织和器官的组合物可以含有约0.05g/L磷酸钠。在本发明中可以使用任何形式的磷酸钠,包括但不限于二元七水合物形式。

[0077] 在本文公开组合物的另一个实施例中,生理盐溶液中含有碳酸氢钠。储存生物组织和器官的组合物中碳酸氢钠的浓度可以在约2-25mM之间,例如约2mM,约3mM,约4mM,约5mM,约6mM,约7mM,约8mM,约9mM,约10mM,约11mM,约12mM,约13mM,约14mM,约15mM,约16mM,约17mM,约18mM,约19mM,约20mM,约21mM,约22mM,约23mM,约24mM,约25mM,包括所有这些值及其范围内的值。在另一个实施例中,储存生物组织和器官的组合物可以含有约0.35g/L碳酸氢钠。

[0078] 在本文公开的组合物的另一个实施例中,生理盐溶液含有钙离子(例如由氯化钙一类钙盐提供的钙离子)。在某些实施例中,储存生物组织和器官的组合物中钙离子的浓度可以在约0-1.5mM之间,例如约0.1mM,约0.2mM,约0.3mM,约0.4mM,约0.5mM,约0.6mM,约0.7mM,约0.8mM,约0.9mM,约1mM,约1.1mM,约1.2mM,约1.3mM,约1.4mM或约1.5mM,包括所有这些值及其范围内的值。在另一个实施例中,本文公开的组合物生理盐溶液含有由一种或多种钙盐(例如选自乙酸钙、铝酸钙、铁铝酸钙、硅铝酸钙、硝酸铵钙、砷酸钙、抗坏血酸钙、迭氮化钙、苯甲酸钙、 β -羟基- β -甲基丁酸钙、碳酸氢钙、亚硫酸氢钙、硼酸钙、溴酸钙、溴化钙、碳化钙、碳酸钙、氯酸钙、铬酸钙、柠檬酸钙、柠檬酸苹果酸钙、钛酸铜钙、氰氨化钙、谷氨酸钙、异抗坏血酸钙、氟化钙、甲酸钙、延胡索酸钙、葡乳醛酸钙、葡庚糖酸钙、葡萄糖酸钙、甘油磷酸钙、鸟苷酸钙、六硼化钙、氢化钙、氢氧化钙、次氯酸钙、肌苷酸钙、碘酸钙、碘化钙、乳酸钙、乳酸葡萄糖酸钙、醋酸钙、苹果酸钙、单氢钙、单磷酸钙、吗啉酸钙、硝酸钙、氮化钙、亚硝酸钙、草酸钙、氧化钙、潘氨酸钙、高氯酸钙、钙高锰酸盐、过氧化钙、磷酸钙、磷化钙、丙酸钙、焦磷酸钙、硅酸钙、水化硅酸钙、硅化钙、山梨酸钙、硬脂酸钙、硫酸钙、硫酸钙、硫化钙、亚硫酸钙、酒石酸钙、钛酸钙、氯化钙和氰化钙。

[0079] 本文公开的任何组合物的生理盐溶液可以含有钾离子源。钾离子可以以钾盐的形式加入到生理盐溶液中,例如选自KAsO₂,KBr,KBrO₃,KCN,KCNO,KCl,KClO₃,KClO₄,KF,KH,KHCO₂,KHCO₃,KHF₂,KHS,KHSO₃,KHSO₄,KH₂AsO₄,KH₂PO₃,KH₂PO₄,KI,KIO₃,KIO₄,KMnO₄,KN₃,KNH₂,KNO₂,KNO₃,KOCN,KOH,KO₂,KPF₆,KCH₃COO,K₂Al₂O₄,K₂CO₃,K₂CrO₄,K₂Cr₂O₇,K₂FeO₄,K₂HPO₄,K₂MnO₄,K₂O,K₂O₂,K₂S,K₂SeO₄,K₂SO₃,K₂SO₄,KHSO₅,K₂S₂O₅,K₂S₂O₇,K₂S₂O₈,K₂SiO₃,K₃[Fe(C₂O₄)₃],K₄[Fe(CN)₆],K₃PO₄,和K₄Mo₂C₁₈组成的组的一种或多种钾盐。在一些实施例中,生物组织和器官储存组合物中的钾离子的浓度可为约4-65mM,诸如约4mM,约5mM,约6mM,约7mM,约8mM,约9mM,约10mM,约11mM,约12mM,约13mM,约14mM,约15mM,约16mM,约17mM,约18mM,约19mM,约20mM,约21mM,约22mM,约23mM,100mM,约24mM,约25mM,约26mM,约27mM,约28mM,约29mM,约107mM,约30mM,约31mM,约32mM,约33mM,约111mM,约34mM,约35mM,约36mM,约37mM,约38mM,约39mM,约40mM,约41mM,约42mM,约43mM,约44mM,约45mM,约46mM,约47mM,约48mM,约49mM,约50mM,约51mM,约52mM,约53mM,约54mM,约55mM,约56mM,约57mM,约58mM,约59mM,约60mM,约61mM,约62mM,约63mM,约64mM或约65mM,包括所有这些值及其范围内的值。在本文公开组合物的其它实施例中,生理盐溶液中含有磷酸钾。储存生物组织和器官的组合物中磷酸钾的浓度可以在约0.4-10mM之间,例如约0.5mM,约0.6mM,约0.7mM,约0.8mM,约0.9mM,约1mM,约2mM,约3mM,约4mM,约5mM,约6mM,约7mM,约8mM,约9mM或约10mM,包括所有这些值及其范围内的值。在另一个实施例中,储存生物组织和器官的组合物可以含有约

0.06g/L磷酸钾。在本发明中可以使用任何形式的磷酸钾,包括但不限于一元形式。

[0080] 在本文公开组合物的某些实施例中,生理盐溶液中含有氯化钾。在一些实施例中,生物组织和器官储存组合物中的钾离子的浓度可为约4-65mM,诸如约4mM,约5mM,约6mM,约7mM,约8mM,约9mM,约10mM,约11mM,约12mM,约13mM,约14mM,约15mM,约16mM,约17mM,约18mM,约19mM,约20mM,约21mM,约22mM,约23mM,100mM,约24mM,约25mM,约26mM,约27mM,约28mM,约29mM,约107mM,约30mM,约31mM,约32mM,约33mM,约111mM,约34mM,约35mM,约36mM,约37mM,约38mM,约39mM,约40mM,约41mM,约42mM,约43mM,约44mM,约45mM,约46mM,约47mM,约48mM,约49mM,约50mM,约51mM,约52mM,约53mM,约54mM,约55mM,约56mM,约57mM,约58mM,约59mM,约60mM,约61mM,约62mM,约63mM,约64mM或约65mM,包括所有这些值及其范围内的值。在另一个实施例中,储存生物组织和器官的组合物可以含有约0.522g/L氯化钾。

[0081] 本文公开的任何组合物的生理盐溶液可以含有镁离子源。镁离子可以镁盐的形式加入到生理盐溶液中,例如选自 MgB_2 , MgBr_2 , MgCO_3 , MgC_2O_4 , $\text{MgC}_6\text{H}_6\text{O}_7$, $\text{MgC}_{14}\text{H}_{10}\text{O}_4$, MgCl_2 , $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$, MgF_2 , MgH_2 , $\text{Mg}(\text{HCO}_3)_2$, MgI_2 , $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$, MgO ,

[0082] MgO_2 , $\text{Mg}(\text{OH})_2$, MgS , MgSO_3 , MgSO_4 , Mg_2Al_3 , Mg_2Si , Mg_2SiO_4 , $\text{Mg}_2\text{Si}_3\text{O}_8$, Mg_3N_2 , $\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2$, 和 $\text{Mg}_2(\text{CrO}_4)_2$ 组成的组的一种或多种镁盐。在某些实施例中,储存生物组织和器官的组合物中镁离子的浓度可以在约0.5-45mM之间,诸如约0.5mM,约0.6mM,约0.7mM,约0.8mM,约0.9mM,约1mM,约2mM,约3mM,约4mM,约5mM,约6mM,约7mM,约8mM,约9mM,约10mM,约11mM,约12mM,约13mM,约14mM,约15mM,约16mM,约17mM,约18mM,约19mM,约20mM,约21mM,约22,约23mM,约24mM,约25mM,约26mM,约27mM,约28mM,约29mM,约30mM,约31mM,约32mM,约33mM,约34mM,约35mM,约36mM,约37mM,约38mM,约39mM,约40mM,约41mM,约42mM,约43mM,约44mM或约45mM,包括所有这些值及其范围内的值。

[0083] 在本文公开组合物的更进一步实施例中,生理盐溶液中含有氯化镁。储存生物组织和器官的组合物中氯化镁的浓度可以在约0.5-45mM之间,诸如约0.5mM,约0.6mM,约0.7mM,约0.8mM,约0.9mM,约1mM,约2mM,约3mM,约4mM,约5mM,约6mM,约7mM,约8mM,约9mM,约10mM,约11mM,约12mM,约13mM,约14mM,约15mM,约16mM,约17mM,约18mM,约19mM,约20mM,约21mM,约22,约23mM,约24mM,约25mM,约26mM,约27mM,约28mM,约29mM,约30mM,约31mM,约32mM,约33mM,约34mM,约35mM,约36mM,约37mM,约38mM,约39mM,约40mM,约41mM,约42mM,约43mM,约44mM或约45mM,包括所有这些值及其范围内的值。在另一个实施例中,储存生物组织和器官的组合物可以含有约101.00g/L氯化镁。在本发明中可以使用任何形式的氯化镁,包括但不限于六水合物形式。

[0084] [1]在本文公开的组合物的其它实施例中,生理盐溶液含有硫酸镁。储存生物组织和器官的组合物中硫酸镁的浓度可以在约0.5-1.5mM之间,例如约0.5mM,约0.6mM,约0.7mM,约0.8mM,约0.9mM,约1mM,约2mM,约3mM,约1.1mM,约1.2mM,约1.3mM,约1.4mM或约1.5mM,包括所有这些值及其范围内的值。在另一个实施例中,储存生物组织和器官的组合物可以含有约0.123g/L硫酸镁。在本发明中可以使用任何形式的氯化镁,包括但不限于七水化物形式。

[0085] B. 其他成分

[0086] [2]除生理盐溶液外,本发明的组合物还可以包括葡萄糖,谷胱甘肽,抗坏血酸,精氨酸,瓜氨酸(如瓜氨酸苹果酸及其盐),腺苷,肌酸(如肌酸乳清酸盐或一水合肌酸或其

盐),乳清酸,苹果酸及其盐,肌肽,肉碱,二氯乙酸和/或胰岛素。该溶液不含胰岛素的情况下制造和销售。规定浓度的胰岛素在使用时或在使用之前不久或在使用之前添加,例如,正好在(例如约30秒,或1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,20,25,30,35,40,45,50,55,60或更多分钟前)注射到活体患者的器官中之前或者就在离体器官灌注前或将器官浸入溶液中前。

[0087] [3]糖,如葡萄糖等六碳糖(如D-葡萄糖或右旋糖)和/或五碳糖如核糖,可作为生产高能磷酸盐(如ATP)的底物,并可以一定浓度包含在本文所述的储存生物组织和器官的组合物中,以约5-25mM,例如约5mM,6mM,7mM,8mM,9mM,10mM,11mM,12mM,10mM,15mM,16mM,17mM,18mM,19mM,20mM,21mM,22mM,23mM,24mM或25mM,包括所有这些值及其范围内的值。在一个实施例中,葡萄糖的浓度为约1.98g/L。在另一个实施例中,葡萄糖以约11mM的浓度存在。

[0088] 生物组织和器官的储存期间可以生成活性氧;然而,存在于溶液中的抗坏血酸和还原型谷胱甘肽(即还原剂)可以在储存期间消耗氧自由基。因此,抗坏血酸和还原型谷胱甘肽都可以约0.5mM至3mM的浓度,例如约0.5mM,1mM,1.5mM,2mM,2.5mM或3mM,包括所有这些值及其范围内的值,存在于本文所述的用于储存生物组织及器官的组合物中。在一个实施例中,抗坏血酸浓度为约0.178g/L。在另一个实施例中,抗坏血酸以约1mM的浓度存在。在某些实施例中,还原型谷胱甘肽浓度为约0.462g/L。在另一个实施例中,还原型谷胱甘肽以约1.5mM的浓度存在。

[0089] 本文公开的储存生物组织和器官的组合物有助于通过三羧酸(TCA)循环产生ATP。在瓜氨酸苹果酸-精氨酸循环中,苹果酸(从瓜氨酸裂解)进入TCA循环以产生更多的ATP。而且,瓜氨酸苹果酸转化为精氨酸和延胡索酸;延胡索酸进入TCA循环以促进更多的ATP产生。TCA循环中的苹果酸和延胡索酸导致更多的ATP产生。

[0090] 另外,虽然通常已知正常生理环境下,只有肝脏能在尿素循环中代谢掉氨的毒性,以便其被肾脏排出,但本文公开的储存器官的组合物可能能够驱动其它有毒的铵离子,通过瓜氨酸,参与大多数器官和组织中的一氧化氮合成(见图33)。NO的产量增加对于器官的长期储存是非常有益的。具体而言,一旦在收获和储存期间中断器官的循环,作为蛋白质退化性分解的一部分,转氨酶(和/或蛋白酶)反应就会加速。这些酶代谢成氨基酸,从而释放可能积聚在储存液中的铵离子,可能对组织造成毒性和损伤。为了抵消这种有害改变,本文所述的器官储存液中瓜氨酸、瓜氨酸苹果酸和/或其盐,可以为铵产量的增加提供一种平衡。不受理论束缚,认为L-瓜氨酸推动NO循环使铵离子与谷氨酰胺结合形成氨甲酰磷酸(见图33)。铵离子将与存在于细胞中的谷氨酰胺结合形成氨基甲酰磷酸,通过形成L-瓜氨酸将其驱入NO循环保持了这一循环,并防止瓜氨酸消耗,溶液中可加入瓜氨酸苹果酸。在NO生产过程中,瓜氨酸代谢为精氨酸(导致NO产生)和Krebs循环(即三羧酸循环)的中间体(参见图33)。这些中间产物如琥珀酸盐、延胡索酸盐和苹果酸盐进入Krebs循环,导致产生额外的ATP,从而进一步促进储存的器官内能量状态的保存。此外,与缺少这些成分的储存液产生的高能磷酸盐(HEPs)相比,本文公开的任何溶液所储存的器官中,肌肽和肉碱结合,协同产生更大量的高能磷酸盐。在另一个实施例中,与缺少这些成分的储存液产生的高能磷酸盐(HEPs)相比,本文公开的溶液所储存的器官中,肌肽、肉碱、葡萄糖和肌酸结合,协同产生更大量的高能磷酸盐。在其它实施例中,与缺少这些成分的储存液产生的NO相比,本文公开的

溶液所储存的器官中,瓜氨酸和精氨酸结合,协同产生更大量的氧化亚氮(NO)。由这些成分组合而产生的协同效应既出乎意料又令人惊讶。

[0091] 因此,精氨酸(例如L-精氨酸)和瓜氨酸(例如瓜氨酸苹果酸,例如L-瓜氨酸苹果酸或其盐)可以约0.5mM至约7mM的浓度存在于本文所述的储存生物组织和器官的组合物中,例如约0.5mM,1mM,1.5mM,2mM,2.5mM,3mM,3.5mM,4mM,4.5mM,5mM,5.5mM,6mM,6.5mM或7mM中的任一个,包括所有这些值及其范围内的值。在一些实施例中,储存器官的组合物不包含瓜氨酸苹果酸。在一个实施例中,精氨酸的浓度为约1.074g/L。在另一个实施例中,精氨酸以约5mM的浓度存在。在一个实施例中,瓜氨酸苹果酸浓度为约0.175g/L。在另一个实施例中,瓜氨酸苹果酸以约1mM的浓度存在。任选地,瓜氨酸(例如L-瓜氨酸)和苹果酸可以约1-10mM瓜氨酸(例如约1mM,2mM,3mM,4mM,5mM,6mM,7mM,8mM,9mM或10mM,包括所有这些值及其范围内的值)和约1-5mM苹果酸(例如约1mM,2mM,3mM,4mM,5mM或5mM,包括所有这些值及其范围内的值)的量,单独添加到组合物中。在一些实施例中,储存器官的组合物不包含瓜氨酸和瓜氨酸苹果酸。但在其他实施例中,储存器官的组合物包含约0.001至约7mM的苹果酸,例如约0.001mM,1mM,2mM,3mM,4mM,5mM,6mM或7mM中的任一值。进一步的实施例中,储存器官的溶液不包括苹果酸盐和苹果酸。

[0092] 另一用于维持ATP水平的成分是腺苷。腺苷可以约1mM至4mM的浓度,例如约1mM,1.5mM,2mM,2.5mM,3mM,3.5mM或4mM,包括所有这些值及其范围内的值,存在于本文所述的用于存储生物组织及器官的组合物中。在一个实施例中,腺苷的浓度为约0.534g/L。在另一个实施例中,腺苷以约2mM的浓度存在。腺苷也改变心脏的两极分化,以使心脏迅速停搏;促进冠状血管的增宽,促进心脏(器官)在储存期间与器官储存溶液的分布/灌注,由此减弱缺氧/缺血造成的相关损伤。腺苷还减慢了钾离子(K⁺)诱导的膜去极化的速率,并降低了K⁺诱导的心室肌细胞内的钙离子(Ca²⁺)负载。不受理论束缚,这样的发现支持腺苷能在高钾停搏液中或在手术期间和/或通过促进器官温和停搏来摘取器官,对心脏起到保护作用这一概念;特别适用于高K⁺情况,以防止由此引起的心脏内在损伤。此外,不受理论束缚,除了在产生高能磷酸盐和离子稳态中的作用之外,镁还通过预处理保护心脏免于反复缺血和损伤,特别是在延长的器官储存期间以及在心脏开心手术或移植时防止术后心室心律失常。高浓度的钾和镁也能防止线粒体中的钙积累以及随后对器官的损伤。

[0093] 在本文所公开的存储生物组织和器官的组合物的一些实施例中,该组合物溶液含有肌酸。I在一些实施例中,肌酸是以肌酸乳清酸和/或肌酸或其盐的形式存在的。储存生物组织和器官的组合物中肌酸的浓度可以在约2-5mM之间,例如约2mM,约3mM,约4mM或约5mM,包括所有这些值及其范围内的值。在另一个实施例中,储存生物组织和器官的组合物可以含有约0.5mM肌酸乳清酸。在另一个实施例中,储存生物组织和器官的组合物可以含有约0.27g/L肌酸乳清酸。在其它实施例中,储存生物组织和器官的组合物可以含有约2mM一水合肌酸或其盐。在另一实施例中,储存生物组织和器官的组合物可以含有约0.3g/L一水合肌酸或其盐。还在另一实施例中,储存生物组织和器官的组合物可以含有0.5mM肌酸肌酸乳清酸和2mM一水合肌酸或其盐。肌酸乳清酸可能难以获得。因此,在一些实施例中,可以将其改为0.5mM乳清酸及其盐(0.50-2.50mM)和2.50mM一水合肌酸或其盐(2.50-10mM)。离体和体内实验均显示,在再灌注开始时,镁乳清酸盐(Mg-Or)给药对心肌功能和IS有益。体外试验表明,Mg-Or显著延迟脑缺血/再灌注(I/R)后开放的线粒体孔隙转变(mPTP)。不受理论束

缚,这表明在再灌注开始时施用Mg-0r可保护心肌功能并减少IS。这种有益效果可能与开放的mPTP显著降低有关,这是I/R后通过细胞凋亡引起心脏细胞死亡的常见起因。

[0094] 在本文公开的储存生物组织和器官的组合物的一些实施例中,所述组合物溶液含有细胞内酸性缓冲剂,例如肌肽(例如L-肌肽)。储存生物组织和器官的组合物中肌肽的浓度可以在约5-15mM之间,例如约5mM,约6mM,约7mM,约8mM,约9mM,约10mM,约11mM,约12mM,约13mM,约14mM或约15mM,包括所有这些值及其范围内的值。在另一个实施例中,储存生物组织和器官的组合物可以含有约2.3g/LL-肌肽。

[0095] 在本文公开的储存生物组织和器官的组合物其它实施例中,所述溶液含有肉碱(例如L-肉碱),其有助于降低心肌乳酸的产生,从而降低酸度。储存生物组织和器官的组合物中肉碱的浓度可以在约5-15mM之间,例如约5mM,约6mM,约7mM,约8mM,约9mM,约10mM,约11mM,约12mM,约13mM,约14mM或约15mM,包括所有这些值及其范围内的值。在另一个实施例中,储存生物组织和器官的组合物可以含有约2g/LL-肉碱。

[0096] 如果二氯乙酸存在于本文公开的储存生物组织和器官的组合物中,则其可以通过降低保存的器官中的乳酸盐水平来控制酸度,从而降低溶液的酸度。储存生物组织和器官的组合物中二氯乙酸的浓度可以在约0.1-2.5mM之间,例如约0.1mM,约0.2mM,约0.3mM,约0.4mM,约0.5mM,约0.6mM,约0.7mM,约0.8mM,约0.9mM,约1mM,约1.1mM,约1.2mM,约1.3mM,约1.4mM,约1.5mM,约1.6mM,约1.7mM,约1.8mM,约1.9mM,约2mM,约2.1mM,约2.2mM,约2.3mM,约2.4mM,约2.5mM,包括所有这些值及其范围内的值。在另一个实施例中,储存生物组织和器官的组合物可以含有约0.08g/L二氯乙酸。在其它实施例中,储存生物组织和器官的组合物不含二氯乙酸。

[0097] 在本文所公开的存储生物组织和器官的组合物进一步实施例中,该组合物溶液含有胰岛素。在其它成分混合之后和/或恰在使用本文公开的储存组合物之前,可以加入胰岛素。例如,可以在将器官浸入溶液之前,加入胰岛素例如0.5,1,2,5分钟至数小时,例如0.5,1,2,3,4或5小时。在一些实施例中,将约100units/L的胰岛素加入到储存生物组织和器官的组合物中。

[0098] 本文公开的储存生物组织和器官的组合物可以保持在中性或弱碱性pH,例如约pH7,7.1,7.2,7.3,7.4,7.5,7.6或7.7,包括所有这些值及其范围内的值。在一个实施例中,储存生物组织和器官的组合物pH为7。在另一个实施例中,使用Tris-三羟甲基氨基甲烷(THAM)调节储存生物组织和器官的组合物pH。

[0099] 在其他实施例中,储存器官的组合物包含表I所示的针对iSomah活性,在去离子水,蒸馏水和/或抑菌水中组合的以下名词或基本成分:

[0100] 表I

[0101]

成分	数量
蒸馏水	1L
氯化钾	至少 20 毫摩钾离子与偏磷酸钾相结合
磷酸钾	至少 20 毫摩钾离子与氯化钾相结合
氯化镁	至少 37 毫摩镁离子与硫酸镁相结合
硫酸镁	至少 37 毫摩镁离子与氯化镁相结合
氯化钠	100-115 毫摩
碳酸氢钠	5-15 毫摩
磷酸钠	10-40 毫摩
谷胱甘肽	1.5-5.0 毫摩
抗坏血酸	1.0-5 毫摩
腺苷	2-5 毫摩

[0102] 在一些实施例中,表I所示的非限制性制剂中的磷酸钾可以是磷酸二氢钾。在另一实施例中,表I所示的非限制性制剂中的氯化镁可以是六水氯化镁。在其它实施例中,表I所示的非限制性制剂中的硫酸镁可以是七水硫酸镁。在其它实施例中,表I所示的非限制性制剂中的磷酸钠可以是磷酸氢二钠七水合物。在一些实施例中,表I所示的非限制性制剂中的谷胱甘肽可以是还原型谷胱甘肽。在一些实施例中,表I所示的非限制性制剂中的肌酸可以是一水合肌酸或其盐。在其它实施例中,表I中所示的非限制性制剂可以进一步包含浓度在约2至约10mM之间的一种或多种精氨酸(例如L-精氨酸),例如约2mM,3mM,4mM,5mM,6mM,7mM,8mM,9mM或10mM,肌肽(例如L-肌肽),浓度在约5至约10mM之间,例如约5mM,6mM,7mM,8mM,9mM或10mM(对于10mM为2.26g/L),浓度在约5至约10mM之间的肉碱(例如L-肉碱),例如5mM,6mM,7mM,8mM,9mM或10mM(对于10mM为2.26g/L),乳清酸,例如浓度为约0.5-2mM,例如约0.5,1,1.5或2mM,或肌酸(例如,一水合肌酸或其盐),浓度为约2至5mM,例如约2mM,3mM,4mM或5mM中的任一者。在另一个实施例中,表I中所示的非限制性制剂可以进一步包含浓度为10mg-100mg/ml/Liter或100-1000Units/L的胰岛素。当组合物中包含胰岛素时,其可在用作器官保存液之前选择性加入。

[0103] 在其它实施例中,表I中所示的非限制性制剂可以进一步包含糖,例如但不限于六碳糖(例如阿洛糖,阿卓糖,半乳糖,葡萄糖(包括D-葡萄糖(又称右旋糖),L-葡萄糖),古洛糖,艾杜糖,甘露糖,塔罗糖,果糖,阿洛酮糖,山梨糖,塔格糖,岩藻糖,墨角藻糖或鼠李糖)或五碳糖(例如阿拉伯糖,来苏糖,核糖,木糖,酮戊糖,核酮糖,或木酮糖,例如约11mM至约25mM,例如任何约11mM,12mM,13mM,14mM,15mM,16mM,17mM,18mM,19mM,20mM,21mM,22mM,23mM,24mM或25mM糖。

[0104] 在其他实施例中,表I中所示的非限制性制剂可以任选地包含浓度为约1-10mM的瓜氨酸(例如L-瓜氨酸)或其盐浓度约为2到10mM,例如任何约2mM,3mM,4mM,5mM,6mM,7mM,8mM,9mM或10mM。在另一个实施例中,表II中所示的非限制性制剂可以任选地包含约0-10mM苹果酸,例如任何约0mM,1mM,2mM,3mM,4mM,5mM,6mM,7mM,8mM,9mM或10mM。在另一个实施例中,表I中所示的非限制性制剂可以任选地包含浓度为约0mM至约10mM或约2mM至约7mM的瓜氨酸苹果酸(例如L-瓜氨酸苹果酸)例如任何约0mM,1mM,2mM,3mM,4mM,5mM,6mM,7mM,8mM,9mM或10mM的瓜氨酸苹果酸,代替苹果酸和/或瓜氨酸。

[0105] 在其它实施例中,作为iSomah的非限制性实例,储存生物组织和器官的组合物包含如表II所示的,在去离子水和/或抑菌水中组合的以下成分:

[0106] 表II

成分	数量
蒸馏水	1L
氯化钾	4-65 毫摩
磷酸钾 (一元)	0.44-10 毫摩
氯化镁 (六水)	0.5-65 毫摩
硫酸镁 (七水)	0.5-1.5 毫摩
氯化钠	80-135 毫摩
碳酸氢钠	2-25 毫摩
磷酸钠 (二元; 七水)	0.15-30 毫摩
氯化钙	0-1.5 毫摩
D-葡萄糖	5-25 毫摩
[0107] 谷胱甘肽 (还原型)	0.5-3 毫摩
抗坏血酸	0.5-3 毫摩
L-精氨酸	0.5 毫摩到 7 毫摩
苹果酸	0 毫摩到 7 毫摩 (任选)
腺苷	1-4 毫摩
乳清酸	0.5-2 毫摩
一水合肌酸	2-5 毫摩
L-肌肽	5-15 毫摩
L-肉碱	5-15 毫摩
二氯乙酸	0.1-2.5 毫摩
胰岛素	10 毫克-100 毫克/毫升/ 公升或 100-1000 单位/升

[0108] 在一些实施例中,在其它成分混合之后和/或恰在使用本文公开的储存组合物之

前,可以加入胰岛素。例如,可以在将器官浸入溶液之前,例如0.5,1,2,5分钟至数小时,例如0.5,1,2,3,4或5小时,加入胰岛素。

[0109] C. 心脏停搏液

[0110] 本文还提供了用于开心手术期间使心脏停搏或移植的供体心脏使用的心脏停搏液。在一个实施例中,本发明的心脏停搏液中可包含一种生理盐溶液其中含有至少20mM钾离子(例如约20mM,21mM,22mM,23mM,24mM,25mM,30mM,35mM,40mM,45mM,50mM,55mM,60mM,65mM,70mM,75mM,80mM,85mM,90mM,95mM或100mM或更多钾离子,包括所有这些值及其范围内的值)以及一个或多个糖(例如核糖,葡萄糖或右旋糖),谷胱甘肽,抗坏血酸,精氨酸,瓜氨酸(如瓜氨酸苹果酸),腺苷,肌酸(如肌酸乳清酸或一水合肌酸或其盐),乳清酸,肌肽(例如L-肌肽),肉碱(例如L-肉碱)和/或二氯乙酸。包含至少20mM钾离子的心脏停搏液可用于阻滞约4-10℃(例如约4℃,5℃,6℃,7℃,8℃,9℃或10℃)温度下的心脏。

[0111] 在另一实施例中,本发明的心脏停搏液可包含含一种生理盐溶液其中含有至少20mM钾离子(例如约20mM,21mM,22mM,23mM,24mM,25mM,30mM,100mM,40mM,45mM,50mM,55mM,60mM,65mM,70mM,75mM,80mM,85mM,90mM,95mM或100mM或更多钾离子,包括所有这些值及其范围内的值)以及至少37mM镁离子(例如约约37mM,38mM,39mM,40mM,41mM,42mM,43mM,44mM,45mM,50mM,55mM,60mM,65mM,70mM,75mM,80mM,85mM,90mM,95mM或100mM或更多镁离子,包括所有这些值及其范围内的值)以及一个或多个糖(例如核糖,葡萄糖或右旋糖),谷胱甘肽,抗坏血酸,精氨酸,瓜氨酸(如瓜氨酸苹果酸),腺苷,肌酸(如肌酸乳清酸或一水合肌酸或其盐),乳清酸,肌肽(例如L-肌肽),肉碱(例如L-肉碱)和/或二氯乙酸。包含至少20mM钾离子和至少37mM镁离子的心麻停搏液可以用于阻滞约10-25℃温度下的心脏,例如约10℃,11℃,12℃,13℃,14℃,15℃,16℃,17℃,18℃,19℃,20℃,21℃,22℃,23℃,24℃或25℃。在另一实施例中,本发明的心脏停搏液可包含含一种生理盐溶液其中含有至少25mM钾离子(例如约25mM,26mM,27mM,28mM,29mM,30mM,31mM,32mM,33mM,34mM,35mM,45mM,46mM,47mM,48mM,49mM,50mM,55mM,60mM,65mM,70mM,75mM,80mM,85mM,90mM,95mM,100mM,105,110,115,120,125或更多钾离子,包括所有这些值及其范围内的值)以及至少37mM镁离子(例如约约37mM,38mM,39mM,40mM,41mM,42mM,43mM,44mM,45mM,50mM,55mM,60mM,65mM,70mM,75mM,80mM,85mM,90mM,95mM或100mM或更多镁离子,包括所有这些值及其范围内的值)以及一个或多个糖(例如核糖,葡萄糖或右旋糖),谷胱甘肽,抗坏血酸,精氨酸,瓜氨酸(如瓜氨酸苹果酸),腺苷,肌酸(如肌酸乳清酸或一水合肌酸或其盐),乳清酸,肌肽(例如L-肌肽),肉碱(例如L-肉碱)和/或二氯乙酸。包含至少25mM钾离子和至少37mM镁离子的心麻停搏液可以用于阻滞约25-37℃温度下的心脏,例如约25℃,26℃,27℃,28℃,29℃,30℃,31℃,32℃,33℃,34℃,35℃,36℃,或37℃。其它实施例中,用于在开心手术期间阻滞心脏或用于供体心脏移植的心脏停搏液包括:一种生理盐溶液其中含有至少4-65mM钾离子(例如约4mM,5mM,6mM,7,8mM,9mM,10mM,15mM,20mM,25mM,30mM,35mM,40mM,45mM,50mM,55mM,60mM,61mM,62mM,63mM,64mM,或65mM或更多钾离子,包括所有这些值及其范围内的值)以及约1.5-45mM镁离子(例如约约1.5mM,2mM,3mM,4mM,5mM,6mM,7mM,8mM,9mM,10mM,15mM,20mM,25mM,30mM,35mM,40mM,41mM,42mM,43mM,44mM,或45mM或更多镁离子,包括所有这些值及其范围内的值)以及一个或多个糖(例如核糖,葡萄糖或右旋糖),谷胱甘肽,抗坏血酸,精氨酸,瓜氨酸(如瓜氨酸苹果酸),腺苷,肌酸(如肌酸乳清酸或一水合肌酸或其盐),乳清酸,肌

肽(例如L-肌肽),肉碱(例如L-肉碱)和/或二氯乙酸。包含至少45mM钾离子和至少37mM镁离子的心麻停搏液可用于阻滞约4-37℃下的心脏,例如4℃,5℃,6℃,7℃,8℃,9℃,10℃,11℃,12℃,13℃,14℃,15℃,16℃,17℃,18℃,19℃,20℃,21℃,22℃,23℃,24℃,25℃,26℃,27℃,28℃,29℃,30℃,31℃,32℃,33℃,34℃,35℃,36℃,或37℃中的任一。

[0112] III.发明的使用方法

[0113] A.储存生物组织和器官的方法

[0114] 本发明还提供了本文公开的存储生物组织和器官的组合物的有效使用方法。生物组织和器官可以在环境温度(例如10-21±4℃)下储存在本文公开的溶液中。根据本文提供的方法,生物组织和器官可以在所公开的溶液中储存24-72小时,例如1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,21,22,23,24,25,26,27,28,29,30,31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42,43,44,45,46,47,48,49,50,51,52,53,54,55,56,57,58,59,60,61,62,63,64,65,66,67,68,69,70,71,72或更多小时,没有明显的储存性水肿积累,自由基损伤,和/或通常发生在器官储存在或接近冰点温度下而导致的细胞/组织损伤。

[0115] 生物组织和器官在延长储存期间维持高能磷酸盐浓度(例如ATP)对于组织和器官移植到供体(或在心脏移植中复苏)的健康是重要的。与未存储在本文公开的溶液中的生物组织和器官相比,根据本文公开的方法储存在本文公开的任何溶液中的生物组织和器官的高能磷酸盐含量更高(诸如约10%,15%,20%,25%,30%,35%,40%,45%,50%,55%,60%,65%,70%或75%的高能磷酸盐,包括所有这些值及其范围内的值)。

[0116] 长期储存的生物组织和器官表现出乳酸产量的显著增加,这可能给储存介质的pH带来负面影响,导致组织和细胞损伤的增加。与未储存在本文公开的溶液中的生物组织和器官相比,根据本文公开的方法储存在本文公开的任何溶液中的生物组织和器官的乳酸含量更低(诸如约10%,15%,20%,25%,30%,35%,40%,45%,50%,55%,60%,65%,70%或75%的更少乳酸产生,包括所有这些值及其范围内的值)。

[0117] 当体外储存心脏时,储存和复苏后冠状动脉血流通常受阻或减少。与未存储在本文公开的溶液中的心脏相比,根据本文公开的方法储存在本文公开的任何溶液中的心脏的冠状血流量水平更高(诸如约10%,15%,20%,25%,30%,35%,40%,45%,50%,55%,60%,65%,70%或75%的更高水平冠状血流量,包括所有这些值及其范围内的值)。

[0118] 此外,当体外储存心脏时,在储存和/或复苏后心脏外二维(2D)超声心动图测量的一个或多个百分比面积变化,射血分数和/或心搏量可能降低。与未存储在本文公开的溶液中的心脏相比,根据本文公开的方法储存在本文公开的任何溶液中的心脏的百分比面积变化,射血分数和/或心搏量水平更高(诸如约10%,15%,20%,25%,30%,35%,40%,45%,50%,55%,60%,65%,70%或75%的更高水平百分比面积变化,射血分数和/或心搏量,包括所有这些值及其范围内的值)。

[0119] B.制备储存生物组织和器官的组合物的方法

[0120] 本文提供了制备用于保存生物组织和器官的组合物的方法,例如本文公开的任何组合物。所述方法包括将上述成分中的一种或多种以所示浓度混合在蒸馏水,去离子水和/或抑菌水中。在进一步实施例中,作为iSomah的非限制性实例,所述方法包括将表III中所示的一种或多种成分在蒸馏水,去离子水和/或抑菌水中混合。

[0121] 表III:

[0122]

成分	mM
氯化钾	7.00
磷酸钾(一元)	0.44
氯化镁(六水)	0.5
硫酸镁(七水)	0.503
氯化钠	125.00
碳酸氢钠	5.00
磷酸钠(二元;七水)	0.19
D-葡萄糖	11.00
谷胱甘肽(还原型)	1.50
抗坏血酸	1.00
L-精氨酸	5.00
L-瓜氨酸苹果酸	1.00
腺苷	2.00
肌酸乳清酸	0.50
一水合肌酸	2.00
L-肌肽	10.00
L-肉碱	10.00
二氯乙酸	0.5
胰岛素	100单位/升

[0123] 在一些实施例中,在其它成分混合之后和/或恰在使用本文公开的储存组合物之前,可以加入胰岛素。例如,可以在将生物组织或器官浸入溶液之前,例如0.5,1,2,5分钟至数小时,例如0.5,1,2,3,4或5小时,加入胰岛素。

[0124] 在本文公开的方法的一个实施例中,不是向组合物中加入瓜氨酸苹果酸(例如L-瓜氨酸苹果酸),而是分别将1-10mM(例如约1mM,2mM,3mM,4mM,5mM,6mM,7mM,8mM,9mM,或10mM)的瓜氨酸(例如L-瓜氨酸)可加上1-5mM(例如任何约1mM,2mM,3mM,4mM或5mM包括所有这些值及其范围内的值)的苹果酸加入组合物。

[0125] 在其它实施例中,作为iSomah的非限制性实例,所述方法包括将表IV中所示的一种或多种成分在蒸馏水,去离子水和/或抑菌水中混合。

[0126] 表IV:

[0127]	成分	mM
	氯化钾	7.00
	磷酸钾	0.44
	氯化钙	1.30
	氯化镁	0.5
	硫酸镁	0.503
	氯化钠	125.00
	碳酸氢钠	5.00
	磷酸钠	0.19
	D-葡萄糖	11.00
	谷胱甘肽	1.50
	抗坏血酸	1.00
	精氨酸	5.00
	瓜氨酸	5.00
[0128]	苹果酸	1.00
	腺苷	2.00
	乳清酸	0.50
	一水合肌酸	2.50
	肌肽	10.00
	肉碱	10.00
	二氯乙酸	0.5
	胰岛素	100 单位/升

[0129] 在一些实施例中,在其它成分混合之后和/或恰在使用本文公开的储存组合物之前,可以加入胰岛素。例如,可以在将生物组织或器官浸入溶液之前例如0.5,1,2,5分钟至数小时,例如0.5,1,2,3,4或5小时,加入胰岛素。

[0130] 在一些实施例中,表IV所示的制备非限制性制剂所用的磷酸钾可以是磷酸二氢钾。在另一实施例中,表IV所示的非限制性制剂中的氯化镁可以是六水氯化镁。在其它实施例中,表IV所示的非限制性制剂中的硫酸镁可以是七水硫酸镁。在其它实施例中,表IV所示的非限制性制剂中的磷酸钠可以是磷酸氢二钠七水合物。在一些实施例中,表IV所示的非限制性制剂中的谷胱甘肽可以是还原型谷胱甘肽。在另一实施例中,表IV所示的非限制性制剂中的肌酸可以是一水合肌酸或其盐。在另一实施例中,表IV所示的非限制性制剂中的精氨酸可以是L-精氨酸。在另一实施例中,表IV所示的非限制性制剂中的肌肽可以是L-肌肽。在另一实施例中,表IV所示的非限制性制剂中的肉碱可以是L-肉碱。

[0131] 该方法还包括将溶液的pH调节至中性或弱碱性的步骤,例如约pH7,7.1,7.2,7.3,

7.4,7.5,7.6或7.7,包括所有这些值及其范围内的值。在一个实施例中,储存生物组织和器官的组合物的pH被调节至7.5。

[0132] 在优选的实施例中,作为iSomah的非限制性实例,用于生产器官保存组合物的方法包括在蒸馏水,去离子水和/或抑菌水中混合一种或多种表V或表Va中所示浓度的以下成分。

[0133] 表V:

成分	mM
氯化钾	20
磷酸钾	0.44
氯化钙	1.30
氯化镁	37
硫酸镁	0.5
氯化钠	100.00
碳酸氢钠	5.00
磷酸钠	30.00
D-葡萄糖	11.00
二氯乙酸	0.50 (任选)
苹果酸	1.0
谷胱甘肽	1.50
抗坏血酸	1.00
腺苷	2.00
乳清酸	0.50
肌酸	2.50
肌肽	10.00
肉碱	10.00
精氨酸	5.00
瓜氨酸	5.00
胰岛素	100 单位/升

[0135] 其中在使用之前加入胰岛素

[0136] 表Va:

[0137]

成分	mM
氯化钾	20
磷酸钾	0.44
氯化钙	1.30
氯化镁	37
硫酸镁	0.5
氯化钠	100.00
碳酸氢钠	5.00
磷酸钠	30.00
D-葡萄糖	11.00
二氯乙酸	0.50 (任选)
苹果酸	1.0
谷胱甘肽	1.50
抗坏血酸	1.00
腺苷	2.00
乳清酸	0.50
肌酸	2.50
肌肽	10.00
肉碱	10.00
精氨酸	5.00
瓜氨酸	5.00

[0138] 在一些实施例中,表V或表Va所示的非限制性制剂中的磷酸钾可以是磷酸二氢钾。在另一实施例中,表V或表Va所示的非限制性制剂中的氯化镁可以是六水氯化镁。在其它实施例中,表V或表Va所示的非限制性制剂中的硫酸镁可以是七水硫酸镁。在其它实施例中,表V或表Va所示的非限制性制剂中的磷酸钠可以是磷酸氢二钠七水合物。在一些实施例中,表V或表Va所示的非限制性制剂中的谷胱甘肽可以是还原型谷胱甘肽。

[0139] 在进一步实施例中,表V或表Va中所示的非限制性制剂可以进一步包含浓度在约2至约10mM之间的一种或多种精氨酸(例如L-精氨酸),例如约2mM,3mM,4mM,5mM,6mM,7mM,8mM,9mM或10mM,肌肽(例如L-肌肽),浓度在约5至约10mM之间,例如约5mM,6mM,7mM,8mM,9mM或10mM(对于10mM为2.26g/L),浓度在约5至约10mM之间的肉碱(例如L-肉碱),例如5mM,6mM,7mM,8mM,9mM或10mM(对于10mM为2.26g/L),乳清酸,例如浓度为约0.5-2mM,例如约0.5,1,1.5或2mM,或肌酸(例如,一水合肌酸或其盐),浓度为约2至5mM,例如约2mM,3mM,4mM或5mM中的任一者。在另一个实施例中,表V中所示的非限制性制剂可以进一步包含浓度为10mg-100mg/ml/Liter或100-1000Units/L的胰岛素。当组合物中包含胰岛素时,其可在用

作器官保存液之前选择性加入。

[0140] 在其它实施例中,表V或表Va中所示的非限制性制剂可以进一步包含糖,例如但不限于六碳糖(例如阿洛糖,阿卓糖,半乳糖,葡萄糖(包括D-葡萄糖(又称右旋糖),L-葡萄糖),古洛糖,艾杜糖,甘露糖,塔罗糖,果糖,阿洛酮糖,山梨糖,塔格糖,岩藻糖,墨角藻糖或鼠李糖)或五碳糖(例如阿拉伯糖,来苏糖,核糖,木糖,酮戊糖,核酮糖,或木酮糖,例如约11mM至约25mM,例如任何约11mM,12mM,13mM,14mM,15mM,16mM,17mM,18mM,19mM,20mM,21mM,22mM,23mM,24mM或25mM的糖。

[0141] 在其它实施例中,表V或表Va中所示的非限制性制剂可以任选地包含浓度为约1-10mM的瓜氨酸(例如L-瓜氨酸)或其盐浓度约为2到10mM,例如任何约2mM,3mM,4mM,5mM,6mM,7mM,8mM,9mM或10mM。在另一个实施例中,表V或表Va中所示的非限制性制剂可以任选地包含浓度为约0mM至约10mM或约2mM至约7mM的瓜氨酸苹果酸(例如L-瓜氨酸苹果酸)例如任何约0mM,1mM,2mM,3mM,4mM,5mM,6mM,7mM,8mM,9mM或10mM的瓜氨酸苹果酸,代替苹果酸和/或瓜氨酸。

[0142] 在另一实施例中,作为iSomah的非限制性实例,用于生产器官保存组合物的方法包括在蒸馏水,去离子水和/或抑菌水中混合一种或多种表VI中所示浓度的以下成分。

[0143] 表VI:

[0144]

成分	数量
蒸馏水	1L
氯化钾	4-65 毫摩
磷酸钾	0.44-10 毫摩
氯化镁	0.5-65 毫摩
硫酸镁	0.5-1.5 毫摩
氯化钠	80-135 毫摩
碳酸氢钠	2-25 毫摩
磷酸钠	0.15-30 毫摩
氯化钙	0-1.5 毫摩
D-葡萄糖	5-25 毫摩
谷胱甘肽	0.5-3 毫摩
抗坏血酸	0.5-3 毫摩
精氨酸	0.5 毫摩到 7 毫摩
苹果酸	0 毫摩到 7 毫摩 (任选)
腺苷	1-4 毫摩
乳清酸	0.5-2 毫摩
肌酸	2-5 毫摩
肌肽	5-15 毫摩
肉碱	5-15 毫摩
二氯乙酸	0.1-2.5 毫摩
胰岛素	10 毫克-100 毫克/毫升/公升 或 100-1000 单位/升

[0145] 其中在使用之前加入胰岛素

[0146] IV. 试剂盒

[0147] 用于制备本文公开的生物组织和器官储存/复苏溶液的组合物, 可选地包装在具有下列成分或其倍数的试剂盒中, 其量需按比例增加为溶液量的2倍, 3倍, 5倍, 10倍, 20倍。示例性试剂盒包含谷胱甘肽, 抗坏血酸, 腺苷, 氯化钾, 磷酸钾, 氯化镁, 硫酸镁, 氯化钠, 碳酸氢钠, 磷酸钠, 糖(如核糖, 葡萄糖或右旋糖), 精氨酸, 瓜氨酸苹果酸, 腺苷, 乳清酸, 肌酸和二氯乙酸中的一种或多种(例如, 约2.76g/L氯化钾, 0.06g/L磷酸钾(一元), 7.47g/L氯化镁(六水合物), 0.123g/(七水合物), 7.30g/L氯化钠, 0.35g/L碳酸氢钠, 0.05g/L磷酸氢二钠(二元; 七水合物), 1.98g/L D-葡萄糖, 0.462g/L谷胱甘肽(还原型), 0.18g/L抗坏血酸, 0.21g/L L-精氨酸, 0.15g/L L-瓜氨酸苹果酸, 0.27g/L腺苷, 0.27g/L肌酸乳清酸, 0.373g/L乳清酸, 肌酸一水合物或其盐, 2.3g/L L-肌肽, 2.0g/L肉碱, 0.08g/L二氯乙酸和100单位/L胰岛素中的一种或多种)。该试剂盒还可以任选地含有瓜氨酸(例如L-瓜氨酸)和苹果酸。

[0148] 这些成分可以与使用说明书一起包装, 并在0.01-2.0L蒸馏水中混合。试剂盒还可

能含有用于调节组合生物组织和器官保存/储存溶液(例如THAM)的pH值的溶液。该试剂盒可以在有或没有无菌和/或去离子水成分情况下包装或销售。

[0149] 本说明书通篇给出的每个最大数值限制都包括每个较低的数值限制,好像这些较低数值限制在本文中明确地写出一样。本说明书通篇给出的每个最小数值限制将包括每个较高的数字限制,好像这样的较高数字限制在本说明书中明确地写出一样。贯穿本说明书给出的每个数字范围将包括在这些更广的数字范围内的每个较窄的数字范围,就好像这样的较窄的数字范围全部被明确地写在这里一样。

[0150] 通过参考以下实施例可以进一步理解本发明,这些实施例作为说明提供而非限制性的。

实施例

[0151] 实施例1

[0152] 在下面的例子中,表格用阿拉伯数字表示(例如表1,表2,表3等)。

[0153] 在过去的40年里,肝脏,肾脏等实体器官的保存已经取得了显著的进步,体外保存长达数小时。不幸的是,这同样的方法不能应用于心脏存储,即使经过数十年的艰苦努力,心脏也仅可在体外存储4-6小时(Churchill TA.Organ preservation for transplantation.In:Storey KB,editor.Functional metabolism:regulation and adaptation.John Wiley-Liss;2004;529-55)。取得的主要进展包括Celsior和威斯康星大学溶液(UWS;表1-1)等保存液在概念上的发展,这些概念的制定是基于预防“4℃低温储存”期间的水肿——一个器官保存法中只允许器官短期离体储存的根深蒂固的概念。该理论的存在可能是由于在这种极低温度下会造成组织/细胞损伤,且随时间呈现不可逆转状态(Devillard et al.,Mol Cell Biochem 2008;307:149-57;Belzer et al.,Transplantation 1988;45:673-6;Southard et al.,Annu Rev Med1995;46:235-47)。通过向Celsior添加细胞渗透剂如甘露醇和乳糖酸并且向UWS添加乳糖酸,棉子糖和羟乙基淀粉来防止器官水肿。由于在41℃下细胞的三磷酸腺苷(ATP)消耗/合成非常低,所以除了需要在UWS中添加腺苷之外,在Celsior和UWS的制剂中维持心肌细胞的高能磷酸盐(HEP;如ATP和磷酸肌酸(CP))含量是足够的。

[0154] 在这个实施例中显示,通过增强高能磷酸盐(HEP)合成,心脏在更高温度下在体外储存是可能的。与Celsior不同,储存在Somah中4℃的猪心在4小时储存后显示出强大的维护器官生存能力。(Thatte et al.,Circulation 2009;120:1704-13)。此外,在Somah中21℃储存的心脏优于储存在极低温(4℃)下的心脏(Lowalekar et al.,Transplant Proc 2013;45:3192-7)且在体外再灌注时表现出优异的功能恢复性(Lowalekar et al.,Am J Transpl2014 Oct;14(10):2253-62)。

[0155] 材料及方法

[0156] 心脏提取手术本实验严格遵守既定的人道政策,经动物研究委员会批准,使用雌性约克夏猪(45至54公斤)。如其他文献所述(Thatte et al.,Circulation 2009;120:1704-13)提取心脏,收集股动脉用于体外实验,然后以<40毫米汞柱(mmHg)的收缩压夹住主动脉。然后在75~100mmHg下灌注21℃的1000ml心脏停搏液,Somah(20mmol/liter K⁺),Celsior(20mmol/liter K⁺)或UWS(固有的140mM K⁺);切除心脏,并在21±2℃(环境温度)

下储存在Somah,Celsior或UWS中5小时。

[0157] 体外心脏存储。在温度 $21 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 的温水浴中将心脏放入自封袋(内含2升Somah,Celsior或UWS)内。由于心脏在Somah储存期间表现出缓慢的收缩运动,所以其通过补充 K^{+} (总共 20mmol/L)和 Mg^{2+} (37mmol/L)来提升麻痹心脏的效果。(Fukuhiro et al., Circulation 2000;102(III):319-25)。预先称重过的心脏在5小时后。穿刺活检($2 \times 4\text{mm}$)取自左心室(LV)后壁,储存前和储存结束后进行HEP分析。

[0158] 三磷酸腺苷(ATP)和磷酸肌酸(CP)测定。如其他文献所述测量心脏组织HEP(Devillard et al., Mol Cell Biochem 2008;307:149-57;Bessho et al., Anal Biochem 1991;192:117-24)。简单地说,将组织悬浮在冷的高氯酸中并均化。将均浆在 0°C 下离心,将沉淀溶解在NaOH中进行蛋白质定量,并用冷的 KHCO_3 中和上清液,并在使用生物发光试剂盒和方案进行HEP(ATP+CP)测量之前再次离心(Promega GloMax-Multi+Detection System; Sigma-Aldrich)。

[0159] 表1-1:Somah,Celsior,及UW溶液的成分

Somah溶液 (酸碱值7.5)	
磷酸钾 (一元)	0.44
氯化钾	7.00
氯化钠	125.00
碳酸氢钠	5.00
氯化钙	1.30
磷酸钠 (二元; 七水)	0.19
氯化镁 (六水)	0.50
硫酸镁 (七水)	0.50
葡萄糖	11.00
谷胱甘肽 (还原型)	1.50
抗坏血酸	1.00
L-精氨酸	5.00
L-瓜氨酸苹果酸	1.00
腺苷	2.00
肌酸乳糖酸	0.50
一水肌酸	2.00
L-肌肽	10.00
L-肉碱	10.00
二氯化碳	0.50
胰岛素	100 单位/升
[0160] 溶液 (酸碱值7.3)	
甘露醇	60.00
乳糖醛酸	80.00
谷氨酸	20.00
组氨酸	30.00
氯化钙	0.25
氯化钾	15.00
氯化镁	2.64
氯化钠	100.00
谷胱甘肽 SH	3.00
UW溶液 (酸碱值7.4)	
乳糖醛酸	105.00
磷酸二氢钾	25.00
氢氧化钾 (56%)	100.00
氢氧化钠 (40%)	27.00
硫酸镁 (七水)	5.00
棉子糖 (五水)	30.00
腺苷	5.00
谷胱甘肽	3.00
别嘌呤醇	1.00
羟乙基淀粉 (代血浆)	50 g/升
胰岛素	40 单位/升

[0161] ^a数据以毫摩尔每升为单位 (毫摩尔/升), 除非另有说明

[0162] 心脏离体复苏和功能研究的准备。从邻近的组织和其他血管分离后, 主动脉, 肺静脉 (PVs) 和肺动脉插管分别使用1/2-至3/8-in, 1/2-至1/4-in, 和1/2-到3/8-in管接头, 而腔静脉结扎。

[0163] 离体研究的血液的制备。术中收集全身肝素化的血液, 使用无菌白血球减少滤器 (Pall Leukoguard RS) 进行白细胞减少, 并储存在41℃下。使用Somah或Plasmalyte (+ 1.3mmol/liter钙) 以1:1的比例将灌注血细胞比容调整至20%, 以减少体外灌注期间心脏的粘性应变。分别使用10%葡萄糖、KCl、CaCl₂和NaHCO₃调节灌注的pH值、葡萄糖、K⁺、Ca²⁺和HCO₃⁻至猪血液水平 (分别为pH 7.5; 100mg/dl; 3.7, 1.38和32mmol/liter)。

[0164] Somah装置。心脏的体外复苏定制的设备(图1)。CDI监测仪(Clinical Documentation Improvement Monitoring System 500;Terumo Cardiovascular Systems Corp.,Ann Arbor,MI)用于实时监测灌注液pH,温度,PO₂,PCO₂,K⁺和HCO₃⁻。也使用iSTAT分析仪对这些参数在流入/流出样本中进行分析(Abaxis,Ltd.,Union City,CA)。

[0165] 体外功能研究。UWS心脏用盐水冲洗以清除过量的钾。在Somah装置附着后,Somah和Celsior/UWS心脏在40-60mmHg下分别用1.5升Somah (pH7.5) 或Plasma-Lyte A (pH7.5;临床使用的生理溶液) 溶液冲洗,之后再灌注。使用HMI软件获取压力流量数据。在30分钟内将系统温度升高至37℃。Somah心脏灌注后评估的平均持续时间为180分钟,由于心肌挛缩发展和/或表现不佳,Celsior和UWS心脏分别为60分钟和120分钟,甚至在再灌注几分钟后便超过了37℃。如果需要,使用电转化(40-50J) 和/或肾上腺素(依据前人的经验,在Somah心脏中使用1:50000到1:100000的比例(Lowalekar et al.,Am J Transpl 2014Oct;14(10):2253-62),或者在Celsior/UWS心脏中如其它报道一样使用1:10000的比例(Hill et al.,Am Thorac Surg2005;79:168-77))。在开始时收集流入(主动脉)和流出(腔静脉)样品,然后每30分钟收集一次(图2)。使用经食道超声心动图(TEE)探头进行心外膜二维(2D)超声心动图功能评估。

[0166] 酶测定和血液化学。使用分析仪(Vetscan VS2和iSTAT;Abaxis) 测量手术期间,储存期间和再灌注期间的血肌酸激酶(CK),肌钙蛋白I (cTnI),乳酸和气体(氧分压/二氧化碳分压[PO₂/PCO₂])。如别处所述,在再灌注过程中计算心肌耗氧量(MVO₂) (Klabunde R.Cardiac function.Cardiovascular physiology concepts.Philadelphia:Lippincott Williams&Wilkins;84-8)。

[0167] 心外膜超声心动图。用TEE探针(Cypress system;Acuson,Mountain View,CA)在手术中和离体(心外膜)获得二维超声心动图数据(心脏功能参数的短轴和长轴视图和LV间隔/心室壁厚度),一旦系统温度达到37℃,灌注开始后30分钟,然后用CYPRESS-VIEWER软件进行分析。在二维超声心动图期间,使用浸入灌注液中的黄铜鳄鱼导管记录三导联心电图。所有Somah心脏都持续满负载状态(PV灌注)和窦性心律状态,但并不是所有的Celsior和UWS心脏都能承受满负载状态。

[0168] 统计分析对于每个调查,将来自每组的相同数量的动物分配用于对比分析。如图2所示,活检和其他样本定时。使用HMI软件获取冠状动脉和主动脉血流/压力数据。用SIGMA-PLOT软件进行统计分析。对于组间比较,假设非参数数据,进行Kruskal-Wallis单因素方差分析(ANOVA)秩检验。如果通过了正态性和等方差检验,则使用Holm-Sidak检验或Dunn检验做进一步分析;否则,数据通过单因素方差分析进行比较。假定非参数数据,为了确定同一组内的显着性改变,进行Mann-Whitney秩和检验。如果正态性和相等方差检验通过,则进行Student's t-检验。认为p<0.05是显着的。所有值以平均值±SEM表示。

[0169] 结果

[0170] 术中心脏停搏所有的心脏都在21℃时接受了心脏停搏。可能由于K⁺含量非常高,心脏在UWS组中立即停止心搏。相反,Somah和Celsior组分别用20到25和30到40秒完成了心脏停搏。

[0171] 大体形态,心脏重量和储存过程中酶的释放。所有储存的心脏呈现正常的总体形态而没有变色,并且是柔软的,没有僵化/僵硬的迹象。在5小时储存期间,心脏重量没有改

变,表明没有严重水肿。在储存期间的所有溶液中,检测到心肌酶(CK/cTnI)的最小释放量。

[0172] 储存期间心脏组织的HEP水平。存储后,Somah储存的心脏HEP水平显著增强(28.33 ± 5.51 ; $P < 0.001$),UWS心脏显著降低(5.92 ± 1.46 ; $P < 0.05$),而Celsior心脏则保持不变(11.57 ± 2.77),与对照组相比($9.95 \pm 2.52 \text{ nmol/L/mg蛋白质}$) (图3),Somah心脏中HEP的积聚显著高于对照组($p < 0.001$)。

[0173] 再灌注时冠脉流量。在相同灌注压下,Somah心脏21℃时的冠状动脉血流显著高于Celsior或UWS心脏灌注压(图2)。Somah心脏但不是Celsior/UWS心脏在再灌注开始时立即表现出缓慢收缩。随着体温升高至37℃,Somah和UWS心脏冠脉流量明显增加,Celsior心脏冠状动脉流量明显增加,Somah心脏冠状动脉流量最高,接近正常。UWS组在最初突然上升之后,冠脉循环压力有所下降。

[0174] Table 1-2: Somah, Celsior和UES组心脏冠状动脉血流改变,Somah装置系统温度升高。

[0175]

	P1-21℃	F1-21℃	P2-30℃	F2-30℃	P3-37℃	F3-37℃
Somah	40 ± 1	385 ± 68^a	44 ± 2	375 ± 62^a	53 ± 4	$579 \pm 35^{a,b}$
Celsior	39 ± 1	272 ± 35	51 ± 7	199 ± 44	55 ± 5	289 ± 99
UWS	38 ± 3	163 ± 13	53 ± 6	195 ± 44	38 ± 3	$443 \pm 80^{a,c}$

[0176] P1,P2,P3:在相应温度下的主动脉根部压力;F1,F2,F3:在相应温度下的冠脉流量。威斯康辛大学溶液。

[0177] ^a在相同的温度下与其他组显著不同

[0178] ^b与同一组中21℃下有显著差异

[0179] ^c与Celsior组的心脏显著不同

[0180] 再灌注时释放酶。而在再灌注30分钟后,Somah和Celsior心脏的CK和cTnI释放量相当,UWS心脏的释放量明显较多(图4A和B)。

[0181] 再灌注心脏的代谢。如MV0₂和乳酸比例反转增加(图5A和B)所示,在Somah心脏再灌注30分钟内,无氧代谢迅速转变为有氧代谢。相反,尽管在Celsior和UWS心脏中乳酸的产生(未经乳化的乳酸比例)是明显的,但是在同一时期Celsior心脏中的MV0₂没有改变(图5A和B)。

[0182] 再灌注后的功能恢复。再灌注后,即刻自发性房室活动,辅以基本的电活动(心电图),在Somah心脏明显随着系统温度升高到37℃进一步增加心室收缩,并且一个单一的复律法建立窦性心律。在整个调查过程中,Somah心脏并不需要强心剂支持或进一步的电转换,依然保持柔软。相比之下,Celsior和UWS心脏表现出最低限度的可见的自发活动,不能被电检测到,并且从LV尖端开始,最终涉及整个LV和隔壁,并且最终涉及RV和心房,提示可能的初始化缺血再灌注损伤(IRI)。因此,灌注液钙离子(Ca²⁺)水平也迅速下降,这表明细胞内转移。Celsior/UWS心脏虽然多次尝试复律和输注肾上腺素,但不能恢复。因此,功能性2D超声心动图数据无法在每个Celsior/UWS心脏成功获取,而心脏功能数据在Celsior/UWS心脏中显示出较低的表现(图6A-C)。此外,在灌注后UWS心脏中LV前壁/间隔壁厚度大大增加(图6D)。

[0183] 总而言之,Somah可能是改善心脏移植患者预后的关键性“解决方案”。新陈代谢强健,即优秀的功能回复,降低IRI依赖性损伤降低,刺激干预需求减少,Somah亚低温常温下

储存的心脏与其他保存液相比更有可能迅速恢复到强健的功能。

[0184] 实施例2

[0185] 本案例检查储存后心脏功能的恢复是否与维持器官的能量状态和储存温度成比例关系,并分别比较在Celsior和Somah溶液中,4℃、13℃和21℃下的心脏保存情况。

[0186] 材料及方法

[0187] 如案例1所述进行心脏摘取手术,体外心脏储存,ATP和磷酸肌酸测定,用于离体复苏和功能研究的心脏的制备,用于离体研究的血液的制备,Somah装置和功能研究,以上。

[0188] 心脏称重和活检。在储存开始之前和5小时之后,心脏腔室被清空用以称重。在心脏切除15分钟内(对照)和从左心室后壁(LV)储存5小时结束时,使用冲压钳取出心脏穿孔活检组织(直径2-4mm)用于组织病理学(HP;苏木精和伊红染色)以及Somah心脏的超微结构和Somah和Celsior心脏的HEP测定。

[0189] 电子显微镜将Somah心脏组织固定在戊二醛中并进行超微结构研究。简而言之,将用于电子显微镜(EM)研究的组织立即固定在戊二醛中并储存在4℃下。在固定、脱水和包埋后,用超薄切片机切割成70-100nm切片,转移到格栅上并在JEOL电子显微镜(1200EX-80kV; JEOL USA Inc.,Peabody,MA)下检查以鉴定任何超微结构变化。

[0190] 酶测定和血液化学。在术中测量肌酸激酶(CK),心肌肌钙蛋白-I(cTnI),乳酸和气体(pO₂/pCO₂),并且在10分钟,2小时和5小时心脏储存结束时用Vetscan VS2或iStat (Abaxis Ltd,Union City,CA)采集Somah样品。Celsior的组分干扰测定;因此,储存样品不能被分析。在开始灌注液灌注后5分钟和90分钟以及在60分钟(基线)和90分钟(峰值性能)下,收集流入(主动脉)和流出(腔静脉)样品用于评估心肌耗氧量(MVO₂)采用Vetscan VS2或i-Stat系统测定血浆乳酸水平。计算MVO₂。体外再灌注过程中获得的Vetscan CK测定值在心脏分离心脏研究中具有特异性。

[0191] 心外膜超声心动图。TEE探头用于Acuson Cypress系统(Acuson,Mountain View,CA)的术中和离体心脏功能的2D Echo评估,并使用Cypress浏览软件分析图像。在离体实验期间,将心脏连接到Somah装置并悬浮在含有2L灌注液足以覆盖心脏表面三分之二的容器中。从实验开始记录心电图并且在灌注后大约45-60分钟开始收集2D回声,如果观察到良好的心脏收缩,并且以30分钟的间隔重复时。将探头置于与心脏直接接触的位置,并调整探头的角度和脉冲方向,来获得短轴和长轴视图,用以评估心功能参数和心室壁厚和室间隔厚度。

[0192] 统计分析所有值以平均值±SEM表示。分析重点是比较Celsior 4℃(n=5)和Somah 4℃心脏(n=6),13℃(n=6)和21℃(n=6)心脏。单因素方差分析用于所有功能测量(对照和300分钟;MVO₂,乳酸,CK,cTnI,60分钟[基线]和90分钟[峰值性能])的冠状动脉血流的总HEP值的差异,以及心室和使用SigmaPlot(Systat Software Inc.,San Jose,CA)。Tukey测试被用于确定组之间的具体差异。由于高能磷酸盐(HEPs)在Somah储存的心脏中显着增加,因此选择随机3颗Somah心脏一组与5颗Celsior心脏用于HEPs分析。采用配对t检验评估0和37℃冠状动脉血流量、心肌耗氧量和乳酸盐水平在基线和90分钟内的差异。对于线粒体缺血评分(MIS),使用Somah心脏(n=3/组)中4张单张有20个线粒体的EM载玻片(x8000放大倍数)。统计显着性在95%置信水平被接受(p<0.05)。如图所示获得了用于不同研究的组织和血液样品(图7)。

[0193] 结果

[0194] 总体形态,心脏重量,HP染色和EM成像。在Celsior和Somah中保存的心脏呈现正常的形态并且没有呈现任何色变。通过比较EM成像,HP染色和心脏重量估计Somah组中的心脏水肿的程度(图8)。EM成像和HP染色表现出完整的细胞器膜,正常的细胞内糖原含量和收缩蛋白排列,没有空泡化和肌纤维束之间的空隙且缺少挛缩带,表明细胞内水肿少。心脏重量在储存前后的差异微乎其微。在Somah组中,以核膜下染色质积聚为特征的心肌细胞核中的最小可逆变化是明显的。线粒体基质密度保存完好,伴有无关紧要的局部缺血。以0-6(6为最差)的平均MIS显示,线粒体的可逆变化可以忽略不计,在4℃、13℃和21℃组的Somah心中分别为 0.09 ± 0.02 、 0.17 ± 0.03 和 0.07 ± 0.02 。在任何心脏中均未见到如溶解、空泡化和线粒体膜破裂等不可逆的损伤。

[0195] 储存期间的心脏代谢

[0196] 高能磷酸盐在Somah中保存的心脏合成HEPs,可不考虑储存温度来确认先前的观察结果。心脏中的HEP浓度存储依赖性温度升高。在保存于4℃、13℃和21℃温度下的Somah中的心脏(n=3/组)中总HEP值分别为 55.7 ± 5.1 、 68.4 ± 11.0 和 81.5 ± 19.8 nM/mg,其蛋白质与Celsior心脏(n=5)在保存结束时观察到的蛋白质含量 26.31 ± 1.4 nM/mg相比明显更高(p<0.05)。各组间的对照值无显著差异。

[0197] 储存期间的乳酸产量和耗氧量:21℃条件下厌氧乳酸盐产量从2小时的 0.41 mmol/L暂时增加到 0.75 ± 0.05 mmol/L,但低温Somah组在5小时储存后氧乳酸盐产量低于检测水平。但是,在所有组中pH稳定在 7.4 ± 0.1 。此外,由于相对活跃的有氧代谢,储存在较高温度下的心脏剧烈地利用溶解在Somah(pO₂ 210-240 mm Hg)中的氧气。Somah分别在4℃、13℃和21℃储氧过程中,pO₂分别下降了 7.0 ± 7.6 、 17.0 ± 3.51 和 14.0 ± 3.51 mm Hg,与HEP合成的平行增加相对应。在Celsior储存期间,乳酸和pO₂的使用量不能测量。

[0198] 心脏功能研究

[0199] 冠脉血流量在顺行灌注开始时,无论溶液或储存温度如何,都在所有心脏中观察到冠状动脉血流。4℃和13℃Somah心脏在温度升高到21℃时表现出缓慢的不规则四室收缩,21℃开始灌注后立即观察到缓慢的节律性收缩。

[0200] 相反,Celsior心脏表现出不规则的心房收缩而不是心室收缩。心脏收缩和窦性心律随着温度升高而增强,所有Somah组在灌注开始后约90分钟达到最高性能,但在Celsior心脏中没有。在21℃储存的Somah心脏,初始冠脉流量显著高于在4℃和13℃储存的心脏(p<0.05)。此外,在37℃下,Somah组冠状动脉血流显著增加(p<0.05),但在Celsior组没有(表2-1)。另外,37℃下Somah组冠脉流量明显大于Celsior心脏(p<0.05)。

[0201] 表2-1:Celsior 4℃、13℃和21℃组心脏冠状动脉血流量(毫米每分钟)根据再灌注和增加系统温度的变化而改变。

	心脏分组	0小时		
		在 21℃	在 37℃	
[0202]	Celsior 4℃	323 ± 44	223 ± 40	350 ± 21^1
	Somah 4℃	290 ± 21^2	299 ± 25	$495 \pm 38^{1,3}$
	Somah 13℃	230 ± 13^2	182 ± 13	$439 \pm 17^{1,3}$
	Somah 21℃	312 ± 90^2	312 ± 90	$621 \pm 88^{1,3}$

[0203] n=5 Celsior心脏组;n=6 Somah心脏组不同温度组;

[0204] 0小时=冠状动脉血流立即进行再灌注。

[0205] ¹Celsior与Somah在37℃ (p<0.05) 条件下对比。

[0206] ²0小时室21℃与13摄氏及4℃心脏组进行对比 (p<0.05)。

[0207] ³0小时组与37℃ (p<0.05) 组对比。

[0208] 工作中的心脏再灌注后心脏代谢和酶释放: MV0₂在4℃Somah心脏组经灌注后在60min(基线)和90min之间保持不变,而在13℃和21℃Somah心脏组中显著增加,但三组之间没有差异。相反,MV0₂在Celsior心脏中严重衰减(图9A)。相似的,Celsior组灌注液乳酸水平基础值显着低于Somah组 (p<0.05)。在90分钟时,所有组的乳酸均下降,尽管组间差异不显着(图9B),但在13℃和21℃Somah组中下降明显 (p<0.05)。在所有Somah心脏组中,能量需求达到稳定状态,与储存温度无关。在Somah工作心脏中,心脏组织中HEP水平的前后工作比率是相当的(~0.37),而Celsior心脏中则不然。21℃Somah组肌酸激酶(CK)释放量最低;然而,在任何组之间没有显着差异(图10A)。相比之下,Celsior心脏中的cTnI释放显着低于Somah组(图10B) (p<0.05)。

[0209] 经食道超声心动图(TEE)和体内二维(2D)超声心动图:四组心脏的左心室前壁和隔膜厚度在术中和体外复苏之间没有显着变化(表2-2)。

[0210] 表2-2:比较差异存储的心脏的左心室(LV)前壁和隔壁的术中和体外厚度(收缩末期)。

温度分组	左室心壁	术中厚度 (mm)	体外厚度 (cm)
Celsior 4°C	左心室前壁	1.29 ± 0.01	1.43 ± 0.04
	左心室间隔	1.37 ± 0.13	1.54 ± 0.19
Somah 4°C	左心室前壁	1.37 ± 0.17	1.40 ± 0.06
	左心室间隔	1.29 ± 0.12	1.36 ± 0.08
Somah 13°C	左心室前壁	1.73 ± 0.09	1.56 ± 0.10
	左心室间隔	1.56 ± 0.09	1.44 ± 0.07
Somah 21°C	左心室前壁	1.56 ± 0.03	1.55 ± 0.06
	左心室间隔	1.56 ± 0.09	1.71 ± 0.04

[0212] 体内和体外组,Celsior,n=5;Somah,n=6/组

[0213] 在Somah的心脏中,2D超声心动图明显地表现出了温度依赖性的存储性能(图11)。在较高温度组中,在预负荷(顺行性冠状动脉灌注)和后负荷(PV灌注)期间,呈现出更明显的室壁运动和LV收缩以及其他心脏功能参数(图6)的增强。心脏的最佳功能出现在21℃组,左心房压力为4±2mmHg时,相比之下,4℃和13℃心脏需要压力为12±3mmHg,且需要不同的刺激干预(表2-3)。

[0214] 表2-3:储存在4℃,13℃或21℃下,心脏功能恢复所需的刺激次数和肾上腺素的量。

储存温度	心脏电复律 (30-40V; 心外膜) x 进行次数	肾上腺素 (0.1mg 团注) x 进行次数
Celsior 4°C	>7	>5
Somah 4°C	4-6	3-4
Somah 13°C	2-5	2-3
Somah 21°C	1	—

[0216] 相反,Celsior心脏不能产生同步的四室收缩,即使采用多种刺激干预(表2-3),也不能承受任何工作负荷,最终在实验期间出现僵硬状态。因此,不能从Celsior心脏组收集

到功能数据。在Somah组灌注90分钟和满工作负荷峰值时所获得的数据用于比较分析。计算出百分比面积变化,冠状动脉血流量,血压,每搏输出量,射血分数和心输出量,接近21℃组心脏的生理参数(表2-4)。

[0217] 表2-4:心脏功能参数在手术和体外再灌注时的峰值。

[0218]

	体内	体外			
		Ceisor 4℃	Somah 4℃	Somah 13℃	Somah 21℃
心率(次/分钟)	98±12	40±20	113±10	111±10	100±10
左室心室收缩压(毫米汞柱)	116±8	20±15	75±5	60±10	100±20
左室心室舒张压(毫米汞柱)	68±7	5±5	15±5	35±5	40±10
左心房压(毫米汞柱)	<10	nt	10-15	8-10	0-5
心输出量(毫升/分钟)	3300±400	nt	1250±100	2350±650 ¹	2500±300 ¹
3D 回声数据分析					
部分面积变化%	>40	10%	21.7±5.54	40.08±10.28 ¹	41.68±12.57 ¹
射血分数(%)	65±5	nt	34.0±6.43	56.08±3.72 ¹	57.64±3.54 ¹
心搏量(毫升)	20±4	nt	11±3	21±5	25±2 ¹

[0219] 2维超声心动图;LV,左心室;nt,由于缺乏预测的功能而没有进行第二次测试。

[0220] n=23,在体内组;n=5Ceisor中的心脏;n=6每个温度组的Somah中的心脏。

[0221] ¹13℃Ca和21℃对比4℃组心脏(p<0.05)。

[0222] 这是第一份报告显示心脏迅速恢复到生理相关的心血流动力学参数的全功能状态,在21℃体外保存5小时后损伤最小。这项研究表明,如果在保存过程中提高器官能量状态的同时可以预防低温损伤,则可以保持结构完整性,细胞稳态,修复和功能恢复。Somah溶液满足器官储存的基本要求,即预防水肿、活性氧类物质依赖性损伤和增强HEP合成,从而减轻极端低温(4℃)储存和相关的细胞损伤。

[0223] 实施例3

[0224] 在这个例子中,研究了心脏循环死亡(DCD心脏)后30分钟摘取的心脏,而且它的储存相当于目前的临床标准的4-5倍。此外,该研究旨在确定在移植的功能可行状态下,在Somah中长期储存DCD心脏的理想温度。

[0225] 材料及方法

[0226] 动物模型严格按照动物研究小组委员会批准的方案使用三个月大的雄性Sprague-Dawley大鼠。

[0227] 溶液制备和其他材料。如上所述配制Somah溶液。新鲜制备的溶液使用0.4mm过滤器(威达优尔公司)在4℃下过滤灭菌,并在24小时内使用。除非另有说明,所有的化学试剂和抗体都来自西格玛化工有限公司(美国,密苏里州,圣路易斯),安玛西亚公司(美国,新泽西,皮斯卡塔韦),伯乐生命医学产品公司(美国,加利福尼亚州,赫拉克勒斯)或丹科公司(美国,加利福尼亚州,卡平特里亚)。

[0228] 心脏的提取、储存和模拟再灌注用二氧化碳使大鼠昏迷,切断血管并将血液收集在酸-柠檬酸盐-葡萄糖(右旋糖)管中用以模拟心脏的再灌注。在安乐死后30分钟提取DCD心脏,并在4℃±2℃,10℃±2℃,21℃±2℃或37℃±2℃的Somah中储存24小时。在24小时储存结束时,通过在振荡水浴中于37℃下在灌注液(血液:Somah::3:1)中孵育心脏30分钟来模拟再灌注。在再灌注之前和之后进行心脏活检以进行死活和酯酶测定,线粒体极化测定,蛋白质表达和组织的三磷酸腺苷(ATP)和磷酸肌酸(CP)水平。

[0229] 活体死亡率和酯酶活性分析。使用基于荧光的活死分析和多光子显微镜评估来自

Somah DCD心脏的心肌细胞的生存力。将心脏活检与钙黄绿素AM(钙黄绿素的乙酰甲氧基衍生物)和乙锭同源二聚体染料(Live-Dead分析试剂盒;分子探针),一同放在1.5mL HBSS(Hanks平衡盐溶液)中,在pH7.4、21℃下,培育30分钟,再用保存液洗涤,之后用多光子显微镜成像为绿色(活细胞)和/或红色(损伤/死亡细胞)荧光。通过半定量测量钙黄绿素荧光的量子产率(光子计数)来评价心肌细胞的功能完整性,用以说明酯酶的活性。

[0230] 线粒体膜电位的JC-1测定法用JC-1染料(分子探针)标记心肌细胞,而后成像,最后使用多光子显微镜测定线粒体极性比率。

[0231] 蛋白质提取和蛋白质免疫印迹。将LV组织(20mg)切成300块,悬浮于200mL含有蛋白酶抑制剂混合物的裂解缓冲液(CellLytic MT;Sigma-Aldrich)中,均化30秒,然后以16,000g离心10分钟,收集上清液(蛋白质),然后使用Bio-Rad蛋白质测定试剂盒进行定量。在7.5%,10%或12%的十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)上分离蛋白质并转移到硝酸纤维素膜上。将免疫印迹与一级抗体(1:1000;抗肌球蛋白重链和轻链,辅肌动蛋白,肌动蛋白和肌钙蛋白C)孵育,然后用HRP(辣根过氧化物酶)缀合的第二抗体孵育,并使用电化学发光(GE Healthcare)检测蛋白质表达。

[0232] ATP和CP测定。在4℃,10℃,21℃或37℃储存24小时后和在使用分光光度计和生物发光测定试剂盒(Perkin Elmer,Waltham,MASS,USA)进行再灌注时,在心脏组织中测量ATP和CP水平。

[0233] 多光子成像。使用BioRad成像系统(MRC 1024ES)以及MaiTai锁模钛:蓝宝石激光器(Spectra-Physics,Mountain View,Calif,USA)的最先进的多光子成像技术被用于深度成像心脏活组织检查及半定量的荧光测量。在直接检测配置中采集512×512像素,分辨率为0.484mm的图像。通过XYZ轴扫描鉴定心肌细胞,并在切除点的LV活组织检查中在50mm深处成像。

[0234] 统计分析Metamorph软件(Molecular Devices,Downingtown,PA,USA)被用于数据提取,量化和多光子图像的荧光计数分析,由实验室的不同成员以不知情的方式进行。数据表示为平均值±标准误差。使用Student t检验(成对配对)或单向方差分析(适用时)确定组间差异。可接受95%可信度($P < 0.05$)的统计显着性差异。数据来源于每个温度组 $n = 3$, $n = 25$ 个酯酶活性和线粒体极化的测量结果,ATP和CP水平测定 $n = 5$ 。

[0235] 结果

[0236] 提取心脏中的心肌细胞活力。提取后立即进行心脏活组织检查(对照;图12A)的活死检测和多光子显微镜检查(图12),所示存在强烈的绿色荧光(指示存活细胞),但没有红色核荧光(指示受损细胞)。在Somah储存24小时后,除了37℃组存在变色和结构完整性有明显缺失之外,在所有其他温度组中DCD心脏的总体形态得以良好保存,而活死测定的绿色荧光与对照组相似。然而,在4℃,10℃和37℃下,受损细胞的红色核荧光在储存24小时后也有所增强(图12B),表明心脏存储完全,但亚低温(21℃)下,细胞有损伤。储存的心脏经模拟再灌注后,存储在4℃和37℃条件下的心脏中的绿色荧光明显减少(图12C)。

[0237] 酯酶活性测量。在模拟灌流之前,绿色荧光的量子产率作为酯酶活性的函数在21℃储存的心脏中最高,在37℃储存最低(表3-1)。再灌注后,21℃储存的心脏中酯酶活性没有改变,但在4℃,10℃和37℃储存的心脏中有不同程度的降低,尽管在10℃组心脏中变化不明显。

[0238] 表3-1:DCD心脏中钙黄绿素荧光(酯酶活性)的定量评估。

	4°C	10°C	21°C	37°C
之前	193.4 ± 6.7	202.8 ± 7.9	216.8 ± 8.4	130.5 ± 5.9
[0239] 再灌注				
再灌注后	165.8 ± 6.9	191.8 ± 6.7	220.4 ± 6.6	113.6 ± 5.8
钙黄绿素荧光变化%	-14% ^a	-5%	2%	-13% ^b

[0240] 通过分析描绘在Somah溶液中储存24小时并且在再灌注后在每个温度组中的心脏循环死亡后捐献的3个心脏的酯酶活性的图像来获得定量数据(总荧光计数)。再灌注24小时后,酯酶活性在37°C时最低,在21°C时最高。再灌注后,在极低温(4°C)或常温(37°C)保存的心脏中,酯酶活性显著下降,但在10°C和21°C组心脏中未见改变。钙黄绿素荧光

[0241] 任意单位+平均值的标准误差

[0242] 灌注后显著变化

[0243] JC-1测定线粒体极化。在新鲜提取的DCD心脏中,线粒体的极化和去极化状态处于平衡状态(图13)。无论储存温度如何,DCD心肌细胞线粒体膜在储存24小时和再灌注后均保持极化,而再灌注后各组极化率无明显变化。此外,再灌注前后各组线粒体极化状态无显著差异。

[0244] 高能磷酸盐合成。与对照相比,在4°C,10°C和21°C的Somah储存24小时后,心脏中的ATP/CP合成显著增强(图14)。再灌注后,4°C组的ATP合成量显著下降,而10°C组的ATP合成量无变化。相比之下,再灌注导致亚低温下储存的心脏中ATP合成增加400%。与ATP研究相似,21°C组再灌注后CP合成也显著增加。

[0245] 蛋白质表达通过评估对于收缩功能重要的蛋白质的表达来确定离体存储的心脏的结构生存力。心肌细胞HC,辅肌动蛋白,肌动蛋白,肌球蛋白LC和肌钙蛋白C的表达被良好地保存在21°C的Somah中保存了24小时(图15)。相反,这些蛋白在24小时储存或再灌注后在其他温度组中容易丢失。

[0246] 总之,本实施例首次证实,使用最近设计的器官保存溶液Somah,在低温储存下超过目前可接受的时间的4至5小时之后,静态储存中的DCD心脏可以保存在亚活性温度下。

[0247] 实施例4

[0248] 这个例子评价了Somah在4°C和21°C下在亚低温体外保存后,保存最佳心脏功能的相对效力。

[0249] 材料及方法

[0250] 心脏提取手术和心脏停搏该比较研究使用了十只雌性约克夏猪(45-54公斤)。按照动物研究委员会(Institutional Animal Care and Use Committee)批准的方案,将心脏分成4°C(n=5)或21°C心脏停搏(n=5)两组。采用所述的纵隔方法提取心脏(Thatte HS, Rousou L, Hussaini BE, Lu XG, Treanor PR, Khuri SF: Development and evaluation of a novel solution, Somah, for the procurement and preservation of beating and non-beating donor hearts for transplantation. Circulation. 2009, 120:1704-1713)。收集血液进行离体实验,收缩压降至40mmHg以下时夹紧主动脉。1000ml SOMAH停搏液((SOMAH(Thatte HS, Rousou L, Hussaini BE, Lu XG, Treanor PR, Khuri SF: Development

and evaluation of a novel solution, Somah, for the procurement and preservation of beating and non-beating donor hearts for transplantation. *Circulation*. 2009, 120:1704-1713) 在4或21℃下,通过加入20mMK⁺,改变最终浓度)在4或21℃下,使用滚筒泵和压力传感器(Myotherm Cardioplegia System, Medtronic, Minneapolis, MN, USA),在75-100mmHg的压力下以300-400ml/分钟的流速输入主动脉根部。并使用iWorks系统(美国,新罕布什尔州,多佛市)记录数据。心脏停搏后,将心脏从所有附件上切下,用生理盐水冲洗,然后在21℃下保存5小时。切除后15分钟内将心脏运送到实验室。

[0251] 心脏的体外储存。将心脏放入含有2L SOMAH的无菌拉链袋中置于21±2℃的水夹套水浴。在整个储存期间定期检查保存液的温度。储存期间通过补充具有37mM Mg²⁺的(Fukuhiro Y, Wowk M, Ou R, Rosenfeldt F, Pepe S: Cardioplegic strategies for calcium control: low Ca²⁺, high Mg²⁺, citrate, or Na⁺/H⁺ exchange inhibitor HOE-642. *Circulation*. 2000, 102(19-3); Osaki S, Ishino K, Kotani Y, Honjo O, Suezawa T, Kanki K, Sano S: Resuscitation of non-beating donor hearts using continuous myocardial perfusion: the importance of controlled initial reperfusion. *Ann Thorac Surg*. 2006, 81:2167-2171) 20mM K⁺的溶液来增加SOMAH的感受性潜能,使心脏维持在非收缩状态。仔细清空心室后,在储存5小时之前和之后称重每组心脏。组织穿刺活检(2×4mm)在实验室进行,从LV的后壁开始,15分钟进入(0小时;对照)和5小时储存测定HEP。

[0252] 三磷酸腺苷(ATP)和磷酸肌酸(CP)测定。如所述在组织提取物中测量ATP和磷酸肌酸(CP)(Thatté HS, Rousou L, Hussaini BE, Lu XG, Treanor PR, Khuri SF: Development and evaluation of a novel solution, Somah, for the procurement and preservation of beating and non-beating donor hearts for transplantation. *Circulation*. 2009, 120:1704-1713; Bessho M, Ohsuzu F, Yanagida S, Sakata N, Aosaki N, Tajima T, Nakamura H: Differential extractability of creatine phosphate and ATP from cardiac muscle with ethanol and perchloric acid solution. *Anal Biochem*. 1991, 192:117-124)。简言之,将组织活检快速冷冻并储存在-80℃;将20mg组织悬浮在400μl 0.4M冰冷的高氯酸中并均化两次共计30秒。将匀浆在0℃以1970g离心10分钟。用等体积的0.4M冷KHCO₃中和和上清液的等分试样并如上所述进行离心。将上清液保存在-80℃下进行ATP和CP测量。将沉淀溶于等体积的0.1M NaOH中,离心并用于蛋白质测定。使用生物发光测定试剂盒(Sigma-Aldrich and GloMax-Multi+Detection System, Promega)测量ATP和CP。

[0253] 心脏离体复苏和功能研究的准备。主动脉和肺动脉(PA)分离。主动脉插管(1/2-3/8英寸管连接器),在40-50mmHg压力下,在4℃和21℃心脏停搏剂组中用100ml SOMAH轻轻冲洗冠状动脉,小心避免空气进入。分离肺静脉(PV)并用1/2-1/4英寸管连接器插管。PA插管采集样本,上下腔静脉结扎。

[0254] 离体研究的血液的制备。术中收集全身肝素化的血液,白细胞脱落(Pa11 Leukoguard过滤器)并在4℃下储存。在实验之前,通过使用SOMAH溶液(1:1比例以降低心脏的粘性应变)将血液的血细胞比容调整到20%来制备灌注液,并温热至21℃。灌注液、pH、葡萄糖、K⁺、Ca²⁺和HCO₃⁻调节至猪血液水平(7.5; 100mg/dl; 3.7, 1.38和32mmol/l)并根据需要分别加入10%右旋糖、KCl、CaCl₂和NaHCO₃。

[0255] SOMAH装置。一个定制的设备被用于心脏的体外复苏(图1)。CDI监测仪(Clinical Documentation Improvement monitoring system 500, Terumo cardiovascular systems corporation, Ann Arbor, MI)用于实时监测灌注液pH, 温度, PO_2 , PCO_2 , K^+ 和 HCO_3^- 。也使用iSTAT分析仪对这些参数在流入/流出样本中进行分析(Abaxis Ltd, Union city, CA)。在电路中的不同点记录压力和流量(图16)。经食管超声心动图(TEE)探头用于评估使用了2D-Echo系统的心脏的收缩功能。在二维超声心动图期间, 使用浸入心脏周围的灌注液中的黄铜鳄鱼导管记录三导联心电图。使用专门为SOMAH装置(Comdel Inc, Wahpeton, ND)编写的HMI软件实时采集和监测压力和流量数据。

[0256] 体外功能研究将心脏附着于SOMAH装置, 并以40-60mmHg在21℃(pH7.5)情况下用1-1.5升SOMAH通过主动脉灌注5分钟, 然后用灌注液灌注至pH、血液气体和电解质建立平衡为止。如上所述调节灌注液pH, 葡萄糖, K^+ , Ca^{2+} , HCO_3^- 至猪血液水平。由于系统温度在30分钟内逐渐升高至37℃, 两组均观察到强烈的心脏收缩。在40分钟内获得血液动力学稳定状态(相对于pH、血液气体和电解质)。实验灌注的总持续时间大约为180分钟。通过主动脉根部(无工作负荷)灌注心脏, 直到系统温度达到37℃, 之后进行PV灌注(满工作负荷)直至实验结束。在最初的顺行灌注期间, 通过每分钟通过主动脉流入心脏的灌注液的量, 以及在工作心脏中每分钟通过从肺动脉收集的灌注液的量(两者均被结扎), 来确定冠脉血流量。如果需要, 使用电转化(40-50J)和/或肾上腺素(1:50,000-1:100,000)(Lowalekar SK, Cao H, Lu XG, Treanor R, Thatte HS: Subnormothermic preservation in SOMAH: a novel approach for enhanced functional resuscitation of donor hearts for transplant. Am J Transplant. 2014)。在两个心脏满工作负荷的情况下在开始灌注之后约90分钟, 使用TEE探头进行心外膜2D回声探测, 在60分钟(基线)和峰值时进行功能评价, 之后每隔30分钟进行一次。峰值心脏性能由2D Echo观察到的最大收缩活动所定义。比较两组间峰值性能数据。

[0257] 酶测定和血液化学。在术中测量肌酸激酶(CK), 天冬氨酸转氨酶(AST), 心肌肌钙蛋白-I(cTnI), 乳酸和气体(pO_2/pCO_2), 并且在10分钟, 2小时和5小时心脏储存结束时用Vetscan VS2或iStat(Abaxis Ltd, Union City, CA)采集Somah样品。采用Vetscan VS2或i-Stat系统采集进口(主动脉)和流出(PA)样品, 进行酶测定及心肌耗氧量(MVO₂)和乳酸水平的灌注后评估, 在5分钟和90分钟时进行酶分析; 在使用Vetscan或iStat灌注开始后, MVO₂和乳酸盐达到60分钟(基线)和90分钟(峰值性能)。如所述计算MVO₂(Klabunde R: Cardiac function. Cardiovascular Physiology Concepts. 2011, Lippincott Williams&Wilkins, Baltimore, MD USA, 84-88)。

[0258] 心外膜超声心动图。经食管(TEE)探头用于Acuson Cypress系统(Acuson, Mountain View, CA)的术中和离体心脏功能的2DEcho评估, 并使用Cypress浏览软件分析图像。将心脏连接到SOMAH装置并悬浮在含有能覆盖心脏的2/3表面的2L灌注液的腔室中。在整个实验过程中记录ECG, 并且在灌注后约45-60分钟开始2D回声采集, 当观察到良好的心脏收缩后, 每30分钟的间隔重复一次。将探头置于与心脏直接接触的位置, 并调整探头的角度和脉冲方向, 来获得短轴和长轴视图, 用以评估心功能参数和心室壁厚和室间隔厚度。

[0259] 统计分析将相同数量的动物($n=5$)分为4℃和21℃的心停搏组, 以用于比较分析各组的生物化学, 血液动力学和功能测量。使用SigmaPlot软件对两组之间的显著性差异进

行统计比较。所有的比较使用配对t检验。 $P < 0.05$ 被认为是显著的。所有值以平均值 $\pm$ SEM表示。实验设计的流程图如图16所示。

[0260] 结果

[0261] 术中心脏停搏心脏骤停取决于停搏液的温度,发生于4℃组10-15秒时,21℃组20-25秒时,可能是因为使心脏骤停的低温(4℃)条件在后者中被有意消除。

[0262] 大体形态,心脏重量和储存过程中酶的释放。无论心脏停搏液的温度如何,所有心脏呈现正常的总体形态而没有任何变色。心脏柔韧,没有硬化或僵硬的迹象。两组储存5小时的心脏重量在储存前后没有改变,表明缺乏储存诱导的重度水肿(未显示)。心脏酶的释放与时间有关在两组中没有显著差异(图中未显示)。

[0263] 储存期间心脏停搏后,心脏组织的HEP水平。如图17所示,心脏骤停15分钟(对照)内ATP、CP和总高能磷酸盐(HEP)的浓度在4℃时显著高于21℃心脏停搏液中的心脏($P < 0.001$),这可能是由于21℃组心脏耗能较多,它们需要大约10秒钟才能完全停止。如图17B所示,两组在储存期间主动合成CP和ATP。然而,在4℃心脏($P < 0.01$)中储存结束时HEP的总浓度显著高于对照组,如图17C所示,5小时相对于0小时的归一化值,表明在21℃心脏中HEP的可用性高于在储存结束时的4℃心脏中的HEP的可用性。

[0264] 离体心脏功能研究-再灌注时的冠状动脉血流。在21℃心脏中,在相似的灌注压下,经过最初的顺行灌注的冠状动脉主动脉流量显著高于4℃组(表4-1)。两组心脏在灌注开始时立即表现出缓慢的四室收缩。当系统温度升高到30℃时,由于心脏开始剧烈收缩,冠脉流量开始下降。随着系统温度升高到37℃,压力和流量都增加。两组在37℃时冠脉流量最高(表4-1)。

[0265] 表4-1:随着SOMAH装置系统温度的升高,不同温度心脏的冠状动脉血流(ml/min)。

[0266]

心脏分组	P1 - 21℃	F1 - 21℃	P2 - 30℃	F2 - 30℃	P3 - 37℃	F3 - 37℃
4℃	40 $\pm$ 1	312 $\pm$ 90	44 $\pm$ 2	297 $\pm$ 28	57 $\pm$ 4	621 $\pm$ 88
21℃	40 $\pm$ 1	404 $\pm$ 65*	40 $\pm$ 2	348 $\pm$ 64	50 $\pm$ 3	619 $\pm$ 34

[0267] P1,P2,P3-在相应温度下的主动脉根部压力;

[0268] F1,F2,F3-在相应温度下的冠脉血流量。

[0269] *与4℃相比有显著性的

[0270] 再灌注时释放酶。在灌注期间,4℃的心脏中CK,AST和cTnI释放速率增加(图18)。随着灌注时间的延长,CK和cTnI的释放均显著增加,但AST没有。相反,在同一时期,21℃心脏中这三种酶的释放暂时减少(图18)。然而,灌注开始时21℃的心脏中的CK和cTnI(而不是AST)的释放显著高于4℃的心脏。

[0271] 再灌注心脏的代谢。与先前的观察一致(Lowalekar SK,Cao H,Lu XG,Treanor R, Thatte HS:Subnormothermic preservation in SOMAH:a novel approach for enhanced functional resuscitation of donor hearts for transplant.Am J Transplant.2014),在4℃和21℃停搏液再灌注时,在缺氧到好氧代谢中发生了快速转换,表现为耗氧量增加,峰值性能时乳酸比率逆转,再灌注90分钟(图19A和19B)。氧气提取,乳酸生产和利用在两组中均达到稳定状态,峰值性能没有显著差异。然而,在再灌注时,21℃组心脏在工作心脏中表现出稳健的HEP合成。相反,在4℃的心脏中产量减少,并且在实验过程中HEP持续下降。当后灌注活检进行HEP分析时,在实验结束时,21℃心脏中,ATP、CP和总

HEP的比率(灌注后/灌注前)分别为1.10、1.97和1.17,显著高于($p < 0.01$)在4°中观察到的比值0.47、0.32和0.38。

[0272] 再灌注后的功能恢复。在两组再灌注开始时,心房和心室立即明显的自发活动。随着温度升高,心室收缩力在单次复律后37℃时达到峰值,这也确立了两组窦性心律的正常电活动和机电耦合。而21℃停搏液组中的5个心脏中有4个以单一心复律恢复窦性心律,且无需进一步的正性肌力支持,4℃心脏停搏液组中5个心脏中有2个需要额外的单剂量的肾上腺素以保持最佳功能。有趣的是,在整个实验过程中,两组的心脏都保持柔韧性,并且在LV峰值和隔膜厚度没有改变的情况下,在峰值性能上没有表现出任何水肿,表4-2。2D Echo获得的心脏功能参数在4℃和21℃停搏液组之间的比较数据与体内观察到的相似(表4-2)。尽管在21℃时接受SOMAH停搏液的心脏恢复较好,但两组的功能参数无明显差异。

[0273] 表4-2:在4℃和21℃的SOMAH心脏停搏液组心脏再灌注时,在手术期间和峰值表现的的心脏功能参数。

[0274]

参数	体内	4℃心脏组	21℃心脏组
左心室壁厚度(厘米)	1.45 ± 0.02	1.55 ± 0.05	1.51 ± 0.04
室间隔厚度(厘米)	1.43 ± 0.12	1.61 ± 0.04	1.49 ± 0.07
心率	98 ± 12	100 ± 10	110 ± 10
左室心室收缩压(毫米汞柱)	116 ± 8	100 ± 20	110 ± 10
左室心室舒张压(毫米汞柱)	68 ± 7	40 ± 10	55 ± 10
左心房压(毫米汞柱)	<10	0-5	0-5
心排量	2500 ± 500	2500 ± 300	2640 ± 250
部分面积变化(%)	>40	42 ± 13	51 ± 4
射血分数(%)	65 ± 5	56 ± 4	66 ± 5
心搏量(毫升)	29 ± 4	25 ± 2	24 ± 3

[0275] 本实施例是为了评估在21℃而不是标准温度4℃下使用晶体SOMAH能否进一步改善SOMAH中保存在室温下的心脏质量,并最终使其体外复苏达到最佳性能。

[0276] 据报道,心脏停搏时灌注压低于50mmHg时会发生心肌水肿(Mehlhorn U,Geissler HJ,Laine GA,Allen SJ:Myocardial fluid balance.Eur J Cardiothorac Surg.2001,20:1220-1230)。然而,在目前和过去的研究中,不管心停搏的温度如何,一直使用100mmHg的SOMAH晶体灌注压力,但是没有观察到任何心脏都水肿(Lowalekar SK,Cao H,Lu XG,Treanor PR,Thatte HS:Sub-normothermic preservation of donor hearts for transplantation using a novel solution,SOMAH:a comparative pre-clinical study.J Heart Lung Transplant.2014,33(9):963-970)。SOMAH心脏停搏液在保护心脏水肿和提供能量代谢底物方面提供了血液停搏液的所有优点,并提供了明确的外科领域。此外,在SOMAH溶液中提供生理浓度的钙还可以防止由于“钙悖论”引起的心肌损伤(Yamamoto H,Yamamoto F:Myocardial protection in cardiac surgery:a historical review from the beginning to the current topics.Gen Thorac Cardiovasc Surg.2013,61:485-496.10.1007/s11748-013-0279-4)。此外,也避免了血液的缺点,也是再灌注损伤的罪魁祸首——白细胞和血小板的存在(Han S,Huang W,Liu Y,Pan S,Feng Z,Li S:Does leukocyte-depleted blood cardioplegia reduce myocardial reperfusion injury in cardiac surgery?A systematic review and meta-analysis.Perfusion.2013,28(6):474-483)。相比之下,近期研究表明其他晶体溶液(Celsior和UWS),当用于心脏停搏时并没

有防止损失储存的心脏中的高磷酸盐能量,再灌注时的水肿和潜在的高K⁺介导的钙超载和导致失去心脏功能的僵硬 (Lowalekar SK,Cao H,Lu XG,Treanor R,Thatte HS: Subnormothermic preservation in SOMAH:a novel approach for enhanced functional resuscitation of donor hearts for transplant.Am J Transplant.2014)。

[0277] 在这项研究中,HEP在4℃的心脏中由于快速停搏得以保存,因此在储存结束时这些心脏中HEP的总浓度也更高。相反,尽管两组的K⁺浓度(20mM)相等,但由于缺乏低温组分,21℃心脏花费更长的时间才完全停搏,导致HEP消耗。两组均在SOMAH储存过程中合成HEP,然而,在5小时结束时,21℃心脏中HEP的功能可用性高于4℃心脏(图3)。同样,在再灌注时,与4℃的心脏不同,21℃心脏继续合成HEP以满足工作心脏的需要。在21℃心脏中的可用HEP的峰值性能显着高于4℃心脏,并且在实验过程中持续如此。相比之下,4℃的心脏不能合成HEP来维持能量需求,因此HEP在工作心脏中继续减少。这些结果与先前的观察结果一致,与在室温下保存在SOMAH中的心脏不同,极端低温导致这些心脏再灌注时HEP合成减弱 (Lowalekar SK,Lu XG,Thatte HS:Further evaluation of somah:long-term preservation,temperature effect and prevention of ischemia-reperfusion injury in rat hearts harvested after cardiocirculatory death.Transplant Proc.2013,45(9):3192-3197)。

[0278] 4℃心脏的顺行灌注显着低于21℃的心脏,甚至在更高的灌注压力下,仍然保持减少,直到系统温度稳定在37℃(表4-1)。不受理论的限制,常温跳动的心脏遇到4℃心脏停搏液会突然休克导致血管收缩,这在储存过程中无法解决,只有在再灌注开始并升温至37℃时才可能解决,这可能由于血管扩张剂一氧化氮和前列环素的活性释放 (Thatte HS,Rousou L,Hussaini BE,Lu XG,Treanor PR,Khuri SF:Development and evaluation of a novel solution,Somah,for the procurement and preservation of beating and non-beating donor hearts for transplantation.Circulation.2009,120:1704-1713)。血管舒张增加,更大的冠状动脉血管通畅性和有利的代谢状态提供了快速营养和H⁺冲刷,从而导致HEP的强健合成及在21℃心脏中快速恢复功能。这些心脏以单次心脏复律恢复窦性心律,并快速达到接近体内范围的心脏和血液动力学参数(表4-2),不需要任何正性肌力支持。另一方面,4℃的心脏只有在温热至37℃时才表现出强烈的收缩,尽管比在人体心脏中报道的心脏维持心输出量少十倍 (Hill AJ,Laske TG,Coles JA,Sigg DC,Skadsberg ND,Vincent SA,Soule CL,Gallagher BA,Iaizzo PA:In vitro studies in human hearts.Am Thorac Surg.2005,79:168-177),但是一些心脏需要额外的转换和/或变力干预。

[0279] 再灌注后两组均观察到心脏酶的释放。心肌细胞释放酶的重要机制是通过工作心脏的HEP依赖性过程响应外部刺激如胰岛素和增加的代谢,在细胞内囊泡运输和并入(例如携带葡萄糖转运蛋白的囊泡(GLUT))到细胞膜中的胞质溶胶渗漏 (Ferrera R,Benhabbouche S,Bopassa JC,Li B:One hour reperfusion is enough to assess function and infarct size with TTC staining in Langendorff rat model.Cardiovasc Drugs Ther.2009,23:327-331)。因此,即使没有对心肌细胞造成实际损伤(酶悖论),也可能发生细胞酶的释放。不受理论束缚,在再灌注开始时,21℃停搏液组

中酶释放的初始爆发可能是由于代谢需求随着系统温度和心肌收缩力的增加而增加(图17),因此在储存结束时HEP的可用性更高。然而,当达到代谢稳定状态时,酶的进一步释放暂时减弱。相反,在4℃的心脏中,随着更多的HEP可用于这些功能,酶的释放速率随时间增加。尽管目前的数据并没有区分酶释放的进展,但两组心脏功能参数相似且接近体内观察到的实际生理值(表4-2),表明SOMAH心脏释放酶是代谢而不是组织损伤的标志,因此这些心脏在移植后会表现良好。

[0280] 实施例5

[0281] 本例设计用于评估新型储存溶液Somah维持肝脏磷酸盐合成和抑制长期静态储存依赖性多细胞损伤进行的能力。这项目前的初步研究目的是,评估Somah与目前临床使用的威斯康星大学溶液(UWS)在72小时低温储存期间保存和加强DCD猪肝脏体外回收的能力的相对功效。有限的体外肝脏再灌注和Somah储存肝脏的功能评估也进行了测试未来移植研究评估移植功能的可行性。

[0282] 材料及方法

[0283] 表5-1比较了CoStorSol(UWS)(Preservation Solutions Inc,Elkhorn,WI)和Somah(Somahlution,LLC,Jupiter,FL)的储存性能。所有其他化学品均得自Sigma-Aldrich(密苏里州,圣路易斯)。VetScan iStat,VetScan VS2,CG4+,CG8+,Large Animal Profile,用于测量血液气体,电解质,乳酸盐,葡萄糖,天冬氨酸转氨酶(AST),丙氨酸转氨酶(ALT)和肌酸激酶(CK)酶的综合诊断盒均购自Abaxis公司(加利福尼亚州,联合市)。

[0284] 表5-1:Somah器官保存液(pH 7.5)和威斯康星大学溶液(UWS;pH 7.8)的成分。

[0285]

成分	浓度 (毫摩)
蒸馏水	1L 1 升
钙	1.30
氯化物	7.00
磷酸钾 (一元)	0.44
氯化镁 (六水)	0.5
硫酸镁 (七水)	0.50
氯化钠	125.00
碳酸氢钠	5.00
磷酸钠 (二元; 七水)	0.19
D-葡萄糖	11.00
谷胱甘肽 (还原型)	1.50
抗坏血酸	1.00
L-精氨酸	5.00
L-瓜氨酸苹果酸	1.00
腺苷	2.00
肌酸乳清酸	0.50
一水肌酸	2.00
L-肌肽	10.00
L-肉碱	10.00
二氯乙酸盐	0.50
胰岛素 (10 毫克 /毫升)	1.00 毫克/升
威斯康星大学 UWS 组合物 (酸碱值 7.8)	
乳糖醛酸	105
磷酸二氢钾	25
氢氧化钾 (56%)	100
氢氧化钠 (40%)	27
硫酸镁(七水)	5
棉子糖 (五水)	30
腺苷	5
谷胱甘肽	3
别嘌呤醇	1
羟乙基淀粉 (代血浆)	50g/L 50g/升
胰岛素	4.0 毫克/升

[0286] 肝脏储存和样品采购。这项研究是根据动物研究小组委员会 (IACUC) (VA Boston Healthcare System) 批准的方案,在14只雌性猪中进行的,每只雌猪重40-50公斤。将动物分成两组,每组七只动物。整个肝脏在心脏死亡和心脏提取后60±10分钟解剖出来。将肝脏

在4℃下储存在UWS (UWS肝脏) 或Somah溶液 (Somah肝脏) 中72小时。储存过程中不会更换溶液。在0, 6, 24和72小时取肝脏活组织检查以进行成活和生化评估。在1, 6, 24和72小时对UWS和Somah溶液进行取样用于代谢监测以及测定其他与肝功能相关的化合物。

[0287] 手术过程。注射telazol 4-6mg/kg和赛拉嗪2mg/kg诱导全身麻醉。插管后, 静脉注射丙泊酚10mg/kg/小时, 瑞芬太尼40-60μg/小时, 尼姆贝10-20mg用以维持动物生命体征, 使用机械维持通气。如所描述的 (Lowalekar SK, Cao H, Lu XG, Treanor R, Thatte HS: Subnormothermic preservation in SOMAH: a novel approach for enhanced functional resuscitation of donor hearts for transplant. Am J Transplant. 2014), 主动脉被交叉钳夹, 心脏停止, 取出心肺阻断用于其它实验。中位剖腹手术后, 将肝动脉插入导管, 腹腔器官分别用2L压力和流速分别为100mmHg和300ml/min的冰冷的UWS或Somah溶液冲洗, 直到通过肝上下腔静脉 (IVC) 的灌注液变为清液。收集全肝切除手术全过程的灌注液。肝脏被转移到保存在4℃冰箱中的含有防腐液的塑料袋中, 并在30分钟内运送到实验室行进一步分析。将肝脏转移到含有防腐剂溶液的储存盒中, 并在4℃下储存72小时。

[0288] 三磷酸腺苷 (ATP) 和磷酸肌酸 (CP) 测定。肝组织提取物中测量ATP和磷酸肌酸 (CP)。简而言之, 将20mg肝组织悬浮于400μl 0.4M冰冷的高氯酸溶液中并均质化30秒两次。匀浆物在0℃以1970g离心10分钟。用等体积的冰冷的0.4M碳酸氢钾溶液中和等分的上清液, 并如上所述离心。将上清液保存在-80℃下进行ATP和CP测量。将沉淀溶于等体积的0.1M NaOH中并离心并用于蛋白质测定。根据制造商提供的方案使用生物发光测定试剂盒 (Sigma-Aldrich和GloMax-Multi+DetectionSystem, Promega) 测量ATP和CP。

[0289] 离体研究的血液的制备。术中收集全身肝素化的血液, 白细胞消化并在4℃下储存。在实验开始之前, 使用Somah溶液 (现在的灌注液) 将血细胞比容调节至20%。分别使用10%葡萄糖, KCl, CaCl₂和NaHCO₃, 将灌注液的pH值, 葡萄糖, 钾离子, 钙离子和碳酸氢根离子调节至猪血液水平 (7.5; 100mg/dl; 3.7, 1.38和32mmol/l); 气体则根据需要进行调整。

[0290] 体外灌注。肝脏在4℃下储存在Somah中72小时 (n=3)。确定肝动脉和门静脉并插管。将肝脏保存在聚丙烯灌注器中, 并连接到用于离体再生心脏的定制Somah装置。在系统中加入了氧合器, 换热器, 临床文件改进 (CDI) 监测仪和具有定制书面软件 (Comdel Inc, Wahpeton, ND) 的数据采集装置, 用于实时监测灌注液pH, 温度, pO₂, pCO₂, K⁺和HCO₃⁻-apop, 压力和流量。Somah装置容器充满2L灌注液。通过门静脉用2L冷Somah将肝脏轻轻冲洗, 然后通过肝动脉 (HA) 和门静脉 (PV) 连接Somah装置。灌注液箱出口被分成两个回路: 在第一回路中, 通过重力将灌注液以8-10mmHg的压力 (通过改变储存器的高度进行调整) 排入PV中。在第二个循环中, 使用一个泵将灌注液通过充氧合器和换热器转移到HA (压力为80-100mmHg)。灌注液的温度在20分钟内升高至37℃, 并且灌注液在肝脏中循环2小时。通过肝静脉 (HV) 将肝脏灌注液排入室内, 并通过另一个泵返回到储存室。如下所述, 从HV排出的灌注液暂时取样为白蛋白, 肝酶和其他代谢物。由于储存在UWS中的DCD肝脏受损, 这种功能评估仅在Somah肝脏中进行。

[0291] 代谢物和肝酶的分析。通过灌注液流入 (HA) 和流出 (HV) 评估血液参数。采用CDI监测仪, VetScan iStat和VetScan VS2分别测定生化指标, 血气, 白蛋白合成和肝酶, 包括碱性磷酸酶 (ALP), 丙氨酸氨基转移酶 (ALT), 天冬氨酸转氨酶 (AST), γ-谷氨酰转肽酶 (GGT)

肌酸激酶(CK)。

[0292] 组织病理学。在0,6,24和72小时储存时间点采集Somah或UWS储存的肝脏的组织活检样本,在10%福尔马林中固定并处理用于组织病理学(10 μ 切片;苏木精和伊红染色)。使用Olympus显微镜和图像分析仪系统(BX51TRF;Olympus America Inc,USA)采集和分析图像。由三位独立的观察者盲估图像以用于组织病理学。统计分析:测量和数据提取以盲法进行。比较两组(UWS vs.Somah,每组n=7;静态储存)以评估两种溶液对器官功能的影响。使用单因素方差分析(ANOVA)将各种测定的定量初始值与随后各组内的时间点进行比较,然后进行Dunnett多重比较测试和t检验以用于配对组之间的比较分析。统计显著性在95%可信度下被接受($P<0.05$)。除非另有说明,所有使用的数值均为平均值 $\pm$ SEM。所有分析均使用GraphPad Prism 6(版本6.1),使用0.05显著性水平。

[0293] 结果

[0294] 总体外观:4 $^{\circ}$ C下在UWS中储存时,在储存的第一小时内肝脏的总体外观迅速改变为变色状态,并且随后持续时间变差(未示出)。相比之下,储存在Somah的肝脏保持其颜色类似于新提取的肝脏(对照),即使在4 $^{\circ}$ C延长72小时储存(图20)之后。此外,Somah肝脏在储存期间没有增加重量(未显示)。

[0295] 肝细胞:在UWS储存的肝脏中看到许多低能量区域的肝细胞的核染色质凝聚和固缩变化,但在Somah中没有。在UWS和Somah保存的肝脏中获得的切片中始终可见双核和多倍体肝细胞核。此外,在Somah肝脏中,相邻肝细胞之间的细胞边界明显完整,并且在仔细扫描多个区域时没有胆汁淤积或胆小管扩张。在72小时从UWS肝脏获得的切片中,肝细胞发生明显的广泛空泡化变性,但Somah肝脏中未发生(图21)。

[0296] 胆管和小管:门脉三联胆小管和较大的胆管衬里出现强烈的固缩,提示UWS肝胆管细胞凋亡或坏死。相反,胆管和胆小管在外观上均匀一致,72小时后在Somah肝脏中具有位置规则的细胞核和保存良好的核异质性(图21)。此外,在UWS肝脏中,早在6小时的就发生胆管上皮剥脱、粘膜脱落以及胆小管基底层细胞的细胞核解体(图22)。相反,即使在储存72小时后,Somah肝脏也不会看到胆管上皮种剥落(图21和22)。

[0297] 存储的肝脏中的代谢。虽然新鲜重组的UWS和Somah的起始pH值是碱性的(UWS pH高于Somah),但Somah酸性(6.8-7.0)与UWS(7.3-7.8)相比在所有的储存时间点都更高。尽管pH值降低较少,但UWS中乳酸的含量有较大幅度的增加。乳酸盐的生产与溶液pH的急剧下降并不符合,这可能是由于两种溶液的高缓冲能力。与Somah溶液相比,UWS中乳酸盐水平增加1.5倍,在24和72小时显著不同($p<0.05$) (图23A和23B)。

[0298] 如图23(下图)所示,UWS和Somah溶液中的葡萄糖浓度有相当的增加。UWS中的葡萄糖浓度在存储72小时后从0mg/dl增加至高达140mg/dl。相似地,Somah中的葡萄糖水平比基线水平180mg/dl增加了1.72倍至320mg/dl,在同一时间段内,表明糖原分解多于葡萄糖再摄取。由于在开放系统中,大气中氧气在水中的溶解度与温度成反比,所以Somah和UWS都在4 $^{\circ}$ C时与氧气过饱和,在存储开始时的氧分压为 200 ± 13 mmHg。因此,在延长的时间低温储存期间,即便因为氧气消耗遵循零级动力学,肝脏利用氧气不能被清楚地证明。

[0299] 相反,虽然没有器官的情况下Somah或UWS溶液中pCO₂(溶解的二氧化碳的指示剂)没有变化(未显示),但是目前的研究证明在72小时储存期间Somah中储存的肝中pCO₂显著增加,表明Somah储存在DCD肝脏中的氧化代谢转换。相比之下,在72小时期间,内有被储

存的肝脏的UWS溶液中的 CO_2 水平显著较低并且保持不变。在UWS中,在肝脏浸入并转移到实验室之后30分钟($6.30 \pm 0.38 \text{ mmHg}$)测量的 pCO_2 增加不明显,在24小时内仅为 $7.33 \pm 0.48 \text{ mmHg}$,在72小时时为 $9.27 \pm 0.89 \text{ mmHg}$ 。与Somah相反, pCO_2 从 $10.8 \pm 1.13 \text{ mmHg}$ 开始显著增加,在肝脏初始浸泡30分钟后,1小时为 $15 \pm 1.45 \text{ mmHg}$,72小时结束时为 $27 \pm 1.14 \text{ mmHg}$,表明代谢的暂时增加。Somah中的 pCO_2 比UWS中的更强,表明新陈代谢从储存开始一直到30分钟时,Somah中的新陈代谢比UWS中的更强。72小时储存过程中,Somah存在的碳酸氢盐的可能性促成了 pCO_2 的这种增加,这是因为 HCO_3^- 浓度基本保持不变(4.23 mM/L)。相反,在72小时储存期间,UWS中 HCO_3^- 浓度从 7.30 降低至 5.33 mM/L ,这不受理论束缚,可能导致储存期间UWS中观察到的 pCO_2 的非显著显著增加(图25)。另一个可能的考虑是无氧糖酵解,通过生产乳酸,可能导致Somah中 pCO_2 的升高(以及UWS储存肝脏的轻度升高)。这些数据表明至少细胞代谢保持完整。

[0300] 储存肝脏中磷酸盐的测量。在72小时储存期间,UWS肝脏中的ATP,CP和总磷酸盐浓度显著降低($p < 0.05$) (图25)。UWS贮藏期间,磷酸盐总量随时间下降,前6小时下降32%,72小时后下降50%。相反,在整个保存过程中,Somah肝脏中的ATP,CP和总磷酸盐水平没有明显变化。观察到Somah肝脏在72小时的总磷酸盐浓度增加(图25),类似于 CO_2 的代谢生成。

[0301] 储存期间肝酶的释放。在储存溶液中观察到ALT,AST和CK酶作为肝组织损伤的标志物的时间依赖性释放。当储存在UWS中时,所有三种酶的释放显著显著升高($P < 0.05$),与储存在Somah中的肝脏相比(图26)。

[0302] 对somah肝脏的功能评估。将Somah储存的肝脏(72小时)在 37°C 用血液(灌注液)再灌注2小时进行功能评估。在30和120分钟时,再灌注肝脏的耗氧量分别显著显著增加了38%和64% ($p < 0.05$)。同时,在灌注液中释放的乳酸浓度在30分钟和2小时后分别下降11%和41%,表明有氧代谢开关厌氧。

[0303] 再灌注期间肝酶的暂时释放没有显著显著差异(图27)。在2小时结束时,ALP (15.33 ± 0.96) 和 $\gamma\text{-GT}$ ($17.5 \pm 1.06 \text{ U/L}$) 均在生理浓度范围内。然而,再灌注结束时灌注液中AST (2151 ± 81),ALT (228 ± 32) 和CK ($1428 \pm 205 \text{ U/L}$) 浓度升高。再灌注30min内Somah肝脏的白蛋白合成和释放显著显著增加($p < 0.03$),在2小时内时间上升($p < 0.01$) (图28)。灌注Somah肝脏的胆汁合成和释放时间也增加(数据未显示)。

[0304] 这个实例的目的是比较“Somah”和UWS溶液,用于延长猪DCD肝脏的体外时间保存。在这项研究中,提供了Somah比UWS有更好效储存性质以功能性挽救DCD肝脏的证据。不受理论束缚,假设Somah的独特制剂在体外储存期间暂时维持和/或增加器官的能量状态,导致增强的细胞内稳态和结构完整性,从而有效地改善切除的器官在储存期间整体修复和恢复。

[0305] 本研究的结果显示DCD肝脏的进行性组织损伤是可预防的,这取决于储存溶液的组成。肝细胞核固缩和胆管上皮细胞反应性变化在UWS肝脏早6小时即可见,72小时内不见于Somah肝。此外,本研究提供了不同类型胆道损伤的早期诊断只是简单地报道((Kochhar et al., 2013, World J. Gastroenterol., 19:2841-46)。储存在UWS中的DCD肝脏在小胆管和大胆管中均显示退行性改变,这与胆管狭窄和胆管功能障碍的潜在原因非常吻合。

[0306] 据报道,这导致移植后移植物功能差(Kochhar et al., 2013, World J. Gastroenterol., 19:2841-46) and greater morbidity (Yan et al., 2011,

J.Surg.Res.,169:117-124)。不受理论束缚,较高的K⁺水平和局部缺血可能增加了UWS中肝脏中的细胞损伤(Lowalekar SK,Cao H,Lu XG,Treanor PR,Thatte HS.Subnormothermic preservation in somah:a novel approach for enhanced functional resuscitation of donor hearts for transplant.Am J Transplant.2014;14:2253-62)。此外,虽然酸性pH据报道对肝细胞和窦状上皮细胞是组成性有益的(Lowalekar SK,Cao H,Lu XG,Treanor PR,Thatte HS:Sub-normothermic preservation of donor hearts for transplantation using transplantation solution,SOMAH:a comparative pre-clinical study.J Heart Lung Transplant.2014,33 (9):963-970),Somah的pH值与UWS相比在整个保存期间保持相对酸性。酶试验研究表明,与UWS相比,Somah储存肝脏的肝细胞损伤明显减少。

[0307] 在低温灌注器官储存期间,糖酵解似乎是在150mmHg的pO₂时的主要能量来源(Opie LH,Lopaschuk GD(2004)Fuels:aerobic and anaerobic metabolism.In:Opie LH,ed.Heart Physiology:From Cell to Circulation.4th ed.Philadelphia,PA:Lippincott,Williams and Wilkins 306-354),Somah中的二氯乙酸(DCA)可能将由糖酵解产生的丙酮酸转化为三羧酸循环,从而进一步增强ATP合成和维持磷酸盐(图25)。此外,通过增强丙酮酸的氧化代谢,DCA还防止Somah储存的肝脏中乳酸盐的积累。而且促进葡萄糖进入细胞的胰岛素是肝脏营养因子,并且维持肝脏超微结构和再生能力。Somah解决方案通过提供浓度为100U/L的胰岛素,比UWS高出2.5倍。因此,在不存在DCA的情况下超过阈值水平的更高的乳酸积累和UWS-肝脏中的更低的胰岛素浓度有助于该组的比较变化。

[0308] 储存期间外植器官中磷酸盐的损失导致器官中不可逆的退行性改变。尽管UWS和Somah溶液肝脏在储存期间糖原依赖性葡萄糖浓度的增加相当,但UWS中的磷酸盐储存耗尽,与Somah的增加相反。不受理论束缚,这表明UWS肝实际上处于分解代谢状态,导致磷酸盐损失。相反,通过促进Somah肝脏中的葡萄糖的氧化磷酸化,产生比单独的无氧酵解(Brown,Biochem J,1992,284:1-13)多15倍的磷酸盐量(对于等量的葡萄糖分子)。此外,在低温灌注期间,具有较高ATP水平的肝脏在再次升温时表现出较低的氧化应激(Belzer F,Southard JH,Transplantation.1988Apr;45 (4):673-6)。

[0309] 在移植之前,静态器官保存一直被认为是维持肝外植体的关键组分(Pegg et al.,Transplantation,1981,32:437-43)。有限的研究已经解决了肝脏在UWS中储存的有害作用溶液(Startzl等,Hepatology,2010,5:1869-84)。然而,这在Somah保存的DCD肝脏中似乎不存在。初步的功能研究表明,在心脏中有相似的结果支持有氧代谢的快速转换(Lowalekar SK,Cao H,Lu XG,Treanor R,Thatte HS:Subnormothermic preservation in SOMAH:a novel approach for enhanced functional resuscitation of donor hearts for transplant.Am J Transplant.2014)。同样,白蛋白的合成显著增加,以及再灌注Somah肝脏中的胆汁释放,表明长时间储存后代谢和功能得到保持。由于这些器官的严重损伤,UWS储存的肝脏被评估无功能恢复。

[0310] Somah肝脏中的胆系统仍然保持分化和完整,表明没有实质的损害。众所周知,肝细胞可以修复或再生,特别是在如果能够保存器官的能量状态的情况下。导致PNF和DGF的是胆管系统的失败(Kochhar et al.,2013,World J.Gastroenterol.,19:2841-46)。可以通过在Somah中体外储存来预防胆汁功能障碍。

[0311] 实施例6

[0312] 去年每百名需要肾脏移植的患者中就有有86人没有找到肾源,移植需求日益增加[National Kidney Foundation;<http://www.kidney.org>].尽管过去数十年的实体器官移植取得了巨大的进展,而肾替代疗法(血液透析和腹膜透析)的使用不仅带来严重衰弱和/或威胁生命的并发症,而且由于需要频繁去医院而妨碍了患者的日常生活,给社会带来巨大的经济负担。

[0313] 2015年,美国有14000例肾移植患者,每月增加肾移植候选列表2500例,撰写本文时约有10万例患者正在等待肾移植。平均等候时间为三至五年。尽管65%的肾移植是从死亡(DCD;心脏死亡后的捐献)捐献者中获得的,但与标准捐献者相比,这些移植发生移植功能延迟(DGF)的可能性增加了两倍,增加了原发性无功能(PNF)发病率,并降低整体移植存活率。然而,移植物暴露于温暖和/或寒冷缺血条件下是实体器官移植的必然,在此期间产生的细胞/组织损伤导致移植手术后肾功能低于预期。以上数据表明通过保存技术的进步,提高DCD肾移植质量有巨大潜力,从而使长期患者有更理想的治疗结果。

[0314] 本例评估了新型器官保存溶液Somah与威斯康星大学(UW)溶液相比延长DCD肾脏储存的能力。

[0315] 材料及方法

[0316] 肾脏的获取手术。根据机构动物研究委员会批准的方案,使用重约40-50Kgs的雌性约克夏猪。用特拉唑尔telazol 4-6mg/kg i.m.和甲苯噻嗪2mg/kg i.m.使猪镇定,插管并连接呼吸机。使用i.v.异丙酚(10mg/kg/hr)和瑞芬太尼(40-60μg/hr)维持麻醉。在手术前10分钟给予麻醉剂一顺式阿曲库铵(10-20mg i.v.)。在中线胸骨切开术后,将动物全身肝素化(300mg/Kg)并主动脉根部插管。在主动脉阻断后注入冰冷的心脏停搏液(20mM K+)以使心脏停搏,然后切除心脏以进行如[6,7]所述实验。记录心脏收缩完全停止的时间,作为其他器官热缺血的开始时间。术中正中剖腹,肝上主动脉插管,用2L冰冷的UW(CoStorSol; Preservation Solutions Inc., Elkhorn, WI)或Somah保存液(Somahlution Inc., Jupiter, FL),在100mmHg压力和300ml/min的流量下,冲洗腹部器官,直到灌注液通过下腔静脉(IVC)返回为止。腹部器官的收获首先用肝切除术完成,用于其他实验,然后仔细解剖肾蒂后进行双侧肾切除术。立即将肾脏转移至4℃Somah或UW溶液(表6-1)并静置72小时。在时间点0、6、24和72小时的时间点获得肾活组织检查,用于组织病理学,HEP和蛋白质印迹分析。时间0对应于1小时的存储;在第一次活检之前将动物研究机构的肾脏运送到实验室所需的时间。

[0317] 表6-1:Somah及UW溶液的成分

[0318]

保存液（酸碱值 7.5）	
毫摩/升	
磷酸钾（一元）	0.44
氯化钾	7.00
氯化钠	125.00
碳酸氢钠	5.00
氯化钙	1.30
磷酸钠（二元；七水）	0.19
氯化镁（六水）	0.50
硫酸镁（七水）	0.50
D-葡萄糖	11.00
谷胱甘肽（还原型）	1.50
抗坏血酸	1.00
L-精氨酸	5.00

[0319]

L-瓜氨酸苹果酸	1.00
腺苷	2.00
肌酸乳清酸	0.50
一水肌酸	2.00
L-肌肽	10.00
L-肉碱	10.00
二氯乙酸盐	0.50
胰岛素	10 毫克 /升
UWS 保存液（酸碱值 7.4）	
乳糖醛酸	105.00
磷酸二氢钾	25.00
氢氧化钾（56%）	100.00
氢氧化钠（40%）	27.00
硫酸镁(七水)	5.00
棉子糖（五水）	30.00
腺苷	5.00
谷胱甘肽	3.00
别嘌呤醇	1.00
羟乙基淀粉（代血浆）	50 克/升
胰岛素	4.0 毫克/升

[0320] 组织病理学将组织固定在福尔马林中并包埋在石蜡里，然后切割10μ薄片，将其融化在载玻片上以进行进一步处理。依次增加乙醇浓度来干燥组织切片，然后用苏木精和伊

红染色,之后将载玻片浸在甲苯噻嗪清除剂中,盖上盖玻片并在显微镜下检查。使用奥林巴斯显微镜和图像分析仪系统(BX51TRF;Olympus America Inc,USA)采集和分析图像,并由独立观察员以盲模式进行评估。

[0321] 三磷酸腺苷(ATP)和磷酸肌酸(CP)测定。如[4-7,10]所述在肾组织提取物中测定ATP和磷酸肌酸(CP)。简言之,将20mg肾组织悬浮在400 μ l 0.4M冰冷的高氯酸中并均化两次共计30秒。将匀浆在0℃以1970g离心10分钟。用等体积的0.4M冷KHCO₃中和上清液的等分试样并如上所述进行离心。将上清液保存在-80℃下进行ATP/CP测量。将沉淀溶于等体积的0.1M NaOH中,离心并用于蛋白质测定。根据制造商的方案,使用生物发光测定试剂盒(Sigma-Aldrich和GloMax Multi+Detection System,Promega)测量ATP/CP。

[0322] 蛋白质印迹法将20mg肾组织悬浮在含有蛋白酶抑制剂混合物的提取缓冲液中。将组织匀浆30秒,以16,100 $\times$ g离心10分钟,收集上清液。将等量的来自不同样品的总蛋白(30 μ g)与含有5% β -巯基乙醇的Laemmli样品缓冲液混合,并在100℃加热3分钟。蛋白质在10% SDS-PAGE上分离,并且电印迹在硝酸纤维素膜上;使用抗体(anti-Caveolin,eNOS,vWF和EPO)鉴定蛋白质,化学发光分析和带密度如[4]所述对 β actin进行标准化。

[0323] 代谢分析使用VetScan iStat和VetScan VS2在0(1小时;参见上文),6,24和72小时的时间点评估Somah和UW中的pH和乳酸盐,葡萄糖代谢,氧气和二氧化碳浓度(pO₂和pCO₂)。

[0324] 统计分析测量和数据提取是盲目进行的。在两组之间进行比较(UW对比Somah,每组n=7)以评估两种溶液的作用。使用单因素方差分析(ANOVA)将各种测定的定量初始值与随后各组内的时间点进行比较,然后进行Dunnett多重比较测试和t检验以用于组间的比较分析。统计显著性在95%可信度被接受(P<0.05)。除非另有说明,所有使用的数值均为平均值 $\pm$ SEM。所有分析均使用GraphPad Prism 6(v6.1)进行。作者有权访问数据并对数据完整性负责。所有作者都阅读并同意了书面协议。

[0325] 结果

[0326] 肾的总体形态在4℃浸泡静置储存的1-3天期间检查肾脏。储存在UW中的肾外观(图1a)暗淡和斑驳的,表明器官充血。相比之下,储存在Somah的肾脏看起来健康,颜色均匀,在储存3天后形态没有改变(图1d)。

[0327] 肾的组织形态学。不考虑储存溶液,在所有DCD肾中所有时间点都没观察到有明显的间质水肿,肾组织的整体结构保持完好(图1b,1c,1e和1f)。在所有时间点,在近曲小管(PCT)中观察到管状管腔中的正常非晶态收集,而不随存储时间而增加。远端回旋小管(DCT)在所有时间点都几乎没有任何碎片,除了在72小时UW和Somah保存的肾脏中有明显的轻度至中度的上皮剥脱(图1c和1f)。在两种溶液(图1b,1c,1e和1f)中,肾小球呈现正常的细胞性,在所有时间点具有正常的Bowman空间和连续的壁层上皮。

[0328] 在UW和Somah储存的肾脏中均观察到肾小管上皮细胞核异质性逐渐增加,偶尔有细胞边缘缺失,表明肾小管上皮损伤(图1c和1f)。然而,这些变化的程度在UW储存的肾脏中更显著(p<0.05)。时间0和6,24和72小时的储存时间点上,肾脏上皮细胞(PCT/DCT's)的细胞核严重不均,UW肾脏分别平均为3.5%,24.4%,39.7%和37%,Somah肾脏分别平均为4.4%,6.2%,10.9%和11.6%,这表明Somah储存的DCD肾中的肾小管上皮细胞能够比UW储存的肾忍受更长的持续时间缺血。

[0329] 存储的肾脏中的代谢。通过评估体外储存过程中的代谢功能,评估DCD肾脏的生理/生化活力;表现出UW和Somah组中新陈代谢的活跃差异。新鲜重构的溶液最初pH值更加偏碱性(在UW中更高),在Somah中,pH值的时间依赖性下降明显,但与UW(7.5-7.4)相比,更偏酸性(6.8-7.2)(图30A)。UW溶液中的葡萄糖水平暂时升高,表明糖原分解,而在Somah中6小时以上的葡萄糖水平有比较显著的下降($p<0.05$),这表明在Somah中肾组织/细胞(图2B)可利用葡萄糖。相反的,与Somah相比,在72小时的时间点UW中乳酸水平显著更高($p<0.05$)(图30C)。

[0330] 由于在我们这样一个开放的实验系统中,大气氧在溶液中的溶解度与温度成反比,并且由于氧消耗遵循零级动力学,并且Somah和UW都在4℃用氧过饱和,全称保持 pO_2 $200\pm 13\text{mmHg}$ (图30D),所以肾脏的氧利用率无法清晰呈现。然而,与UW相比,在整个储存过程中 pCO_2 显著低于Somah(1小时为 $7.28\pm 0.40\text{mmHg}$,72小时为 $7.50\pm 0.48\text{mmHg}$),DCD肾脏在Somah中存储一小时内观察到 pCO_2 显著增加($p<0.01$)(肾初始浸泡从 $5.8\pm 1.15\text{mmHg}$ 至 $17.00\pm 0.45\text{mmHg}$),72小时内始终保持高水平,表明氧化代谢周期正好从贮存期开始(图30E)。必须注意的是,在没有器官的情况下,在Somah或UW溶液中,溶解 CO_2 的指标 pCO_2 不会改变(未显示)。HCO₃⁻浓度在储存的72小时内基本保持不变(4.86mM/L)这一事实否定了存在于Somah中的碳酸氢盐有助于 pCO_2 的增加这一可能。相反,在72小时储存期间,UW中HCO₃⁻浓度从 6.30mM/L 降低到 4.33mM/L ,这可能导致 pCO_2 的非显著增加(图30E)。

[0331] 储存肾脏中的高能磷酸盐在低温储存期间,UW中肾组织的ATP,肌酸磷酸盐(CP)和总HEP浓度明显呈线性下降($p<0.05$)。HEP在六个小时内下降了20%(图31),72小时储存结束时,净减少了45%。相比之下,Somah肾中ATP,CP和总HEP水平没有明显变化,并且ATP的任何减少均被CP浓度的平行增长而补偿,从而在储存期间保持优良的肾组织总能量水平。

[0332] 血管内皮功能的标记。在Somah保存的DCD肾脏中,在整个储存期间,小窝蛋白,eNOS,vWF和EPO的表达保持完好(图32)。相反,虽然在UW中保存的肾中窖蛋白的表达也没有改变,但eNOS,vWF和EPO的表达的时间依赖性降低,表明可能的肾组织损伤。

[0333] 作为最能抵抗缺血的内脏器官之一,用来自死亡(DCD)供体的肾脏移植已经在世界范围内普遍实施(作为最能抵抗缺血的内脏器官之一,用来自死亡(DCD)供体的肾脏移植已经在世界范围内普遍实施(Morrissey PE,Monaco AP(2014) Donation after circulatory death:Current practices,ongoing challenges,and potential improvements.Transplantation 97:258-264)。虽然DCD池肾脏仍未得到充分利用,但移植后DCD肾脏的预后与DGF、PNF发生率明显增加有关,还与接受者预期寿命降低有关。不受理论束缚,本研究的结果表明,通过使用Somah保存DCD肾脏中的能量水平,可以避免细胞水平上的细微损伤。

[0334] 结果显示,UW保存的肾,在收获后,在UW灌注的器官几分钟内发生区域性半点变色,并且在储存72小时期间不分解。相比之下,Somah保存的肾脏在所有时间点的外部形态均保持均匀。当Somah具有接近生理盐水的粘度时,由于羟乙基淀粉存在(HES;表6-1),UW具有高得多的粘度,(Collins GM,Wicomb WN(1992) New organ preservation solutions.Kidney Int Suppl38:S197-S202)。虽然HES有助于在储存过程中防止器官水肿,但会增加保存液的密度,可以干扰器官的所有部分的灌注。尽管大体形态不是器官活力的最佳指标,但收获期间肾脏灌注不均匀可能导致肾脏斑片状变色,尽管大量使用了灌

流溶液,这是由于UW粘度较高(图29)

[0335] 肾组织病理学显示在UW或Somah储存的肾的皮质或髓质区域,没有显著的超微结构改变。然而,更高的放大倍数显示细胞核有细微的变化,尤其是在肾小管上皮细胞中,其特征是核异染色性的丧失和超致色素增加,在UW存储的肾中更显著。这与UW不足以达到肾的所有部分一致(见上文),而Somah在收获和体外储存过程中有效地达到了组织的全部,并提供了必要的营养,从而避免了微小病变的发展并且可能潜在地改善移植结果。尽管在Somah中肾组织有较好的耐受性,但Somah的pH在所有时间点都比UW更偏酸性。据报道酸性pH对肝细胞,窦上皮细胞以及心肌细胞有本质上的益处(Lemasters JJ,Bond JM,Currin RT,Nieminen AL,Caldwell-Kenkel(1993) Reperfusion Injury to Heart and Liver Cell:Protection by acidosis during ischemia and a 'pH paradox' during reperfusion. In:Hochachka PW,Lutz PL,Sick TJ,Rosenthal M(eds) Surviving Hypoxia:Mechanisms of Control and Adaptation.CRC Press,Inc,Florida495-508),这是首次报道体外肾保存中相对酸性环境的优势。

[0336] 葡萄糖是高度代谢性肾脏组织的重要能量来源,被目前实践中使用的肾脏保存液中排除在外,因为它被认为通过增强乳酸积累而引起水肿,这是体外储存过程中无氧代谢的产物(Kallerhoff M,Holscher M,Kehrer G,Klab G,Bretschneider HJ(1985) Effects of preservation conditions and temperature on tissue acidification in canine kidneys.Transplantation 485-489)。UW是一种常用的肾脏储存溶液,不含任何葡萄糖。然而,葡萄糖是体外肾脏储存期间的重要能量来源,可能是由于肾脏糖原分解引起的UW中葡萄糖水平的内源性增加以及Somah中的葡萄糖水平的相应降低,其天然含有高浓度的葡萄糖(表6-1)。然而,即使在Somah中长时间储存的肾脏,通过大体或组织学检查也没有观察到水肿的发展,这与之前涉及其他保存液的研究相反。(Kallerhoff M,Blech M,Kehrer G,Kleinert H,Langheinrich M,et al.(1987) Effects of glucose in protected ischemic kidneys.Urol Res 15:215-222)。

[0337] 在肾脏储存72小时后,尽管葡萄糖代谢(厌氧和好氧),但Somah肾脏中的UEP仍保持较低水平(图30C),所以在Somah的所有时间点UW的有害乳酸水平均显示出明显升高(图31)。在Somah肾中的有氧氧化磷酸化活性,在Somah储存过程中观察到代谢二氧化碳增加得以证实。这是一个预期的结果;因为Somah还含有二氯乙酸(DCA)这一种增加丙酮酸脱氢酶复合物活性的化合物,从而增强丙酮酸向乙酰-CoA的转化,防止乳酸积累(Shangraw RE,Winter R,Hromco J,Robinson ST,Gallaher EJ(1994) Amelioration of lactic acidosis with dichloroacetate during liver transplantation in humans.Anesthesiology 81:1127-1138),在Somah储存的心脏和肝脏中观察到的证实了这些(Thatte HS,Rousou L,Hussaini BE,Lu XG,Treanor PR,et al.(2009) Development and evaluation of a novel solution,Somah,for the procurement and preservation of beating and non-beating donor hearts for transplantation.Circulation 20:1704-1713)。此外,不受理论束缚,DCA凭借其保存血管的能力可帮助预防移植后发生肾动脉狭窄,并进一步改善移植的DCD肾的预后(Deuse T,Hua X,Wang D,Maegdefessel L,Heeren J,et al.(2014) Dichloroacetate prevents restenosis in preclinical animal models of vessel injury.Nature 509:641-644)。

[0338] 在储存期间,外植器官中的能量状态(HEP)的显着损失,导致了器官中不可逆的退行性变化(Vajdova K,Graf R,Clavien PA (2002) ATP-supplies in the coldpreserved liver:a long-neglected factor of organ viability.Hepatology 36:1543-1551).因此,通过调节器官代谢途径,防腐液维持器官稳态和/或允许其在长期储存期间恢复是必要的。尽管在储存过程中,UW中葡萄糖浓度依有赖于糖原依赖性的增加(图30B),但与Somah肾中明显的能量状态保存相比(图31),肾HEP储存的显着消耗明显。这表明UW肾是高度分解代谢的,导致HEP丧失和组织损伤(图29)。相反,Somah储存的肾中葡萄糖的氧化磷酸化更大,促进了更高的HEP产生(相当于葡萄糖分子),而不是单独的无氧酵解,从而增强储存期间器官的能量状态。不受理论束缚,在DCD UW肾脏中观察到的低HEP水平,可预见地至少导致了移植肾功能延迟恢复(DGF),甚至是原发性无功能(PNF)。因此,尽管主要用作外植肾的保存液,但UW可能不提供长期储存DCD(或BHD)肾的最佳条件。相反,Somah中的保存可能提供可行的替代方案。

[0339] 血管(毛细血管)形成大部分肾皮质组织,而肾髓质中肾小管结构占优势。虽然已有报道称(Kallerhoff M,Blech M,Kehrer G,Kleinert H,Langheinrich M,et al. (1987) Effects of glucose in protected ischemic kidneys.Urol Res 15:215-222),在组氨酸-色氨酸-酮戊二酸(HTK)溶液中贮存6小时内肾小球簇塌陷,但在任何时间点(图29),Somah或UW存储的肾中均未观察到这种剧烈的肾小球变化。然而,在72小时的UW DCD肾脏储存期间,eNOS(血管舒缩功能中重要的),血管性血友病因子(vWF;血管内皮标志物)和促红细胞生成素(EPO;专门的管周上皮细胞标志物)表达的稳定下降,提示血管和管状结构的细微损伤(图32)。这与组织学发现的UW中存储的肾脏中观察到的管状核色超致色素增加的一致。相反,所有研究的蛋白质,包括小窝蛋白,eNOS,vWF和EPO的表达在Somah保存的肾脏的同一观察期间不变,表明皮质和肾小管的肾组织得以保存。

[0340] 本实施例提供的证据表明使用Somah静态保存DCD肾脏可潜在地降低DGF,PNF的发生率并改善移植后的移植物寿命。

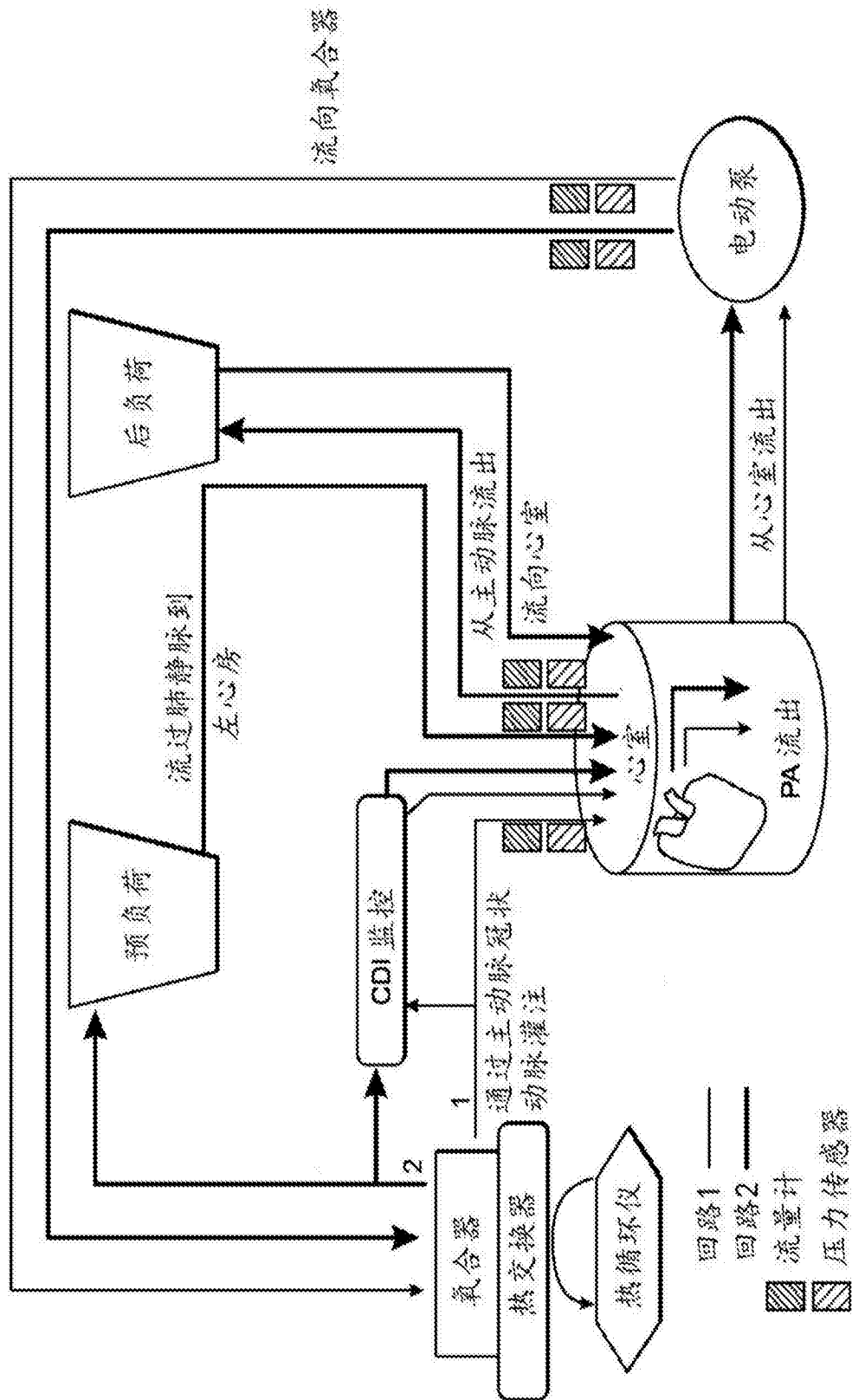


图1

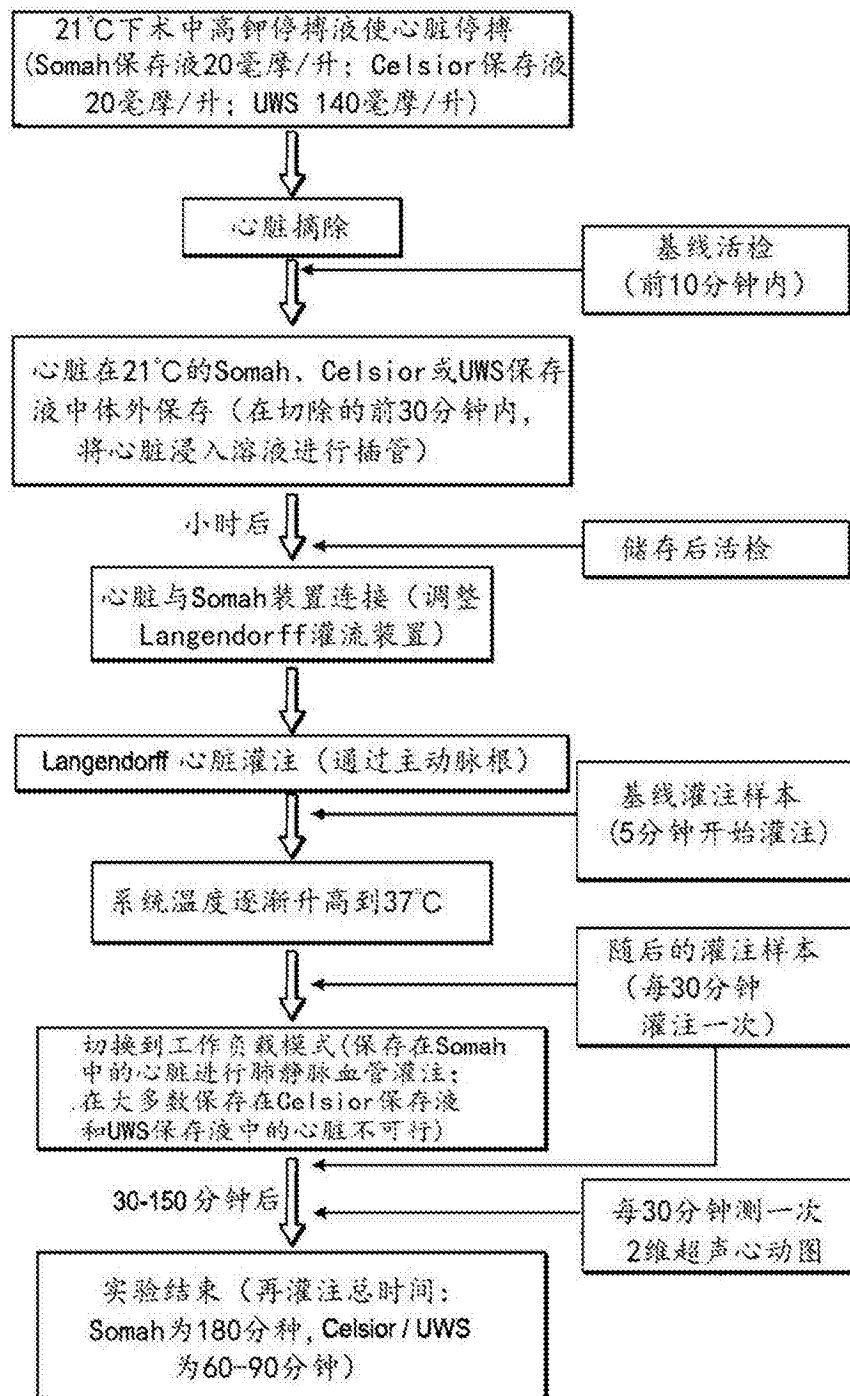


图2

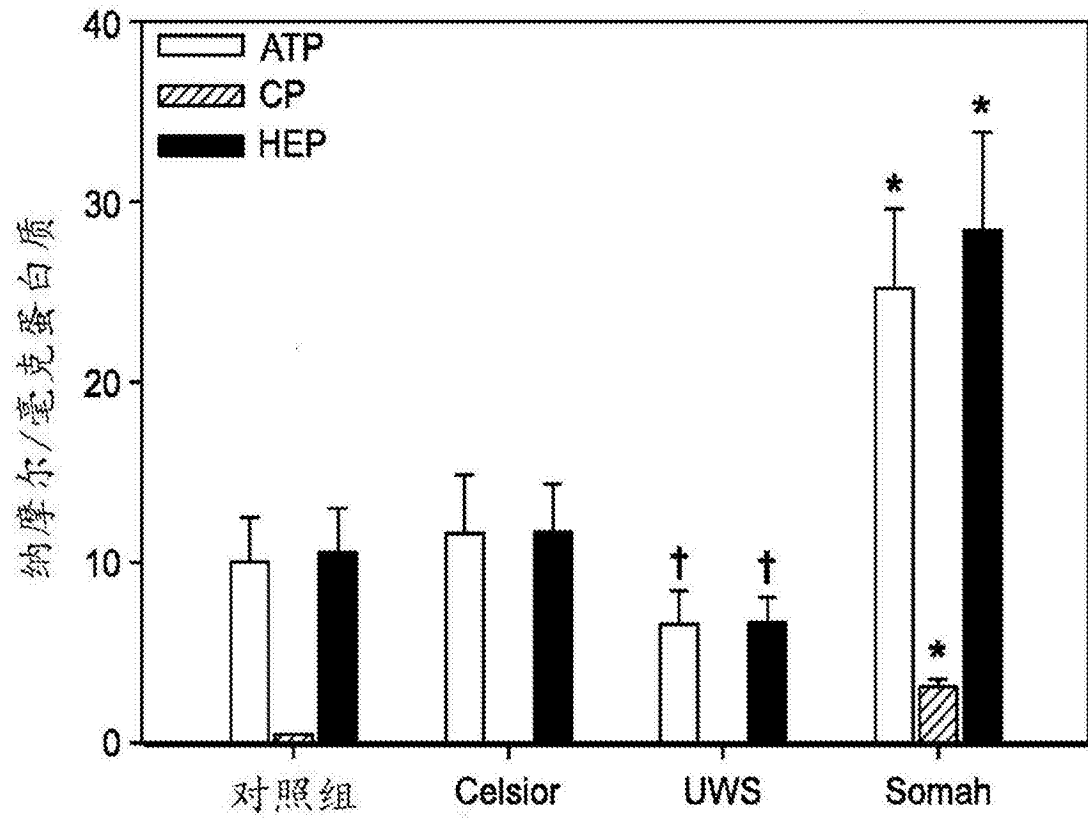


图3

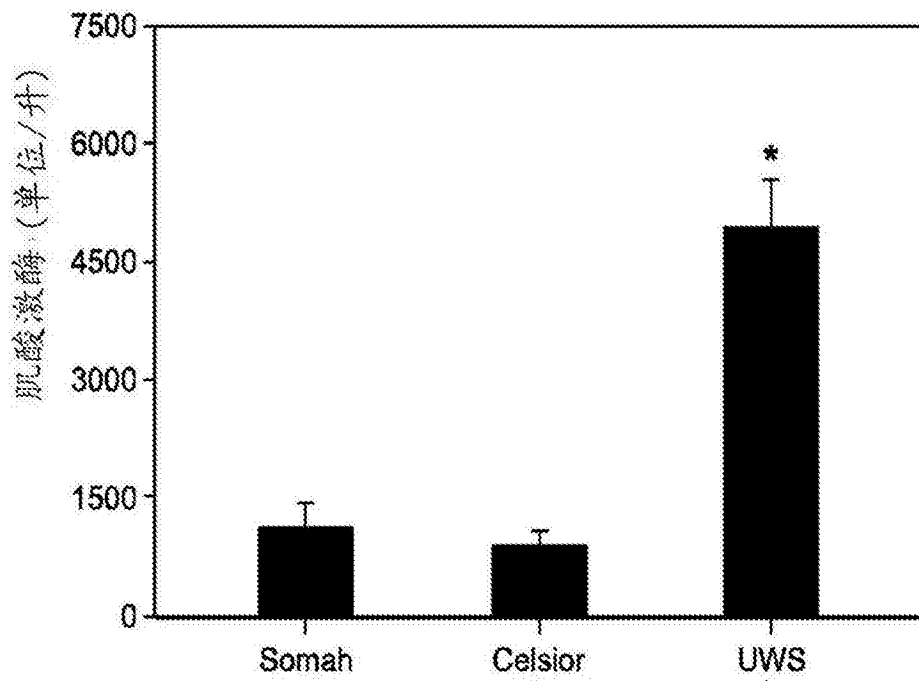


图4A

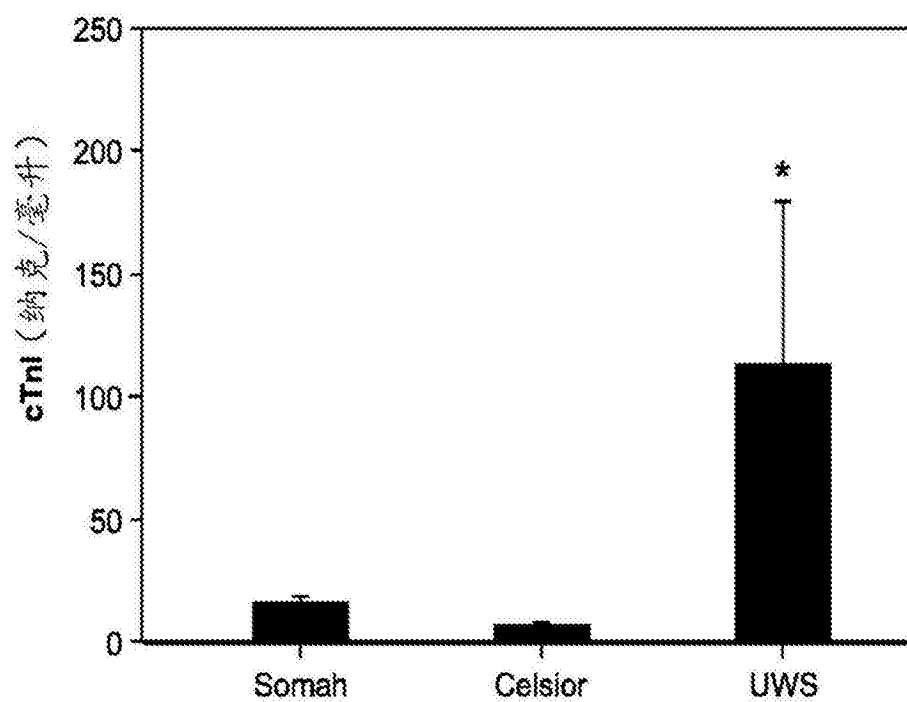


图4B

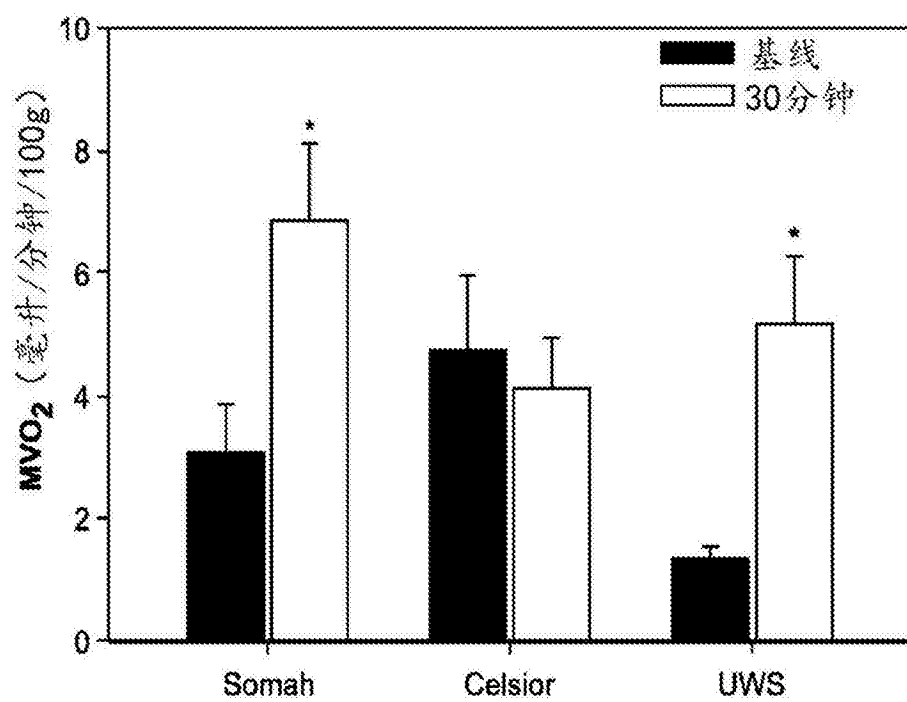


图5A

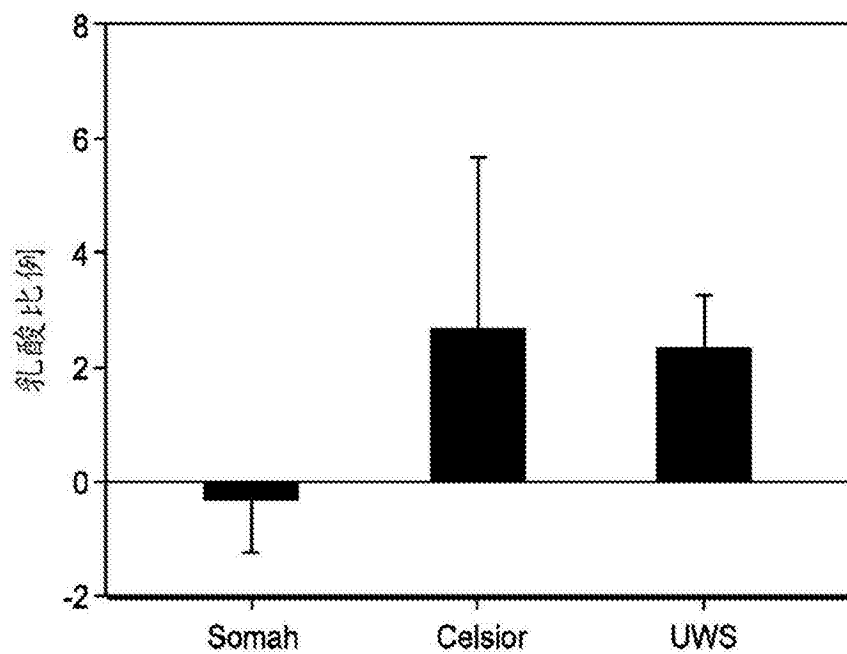


图5B

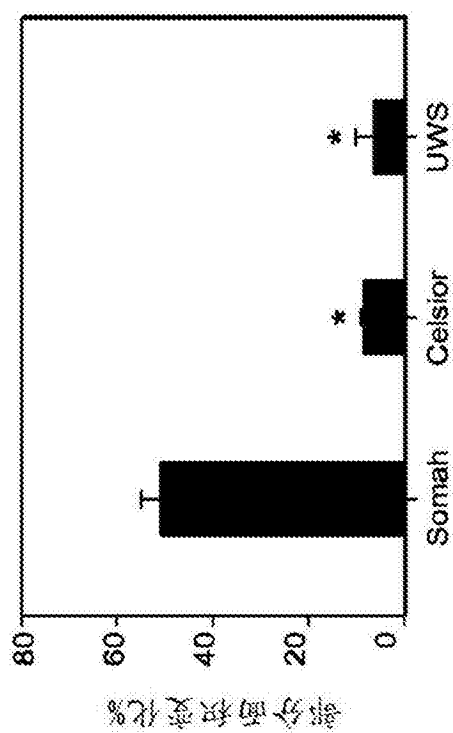


图6A

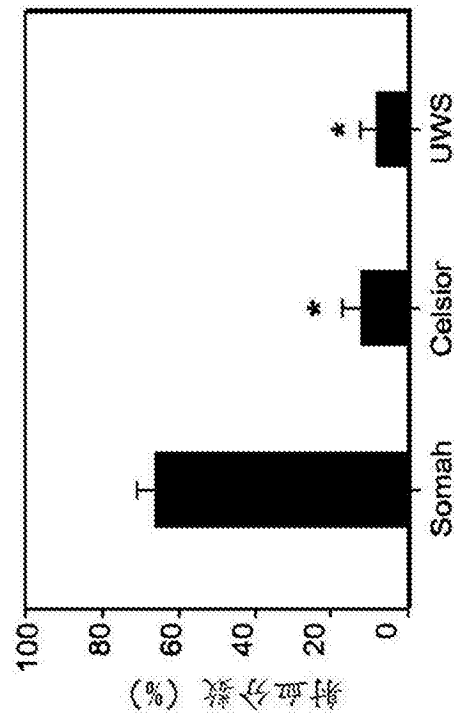


图6B

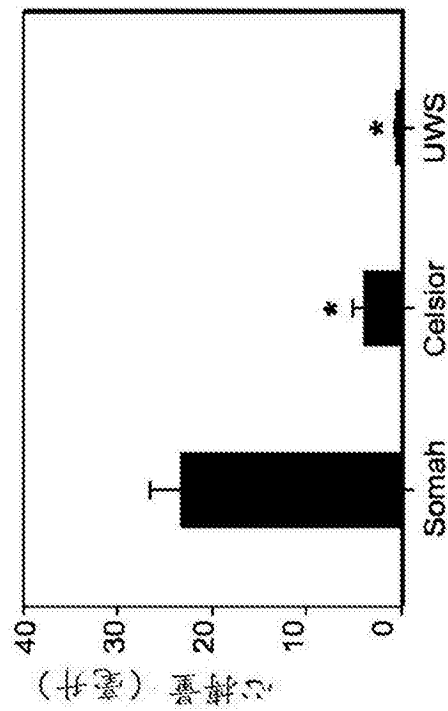


图6C

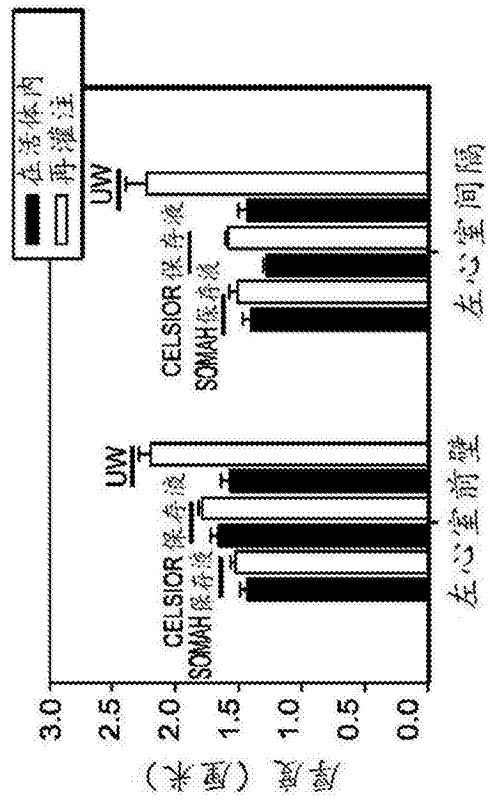


图6D

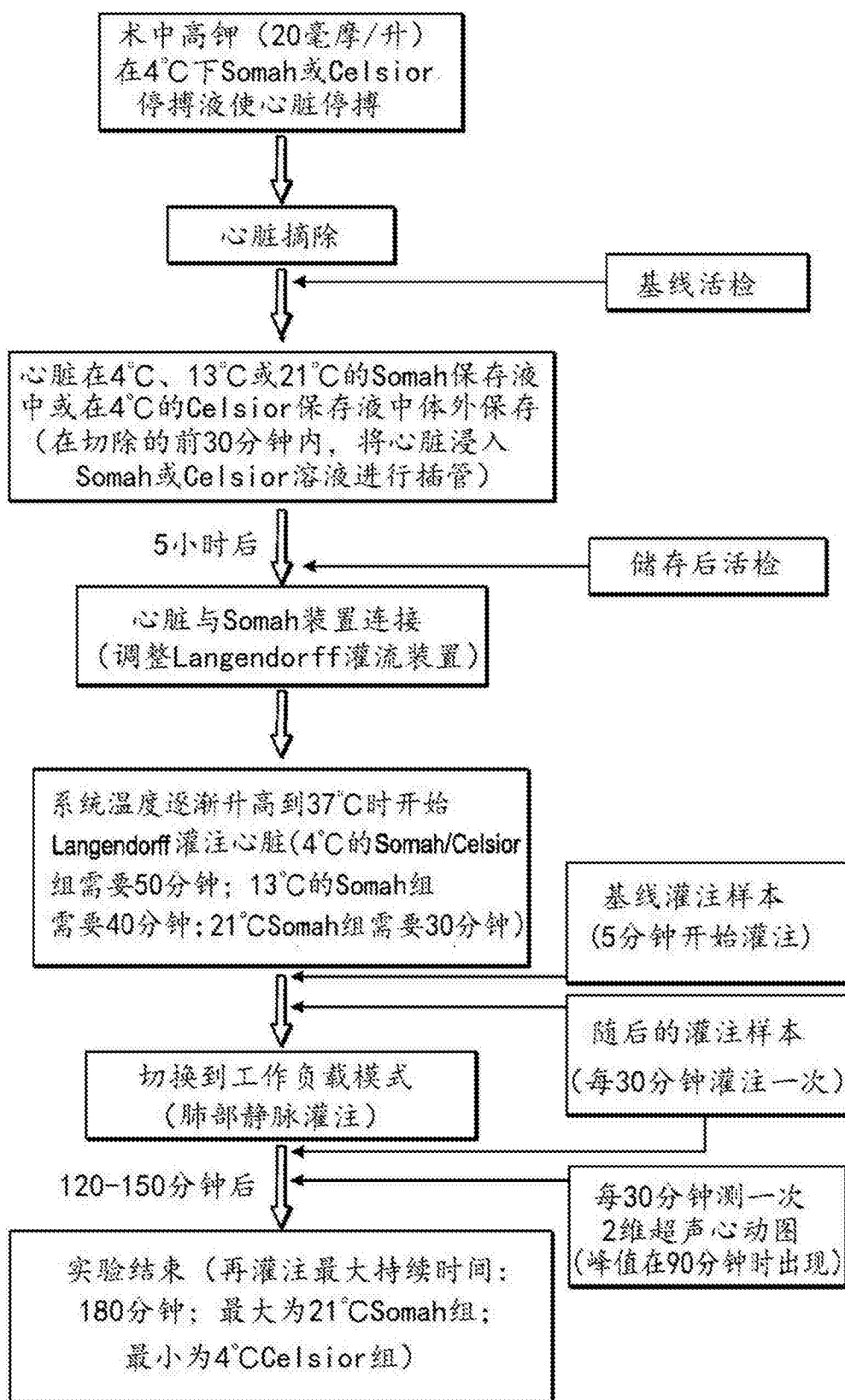


图7

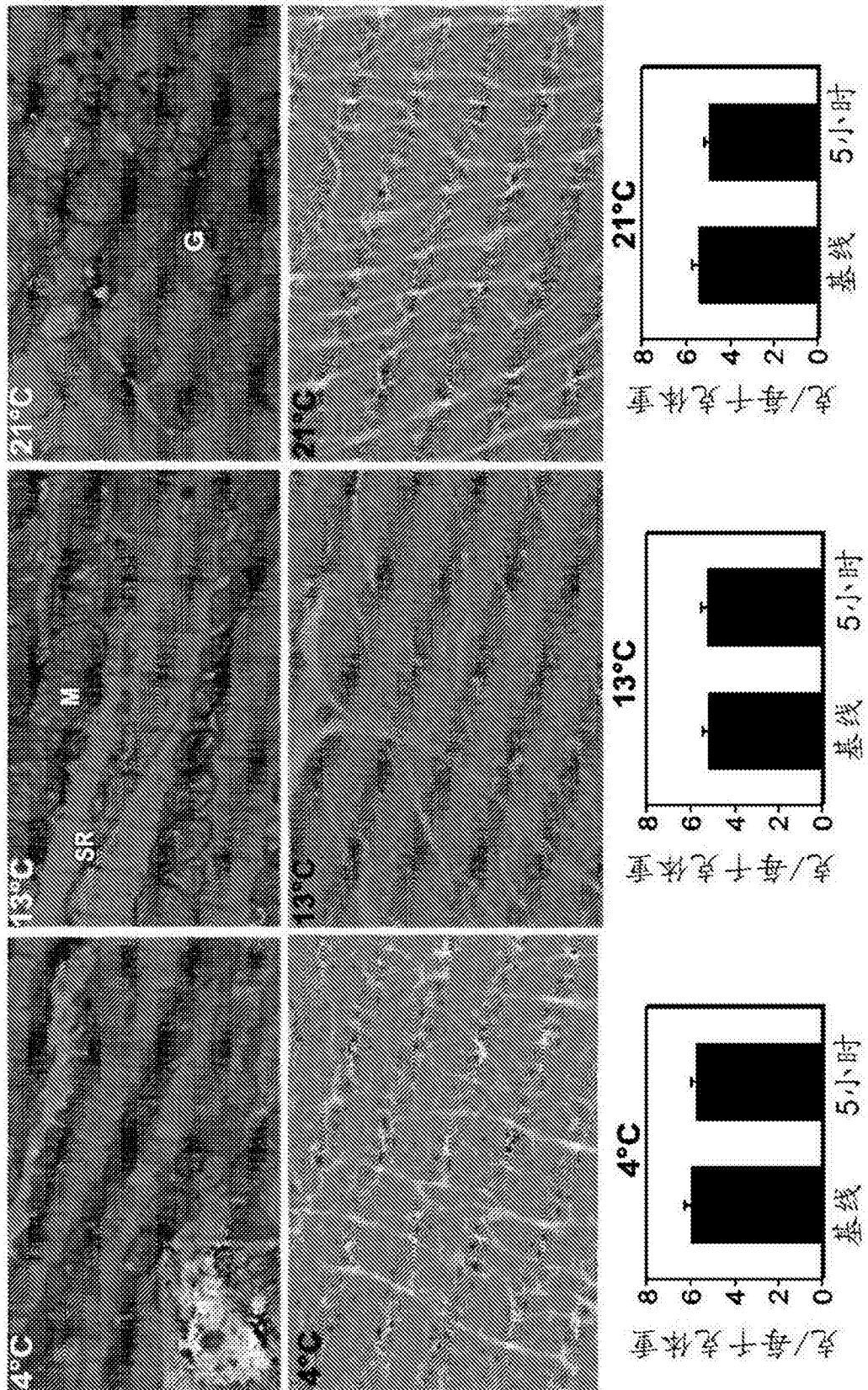


图8

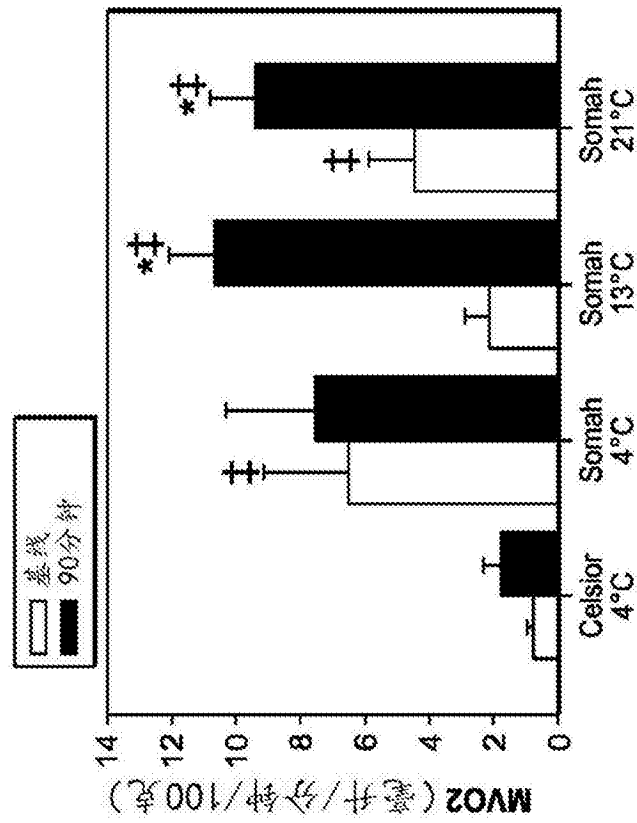


图9A

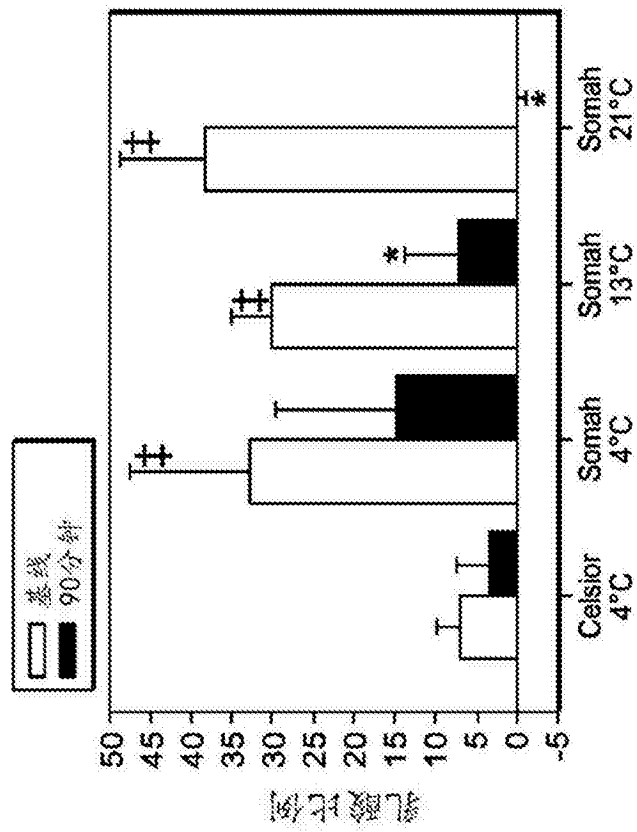


图9B

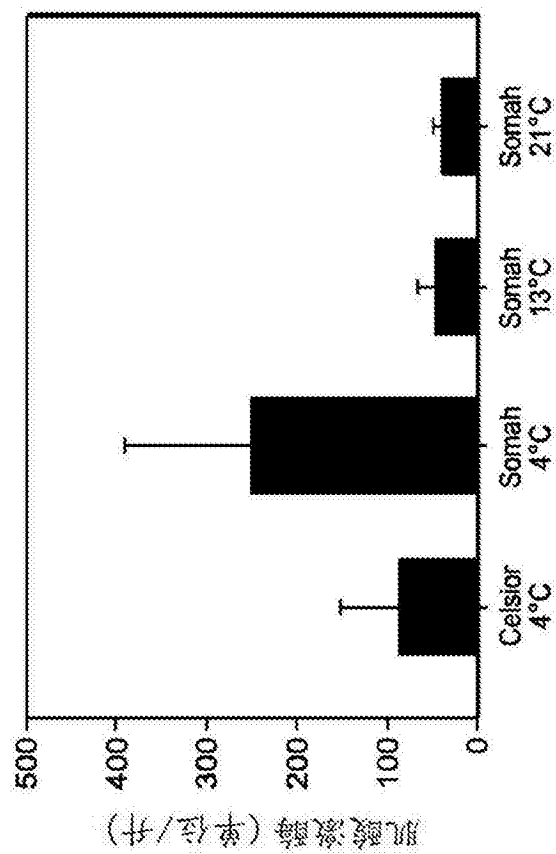


图10A

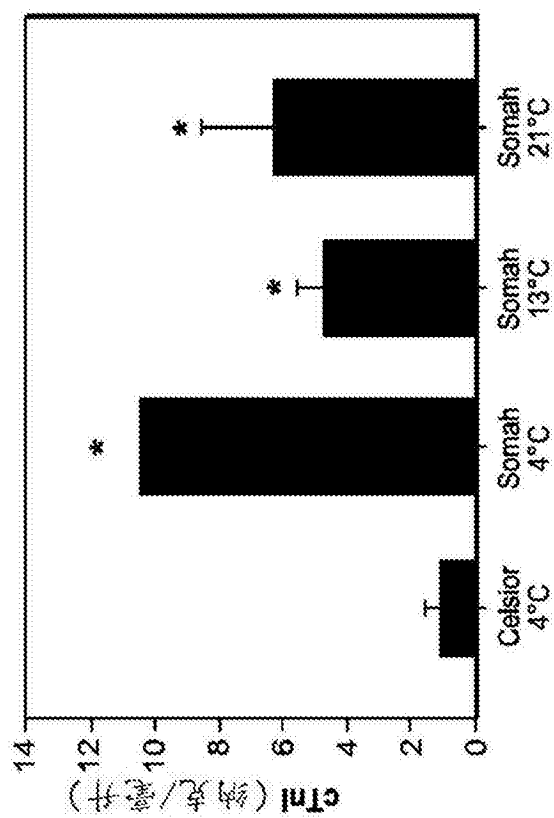


图10B

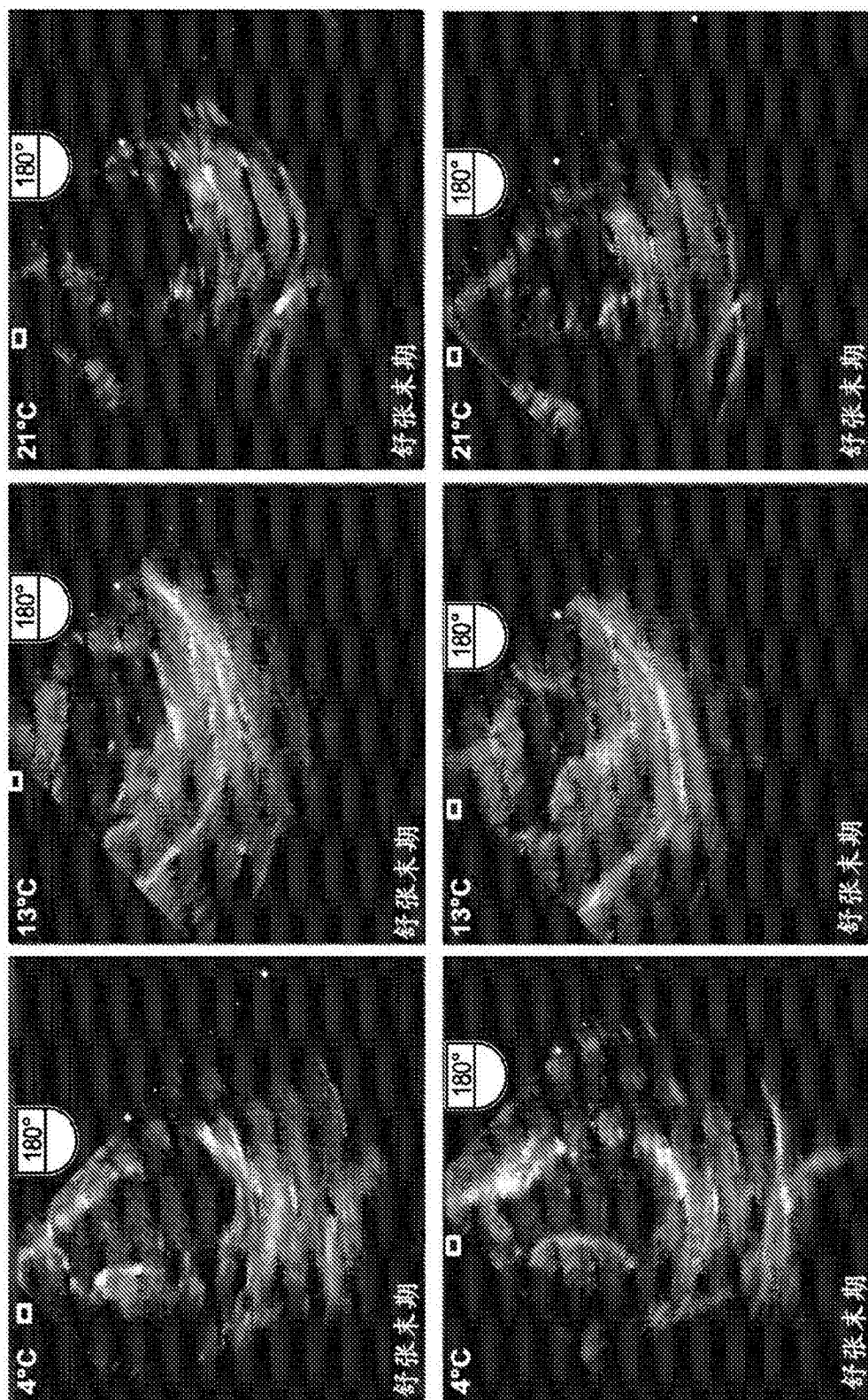


图11

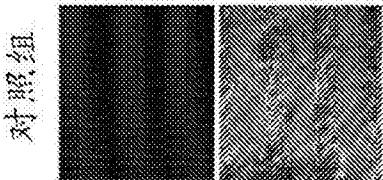


图12A

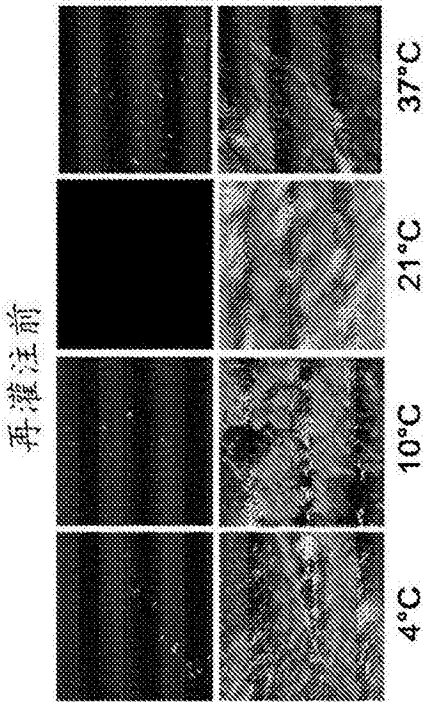


图12B

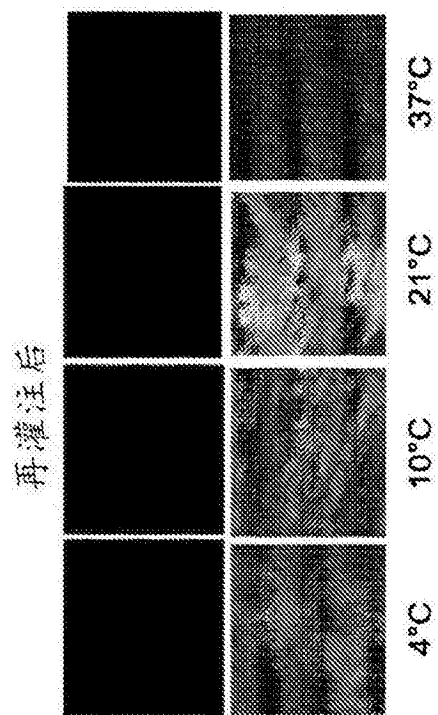


图12C

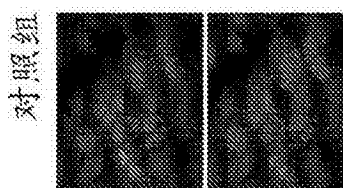


图13A

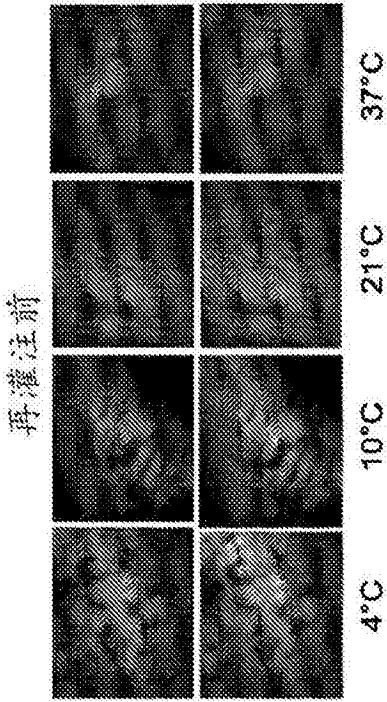


图13B

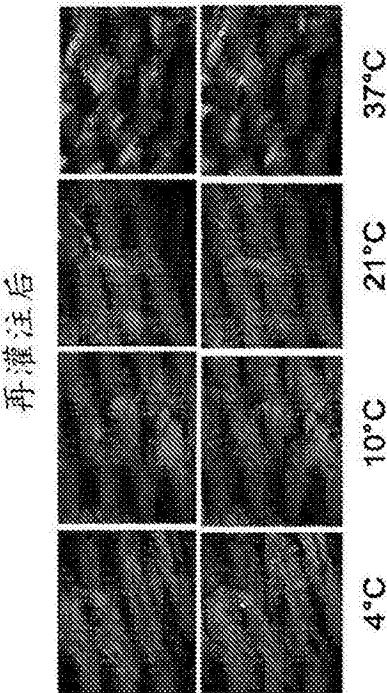


图13C

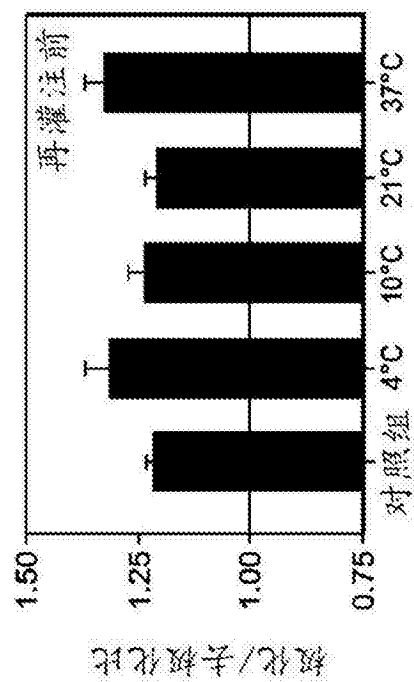


图13D

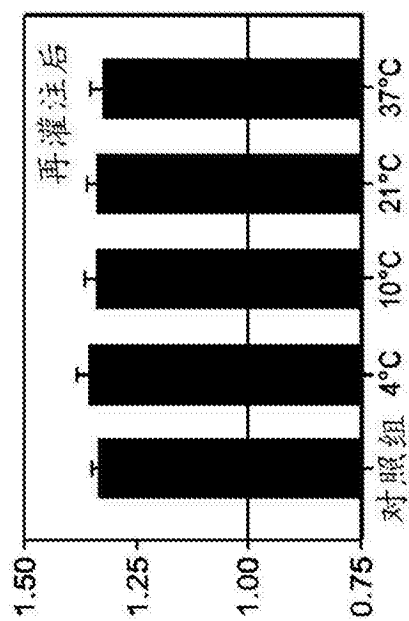


图13E

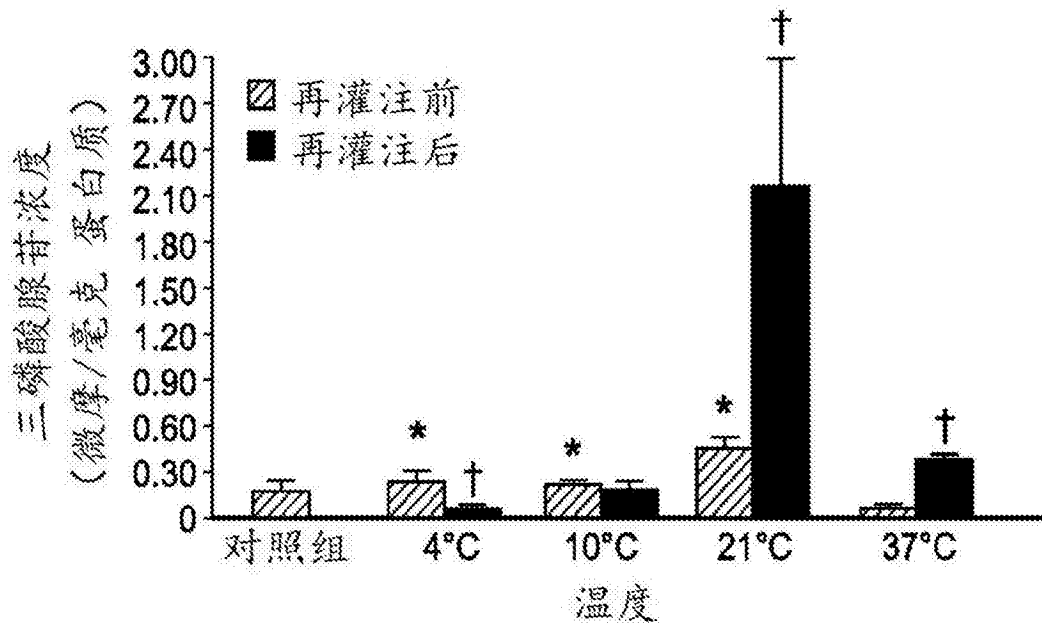


图14A

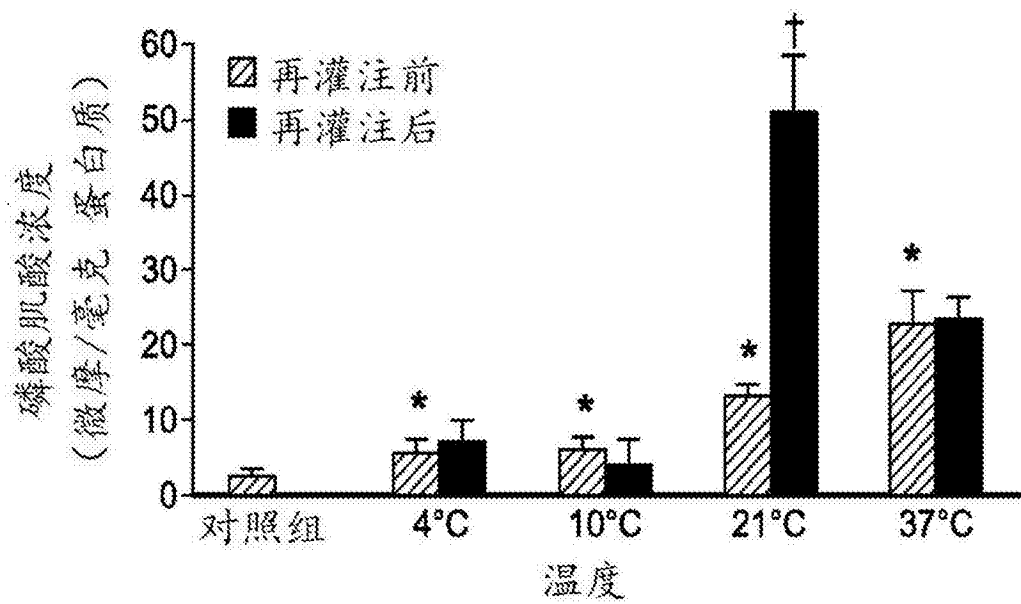


图14B

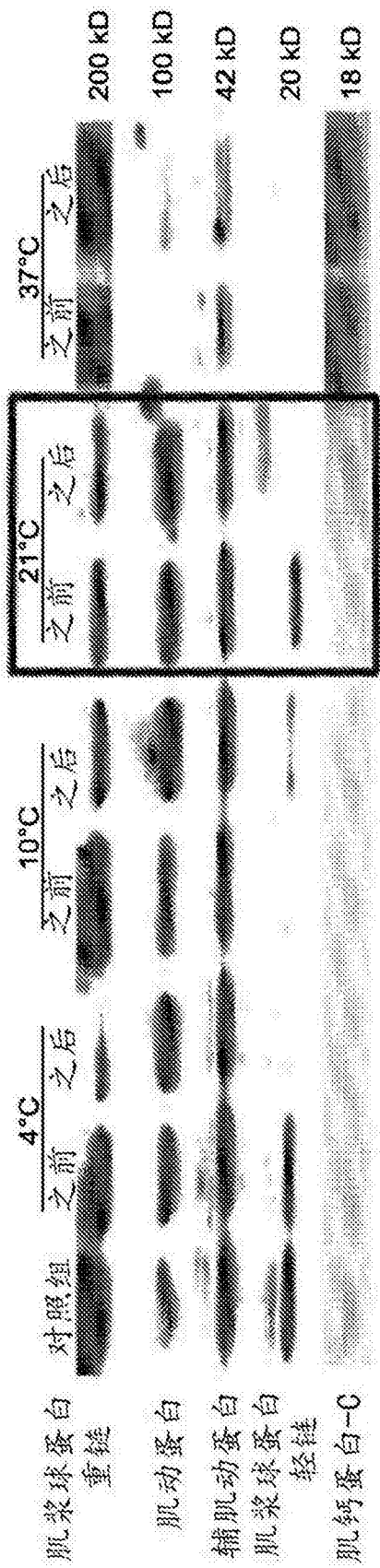


图15

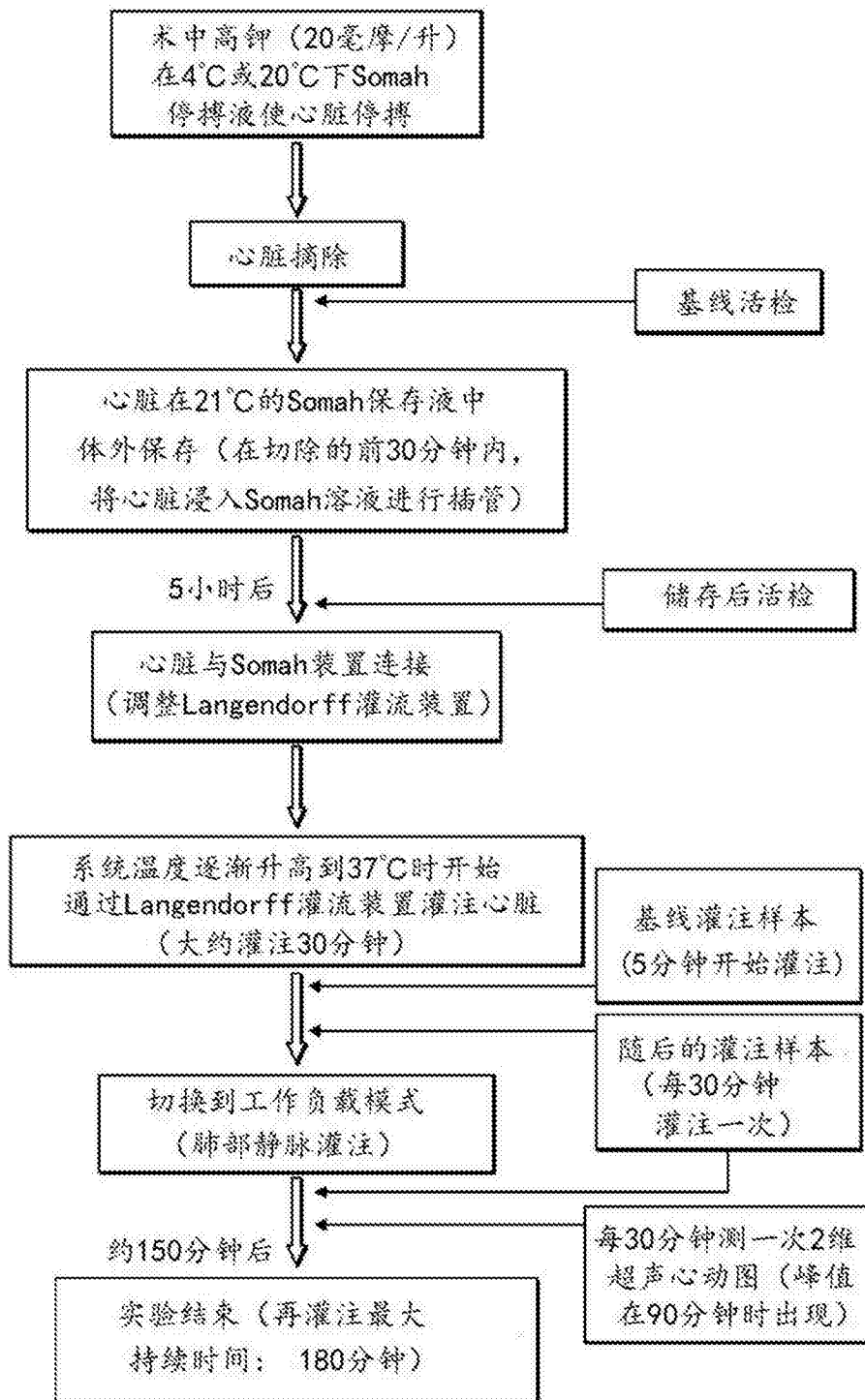


图16

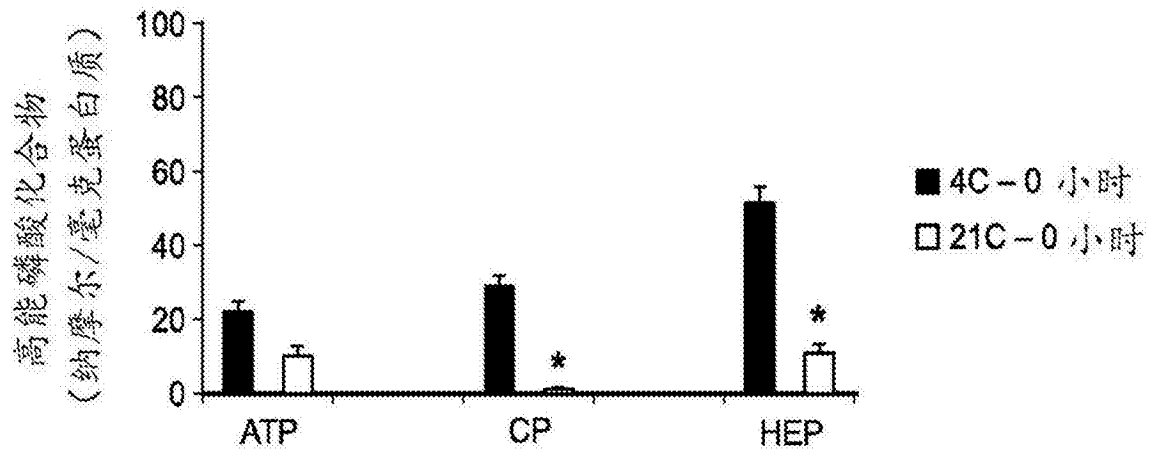


图17A

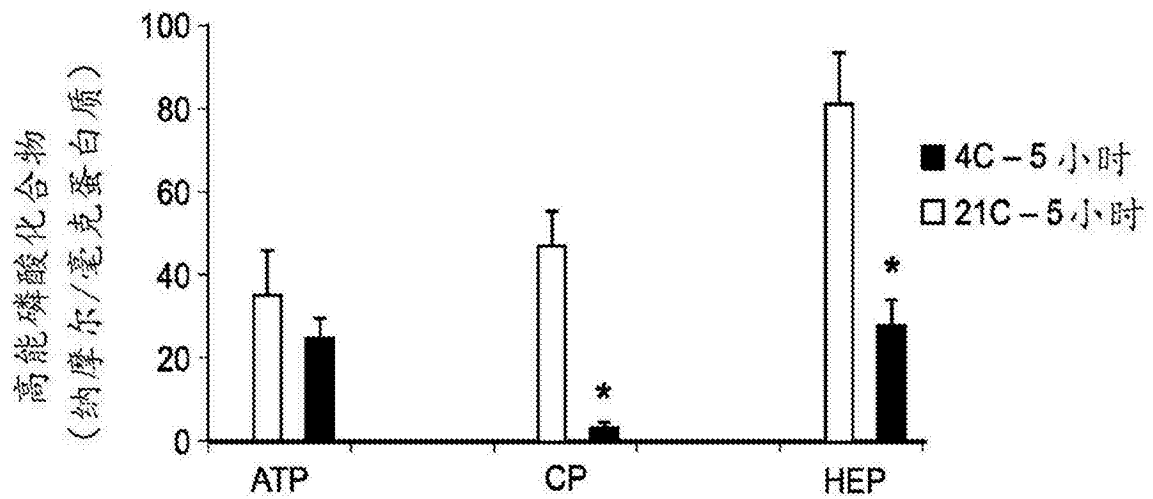


图17B

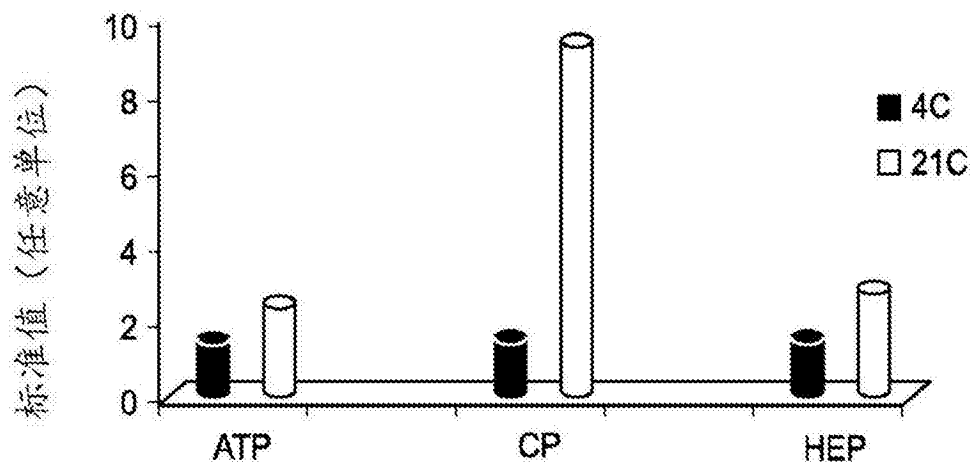


图17C

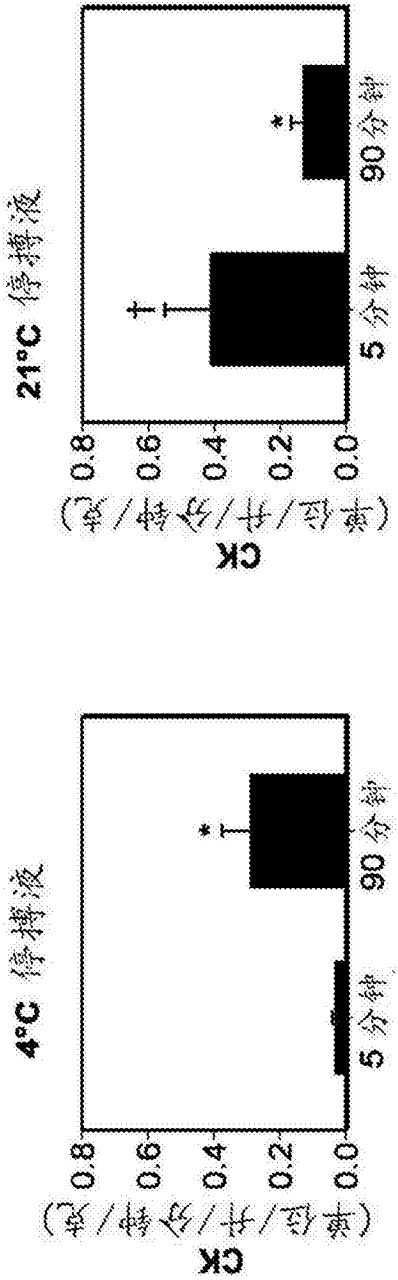


图18A

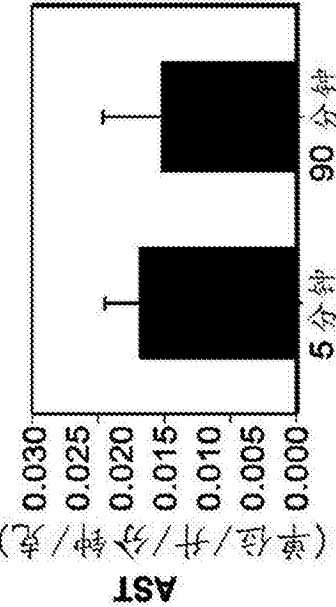
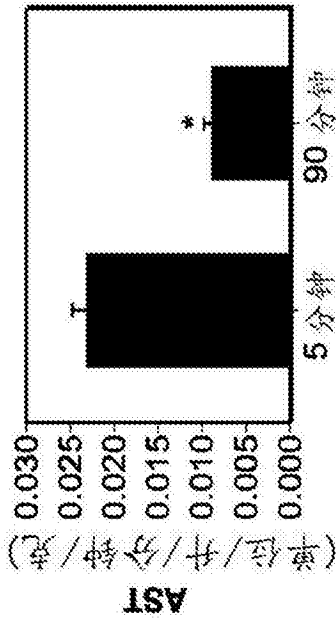


图18B

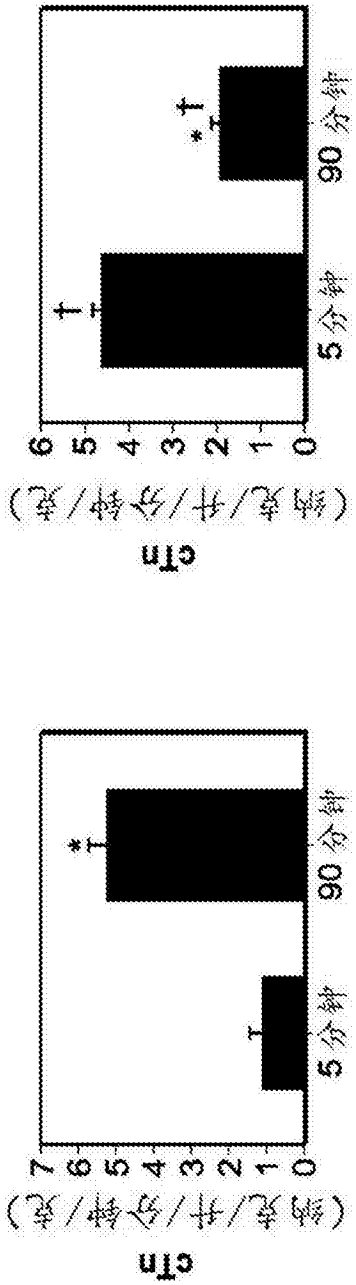


图18C

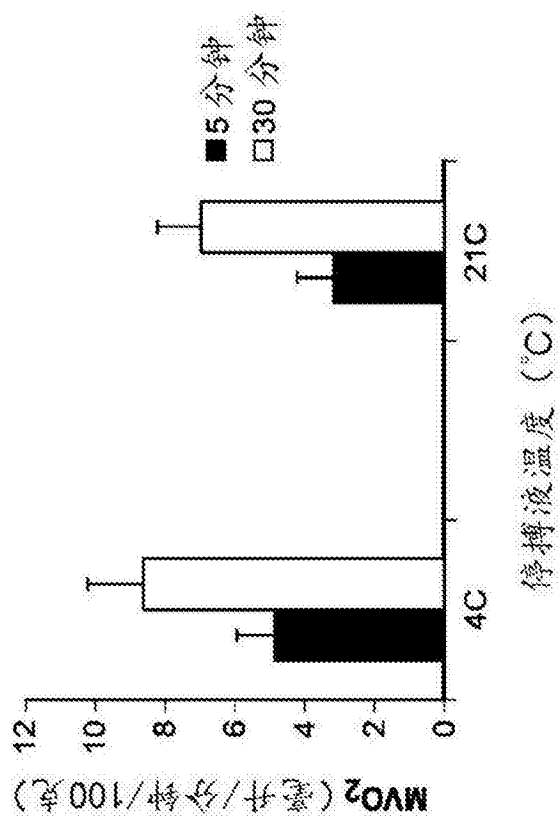


图19A

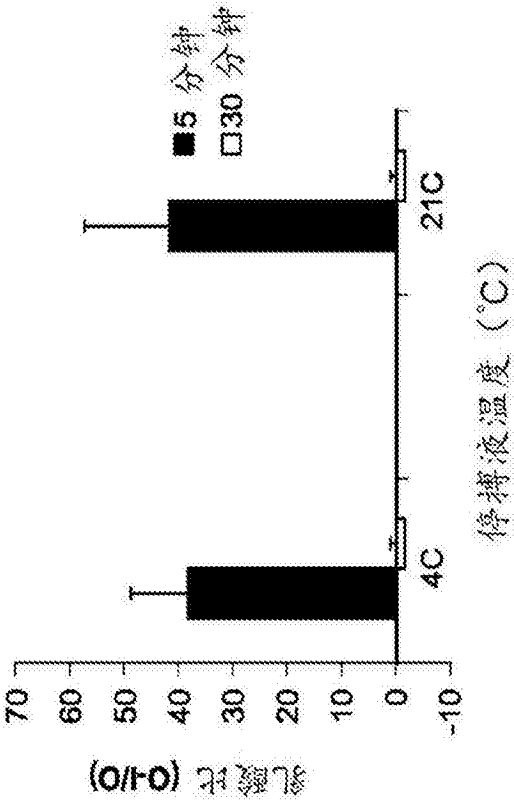


图19B

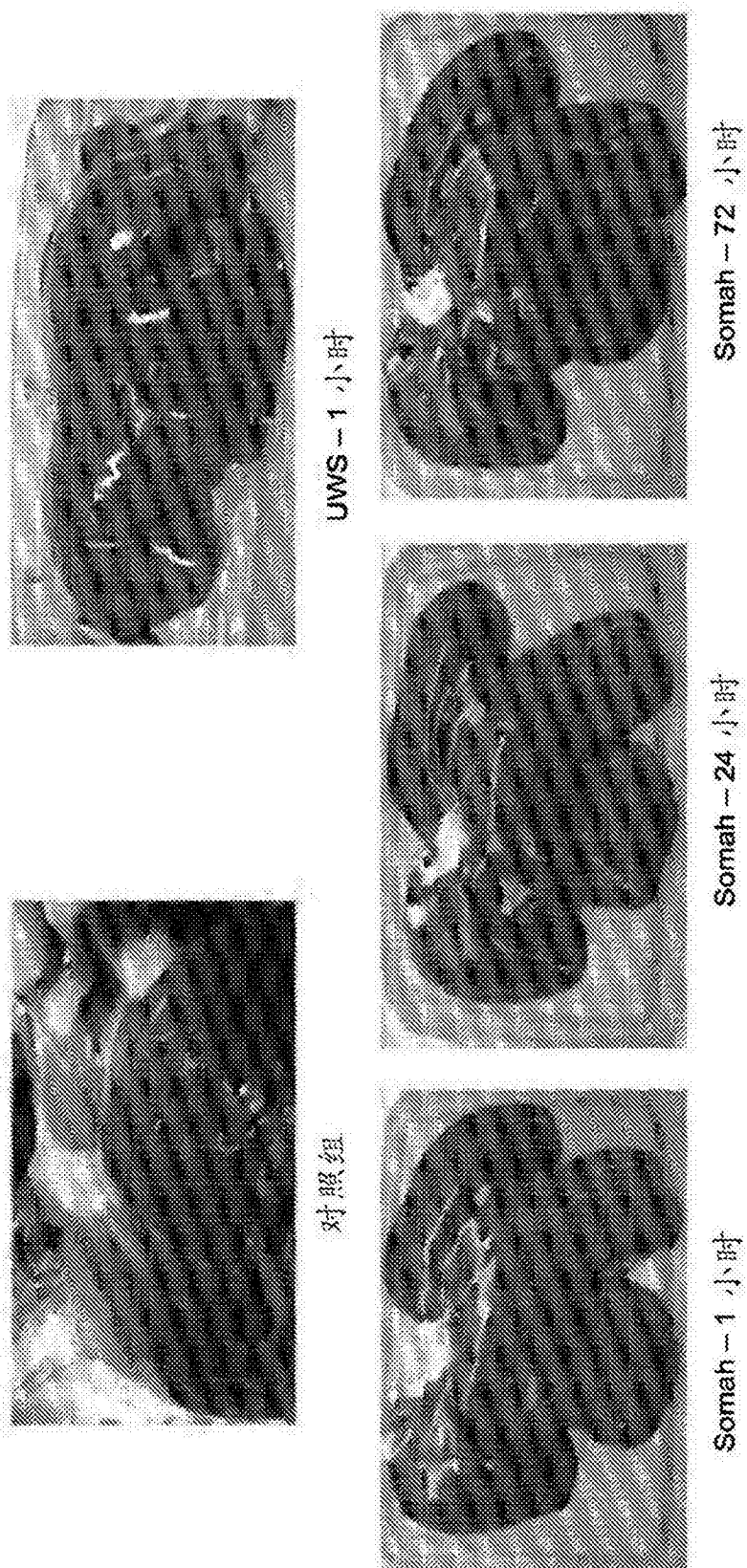


图20

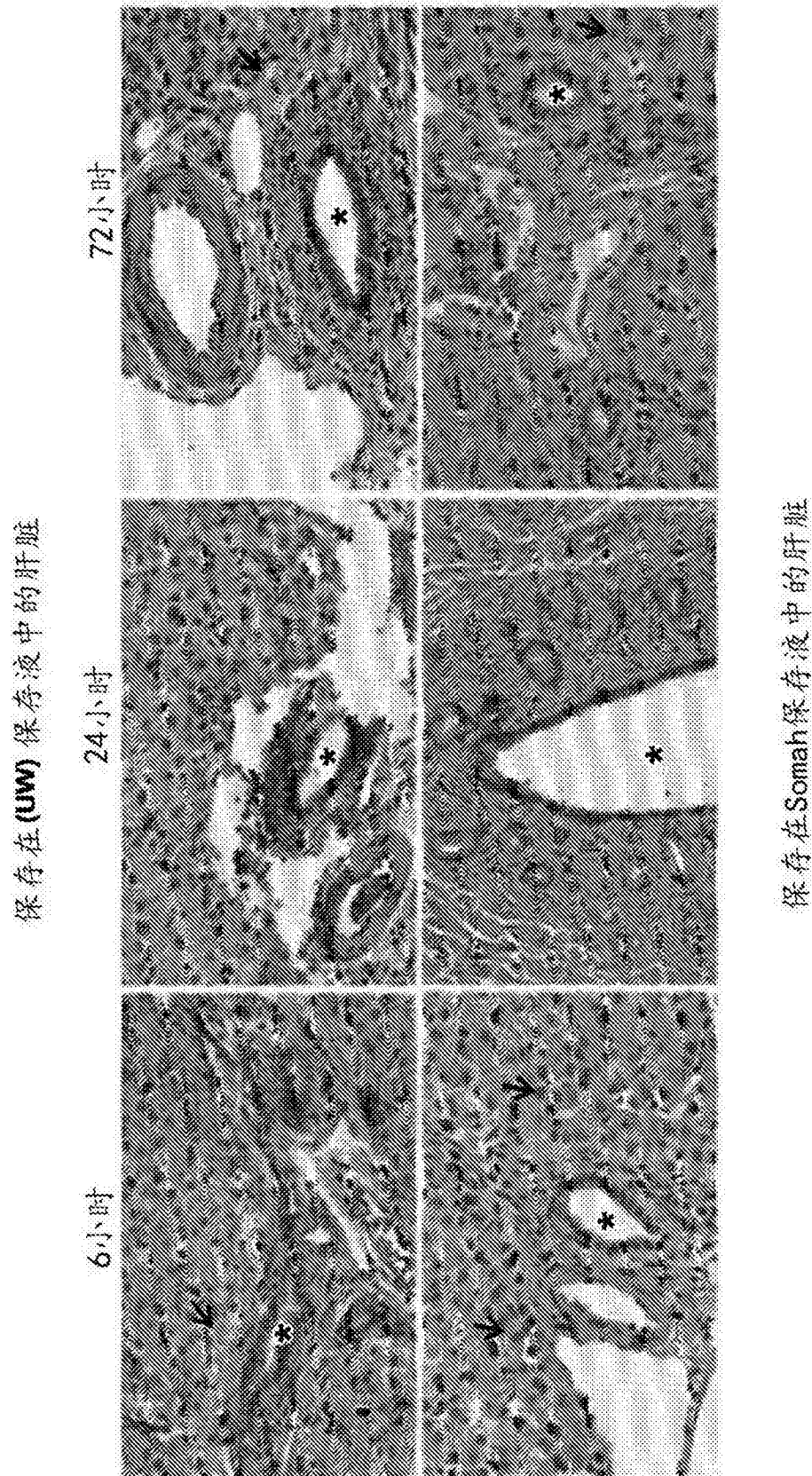


图21

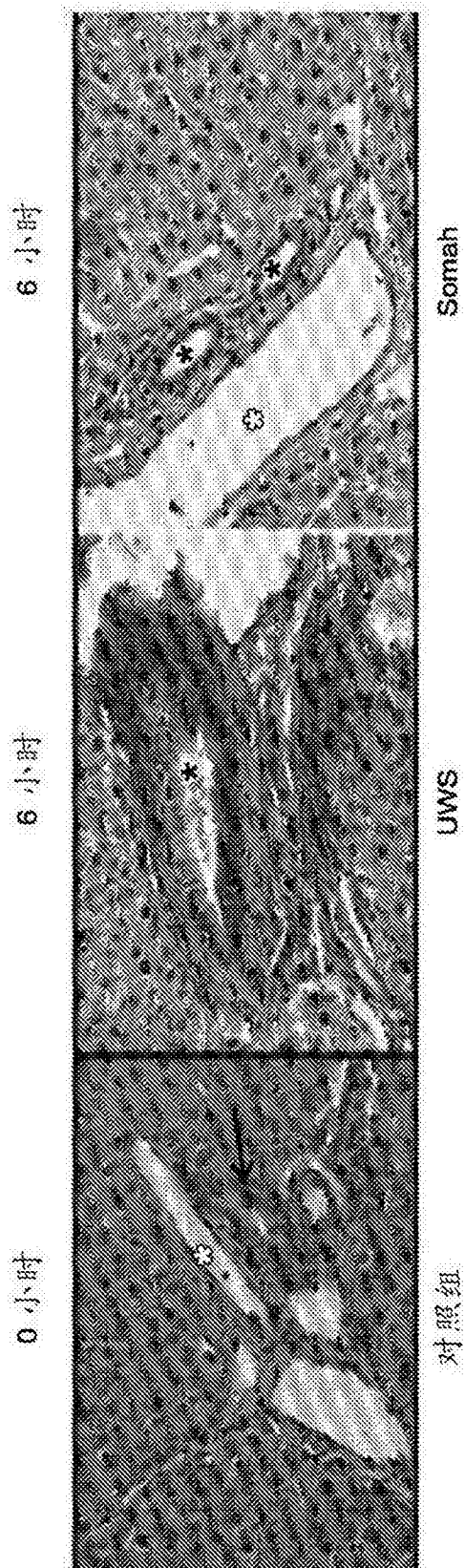


图22

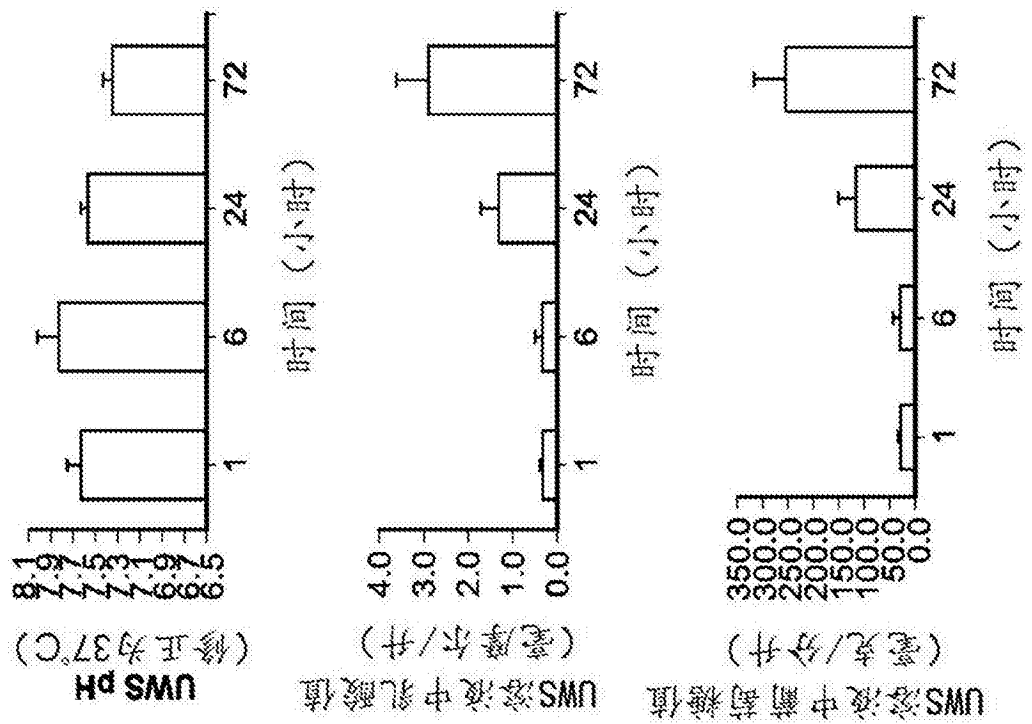


图23A

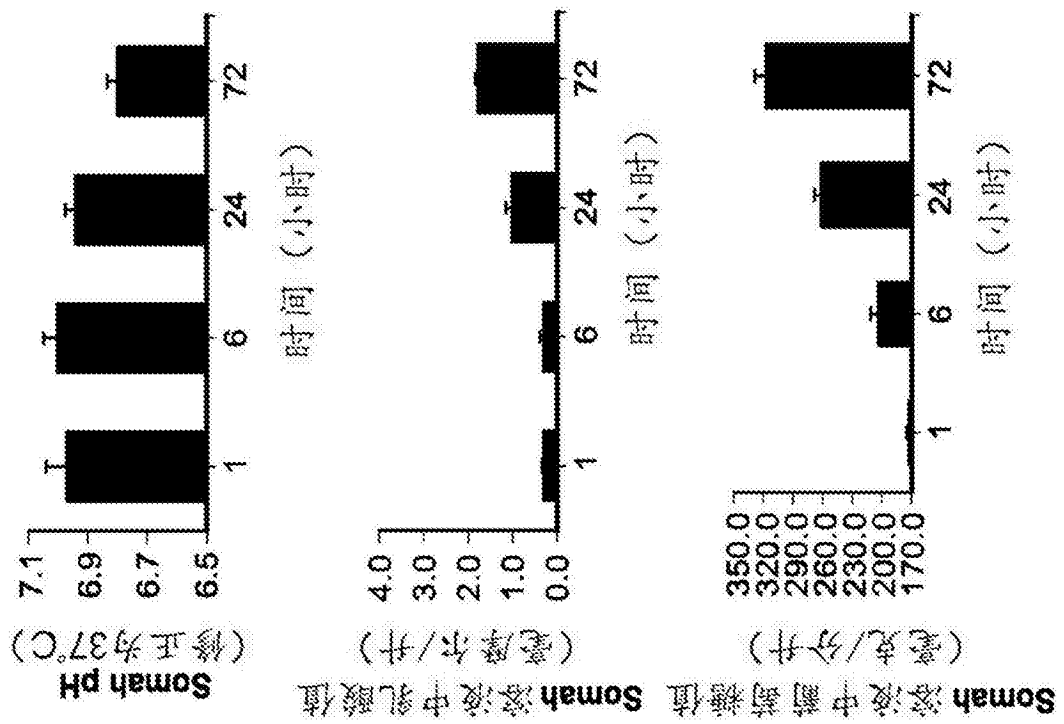


图23B

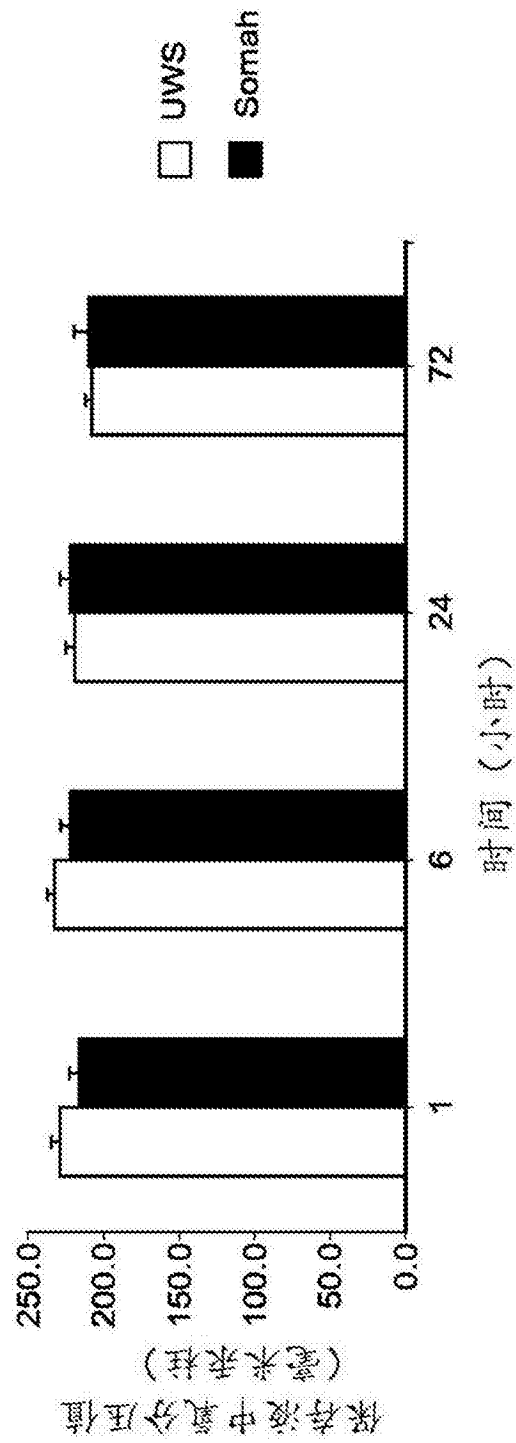


图24A

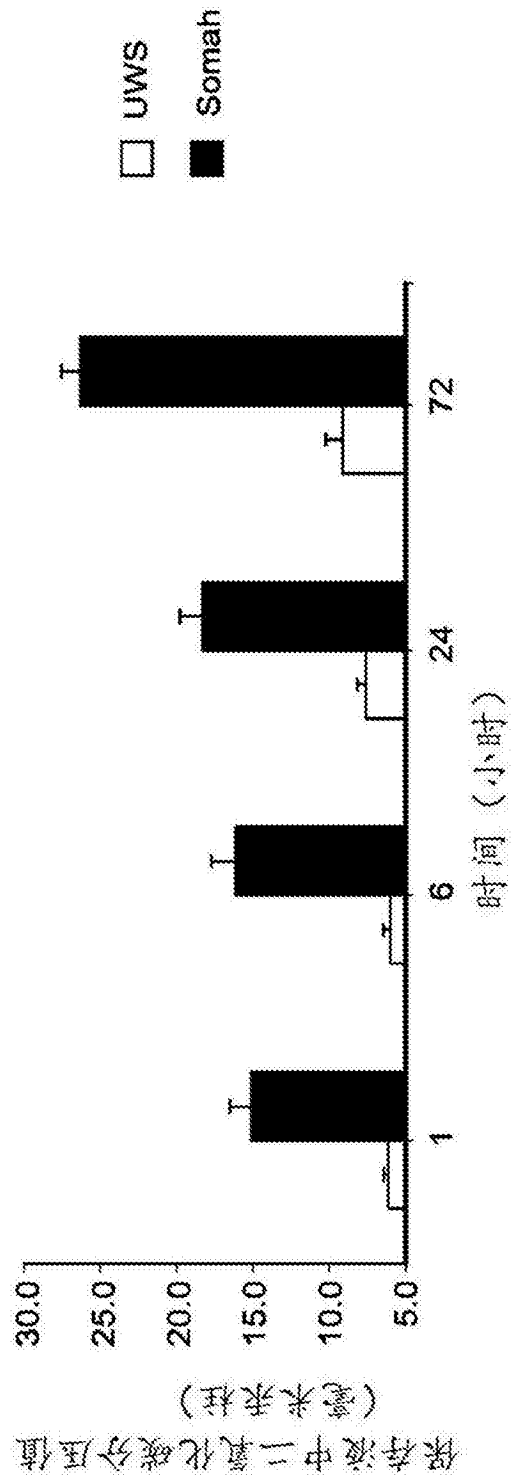


图24B

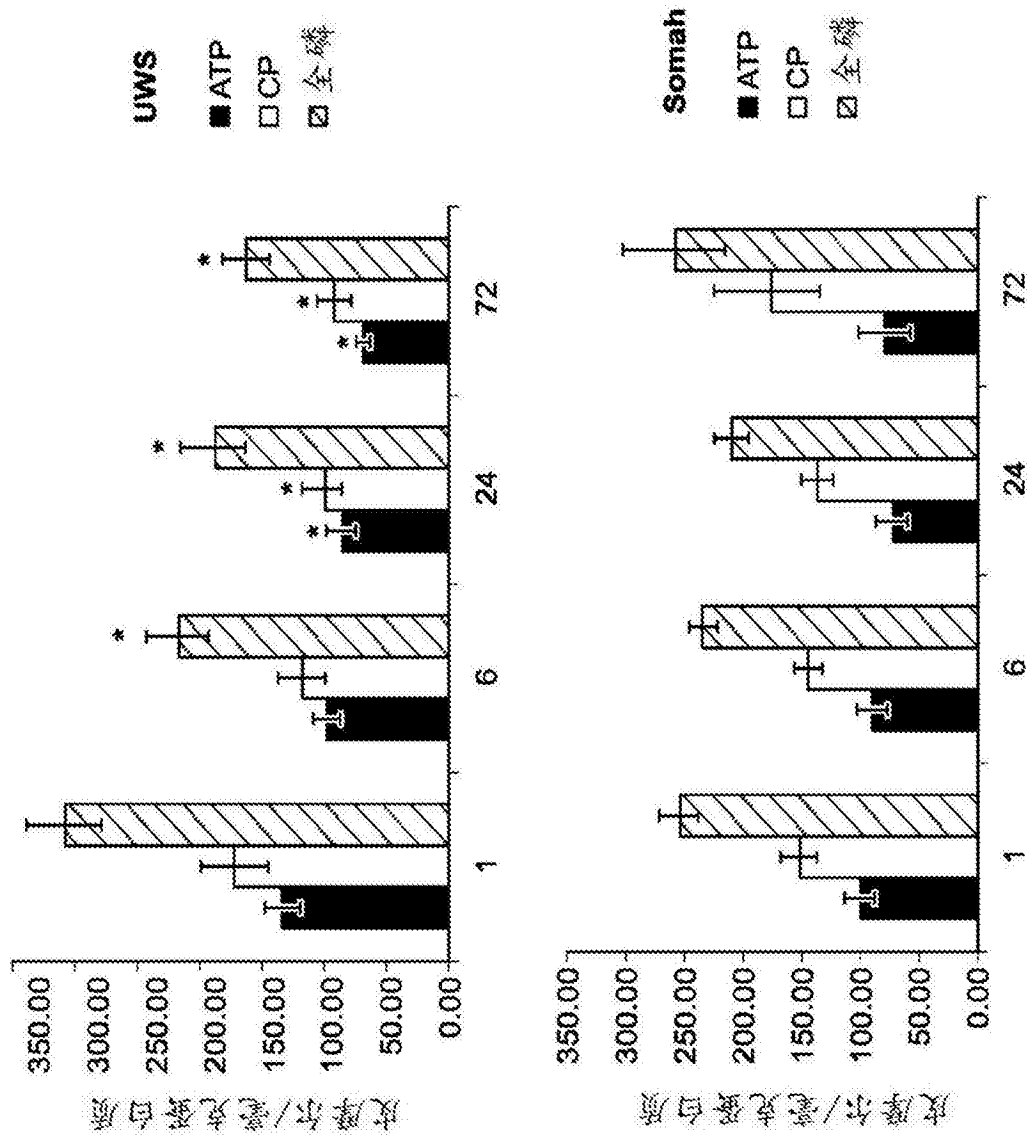


图25

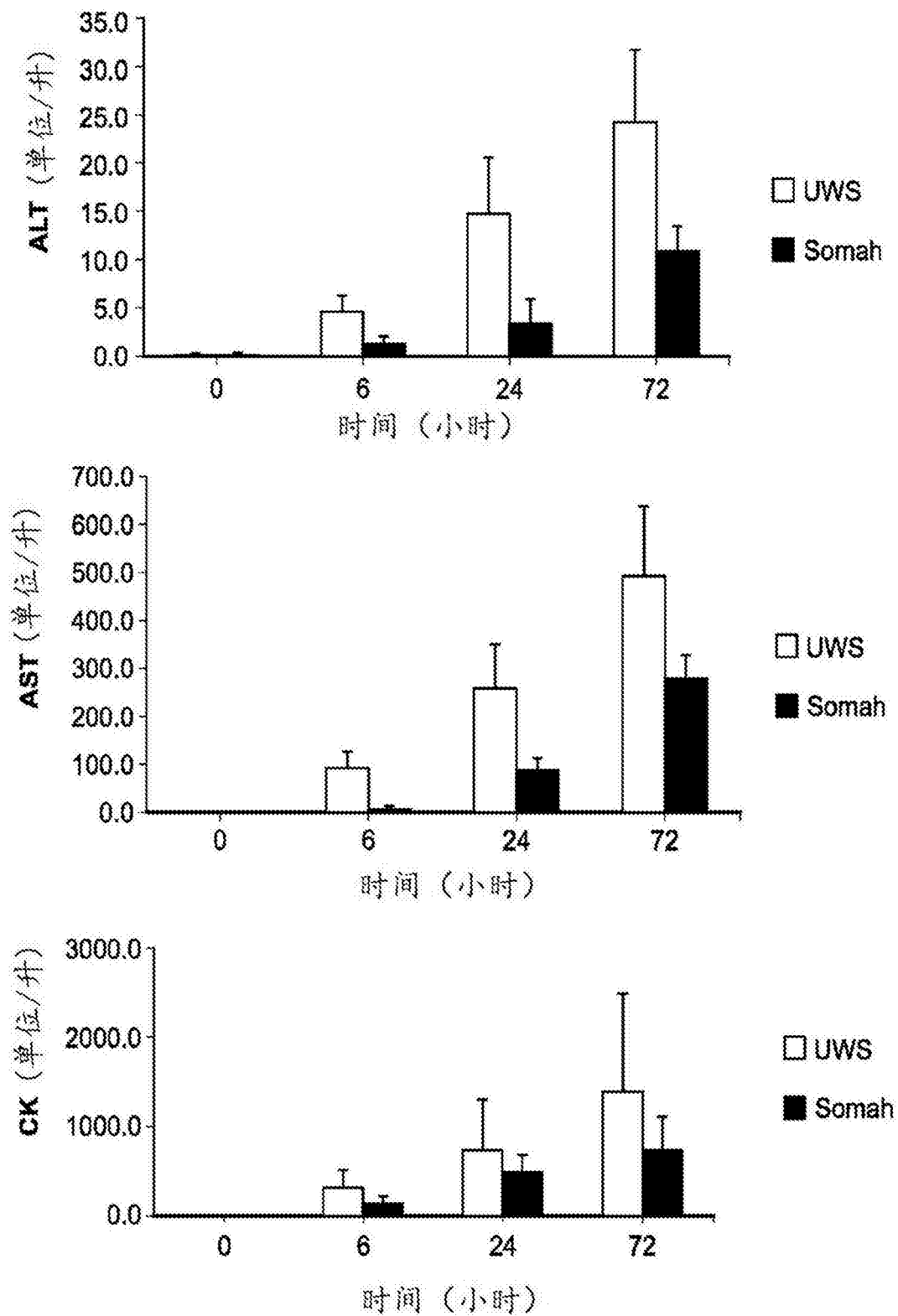


图26

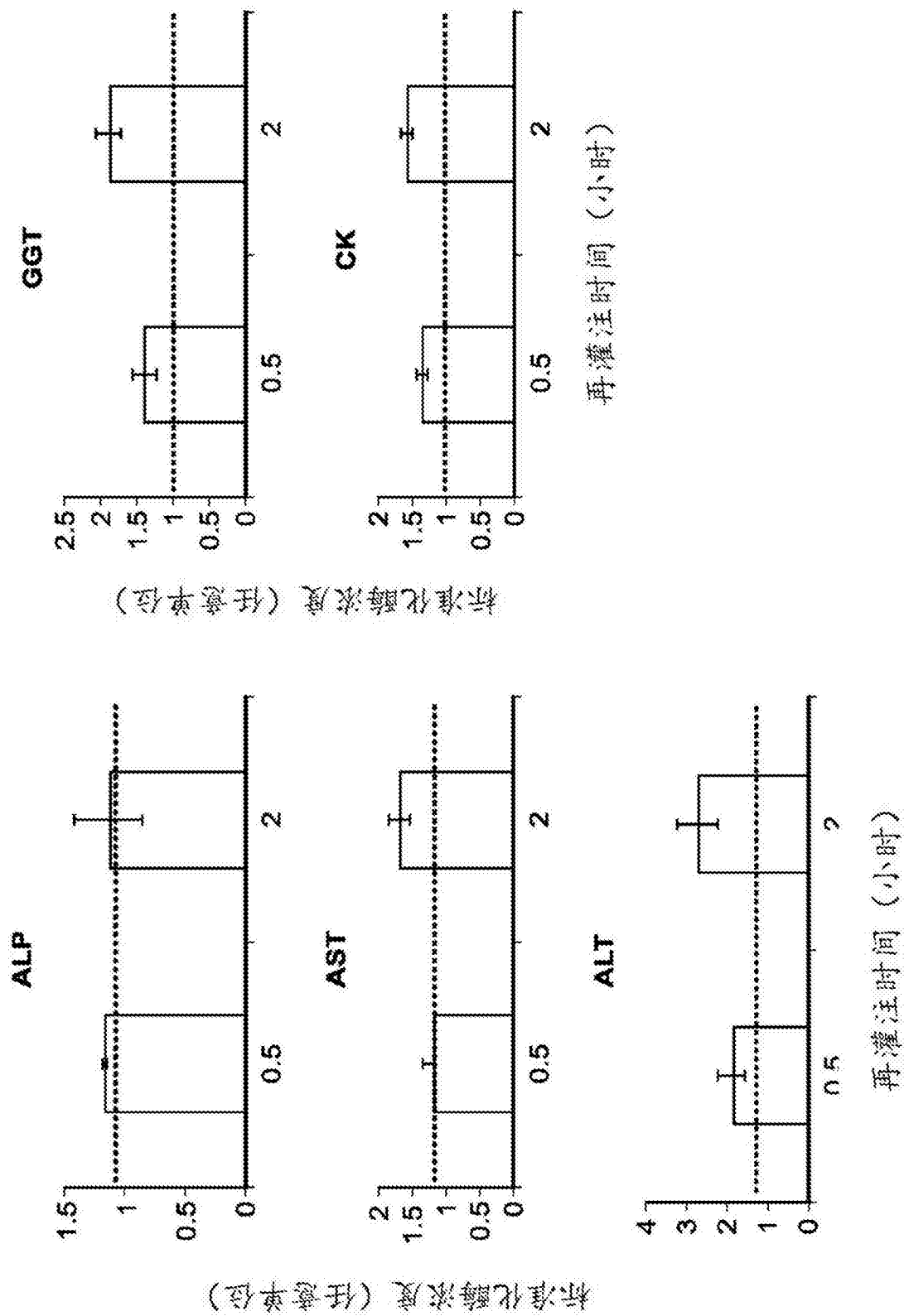


图27

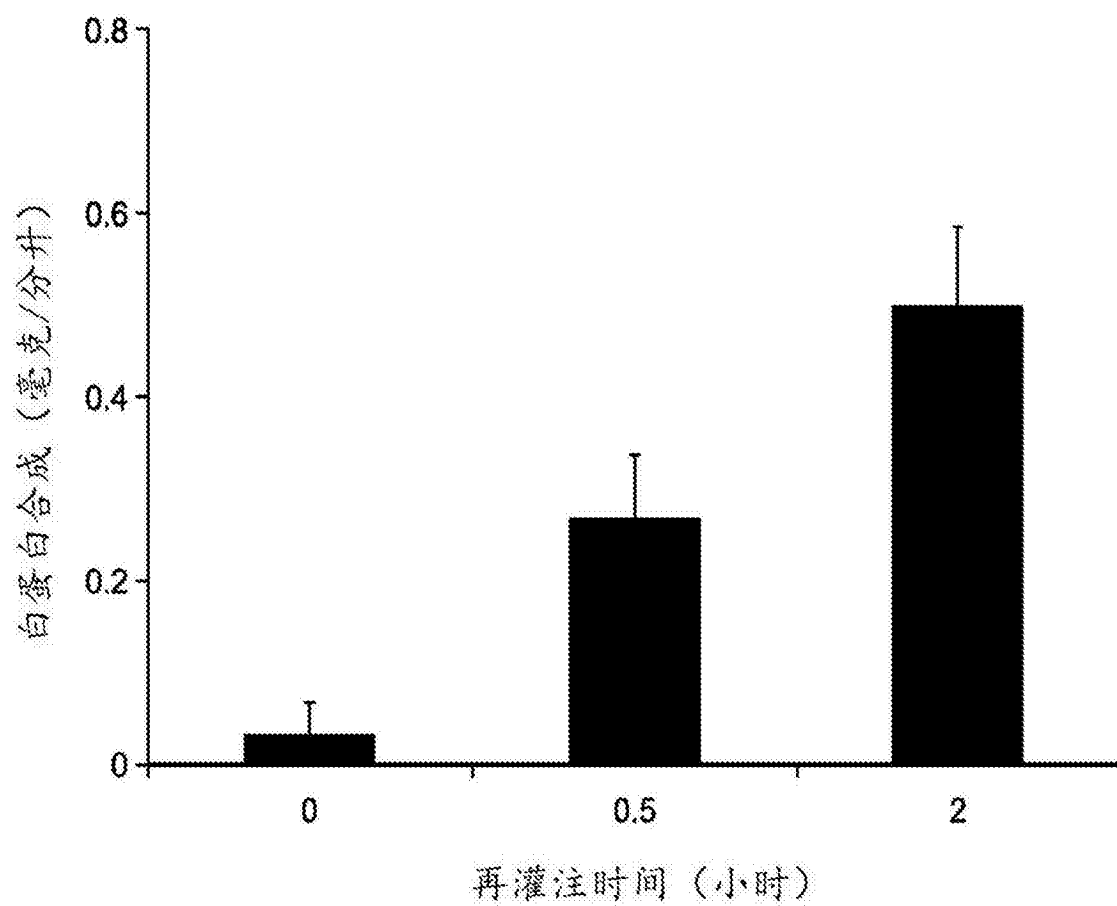


图28

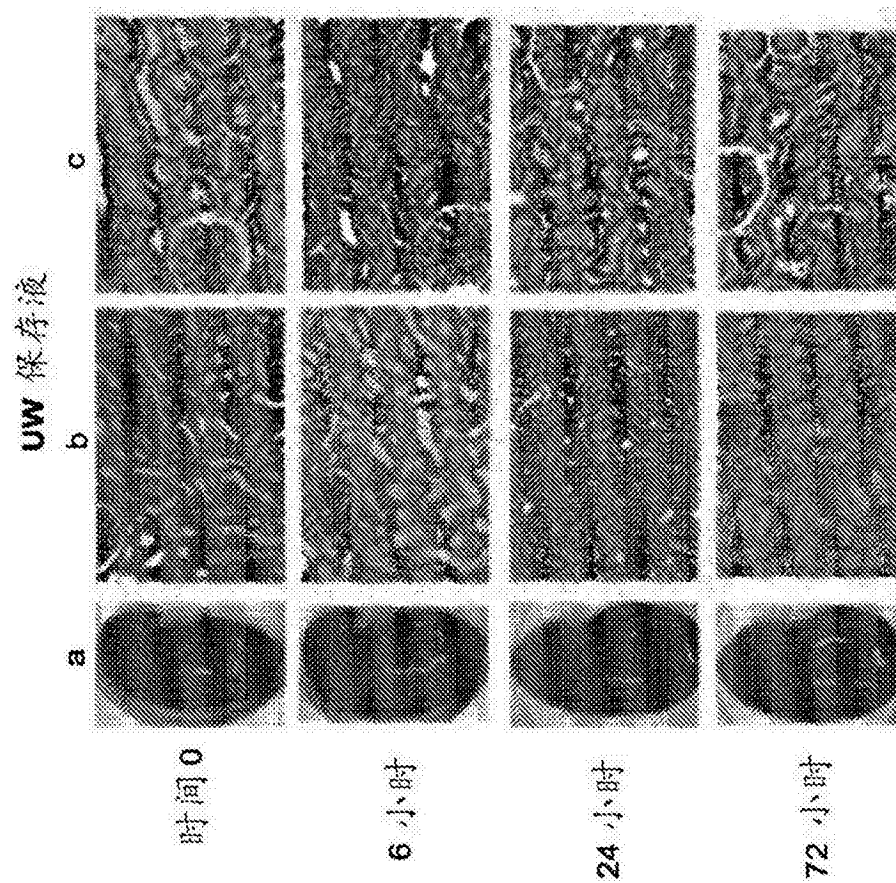


图29A

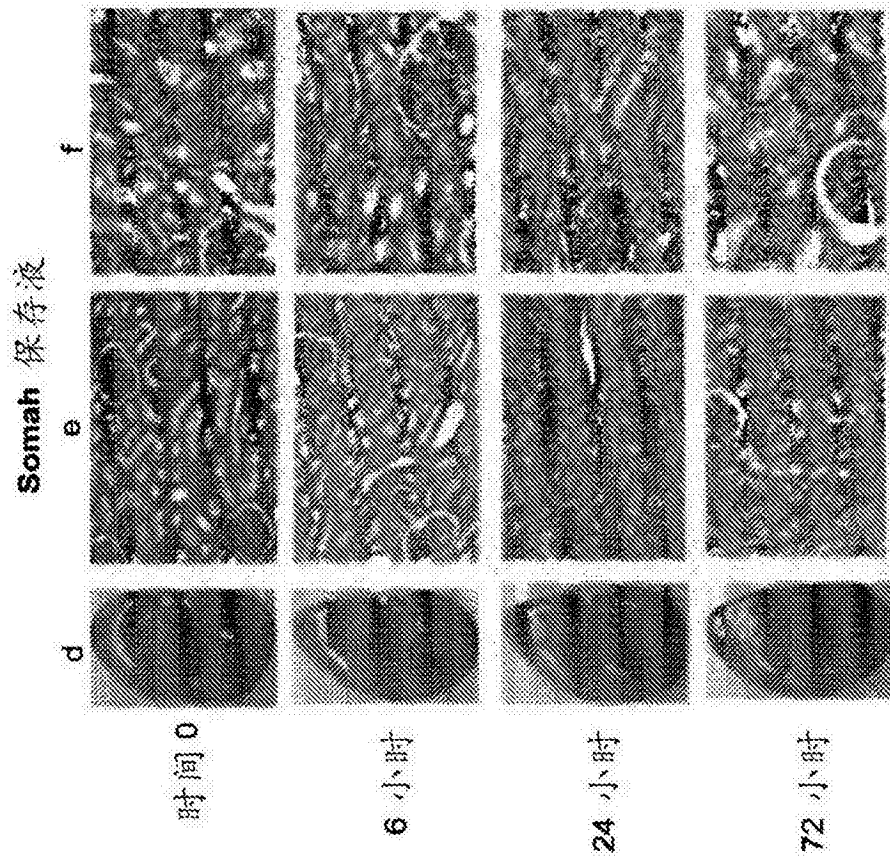


图29B

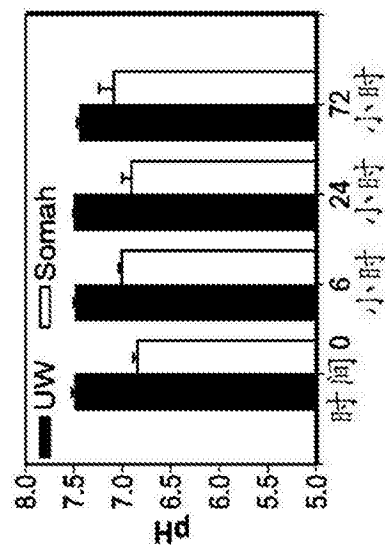


图30A

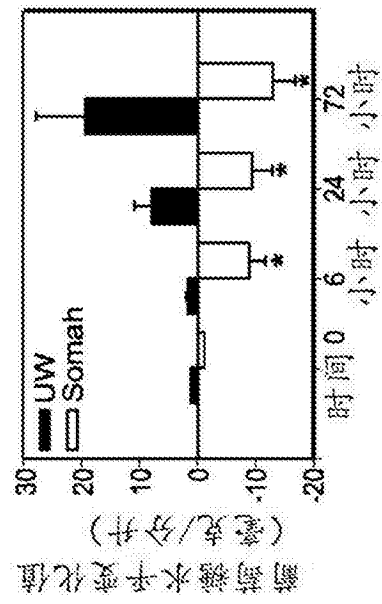


图30B

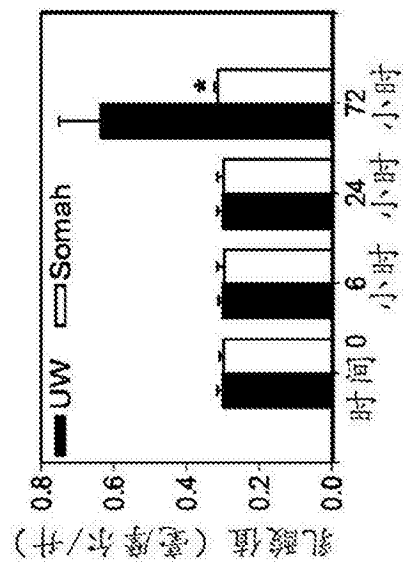


图30C

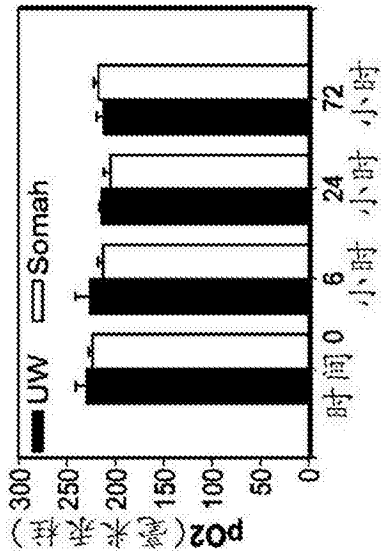


图30D

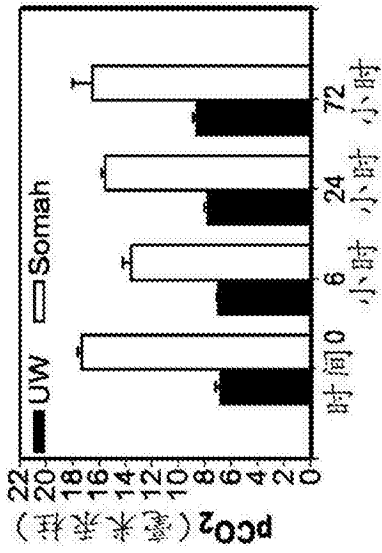


图30E

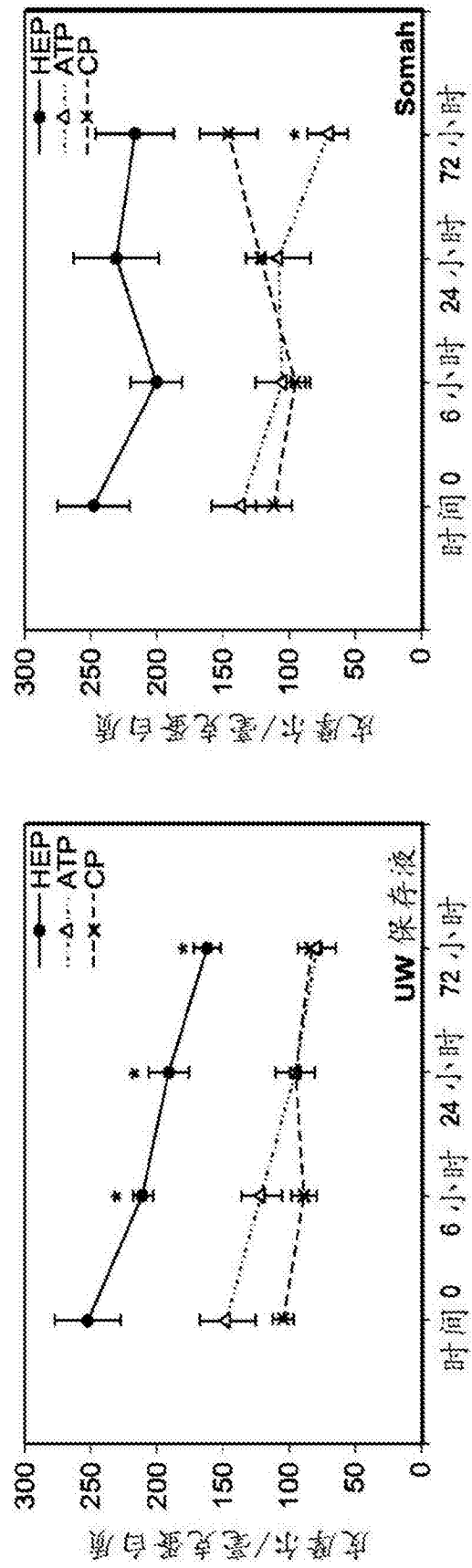


图31

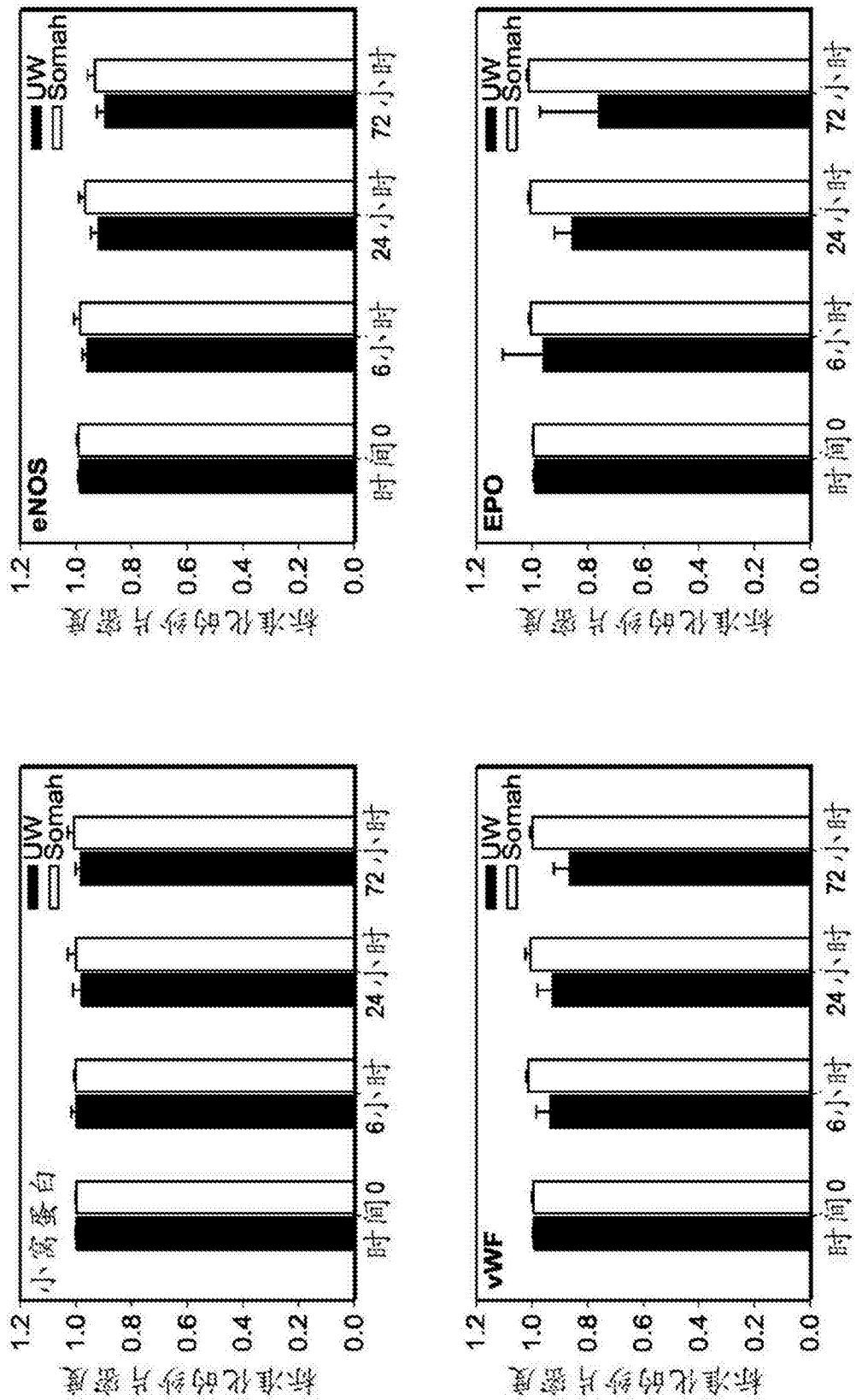


图32

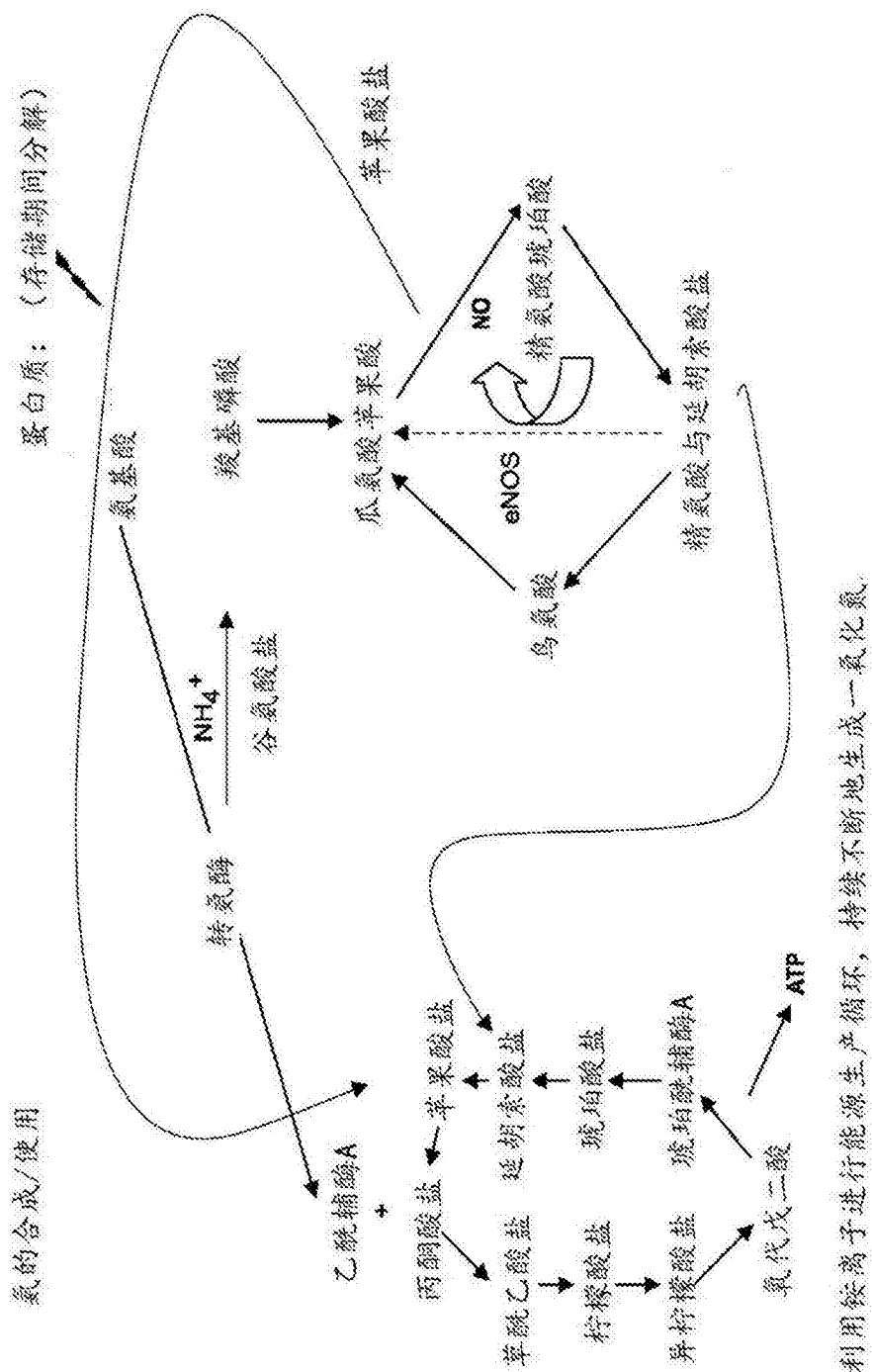


图33