

**Висновки**

1. Запропонована методика консервації та ізольованої перфузії печінки щура ефективна для вивчення дії консервантів з різними мембран-стабілізуючими препаратами.

**Література**

1. Гомоляко І. В., Шагідулін М. Ю., Донцова Л. С., Дубовик Т. О. Вплив недостатньої відмивки судин печінки та якість збереження її в консервуючому розчині // Сучасні проблеми клінічної та експериментальної трансплантології. – К., 1995. – С. 40.
2. Ar-Rajab A., Ahren B., Nilsson A. Temperature depended phospholipid degradation in the rat liver during preservation for transplantation. A comparison between different preservation solutions // Transplantation. – 1994. – Vol. 57, N 8. – P. 1153–1160.
3. Ar-Rajab A., Ahren B., Sandberg R., Bengmark S. The function of a colloid in liver coldstorage preservation // Ibid. – 1991. – Vol. 52, N 7. – P. 34–38.
4. Castaing D., Houssin D., Bismuth H. Anatomy of the liver and portal system of the rat // Hepatic and portal surgery in the rat. – Paris: Masson, 1980. – Kptl. III. – P. 27–45.
5. Dunne J. B., Davenport M., Williams R., Tredger M. Evidence that S-adenosylmethionine and N-acetylcysteine reduce injury from sequential cold and warm ischemia in the isolated perfused rat liver // Transplantation. – 1994. – Vol. 57, N 8. – P. 1161–1168.
6. Fusaoka T., Hunt K. J., Lemasters J. J., Thrumann R. G. Evidence that activation of Kupfer cells increases oxygen uptake after cold storage // Ibid. – Vol. 58, N 10. – P. 1067–1071.
7. Holzmueller P., Reckendorfer H., Burgmann H., Moser E. Viability testing of transplantation donor liver by <sup>31</sup>P NMR relaxometry // Magnetic resonance in medicine. – 1990. – Vol. 16. – P. 173–178.
8. Kamada N. Experimental liver transplantation. – Boca Raton, Florida: CRS Pressinc, 1988. – 153 p.

2. Використання мініоксигенатора дозволило істотно збільшити тривалість ізольованої перфузії печінки в експерименті.

9. Kamada N., Calne R. Y. A surgical experience with five hundred thirty liver transplants in the rat // Surgery. – 1983. – Vol. 93. – P. 64.
10. Palombo J. D., Pomposelli J. J., Fechner K. D. et al. Enhanced restoration of adenine nucleotides in rat liver following extended preservation in UW solution by provision of adenosine during reperfusion // Transplantation. – 1991. – Vol. 51, N 4. – P. 867–873.
11. Lee S., Skivolocki W. P., Hasel J., Orloff M. J. Influence of portal vein arterisation on liver regeneration in a double liver rat biopsy model // Europ. Surg. Res. – 1981. – Vol. 13. – P. 17.
12. Lindell S. L., Southard J. H., Vreugdenhil P., Belzer F. O. Kupfer cells depress hepatocyte protein synthesis on cold storage of the rat liver // Transplantation. – 1994. – Vol. 58, N 8. – P. 869–874.
13. Rao P. N., Liu T., Snyder J. T. et al. Reperfusion injury following cold ischemia activates rat liver Kupfer cells // Transplant. Proc. – 1991. – Vol. 23, N 1. – P. 666–669.
14. Schiff L., Schiff E. R. Diseases of the liver. – Philadelphia: J. B. Lippincott Co., 1993. – Vol. 1. – 416 p.
15. Sherman I. A., Saibil F. G., Janoddy T. Hydroxybutyrate mediated protection of liver function after long-term hypothermic storage // Transplantation. – 1994. – Vol. 57, N 1. – P. 8–11.
16. Suehiro T., Yanaga K., Itasaka H. et al. Beneficial effect of thromboxane A-2 synthetase inhibitor on cold-stored rat liver // Ibid. – Vol. 58, N 7. – P. 768–773.
17. Waynforth H. B. Experimental and surgical technique in the rat. – London: Acad. Press, 1980. – 244 p.
18. Zimmermann F. A., Davies H. S., Knoll P. P. Orthotopic liver allografts in the rat. The influence of strain combination on the fate of the graft // Transplantation. – 1984. – Vol. 37. – P. 406.

© М. Ю. Шагідулін, 1997

Надійшла 18.02.97

УДК 616.36 – 007.17 – 085

## ВПЛИВ КОНСЕРВУЮЧИХ РОЗЧИНІВ ЄВРОКОЛЛІНЗ ТА ЄВРОКОЛЛІНЗ+N НА ПЕРЕБІГ ДИСТРОФІЧНОГО ПРОЦЕСУ В ПЕЧІНЦІ ЩУРІВ

Л. С. Донцова, М. Ю. Шагідулін, І. В. Григорова, Н. М. Гулая

Інститут клінічної та експериментальної хірургії АМН України, м. Київ

**Реферат.** Вивчено вплив консервуючих розчинів Євроколлініз (ЕС) та Євроколлініз з мембранстабілізуючою добавкою (ЕС + N) на перебіг дистрофічного процесу в паренхімі печінки щурів. Використання мембранстабілізуючої добавки сприяло стабілізації структури печінки, що проявлялось зменшенням вираженості та поширеності гідропічної дистрофії.

**Summary.** The influence of Eurocollins and Eurocollins with the membranestabilizing additives conserving solutions on the course of dystrophic process in the rat's hepatic parenchyma was studied. Application of the membranestabilizing additives promoted the hepatic structure stabilization, showing the reduce of the hydropic dystrophia intensity and extent.

Ряд найважливіших досягнень початку 80-х років, зокрема, розробки у галузі консервації органів, створили передумови для визнання та широкого впровадження трансплантації печінки у клініках світу.

Інтерес до проблеми ішемії та її значення у зв'язку з консервацією органів і тканин росте, проте далеко не всі питання ішемічного пошкодження вирішені. Ішемія супроводжує всі етапи виділення донорських органів та їх консервації [1–3].

Консервація ізольованих органів вимагає розробки умов зберігання, структурно-функціональної цілісності органів, ефективних засобів боротьби

з ішемічним пошкодженням донорських органів. У патогенезі ішемічного пошкодження тканин виділяють два основні моменти: дефіцит макроергічних сполук, що зумовлюють пусковий механізм патологічних реакцій, та руйнування мембранних структур клітини, що є одночасно причиною та наслідком подальшого поглиблення енергетичного дефіциту клітин.

Для консервації ізольованих органів перш за все необхідне створення штучного середовища, здатного протягом певного часу підтримувати оптимальну структурно-функціональну цілісність органа.

Трансплантаційні центри світу для збереження органів використовують безперфузійний метод консервації [4]. Судинне русло донорського органа відмивають охолодженням (2 – 4°C) розчином спеціального складу, підбраного експериментальним шляхом, з подальшим тривалим зберіганням при тій же температурі. Консервуючі розчини помірно гіперосмотичні, безкальцієві (або гіпокальцієві), гіпонатрієві та гіперкалієві (мало, помірно або потужні гіперкалієві) розчини з додатком (або без нього) різних регуляторів метаболізму.

Для консервації печінки застосовують гіперкалієві та гіпонатрієві розчини. Вони оптимальні, оскільки перешкоджають пасивній дифузії іонів натрію у клітину, зберігають внутрішньоклітинний рівень калію, компенсують завдяки гіпотермії знижену активність АТФ-ази у період відігрівання, створюють передумови для збереження ферментних систем та енергетики клітин. Гіперкалієві та гіпонатрієві розчини сприяють збереженню цілісності гепатоцитів і ендотеліальних клітин судинного русла, які в умовах гіпотермії мають різну чутливість до методів консервації.

В клінічній практиці фармакологічні препарати є основним засобом боротьби з ішемією органів, перш за все, з пошкодженням мембран. З цією метою успішно використовують препарати різної фармакологічної дії, зокрема, засоби з мембранотропною активністю мають найбільш виражений захисний ефект.

Застосування препаратів, що запобігають незворотній структурній перебудові мембран внаслідок стимуляції пластичної конформації їх білково-ліпідного комплексу, сприяє істотному підвищенню резистентності органів та тканин до ішемії. Конформаційна перебудова мембран під дією мембранотропних препаратів здійснюється звичайно на рівні слабких внутрішньо- та міжмолекулярних зв'язків завдяки електростатичній індукційній та дисперсійній взаємодії, що об'єднують іон-іонні, диполь-дипольні, гідрофобні та водневі зв'язки [5]. Перерозподіл цих сил під дією фармакологічних засобів спричинює просторову перебудову взаєморозташування внутрішньомембранних молекул білків, ліпідів, води, катіонів та зміни їх внутрішньої конформації.

Розробка способів фармакологічного захисту донорських органів, порівняльна оцінка методів

консервації, критеріїв життєздатності вимагають проведення експерименту та стандартизації його умов.

Нами проведені експериментальні дослідження зберігання ізольованої печінки безпородних щурів за допомогою різних консервуючих розчинів. Як донори були використані 52 щури (самці та самки) масою від 220 до 320 г. Для наркозу використовували тіопентал-натрій, який вводили внутрішньочеревинно, у дозі 30–50 мг/кг маси тіла. Під знеболюванням з використанням середнього розрізу розкривали черевну порожнину. Печінку звільняли від зв'язок шляхом їх пересічення та коагуляції, з старанним проведенням гемостазу. Здійснювали резекцію невеликої ділянки печінки із збереженням кровообігом, проводили морфологічні та цитологічні дослідження тканини. Місце резекції тканини старанно коагулювали. Після відмивання печінки від елементів крові вдруге здійснювали біопсію з наступною коагуляцією місця взяття біоптату. Печінку видаляли з черевної порожнини і вміщували у контейнер з консервантом при температурі 2°C. Орган зберігали протягом 2, 4, 6, 8 та 22 год, після чого проводили морфологічні та цитологічні дослідження. Для консервації печінки використовували консервуючі розчини: у 1-й групі спостережень – ЕС, у 2-й групі – ЕС+ N.

Для морфологічного дослідження шматочки органа фіксували в 10% розчині нейтрального формаліну, заливали у парафін за загальноприйнятою гістологічною методикою. Парафінові зрізи забарвлювали гематоксиліном та еозинном, ставили ШК-реакцію, реакцію Фельгена. Одночасно проводили морфометричні дослідження. Зміни в тканині печінки оцінювали за допомогою морфометричних методик. Обчислювали кількість та розміри ядер гепатоцитів, розміри та щільність їх цитоплазми за допомогою масштабної окулярної сітки, площу незмінених та дистрофічно-змінених гепатоцитів. Площу та щільність визначали за допомогою аналізатора зображення (МП "АРВЕЛ"). Результати досліджень обробляли статистично.

Деякі параметри у спостереженнях 1-ї та 2-ї груп суттєво не відрізнялися, хоча візуально різниця була добре виражена. Це зумовлене тим, що зміни в тканині печінки були мозаїчними. Розроблено методику оцінки паренхіми печінки за допомогою морфограм. Морфограми – це графічні моделі паренхіми, при побудові яких брали до уваги площу візуально інтактних та дистрофічно-змінених гепатоцитів у різних полях зору.

Цитограми готували шляхом чисельних відбитків шматочків печінки на попередньо знежиреному предметному склі з наступною фіксацією 96% етиловим спиртом протягом 1–2 хв та забарвленням за Романовським – Гімза. Цитограми аналізували за допомогою світлооптичного мікроскопа (збільшення 40), оптичну щільність та площу гепатоцитів визначали за допомогою комп'ютера та аналізатора зображення. Оцінювали кількість, розміри та кіль-

кісні параметри гепатоцитів, комплексів гепатоцитів, наявність "голих" ядер, а також неспечінкових клітин.

Морфологічні зміни в інтактній печінці в обох групах однорідні. Препарати з значними дистрофічними змінами були виключені з експерименту. Малюнок печінки був нерівномірним. Долькова та балкова будова не змінена. Контури гепатоцитів чіткі, цитоплазма збагачена глікогеном. Ядра здебільшого мноморфні, однакових розмірів та щільності. Відхилення спостерігали рідко.

У вихідних цитограмах відбитків печінки виявляли гепатоцити, комплекси гепатоцитів, поодинокі лейкоцити, лімфоцити, зірчасті ретикулоендотеліоцити та тканинні базофіли, а також клітини ендотелію кровеносних судин, покривний епітелій жовчовивідних шляхів.

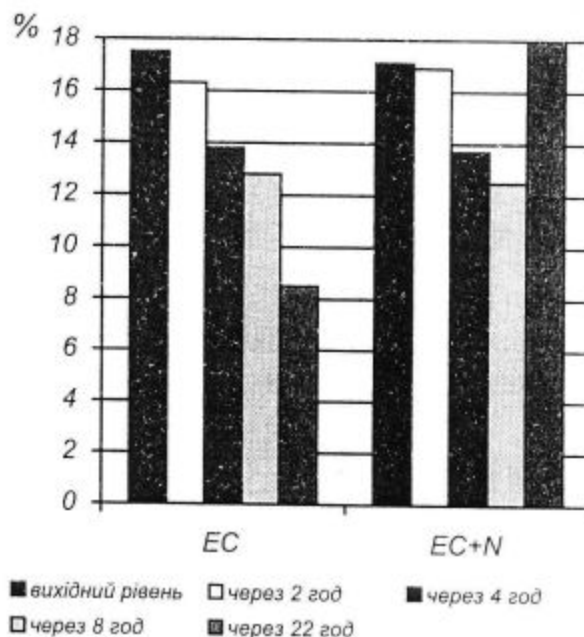
Відмивання судинного русла печінки за допомогою консервуючих розчинів суттєво не впливало на загальну картину, лише у просвіті капілярів та більш крупних судин не виявляли еритроцити. Як закономірне явище відмічено активацію елементів строми печінки – збільшення розмірів та кількості зірчастих ретикулоендотеліоцитів, збільшення кількості лімфоїдних елементів уздовж воротних каналів.

Через 2 год зберігання печінки в консервуючих розчинах виявляли зміни її структури відносно контролю. Поява значної кількості клітин з вакуолізованою цитоплазмою, що втратили глікоген, а також ділянок з дифузним рожевим ШІК-забарвленням, що не змінювалось під дією амілази, свідчило про виникнення дистрофічних змін. Реакція ядер була менш вираженою, проте відмічали тенденцію до збільшення кількості ядер меншої площі. Дистрофічні зміни у паренхімі печінки спостерігали, як правило, у центральній частині дольок. По периферії ці зміни були менш виражені. Ця закономірність характерна для обох досліджуваних груп.

Зміни, що спостерігали через 2 год, були більш виражені, ніж такі через 4 год. Це відмічено під час гістологічного і цитологічного дослідження. Можливо, це слід оцінювати як первинний вплив ішемії, яка посилює руйнівні процеси, процеси апоптозу в клітинах, чутливих до гіпоксії. У цей період також спостерігали активацію місцевих фагоцитуючих клітин.

У подальші строки зберігання печінки в консервуючих розчинах (через 4, 8 та 22 год) виявлені загальні риси та відмінності перебігу патологічних змін, спричинених ішемією. Кількість ядер в обох групах суттєво не відрізнялась. Через 2 год в обох групах кількість ядер зменшувалась на 2%, дещо менше у 2-й групі (мал. 1). Через 22 год кількість ядер у 1-й групі зменшувалась на 10%. Зміна кількості ядер на одиницю площі не є об'єктивним показником, він залежить від стану цитоплазми гепатоцитів. Збільшення кількості ядер через 2 год зумовлене дегідратацією та зменшенням розмірів

гепатоцитів, спаданням синусоїдних судин. Різке зменшення кількості ядер через 22 год зумовлене загальним зменшенням кількості гепатоцитів на одиницю площі внаслідок вираженої гідронічної дистрофії, набряку, вакуолізації клітин. Отже, кількість ядер на одиницю площі опосередковано відображає тяжкість дистрофічних змін у цитоплазмі гепатоцитів.



Мал. 1. Кількість ядер гепатоцитів при дії на тканину печінки консервуючих розчинів.

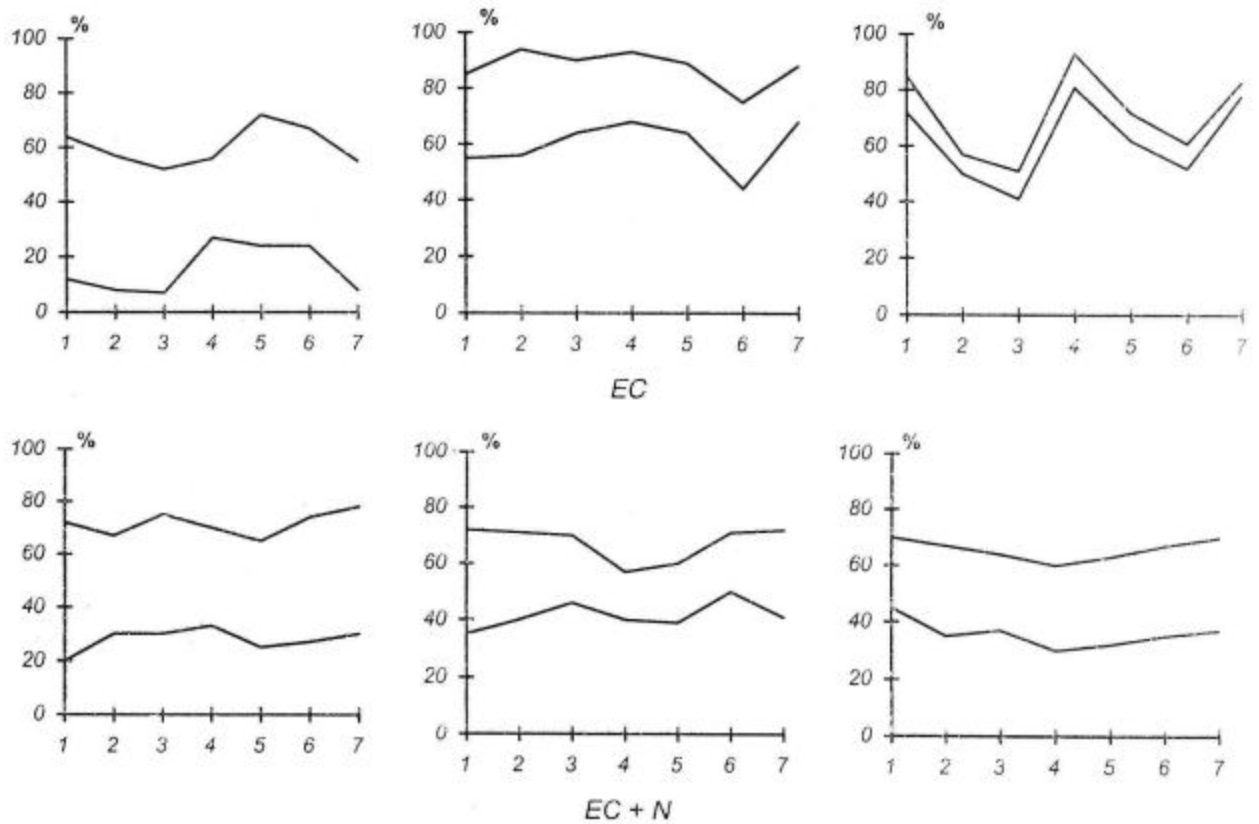
Більш демонстративне співставлення змін у паренхімі печінки за допомогою морфограм, які дозволяють дати не тільки загальну, а й індивідуальну оцінку кожному спостереженню (мал. 2). Прогресування дистрофічних змін при використанні розчину EC+N відбувалось повільніше, ніж при використанні розчину EC, і навіть через 22 год кількість добре збереженої паренхіми була значно більша.

Ще однією відмінною перебігу дистрофічних змін під дією мембранстабілізуючої добавки є те, що ішемія супроводжувалась дегідратацією клітин. Це проявлялось зменшенням розмірів гепатоцитів та печінкових балок. Ядра печінкових клітин зменшувались, ставали гіперхромними, інколи пікнотичними, виявляли поодинокі клітини з крупними світлими ядрами. При цьому клітини втрачали міжклітинні зв'язки, були круглими або овальними, внаслідок цього дисконкомплексована балка виглядала як розсин гіперхромних клітин.

Дистрофічні зміни відбувались не лише в цитоплазмі гепатоцитів, а перш за все в їх ядрах. Показником реактивних змін в ядрах є зміна їх розмірів (мал. 3). Дистрофічно-зміненими вважали ядра з рівномірним інтенсивним забарвленням, конденсованим хроматином, в яких не розрізнявся малюнок розподілу хроматину, характерний для гепатоцитів, а також ядра з блідим забарвленням, дрібними

грудками хроматину, розташованими під каріолею, в яких не розрізнявся типовий малюнок розподілу хроматину.

цитограм складали гепатоцити. При дослідженні в різні строки зберігання в різних консервуючих розчинах встановлено, що наявність непечинкових



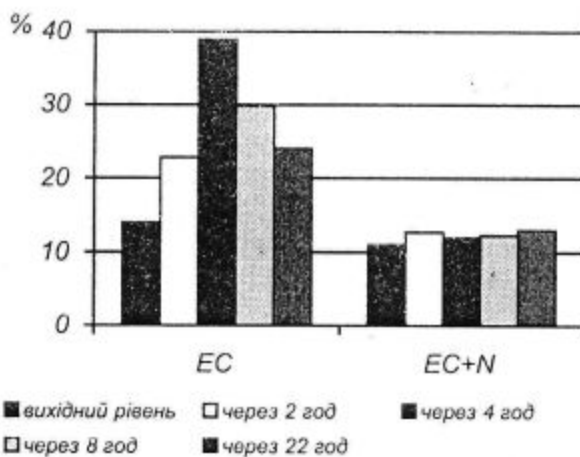
Мал. 2. Індивідуальні морфограми печінки щурів.

Кількість дистрофічно-змінених клітин протягом всього періоду дослідження була суттєво меншою у 2-й групі спостережень.

Після відмивання і в усі наступні строки спостереження елементи крові не виявляли. Клітини ендотелію та покривного епітелію жовчних проток також з часом спостерігали рідко. Основну частину

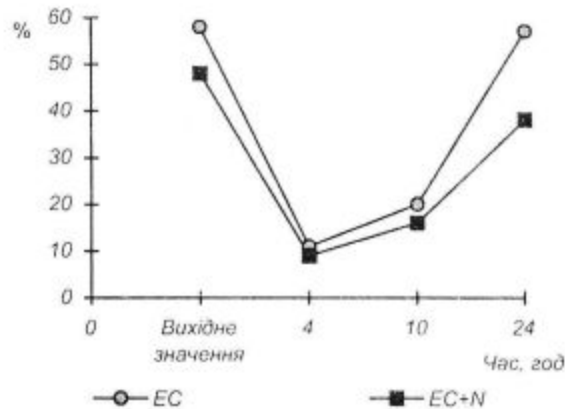
клітин у препаратах не має діагностичного значення. Деяку інформаційну цінність має дослідження комплексів гепатоцитів: при більш тривалій консервації відмічали поступове збільшення їх кількості та розмірів, вакуолізацію цитоплазми, її подальше руйнування (гідронічна дегенерація), пікноз ядер, що свідчило про прогресування дистрофічних змін у печінці. При використанні EC+N цей процес був більш повільним. Через 10 год кількість і розміри клітинних комплексів у 2-й групі суттєво не відрізнялися від таких через 2-4 год. Кількість двоядерних клітин була стабільною і становила 14-20% незалежно від терміну зберігання.

В цілому гепатоцити у відлітках були педиморфними: різних розмірів, оптичної щільності цитоплазми та ядер. Під час досліду відмічено збільшення кількості гепатоцитів з вираженими дистрофічними змінами в цитоплазмі. У деяких гепатоцитах цитоплазма була неоднорідною, вакуолізованою, з слабкими тинкторіальними властивостями. Лише окремі гепатоцити зберігали чіткі контури. Збільшення тривалості консервації в розчині EC до 8 год спричинувало зморщування цитоплазми, її інтенсивну вакуолізацію. Деякі гепатоцити зменшувались, посилювалась базофілія цито-



Мал. 3. Кількість дистрофічно-змінених ядер гепатоцитів при дії на тканину печінки консервуючих розчинів.

плазми. Через 22 год в цитологічних препаратах відмічено збільшення кількості клітинних вакуолей, які займали більший обсяг, внаслідок чого з'являлися окремі клітини з світлою пінистою ци-



Мал. 4. Кількість дистрофічно-змінених гепатоцитів залежно від виду консерванту.

топлазмой (мал. 4). Клітинна мембрана була більш деформованою майже до руйнування, з'являлися так звані "голі" ядра (без цитоплазми).

Морфофункціональний стан ядра – один з важливих показників життєздатності клітини. На початку ішемії в більшості ядер не було значних пошкоджень. Із збільшенням тривалості консервування з'являлися ядра з неправильними контурами, збіднені хроматином або пікнотичні, гіперхромні. Кількість "голих" ядер зростала, розміри їх зменшувались. Це може бути важливим орієнтиром оцінки тяжкості деструктивних змін. Незначна кількість незмінених гепатоцитів зумовлена не стільки їх відсутністю насправді, скільки тим, що саме дистрофічно-змінені клітини перш за все втрачають зв'язки з сусідніми клітинами, тому їх частіше виявляють у відбитках.

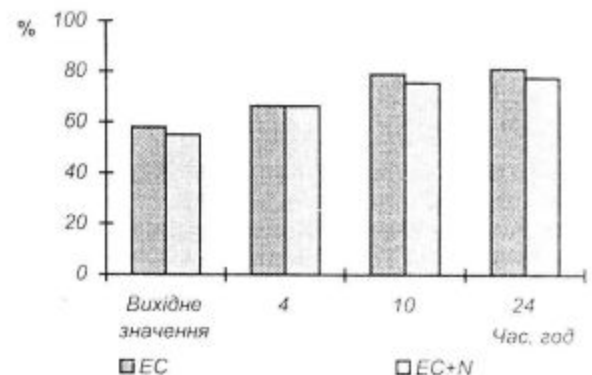
"Голі" ядра були різних розмірів. Площа їх становила 515–11212 ум. од. Найбільш чисельні малі

### Література

1. Шумаков В. И., Овчиненко П. А., Кириатовский В. И. Фармакологическая защита трансплантата. – М.: Медицина, 1993. – 231 с.
2. Belzer F. O., Southard J. H. Principles of solid-organ preservation by cold storage // *Transplantation*. – 1988. – Vol. 45, N 4. – P. 673–676.
3. Eurukava H., Todo S., Starzl T. E. Effect of cold ischemia time the early outcome of human hepatic allografts preservation with UW-solution // *Ibid.* – 1991. – Vol. 51, N 3. – P. 589.

"голі" ядра, до яких віднесені ядра площею від 515 до 1180 ум. од.

Початкова кількість малих "голих" ядер у 1-й та 2-й групах становила відповідно 55,3 та 55%, через



Мал. 5. Кількість малих "голих" ядер у динаміці постішемичного періоду залежно від виду консерванту.

4 год – 66,3 та 68,1%. Через 10 год вона збільшувалась до 79 та 75,6% (мал. 5).

При зберіганні печінки в консервуючому розчині протягом доби виникають значні порушення структури органа внаслідок прогресування дистрофічних змін у клітинах. Кількість деформованих клітин, які втратили цитоплазму, збільшувалась у 1-й групі до 81%, у 2-й групі – до 77,6%. Хоча різниця кількості "голих" ядер в обох групах недостатньо велика, її спостерігали в усіх дослідках. Це свідчило про стійку тенденцію до меншої вираженості дистрофічних змін під впливом мембранстабілізуючої добавки.

Отже, вплив стандартного консервуючого розчину EC та розчину EC+N на тканину печінки помітно відрізнявся: використання мембранстабілізуючої добавки сприяло стабілізації структури печінки, але зумовлювало дегідратацію деяких гепатоцитів. Оцінка життєздатності таких клітин потребує проведення подальших досліджень.

4. Okouchi Y., Tamaki T., Kozaki M. The optimal temperature for hypothermic liver preservation in the rat // *Ibid.* – 1992. – Vol. 54, N 6. – P. 1129–1130.
5. Sundberg R., Ar` Rajab A., Ahren B., Bengmark S. The functional effects of suppression of hypothermia-induced cell swelling in liver preservation by cold storage // *Cryobiology*. – 1991. – Vol. 28, N 2. – P. 150–158.