

Энергетическое состояние печени крыс при краткосрочном гипотермическом хранении

UDC 577.121.7.085.2:615.041.41

E.N. TKACHEVA, O.A. SEMENCHENKO, A.YU. SOMOV, A.YU. PETRENKO*

Rat Liver Energetic State Under Short-Term Hypothermic Storage

Изучали влияние предварительной обработки животных цитозолем фетальных тканей на функциональное состояние митохондрий и содержание АТФ в изолированной печени крыс при краткосрочном гипотермическом хранении. Показано, что предобработка животных цитозолем фетальных тканей приводит к достоверному повышению содержания АТФ в печени после 1 часа гипотермического хранения изолированного органа, а также увеличению скорости сукцинат-зависимого дыхания в состоянии V_3 и V_4 по Чансу. Скорости дыхания в присутствии малата и глутамата не отличались от контрольных значений.

Ключевые слова: цитозоль фетальных тканей, гипотермическое хранение, митохондрии, субстраты дыхания.

Вивчали вплив попередньої обробки тварин цитозолем фетальних тканин на функціональний стан мітохондрій і вміст АТФ в ізольованій печінці шурів після короткочасного гіпотермічного зберігання. Показано, що попередня обробка тварин цитозолем фетальних тканин приводить до достовірного підвищення вмісту АТФ у печінці після 1 години гіпотермічного зберігання ізольованого органа, а також збільшення швидкості сукцинат-залежного дихання в стані V_3 і V_4 по Чансу. Швидкості дихання в присутності малату і глутамату не відрізнялися від контрольних значень.

Ключові слова: цитозоль фетальних тканин, гіпотермічне зберігання, мітохондрії, субстрати дихання.

The effect of pretreatment of rats with fetal tissue cytosol on mitochondrial functional state and ATP content in isolated liver under short-term hypothermic storage has been studied. Animal pretreatment with fetal tissue cytosol was shown to result in a statistically significant increase in ATP content in an isolated liver following 1 hr of organ hypothermic storage as well as in succinate-dependent respiration rate rise in V_3 and V_4 state according to Chance. Respiration rate in malate and glutamate presence did not differ from the control values.

Key-words: fetal tissue cytosol, hypothermic storage, mitochondria, respiratory substrates.

Трансплантация печени является радикальным способом лечения терминальных состояний, связанных с печёночной недостаточностью. Известно, что для успешного исхода трансплантации необходимы сохранение жизнеспособности и восстановление функциональной активности органа после гипотермического хранения. Создание новых консервирующих сред позволило улучшить результаты хранения печени, однако полностью не решило проблем ее трансплантации. Несмотря на высокую эффективность растворов, безопасный предел холодовой ишемии органа не превышает 18 ч [1].

Известно, что одним из важнейших показателей негативного влияния охлаждения и гипоксии является нарушение энергетической функции печени. Подавление синтеза энергии в условиях дефицита кислорода, приводящее к падению уровня внутриклеточного АТФ и сопряжённому торможению энергозависимых процессов, — причина многих функционально-метаболических нарушений, характерных для гипоксии [2]. Перечисленные факты определяют исключитель-

Liver transplantation is an essential approach to treat terminal states related to hepatic failure. Viability preservation and recovery of organ functional activity after hypothermic storage (HS) are necessary for successful transplantation outcome. Creating new preservation media enabled to improve the results of liver storage, but did not completely solve the problem of its transplantation. However, in spite of a high solution efficiency, a safe limit for organ cold ischemia does not exceed 18 hrs [1].

One of the most important indices of cooling and hypoxia negative effects is known to be the disturbance of liver energetic function. Suppression of energy synthesis under oxygen deficit conditions, resulting in a fall of intracellular ATP level and coupling inhibition of energy-dependent processes is the cause for many functional and metabolic disorders being typical for hypoxia [2]. The mentioned facts determine an exceptional importance of energetic homeostasis maintaining and preserving problem under hypothermia.

Preliminary preparing of a donor's organism via introducing different biologically active substances *in vivo* prior to liver isolation and following HS with

Институт проблем криобиологии и криомедицины
НАН Украины, г. Харьков

* Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию:
ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: +38
(057) 373-41-35, факс: +38 (057) 373-30-84, электронная почта:
cryo@online.kharkov.ua

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

* To whom correspondence should be addressed: 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.: +380 57 373 4135, fax: +380 57 373 3084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

ную важность проблемы поддержания и сохранения энергетического гомеостаза в гипотермических условиях.

Перспективным направлением исследований в этой области является предварительная подготовка организма донора путём введения различных биологически активных веществ *in vivo* до изоляции печени и последующего гипотермического хранения с целью улучшения ее функционального состояния в период холодовой ишемии.

В работах нашей лаборатории было показано, что предобработка крыс цитозоном фетальных тканей (ЦФТ) за 4 ч до изоляции печени нормализует проокислительно-антиокислительное равновесие в органе при гипотермическом хранении [5], однако механизмы реализации действия ЦФТ остаются не выясненными.

Цель данной работы – изучение влияния предварительной обработки животных ЦФТ на функциональное состояние митохондрий и содержание АТФ в изолированной печени крыс при краткосрочном гипотермическом хранении.

Материалы и методы

Для моделирования гипотермического хранения печени использовали белых беспородных крыс-самок массой 200–250 г, которых содержали в стандартных условиях вивария. Манипуляции с животными проводились в соответствии с правилами “Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей” (Страсбург, 1985).

Цитозоль фетальных тканей получали при помощи ультрацентрифугирования гомогената мягких тканей (105000 г, 1,5 ч). Все работы выполняли в стерильных условиях на холоде; ЦФТ хранили при температуре -18°C (в условиях морозильной камеры). Стандартизация проб проводилась по содержанию белка ($1 \pm 0,25$ мг/мл).

Опытной группе крыс ЦФТ вводили в бедренную вену за 4 ч до изоляции печени в дозе 0,3 мл/100 г массы [5], контрольной группе – равный объем физиологического раствора.

В качестве консервирующей среды был использован сахарозо-содержащий раствор (ССР), разработанный в Институте проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины [6]. Для гипотермического хранения брюшную полость животных вскрывали, печень отмывали от крови и насыщали консервирующим раствором через портальную вену *in situ* со скоростью потока 20–30 мл/мин. Орган осторожно извлекали, переносили в пластиковые бюксы, наполненные ССР, и хранили 1 ч в бытовом холодильнике при 4°C . После этого на добавочную долю печени накладывали лигатуру и отрезали небольшой фрагмент органа для опреде-

the aim to improve its functional state within the cold ischemia period is a perspective research direction in this field.

Our laboratory researches have demonstrated that a rat pretreatment with fetal tissue cytosol (FTC) 4 hrs before liver isolation normalises a pro-oxidant-antioxidant organ balance under HS [5], however the mechanisms of FTC effect realising have still remained unclear.

This research is aimed to study the effect of animal pretreatment with FTC on functional state of mitochondria and ATP content in isolated rat liver under a short-term HS.

Materials and methods

White breedless female rats of 200–250 g, kept under the standard vivarium conditions were used for liver HS modelling. Manipulations with animals were carried out according to the statements of the “European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes” (Strasbourg, 1985).

Fetal tissue cytosol (FTC) was obtained using ultracentrifugation of soft tissue homogenate (105000 g, 1.5 hrs). All the works were performed under sterile conditions on cold; FTC was stored in a freezing chamber at -18°C and samples were standardised according to the protein content in samples (1 ± 0.25 mg/ml).

In the experimental group FTC was introduced into a femoral vein prior to 4 hrs of liver isolation in 0.3 ml/100 g mass dose [5], for the control group the same volume of physiological solution was administered.

Sucrose-based solution (SBS), designed at the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine was used as a preservation medium [6]. For HS animal abdominal cavity was dissected, liver was washed-out of blood and saturated with a cooled preservation solution via *v. porta in situ* with 20–30 ml/min flow rate. Organ was thoroughly removed and transferred into the plastic SBS-filled weighting cup and stored for 1 hr at 4°C on ice. Afterwards a ligature was put on an accessory liver lobe and a small fragment was cut to determine ATP content according to the method [7] with “Sigma” express-kit (USA).

Liver mitochondria were isolated with the method of differentiated centrifugation [4], using the 10mM Tris-HCl buffer, containing 0.3M sucrose and 1mM EDTA as isolation medium.

Respiratory parameters of mitochondria were evaluated using the Clark’s closed platinum electrode in a 1 ml thermostated well at 26°C with PC-connected “Rank Brother” polarograph (Great Britain). For polarographic measurements we used the following medium: 30 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4), containing

ления концентрации АТФ по методу [7] с помощью экспресс-набора ("Sigma", США).

Митохондрии печени выделяли с помощью дифференциального центрифугирования [4], используя в качестве среды выделения 10 мМ трис-НСl буфер, содержащий 0,3 М сахарозы и 1мМ ЭДТА.

Оценка дыхательных параметров митохондрий проводилась с помощью закрытого платинового электрода Кларка в термостатируемой ячейке объёмом 1 мл при 26°C на полярографе "Rank Brother-20" (Великобритания), соединенном с персональным компьютером. В качестве среды для полярографических измерений использовали 30 мМ трис-НСl буфер (рН 7,4), содержащий 200 мМ маннита, 50 мМ сахарозы, 1мМ ЭДТА, 10 мМ KH_2PO_4 .

Добавляемая в ячейку полярографа суспензия митохондрий содержала 1,5-2,5 мг белка. Субстратами дыхания служили малат (5 мМ) и глутамат (5 мМ) или сукцинат (8 мМ). Окислительное фосфорилирование инициировали добавкой АДФ (250 мкМ), разобщение дыхания и фосфорилирования вызывали 2,4-динитрофенолом (100 мкМ). При использовании в качестве субстрата сукцината 1-й участок дыхательной цепи блокировали ротеноном (1 мкМ). Показатели скорости потребления кислорода рассчитывали с помощью прикладного программного обеспечения и выражали в нмоль O_2 /мг белка за 1 мин.

Концентрацию белка определяли биуретовым методом [12] с помощью набора ("Sigma", США).

Полученные результаты обрабатывали на персональном компьютере с помощью специализированных программ. Для определения достоверности данных использовали параметрический метод статистического анализа (t-критерий Стьюдента). Результаты выражали в виде $M \pm m$. Достоверно отличными считали результаты при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Содержание АТФ в печени на момент ее изоляции достоверно не отличалось в контрольной и опытной группах и составляло 5,5-6,5 мкмоль/г ткани (рисунок). После 1 ч гипотермического хранения наблюдалось 2-кратное снижение уровня АТФ в контрольной группе по сравнению с исходным значением ($p < 0,05$). В то же время после предобработки животных ЦФТ (опытная группа) уровень АТФ сохранялся.

В таблице представлены дыхательные параметры изолированных митохондрий печени крыс до и после гипотермического хранения органа. Из приведенных данных видно, что митохондрии, выделенные из печени до холодового хранения,

200 мМ mannitol, 50 мМ sucrose, 1 мМ EDTA and 10 мМ KH_2PO_4 .

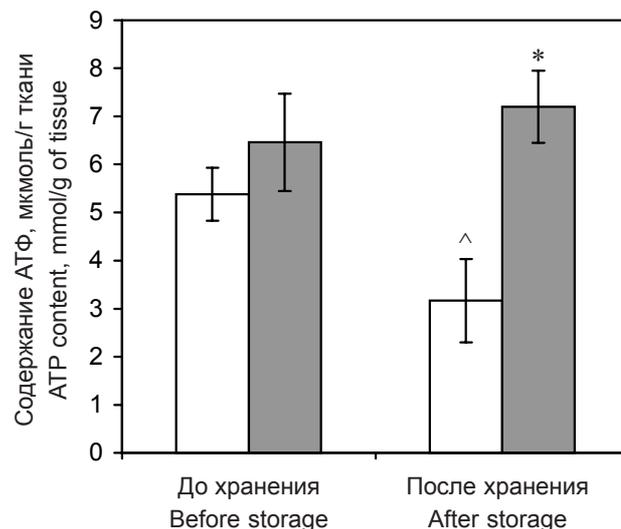
The mitochondria suspension, added into a polarograph well contained 1.5-2.5 mg of protein. Either malate (5 mM) and glutamate (5 mM) or succinate (8 mM) served as respiration substrates. Oxidative phosphorylation was initiated with ADP adding (250 μM), respiration and phosphorylation uncoupling was done with 2,4-dinitrophenol (100 μM). When using succinate as a substrate the 1st site of respiratory chain was blocked with rotenone (1 μM). Rates of oxygen consumption were calculated using the applied software and expressed in nmol O_2 /mg of protein per 1 min.

Protein concentration was determined by biuretic method [12] using "Sigma" kit (USA).

The results obtained were PC processed using the special software. In order to determine statistical significance of data we used a parametric method of statistical analysis (Student's t-criterion). Results were expressed as $M \pm m$. The results at $p < 0.05$ were considered as statistically and significantly different.

Results and discussion

ATP content in liver for the moment of its isolation was not significantly different in the control and experimental groups and was made about 5.5-6.5 $\mu\text{mol/g}$ tissue (Figure). After 1 hr hypothermic storage a 2-fold reduction of ATP level in the control group compared to the initial value ($p < 0.05$) was observed. At the same time after animals' pretreatment with FTC (experimental group) the ATP level was kept.



Содержание АТФ в печени до и после 1 ч гипотермического хранения: □ – контроль; ■ – опыт; * – $p < 0,05$ по отношению к контролю; ^ – $p < 0,05$ по отношению к значениям до хранения.

ATP content in liver prior to and after 1 hr hypothermic storage: □ – control; ■ – experiment; * – $p < 0.05$ as compared to the control; ^ – as compared to the data before storage

характеризовались низкой скоростью дыхания в энергетическом состоянии V_4 по Чансу на субстратах малат+глутамат и сукцинат в контрольной и опытной группах. Добавка АДФ увеличивала скорость поглощения кислорода, что свидетельствует о высокой сопряженности процессов дыхания и окислительного фосфорилирования, однако достоверных отличий между группами не наблюдалось. Показатели дыхательного контроля (ДК) на субстратах малат+глутамат и сукцинате в двух группах также достоверно не отличались.

После 1 ч гипотермического хранения печени наблюдалось достоверное увеличение скорости дыхания митохондрий в состоянии V_3 и V_4 по Чансу в опытной группе животных в присутствии субстрата дыхания второго комплекса – сукцината (таблица). В присутствии малата и глутамата данные показатели не отличались от контрольных значений. Дыхательный контроль в присутствии субстратов 1- и 2-го комплексов достоверно не отличался между группами и оставался на уровне значений, полученных до гипотермического хранения печени.

Известно, что основным источником синтеза АТФ в клетке при нормальных условиях является гликолиз. Согласно литературным данным гликолитическая наработка АТФ в условиях гипотермии считается недостаточной для поддержания пула высокоэнергетических адениновых нуклеотидов [9]. Кроме того, чрезмерная активация гликолиза сопровождается развитием лактатного ацидоза, нарушением работы многих внутриклеточных ферментов и ионным дисбалансом [3]. В этих условиях “поставщиками” энергии являются окислительно-восстановительные процессы, протекающие в митохондриальной дыхательной цепи [2]. Известно, что при гипоксии НАД-зависимые субстраты полностью восстановлены и окисляться не могут. Вместе с тем имеется возможность для окисления ФАД-зависимых субстратов, позволяющая сохранить сопрягающую функцию митохондрий [3].

Указанные изменения реакции компонентов дыхательной цепи на гипоксию приводят к усиленному окислению сукцината, поскольку сукцинатдегидрогеназа, в отличие от других дегидрогеназ, является ФАД-зависимым ферментом, активность которого не лимитируется соотношением НАД/НАДН. Показано, что при гипоксии сукцинат имеет возможность монополизовать дыхательную цепь митохондрий и его окисление остается одним из немногих источников АТФ в клетке, что позволяет частично сохранить энергосинтезирующую функцию митохондрий в условиях ишемии [3]. Возможно, противоишемический эффект сукцината связан не только с активацией

Дыхательные параметры изолированных митохондрий печени крыс до и после гипотермического хранения органа

Respiratory parameters of rat liver isolated mitochondria prior to and after organ hypothermic storage

Дыхательные параметры Respiratory parameters	Поглощение кислорода, нмоль O_2 /мг белка за 1 мин Oxygen uptake, nmol of O_2 per mg of protein per 1 min			
	До хранения Before storage		Через 1 ч хранения After 1 hr storage	
	контроль control	опыт experiment	контроль control	опыт experiment
V_4 м+гл V_4 m+gl	2,72±0,47	3,6±0,56	3,28±0,81	4,99±0,55
V_3	8,38±1,3	9,65±1,81	14,53±2,1 ²	15,44±0,53 ¹
ДК BC	3,2±0,36	3,37±1,11	4,48±0,85	3,49±0,38
V_4 сукци V_4 succ	3,26±1,22	5,39±1,34	5,97±1,04	16,21±1,56 ^{1,2}
V_3	9,79±1,22	12,69±1,36	17,29±3,61 ²	31,91±3,13 ^{1,2}
ДК BC	2,79±0,26	2,55±0,33	2,91±0,67	2,1±0,18

Примечание: ¹ – p<0,05 по отношению к контролю; ² – p<0,05 по отношению к значениям до хранения.

Notes: ¹ – p<0.05 in respect to the control; ² – p<0.05 as compared to the data before storage .

The Table shows respiratory parameters of rat liver isolated mitochondria prior to and after organ HS. The data presented demonstrate that mitochondria, isolated from liver before cold storage were characterised by a low respiration rate in V_4 energetic state according to the Chance on the malate + glutamate and succinate substrates in the control and experimental groups. ATP adding increased the oxygen consumption rate that testified to a high coupling of respiration and oxidative phosphorylation processes, but no statistically significant differences between groups were observed. Respiratory control indices (RCI) on malate + glutamate and succinate in two groups did not statistically and significantly differ as well.

In experimental group after 1 hr liver’s HS a statistically significant increase in respiration rates in V_3 and V_4 states according to the Chance method at the presence of respiration substrate of the second complex: succinate (Table) was observed. As for malate and glutamate presence, these indices did not differ from the control ones. RCI at the 1st and 2nd complex substrates presence were not significantly differ between the groups and remained at level of the values obtained before liver HS.

Glycolysis is known to be the main source of ATP synthesis in cell under normal conditions. According to the literature data the ATP glycolytic accumulation under hypothermia is considered to be insufficient to maintain the pool of high-energetic adenine nucleotides [9]. In addition, an excessive glycolytic activation is accompanied with development of lactate acidosis, dis-

сукцинатдегидрогеназного окисления, но и с восстановлением активности ключевого фермента дыхательной цепи митохондрий клеток – цитохромоксидазы [2].

В данной работе для поддержания энергетического статуса клеток печени в период гипотермического хранения органа животные подвергались предварительной обработке ЦФТ. Согласно современным представлениям, фетальные ткани характеризуются высокой устойчивостью к гипоксии, так как основным источником макроэргов в них является анаэробный гликолиз.

Ранее в наших исследованиях было показано, что предварительная обработка крыс ЦФТ за 4 ч до изоляции печени приводит к поддержанию пируваткиназной активности на интактном уровне при гипотермическом хранении органа в течение 1 ч [10]. Этот факт может свидетельствовать о существенном вкладе пируваткиназы для поддержания пула АТФ как АТФ-генерирующего фермента или источника пирувата.

Выводы

Можно предположить, что введение животным ЦФТ существенно повышает устойчивость клеток печени к гипоксии за счёт активации механизмов срочной адаптации к дефициту кислорода путём усиления сукцинатоксидазного пути окисления, вовлечение которого в энергетический метаболизм препятствует снижению внутриклеточного содержания АТФ.

Эффективность предварительной обработки животных ЦФТ, вероятно, обусловлена наличием в фетальных тканях биологически активных соединений: эпидермального фактора роста, ИЛ-3, инсулиноподобных факторов роста 1 и 2, инсулина и др. [8, 11]. Для более детального понимания механизмов действия ЦФТ на процессы генерации энергии в гипотермических условиях требуются дальнейшие исследования.

Литература

1. *Никоненко А.С., Ковалёв А.А., Гриценко С.Н., Никоненко Т.Н.* Трансплантация печени.– Запорожье, 2000.– С. 6-11.
2. *Лукьянова Л.Д.* Молекулярные механизмы тканевой гипоксии и адаптация организма // *Фізіолог. журн.*– 2003.– Т. 4, №3.– С. 17-35.
3. *Маевский Е.И., Гришина Е.В., Розенфельд А.С. и др.* Анаэробное образование сукцината и облегчение его окисления – возможные механизмы адаптации клетки к кислородному голоданию // *Биофизика.*– 2000.– Т. 45, №3.– С. 509-513.
4. *Мосолова И.М., Горская И.А., Шольц К.Ф. и др.* Выделение интактных митохондрий из печени крыс / В кн.: *Методы современной биохимии.*– М.: Наука, 1975.– С. 45-47.

order in functioning of many intracellular enzymes and ion dysbalance [3]. Under these conditions the energy “suppliers” are the oxidation-reduction processes, proceeding in a mitochondrial respiratory chain [2]. Under hypoxia the NAD-dependent substrates are known as completely recovered and can not be oxidised. However, there is the possibility for oxidation of FAD-dependent substrates, enabling to preserve the mitochondria coupling function [3].

These changes in the respiratory chain component response to hypoxia result in a strengthened succinate oxidation, since the succinate dehydrogenase, in contrast to other dehydrogenases is a FAD-dependent enzyme, which activity is not limited by the NAD/NADH ratio. Under hypoxia the succinate was shown to be capable to monopolise a respiratory mitochondrial chain and its oxidation remains the one of a few ATP sources in cell, that enables a partial preservation of energy-synthesising function of mitochondria under ischemia [3]. Anti-ischemic succinate effect is possibly related not only to activation of succinate dehydrogenase oxidation, but to the recovery of key enzyme activity of cell mitochondria respiratory chain: cytochrome oxidase [2].

In this work to maintain an energetic status of liver cells during the organ hypothermic storage the animals underwent the FTC pretreatment. According to the current notions the fetal tissues are characterised with a high resistance to hypoxia, i.e. an anaerobic glycolysis is the main source of macroergs in them.

As we have demonstrated in our previous researches, a pretreatment of rats with FTC prior to 4 hrs of liver isolation resulted in maintaining a pyruvate kinase activity at an intact level under organ hypothermic storage within 1 hr [10]. This fact may testify either to a significant contribution of pyruvate kinase in to ATP pool maintaining as an ATP-generating enzyme or as pyruvate source.

Conclusions

FTC introducing into the animals may be assumed as significantly increasing liver cell resistance to hypoxia due to mechanism activation of urgent adaptation to oxygen deficit via strengthening a succinate oxidase oxidation pathway, whose involving into energetic metabolism prevents a decrease in ATP intracellular content.

The efficiency of pretreatment of animals with FTC is probably stipulated to the presence in fetal tissues of biologically active compounds, namely: epidermal growth factor, IL-3, insulin-like growth factors 1 and 2, insulin etc. [8, 11]. Further researches are necessary for more detailed understanding the mechanisms of FTC effect on energy generation processes under hypothermia.

5. Черкашина Д.В., Петренко А.Ю. Влияние предварительной обработки крыс эмбриоспецифическими факторами на состояние антиоксидантной системы печени в ходе гипотермического хранения и нормотермической реперфузии // Пробл. криобиологии.– 2003, №4.– С. 49-57.
6. Пат. 57680 А (Україна) МПК АО1№1/02. Середовище для гіпотермічного зберігання ізольованої печінки / О.А. Семенченко, І.В. Шаніна, О.Ю. Петренко. Заявлено 05.11.2002. Опубл. 16.06.2003. Бюл. №6.
7. Adams H. Adenosine 5'-triphosphate determination with phosphoglycerate kinase // In: Methods of enzymatic analysis / Ed.: Bergmeyer H.U.– New York: Academic Press, 1963.– P. 539-543.
8. Canesi L., Ciacci C., Betti M. et al. Growth factors stimulate the activity of key glycolytic enzymes in isolated digestive gland cells from mussels through tyrosine kinase mediated signal transduction // Gen. Comp. Endocrinol.– 1999.– Vol. 116, N2.– P. 241-248.
9. Cherkashina D.V., Tkacheva E.N., Semenchenko O.A. et al. Pretreatment with fetal-specific factors positively affects rat liver metabolic activity after short-term cold storage // Abstracts of the 43rd Annual Meeting of the Society for Cryobiology and Society for Low Temperature Biology.– 2006.– P. 129.
10. Cicalese L. Pyruvate in organ transplantation // JPEN J. Parenter. Enteral. Nutr.– 2001.– Vol. 25, N4. – P.216-218.
11. Gonin-Giraud S., Mathieu A.L., Diocou S. et al. Decreased glycolytic metabolism contributes to but is not the inducer of apoptosis following IL-3-starvation // Cell Death Differ.– 2002.– Vol. 9, N10.– P. 1147-1157.
12. Gornall A.G., Bardawill C.J., David M.M. Determination of serumproteins by means of the biuret reaction // J. Biol. Chem.– 1949.– Vol. 177, N2.– P.751-766.

Поступила 24.11.2005

References

1. Nikonenko A.S., Kovalev A.A., Gritsenko S.N., Nikonenko T.N. Liver transplantation.– Zaporozhie, 2000.– P. 6-11.
2. Lukianova L.D. Molecular mechanisms of tissue hypoxia and organism adaptation // Fiziologichny Zhurnal.– 2003.– Vol. 4, N3.– P. 17-35.
3. Mayevsky E.I., Grishina E.V., Rozenfeld A.S. et al. Anaerobic formation of succinate and facilitation of its oxidation – possible mechanisms of cell adaptation to oxygen starvation // Biofizika.– 2000.– Vol. 45, N3.– P. 509-513.
4. Mosolova I.M., Gorskaya I.A., Sholts K.F. et al. Isolation of intact mitochondria from rat liver // In: Methods of actual biochemistry.– Moscow: Nauka, 1975.– P. 45-47.
5. Cherkashina D.V., Petrenko A.Yu. Effect of preliminary rat treatment with embryospecific factors on the state of liver anti-oxidant state within hypothermic storage and normothermic perfusion // Problems of Cryobiology.– 2003.– N4.– P. 49-57.
6. Patent 57680 A (Ukraine) IPC7 AO1N1/02. Medium for hypothermic storage of isolated liver / O.A. Semenchenko, I.V. Shanina, O.Yu. Petrenko; Applied 05.11.22002; Published 16.06.2003.– Bull. N6.
7. Adams H. Adenosine 5'-triphosphate determination with phosphoglycerate kinase // In: Methods of enzymatic analysis / Ed.: H.U. Bergmeyer.– New York: Academic Press, 1963.– P. 539-543.
8. Canesi L., Ciacci C., Betti M. et al. Growth factors stimulate the activity of key glycolytic enzymes in isolated digestive gland cells from mussels through tyrosine kinase mediated signal transduction // Gen. Comp. Endocrinol.– 1999.– Vol. 116, N2.– P. 241-248.
9. Cherkashina D.V., Tkacheva E.N., Semenchenko O.A. et al. Pretreatment with fetal-specific factors positively affects rat liver metabolic activity after short-term cold storage // Abstracts of the 43rd Annual Meeting of the Society for Cryobiology and Society for Low Temperature Biology.– 2006.– P. 129.
10. Cicalese L. Pyruvate in organ transplantation // JPEN J. Parenter. Enteral. Nutr.– 2001.– Vol. 25, N4. – P.216-218.
11. Gonin-Giraud S., Mathieu A.L., Diocou S. et al. Decreased glycolytic metabolism contributes to but is not the inducer of apoptosis following IL-3-starvation // Cell Death Differ.– 2002.– Vol. 9, N10.– P. 1147-1157.
12. Gornall A.G., Bardawill C.J., David M.M. Determination of serumproteins by means of the biuret reaction // J. Biol. Chem.– 1949.– Vol. 177, N2.– P.751-766.

Accepted in 24.11.2005