

Влияние предобработки крыс эмбриоспецифическими факторами на состояние антиоксидантной системы печени при гипотермическом хранении и нормотермической реперфузии

Д.В. ЧЕРКАШИНА, А.Ю. ПЕТРЕНКО

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Effect of Rat Pretreatment with Embryospecific Factors on the State of Liver Antioxidant System at Hypothermic Storage and Normothermic Reperfusion

CHERKASHINA D.V., PETRENKO A.YU.

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

Исследовалось влияние предварительного введения крысам эмбриоспецифических факторов (ЭСФ) на окислительно-восстановительное равновесие в печени после гипотермического хранения (1 и 24 ч) в сахарозо-солевой среде и нормотермической реперфузии (60 мин). Показаны снижение количества свободнорадикальных продуктов, определяемых по уровню и скорости накопления ТБК-активных продуктов, и нормализация активности ферментов системы антиоксидантной защиты – каталазы, глутатионпероксидазы и редуктазы.

Ключевые слова: эмбриоспецифические факторы, гипотермическое хранение печени, нормотермическая реперфузия, система антиоксидантной защиты, свободнорадикальное повреждение.

Вивчався вплив попереднього введення шурам ембріоспецифічних факторів на окислювально-відновну рівновагу в печінці після гіпотермічного зберігання (1 і 24 год) у сахарозо-сольовому розчині та нормотермічної реперфузії (60 хв). Показано зниження кількості вільнорадикальних продуктів, що визначали за рівнем та швидкістю накопичення ТБК-активних продуктів, а також нормалізацію активності ферментів системи антиоксидантного захисту - каталази, глутатионпероксидази та редуктази.

Ключові слова: ембріоспецифічні фактори, гіпотермічне зберігання печінки, нормотермічна реперфузія, система антиоксидантного захисту, вільнорадикальне ушкодження.

The effect of embryospecific factor pretreatment on liver oxidative-reducing balance after hypothermic storage (1 and 24 hours) in sucrose-saline solution, and normothermic reperfusion (60 minutes) has been studied. The decrease of free radical product number investigating by TBA-product level and accumulation rate, and normalization of antioxidant system enzyme activity (catalase, glutathione peroxidase and reductase) has been shown.

Key words: embryospecific factors, liver hypothermic storage, normothermic reperfusion, antioxidant system, free radical damage.

Поиск методов пролонгирования сроков гипотермического хранения печени, которое сопровождалось бы минимальной потерей ее функциональной активности, – актуальная проблема криобиологии и трансплантологии. Повреждение печени при гипотермическом хранении и последующей нормотермической реперфузии (ГХ/НР) является мультифакторным и развивается в различных направлениях [17]. Основными причинами снижения жизнеспособности органа после ГХ/НР считаются нарушение энергетического статуса клеток и развитие свободно-радикальных повреждений, особенно после перевода печени в физиологические условия [9, 17]. Генерация активных форм кислорода наряду с угнетением работы ферментов системы анти-оксидантной защиты приводит к усилению перекисных процессов и нарушению нативной структуры как плазматической, так и внутри-клеточных мембран. Кроме того, развитие оксидативного стресса в процессе ГХ/НР активи-

Searching the methods for prolongation of the terms of liver hypothermic storage that would be accompanied by the minimum loss of its functional activity is known to be a current problem of both cryobiology and transplantology. Liver damage during hypothermic storage and further normothermic reperfusion (HS/NR) is known to be multi-factor and develops in various directions [17]. Failure of cell energetic status and development of free radical damage are considered to be the main causes of organ viability loss following HS/NR, especially after subjecting the liver to physiological conditions [9, 17]. Generation of active oxygen species together with the suppression of the enzyme system of antioxidant defence results in an increase of peroxidative processes and failure of native structure of both plasmatic and intracellular membranes. In addition oxidative stress development during HS/NR activates Kupffer's cells and endothelial cells of liver sinusoid being the cause of cytokine disbalance in liver. In these cells the level of mRNA expression rises of pro-

Адрес для корреспонденции: Черкашина Д.В., Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: +38 (057) 772-01-35, факс: +38 (057) 772-00-84, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

Address for correspondence: Cherkashina D.V., Institute for Problems of Cryobiology & Cryomedicine of the Natl. Acad. Sci. of Ukraine, 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.: +38 (057) 7720135, fax: +38 (057) 7720084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

рует клетки Купфера и эндотелиальные клетки печеночного синусоида, что является причиной нарушения цитокинового баланса в печени. В этих клетках повышается уровень экспрессии мРНК провоспалительных цитокинов: фактора некроза опухоли α (ФНО α), интерлейкина-1 β (ИЛ-1 β), которые усиливают свободнорадикальные повреждения при ГХ/НР [9].

На модели острой интоксикации тетрахлометаном [6] показано, что предварительное введение постклеточного цитозоля эмбриональных тканей человека, содержащего большое количество биологически активных, стадиоспецифических биомолекул – ЭСФ, животным с экспериментальным токсическим гепатитом приводило к снижению степени повреждения печени и нормализации работы системы антиоксидантной защиты. Наиболее эффективной была предобработка крыс за 4 ч до интоксикации. Полученные результаты позволили предположить перспективность применения ЭСФ для введения животным перед гипотермическим хранением печени.

Цель настоящей работы – исследование состояния системы антиоксидантной защиты печени в ходе ГХ/НР после предобработки животных ЭСФ.

Материалы и методы

Эксперименты проводили на белых, беспородных крысах-самках массой 200-250 г (n=36), содержащихся в стандартных условиях вивария ИПКиК НАН Украины. Все манипуляции с животными осуществляли под эфирным наркозом.

В качестве источника ЭСФ использовали цитозоль эмбриональных тканей человека 9-12 недель гестации, который получали путем высокоскоростного ультрацентрифугирования (105 000g, 90 мин) 40%-го гомогената мягких тканей эмбриона. Все работы проводили в стерильных условиях.

До начала эксперимента животным опытной группы в бедренную вену вводили цитозоль эмбриональных тканей человека в дозе 0,3 мл/100 г массы, контрольной группы – физиологический раствор. Через 4 ч животных забивали, брюшную полость вскрывали, печень промывали от крови и насыщали консервирующим раствором *in situ* через *v. porta* (T=0-4°C). После начала перфузии *v. cava sup.* надсекали в месте ответвления правой почечной вены для оттока перфузата. Для гипотермического хранения органа в работе был использован сахарозосодержащий раствор, разработанный в Институте проблем криобиологии и криомедицины [4]. После окончания перфузии в портальную вену вводили катетер, печень изолировали и помещали в консервирующий раствор. Орган хранили в течение 1 или 24 часов в холодильнике при

inflammatory cytokines, such as tumour necrosis factor α (TNF α) and interleukin-1 β (IL-1 β), strengthening free damage during HS/NR, is increased [9].

In the model of acute intoxication caused by tetrachloromethane [6] it has been shown that preliminary injection of postcellular cytosole of human embryonic tissues that comprises a great number of biologically active, stage-specific biomolecules – ESF, to the animals with experimental toxic hepatitis resulted in the decrease of the liver damage degree and the functioning normalization of antioxidant defence system. Pretreatment of rats 4 hrs prior to the intoxication occurred to be the most efficient. Obtained results allowed to suppose the perspective of ESFs to be injected to animals prior to liver hypothermic storage.

Studying the state of the system of liver antioxidant defence during HS/NR was the objective of the work.

Materials and methods

Experiments were performed in white breedless female rats with the weight of 200-250g (n=36). All manipulations with the animals were accomplished under ether anaesthesia.

Cytosol of human embryonic tissues of 9-12 gestation weeks was used as a source of ESF, obtained using ultra-rapid ultra-centrifuging (105,000g, 90 min) of 40% homogenate of soft embryonic tissues. All procedures were done under sterile conditions.

Prior to the experiment start the cytosol of human embryonic tissues was injected into femoral vein of experimental group animals in the dose of 0.3ml/100g of weight, and physiological solution was infused to the animals of the control group. By 4 hours the animals were decapitated, peritoneal cavity was opened and liver was washed free of blood and saturated with the preserving solution *in situ* via *v. porta* (T=0-4°C). After the perfusion started *v. cava sup.* was cut at the site of the branching of right renal vein for perfusate drainage. With the aim of organ hypothermic storage there was used a sucrose-based solution elaborated at the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine [4]. After the perfusion finished a catheter was introduced into a portal vein, liver was isolated and placed into the preserving solution. The organ was stored during 1hr or 24 hrs in a refrigerator at 4°C. After cold exposure liver was subjected to reperfusion at 37°C with Krebs-Ringer's medium (bicarbonate buffer, pH 7.4, 1mg/ml) within 60 min. Glucose was added to the solution, which was then saturated with carbogen during 5 min. In 20% liver homogenates obtained prior to and following 60-min reperfusion, the following indices were studied: the basal level of TBA-active products [1], the intensity of the induced LPO by the accumulation rate of TBA-active products in

температуре 4°C. После холодовой экспозиции печень подвергали реперфузии при 37°C в среде Кребса-Рингера (бикарбонатный буфер, pH 7.4) в течение 60 мин. В раствор добавляли глюкозу (1 мг/мл) и насыщали карбогеном 5 мин. В 20%-х гомогенатах печени, полученных до и после 60-минутной реперфузии, исследовали следующие показатели: базальный уровень ТБК-активных продуктов [1], интенсивность индуцированного ПОЛ по скорости накопления ТБК-активных продуктов в проокислительном буфере [2]. Активности ферментов определяли спектрофотометрически на "Carry-50": каталазную по убыли H₂O₂ при 240 нм [3]; глутатион-редуктазную (ГР) по убыли НАДФН при 340 нм [7]; глутатионпероксидазную (ГП) по приросту содержания окисленного глутатиона при 260 нм [5] и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназную (Г6ФДГ) по накоплению НАДФН при 340 нм [14]. Содержание белка определяли биуретовым методом.

Статистическую обработку результатов осуществляли при помощи пакета программ Statistica, используя непараметрический критерий Манна-Уитни. Достоверно различными принимали результаты при p<0,05.

Результаты и обсуждение

Развитие свободнорадикальных процессов при ГХ/НР оценивали по базальному уровню и скорости накопления ТБК-активных продуктов. Было показано, что уже через 60 мин хранения в контрольной группе происходило повышение базального уровня МДА в 1,6 раза, сохранявшееся после реперфузии на том же уровне (рис. 1). Предобработка ЭСФ приводила к достоверному снижению уровня ТБК-активных продуктов в печени после 1 ч гипотермического хранения. После нормотермической реперфузии содержание МДА продолжало снижаться и находилось на уровне интактной группы. Базальный уровень ТБК-активных продуктов в печени после 24 ч хранения оставался на высоком уровне, реперфузия не влияла на этот показатель. Предобработка ЭСФ вызывала устойчивое снижение содержания МДА как сразу после хранения, так и через 60 мин реперфузии (рис. 1).

Скорость накопления ТБК-активных продуктов в контрольной группе оставалась неизменной через 1 ч хранения, а также после реперфузии и находилась на уровне интактной группы (рис. 2). Гипотермическое хранение печени в течение 24 ч не влияло на интенсивность индуцированного ПОЛ в печени, последующая реперфузия приводила к ее повышению в 1,5 раза. Скорость накопления ТБК-активных продуктов после предобработки ЭСФ достоверно снижалась не только относитель-

проокислительному буферу [2]. Enzyme activity was evaluated spectrophotometrically using "Carry-50" device: catalase activity by H₂O₂ reduction at 240nm [3]; glutathione reductase one (GR) by NADPH reduction at 340 nm [7]; glutathione peroxidase (GP) by the growth of oxidized glutathione content at 260 nm [5] and glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDG) by NADPH accumulation at 340 nm [14]. Protein content was determined by biuretic method.

Statistical processing of the results was performed by the Statistical programme using non parametrical Mann-Whitney criterion. The results were considered as statistically different at p<0.05.

Results and discussion

Development of free radical processes at HS/NR was evaluated by the basal level and accumulation rate of TBA-active products. It was demonstrated that already in 60 min of storage the increase of MDA basal level increased by 1.6 times in the control group, which has kept at the same level after reperfusion (Fig. 1). Pretreatment by ESF induced a stable reduction of the MDA content both following the storage and by 60 min of reperfusion (Fig. 1).

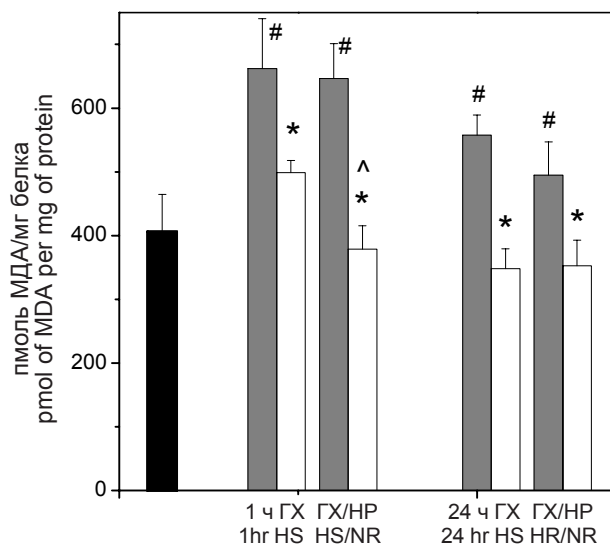


Рис.1. Влияние ЭСФ на базальный уровень ТБК-активных продуктов в гомогенате печени при гипотермическом хранении и последующей реперфузии: * – достоверные отличия относительно контрольной группы; ^ – достоверные отличия между опытными группами; # – достоверные отличия относительно интактной группы; p<0,05. ■ – интактная; □ – контрольная; □ – опытная.

Fig. 1. ESF effect on a basal level of TBA-active products in liver homogenate under hypothermic storage and further reperfusion: * – the significant differences regarding the control group; ^ – the significant differences between the experimental groups; # – the significant differences in respect of the intact group, p<0.05; groups: ■ – intact; □ – control; □ – experimental.

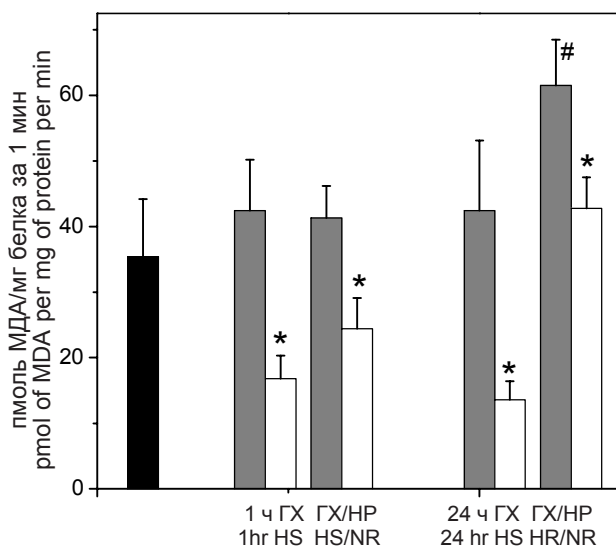


Рис.2. Влияние ЭСФ на интенсивность индуцированного ПОЛ в гомогенате печени при гипотермическом хранении и последующей реперфузии: * – достоверные отличия относительно контрольной группы; ^ – достоверные отличия между опытными группами; # – достоверные отличия относительно интактной группы; $p < 0,05$. ■ – интактная; ■ – контрольная; □ – опытная.

Fig. 2. ESF effect on the intensity of induced LPO in liver homogenate under hypothermic storage and further reperfusion: * – the significant differences regarding the control group; ^ – the significant differences between the experimental groups; # – the significant differences in respect of the intact group, $p < 0,05$; groups: ■ – intact; ■ – control; □ – experimental.

но контрольной, но и интактной группы через 1 ч хранения и реперфузии, а также через 24 ч хранения. После нормотермической реперфузии показатель повышался до нормальных значений (рис. 2).

Хранение печени в течение 1-го часа приводило к выраженному угнетению каталазной и ГР активности (в 2 раза), ГП активность в контрольной группе имела тенденцию к снижению относительно интактной. Данные изменения сохранялись на всех этапах эксперимента. Предварительное введение ЭСФ нормализовало все исследованные показатели на всех этапах эксперимента, что коррелирует с состоянием прооксидантной системы (рис. 3-5). Эффективность действия ЭСФ была менее выражена относительно ГП активности (рис. 4).

Важная роль глутатион-зависимой системы в нейтрализации свободнорадикальных повреждений при ГХ/НР подчеркивается многими авторами [10]. Потеря клетками печени восстановленного глутатиона (GSH) в ходе реперфузии, с одной стороны, и нарушение работы ферментативной системы, поддерживающей пул GSH, с другой – способствуют развитию оксидативного стресса в органе [9,10]. Известно, что предварительное введение *in vivo* или добавление в среду хранения

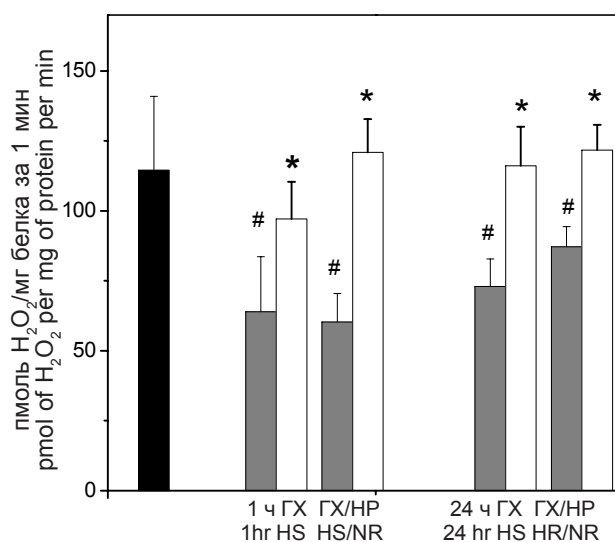


Рис. 3. Влияние ЭСФ на каталазную активность печени при гипотермическом хранении и последующей реперфузии: * – достоверные отличия относительно контрольной группы; ^ – достоверные отличия между опытными группами; # – достоверные отличия относительно интактной группы; $p < 0,05$. ■ – интактная; ■ – контрольная; □ – опытная.

Fig. 3. ESF effect on liver catalase activity under hypothermic storage and further reperfusion: * – the significant differences regarding the control group; ^ – the significant differences between the experimental groups; # – the significant differences in respect of the intact group, $p < 0,05$; groups: ■ – intact; ■ – control; □ – experimental.

Accumulation rate of TBA-active products in the control group remained to be unchanged in 1 hour of storage and further reperfusion and was at the level of intact group (Fig. 2). Liver hypothermic storage during 24hrs did not affect the intensity of induced LPO in liver, further reperfusion resulted in its 1.5 times increase. Accumulation rate of TBA-active products following the ESF pretreatment decreased considerably not only in respect of the control group, but intact group also in one hour of storage and reperfusion, as well as in 24 hours. Following normothermic reperfusion the index increased up to normal values (Fig. 2).

A 60-min liver storage resulted in the manifested, twice suppression of a catalase and GR activity, GP activity in the control group had a tendency to reduction in respect of the intact group. The data on the change have remained at all the experiment stages. Preliminary injection of ESF normalised the indices investigated at all the stages of the experiment, that correlates with the state of prooxidant system (Figs 3-5). Efficiency of the ESF influence was less manifested as for GP activity (Fig. 4).

An important role of glutathione-dependent system in neutralization of free radical damage at HS/NR is noted by the number of authors [10]. The loss by liver cells of the reduced glutathione (GSH) during the

GSH и его предшественников позволяет снизить повреждение печени [10]. Кроме того, нарушение энергетического статуса клеток печени приводит к недостатку макроэргов, необходимых как для восстановления, так и синтеза GSH. Основным источником восстановительных эквивалентов являются реакции пентозофосфатного пути, особенно Г6ФДГ. В настоящее время данный фермент считается важным фактором оксидорезистентности клеток при развитии оксидативного стресса [13]. Генерируемый в этой реакции НАДФН используется для восстановления глутатиона в ГР реакции и необходим для поддержания нативной структуры каталазы.

Показано, что гипотермическое хранение печени в течение 1 ч снижало активность Г6ФДГ в 1,4 раза. Данное понижение оставалось неизменным при продлении сроков хранения и после нормотермической реперфузии. Предварительное введение ЭСФ достоверно повышало активность фермента относительно контроля только после 1 ч ГХ/60 мин НР, в остальных случаях различий не наблюдалось (рис. 6).

Согласно современным представлениям, в первую очередь, при холодовой ишемии страдают

реперфузия с одной стороны, и impairment of the functioning of enzyme system maintaining GSH pool, on the other, promotes the development of an oxidative stress in an organ [9, 10]. Preliminary *in vivo* introduction or adding into the storage medium of GSH and its precursors allows to reduce the liver damage [10]. After all the impairment of the energetic status of hepatic cells results in the lack of macroergs essential both for the reduction and GSH synthesis. The reactions of pentose phosphate pathway, especially of G6PDG are known to be the main source of the reducing equivalents. Nowadays this enzyme is considered to be an important factor of cell oxide-resistance during the oxidative stress development [13]. Being generated during this reaction NADPH is used for glutathione reduction in a GR reaction and is essential for maintenance of native catalase structure.

It was shown, that liver hypothermic storage within 1 hr decreased the G6PDG activity by 1.4 times. Such a reduction remained to be unchanged while the storage terms were prolonged and after normothermic reperfusion. Preliminary injection of ESF considerably increased the enzyme activity as compared with the control only in 1 hour of storage, in the rest cases no differences were noted (Fig. 6).

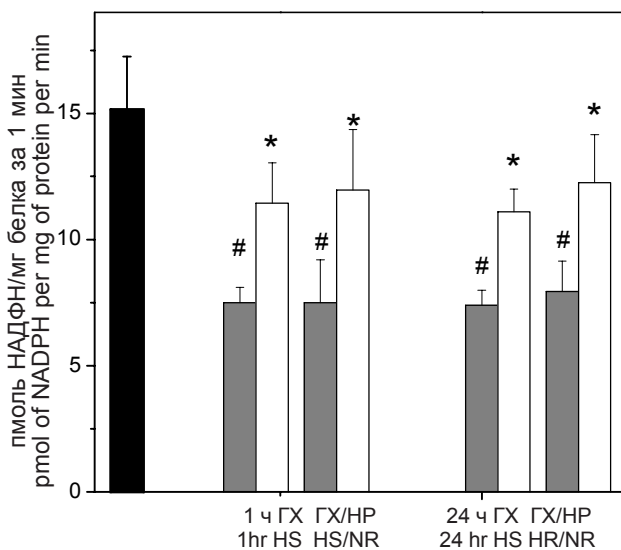


Рис. 4. Влияние ЭСФ на глутатионредуктазную активность печени при гипотермическом хранении и последующей реперфузии: * – достоверные отличия относительно контрольной группы; ^ – достоверные отличия между опытными группами; # – достоверные отличия относительно интактной группы; $p < 0,05$. ■ – интактная; ■ – контрольная; □ – опытная.

Fig. 4. ESF effect on liver glutathione activity under hypothermic storage and further reperfusion: * – the significant differences regarding the control group; ^ – the significant differences between the experimental groups; # – the significant differences in respect of the intact group, $p < 0,05$; groups: ■ – intact; ■ – control; □ – experimental.

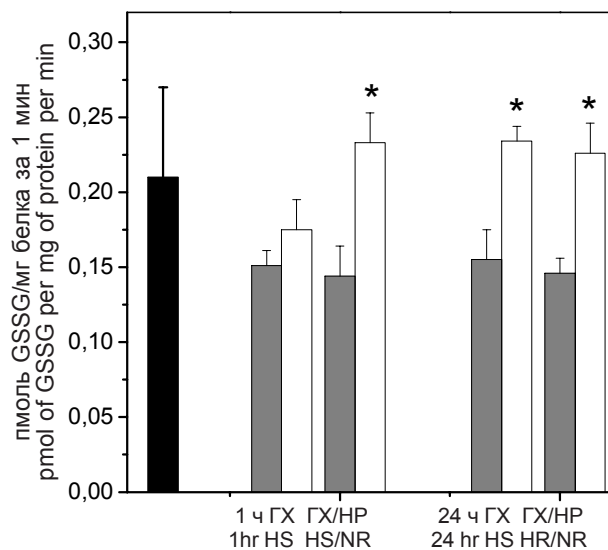


Рис. 5. Влияние ЭСФ на ГП активность печени при гипотермическом хранении и последующей реперфузии: * – достоверные отличия относительно контрольной группы; ^ – достоверные отличия между опытными группами; # – достоверные отличия относительно интактной группы; $p < 0,05$. ■ – интактная; ■ – контрольная; □ – опытная.

Fig. 5. ESF effect on liver GP activity under hypothermic storage and further reperfusion: * – the significant differences regarding the control group; ^ – the significant differences between the experimental groups; # – the significant differences in respect of the intact group, $p < 0,05$; groups: ■ – intact; ■ – control; □ – experimental.

эндотелиальные клетки печеночного синусоида [9,16,17]. Их повреждение приводит к нарушению микроциркуляции и развитию центролобулярного некроза при нормотермической реперфузии.

Внутриклеточное накопление свободных радикалов при ГХ/НР усугубляется гипоксической активацией клеток Купфера, которые продуцируют большое количество H_2O_2 [12]. Наблюдаемое раннее повышение базального уровня ТБК-активных продуктов в печени уже после 1 ч гипотермического хранения служит тому подтверждением. Отсутствие повышения интенсивности индуцированного ПОЛ может быть обусловлено низкой реактивностью системы неферментативного ПОЛ, накопление ТБК-активных продуктов, очевидно, происходит ферментативным путем при участии системы микросомального окисления и ксантиноксидазы, накопление субстратов которой (ксантина и гипоксантина) показано на этапе холодной ишемии [10]. Повышение интенсивности ПОЛ в группе с максимальным временем хранения и реперфузии свидетельствует, вероятно, о массивном повреждении клеток печени и появлении дополнительных механизмов генерации свободных радикалов. Выраженное влияние ЭСФ на развитие свободнорадикальных процессов при гипотермическом хранении и последующей нормотермической реперфузии может быть обусловлено стабилизирующим их действием на клеточные мембраны. Кроме того, вероятным механизмом реализации эффектов является воздействие на ферментативную систему антиоксидантной защиты печени.

Согласно данным [15], угнетение активности ферментов системы антиоксидантной защиты на ранних этапах хранения обусловлено их инактивацией, в дальнейшем происходят деградация существующих молекул и снижение экспрессии мРНК данных ферментов [15]. Особую роль в ослаблении повреждений при ГХ/НР исследователи отводят защитной глутатион-зависимой системе, так как в ходе реперфузии наблюдается быстрое снижение содержания восстановленного глутатиона, в том числе в митохондриях [9]. Этот процесс является причиной повышения чувствительности клеток к действию активных форм кислорода. Кроме того нарушается энергетический статус клеток, в связи с тем, что в митохондриях глутатион служит важнейшим антиоксидантом, защищающим эти органеллы от собственных активных форм кислорода. Эффекты предобработки ЭСФ в отношении антиоксидантной системы могут быть обусловлены несколькими факторами. Стабилизация мембран может препятствовать быстрой потере глутатиона клетками печени, кроме того, воздействие, очевидно, связано с регуляцией

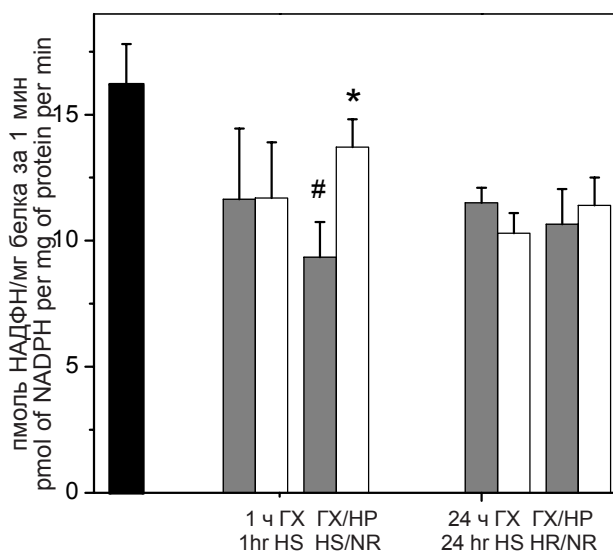


Рис. 6. Влияние ЭСФ на Г6ПФ активность печени при гипотермическом хранении и последующей реперфузии: * – достоверные отличия относительно контрольной группы; ^ – достоверные отличия между опытными группами; # – достоверные отличия относительно интактной группы; $p < 0,05$. ■ – интактная; ▒ – контрольная; □ – опытная.

Fig. 6. ESF effect on liver G6PG activity under hypothermic storage and further reperfusion: * – the significant differences regarding the control group; ^ – the significant differences between the experimental groups; # – the significant differences in respect of the intact group, $p < 0,05$; groups: ■ – intact; ▒ – control; □ – experimental.

According to current notions and, first of all at cold ischemia the endothelial cells of liver sinusoid are suffering [9, 16, 17]. Their damage results in the impairment of microcirculation and development of centrolobular necrosis during normothermic reperfusion.

Intracellular accumulation of free radicals at HS/NR is getting worse by hypoxia activation of Kuppfer's cells which produce a great number of H_2O_2 [12]. The observed earlier rise of the TBA-active product level in liver already after one hour of hypothermic storage has confirmed this fact. No increase in the intensity of the induced LPO may be stipulated by low reactivity of the system of non-enzymatic LPO, accumulation of TBA-active products has probably occurred by enzymatic pathway with participation of the system of microsomal oxidation and xanthinoxidase, the substrates accumulation of which (xanthine and hypoxanthine) has been shown at the stage of cold ischemia [10]. The increase of the LPO intensity in the group with the maximum storage and reperfusion time has probably testified to a massive liver cell damage and appearance of the additional mechanisms of free radical generation. Manifested influence of ESF on the development of free radical processes under hypothermia storage and further normothermic

активности антиоксидантных ферментов на различных этапах их синтеза *de novo* или деградации.

Угнетение Г6ФДГ активности при ГХ/НР также является важным фактором усугубления окислительных повреждений клеток печени. Отсутствие эффекта предобработки ЭСФ относительно этого фермента свидетельствует о запуске других регуляторных механизмов, не связанных с активацией пентозофосфатного пути. Известно, что в клетках печени наблюдается высокая активность других НАДФН-генерирующих ферментов (малик-фермента, изоцитратдегидрогеназы), которые могут частично компенсировать нехватку окислительно-восстановительных эквивалентов [13].

Комплексный кооперативный ответ клеток печени на действие ГХ/НР опосредуется биологически активными низкомолекулярными (H_2O_2 , NO, производные арахидоновой кислоты) и белковыми (цитокины, белки острой фазы) молекулами. Баланс между количеством свободных радикалов и провоспалительных факторов определяет степень и ход развития повреждения органа. Важную роль в этом процессе играют клетки Купфера, продуцирующие H_2O_2 и провоспалительные цитокины, в первую очередь, ФНО α и ИЛ-1 β . Эти белки значительно усугубляют состояние клеток печени, усиливая продукцию активных форм кислорода и угнетая активность ферментов системы антиоксидантной защиты [12]. Показано, что блокада клеток Купфера, а также использование агентов, угнетающих синтез провоспалительных цитокинов или снижающих чувствительность к ним клеток печени, ослабляют пагубное действие ишемии-реперфузии [11].

Снижение степени повреждения печени при ГХ/НР возможно при помощи ростовых факторов, которые принимают активное участие в регуляции биосинтетических и энергетических процессов в клетках печени. Показано, что экзогенное применение ростовых факторов, например, фактора роста гепатоцитов [16], ослабляет повреждающее действие при ГХ/НР.

Таким образом, нормализация цитокинового профиля в присутствии ростовых факторов при ГХ/НР печени, вероятно, может привести к снижению свободнорадикальных повреждений клеток и предотвращению потери клетками печени макроэргов, необходимых для полноценного функционирования органа. Фетальные экстракты, характеризуются высоким содержанием биологически активных веществ, что, вероятно, благоприятно влияет на цитокиновый профиль поврежденного органа. Показано восстановление измененного цитокинового профиля после применения овечьего фетального экстракта [8]. Полученные результаты позволяют предположить, что реализация эффектов

реперфузии может быть обусловлено их стабилизирующим влиянием на клеточные мембраны. После всего, влияние на систему ферментов печени антиоксидантной защиты известно как возможный механизм влияния реализации.

Согласно данным [15] активность системы антиоксидантной защиты на ранних стадиях хранения обусловлена их инактивацией, далее происходит деградация молекул, существующих в этот момент, а также экспрессия мРНК этих ферментов [15]. Специальную роль в ослаблении повреждения при ГХ/НР играет защитная система, зависящая от глутатиона, так как во время реперфузии наблюдается резкое падение содержания глутатиона, в частности в митохондриях [9]. Этот процесс является причиной увеличения чувствительности к влиянию активных форм кислорода, после чего энергетический статус клетки ухудшается, так как глутатион в митохондриях является наиболее важным антиоксидантом, который защищает эти органеллы от собственных активных форм кислорода. Эффекты предобработки ЭСФ на антиоксидантную систему могут быть обусловлены несколькими факторами. Стабилизация мембран может предотвратить резкую потерю глутатиона клетками печени, в дополнение к этому влияние может быть связано с активностью регуляции антиоксидантных ферментов на различных стадиях их синтеза *de novo* или деградации.

Подавление активности Г6ФДГ при ГХ/НР также известно как важный фактор окислительного повреждения в клетках печени. Отсутствие ЭСФ предобработки на этот фермент свидетельствует о запуске других регуляторных механизмов, которые не связаны с активацией пентозофосфатного пути. Известно, что в клетках печени высокая активность НАДФН-генерирующих ферментов (малик-фермента, изоцитратдегидрогеназы), способная частично компенсировать недостаток окислительно-восстановительных эквивалентов, была замечена [13].

Сочетанная кооперативная реакция печени на ГХ/НР обусловлена биологически активными низкомолекулярными молекулами (H_2O_2 , NO, производные арахидоновой кислоты) и белковыми (цитокины, белки острой фазы). Баланс между количеством свободных радикалов и провоспалительных факторов определяет степень и развитие повреждения органа. Важную роль в этом процессе играют клетки Купфера, продуцирующие H_2O_2 и провоспалительные цитокины, в первую очередь, ФНО α и ИЛ-1 β . Эти белки значительно усугубляют состояние клеток печени, усиливая продукцию активных форм кислорода и угнетая активность ферментов системы антиоксидантной защиты [12]. Известно, что блокада клеток Купфера, а также использование агентов, подавляющих синтез провоспалительных цитокинов или снижающих чувствительность к ним клеток печени, ослабляет повреждающее действие ишемии-реперфузии [11].

предобработки ЭСФ при ГХ/НР печени осуществляется, прежде всего, путем изменения цитокинового профиля в органе. Следствием таких изменений может быть регуляция активности ферментов как системы антиоксидантной защиты, так и комплексов, отвечающих за энергетический статус клеток.

Выводы

В настоящей работе впервые показано нормализующее действие ЭСФ на состояние системы антиоксидантной защиты печени крыс при гипотермическом хранении в сахарозо-солевом растворе и последующей нормотермической реперфузии. Полученные результаты свидетельствуют о перспективности применения ЭСФ, полученных из эмбриональных тканей, в качестве гепатопротектора для сохранения функциональной активности печени при гипотермическом хранении.

Литература

1. Арутюнян А.В., Дубинина Е.Е., Жибина Н.Н. Методы оценки свободнорадикального окисления и антиоксидантной системы организма.– СПб.: ИКС "Фолиант", 2000.– 200 с.
2. Владимиров Ю.А., Арчаков А.И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах.– М.:Наука, 1972.– 252 с.
3. Королук М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Г. Метод определения активности каталазы // Лаб.дело.– 1988.– №1.– С.16-19.
4. Тэфтюзва Н.Б., Яремий І.М., Григор'єва Н.П. Вплив настоянки перстачу прямоствоячого на глутатионову систему печінки щурів за умов токсичного гепатиту // Медична хімія.– 2001.– Т.3, №4.– С. 52-55.
5. Черкашина Д.В., Петренко О.Ю., Оченашко О.В. Захист печінки від гострого отруєння тетрахлорметаном препаратами ембріонального походження // Трансплантологія. – 2003. – Т.4, №1.– С.49-50.
6. Чернов Н.Н. Исследование глутатионредуктазы в печени крыс. Энзимология опухолей.– М.: Ун-т дружбы народов, 1979.– С. 96-101.
7. Пат. 57680 А (Україна) МПК⁷ А01Н1/02. Середовище для гіпотермічного зберігання ізольованої печінки / О.А. Семенченко, І.В. Шаніна, О.Ю. Петренко. Заявлено 05.11.2002. Публ.16.06.2003. Бюл.№6.
8. Gorczynski R.M., Bessler W.G., Chung S. et al. A fetal sheep liver extract reverses age-related increments in spontaneous and induced cytokine production by indirect environmental effects // Immunology Letters.– 1998.– Vol.60, N2-3.– P. 157-164.
9. Jaeschke H. Preservation injury: mechanisms, prevention and consequences // J. of Hepatology.– 1996.– Vol.25.– P. 774-780.
10. Kobayashi H., Kurokawa T., Kitahara S. et al. The effects of gamma-glutamylcysteine ethyl ester, a prodrug of glutathione, on ischemia-reperfusion-induced liver injury in rats // Transplantation.– 1992.– Vol.54, N3.– P. 414-418.
11. Lee Y.G., Lee S.H., Lee S.M. Role of Kupffer cells in cold/warm ischemia-reperfusion injury of rat liver // Arch. Pharm. Res.– 2000.– Vol.23, N6.– P. 620-625.

The decrease of liver damage degree at HS/NR is possible if growth factors used, which actively participate in the regulation of biosynthetic and energetic processes in liver cells. It has been shown that exogenous application of growth factors, for example, hepatocyte growth factor [16] makes weaker the damaging influence at HS/NR.

The normalization of a cytokine profile in the presence of growth factors at HS/NR of liver, may cause the reduction of cell free radical damage and prevent from the liver cells from the loss of macroergs, essential for a valuable functioning of an organ. Fetal extracts are characterized by a high content of biologically active substances, that will probably positively affect cytokine profile of the damaged organ. It was demonstrated the reduction of altered cytokine profile following the use of sheep fetal extract [8]. Obtained results allow to suppose that the realization of ESF pretreatment effects at liver HS/NR is achieved first of all by changing a cytokine profile in an organ. Such changes may result in the regulation of enzymes activity of both the system of antioxidant defence and the complexes responsible for the energetic status of cells.

Conclusions

In the work there was shown for the first time the ESF normalising influence on the state of the system of liver antioxidant defence during hypothermic storage in sucrose-based solution and further normothermic reperfusion. The results obtained testify to the perspectiveness of the ESF application, derived from embryonic tissues as a hepatoprotector to keep liver functional activity at hypothermic storage.

References

1. Arutyunyan A.V., Dubinina E.E., Zhibina N.N. The methods for evaluation of free-radical oxidation and antioxidative system of an organism.– St. Peterburg: IKS "Foliant", 2000.– 200 p.
2. Vladimirov Yu.A., Archakov A.I. Lipid peroxidation in biological membranes.– Moscow: Nauka, 1972.– 252p.
3. Korolyuk M.A., Ivanova L.I., Majorova I.G. The method for catalase activity determination // Lab. Delo.– 1998.– N1.– P. 16-19.
4. Teftuyeva N.B., Yaremiy I.M., Grigoryeva N.P. Effect of Potentilla erecta L. on a glutathione system of rat liver under the conditions of toxic hepatitis // Medical chemistry.– 2001.– Vol.3, N4.– P. 52-55.
5. Cherkashina D.V., Petrenko O.Yu., Ochenashko O.V. Liver protection against an acute poisoning by tetrachlormethane with the preparations of embryonic origin // Transplantologiya.– 2003.– Vol.4, N1.– P. 49-50.
6. Chernov N.N. Studying glutathione peroxidase in rat liver. Enzymology of tumors.– Moscow: Universitet Druzhby Narodov, 1979.– P. 96-101.
7. Patent 57680 A (Ukraine) IPC⁷ A01N1/02. Medium for hypothermic storage of isolated liver/ O.A. Semenchenko,

12. *Olthoff K.M.* Molecular pathways of regeneration and repair after liver transplantation // *World J. of Surg.*– 2002.– Vol.26, N7.– P. 831-837.
13. *Pandolfi P.P., Sonati F., Rivi R. et al.* Targeted disruption of the housekeeping gene encoding glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PD): G6PD is dispensable for pentose synthesis but essential for defence against oxidative stress // *EMBO J.*– 1995.– Vol.14, N21.– P. 5209-5215.
14. *Rudack D., Chisholm E.M., Holten D.* Rat liver glucose 6-phosphate dehydrogenase // *J. Biol. Chem.*– 1971.– Vol.246.– P. 1249-1254.
15. *Singh I., Gulati S., Orak J.K. et al.* Expression of antioxidant enzymes in rat kidney during ischemia-reperfusion injury // *Mol. Cell Biochem.*– 1993.– Vol.125, N2.– P. 97-104.
16. *Takeda Y., Arai S., Kaido T. et al.* Morphologic alteration of hepatocytes and sinusoidal endothelial cells in rat fatty liver during cold preservation and the protective effect of hepatocyte growth factor // *Transplantation.*– 1999.– Vol.67, N6.– P. 820-828.
17. *Taneja C., Prescott L., Koneru B.* Critical preservation injury in rat fatty liver is to hepatocytes, not sinusoidal lining cells // *Transplantation.*– 1998.– Vol.65, N2.– P. 167-172.
- I.V. Shanina, O.Yu. Petrenko. Accepted in 05.11.2002. Published 16.06.2003. Bul. N6
8. *Gorczynski R.M., Bessler W.G., Chung S. et al.* A fetal sheep liver extract reverses age-related increments in spontaneous and induced cytokine production by indirect environmental effects // *Immunology Letters.*– 1998.– Vol.60, N2-3.– P. 157-164.
9. *Jaeschke H.* Preservation injury: mechanisms, prevention and consequences // *J. of Hepatology.*– 1996.– Vol.25.– P. 774-780.
10. *Kobayashi H., Kurokawa T., Kitahara S. et al.* The effects of gamma-glutamylcysteine ethyl ester, a prodrug of glutathione, on ischemia-reperfusion-induced liver injury in rats // *Transplantation.*– 1992.– Vol.54, N3.– P. 414-418.
11. *Lee Y.G., Lee S.H., Lee S.M.* Role of Kupffer cells in cold/warm ischemia-reperfusion injury of rat liver // *Arch. Pharm. Res.*– 2000.– Vol.23, N6.– P. 620-625.
12. *Olthoff K.M.* Molecular pathways of regeneration and repair after liver transplantation // *World J. of Surg.*– 2002.– Vol.26, N7.– P. 831-837.
13. *Pandolfi P.P., Sonati F., Rivi R. et al.* Targeted disruption of the housekeeping gene encoding glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PD): G6PD is dispensable for pentose synthesis but essential for defence against oxidative stress // *EMBO J.*– 1995.– Vol.14, N21.– P. 5209-5215.
14. *Rudack D., Chisholm E.M., Holten D.* Rat liver glucose 6-phosphate dehydrogenase // *J. Biol. Chem.*– 1971.– Vol.246.– P. 1249-1254.
15. *Singh I., Gulati S., Orak J.K. et al.* Expression of antioxidant enzymes in rat kidney during ischemia-reperfusion injury // *Mol. Cell Biochem.*– 1993.– Vol.125, N2.– P. 97-104.
16. *Takeda Y., Arai S., Kaido T. et al.* Morphologic alteration of hepatocytes and sinusoidal endothelial cells in rat fatty liver during cold preservation and the protective effect of hepatocyte growth factor // *Transplantation.*– 1999.– Vol.67, N6.– P. 820-828.
17. *Taneja C., Prescott L., Koneru B.* Critical preservation injury in rat fatty liver is to hepatocytes, not sinusoidal lining cells // *Transplantation.*– 1998.– Vol.65, N2.– P. 167-172.

Поступила 30.09.2003

Accepted in 30.09.2003