Гусарева Марина Александровна, кандидат медицинских наук, заведующая отделением радиологии;
e-mail: oncorad@mail.ru; <http://orcid.org/0000-0002-9426-9662>

Тимошкина Наталья Николаевна, кандидат биологических наук, руководитель лаборатории молекулярной онкологии;
e-mail: n_timoshkina@mail.ru; <http://orcid.org/0000-0001-6358-7361>

Потемкин Дмитрий Сергеевич, младший научный сотрудник; e-mail: desmonddimon@gmail.com; <http://orcid.org/0000-0002-5221-3644>

Арапова Юлия Юрьевна, кандидат биологических наук, научный сотрудник испытательного лабораторного центра;
e-mail: juli.arapova@yandex.ru; <http://orcid.org/0000-0002-4300-6272>

Стасов Виталий Викторович, кандидат физико-математических наук, эксперт-физик по контролю за источниками ионизирующих и неионизирующих излучений отделения радиологии; e-mail: vityal_stasov@mail.ru; <http://orcid.org/0000-0002-6953-5391>

© Коллектив авторов, 2019
УДК [616-005.4+616.36]:576.311.347
DOI – <https://doi.org/10.14300/mnnc.2019.14022>
ISSN – 2073-8137

ИЗМЕНЕНИЯ МЕМБРАННОГО ПОТЕНЦИАЛА МИТОХОНДРИЙ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ДЛИТЕЛЬНОСТИ ИШЕМИИ И РЕПЕРФУЗИИ ПЕЧЕНИ У КРЫС

К. А. Попов, И. М. Быков, И. Ю. Цымбалюк, А. Н. Курзанов, А. П. Сторожук, Е. Е. Есауленко
Кубанский государственный медицинский университет, Краснодар, Россия

CHANGES IN THE MEMBRANE POTENTIAL OF MITOCHONDRIA IN DEPENDENCE ON THE CONTINUANCE OF ISCHEMIA AND REPERFUSION OF LIVER IN RATS

Popov K. A., Bykov I. M., Tsymbalyuk I. Yu., Kurzanov A. N., Storozhuk A. P., Esaulenko E. E.
Kuban State Medical University, Krasnodar, Russia

Проведено исследование изменений мембранного потенциала митохондрий гепатоцитов в зависимости от различной длительности ишемического и последующего реперфузионного периодов. Полученные результаты показали поэтапное снижение мембранного потенциала митохондрий, выделенных из ткани печени крыс после ишемического периода различной продолжительности. Снижение данного показателя достигало практически нулевых значений после 25-минутного пережатия аналога печеночно-двенадцатиперстной связки. В то же время была отмечена тенденция к восстановлению нормальных значений митохондриального мембранного потенциала в реперфузионный период, наиболее характерная для ткани печени после 10–15-минутной длительности ишемии (на 30–60 %, до 102–154 мВ). Таким образом, полученные данные отражают высокую лабильность функционального состояния митохондрий при ишемически-реперфузионном повреждении гепатоцитов и могут быть использованы для изучения особенностей течения различных гипохроэнергетических состояний, а также для оценки эффективности митохондриальных цитопротекторов в экспериментальной коррекции широкого спектра патологических процессов.

Ключевые слова: митохондрии, мембранный потенциал, сафранин, ишемия, реперфузия, печень

The study in the membrane potential of hepatocyte mitochondria in dependence on the various continuances of the ischemic and the following reperfusion period has been performed. The received data has demonstrated the gradual decrease in the membrane potential of mitochondria extracted from the liver tissue of rats after the ischemic periods of various continuances. The decrease in this index has practically reached the null-values after 25-minute clamping of the analogue of hepatoduodenal ligamentum. At the same time the tendency to the restoration of normal values for mitochondrial membrane potential at the reperfusion period has been revealed, most typically for the liver tissue after 10–15 minute ischemia (by 30–60 %, up to 102–154 mV). Thus, the received data demonstrate the high lability of the functional state of mitochondria at the ischemic-reperfusion disorder of hepatocytes and can be used for studies in the course peculiarities for various hypochroenergetical conditions as well as for evaluation of effectiveness of mitochondrial cytoprotectors within the experimental correction of wide range of pathological processes.

Keywords: mitochondria, membrane potential, safranin, ischemia, reperfusion, liver

Для цитирования: Попов К. А., Быков И. М., Цымбалюк И. Ю., Курзанов А. Н., Сторожук А. П., Есауленко Е. Е. ИЗМЕНЕНИЯ МЕМБРАННОГО ПОТЕНЦИАЛА МИТОХОНДРИЙ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ДЛИТЕЛЬНОСТИ ИШЕМИИ И РЕПЕРФУЗИИ ПЕЧЕНИ У КРЫС. *Медицинский вестник Северного Кавказа*. 2019;14(1.2):231–234.
DOI – <https://doi.org/10.14300/mnnc.2019.14022>

For citation: Popov K. A., Bykov I. M., Tsymbalyuk I. Yu., Kurzanov A. N., Storozhuk A. P., Esaulenko E. E. CHANGES IN THE MEMBRANE POTENTIAL OF MITOCHONDRIA IN DEPENDENCE ON THE CONTINUANCE OF ISCHEMIA AND REPERFUSION OF LIVER IN RATS. *Medical News of North Caucasus*. 2019;14(1.2):231-234. DOI – <https://doi.org/10.14300/mnnc.2019.14022> (In Russ.)

Ключевые нарушения при ишемически-реперфузионном синдроме связаны с переходом на анаэробное энергообеспечение клетки в период выключения кровотока и усиленной генерацией свободных радикалов после восстановления кровообращения в ткани [1, 2]. Эти процессы непосредственно связаны с метаболическими изменениями, происходящими в матриксе и на внутренней мембране митохондрий.

Одним из основных показателей функционального состояния митохондрий является мембранный потенциал, возникающий при переносе протонов по дыхательной цепи в межмембранное пространство. Мембранный потенциал обеспечивает сопряжение окисления и фосфорилирования, в результате которого синтезируется АТФ. Нарушения функционального состояния митохондрий уже на ранних этапах проявляются снижением способности генерировать мембранный потенциал, что может быть связано как с нарушением цепи переноса электронов, так и с нарушением целостности внутренней мембраны, действием разобщителей окислительного фосфорилирования и другими причинами [3, 4, 5, 6].

Цель исследования – определение изменений мембранного потенциала митохондрий гепатоцитов в зависимости от различной длительности ишемического и последующего реперфузионного периодов.

Материал и методы. В исследовании использовали 70 белых нелинейных половозрелых крыс-самцов массой 220–250 г. Все манипуляции с лабораторными животными проводили под общей анестезией Зоветилом 100 (Virbac, Франция). Моделирование ишемического повреждения печени осуществляли с помощью маневра Прингла – пережатие аналога печеночно-двенадцатиперстной связки сосудистым зажимом. После ишемического периода длительностью 10, 15, 20 или 25 минут забирали печень для исследований сразу без снятия зажима или через 30 минут после восстановления кровотока. Таким образом, были сформированы следующие группы животных: контрольная группа (группа К, интактные животные, у которых забирали печень без моделирования патологического процесса), группы животных, у которых забирали печень без восстановления кровотока, то есть в ишемическом периоде (группы 10и, 15и, 20и и 25и), группы животных, у которых забирали печень после 30-минутной реперфузии (группы 10р, 15р, 20р и 25р). Печень сразу помещали в холодную среду, содержащую не менее 40 % замороженной составляющей, для выделения митохондрий (250 мМ сахараза, 1 мМ ЭДТА и 2 мМ хлорид магния в 0,02 М трис-НСl буфере с рН 7,4) и доставляли в лабораторию. Выделение митохондрий осуществляли методом дифференциального центрифугирования с использованием центрифуги Centrifuge 5424 R (Eppendorf, Германия) при охлаждении до +2 °С [7]. Определение белка в полученной суспензии органелл осуществляли по методу Брэдфорд [7], после чего готовили рабочие растворы с концентрацией белка 3 мг/мл. Определение мембранного потенциала митохондрий осуществляли с использованием катионного флуоресцентного красителя сафранин О (AppliChem, США) в конечной концентрации в реакционной смеси 1 мкМ [8, 9]. Концентрация митохондрий в конечной смеси составляла 0,3 мг белка/мл. Энергизацию осу-

ществляли внесением в реакционную смесь 10 мкМ ротенона и 5 мМ сукцината. Для деэнергизации в реакционную смесь вносили ингибитор цитохромов 1 мМ азид натрия. Регистрацию интенсивности флуоресценции проводили с помощью спектрофлуориметра CM 2203 (Solar, Беларусь) при длине волны возбуждения – 495 нм и длине волны испускания – 586 нм. Все измерения выполняли в термостатируемой кювете при 25 °С при постоянном перемешивании. Расчет мембранного потенциала митохондрий осуществляли теоретически по формуле, предложенной и апробированной в работах [9, 10].

Статистический анализ полученных данных проводили с помощью программного обеспечения Microsoft Excel 2010 и Stat plus версия 6 (AnalystSoft Inc., США). Оценку распределения полученных данных проводили с использованием критерия Шапиро – Уилка, данные представляли в виде медианы и квартилей (1-го и 3-го). Оценку статистической значимости различий между группами животных проводили с помощью непараметрического критерия Краскела – Уоллиса с последующим, при необходимости, сравнением групп между собой с помощью критерия Манна – Уитни. Статистически значимыми считали различия при вероятности ошибки менее 5 % ($p < 0,05$).

Результаты и обсуждение. В результате проведенных исследований теоретически рассчитанный мембранный потенциал митохондрий печени крыс контрольной группы составил в среднем 180,2 мВ (табл.). Моделирование 10-минутной сосудистой изоляции печени сопровождалось значительным снижением мембранного потенциала, определенного в митохондриальной суспензии, выделенной из органа без восстановления кровотока. У животных рассматриваемой подгруппы мембранный потенциал митохондрий был на 34,6 % ниже контрольного показателя. Дальнейшее увеличение длительности ишемического периода сопровождалось прогрессирующим снижением значения анализируемого показателя (рис.).

Таблица

Мембранный потенциал митохондрий печени крыс при различной длительности ишемически-реперфузионного поражения (Me(Q1/Q3))

Исследуемые группы	Мембранный потенциал, мВ
Контрольная	180,2 (172,3/185,6)
10и	117,8 (107,1/123,5)
15и	61,5 (55,2/68,9)*
20и	28,3 (24,5/33,1)*
25и	10,1 (0/17,1)*
10р	154,7 (148,2/160,5)^
15р	102,6 (95,7/107,1)*^
20р	59,9 (54,2/60,4)*^
25р	14,3 (8,3/21,2)*

Примечание: * – $p < 0,05$ при сравнении между показателями групп животных с длительностью ишемии 10 и 15 минут, 15 и 20 минут, 20 и 25 минут; ^ – $p < 0,05$ при сравнении между показателями групп животных с одинаковой длительностью ишемии, но с реперфузией или без. Все показатели животных опытных групп статистически значимо отличались от показателя контрольной группы.

Рис. Типичные кинетические кривые интенсивности флуоресценции сафранина О в энергетизированном и деэнергетизированном состоянии митохондрий после различной по длительности ишемии печени крыс: К — митохондрии печени крысы из контрольной группы; 10', 15', 25' — образцы митохондрий печени крыс: после 10, 15 и 25-минутной сосудистой изоляции соответственно

У животных после 15-минутной сосудистой изоляции без реперфузионного периода значение мембранного потенциала митохондрий печени было снижено в 2,9 раза. Пережатие аналога печеночно-двенадцатиперстной связки на 20–25 минут и без восстановления кровотока характеризовалось значениями мембранного потенциала митохондрий печени, близкими к нулю (10–30 мВ), и тем не менее между показателями этих двух групп было зарегистрировано статистически значимое отличие. Кроме того, только среди образцов суспензий митохондрий гепатоцитов животных, перенесших 25-минутную ишемию, встречались полностью неспособные генерировать мембранный потенциал. Исследование изменений функционального состояния митохондрий печени в ранние сроки реперфузионного периода (через 30 минут после восстановления кровотока в печеночной артерии и воротной вене) было продиктовано представлениями об усугублении метаболических нарушений в данный период вследствие прогрессирования окислительных повреждений на фоне резко возникшей относительной гипероксии. Таким образом, можно было бы ожидать дальнейшего неуклонного снижения мембранного потенциала. Однако исследования показали, что в ранние сроки реперфузионного периода изменения имеют тенденцию к восстановлению адекватного функционирования митохондрий. Наиболее выраженное увеличение рассматриваемого показателя было зафиксировано в печени крыс, подвергавшихся 10–15-минутной сосудистой изоляции с 30-минутным периодом восстановления кровотока. Так, показатель животных после 10-минутной ишемии с 30-минутной реперфузией увеличивался на 31,3 % относительно аналогичного параметра крыс, подвергавшихся только 10-минутной сосудистой изоляции, при этом он только на 14 % был ниже контрольных цифр.

Мембранный потенциал митохондрий печени животных после 15-минутной ишемии с 30-минутной реперфузией возрос на 66,8 % относительно митохондрий крыс, выделенных из органа также после 15-минутной сосудистой изоляции, но без восстановления кровотока. Результаты исследования функционального состояния митохондрий печени после 20-минутного ишемического периода с 30-минутной реперфузией также показали положительную динамику восстановления мембранного потенциала,

однако его значения оставались в 3 раза ниже контрольных цифр. Только после 25-минутной сосудистой изоляции печени крыс значения мембранного потенциала митохондрий не отличались друг от друга вне зависимости от наличия или отсутствия периода восстановления кровотока. Последнее может свидетельствовать о наличии глубоких нарушений энергетического метаболизма в гепатоцитах, возможно, необратимого характера. При этом летальность среди крыс изученных опытных групп наблюдалась только после 25-минутной ишемии печени. Вероятнее всего, это обусловлено выраженными гемодинамическими нарушениями, однако вызывает интерес согласованность мобилизации функциональных резервов системы биоэнергетики клетки и других регуляторных физиологических систем.

Также следует отметить, что снижение регистрируемого *in vitro* уровня мембранного потенциала в суспензии выделенных митохондрий может быть связано как с нарушением функции органелл, так и с полной потерей ими жизнеспособности. Поэтому при 10–15-минутной ишемии печени быстрое увеличение мембранного потенциала после восстановления кровотока свидетельствует о сохранности большинства митохондрий в гепатоцитах, быстро возвращающихся к нормальному функционированию в аэробных условиях вне зависимости от действия повреждающих факторов реперфузии. В то же время 20-минутное и в особенности 25-минутное выключение органа из системного кровотока, вероятно, сопровождается гибелью значительной части митохондрий. Последнее подтверждается слабой динамикой восстановления функционального состояния митохондрий в реперфузионный период. В долгосрочной перспективе сохранение жизнеспособности печени может обеспечиваться за счет деления оставшихся органелл и регенерации сохранной части печени. В этот период важным представляется фармакологическая поддержка системы биоэнергетики клетки, а также перспективными являются разрабатываемые в последнее время технологии трансплантации митохондрий [11, 12].

Заключение. Полученные в исследовании данные отражают высокую лабильность функционального состояния митохондрий при ишемически-реперфузионном повреждении печени. При этом основные негативные тенденции связаны с действием повреждающих факторов ишемического периода, в который мембранный потенциал неуклонно снижается практически до нулевых значений при 25-минутной сосудистой изоляции печени. В ранние сроки после восстановления кровотока рассматриваемый показатель имеет тенденцию к восстановлению нормальных значений, наиболее отчетливо выраженную у крыс, подвергавшихся 10–15-минутной ишемии печени. Практически не изменялся мембранный потенциал митохондрий после 30 минут реперфузии при 20–25-минутной продолжительности предшествовавшего ишемического периода, что свидетельствует о более глубоких нарушениях энергетического метаболизма. Полученные результаты могут быть использованы для изучения особенностей течения различных гипонергетических состояний и для оценки эффективности цитопротекторов в экспериментальной коррекции широкого спектра патологических состояний, обусловленных митохондриальной дисфункцией.

Финансирование: Работа выполнена при поддержке государственного задания Министерства здравоохранения Российской Федерации (от

28.01.2015 ч. 1, раздел 1) «Осуществление прикладных научных исследований, в том числе проведение доклинических исследований лекарственных средств и клинических исследований лекарственных препаратов».

Информированное согласие: Все манипуляции с лабораторными животными проводили в соответствии с принципами и правилами, принятыми в Кон-

венции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей (Страсбург, 1986). Выполнение экспериментальных работ было одобрено локальным этическим комитетом (протокол № 51 от 23.05.2017).

Конфликт интересов. Все авторы заявляют об отсутствии потенциального конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Литература/References

1. Даниленко Л. М., Покровский М. В., Татаренкова И. А., Елагин В. В., Братчиков О. И. Фармакологическое preconditioning с ресвератролом при ишемическом/реперфузионном повреждении миокарда: роль оксида азота. *Кубанский научный медицинский вестник*. 2015;155(6):35-38. [Danilenko L. M., Pokrovsky M. V., Tatarenkova I. A., Elagin V. V., Bratchikov O. I. Pharmacological preconditioning of resveratrol in ischemic / reperfusion injury: the role of nitric oxide. *Kubanskij nauchnyj medicinskiy vestnik*. – *Kuban scientific medical journal*. 2015;155(6):35-38. (In Russ.)].
2. Цымбалюк И. Ю., Мануйлов А. М., Попов К. А., Басов А. А. Метаболическая коррекция дихлоратетом натрия ишемически-реперфузионного повреждения при сосудистой изоляции печени в эксперименте. *Новости хирургии*. 2017; 25(5):447-453. [Tsymbalyuk I. Y., Manuilov A. M., Popov K. A., Basov A. A. Metabolicheskaya korrektsiya dikhloratsetatom natriya ishemicheski-reperfuzionnogo povrezhdeniya pri sosudistoy izolyatsii pecheni v eksperimente. *Novosti Khirurgii*. – *Surgery News*. 2017; 25(5):447-453. (In Russ.)]. <https://doi.org/10.18484/2305-0047.2017.5.447>
3. Звягина В. И., Бельских Э. С., Урясьев О. М., Медведев Д. В., Киселева В. А. [и др.]. Влияние карнитина хлорида на митохондрии сердца крыс при моделировании гипергомоцистеинемии. *Медицинский вестник Северного Кавказа*. 2018;13(1-1):78-81. [Zvyagina V. I., Belskikh E. S., Uryasev O. M., Medvedev D. V., Kiseleva V. A. [et al.]. Vliyaniye karnitina khlorida na mitokhondrii serdtsa krys pri modelirovani gipergomotsisteinonii. *Meditsinskii vestnik Severnogo Kavkaza*. – *Medical News of North Caucasus*. 2018;13(1-1):78-81. (In Russ.)]. <https://doi.org/10.14300/mnnc.2018.13022>
4. Зорова Л. Д., Попков В. А., Плотноков Е. Ю., Силачев Д. Н., Певзнер И. Б. [и др.]. Функциональная значимость митохондриального мембранного потенциала. Биологические мембраны. *Журнал мембранной и клеточной биологии*. 2017;34(6):93-100. [Zorova L. D., Popkov V. A., Plotnikov E. J., Silachev D. N., Pevzner I. B. [et al.]. Funktsionalnaya znachimost mitokhondrialnogo membrannogo potentsiala. *Biologicheskiye membrany. Zhurnal membrannoy i kletchnoy biologii*. – *Membrane and Cell Biology J*. 2017;34(6):93-100. (In Russ.)]. <https://doi.org/10.7868/S0233475517060020>
5. Ионов Д. Ю., Федорова М. М., Галенко-Ярошевский П. А., Кезели Т. Д., Мирзиашвили М. Г. [и др.]. Влияние кардиотонических средств различной природы на биоэнергетические процессы в миокарде при сочетании синдрома системного воспалительного ответа и сердечной недостаточности. *Кубанский научный медицинский вестник*. 2016;156(1):52-56. [Ionov D. I., Fedorova M. M., Galenko-Yaroshevsky P. A., Kezeli T. D., Mirziashvili M. A. [et al.]. Vliyaniye kardiotonicheskikh sredstv razlichnoy prirody na bioenergeticheskiye protsessy v miokarde pri sochetanii sindroma sistemnogo vospalitel'nogo otveta i serdechnoy nedostatochnosti. *Kubanskij nauchnyj medicinskiy vestnik*. – *Kuban scientific medical journal*. 2016;156(1):52-56. (In Russ.)]
6. Dzhimak S. S., Basov A. A., Volchenko N. N., Samkov A. A., Baryshev M. G. [et al.]. Changes in the functional activity of mitochondria isolated from the liver of rat that passed the preadaptation to ultra-low deuterium concentration. *Doklady Biochemistry and Biophysics*. 2017;476(1):323-325. <https://doi.org/10.1134/S1607672917050088>
7. Panov A. V. Practical mitochondriology: pitfalls and problems in studies of mitochondria with a description of mitochondrial functions. Charleston, NC USA: Create Space; 2015.
8. Перевощикова И. В., Сорочкина А. И., Зоров Д. Б., Антоненко Ю. Н., Сафранин О. как флуоресцентный индикатор мембранного потенциала митохондрий: исследование на уровне суспензии и уровне отдельных митохондрий. *Биохимия*. 2009;74(6):814-824. [Perevoshchikova I. V., Sorochkina A. I., Zorov D. B., Antonenko Y. N., Safranin O. kak fluorestsennyi indikator membrannogo potentsiala mitokhondriy: issledovaniye na urovne suspenzii i urovne otdelnykh mitokhondriy. *Biokhimiya*. – *Biochemistry*. 2009;74(6): 663-671. (In Russ.)] <https://doi.org/10.1134/S000629790906011X>
9. Чешевик В. Т. Мембранный потенциал митохондрий гепатоцитов крыс при токсическом поражении печени. *Известия НАН Беларуси. Серия биологических наук*. 2010;2:75-80. [Cheshchevik V. T. Mitochondrial membrane potential of rat hepatocytes under toxic injury. *Izvestiya Nacional'noy akademii nauk Belarusi. Seriya biologicheskikh nauk*. – *Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus, Biological Series*. 2010;2:75-80. (In Russ.)].
10. Bunting J. R., Phan T. V., Kamali E., Dowben R. M. Fluorescent cationic probes of mitochondria. Metrics and mechanism of interaction. *Biophysical Journal*. 1989;56(5):979-993. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(89\)82743-2](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(89)82743-2)
11. Lin H. C., Liu S. Y., Lai H. S., Lai I. R. Isolated mitochondria infusion mitigates ischemia-reperfusion injury of the liver in rats. *Shock*. 2013;39(3):304-310. <https://doi.org/10.1097/SHK.0b013e318283035f>
12. McCully J. D., Levitsky S., del Nido P. J., Cowan D. B. Mitochondrial transplantation for therapeutic use. *Clinical and Translational Medicine*. 2016;5:16. <https://doi.org/10.1186/s40169-016-0095-4>

Сведения об авторах:

Попов Константин Андреевич, кандидат медицинских наук, ассистент кафедры фундаментальной и клинической биохимии; тел.: 89288824941; e-mail: naftalin444@mail.ru

Быков Илья Михайлович, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой; тел.: 89182125530; e-mail: ilya.bh@mail.ru; <http://orcid.org/0000-0001-7325-5360>

Цымбалюк Игорь Юрьевич, кандидат медицинских наук, ассистент; тел.: 89284300769; e-mail: igor_ts@inbox.ru

Курзанов Анатолий Николаевич, доктор медицинских наук, профессор; тел.: 89182125530; e-mail: kurzanov@mail.ru

Сторожук Александр Петрович, доктор медицинских наук, профессор; тел.: 89182125530; e-mail: ilya.bh@mail.ru

Есауленко Елена Евгеньевна, доктор биологических наук, доцент, профессор кафедры; тел.: 89184353523; e-mail: esaulenko@bk.ru