

УДК 612.35:612.6.089.67:612.085.2

*Д.В. Черкашина, И.А. Сосимчик, О.А. Семенченко,  
Е.Н. Ткачева, А.Ю. Петренко*

*Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков*

## **ВНЕСЕНИЕ БИОРЕГУЛЯТОРОВ СТВОЛОВЫХ И ПРОГЕНИТОРНЫХ КЛЕТОК В КОНСЕРВИРУЮЩИЙ РАСТВОР УЛУЧШАЕТ ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ ПЕЧЕНИ ДЛЯ ТРАНСПЛАНТАЦИИ**

Наличие в консервирующем растворе биорегуляторов стволовых и прогениторных клеток предотвращало разобщение окислительного фосфорилирования митохондрий и снижение содержания АТФ, а также улучшало прооксидантно-антиоксидантный баланс в печени после 24 ч гипотермического хранения. Функциональное состояние печени, оцененное по скорости потока желчи, под влиянием биорегуляторов оставалось на физиологическом уровне. Выраженный защитный эффект в отношении печени в условиях околонутевых температур определяет перспективность использования таких биорегуляторов в качестве компонента растворов для долгосрочного хранения изолированных органов.

**Ключевые слова:** гипотермическое хранение печени, биорегуляторы стволовых и прогениторных клеток, дыхательная активность митохондрий, уровень АТФ, прооксидантно-антиоксидантный баланс.

На сегодняшний день вопрос предупреждения ишемически-реперфузионных повреждений, возникающих при гипотермическом хранении (ГХ) печени для трансплантации, остается открытым. Одним из перспективных подходов к повышению сохранности органа является дополнение раствора хранения смесью трофических факторов, эффективность которых показана при трансплантации печени у свиней [1].

Ранее в нашей лаборатории были проведены исследования влияния биорегуляторов стволовых и прогениторных клеток (БСПК) мезенхимально-мезодермального происхождения на течение ряда экспериментальных патологий [2, 3]. Нами показано, что введение крысам БСПК за 4 часа до изоляции органа позволяет значительно улучшить его состояние после длительного ГХ и последующей нормотермической реперфузии (НР) [4].

Эти данные и тот факт, что в клинической практике возможность подготовки донора существует только в случае частичной трансплантации печени, определили цель настоящей работы — исследование возможности применения БСПК в качестве компо-

нента раствора для долгосрочного хранения изолированной печени. Кроме того, преимуществом избранного подхода, на наш взгляд, является «физиологичность» состава БСПК, в отличие от искусственно созданной смеси отдельных трофических факторов.

**Материал и методы.** Эксперименты проводили на белых беспородных крысах-самках массой 200–250 г (n=25). Все манипуляции с животными проводили в соответствии с требованиями Этического комитета Института, согласованными с правилами «Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных и других исследовательских целях» (Страсбург, 1986). Для наркоза использовали диэтиловый эфир.

В качестве источника БСПК использовали цитозоль фетальных тканей, который получали путем высокоскоростного ультрацентрифугирования гомогената тканей мезенхимально-мезодермального происхождения плодов крыс 15–16 дней гестации, стандартизацию проводили по содержанию белка [4]. В качестве раствора хранения использовали сахарозосодержащий раствор (ССР), разработанный в нашем

© Д.В. Черкашина, И.А. Сосимчик, О.А. Семенченко и др., 2011

Институте (250 мМ сахарозы, 1мМ MgSO<sub>4</sub>, 0,5 мМ CaCl<sub>2</sub>, 15 мМ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 30 мМ KН<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 % ПЭГ-8000; рН 7,4) [5].

Печень хранили в течение 24 ч при 0–4 °С в ССР, в отсутствие или при наличии БСПК (100 мкл/100 мл раствора). Затем орган реперфузировали бикарбонатным раствором Кребс–Рингера (рН 7,4) в течение 60 мин при температуре 37 °С. В ходе реперфузии для оценки секреторной функции печени производили сбор желчи. Контролем служила свежеизолированная печень.

В гомогенатах печени до и после реперфузии общепринятыми методами исследовали: дыхательную активность митохондрий, уровень АТФ, базальный уровень и скорость накопления малонового диальдегида (МДА), каталазную и GSH-пероксидазную активности [5].

Полученные результаты обрабатывали статистически с помощью пакета программы «Statistica v. 5.5». Данные оценивали, используя непараметрический U-критерий Манна–Уитни, выражали в виде  $M \pm m$ . Достоверно отличными считали результаты при  $p < 0,05$ .

**Результаты и их обсуждение.** Энергетическое состояние печени после долгосрочного хранения является важнейшей характеристикой ее сохранности. Хранение печени в ССР приводило к снижению дыхательного контроля митохондрий более чем в

2 раза (таблица). При наличии БСПК после ГХ наблюдалось повышение дыхательного контроля в 1,7 раза, а после НР — почти в 2 раза, что свидетельствует об улучшении функционального состояния митохондрий. Подтверждением этому служит значительное увеличение содержания АТФ в печени, которое при наличии БСПК было выше, чем в ССР-группе, после ГХ в 3,6 раза, а после реперфузии — в 9 раз (таблица).

Важнейшим фактором развития ишемически-реперфузионных повреждений печени в ходе хранения и последующей НР является нарушение прооксидантно-антиоксидантного баланса [4, 5]. Действительно, базальный уровень МДА после ГХ увеличился в 2 раза и оставался на этом уровне после НР. Дополнение раствора БСПК не влияло на данный показатель после хранения, однако после реперфузии наблюдалось его снижение в 1,4 раза по отношению к таковому при ГХ и в группе без БСПК. После ГХ скорость накопления МДА не изменялась, а последующая реперфузия приводила к ее двукратному увеличению. Наличие в среде БСПК вызывало снижение интенсивности индуцированного ПОЛ в 2 и 3 раза по отношению к показателю в ССР-группе после ГХ и НР соответственно. Кроме того, значения в БСПК-группе были достоверно ниже контрольных как после ГХ, так и после НР (таблица).

*Влияние БСПК на биохимические и функциональные параметры изолированной печени после ГХ и НР ( $M \pm m$ )*

Показатель	Контроль	ССР		ССР + БСПК	
		ГХ	ГХ + НР	ГХ	ГХ + НР
Дыхательный контроль	6,41±0,70	3,02±0,10 <sup>#</sup>	2,36±0,10 <sup>#^</sup>	5,12±0,40*	4,68±0,40 <sup>#*</sup>
Уровень АТФ, мкмоль/г ткани	3,85±0,40	0,72±0,10 <sup>#</sup>	0,38±0,10 <sup>#^</sup>	2,6±1,2*	3,43±1,50*
Базальный уровень МДА, пмоль/мг белка	142,3±31,7	307,9±16,4 <sup>#</sup>	325,7±26,0 <sup>#</sup>	300,1±16,7 <sup>#</sup>	222,6±13,0 <sup>#^</sup>
Скорость накопления МДА, пмоль/мг белка за 1 мин	19,0±3,9	18,9±2,1	38,1±8,3 <sup>#</sup>	9,1±2,1 <sup>#</sup>	11,3±1,5 <sup>#</sup>
Каталазная активность, мкмоль H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /мг белка за 1 мин	122,0±14,9	77,4±8,8 <sup>#</sup>	70,7±15,6 <sup>#</sup>	117,5±9,3*	91,6±17,7 <sup>#*</sup>
GSH-пероксидазная активность, мкмоль GSSG/мг белка за 1 мин	0,309±0,04	0,161±0,02 <sup>#</sup>	0,173±0,01 <sup>#</sup>	0,241±0,02 <sup>#*</sup>	0,238±0,05 <sup>#*</sup>
Скорость потока желчи, мкл/г ткани за 1 ч	16,0±1,7	6,0±1,3 <sup>#</sup>		15,4±2,5*	

Примечания: 1. n=7.

2.  $p < 0,05$ ; достоверно при сравнении с показателем: <sup>#</sup> контроля; \* ССР-группы; ^ при ГХ.

В ССР-групі в ході ГХ і наступуючої НР спостерігалося значне угнетення активності антиоксидантних ферментів. Так, каталазна активність знижувалася в 1,6 разів, а GSH-пероксидазна — в 2 рази порівняно з контролем. Введення БСПК в ССР повністю запобігало зниженню активності каталази після ГХ, а також призводило до підвищення активності GSH-пероксидази в 1,5 рази як після зберігання, так і після реперфузії (таблиця).

В доповнення до спостережуваних біохімічних змін, найбільш яскравим підтвердженням спроможності БСПК в складі розчину зберігання покращувати стан ізольованої печінки після довготривалого ГХ стало практично повне відновлення швидкості потоку жовчі в ході реперфузії, що і спостерігалося нами в ССР-групі (таблиця).

Висновок хотілося б зробити, що при попередньому введенні БСПК животної настільки вираженого ефекту в енергетичному стані печінки не спостерігалося. Ступінь сопряженности мітохондрій залишалася низкою навіть після короткотривалого ГХ, а рівень АТФ підви-

щувався тільки після 1 ч ГХ, а при продовженні терміну цей ефект вирівнювався [4, 6]. Вероятно, механізми реалізації ефектів БСПК в багатьох випадках залежать від способу введення і температурного режиму.

#### Висновки

1. БСПК в складі цитозолю фетальних тканин викликають виражене захисне дію на енергетичний стан печінки, зберігаючи ступінь сопряжения окислительного фосфорилирования і продукцію АТФ на нормальному рівні.

2. Доповнення розчину для ГХ печінки БСПК позитивно впливає на прооксидантно-антиоксидантний баланс, який порушується в процесі ГХ і НР.

3. Відновлення швидкості утворення жовчі дозволяє утвердити, що наявність БСПК в консервуючому розчині позитивно впливає на функціональний стан органу.

4. Всі спостережувані ефекти БСПК реалізуються при околонулевых температурах, що вказує на перспективність їх застосування як складової частини розчину для зберігання ізольованих органів.

#### Список литературы

1. Improved survival of orthotopic liver allograft in swine by addition of trophic factors to University of Wisconsin solution / S. Ambiru, K. Uryuhara, S. Talpe [et al.] // Transplantation. — 2004. — V. 77, № 2. — P. 302–319.
2. Cherkashina D. V. Hepatoprotective effect of fetal tissue cytosol and its thermostable fraction in rats with carbon tetrachloride-induced hepatitis / D. V. Cherkashina, A. Yu. Petrenko // Bull. Exp. Biol. Med. — 2006. — V. 141, № 4. — P. 544–547.
3. Kovalev G. A. Modulating the state of the pro-oxidant-antioxidant brain system with xenopreparations under experimental chronic alcohol poisoning / G. A. Kovalev, D. V. Cherkashina // Cell Preserv. Technol. — 2008. — V. 6. — P. 108.
4. Supplementation with fetal-specific factors ameliorates oxidative liver damage during hypothermic storage and reperfusion in a rat model / D. V. Cherkashina, O. A. Semenchenko, V. P. Grischuk [et al.] // Cell Preserv. Technol. — 2005. — V. 3, № 3. — P. 201–209.
5. Reversible mitochondrial uncoupling in the cold phase during liver preservation/reperfusion reduces oxidative injury in the rat model / A. Yu. Petrenko, D. V. Cherkashina, A. Yu. Somov [et al.] // Cryobiology. — 2010. — V. 60, № 3. — P. 293–300.
6. Перспективи застосування біорегуляторів стовбурових клітин при трансплантації печінки / Д. В. Черкашина, Е. Н. Ткачева, А. Ю. Сомов [і др.] // Проблеми криобіології. — 2005. — № 3. — С. 389–392.

#### **Д.В. Черкашина, І.О. Сосімчик, О.А. Семенченко, О.М. Ткачова, О.Ю. Петренко** **ВНЕСЕННЯ БІОРЕГУЛЯТОРІВ СТОВБУРОВИХ І ПРОГЕНІТОРНИХ КЛІТИН ДО КОНСЕРВУЮЧОГО РОЗЧИНУ ПОКРАЩУЄ ФУНКЦІОНАЛЬНІ ПОКАЗНИКИ ПЕЧІНКИ ДЛЯ ТРАНСПЛАНТАЦІЇ**

Наявність у консервуючому розчині біорегуляторів стовбурових та прогеніторних клітин попереджувала роз'єднання окислювального фосфорилування мітохондрій та зниження вмісту АТФ, а також покращувала прооксидантно-антиоксидантний баланс у печінці після 24 год гіпотермічного зберігання. Функціональний стан печінки, що оцінювали за швидкістю потоку жовчі, під впливом біорегуляторів залишався на фізіологічному рівні. Виразний захисний ефект щодо печінки за температур, близьких до нуля, визначає перспективність застосування таких біорегуляторів у якості компонентів розчинів для довгострокового зберігання ізольованих органів.

**Ключові слова:** гіпотермічне зберігання печінки, біорегулятори стовбурових і прогеніторних клітин, дихальна активність мітохондрій, рівень АТФ, прооксидантно-антиоксидантний баланс.

**D.V. Cherkashina, I.A. Sosimchyk, O.A. Semchenko, E.N. Tkacheva, A.Yu. Petrenko**  
**SUPPLEMENTATION OF PRESERVATION SOLUTION WITH BIOREGULATORS OF STEM**  
**AND PROGENITOR CELLS IMPROVES FUNCTIONAL PARAMETERS OF LIVER**  
**FOR TRANSPLANTATION**

Presence of bioregulators of stem and progenitor cells in storage solution prevented oxidative phosphorylation uncoupling and ATP content decrease and improved pro-oxidant-antioxidant balance in liver after 24 h of hypothermic storage. Due to bioregulators liver functional state estimated by bile flow rate remained at physiological level. Significant protective effect on liver at near-zero temperatures determines the prospects of such bioregulator application as a compound of solutions for long-term storage of isolated organ.

**Key words:** liver hypothermic storage, bioregulators of stem and progenitor cells, mitochondrial respiratory activity, ATP level, pro-oxidant-antioxidant balance.