

# Состояние печени крыс при экспериментальном алкогольном поражении после введения эмбриональных нервных клеток

Г.А. КОВАЛЕВ<sup>1</sup>, Д.В. ЧЕРКАШИНА<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Харьковский национальный университет им. В.Н. Каразина

<sup>2</sup>Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

## Rat Liver State at Experimental Alcohol Damage after Embryonic Nerve Cell Introduction

G.A. KOVALYOV<sup>1</sup>, D.V. CHERKASHINA<sup>2</sup>

<sup>1</sup>V.N. Karazin Kharkov National University

<sup>2</sup>Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov

Этанол является прямым гепатотоксичным агентом и остается одной из основных причин поражения печени, при этом алкогольное поражение печени (АПП) у женщин развивается быстрее и протекает тяжелее. Для лечения АПП актуальна разработка новых терапевтических подходов с использованием эмбриональных тканей, эффективность применения которых уже доказана при лечении многих заболеваний. Учитывая системный характер влияния этанола на организм, в том числе выраженное токсическое воздействие на нервную систему, целью исследования явилось изучение состояния печени крыс при лечении экспериментального алкогольного поражения криоконсервированными эмбриональными нервными клетками (ЭНК).

В работе использовали 3-месячных белых беспородных крыс-самок, АПП моделировали, как описано нами ранее (Г.А. Ковалёв, А.Ю. Петренко, 2004), после чего животных переводили на малую дозу алкоголя (15%-й раствор этанола как единственный источник жидкости). Животным экспериментальной группы внутривенно вводили криоконсервированные ЭНК человека 9-12 недель гестации в дозе  $10^7$  клеток/100 г массы тела, контрольной – среду криоконсервирования в эквивалентном объеме. Спустя неделю выполняли исследование функционального состояния печени, а через две недели – прооксидантно-антиоксидантного баланса.

Функциональная активность печени является важнейшим показателем тяжести АПП и может быть оценена по сохранности детоксикационной и синтетической функций. Для характеристики детоксикационной функции печени исследовалась скорость метаболизма гексена. Синтетическая функция печени оценивалась на основании теста “протромбиновое время” и по содержанию альбумина в плазме крови. Длительное поступление этанола приводит к возникновению в печени оксидативного стресса, выраженность которого может характеризовать тяжесть протекающих деструктивных процессов. Для описания прооксидантного статуса клеток печени определяли базальный уровень ТБК-активных продуктов и интенсивность индуцированного перекисного окисления липидов (ПОЛ). Состояние антиоксидантной системы печени оценивали по изменению активности её основных ферментов – каталазы и глутатионпероксидазы. Статистическую обработку результатов осуществляли с использованием U-критерия Манна-Уитни ( $P \leq 0,05$ ).

Продолжительность гексеналового сна в опытной группе уменьшалась в 2,5 раза, в контрольной – достоверно не изменялась. Протромбиновое время в опыте снижалось в 1,9 раза, в контроле – в 1,2 раза. Содержание альбумина в плазме крови животных

Ethanol is a direct hepatotoxic agent and remains one of the basic causes of liver damage, at the same time the liver alcohol damage (LAD) in women proceeds more rapidly and severe. For LAD treatment the development of new therapeutic approaches using embryonic tissues, which efficiency has been already proved for many diseases treatment, is still actual. Taking into consideration a systemic character of ethanol effect on an organism, including manifested toxic effect of nervous system, the research aim was to study the state on rat liver when treating experimental alcohol damage with cryopreserved embryonic nerve cells (ENCs).

In the work we used 3-month white breedless female rats, LAD was modelled as we described previously (G.A. Kovalev, A.Yu. Petrenko, 2004), then animals were exposed to low alcohol dose (15% ethanol solution as the one source of liquid). Animals of experimental group were intravenously injected with cryopreserved human ENC's of 9-12 gestation week in dose of  $10^7$  cells/100g of body weight and cryopreservation medium in the same volume was done to those of the control group. A week later the liver functional state was investigated and in 2 weeks there was done for prooxidant-antioxidant balance.

Liver functional activity is the most important index of LAD severity and can be estimated by the integrity of detoxicative and synthetic functions. Rate of hexenal metabolism was investigated to characterise detoxicative function of liver. Synthetic function of liver was estimated basing on “prothrombin time” test and by albumin content in blood plasm. Long-term ethanol incoming results in oxidative stress occurrence in liver, which manifestation can characterise the severity of proceeding destructive processes. In order to describe prooxidant status of liver cells we determined a basal level of TBA-active products and induced lipid peroxidation (LPO) intensity. State of liver antioxidant system was estimated by a change in activity of its main enzymes: catalase and glutathione peroxidase. Results were statistically processed with the Mann-Whitney U-criterion ( $P \leq 0.05$ ).

Hexenal sleep duration in experimental group reduced in 2.5 times and did not statistically and significantly change in the control one. Prothrombin time in experiment decreased in 1.9 times and in 1.2 times in the control. Albumin content in blood plasm of experimental group animals increased in 1.9 times and in 1.3 for the control one. Basal level of TBA-active products in experimental group animal liver reduced in 2.5 times and in 1.6 for the control. Intensity of induced LPO in the experiment reduced in 2 times and did not statistically and significantly change in the control. Glutathione peroxidase activity in experimental group augmented in 1.9 times and in 1.2 in the control. Catalase

экспериментальной группы увеличивалось в 1,9 раза, контрольной – в 1,3 раза. Базальный уровень ТБК-активных продуктов в печени животных опытной группы понижался в 2,5 раза, в контрольной – в 1,6 раза. Интенсивность индуцированного ПОЛ в опыте уменьшалась в 2 раза, в контроле – достоверно не изменялась. Глутатионпероксидазная активность в опытной группе возрастала в 1,9 раза, в контрольной – в 1,2 раза. Каталазная активность в опытной группе увеличилась в 1,6 раза, контрольной – достоверно не изменялась.

Таким образом, внутривенное введение криоконсервированных ЭНК при экспериментальном АПП приводило к улучшению функционального состояния печени и торможению оксидативного стресса. Обсуждаются возможные механизмы лечебного действия ЭНК. Полученные результаты могут явиться основой для разработки новых методов лечения АПП.

activity in experimental group increased in 1.6 times and did not statistically and significantly change in the control.

Thus, intravenous introduction of cryopreserved ENC at experimental LAD resulted in the improvement of liver functional state and oxidative stress inhibition. Possible mechanisms of therapeutic effect of ENC are discussed. The results obtained can be the base to develop new methods for LAD treatment.

## **Исследование криозащитной активности эндоцеллюлярных криопротекторов в процессе криоконсервирования сперматозоидов собак**

М.И. ЕГОРОВ, Т.П. Линник, Т.С. ДЮБКО, А.П. БЕЛОНОЖКО  
*Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков*

### **Study of Cryoprotective Activity of Endocellular Cryoprotectants during Canine Spermatozoa Cryopreservation**

M.I. EGOROV, T.P. LINNIK, T.S. DYUBKO, A.P. BELONozhko  
*Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov*

При криоконсервировании сперматозоидов собак (СС) используется в качестве криопротектора глицерин. Низкая проникающая способность, показанная на некоторых биообъектах, может быть причиной осмотического шока, проявляющегося на спермиях собак при добавлении криозащитной среды к клеткам. Поэтому поиск альтернативного глицерину криопротектора, имеющего большую проникающую способность для данного вида клеток, является актуальной задачей.

Одним из физико-химических свойств веществ, способствующих высокой проникающей способности криопротекторов через мембраны, является их гидрофобность, характеризующаяся коэффициентом распределения в системе вода-неполярная фаза. В наших исследованиях были изучены криопротекторы с различным значением этого коэффициента. Исследовали криозащитную активность этиленгликоля, диметилсульфоксида, N,N-диметилформамида (DMFA), 1,2-пропандиола в концентрации 1 М в сравнении с глицерином. Кроме этого, была предложена криозащитная среда, содержащая вместо желтка куриных яиц яичный альбумин в концентрации 1%. Установлено, что самая высокая жизнеспособность СС как до, так и после криоконсервирования наблюдалась под защитой DMFA.

Для выяснения возможного механизма влияния яичного альбумина на жизнеспособность СС было исследовано взаимодействие альбумина с клетками, отмытыми от спермальной плазмы в среде, не содержащей ни желтка куриных яиц, ни белка, а также с модельными мультислойными липосомами из яичного фосфатидилхолина. Для этого применяли ковалентно меченый флуоресцентным красителем Tasman Green-404

During cryopreservation of canine spermatozoa (CS) glycerol is used as cryoprotectant. Low penetrating ability shown in some biological objects could be the reason of osmotic shock manifesting in canine spermatozoa when adding cryoprotective media to cells. Therefore search for a cryoprotectant as an alternative with higher penetrating ability for certain type of cells is an actual task.

One of physical and chemical properties of substances contributing to a high penetrating ability of cryoprotectants via membranes is their hydrophobicity characterizing with distribution coefficient in water-non-polar phase system. Our researches dealt with cryoprotectants with different values of this coefficient. There was investigated cryoprotective activity of ethylene glycol, dimethyl sulfoxide, N,N-dimethylformamide (DMFA), 1,2-propanediol under 1M concentration in comparison with glycerol. In addition there was proposed the cryoprotective medium containing 1% egg albumin instead of chicken egg yolk. The highest CS viability was established to be observed both before and after cryopreservation under DMFA protection.

To reveal a possible effect mechanism of egg albumin on CS viability there was researched the interaction of albumin and cells washed out of sperm plasma in the medium without both chicken egg yolk and white as well as with model multilayer liposomes derived from egg phosphatidyl choline. For this purpose there was used egg albumin which was covalent-labeled fluorescent dye Tasman Green-404 (TG-404) and obtained from the Institute of Single Crystals of the National Academy of Sciences of the Ukraine.

DMFA and ethylene glycol having higher when comparing with glycerol permeability coefficient via cell