

Сохранность фрагментов печени половозрелых свиной и новорожденных поросят при разных условиях криоконсервирования

Б.П. САНДОМИРСКИЙ, С.Е. ГАЛЬЧЕНКО, Л.Н. ТЫНЫНКА

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Integrity of Adult Pig and Newborn Piglets Liver Fragments Under Different Cryopreservation Conditions

SANDOMIRSKY B.P., GALCHENKO S.E., TYNYNKA L.N.

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

Исследовано влияние факторов криоконсервирования (скорости охлаждения и криопротекторов в различных концентрациях) на сохранность фрагментов печени новорожденных поросят и половозрелых свиной. Показано минимальное повреждение исследуемого биоматериала при криоконсервировании по состоянию перекисных процессов и интенсивности эндогенного дыхания при использовании полиэтиленоксидов (ПЭО-400 и ПЭО-1500) в качестве криопротекторов со скоростями охлаждения 1 и 8000°C/мин.

Ключевые слова: фрагменты печени, скорости охлаждения, криопротекторы, эндогенное дыхание, перекисные процессы.

Досліджено вплив факторів криоконсервування (швидкості охолодження і криопротекторів у різних концентраціях) на збереження фрагментів печінки новонароджених поросят і статевозрілих свиной. Показано мінімальне пошкодження досліджуваного біоматеріала при криоконсервуванні за станом перекисних процесів та інтенсивності ендогенного дихання при використанні поліетиленоксидів (ПЕО-400 і ПЕО-1500) як криопротекторів зі швидкостями охолодження 1 і 8000°C/хв.

Ключові слова: фрагменти печінки, швидкості охолодження, криопротектори, ендогенне дихання, перекисні процеси.

The effect of cryopreservation factors (cooling rates and cryoprotectants in different concentrations) on the integrity of newborn piglet and adult pig liver fragments was investigated. There was demonstrated the minimum damage of studied biomaterial during cryopreservation on the peroxide processes and the intensity of endogenous respiration when using polyethylene oxides (PEO-400 and PEO-1500) as cryoprotectants with 1 and 8000°C/min cooling rates.

Key-words: liver fragments, cooling rates, cryoprotectant, endogenous respiration, peroxide processes.

В настоящее время широкое распространение получают методы клеточной и тканевой терапии, в частности, при лечении печеночной недостаточности используют изолированные клетки печени, в научных исследованиях – при изучении биофизических и биохимических процессов, которые происходят в печени *in vivo* [9, 11]. Выделять изолированные клетки печени, которые бы сохранили все функции, присущие гепатоциту, очень сложно. Например, при коллагеназном методе выделения клеток их функционально-метаболические показатели зависят от типа и чистоты ферментативного препарата [3]. В последнее время в научных исследованиях все шире используются срезы или фрагменты печени. В многоклеточных фрагментах печени сохраняются межклеточные контакты и ориентация клеток поддерживается на уровне печени *in vivo*. Сохраняются также межклеточные взаимодействия, которые принимают участие в контактном ингибировании, трансформации сигнала, гормональном и ионном транспорте [7,8]. В связи с этим можно предположить, что фрагменты

Nowadays the methods of cellular and tissue therapy are getting widely spread. In particular, when treating a liver insufficiency there are used hepatic isolated cells, in scientific investigations: when studying biophysical and biochemical processes, occurring in liver *in vivo* [9, 11]. It is very complicated to isolate liver cells, which would keep all functions, inherent to hepatocyte. For example, in a collagenase method of cell isolation their functional and metabolic indices depend on the type and purity of enzyme preparation [3]. Recently in scientific investigations the sections or liver fragments are getting the wider usage. In polycellular liver fragments there are preserved the intercellular contacts and the cell orientation is maintained at the liver level *in vivo*. The intercellular interactions, participating in a contact inhibition, signal transformation, hormonal and ion transport are kept as well [7, 8]. In this connection we can suppose, that the liver fragments are efficient as the hepatocytes are when using them in contours for hemoperfusion at liver insufficiency. In practice, in addition to liver fragments of adult pigs, those of newborn piglets can be also applied as the material for stimulating the

Адрес для корреспонденции: Сандомирский Б.П. Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина, 61015; тел.: +38 (057) 770-29-35, факс: +38 (057) 772-00-84, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

Address for correspondence: Sandomirsky B.P., Institute for Problems of Cryobiology & Cryomedicine of the Natl. Acad. Sci. of Ukraine, 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.: +38 (057) 7702935, fax: +38 (057) 7720084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

печени эффективны как и гепатоциты при их использовании в контурах для гемоперфузии при печеночной недостаточности. В практике, кроме фрагментов печени половозрелых свиней, могут применяться также фрагменты печени новорожденных поросят как материал для стимуляции регенеративных процессов в печени, но это возможно только при его наличии в достаточном количестве. Эта проблема может быть решена с помощью криоконсервирования. Но если в отношении гепатоцитов она исследована достаточно [3, 5, 11, 12], то вопросам криоконсервирования срезов, фрагментов или органов посвящены единичные работы [6-8].

Целью нашей работы было изучение влияния факторов криоконсервирования на сохранность фрагментов печени половозрелых свиней и новорожденных поросят. Было исследовано влияние таких факторов криоконсервирования, как скорость охлаждения, включая сверхбыстрые скорости, а также эффективность различных криопротекторов в зависимости от их концентрации. Показателями, которые характеризуют состояние фрагментов печени после криоконсервирования, были выбраны интенсивность дыхания, связанная с биоэнергетическими процессами в тканях, и характер перекисных процессов в фрагментах, являющийся неспецифическим ответом на повреждения биологических мембран [3,5].

Материалы и методы

Фрагменты печени получали продавливанием ее кусочков через решетку с отверстиями диаметром 0,8 мм. После этого их трижды отмывали физиологическим раствором (рН 7,4) и добавляли растворы криопротекторов в соотношении 1:1. В работе были использованы глицерин, ДМСО, ПЭО-400 и ПЭО-1500 в конечных концентрациях 10 и 20%. Материал расфасовывали в пластиковые контейнеры по 1 мл для замораживания с малыми скоростями и по 0,5 мл в контейнеры из алюминиевой фольги для замораживания с большими скоростями.

Для замораживания материала использовали: программный замораживатель УОП-6 производства СКТБ с ОП ИПКи К НАН Украины (1, 10 и 100°C/мин), устройство для замораживания биологических объектов с большими скоростями (1000, 8000 и 80000°C/мин) [2, 13]. Отогревали на водяной бане при температуре 37°C. Проникающие криопротекторы отмывали растворами сахарозы с заменой их на среду 199, в которой инкубировали фрагменты печени на протяжении 30 мин. Для биоматериала, криоконсервированного в присутствии 20%-го раствора глицерина, использовали кон-

regenerative processes in liver, but this is only possible under its presence in a sufficient amount. This problem can be solved by means of cryopreservation. But if in respect to hepatocytes it is investigated in a sufficient extent [3, 5, 11, 12], only single papers are devoted to the questions of sections, fragments or organs cryopreservation [6-8].

The aim of our work was to study the effect of cryopreservation factors on the preservation of liver fragments of adult pigs and newborn piglets. The effect of such cryopreservation factors, as cooling rate, including ultrarapid ones, as well as the efficiency of different cryoprotectants depending on their concentration were investigated. The respiration intensity, related to the bioenergetic processes in tissues, and the character of peroxide processes in fragments, being a non-specific response to the damage of biological membranes were chosen as the indices, characterising the liver fragment state after cryopreservation [3, 5].

Materials and methods

The liver fragments were obtained by pressing its pieces through a grid with 0.8 mm's holes. Afterwards they were thrice washed-out with physiological solution (pH 7.4) and the cryoprotectants solutions in 1:1 ratio were added. DMSO, PEO-400 and PEO-1500 under final 10 and 20% concentrations were used in the work. The material was packed into 1 ml plastic containers for freezing with low rates and by 0.5 ml into the containers from aluminium foil to be frozen with high rates.

UOP-6 programmable freezer, produced by Special Design and Technical Bureau with Experimental Unit of the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of the Ukraine (1, 10 and 100°C/min), a device for freezing biological objects with high rates (1000, 8000 and 80000°C/min) were used for material freezing [2, 13]. Thawing was performed on a water bath at 37°C. The penetrating cryoprotectants were washed-out using sucrose solution with their replacement by the medium 199, where the liver fragments were incubated for 30 min. For biomaterial, cryopreserved under the presence of 20% glycerol solution one used the following concentrations of sucrose solution: 2.2; 1.1; 0.55; 1.15M with physiological solution, for 10% glycerol solution: 1.1; 0.55; 0.15M. For biomaterial, cryopreserved under 20% DMSO solution presence there were used the concentrations of sucrose solutions as follows: 2.6; 1.3; 0.65; 0.15 M, for 10% DMSO solution: 1.3; 0.65; 0.15M. The respiration intensity was measured with polarograph ("Radelkis" company). In a polarograph cell with 1 ml of Krebs-Ringer medium there were added 10-20 mg of liver fragments and the respiration dynamics were registered with recorder. The respiration rate was presented in nM O₂/min of

центрации растворов сахарозы 2,2; 1,1; 0,55; 0,15M на физиологическом растворе, для 10%-го раствора глицерина – 1,1; 0,55; 0,15M соответственно. Для биоматериала, криоконсервированного в присутствии 20%-го раствора ДМСО, использовали концентрации растворов сахарозы 2,6; 1,3; 0,65; 0,15M, для 10%-го раствора ДМСО – 1,3; 0,65; 0,15M. Интенсивность дыхания измеряли на полярографе фирмы Radelkis. В ячейку полярографа, содержащую 1 мл среды Кребса-Рингера, добавляли 10-20 мг фрагментов печени и динамику дыхания регистрировали на самописце. Скорость дыхания выражали в нмоль O_2 /мин мг ткани. Интенсивность перекисных процессов определяли хемилюминесцентным методом по светосумме хемилюминесценции (ХЛ), индуцированной Fe^{++} или H_2O_2 , а также по концентрации продуктов, которые дают цветную реакцию с тиобарбитуровой кислотой (ТБК). При хемилюминесцентном методе в ячейку хемилюминесцентметра, в которой находились 1 мл физиологического раствора (рН 7,4) и 100 мкл гомогената ткани, добавляли 100 мкл раствора соли Мора или перекиси водорода. Концентрация Fe^{++} в ячейке составляла 10^{-3} ммоль, а перекиси водорода – 0,5%. Хемилюминесцентметр работал в режиме счета фотонов. Динамику свечения регистрировали на самописце и с помощью частотомера. Результаты выражали в условных единицах (усл. ед.). Концентрацию ТБК-активных продуктов (ТБКАП), которые дают цветную реакцию с ТБК, определяли по стандартной методике при длине волны 532 нм на спектрофотометре Spektromom-204 [1]. Реактивы, использованные в работе, были квалификации не ниже “х. ч.”, а для ХЛ – не ниже “ч. д. а.”. Статистическая обработка результатов проводилась по методу Стьюдента-Фишера.

Результаты и обсуждение

В табл. 1 представлены результаты, характеризующие интенсивность дыхания фрагментов печени половозрелых свиней в зависимости от скоростей охлаждения, криопротекторов и их концентрации. Наблюдалось два максимума интенсивности дыхания при скоростях охлаждения 1 и 8000°С/мин. Подобная тенденция прослеживалась и в отношении сохранности некоторых других биологических объектов [2]. Максимальное сохранение интенсивности эндогенного дыхания, при котором полученные результаты достоверно не отличаются от контроля, наблюдается при использовании в качестве криопротекторов ПЭО. В тех случаях, когда применяли ДМСО или глицерин, интенсивность дыхания была понижена приблизительно в 1,8 раза по сравнению с результатами, полученными при использовании ПЭО. Если при использовании ПЭО интенсивность

tissue mg. The intensity of peroxide processes was determined by chemoluminescent method by the chemoluminescence (CL) light sum, induced by Fe^{++} or H_2O_2 , as well as by the product concentration, providing a colour reaction with thiobarbituric acid (TBA). At a chemoluminescent method into a cell of chemoluminometer, with 1ml of physiological solution (pH 7.4) and 100 μ l of tissue homogenate, there were added 100 μ l of Mohr's salt solution and hydrogen peroxide. Fe^{++} concentration in a cell made 10^{-3} mM, and 0.5% for hydrogen peroxide. Chemoluminometer operated as the photon counter. The glow dynamics was registered with recorder by means of the frequency meter. The results were presented in relative units (rel. units). The concentration of TBA-active products (TBAAP), providing a colour reaction with TBA, was detected according to the standard method at 532 nm wavelength in the Spektromom-204 spectrophotometer [1]. The reagents, used in the work, had the qualification not lower than “chemically pure”, and not lower than “pure for analyses” for CL. Statistical processing of the results was performed using the Student-Fisher method.

Results and discussion

The Table 1 demonstrates the results, characterising the respiration intensity of the adult pig's liver fragments depending on cooling rates, cryoprotectants and their concentration. There were observed two maxima of respiration intensity at cooling rates of 1 and 8000°С/min. The similar tendency was traced in respect of certain biological object preservation as well [2]. The maximum preservation of the endogenous respiration intensity, when the obtained results do not statistically and truly differ from the control, is observed when using PEO as a cryoprotectant. In those cases, when DMSO or glycerol were applied, the respiration intensity was decreased approximately in 1.8 times in comparison with the results, obtained when using PEO.

If during PEO usage the respiration intensity at 1 and 8000°С/min cooling rates is quite the same, the maximum during glycerol and DMSO usage at 8000°С/min cooling rate makes approximately 76 and 71% of the control, correspondingly. At the 1°С/min cooling rate the maximum indices are 59 and 45% of the control correspondingly (20% concentration of cryoprotectant).

The respiration intensity of liver fragments does not practically depend on a cryoprotectant concentration. Although glycerol and DMSO lower activity in comparison with PEO can be related not only to the fact, that they are less efficient cryoprotectants for this biological object, but they penetrate into a cell and at their washing-out it is possible to an additional damage of biological structures, especially at the background of the effect of cryopreservation negative

Таблица 1. Интенсивность дыхания (нмоль O₂/мин мг ткани) фрагментов печени половозрелых свиней в зависимости от скоростей охлаждения криопротекторов и их концентрации, n=10

Table 1. Respiration intensity (nM O₂/min mg of tissue) of adult pigs' liver fragments depending on cooling rates, cryoprotectants and their concentration, n=10

| Криопротектор Cryoprotectant | Концентрация, % Concentration, % | Скорость охлаждения, °С/мин Cooling rate, °C/min | | | | | |
|--|-------------------------------------|---|-----------|-----------|-----------|------------|-----------|
| | | 1 | 10 | 100 | 1000 | 8000 | 80000 |
| Без криопротектора Without cryoprotectant | | 0,11±0,01 | 0,08±0,01 | 0,06±0,01 | 0,08±0,01 | 0,12±0,03 | 0,08±0,01 |
| Глицерин Glycerol | 10 | 0,27±0,02 | 0,22±0,01 | 0,16±0,01 | 0,21±0,02 | 0,36±0,03 | 0,11±0,01 |
| | 20 | 0,3±0,03 | 0,22±0,01 | 0,19±0,01 | 0,25±0,02 | 0,39±0,03 | 0,09±0,01 |
| ДМСО DMSO | 10 | 0,24±0,02 | 0,19±0,02 | 0,13±0,01 | 0,3±0,03 | 0,36±0,03 | 0,09±0,01 |
| | 20 | 0,23±0,02 | 0,24±0,02 | 0,15±0,03 | 0,25±0,02 | 0,36±0,03 | 0,09±0,01 |
| ПЭО – 400 PEO – 400 | 10 | 0,47±0,04* | 0,22±0,02 | 0,19±0,2 | 0,42±0,03 | 0,45±0,04* | 0,17±0,01 |
| | 20 | 0,48±0,04* | 0,24±0,02 | 0,24±0,02 | 0,44±0,04 | 0,47±0,05* | 0,15±0,03 |
| ПЭО – 1500 PEO – 1500 | 10 | 0,41±0,03* | 0,24±0,02 | 0,13±0,01 | 0,39±0,03 | 0,40±0,04* | 0,13±0,01 |
| | 20 | 0,41±0,03* | 0,2±0,02 | 0,16±0,01 | 0,36±0,03 | 0,39±0,03 | 0,14±0,01 |

Примечание: * – показатель достоверно не отличается от контроля (p>0,05).

Note: * – the index statistically and significantly differs from the control (p>0.05).

дыхания при скоростях охлаждения 1 и 8000°С/мин практически одинакова, то при использовании глицерина и ДМСО максимум при скорости охлаждения 8000°С/мин составляет примерно 76 и 71% от контроля соответственно. При скорости охлаждения 1°С/мин максимальные показатели соответственно 59 и 45% от контроля (концентрация криопротектора 20%).

Интенсивность дыхания фрагментов печени почти не зависит от концентрации криопротектора. Хотя при этом меньшая эффективность глицерина и ДМСО по сравнению с ПЭО может быть связана не только с тем, что они являются менее эффективными криопротекторами для данного биологического объекта, но и с тем, что они проникают в клетку и при их отмывании возможно дополнительное повреждение биологических структур, особенно на фоне влияния отрицательных факторов криоконсервирования. При этом клетки могут иметь не только явные, но и латентные повреждения [3], которые усугубляются и проявляются во время отмывания, а также при инкубировании после отогрева.

Аналогичные данные для фрагментов печени новорожденных поросят представлены в табл. 2. Эндогенное дыхание свежеевыделенных фрагментов печени поросят (0,57±0,05 нмоль O₂/мин мг ткани) несколько выше, чем фрагментов печени свиней (0,51±0,03 нмоль O₂/мин мг ткани). Это может

factors of. At the same time the cells can have not only evident, but latent damages as well [3], which are aggravated and manifested during washing-out, as well as at the incubation following thawing.

The similar data for liver fragments of newborn piglets are presented in the Table 2. An endogenous respiration of freshly isolated fragments of piglet's liver (0.57±0.05 nM O₂/min mg of tissue) is slightly higher, than the liver fragments of pigs (0.51±0.03 nM O₂/min mg of tissue). This can be related to a higher level of metabolism in newborn piglets. But the character of the dependency of endogenous respiration intensity on cryopreservation factors is similar to that, presented in the Table 1. The studied index when using penetrating cryoprotectants (glycerol under 10 and 20% concentration and DMSO under 10% concentration) in the piglet's liver fragments is twice less comparing with those, obtained in the pig's liver fragments. In the case of PEO use at the piglet's liver fragment cryopreservation the respiration intensity at the presence of 10% PEO-400, 10% and 20% PEO-1500 at cooling rates of 1 and 8000°С/min does not statistically and significantly differ from the control. At the same time PEO-400 has slightly higher cryoprotective efficiency, than PEO-1500. Probably, this can be explained by the fact, that during PEO interaction with water there are formed an continuous network of hydrogen bonds in the water-PEO system or the intermolecular associates with a high rate of decay. With an increase in the PEO poly-

Таблица 2. Интенсивность дыхания (нмоль O₂/мин мг ткани) фрагментов печени новорожденных поросят в зависимости от скоростей охлаждения криопротекторов и их концентрации, n=10

Table 2. Respiration intensity (nM O₂/min mg of tissue) of newborn piglets' liver fragments depending on cooling rates, cryoprotectants and their concentration, n=10

| Криопротектор Cryoprotectant | Концентрация, % Concentration, % | Скорость охлаждения, °C/мин Cooling rate, °C/min | | | | | |
|--|-------------------------------------|---|-----------|------------|-----------|------------|-----------|
| | | 1 | 10 | 100 | 1000 | 8000 | 80000 |
| Без криопротектора Without cryoprotectant | | 0,12±0,02 | 0,09±0,02 | 0,08± 0,01 | 0,11±0,01 | 0,14±0,04 | 0,08±0,01 |
| Глицерин Glycerol | 10 | 0,13±0,01 | 0,15±0,01 | 0,13±0,01 | 0,13±0,01 | 0,34±0,02 | 0,09±0,01 |
| | 20 | 0,2±0,01 | 0,17±0,01 | 0,16±0,01 | 0,17±0,01 | 0,36±0,01 | 0,1±0,01 |
| ДМСО DMSO | 10 | 0,12±0,01 | 0,13±0,01 | 0,11±0,01 | 0,15±0,01 | 0,37±0,03 | 0,13±0,01 |
| | 20 | 0,12±0,01 | 0,17±0,01 | 0,15±0,01 | 0,2±0,01 | 0,38±0,03 | 0,12±0,01 |
| ПЭО – 400 PEO – 400 | 10 | 0,49±0,03 | 0,27±0,02 | 0,22±0,2 | 0,29±0,02 | 0,52±0,04* | 0,19±0,01 |
| | 20 | 0,52±0,05* | 0,28±0,03 | 0,23±0,02 | 0,33±0,03 | 0,53±0,05* | 0,2±0,02 |
| ПЭО – 1500 PEO – 1500 | 10 | 0,44±0,03 | 0,25±0,02 | 0,2±0,02 | 0,25±0,02 | 0,42±0,03 | 0,16±0,01 |
| | 20 | 0,49±0,05* | 0,3±0,02 | 0,23±0,02 | 0,29±0,03 | 0,51±0,04* | 0,13±0,01 |

Примечание: * – показатель достоверно не отличается от контроля (p>0,05).

Note: * – the index statistically and significantly differs from the control (p>0.05).

быть связано с более высоким уровнем метаболизма у новорожденных поросят. Но характер зависимости интенсивности эндогенного их дыхания от факторов криоконсервирования подобный представленному в табл. 1. Исследуемый показатель при использовании проникающих криопротекторов (глицерин в концентрации 10 и 20% и ДМСО в концентрации 10%) на фрагментах печени поросят в 2 раза меньший по сравнению с показателями, полученными на фрагментах печени свиней. В случае использования ПЭО при криоконсервировании фрагментов печени поросят интенсивность дыхания в присутствии 10%-го ПЭО-400, 10% - и 20%-го ПЭО-1500 при скоростях охлаждения 1 и 8000°C/мин достоверно не отличается от контроля. При этом ПЭО-400 обладает несколько большей криопротекторной эффективностью, чем ПЭО-1500. Это можно объяснить, возможно, тем, что при взаимодействии ПЭО с водой образуется непрерывная сеть водородных связей в системе вода-ПЭО либо межмолекулярные ассоциаты с быстрой скоростью распада. С увеличением степени полимеризации ПЭО возрастает количество молекул воды, что может изменять характер кристаллизации водного раствора с образованием аморфного льда. В процессе взаимодействия ПЭО с мембраной биообъекта (фрагменты печени), очевидно, происходит формирование сольватной оболочки из молекул криопротектора,

merisation degree there is the augmentation of water molecule number, what can change the crystallisation character of an aqueous solution with the amorphous ice formation. During the process of PEO interaction with the bioobject membrane (liver fragment), it is evident, that the solvate membrane formation from the cryoprotectant molecules occurs, affecting the process of cell dehydration during cooling [8].

Thus, when cryopreserving liver fragment of adult pigs and newborn piglets the maximums of the integrity of endogenous respiration intensity are determined at the cooling rates of 1 and 8000°C/min. Namely these rates are efficient for the liver fragment cryopreservation. In addition to the respiration intensity, one more factor, reflecting the state of biological object after cryopreservation is the lipid peroxidation (LPO) intensity of biomembranes. A decrease in the fragment resistance to LPO is related to the fact, that when preparing the material to cryopreservation and during its washing-out after thawing there are possible the loss of both water-soluble and binding to the membranes antioxidants, as well as the induction of peroxidation as a result of shifting of metabolic balance in cells [1, 4, 10], because under physiological conditions the LPO rate is regulated along with other systems by that of glutation. This system uses NADPH as the recovery equivalents and depends on the intensity of their regeneration and consumption. Thus, the LPO intensity is closely related to the metabolic state of

которая влияет на процесс дегидратации клетки при охлаждении [8].

Таким образом, при криоконсервировании фрагментов печени половозрелых свиней и новорожденных поросят максимумы сохранности интенсивности эндогенного дыхания определяются при скоростях охлаждения 1 и 8000°C/мин. Именно эти скорости являются эффективными для криоконсервирования фрагментов печени. Кроме интенсивности дыхания, еще одним фактором, который отражает состояние биологического объекта после криоконсервирования, является интенсивность перекисного окисления липидов (ПОЛ) биомембран. Понижение устойчивости фрагментов к ПОЛ связано с тем, что при подготовке материала к криоконсервированию и при его отмывании после отогревания возможны потеря антиоксидантов как водорастворимых, так и связанных с мембранами, а также индукция перекисидации в результате смещения метаболического равновесия в клетках [1, 4, 10], так как в физиологических условиях скорость ПОЛ регулируется, наряду с остальными системами, системой глутатиона. Эта система использует в качестве восстановительных эквивалентов NADPH и зависит от интенсивности их генерации и потребления. Таким образом, интенсивность ПОЛ тесно связана с метаболическим состоянием клеток, которое зависит от его интенсивности и повреждения клеточных структур вследствие этого процесса.

В табл. 3 и 4 приведены показатели, которые отражают характер перекисных процессов в ткани. Скорость охлаждения составляла 1 и 8000°C/мин. В качестве криопротекторов использовали ДМСО и ПЭО-400 в концентрации 10%. Светосумма ХЛ, индуцированной двухвалентным железом, пропорциональна концентрации свободных радикалов и отражает интенсивность перекисидации в момент измерения. Светосумма ХЛ, индуцированной перекисью водорода, показывает устойчивость мембран к ПОЛ. Чем меньше устойчивость, тем больше светосумма. Концентрация ТБКАП дает информацию о количестве конечных продуктов ПОЛ.

Как видно из табл. 3, 4, концентрация

cells, which depends on its intensity and damage of cellular structures due to this process.

The Table 3 and 4 demonstrate the indices, reflecting the character of peroxide processes in tissue. The cooling rate made 1 and 8000°C/min. DMSO and PEO-400 in 10% concentration were used as the cryoprotectants. The light sum of CL, induced by a bivalent iron is proportional to the concentration of free radicals and reflects the peroxidation intensity in the moment of measurement. The light sum of CL, induced by hydrogen peroxide shows the membrane resistance to the LPO. The lower is the resistance, the higher is the light sum. The TBAAP concentration provides the information on the number of final LPO products.

As it is seen from the Table 3, 4 the TBAAP concentration after freeze-thawing does not considerably and truly differ from the control, although the results, obtained at the cooling rate of 1°C/min, have the tendency to the augmentation in the liver fragments of both pig and piglets. The CL intensity, induced by Fe⁺⁺ at the cooling rate of 1°C/min, statistically and truly differs from the control independently on a biological material and cryoprotectant. At the cooling rate of 8000°C/min the activation of lipid peroxidation is less manifested (the differences in comparison with the control are not statistically true). These tables demonstrate, that the resistance of studied biological material to peroxidation remains at a quite high level, although in some cases does not statistically and truly differ from the control. The presented data characterise the LPO stage in liver fragments in 30 min after thawing. During further normothermic incubation depending on the material initial state, as well as on the incubation medium composition these indices can be changed, but this requires following investigations.

Таблица 3. Интенсивность перекисных процессов в фрагментах печени новорожденных поросят и половозрелых свиней в зависимости от скоростей охлаждения. Криопротектор ДМСО, концентрация 10%, n=10

Table 3. Intensity of peroxidation processes in liver fragment of newborn piglets and adult pigs depending on cooling rates. Cryoprotectant: DMSO, 10% concentration, n=10

| Источник фрагментов печени Liver fragments source | Скорость охлаждения, °C/мин Cooling rate, °C/min | Показатели перекисного окисления Peroxidation indices | | |
|--|---|--|--|--|
| | | ТБКАП, нмоль/мг TBA AP, nM/mg | ХЛ, индуцированная Fe ⁺⁺ , усл. ед. Fe ⁺⁺ – induced CL (rel. units) | ХЛ, индуцированная H ₂ O ₂ , усл. ед. H ₂ O ₂ – induced CL (rel. units) |
| Свиней Pigs | Контроль Control | 7,8±0,4 | 108±8 | 1208±112 |
| | 1 | 8,5±0,6 | 146±10* | 1413±123 |
| | 8000 | 8,0±0,7 | 125±9 | 1273±113 |
| Поросят Piglets | Контроль Control | 8,0±0,7 | 131±12 | 1406±131 |
| | 1 | 9,0±0,8 | 173±13* | 1553±148 |
| | 8000 | 8,6±0,6 | 155±15 | 1491±132 |

Примечание: * – показатель достоверно не отличается от контроля (p>0,05).

Note: * – the index statistically and significantly differs from the control (p>0.05).

ТБКАП после замораживания-отогревания достоверно не отличается от контроля, хотя результаты, полученные при скорости охлаждения 1°C/мин, имеют тенденцию к повышению в фрагментах печени как свиней, так и поросят. Интенсивность ХЛ, индуцированной Fe⁺⁺ при скорости охлаждения 1°C/мин, достоверно отличается от контроля независимо от биологического материала и криопротектора. При скорости охлаждения 8000°C/мин активация перекисного окисления менее выражена (различия по сравнению с контролем не достоверны). Из этих же таблиц видно, что устойчивость исследуемого биологического материала к перекисному окислению остается на достаточно высоком уровне, хотя в некоторых случаях и достоверно отличается от контроля. Приведенные данные характеризуют этап ПОЛ в фрагментах печени через 30 мин после отогревания. В процессе дальнейшей нормотермической инкубации в зависимости от начального состояния материала, а также состава среды инкубации эти показатели могут изменяться, но это требует дальнейшего исследования.

Выводы

При криоконсервировании фрагментов печени половозрелых свиней и новорожденных поросят максимумы сохранности интенсивности эндогенного дыхания определяются при скоростях охлаждения 1 и 8000°C/мин.

Подбором криопротекторов и скоростей охлаждения при криоконсервировании фрагментов печени половозрелых свиней и новорожденных поросят можно сохранить интенсивность эндогенного дыхания и уровень ПОЛ в мембранах клеток на уровне, близком к контролю.

Полученные результаты позволяют перейти к исследованию функциональной активности фрагментов органов после криоконсервирования, так как сохранение этой активности является важным фактором при использовании материала в клинической практике или в научных исследованиях.

Таблица 4. Интенсивность перекисных процессов в фрагментах печени половозрелых свиней и новорожденных поросят в зависимости от скоростей охлаждения. Криопротектор – ПЭО-400, концентрация 10%, n=10

Table 4. Intensity of peroxidation processes in liver fragment of adult pigs and newborn piglets depending on cooling rates. Cryoprotectant: PEO-400, 10% concentration, n=10

| Источник фрагментов печени Liver fragments source | Скорость охлаждения, °C/мин Cooling rate, °C/min | Показатели перекисного окисления Peroxidation indices | | |
|--|---|--|--|--|
| | | ТБКАП, нмоль/мг TBA AP nM/mg | ХЛ, индуцированная Fe ⁺⁺ , усл. ед. Fe ⁺⁺ -induced CL (rel. units) | ХЛ, индуцированная H ₂ O ₂ , усл. ед. H ₂ O ₂ -induced CL (rel. units) |
| Свиней Pigs | Контроль Control 1 8000 | 7,6±0,6 | 96±7 | 1445±107 |
| | | 8,3±0,7 | 135±12* | 1406±121 |
| | | 7,8±0,5 | 118±9 | 1203±113 |
| Поросят Piglets | Контроль Control 1 8000 | 8,1±0,5 | 123±11 | 375±123 |
| | | 8,8±0,4 | 142±13* | 1513±134 |
| | | 8,3±0,6 | 131±11 | 1422±127 |

Примечание: * – показатель достоверно не отличается от контроля (p>0,05)

Note: * – the index statistically and significantly differs from the control (p>0.05)

Conclusions

When cryopreserving the liver fragments of adult pigs and newborn piglets the integrity maxima of endogenous respiration are determined at 1 and 8000°C/min cooling rates.

Using the selection of cryoprotectants and cooling rates when cryopreserving liver fragments of adult pigs and newborn piglets we can preserve the intensity of endogenous respiration and the LPO level in cell membranes at the level, close to the control.

The results obtained will permit to go over to the investigation of functional activity of the organ fragments after cryopreservation, because the preserving of this activity is an important factor when using the material in clinical practice or in scientific investigations.

References

1. *Vladimirov Yu.A., Archakov A.I.* Lipid peroxidation in biological membranes.– Moscow: Meditsina, 1972.– 16 p.
2. *Galchenko S.E.* Peculiarities of biological object cryopreservation with applying high cooling rates: Authors' abstract of thesis of the candidate of biological sciences.– Moscow, 1990.– 16 p.
3. *Hepatocyte: functional and metabolic properties/* Ed. by L.D. Lukyanova.– Moscow: Nauka, 1985.– 272 p.
4. *Kuzmenko A.I.* Characteristics of H₂O₂: initiated lipid oxidation of blood serum by kinetic parameters of chemoluminescence // *Ukr. Biokhim. Zhurn.*– 1999.– Vol.71, N4.– P. 63-67.
5. *Petrenko A. Yu.* Energetic state and metabolism of xenobiotics in isolated hepatocytes depending on conditions of cell isolation and cryopreservation: Authors' abstract of thesis of the candidate of biological sciences.– Moscow, 1993.– 30 p.
6. *Ekins S.* Vitrification of precision-cut liver slices // *Cryo-Letters.*– 1996.– Vol.17, N7.– P.7-12

Литература

1. *Владимиров Ю.А., Арчаков А.И.* Перекисное окисление липидов в биологических мембранах.– М.: Медицина, 1972.– 16 с.
2. *Гальченко С.Е.* Особенности криоконсервирования биологических объектов с применением больших скоростей охлаждения: Автореф. дис. ...канд. биол. наук.– М., 1990.– 16 с.
3. *Гепатоцит: Функционально-метаболические свойства /* Под ред. Л.Д. Лукьяновой.– М.: Наука, 1985.– 272 с.
4. *Кузьменко А.И.* Характеристика H_2O_2 – инициированного окисления липидов сыворотки крови по кинетическим параметрам хемилюминесценции // Укр.биохим.журн.– 1999.– Т.71, №4.– С. 63-67
5. *Петренко А.Ю.* Энергетическое состояние и метаболизм ксенобиотиков в изолированных гепатоцитах в зависимости от условий выделения и криоконсервирования клеток: Автореф. дис. ...канд. биол. наук.– М., 1993.– 30 с.
6. *Ekins S.* Vitrification of precision-cut liver slices // *Cryo-Letters.*– 1996.– Vol.17, N7.– P.7-12
7. *Fuller B.J., Busza A.L.* Proton NMR studies on permeation of tissue fragments by dimethyl sulphoxide: liver as a model for compact tissue // *Cryo-Letters.*– 1994.– Vol.15, № 7.– P. 131-134.
8. *Graaf I.A., Koster H.J.* Water Crystallization within Rat Precision-Cut Liver Slices in Relation to Their Viability// *Cryobiology.*– 2001.– Vol.43, №3.– P. 224-37.
9. *Imamura H., Brault A., Huet P.M.* Effect of extended cold preservation and transplantation on rat liver micro-circulation // *Hepatology.*– 1997.– Vol.25, №3.– P. 664-671.
10. *Keizo S.M., Kiyohiro D.M., Kazuo Y.D. et al.* The role of lipid peroxidation in endotoxin-induced hepatic damage and protective effect of antioxidants // *Surgery.*–1987.–Vol.101, №6.– P. 746-751.
11. *Lin C., Hou K.Y., Zhang W.X.* Studies of long-term cryopreservation of hepatocytes and their transplantation treating acute hepatic failure in Wistar rats // *Chung Hua Wai Ko Tsa Chin.*– 1994.– Vol.32, №10.– P. 178-185.
12. *Mc Kay G.S., Henderson C., Holdie E. et al.* Cryo-preservation of rat hepatocyte monolayers: cell viability and cytochrome P450 content in post-thaw cultures // *Toxicol In Vitro.* 2002.– Vol.16, №1.– P. 71-79.
13. *Pat. 4.817.397.USA, F25B 19/00.* Device for refrigeration and freezing of biological objects/ *Grischenko V.I., Tarasov V.F., Galchenko S.E., et al. / Publ.apr.4.89.(USSR)*
7. *Fuller B.J., Busza A.L.* Proton NMR studies on permeation of tissue fragments by dimethyl sulphoxide: liver as a model for compact tissue // *Cryo-Letters.*– 1994.– Vol.15, № 7.– P. 131-134.
8. *Graaf I.A., Koster H.J.* Water Crystallization within Rat Precision-Cut Liver Slices in Relation to Their Viability // *Cryobiology.*– 2001.– Vol.43, №3.– P. 224-37.
9. *Imamura H., Brault A., Huet P.M.* Effect of extended cold preservation and transplantation on rat liver micro-circulation // *Hepatology.*– 1997.– Vol.25, №3.– P. 664-671.
10. *Keizo S.M., Kiyohiro D.M., Kazuo Y.D. et al.* The role of lipid peroxidation in endotoxin-induced hepatic damage and protective effect of antioxidants // *Surgery.*–1987.–Vol.101, №6.– P. 746-751.
11. *Lin C., Hou K.Y., Zhang W.X.* Studies of long-term cryopreservation of hepatocytes and their transplantation treating acute hepatic failure in Wistar rats // *Chung Hua Wai Ko Tsa Chin.*– 1994.– Vol.32, №10.– P. 178-185.
12. *Mc Kay G.S., Henderson C., Holdie E. et al.* Cryo-preservation of rat hepatocyte monolayers: cell viability and cytochrome P450 content in post-thaw cultures // *Toxicol In Vitro.* 2002.– Vol.16, №1.– P. 71-79.
13. *Pat. 4.817.397.USA, F25B 19/00.* Device for refrigeration and freezing of biological objects/ *Grischenko V.I., Tarasov V.F., Galchenko S.E., et al. / Publ.apr.4.89.(USSR)*

Accepted in 24.12.2002

Поступила 24.12.2002