

Показники окислювального метаболізму фрагментів печінки свиней та поросят після їх кріоконсервування в присутності поліетиленоксидів

С.Є. Гальченко

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків

Oxidative Metabolism Indices in Pigs and Piglets' Liver Fragments Following their Cryopreservation in Presence of Polyethylene Oxides

S.Ye. GALCHENKO

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of the Ukraine, Kharkov

Вивчали вплив кріоконсервування на збереження деяких показників біоенергетики фрагментів печінки свиней і поросят. Встановлено, що на 60-й хвилині після відігріву спостерігається відносна нормалізація метаболічних параметрів кріоконсервованих фрагментів печінки. На протяжні 2-ї години спостереження поступово втрачаються метаболічні властивості, притаманні даній тканині. У кріоконсервованих фрагментах ці процеси відбуваються швидше, ніж у контролі, але якісно не відрізняються. Цю закономірність необхідно мати на увазі при використанні фрагментів печінки як моделі або з іншою метою.

Ключові слова: фрагменти печінки, кріоконсервування, метаболізм.

Изучали влияние кріоконсервирования на сохранность некоторых показателей биоэнергетики фрагментов печени свиней и поросят. Установлено, что на 60-й минуте после отогрева наблюдается относительная нормализация метаболіческих параметров кріоконсервированных фрагментов печени. На протяжении 2-го часа наблюдения происходит постепенная потеря метаболіческих свойств, присущих данной ткани. В кріоконсервированных фрагментах эти процессы идут более быстрыми темпами, чем в контроле, но качественно не отличаются. Эту закономерность нужно иметь в виду при использовании фрагментов печени как модели или с другими целями.

Ключевые слова: фрагменты печени, кріоконсервирование, метаболізм.

The effect of cryopreservation on the integrity of some bioenergetic indices of pig and piglet liver fragments was studied. It was found that the relative normalisation of metabolic parameters of cryopreserved liver fragments is observed by 60 min after thawing. During the second hour of observation the gradual loss of metabolic properties of the tissue took place. In addition, these processes went in faster way in cryopreserved fragments than in the control, but they did not differ in quality. This phenomenon should be taken into consideration while using liver fragments as model or for other purposes.

Key-words: liver fragments, cryopreservation, metabolism.

Фрагменти ксеноорганів використовуються в клінічній практиці [1, 8], біологічних і медичних дослідженнях, а також для отримання препаратів з високою біологічною активністю, наприклад екстрактів, що містять тканинноспецифічні пептиди [4, 9]. Найбільш раціональним методом зберігання таких біологічних об'єктів є кріоконсервування. Використання відповідних технологій при кріоконсервуванні, які визначаються експериментально, дозволяє нейтралізувати негативний вплив фізико-хімічних факторів на біологічні об'єкти під час заморожування-відігріву, але повністю виключити його неможливо. При цьому самі фрагменти є складною біологічною системою, біоенергетика якої, перекисні процеси, синтетичні реакції і т.д. в значній мірі залежать від часу ішемії органа, методу підготовки біологічного матеріалу, розміру фрагментів і деяких інших факторів [6, 7].

Адреса для кореспонденції: Гальченко С.Є., Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, вул. Переяславська, 23, м. Харків, Україна 61015; тел.:+38 (057) 770-29-35, факс: +38 (057) 772-00-84, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

Xenoorgan fragments are known to be used in clinics [1, 8], biological and medical research, as well as for obtaining the preparations with high biological activity, for example, of extracts comprising the tissue specific peptides [4, 9]. Cryopreservation is known to be the most reasonable method for preserving such biological objects. The use of certain cryopreservation protocols which are determined experimentally, enables us to neutralize the negative effect of physico-chemical factors on biological objects during freeze-thawing, though we can not avoid it completely. The fragments themselves thereat are a combined biological system, which bioenergetics, peroxidative processes, synthetic reactions are found to depend considerably on the time of organ ischemia, the method of biological material preparation, fragments' size and some other factors [6, 7].

As in clinical practice there are mainly used the cell and tissue preparations derived from adult pig and

Address for correspondence: Galchenko S.Ye., Institute for Problems of Cryobiology&Cryomedicine of the Natl. Acad. Sci. of Ukraine, 23, Pereyaslavskaya str.,Kharkov, Ukraine 61015; tel.:+38 (057) 7722935, fax: +38 (057) 7720084, e-mail:cryo@online.kharkov.ua

У зв'язку з тим, що в клінічній практиці в основному використовуються клітинні та тканинні препарати з органів свиней і поросят [3, 11], в тому числі і кріоконсервовані, нами було досліджено вплив факторів кріоконсервування на збереження фрагментів печінки статевозрілих свиней (ФПС) та новонароджених поросят (ФПП) відразу після відігріву. При цьому було показано, що максимальне збереження фрагментів спостерігається при швидкостях охолодження 1 і 8000°C/хв [5, 10]. Але для того, щоб отримані препарати були спроможні виконувати свою функцію, важливо зберегти їх життєздатність в часі.

Метою даної роботи було визначення впливу кріоконсервування на збереження деяких показників біоенергетики ФПС і ФПП.

Матеріали і методи

Фрагменти печінки отримували продавлюванням її шматочків через решітку з отворами діаметром 0,8 мм, тричі відмивали фізіологічним розчином (рН 7,4) та додавали розчини кріопротекторів ПЕО-400 і ПЕО-1500 в кінцевій концентрації 10% у співвідношенні 1:1. Матеріал розфасовували в пластикові контейнери по 1 мл для заморожування зі швидкістю 1°C/хв і по 0,5 мл в контейнери з алюмінієвої фольги для заморожування зі швидкістю 8000°C/хв. Заморожували за допомогою програмного заморожувача УОП-6 виробництва СКТБ з ДВ ІПКіК НАН України (1°C/хв) і пристрою для заморожування біологічних об'єктів з великими швидкостями охолодження (8000°C/хв) [12]. Відігрівали на водяній бані з температурою 37°C. ПЕО-1500 відмивали фізіологічним розчином, а ПЕО-400 – розчином цукрози з концентрацією 0,250 моль/л з заміною їх на середовище Krebs-Рінгера. Інтенсивність дихання визначали полярографічним методом в нмоль O_2 /(хв×мг тканини). В ячейку полярографа, що містила 1 мл середовища Krebs-Рінгера, додавали 10-20 мг фрагментів і динаміку дихання реєстрували на самописі. Концентрація ДНФ становила 200 мкмоль/мл, аміталу – 2 мкмоль/мл [7].

Швидкість відновлення фериціаніду калію визначали спектрофотометрично при довжині хвилі 420 нм. Фрагменти поміщали в середовище Krebs-Рінгера, яке містило 1 ммоль фериціаніду калію. Після 20 хв інкубації при 37°C фрагменти видаляли і білки осаджували центрифугуванням у присутності трихлороцтової кислоти і вимірювали оптичну щільність надосаду. По її зменшенні розраховували швидкість відновлення фериціаніду калію в нмоль/(хв×мг тканини) [7].

Концентрацію ТБК-активних продуктів (ТБКАП), які дають кольорову реакцію з тиобарбітуровою

piglets' organs [3, 11], as well as the cryopreserved ones, we studied the effect of cryopreservation factors on liver fragments of mature pigs (MLF) and newborn piglets (NLF) right after thawing. The maximum keeping of the fragments was shown to occur in this case under the cooling rates of 1 and 8000°C/min [5, 10].

In order to make the obtained preparations capable of accomplishing their function it is crucial to maintain their viability in time. Our work was aimed to determine the cryopreservation effect on maintenance of certain bioenergetic indices in MLF and NLF.

Materials and methods

Liver fragments were obtained by squeezing its pieces through 0.8mm-opening net, thrice washed-out by physiological solution afterwards (pH 7.4) and added with the cryoprotectants solution (PEO-400 and PEO-1500) under final concentration of 10% in 1:1 ratio. The material was packed into 1ml plastic containers in order to freeze it with the rate of 8000°C/min. Freezing was accomplished using UOP-6 device produced by Special Designing Technical Bureau with Experimental Unit (Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine) and a freezing device for biological objects of high cooling rates (8000°C/min) [12]. Thawing was accomplished in water bath at 37°C. PEO-1500 was washed-out with physiological solution, the washing-out for PEO-400 was performed using sucrose solution of 0.250 mol/l concentration with changing it for Krebs-Ringer solution. Respiration intensity was measured polarographically in nmol of O_2 /min/mg of tissue. Into a polarograph cell, which comprised 1 ml of Krebs-Ringer solution there was added 10-20 mg of fragments, the respiration dynamics was recorded using self-recorder. DNP concentration made 200 μ mol/ml, the one of amytal was 2 μ mol/ml [7].

The rate of potassium ferricyanide recovery was detected spectrophotometrically at a wave length of 420nm. Fragments were placed into Krebs-Ringer solution, which comprised 1mMol of potassium ferricyanide. After a 20 min incubation at 37°C the fragments were removed and proteins sedimented by centrifugation in the presence of trichloroacetic acid and optic density of the sediment was measured. At its fall we calculated the restoration rate of potassium ferricyanide in nMol (min×mg of tissue) [7].

Concentration of TBA-active products which are known to give color reaction with thiobarbituric acid, was measured using a standard spectrophotometric method at a wave length of 532 nmol [2]. Reagents used in the work were of the quality of not lower than "chemically pure". Statistical processing was accomplished by a Student-Fisher's method.

кислотою, визначали спектрофотометрично при довжині хвилі 532 нм за стандартною методикою [2]. Реактиви, які використовувались в роботі, були кваліфікації не нижче ХЧ. Статистична обробка проводилась за методом Стюдента-Фішера.

Результати та обговорення

Процеси біологічного окислення займають центральне місце в метаболізмі клітин, і будь-які зовнішні фактори хімічної і фізичної природи можуть впливати на різні ланки окислювального метаболізму і, зрештою, призводити до зміни утилізації кисню клітинами і забезпечення їх енергією. Саме тому показники інтенсивності дихання використовуються в біохімічних, фізіологічних і фармакологічних дослідженнях як інтегральний показник стану біологічного об'єкта. Відомо, що окислювально-відновні та метаболічні властивості, які пов'язані з роботою дихального ланцюга, змінюються в часі [7].

Інтенсивність як ендогенного, так і в присутності ДНФ дихання ФПП в момент їх отримання значно вища, ніж ФПС (табл. 1). Це може бути пов'язане з часом між екстирпацією органа і отриманням з нього фрагментів. Кріоконсервування фрагментів

Results and discussion

The processes of biological oxidation are known to possess a central place in cell metabolism, any external factors of chemical and physical origin may affect different links of oxidative metabolism and cause finally the alteration of oxygen utilization by cells and energy supply. This is the reason why the respiration intensity indices are used in biochemical, physiological and pharmacological investigations as an integral index of a bioobject state. Oxidation-reduction and metabolic properties related to the functioning of a respiration chain are known to change in time [7].

Intensity of both endogenous NLF respiration and in the presence of DNF at the moment of their procurement was noted to be much higher than MLF (Table 1). This may be related to the time passed since an organ extirpation and obtaining its fragments. Cryopreservation of fragments causes a statistically true fall of these indices immediately after thawing at all the freezing regimens studied. The relationship of respiration and oxidative phosphorylation was noted to decrease as well. In 60 min the intensity of NLF respiration in control was noted to fall and become the same as in MLF. By this term the bioenergetics indices of cryopreserved fragments do not differ from those

Таблиця 1. Інтенсивність ендогенного (V_o) та в присутності ДНФ ($V_{\text{ДНФ}}$) дихання фрагментів печінки свиней і поросят (нмоль O_2 /(хв×мг тканини)) в залежності від умов кріоконсервування та часу інкубації

Table 1. Intensity of endogenous respiration (V_o) and the one in the presence of DNF (V_{DNF}) of pig and piglet liver fragments (nmol of O_2 /(min per mg of tissue) depending on cryopreservation conditions and incubation time

Кріопротектор та об'єкт Cryoprotectant and an object	Швидкість охолодження, °C/хв Cooling rate, °C/min	Час після відігріву, хв Time after thawing, min								
		5			60			120		
		V_o	$\frac{V_{\text{АНФ}}}{V_{\text{ДНФ}}}$	$\frac{V_{\text{АНФ}}}{V_{\text{ДНФ}}} / \frac{V_o}{V_o}$	V_o	$\frac{V_{\text{АНФ}}}{V_{\text{ДНФ}}}$	$\frac{V_{\text{АНФ}}}{V_{\text{ДНФ}}} / \frac{V_o}{V_o}$	V_o	$\frac{V_{\text{АНФ}}}{V_{\text{ДНФ}}}$	$\frac{V_{\text{АНФ}}}{V_{\text{ДНФ}}} / \frac{V_o}{V_o}$
Контроль, ФПС Control, MLF		0,54±0,03	1,30±0,12	2,41	0,50±0,04	1,20±0,11	2,40	0,44±0,04	0,66±0,04	1,50
ПЕО – 400, ФПС PEO – 400, MLF	1	0,31±0,02	0,43±0,03	1,39	0,43±0,03 ¹	0,95±0,07 ¹	2,21	0,31±0,02	0,38±0,03	1,22
	8000	0,35±0,04	0,53±0,04	1,51	0,41±0,04 ¹	0,98±0,09 ¹	2,39	0,32±0,02 ¹	0,45±0,04	1,41
ПЕО – 1500, ФПС PEO – 1500, MLF	1	0,33±0,03	0,36±0,03	1,09	0,47±0,04 ¹	1,03±0,09 ¹	2,19	0,30±0,02	0,38±0,01	1,25
	8000	0,37±0,04	0,44±0,03	1,20	0,42±0,03 ¹	0,92±0,08 ¹	2,19	0,29±0,02	0,37±0,02	1,27
Контроль, ФПП Control, NLF		0,72±0,06	2,21±0,02	2,81	0,51±0,05	1,22±0,10	2,39	0,48±0,04	0,67±0,05	1,39
ПЕО – 400, ФПП PEO – 400, NLF	1	0,34±0,03	0,41±0,03	1,21	0,45±0,04 ¹	1,04±0,09 ¹	2,36	0,36±0,03 ¹	0,46±0,05	1,29
	8000	0,48±0,04 ²	0,67±0,05	1,40	0,49±0,05 ¹	1,13±0,10 ¹	2,31	0,38±0,03 ¹	0,48±0,04	1,27
ПЕО – 1500, ФПС PEO – 1500, NLF	1	0,33±0,02	0,30±0,03	0,91	0,42±0,04 ¹	0,97±0,09 ¹	2,40	0,32±0,03	0,39±0,03	1,21
	8000	0,46±0,04 ²	0,58±0,05	1,21	0,48±0,04 ¹	1,18±0,11 ¹	2,41	0,30±0,03	0,37±0,02	1,23

Примітки: ¹ – відмінності статистично недостовірні в порівнянні з контролем, $p > 0,05$;

² – відмінності статистично достовірні в порівнянні зі швидкістю охолодження 1°C/хв, $p < 0,05$.

Notes: ¹ – no statistically significant differences comparing to the control, $p > 0.05$;

² – statistically significant differences comparing to the data for cooling rate of 1°C/hv, $p < 0.05$.

приводить до достовірного зменшення цих показників відразу після відігріву при всіх досліджених режимах заморожування. Меншим стає також сполучення дихання та окислювального фосфорилування. Через 60 хв інтенсивність дихання ФПП в контролі зменшується і стає такою ж, як і ФПС. У цей термін показники біоенергетики кріоконсервованих фрагментів не відрізняються від показників біоенергетики контрольного матеріалу і не залежать від швидкості охолодження. На 120-й хвилині в контролі ендогенне дихання практично не зменшується в порівнянні з 60-ю хвилиною. Але сполучення дихання і окислювального фосфорилування становиться значно меншим. У кріоконсервованих фрагментах зменшується не тільки цей показник, але достовірно меншою стає і інтенсивність ендогенного дихання. Це може бути пов'язане як з розвитком пошкоджень, отриманих клітинами при кріоконсервуванні, так і зменшенням ендогенних субстратів, необхідних для їх репарації. Адже репараційні процеси є енергозалежними і, можливо, енергетичні субстрати вичерпуються значно швидше, ніж в контролі.

Інгібітори окислювання НАДН-залежних субстратів, наприклад амітал, пригнічують дихання клітин і тканин. Однак частина дихання є амітал-резистентною, зокрема окислення сукцинату в дихальному ланцюгу. Аналіз аміталчутливої компоненти дихання в тканинних препаратах дозволяє отримати інформацію про відносний вклад НАД-залежного окислення для даної тканини та даного метаболічного стану. Таким чином, дослідження дії аміталу на НАД-залежну ділянку окислення дає інформацію про направленість метаболічного потоку в клітині. Ця інформація особливо важлива, якщо кріоконсервовані фрагменти будуть використовуватись у біохімічних або фармакологічних дослідженнях.

Було встановлено (табл. 2), що ця частина дихання в кріоконсервованих фрагментах практично не змінюється як після кріоконсервування, так і протягом 120 хв спостереження. Можна вважати, що співвідношення енергетичних потоків залишається незмінним, незважаючи на те що інтенсивність ендогенного дихання та сполучення дихання і окислювального фосфорилування зазнають значної зміни на 120-й хвилині спостереження.

Значення показників взаємодії різних шляхів споживання кисню в клітині є важливою характеристикою її функціонального стану. Незважаючи на те, що мембрана мітохондрії непроникна для НАД⁺ і НАДН, існує механізм обміну відновлювальними еквівалентами з цитоплазмою. Встановлена також

Таблиця 2. Вплив кріоконсервування фрагментів печінки на величину аміталзалежного дихання (% від ендогенного)

Table 2. Effect of liver fragments cryopreservation on amytd-dependent respiration value (percent of endogenous one)

Кріопротектор та об'єкт Cryoprotectant and an object	Швидкість охолодження, °C/хв Cooling rate, °C/min	Час після відігріву, хв Time after thawing, min		
		5	60	120
Контроль, ФПС Control, MLF		42	32	37
ПЕО – 400, ФПС PEO – 400, MLF	1	47	31	33
	8000	55	42	32
ПЕО – 1500, ФПС PEO – 1500, MLF	1	39	36	31
	8000	48	34	32
Контроль, ФПП Control, NLF		46	44	41
ПЕО – 400, ФПП PEO – 400, NLF	1	49	41	44
	8000	51	46	43
ПЕО – 1500, ФПП PEO – 1500, NLF	1	48	43	37
	8000	52	47	39

for the control material and are found to be independent upon the cooling rate. By the 120th minute the endogenous respiration in the control almost does not decrease comparing to the 60th min.

Dependence of respiration on oxidative phosphorylation was noted to be much lesser. In cryopreserved fragments not only this index decreases but also the intensity of endogenous respiration is getting lower. This may be connected both to the development of injuries in cells during cryopreservation, and to the decrease of endogenous substrates necessary for their reparation as the reparative processes are energy-dependent and the energetic substrates are thought to deplete far quickly, than in the control.

Oxidation inhibitors of NADH-dependent substrates, such as amytd are known to suppress cell and tissue respiration. Respiration however is partially amytd-resistant, in particular, succinate oxidation in a respiration chain. Analysis of amytd-sensitive respiration component in tissue preparations enables to get the information about a relative contribution of NADH dependent oxidation for such tissue and such metabolic state. Thus investigation of amytd effect on NAD-dependent oxidation site provides the information on metabolic flux in a cell. This information is extremely important if cryopreserved fragments are to be used in biochemical and pharmacological investigations.

We established (Table 2), that this part of respiration in cryopreserved fragments did not change both

наявність такого обміну з позаклітинним середовищем, що розширює для клітин можливість регулювання окислювально-відновлювального балансу в залежності від стану клітини, і цей шлях є альтернативним відновленню кисня за участю внутрішньоклітинних термінальних оксидаз. Обмін відновлювальними еквівалентами між клітиною і середовищем або між клітинами тканини може набувати особливого значення в умовах, коли перенесення електронів у дихальному ланцюгу мітохондрій на кінцевий акцептор – кисень в тій чи іншій мірі утруднене, наприклад, при пошкодженні (дезорганізації) ансамблю дихального ланцюга внаслідок кріоконсервування.

У модельних ситуаціях для дослідження обміну відновлювальними еквівалентами тканинних препаратів із зовнішнім середовищем використовується непроникаючий в клітини акцептор електронів – фериціанід калію, за допомогою якого можна оцінити активність НАДФН-регенеруючих систем гепатоцитів [7].

Одразу після відігріву матеріалу і протягом 60 хв швидкість відновлення фериціаніду калію фрагментами печінки не відрізняється від такої у контролі при всіх режимах кріоконсервування

following the cryopreservation and during 120 min of observation. As a result, the ratio of energetic fluxes remains unchanged despite the fact that the intensity of endogenous respiration and conjugation of respiration and oxidative phosphorylation undergo significant changes by the 12th min of observation.

Values of the interaction indices for various paths of oxygen uptake by a cell is thought to be an important characteristic of a functional state. Despite the fact that membrane mitochondria is impermeable for NAD⁺ and NADH, there is the exchange mechanism with cytoplasm with recovering equivalents. There has been also established such an exchange with extra-cellular medium, that is known to expand the opportunity for cells to regulate the oxidation-reduction balance depending on a cell state, and this way is an alternative one to oxygen reduction with participation of intracellular terminal oxidase. Exchange by reducing equivalents between a cell and environment or between the tissue cells may gain a special importance under the conditions when transferring the electrons in a respiration chain of mitochondria on a terminating acceptor, oxygen, was found to be complicated in a way, for example, when injuring (disorganizing) the respiration chain ensemble due to cryopreservation.

In model situations in order to investigate the reducing equivalents exchange in tissue preparations with the environment one uses non-penetrating into cells electron acceptor, potassium ferricyanide, due to which it is possible to estimate the NADPH activity of regenerating hepatocytes system [7].

Immediately after the material thawing and during 60 min afterwards the reducing rate of potassium ferricyanide by liver fragments does not differ from the one in control at any cryopreservation regimen (Table 3). By the 120th min of observation this index does not differ from the control only at fragments preservation in the presence of PEO-400. This fact may be related to the effect mechanism of this cryoprotectant. PEO-400 unlikely to PEO-1500 may partially penetrate into the material's cells and protect subcellular structures. Though it is more probable that at an equal percent concentration of these protectants the molar concentration of PEO-400 is 3.8 times higher, and due to this the greater dehydration occurs while equilibrating with cryoprotectant. This is the reason why a smaller fragments' injury occurs. Activation of lipid peroxidation processes is known to be one of the most dangerous results of cryopreservation, causing cell membranes, also mitochondrial ones, and therefore cell energy supply is impaired and the chance of their reparation, and mitochondria themselves, is getting lower. In addition, during

Таблиця 3. Вплив кріоконсервування фрагментів печінки на швидкість відновлення ними фериціаніду калію (нмоль/хв×мг тканини)

Table 3. Cryopreservation effect of liver fragments on the rate of potassium ferricyanide reduction (nmol/min per mg of tissue)

Кріопротектор та об'єкт Cryoprotectant and an object	Швидкість охолодження, °C/хв Cooling rate, °C/min	Час після відігріву, хв Time after thawing, min		
		5	60	120
Контроль, ФПС Control, MLF		0,29±0,02	0,32±0,04	0,36±0,03
PEO – 400, ФПС PEO – 400, MLF	1	0,23±0,01	0,40±0,04	0,42±0,04
	8000	0,27±0,02	0,37±0,03	0,47±0,04
PEO – 1500, ФПС PEO – 1500, MLF	1	0,22±0,01	0,38±0,03	0,52±0,03*
	8000	0,24±0,02	0,34±0,04	0,59±0,05*
Контроль, ФПП Control, NLF		0,22±0,02	0,27±0,03	0,33±0,03
PEO – 400, ФПП PEO – 400, NLF	1	0,19±0,01	0,30±0,03	0,47±0,03*
	8000	0,15±0,02	0,26±0,02	0,44±0,04
PEO – 1500, ФПП PEO – 1500, NLF	1	0,15±0,01	0,32±0,03	0,46±0,04*
	8000	0,17±0,01	0,30±0,03	0,49±0,05*

Примітка: * – відмінності статистично достовірні в порівнянні з контролем, p<0,05.

Note: * – statistically significant differences comparing to the control, p<0.05.

(табл. 3). На 120-й хвилині спостереження цей показник не відрізняється від контролю тільки при кріоконсервуванні фрагментів у присутності ПЕО-400, що може бути пов'язано з механізмом дії цього кріопротектора. ПЕО-400 на відміну від ПЕО-1500 може частково проникати в клітини матеріалу і таким чином захищати субклітинні структури. Але більш вірогідно, що при однаковій відсотковій концентрації цих протекторів молярна концентрація ПЕО-400 в 3,8 рази більша, і завдяки цьому досягається більше збезводнення матеріалу при його еквілібрації з кріопротектором. І саме тому спостерігається менше пошкодження фрагментів.

Одним з найбільш небезпечних наслідків консервування є активація процесу перекисного окислення ліпідів, під час якого пошкоджуються мембрани клітин, в тому числі і мітохондріальні, а отже страждає енергозабезпечення клітин і зменшуються можливості їх репарації, в тому числі і самих мітохондрій. Крім того, у процесі дезактивації перекисів значну роль відіграє глутатіон. Він міститься практично в усіх тканинах, а особливо велика кількість в печінці, головним чином у відновленій формі [7]. Його відновлення забезпечується комплексом ферментів глутатіонредуктаза-глутатіонпероксидаза. А субстратом глутатіонредуктази є НАДФН, який утворюється в різних метаболічних шляхах клітини, і отже при цьому також використовуються енергетичні ресурси клітин.

Той факт, що кріоконсервування активує процеси перекисного окислення ліпідів в фрагментах печінки, підтверджують дані, наведені в табл. 4. Вони свідчать, що накопичення ТБКАП іде більш швидкими темпами в кріоконсервованих фрагментах. Хоча на 60-й хвилині після відігріву в фрагментах, кріоконсервованих під захистом ПЕО-400, в окремих випадках цей показник і не перевищує контрольних величин.

Висновки

На 60-й хвилині спостерігається відносна нормалізація метаболічних параметрів кріоконсервованих фрагментів печінки. На протязі 2-ї години поступово втрачаються метаболічні властивості, притаманні даній тканині, у зв'язку зі старінням препарату. Причому в кріоконсервованих фрагментах ці процеси відбуваються більш швидкими темпами, ніж в контролі, але якісно не відрізняються. Цю закономірність необхідно мати на увазі при використанні фрагментів печінки як моделі або з іншою метою.

Таблиця 4. Концентрація ТБКАП (нмоль/мг тканини) в фрагментах печінки в залежності від умов кріоконсервування та часу інкубації

Table 4. TBAAP concentration (nmol/mg of tissue) in liver fragments depending on cryopreservation conditions and incubation time

Кріопротектор та об'єкт Cryoprotectant and an object	Швидкість охолодження, °C/хв Cooling rate, °C/min	Час після відігріву, хв Time after thawing, min		
		5	60	120
Контроль, ФПС Control, MLF		5,6±0,5	6,9±0,4	7,7±0,6
ПЕО-400, ФПС PEO-400, MLF	1	7,5±0,7*	13,9±1,1	18,8±1,3
	8000	7,4±0,6*	9,4±0,9*	13,3±1,2
ПЕО-1500, ФПС PEO-1500, MLF	1	7,1±0,6*	12,8±0,9	21,0±1,7
	8000	6,5±0,4*	10,6±0,8	17,5±1,4
Контроль, ФПП Control, NLF		5,1±0,4	7,2±1,1	7,8±0,5
ПЕО-400, ФПП PEO-400, NLF	1	7,7±0,4	10,8±1,1*	14,7±1,9
	8000	6,3±0,6*	9,7±1,0*	22,8±1,7
ПЕО-1500, ФПП PEO-1500, NLF	1	7,9±0,7	13,2±0,9	23,2±1,7
	8000	6,8±0,6*	11,3±0,8	19,2±1,5

Примітка: * – відмінності статистично недостовірні в порівнянні з контролем, $p > 0,05$.

Note: * – the differences are not statistically significant comparing to the control, $p > 0.05$.

the process of peroxide disactivation an important role is played by glutathione. It is comprised by nearly all the tissues, especially liver has its large amount, mostly in a reduced form [7]. Its reduction is provided by glutathione reductase-glutathione peroxidase complex of enzymes. NADPH, which is formed in various cell metabolic ways, is known to be glutathione reductase substrate, and therefore cell energy resources are used thereat as well.

The fact that cryopreservation activates the LPO processes in liver fragments is proved by the data of Table 4, which testify to the TBAAP accumulation occurring more rapidly in the cryopreserved fragments. Although by the 60th minute after thawing in the fragments cryopreserved under PEO-400 protection this index was shown not to exceed the control values.

Conclusions

By the 60th min we observed a relative normalization of metabolic parameters of liver cryopreserved fragments. During the 2nd hour the metabolic parameters of this tissue were shown to fall gradually because of the preparation aging. Interestingly that in cryopreserved fragments these processes were found

Література

1. Анастасій Л.В., Малижєв В.О. Проблеми та шляхи їх подолання при ксенотрансплантації ендокринних органів і клітин // Трансплантологія.– 2000.– Т. 1, №1.– С.138-140.
2. Арутюнян А. В., Дубинина Е.Е., Зыбина Н.Н. Методы оценки свободнорадикального окисления и антиоксидантной системы организма: Метод. рекомендации.– СПб.: ИКФ Фолиант, 2000.– 104 с.
3. Бондаренко Т.П., Божок Г.А., Алабедаькарім Н.М., Абу-Жаяб Салех. Вплив диметилсульфоксиду та кріоконсервування на функціональні характеристики органної культури сім'яників // Пробл. ендокринології.– 2003.– №3.– С. 61-66.
4. Гальченко С.Е., Белочкіна І.В., Тининика Л.М., Сандомирський Б.П. Вплив екстрактів підшлункової залози і печінки свиней на щурів з експериментальними патологіями відповідних органів // Трансплантологія.– 2003.– Т. 4, №1.– С. 68 -70.
5. Гальченко С.Е., Мамонтова А.В., Тыныныка Л.Н., Сандомирський Б.П. Влияние крיוконсервирования на интенсивность дыхания фрагментов ксеноорганов // Пробл. криобиологии.– 1998.– №3.– С. 45-48.
6. Грищенко В.И., Чуйко В.А., Пушкарь Н.С. Крיוконсервация тканей и клеток эндокринных органов.– Киев: Наук. думка, 1993.– 242 с.
7. Лукьянова Л.Д., Балмуханов Б.С., Уголев А.Т. Кислород-зависимые процессы в клетке и ее функциональное состояние.– М.: Наука, 1982.– 301 с.
8. Лучицький Є.В., Кобяков С.К., Зубкова Г.А. та ін. Імуногенність та функціональна активність органної ксенокультури сім'яників // Трансплантологія.– 2000.– №1.– С. 159-160.
9. Сандомирський Б.П., Бызов В.В., Иванов Л.В., Гальченко С.Е. Некоторые биофармацевтические свойства экстракта крיוконсервированных фрагментов ксеноселезенки // Фармаком.– 2002.– №2.– С. 78-82.
10. Сандомирський Б.П., Гальченко С.Е., Тыныныка Л.Н. Влияние условий крיוконсервирования на сохранность фрагментов печени свиней и поросят // Пробл. медич. науки та освіти.– 2003.– №2.– С. 46-48.
11. Турчин І.С. Проблема трансплантації культур клітин і тканин залоз внутрішньої секреції хворим з різними формами ендокринопатії // Ендокринологія.– 1996.– Т.1, №2.– С. 6-13.
12. Пат. 1655426 РФ, МКИ А01/00. Устройство для замораживания биологических объектов / В.И. Грищенко, В.Ф. Тарасов, С.Е. Гальченко, Ю.С. Парасчук, Е.Н. Черныш; № 3875501; Заявл. 18.04.85; Опубл. 15.06.91; Бюл. № 22.

Надійшла 17.06.2004

to occur in quicker rates than in the control, thought with no qualitative difference. This regularity should be considered when using liver fragments as a model or with any other aim.

References

1. Anastasij L.V., Malizhev V.O. Problems and ways of solving them at xenotransplantation of endocrine organs and cells // Transplantologija.– 2000.– Vol.1.– P. 138-140.
2. Arutyunyan A.V., Dubinina E.E., Zybina N.N. Evaluation methods for free radical oxidation and antioxidative system of an organism: Method. Recommendations.– SPb.: Foliant, 2000.– 104 p.
3. Bondarenko T.P., Bozhok G.A., Alabedalkarim N.M., Abu-Zhayab S. Effect of DMSO and cryopreservation on functional characteristics of testes organ cultures// Problems of endocrinology.– 2003.– N3.– P. 61-66.
4. Galchenko S.E., Belochkina I.V., Tynnyka L.N., Sandomirsky B.P. Effect of pancreas and liver extracts on rats with experimental pathologies of these organs // Transplantologija.– 2003.– Vol.4, N1.– P. 68-70.
5. Galchenko S.E., Mamontova A.V., Tynnyka L.N., Sandomirsky B.P. Effect of cryopreservation on the respiration intensity of xenoorgan fragments // Problems of Cryobiology.– 1998.– N3.– P. 45-48.
6. Grischenko V.I., Chujko V.A., Pushkar N.S. Tissue and endocrine organs cell cryopreservation.– Kiev: Nauk. Dumka, 1993.– 242 p.
7. Lukyanova L.D., Balmukhanov B.S., Ugolev A.T. Oxygen-dependent processes in cell and its functional state.– Moscow: Nauka, 1982.– 301 p.
8. Luchytsky E.V., Kobayakov S.K., Zubkova G.A. et al. Immunogeneity and functional activity of testes organ xenoculture // Transplantologija.– 2000.– N1.– P. 159-160.
9. Sandomirsky B.P., Byzov V.V., Ivanov L.V., Galchenko S.E. Some biopharmaceutical properties of the extract of cryopreserved xenospleen fragments // Farmacom.– 2002.– N2.– P. 78-82.
10. Sandomirsky B.P., Galchenko S.E., Tynnyka L.N. Effect of cryopreservation conditions on the integrity of pig and piglets' liver fragments // Probl. Med. Nauki ta Osvity.– 2003.– N2.– P. 46-48.
11. Turchin I.S. Problem of cell and tissue culture transplantation of endocrine glands to the patients with various endocrinopathy forms // Endokrinologia.– 1996.– Vol.1, N2.– P. 6-13.
12. Patent of Russia, N 1655426, MKI A01/00. Freezing device for biological objects. V.I. Grischenko, V.F. Tarasov, S.E. Galchenko, Yu.S. Paraschuk, E.N. Chernysh, N3875501; Accepted in 18.04.85; Issued in 15.06.91; Bul. N22.

Accepted in 17.06.2004