



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **38844** (13) **U**
(51) МПК (2009)
A01N 1/02МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ**ОПИС
ДО ПАТЕНТУ
НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ**видається під
відповідальність
власника
патенту**(54) СЕРЕДОВИЩЕ "ГІПОЛІД" ДЛЯ ГІПОТЕРМІЧНОГО ЗБЕРІГАННЯ ІЗОЛЬОВАНОЇ ПЕЧІНКИ**

1

2

(21) u200808655

(22) 01.07.2008

(24) 26.01.2009

(46) 26.01.2009, Бюл.№ 2, 2009 р.

(72) ПЕТРЕНКО ОЛЕКСАНДР ЮРІЙОВИЧ, UA,
СЕМЕНЧЕНКО ОЛЬГА АНАТОЛІЙВНА, UA, ЧЕР-
КАШИНА ДАР'Я ВІКТОРІВНА, UA, СОМОВ ОЛЕК-
САНДР ЮРІЙОВИЧ, UA, ТКАЧЕВА ОЛЕНА МИКО-
ЛАЇВНА, UA, ЛЕБЕДИНСЬКИЙ ОЛЕКСАНДР
СЕРГІЙОВИЧ, UA, ФУЛЛЕР БАРРІ Д.(73) ІНСТИТУТ ПРОБЛЕМ КРІОБІОЛОГІЇ І КРІО-
МЕДИЦИНИ НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ НАУК
УКРАЇНИ, UA(57) Середовище для гіпотермічного зберігання
ізолюваної печінки, що включає сахарозу, фос-
форнокислий натрій, фосфорнокислий калій, сір-
чаноокислий магній, хлористий кальцій і бідис-
тильовану воду, яке **відрізняється** тим, що
додатково містить поліетилєнглїколь з молекуляр-
ною масою 8000 в концентрації 0,5-5%.

Корисна модель належить до кріобіології і кріомедицини і може бути використана для зберігання ізолюваних органів при 0-4°C з метою подальшої трансплантації.

Для зберігання органів при 4°C відоме середовище Євро-Коллінз, яке містить 139мМ глюкози і мікродобавки солей [1]. Однак у цьому середовищі печінка може зберігатися не більше 8 годин.

Найбільш близьким до розчину, що заявляється, за складом і досягненим ефектом, є середовище, яке містить сахарозу, фосфорнокислий натрій, фосфорнокислий калій, хлористий калій, сірчаноокислий магній, хлористий кальцій і бідистильовану воду [2]. Недоліком застосування цього середовища є те, що після 12 годин зберігання в ньому печінка поступово втрачає свої функціональні властивості. Спостерігається зниження такого важливого енергетичного параметра як рівень АТФ. Це пов'язано з тим, що консервуючий розчин містить ряд проникаючих в клітину компонентів (K^+ , PO_4^{3-} , Mg^{2+} , SO_4^{2-}), які в умовах гіпотермії викликають порушення осмотичного тиску в клітинах і призводять до набряку тканини.

В основу корисної моделі поставлена задача удосконалити відоме середовище таким чином, щоб воно дозволяло уникнути порушень осмотичного тиску в клітинах печінки і, за рахунок цього, підвищити рівень функціональної активності органу.

Ця задача вирішується тим, що середовище для гіпотермічного зберігання ізолюваної печінки,

яке має в складі сахарозу, фосфорнокислий натрій, фосфорнокислий калій, сірчаноокислий магній, хлористий кальцій і бідистильовану воду, згідно з корисною моделлю, додатково містить поліетилєнглїколь з молекулярною масою 8000 (ПЕГ-8000) у концентрації 0,5-5%.

ПЕГ-8000 є високомолекулярною синтетичною речовиною, яка має властивість нормалізувати осмотичний тиск в клітинах. Тому введення його до складу консервуючого середовища дає можливість запобігти осмотичним пошкодженням і, за рахунок цього, підвищити функціональну активність органу і підтримати його у життєздатному стані протягом 18 годин.

Приклад 1. Дослідження здійснювали на нелінійних білих щурах вагою 200-250г, які знаходились на стандартному харчовому раціоні в умовах віварію. Усі маніпуляції з тваринами проводили згідно з правилами "Європейської конвенції захисту хребетних тварин, що використовуються в експериментальних та інших дослідних цілях". Роботу з тваринами проводили з використанням наркозу (дієтиловий ефір). Печінку анестезованих щурів перфузували *in situ* охолодженим до 4°C фізіологічним розчином через портальну вену з використанням перистальтичного насоса зі швидкістю 2,5-3,0мл/хв/г. Відтік крові і перфузату здійснювали через нижню порожнисту вену, яку надсікали в момент початку перфузії. Після відмивання печінки і насичення її відповідним розчином консервування в портальну вену вводили катетер (діаметр

(13) **U**(11) **38844**(19) **UA**

1,4мм) і фіксували його лігатурою. Потім печінку з катетером акуратно видаляли з тіла тварини і негайно переносили в бокси, наповнені охолодженим середовищем консервування.

Підготовлену описаним вище чином печінку щурів зберігали в умовах побутового холодильника при температурі 0-4°C протягом 1 і 18 годин. В якості розчинів консервування використовували відомий розчин і середовище "Гіполід" (фосфорнокислий натрій 1,8г/л, фосфорнокислий калій 4,08г/л, магній сірчаноокислий 0,15г/л, кальцій хлористий 0,71г/л, сахароза 85г/л, ПЕГ-8000 10г/л бідистильованої води, рН 7,4). Наприкінці кожного терміну зберігання з печінки готували гомогенат, в якому визначали вміст АТФ. Після відповідного терміну холодового зберігання, печінку підключали через катетер до системи рециркуляційної перфузії. Перфузію здійснювали 130мл мінімального сольового розчину Кребс-Рінгер-бікарбонат (рН 7,4) протягом 60хв. при 37°C. Перед початком перфузії в розчин вводили 10мМ НЕРЕС, 5мМ глюкози й насичували карбогеном (час газациї 3хв.). Наприкінці нормотермічної реперфузії ізольованої печінки в перфузаті визначали активність цитоплазматичного фермента лактатдегідрогенази (ЛДГ).

У свіжовиділеній і відмитій від крові печінці вміст АТФ становить 2,5-4,5мкмоль/г ткани. Одержані нами результати узгоджуються з цими показниками (Табл.1). При дослідженні внутрішньоклітинного вмісту АТФ після годинного зберігання ізольованого органу в розчині за прототипом і середовищі "Гіполід" були отримані аналогічні результати, які свідчать про високий рівень інтактності клітин печінки і про їх адекватну реакцію на умови короткочасної холодової ішемії (60 хв.) і наступної нормотермічної реперфузії.

Після 18-годинного гіпотермічного зберігання ізольованої печінки зафіксовано зниження рівня АТФ, що можна пояснити, з одного боку, виснаженням внутрішньоклітинних субстратів окислення, а з іншого - його витратою на підтримку гомеостазу клітин при холодовій ішемії. Однак при використанні середовища "Гіполід", рівень внутрішньоклітинного АТФ вище, ніж у відомому розчині.

Наступна нормотермічна реперфузія зразків виявила ще більшу різницю в ефективності середовищ. Використання середовища "Гіполід" дозволило зберегти цей показник на вищому рівні (Табл.1).

Для подальшого обґрунтування введення ПЕГ-8000 в середовище гіпотермічного зберігання печінки, була вивчена динаміка зміни рівня активності ЛДГ в перфузаті під час нормотермічної реперфузії ізольованої печінки. Переведення печінки з умов холодової ішемії в нормотермічний стан дозволяє виявити латентні пошкодження гепатоцитів у складі органу. Стан плазматичних мембран клітин печінки чутливо реагує на найменші впливи, в результаті чого відбувається втрата розчинних ферментів і дезорганізація клітин в цілому.

Як видно із представлених результатів (Табл.2), протягом нормотермічної реперфузії у середовищі інкубації спостерігається поступове збільшення активності ЛДГ незалежно від складу консервуючих середовищ. І якщо в контрольних пробах (60хв. зберігання) різниця в активності ферменту не є достовірною, то після 18-годинного зберігання печінки в заявлюваному середовищі рівень ЛДГ після реперфузії нижчий, ніж у прототипі.

Приклад 2. Для обґрунтування концентрації ПЕГ-8000 в заявлюваному середовищі були проведені експерименти щодо вивчення активності ЛДГ в реперфузійному середовищі після 18-годинного зберігання ізольованої печінки в розчинах консервування, які містять різні концентрації ПЕГ-8000. Як показують представлені дані (Табл.3), найменший вихід ЛДГ у позаклітинне середовище спостерігається при використанні у складі консервуючого розчину ПЕГ-8000 у концентрації 0,5-5%.

Таким чином, отримані результати свідчать, що заявлюване середовище "Гіполід", яке містить у своєму складі від 0,5 до 5% ПЕГ-8000, більшою мірою, у порівнянні з прототипом, забезпечує збереження функціонально-метаболического статусу ізольованої печінки після 18-годинного гіпотермічного зберігання органа при 4°C.

Таблиця 1

Вміст АТФ (мкмоль/г) в печінці після її зберігання при 4°C
(n=6)

Умови зберігання та інкубації	Середовище зберігання	
	за прототипом	"Гіполід"
Контроль, 4°C, 60хв.	3,61±0,24	4,44±0,45
Наступна реперфузія при 37°C, 60хв.	2,86±0,42	2,98±0,36
Зберігання, 4°C, 18год.	2,08±0,15	2,32±0,21
Наступна реперфузія при 37°C, 60хв.	1,40±0,19	1,56±0,17

Таблиця 2

Рівень активності ЛДГ (U/V) в розчині нормо термічної реперфузії після зберігання ізолюваної печінки в середовищах різного складу (n=6)

Середовище	Умови зберігання	
	Контроль, 60хв., 4°C	18 год., 4°C
за прототипом	16,6±1,8	24,0±0,8
"Гиполід"	15,8±0,8	20,8±1,3*

* - зміни достовірні порівняно з відомим розчином

Таблиця 3

Рівень активності ЛДГ (U/V) в розчині нормотермічної реперфузії (60хв.) після зберігання ізолюваної печінки в середовищах з різною концентрацією ПЕГ-8000 (n=6)

Концентрація ПЕГ-8000, %	Активність ЛДГ
0,25	28,7±0,8*
0,5	23,8±1,3
1	20,8±0,8
2	23,2±1,9
3	23,2±1,4
4	24,5±1,4
5	24,1±2,0
6	30,8±1,9**

* - зміни достовірні порівняно з наступними концентраціями ПЕГ

** - зміни достовірні порівняно з попередніми концентраціями ПЕГ

Джерела інформації:

1. Wahlberg J., Eklund T. Hillered comparison of energy metabolism in rat liver grafts during preservation in University of Wisconsin or Euro-Collins //Transplant. Proceed. -1995. -V.27. -P.721-722.

2. Семенченко О.А., Шаніна І.В., Петренко О.Ю. Середовище для гіпотермічного зберігання ізолюваної печінки. /Патент України 57680А, АО1N1/02, 2003.