

# ВЕСЦІ

## НАЦЫЯНАЛЬнай АКАДЭМІІ НАВУК БЕЛАРУСІ

СЕРЫЯ БІЯЛАГІЧНЫХ НАВУК 2010 № 2

# ИЗВЕСТИЯ

## НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ НАУК БЕЛАРУСИ

СЕРИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ НАУК 2010 № 2

ЗАСНАВАЛЬНІК – НАЦЫЯНАЛЬНАЯ АКАДЭМІЯ НАВУК БЕЛАРУСІ

Часопіс выдаецца са студзеня 1956 г.

Выходзіць чатыры разы ў год

### ЗМЕСТ

<b>Рупасова Ж. А., Василевская Т. И., Яковлев А. П., Волотович А. А., Пинчукова Ю. М., Павловский Н. Б.</b> Сравнительная оценка генотипической изменчивости биохимического состава плодов видов сем. Vassiniaceae при интродукции в условиях Беларуси. ....	5
<b>Куликова Е. Я.</b> Синтаксономия и эколого-флористическая характеристика синантропной растительности г. Минска. ....	13
<b>Бондарь Ю. И., Калининченко С. А., Марченко Ю. Д.</b> Динамика радиационной обстановки в природных комплексах ближней зоны Чернобыльской АЭС. ....	19
<b>Урбанович О. Ю., Козловская З. А., Заблוצкая Е. А., Васеха В. В., Картель Н. А.</b> Использование молекулярных маркеров при создании гибридных семян яблони ( <i>Malus × domestica Borkh</i> ) с комплексом хозяйственно ценных генов. ....	25
<b>Белько Н. Б., Гордей С. И., Щетько И. С., Гордей И. А.</b> Генотипическая специфичность реакции сортов и гибридов диплоидной озимой ржи ( <i>Secale cereale</i> ) на полиплоидизацию закисью азота. ....	32
<b>Павлюк Н. В., Жукова М. И., Воронкова Е. В., Булойчик А. А., Зубкевич О. Н.</b> Использование ПЦР-анализа для идентификации генов устойчивости картофеля к <i>Globodera rostochiensis</i> . ....	36
<b>Полюхович Ю. В., Маханько О. В., Савчук А. В., Воронкова Е. В., Ермишин А. П.</b> Создание линий-посредников для преодоления межвидовой несовместимости у картофеля. ....	42
<b>Баранова Л. А., Емельянова В. П., Волотовский И. Д.</b> Гомология области гена RYR1, ассоциированной со злокачественной гипертермией, свиньи ( <i>Sus scrofa</i> ) и крупного рогатого скота ( <i>Bos taurus</i> ). ....	50

<b>Лукьяненко Л. М., Скоробогатова А. С., Слобожаннина Е. И.</b> Влияние ионов алюминия на биофизические параметры мембран эритроцитов. . . . .	55
<b>Davidovskii A. I., Veresov V. G.</b> Structural determinants of the binding of antitumor drug apogossypolone to antiapoptotic proteins Bcl-2, Bcl-xL and Mcl-1. . . . .	59
<b>Жорник Е. В.</b> Влияние искусственных углеродных нанотрубок на экспрессию гена <b>Rb</b> и жизнеспособность лимфоцитов. . . . .	62
<b>Aleschenkova Z. M., Sukhovitskaya L. A., Melnikova N. V.</b> Efficiency of pre-sowing inoculation of barley seeds with diazotrophic rhizobacteria and arbuscular mycorrhizal fungi. . . . .	66
<b>Пучкова Т. А., Щерба В. В.</b> Сравнительное изучение образования полисахаридов грибами рода <i>Lentinus</i>	70
<b>Чецевик В. Т.</b> Мембранный потенциал митохондрий гепатоцитов крыс при токсическом поражении печени . . . . .	75
<b>Титовец Э. П., Пархач Л. П., Степанова Т. С.</b> Изучение механизма переноса кислорода через эритроцитарную мембрану: роль аквапорина AQP1 . . . . .	81
<b>Корень С. В., Кулагова Т. А., Квачева З. Б., Семенкова Г. Н.</b> Изменение редокс-свойств мезенхимальных стволовых клеток костного мозга при инфицировании вирусом простого герпеса. . . . .	88
<b>Переволоцкая Т. В.</b> Оценка доз внутреннего облучения сосны обыкновенной ( <i>Pinus silvestris</i> ) при подтоплении и затоплении территории . . . . .	93
<b>Прощалькин М. Ю., Шляхтенко А. С.</b> Жалоносные перепончатокрылые (Hymenoptera, Aculeata) Национального парка «Припятский». . . . .	98
<b>Седловская С. М., Денисова С. И., Аретинская Т. Б., Трокоз В. А.</b> Влияние комплекса микроэлементов на рост и развитие дубового шелкопряда ( <i>Antheraea pernyi</i> ). . . . .	102
<b>АГЛЯДЫ</b>	
<b>Щербин Д. Г., Клайнерт Б., Брышевска М.</b> Дендримеры и их применение в биологии и медицине. . . . .	109
<b>ВУЧОНЫЯ БЕЛАРУСІ</b>	
Александр Потапович Волынец (К 75-летию со дня рождения) . . . . .	121

ИЗВЕСТИЯ НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ НАУК БЕЛАРУСИ 2010 № 2

Серия биологических наук  
на русском и белорусском языках

Рэдактар Л. Л. Б а ж к о  
Камп'ютэрная вёрстка Ю. В. Д з я н і ш ч ы к

Здадзена ў набор 16.02.2010. Падпісана ў друк 05.04.2010. Выхад у свет 19.04.2010. Фармат 60×84<sup>1</sup>/<sub>8</sub>. Папера афсетная. Ум. друк. арк. 14,88. Ул.-выд. арк. 16,4. Тыраж 134 экз. Заказ 177.  
Кошт нумару: індывідуальная падпіска – 17 780 руб., ведамасная падпіска – 44 110 руб.

Рэспубліканскае ўнітарнае прадпрыемства «Выдавецкі дом «Беларуская навука». ЛІ № 02330/0494405 ад 27.03.2009.  
Вул. Ф. Скарыны, 40. 220141, Мінск. Пасведчанне аб рэгістрацыі № 395 ад 18.05.2009.

Надрукавана ў РУП «Выдавецкі дом «Беларуская навука».

© Выдавецкі дом «Беларуская навука».  
Весці НАН Беларусі. Серыя біялагічных навук, 2010

УДК 576.311.347+615.099.08

*В. Т. ЧЕЩЕВИК*

## **МЕМБРАННЫЙ ПОТЕНЦИАЛ МИТОХОНДРИЙ ГЕПАТОЦИТОВ КРЫС ПРИ ТОКСИЧЕСКОМ ПОРАЖЕНИИ ПЕЧЕНИ**

*Институт фармакологии и биохимии НАН Беларуси, Гродно*

*(Поступила в редакцию 23.01.2009)*

**Введение.** Одним из важных показателей функционального состояния митохондрий является мембранный потенциал, представляющий разность потенциалов, которая возникает вследствие переноса протонов на внешнюю сторону внутренней мембраны митохондрий при прохождении электронов через I, III и IV комплексы дыхательной цепи. Благодаря мембранному потенциалу осуществляется связь между процессами окисления субстрата и аккумуляции образующейся при этом энергии в виде макроэргических связей молекул АТФ. Величина мембранного потенциала в митохондриях определяется не только работой электрон-транспортной цепи, но также проницаемостью внутренней мембраны и процессом синтеза АТФ [1]. Митохондрии, помимо энергообеспечения клетки, играют важную роль в регуляции многих клеточных функций и нарушение функционального состояния митохондрий – причина ряда патологических состояний. Одновременно митохондрии сами служат мишенью окислительных воздействий [2, 3]. При этом электрон-транспортная цепь митохондрий является основным источником активных форм кислорода, генерируемых вследствие неполного восстановления кислорода. Это приводит к нарушению интегральности митохондриальной мембраны, повреждению компонентов дыхательной цепи митохондрий и системы фосфорилирования, что, в свою очередь, оказывает влияние на мембранный потенциал [4–7]. Возникающие изменения мембранного потенциала могут индуцировать формирование неспецифических мембранных пор, набухание митохондрий, высвобождение проапоптотических факторов, способствовать нарушению кальциевого гомеостаза клетки [3], что играет решающую роль в процессах гибели клетки, которые могут протекать как по апоптотическому, так и по некротическому пути [5, 8].

Предполагают, что дисфункция митохондрий при интоксикации представляет начальный этап проявлений гепатотоксичности, а сами митохондрии выступают первичной мишенью гепатотропных токсинов [9]. В многочисленных исследованиях ранее было продемонстрировано нарушение структуры и функции митохондрий клеток печени при интоксикации тетрахлорметаном (CCl<sub>4</sub>) [10–12]. При CCl<sub>4</sub>-индуцируемом циррозе печени уменьшается содержание митохондрий в ткани печени, повреждается митохондриальный метаболизм [10], выражено уменьшается скорость образования АТФ [11]. Интоксикация CCl<sub>4</sub> дозозависимо нарушала степень упорядоченности фосфолипидного бислоя митохондриальных мембран [12]. Уже в ранней работе [13], описывающей эффекты острой интоксикации крыс тетрахлорметаном, обнаружено уменьшение величины митохондриального мембранного потенциала, что связано с повреждением фосфолипидного матрикса внутренней мембраны митохондрий и возрастанием ее протонной проницаемости. Недавно продемонстрировано, что интоксикация мышей CCl<sub>4</sub> приводила к уменьшению митохондриального потенциала (14,8%) и возрастанию содержания ионов Ca<sup>2+</sup> (в 2,1 раза) внутри митохондрий [14].

Существует ряд методов определения мембранного потенциала, в первую очередь, с использованием флуоресцентных зондов сафранина О, родамина, цианинов (DiOC2(3), DiSC2(3), JC-1) [15], зонда тетрафенилфосфония (региструемого соответствующим селективным электродом) [16].

Сафранин О по сравнению с другими зондами характеризуется высокой степенью потенциал-зависимого аккумуляирования в митохондриях [17]. Линейная зависимость интенсивности флуоресценции используемого нами зонда – сафранина О от величины мембранного потенциала сохраняется в широком диапазоне значений мембранного потенциала [18].

Поскольку токсический эффект тетрахлорметана зависит от дозы и длительности воздействия, целью настоящей работы было выяснить количественные изменения величины мембранного потенциала митохондрий печени крыс через 24 ч после воздействия тетрахлорметана с использованием потенциал-чувствительного флуоресцентного зонда сафранина О, сопоставить наблюдаемые изменения величины митохондриального потенциала с изменением уровня внутримитохондриального глутатиона, определить возможность регуляции величины мембранного потенциала митохондрий мелатонином. Количественную оценку величины мембранного потенциала митохондрий печени проводили путем теоретического расчета потенциала в зависимости от степени тушения флуоресценции зонда в суспензии митохондрий [19] и применения метода предварительного построения калибровочной зависимости интенсивности флуоресценции зонда от величины мембранного потенциала [20].

**Материалы и методы исследования.** В работе использовали сахарозу, сукцинат натрия, ротенон, сафранин О, валиномицин, 2,4-динитрофенол, азид натрия, L-глутамат (Sigma Aldrich, Steinheim, Germany).

Эксперимент проводили на 40 крысах-самцах линии Wistar массой 200–250 г. Острое токсическое поражение печени индуцировали путем однократного интрагастрального введения тетрахлорметана в дозе 4 г/кг массы тела (50%-ный раствор на оливковом масле, 5 мл/кг). В качестве гепатопротектора использовали антиоксидант мелатонин [21], который вводили в виде 0,3%-ного раствора в 0,9%-ном NaCl, содержащего не более 5% этанола, трехкратно внутрибрюшинно в дозе 10 мг/кг за 0,5 до и через 2 и 6 ч после интоксикации. Декапитацию животных осуществляли через 24 ч после введения четыреххлористого углерода.

Митохондрии изолировали из печени крыс по методу Джонсона и Ларди [22] при 4 °С. Для получения митохондрий использовали среду, содержащую 0,25 М сахарозы, 0,02 М Трис-НСl, 0,5 мМ ЭДТА, рН 7,2. После осаждения ядер и обломков клеток осуществляли центрифугирование супернатанта при 8500 g в течение 10 мин для получения митохондриального осадка. После отмывки митохондрии ресуспендировали в среде выделения для получения конечной концентрации белка 40 мг/мл. Определение концентрации митохондриального белка осуществляли по методу Лоури [23] с использованием в качестве стандарта бычьего сывороточного альбумина.

Величину трансмембранного потенциала митохондрий измеряли по интенсивности флуоресценции катионного липофильного зонда сафранина О ( $\lambda_{ex} = 495$  нм,  $\lambda_{em} = 586$  нм) [18, 20]. Мембранный электрический потенциал митохондрий (отрицательный на внутренней стороне) приводит к аккумуляированию зонда внутри органелл, его димеризации и тушению флуоресценции [17]. Степень тушения флуоресценции определяли с использованием спектрофлуориметра CM 2203 (Солар, Беларусь). Для измерения мембранного потенциала суспензию митохондрий (0,3 мг белка/мл) инкубировали при температуре 27 °С в среде следующего состава: 0,125 М сахарозы, 0,02 М Трис-НСl, 0,05 М KCl, 0,02 М  $\text{K}_2\text{H}_2\text{PO}_4$ , 0,005 М  $\text{MgSO}_4$ , 0,001 М ЭДТА, рН 7,5 в присутствии зонда (8 мкМ). При использовании L-глутамата (1 мМ) в качестве субстрата происходила генерация мембранного потенциала, характеризующего функционирование I, III и IV комплексов электрон-транспортной цепи митохондрий. Мембранный потенциал, отражающий активность комплексов II, III и IV, возникал при использовании в качестве субстрата дыхания митохондрий сукцината (5 мМ) в присутствии ротенона (40 мкМ). Калибровали интенсивность флуоресценции зонда при помощи протонофора 2,4-динитрофенола (36 мкМ), вызывающего полную деполяризацию мембраны митохондрий.

Результаты исследований были проанализированы параметрическим методом вариационной статистики с применением *t*-критерия Стьюдента и представлены как среднее значение 8–10 измерений  $\pm$  стандартное отклонение.

**Результаты и их обсуждение.** Накопление флуоресцентного зонда сафранина О в митохондриальном матриксе происходит в результате электрофоретической силы, действующей на катионный краситель. Высокая локальная внутримитохондриальная концентрация зонда приводит



к его агрегации и тушению флуоресценции. Т. Т. Томов предложил теоретическое выражение [19], которое соотносит трансмембранный потенциал ( $E$ ) с концентрацией суспензии дышащих митохондрий, концентрацией флуоресцентного монокатионного зонда в суспензии [ $D$ ], константой дезагрегации зонда ( $K_{Dm}$ ) и наблюдаемой степенью тушения флуоресценции ( $\epsilon$ ) при внесении в среду митохондрий. Теоретический расчет мембранного потенциала митохондрий осуществляли по уравнению

$$E = 59 \lg \{ \delta(\epsilon(K_{Dm} / 2[D])(1-\delta))^{-1/2} - 1 \},$$

где  $E$  – трансмембранный потенциал, мВ; [ $D$ ] – концентрация зонда в суспензии, М;  $K_{Dm}$  – константа дезагрегации зонда, ее принимали равной  $5 \cdot 10^{-4}$  М;  $\epsilon$  – отношение интенсивности флуоресценции зонда в присутствии энергизованных митохондрий к интенсивности флуоресценции зонда в присутствии митохондрий и 2,4-динитрофенола;  $\delta$  – коэффициент, равный отношению митохондриально-матриксного объема (0,001 мл/мг белка митохондрий) к общему объему суспензии митохондрий [17].

Экспериментальное определение мембранного потенциала митохондрий выполняли по калибровочному графику, представляющему зависимость интенсивности флуоресценции зонда от величины мембранного потенциала (рис. 1). Построение калибровочного графика осуществляли с использованием уравнения Нернста для расчета калиевого диффузионного потенциала митохондрий

$$\Delta\psi = 60 \lg [K^+]_{out} / [K^+]_{in},$$

где  $[K^+]_{in}$  равна 125 мМ [20, 24] и  $[K^+]_{out}$  – концентрация калия в среде. Для построения калибровочного графика митохондрии (0,3 мг белка/мл) ресуспендировали в среде (0,2 М сахарозы, 2,5 мМ  $MgSO_4$ , 0,001 М ЭДТА, 0,02 М Трис-НСl (рН 7,5), содержащей 8 мкМ сафранина О. Изменение немитохондриальной концентрации ионов калия (в диапазоне 0–20 мМ) в присутствии ионофора валиномицина (0,28 мкМ) приводит в случае энергизованных митохондрий (в качестве субстрата использовали 5 мМ сукцинат натрия) к поступлению ионов калия внутрь митохондрий, уменьшению потенциала и истечению катионного красителя сафранина О из органелл.

Значения мембранного потенциала митохондрий печени крыс, определенные экспериментально с помощью калибровочного графика и рассчитанные теоретически, представлены в таблице.

#### Мембранный потенциал и уровень восстановленного глутатиона митохондрий печени крыс

Группа	Потенциал, рассчитанный теоретически, мВ		Потенциал, определенный экспериментально, мВ		GSH, нмоль / мг белка
	глутамат	сукцинат	глутамат	сукцинат	
Контроль	163,5 ± 10,6	187,4 ± 10,6	140,8 ± 25,0	170,2 ± 10,7	10,2 ± 1,3
CCl <sub>4</sub>	156,7 ± 9,4	188,1 ± 28,8	125,0 ± 22,9	158,8 ± 38,2	7,6 ± 2,3*
CCl <sub>4</sub> + мелатонин	143,7 ± 4,1**	172,6 ± 30,8	75,26 ± 23,5***	136,5 ± 41,0	5,9 ± 2,3**
Мелатонин	170,1 ± 6,3	192,3 ± 7,1	154,4 ± 9,7	176,1 ± 5,7	10,9 ± 2,4

\* $P < 0,05$ , по отношению к контрольным значениям.

\*\* $P < 0,01$ , по отношению к контрольным значениям.

\*\*\* $P < 0,001$ , по отношению к контрольным значениям.

Внесение в суспензию митохондрий субстратов глутамата и сукцината приводит к тушению флуоресценции зонда сафранина О, что связано с формированием электрического потенциала

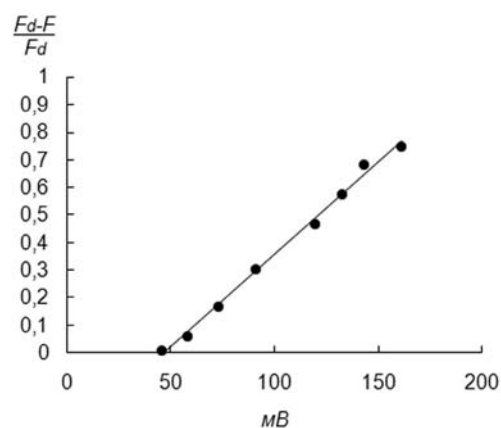


Рис. 1. Зависимость интенсивности флуоресценции зонда сафранина О от величины диффузионного  $K^+$ -зависимого потенциала:  $F$  – интенсивность флуоресценции зонда в присутствии митохондрий;  $F_d$  – интенсивность флуоресценции зонда в присутствии митохондрий и 2,4-динитрофенола. Концентрация митохондрий – 0,3 мг белка/мл. Среда измерения: 0,2 М сахарозы, 2,5 мМ  $MgSO_4$ , 0,001 М ЭДТА, 0,02 М Трис-НСl, 8 мкМ сафранин О, 5 мМ сукцинат натрия, 0,28 мкМ валиномицин (рН 7,5). Изменение немитохондриальной концентрации ионов калия (в диапазоне 0–20 мМ) в присутствии ионофора валиномицина приводит в случае энергизованных митохондрий к уменьшению мембранного потенциала и повышению интенсивности флуоресценции зонда

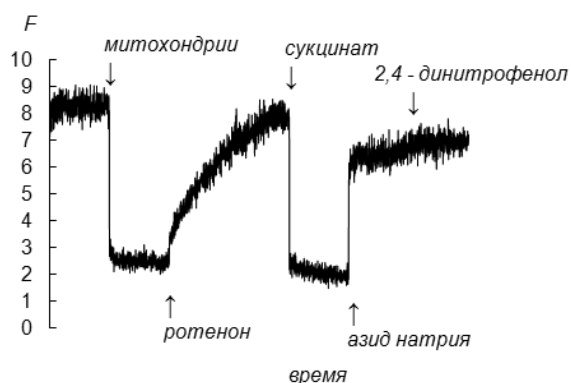


Рис. 2. Интенсивность флуоресценции зонда сафранина O в присутствии митохондрий печени крыс контрольной группы. Концентрация митохондрий – 0,3 мг белка/мл. Среда измерения: 0,125 М сахарозы, 0,02 М Трис-НСl, 0,05 М КСl, 0,02 М КН<sub>2</sub>РО<sub>4</sub>, 0,005 М MgSO<sub>4</sub>, 0,001 М ЭДТА, 8 мкМ сафранин O, рН 7,5. Стрелками указано последовательное внесение компонентов в среду измерения

четырёххлористым углеродом наблюдали тенденцию к уменьшению мембранного потенциала митохондрий при использовании глутамата в качестве субстрата (изменение составило 11%). При использовании сукцината в качестве субстрата дыхания степень деполяризации мембраны митохондрий при интоксикации была еще менее выражена по сравнению с группой контроля. При введении мелатонина интактным животным также не наблюдали значительных изменений потенциала по сравнению с животными в контрольной группе при использовании обоих субстратов. Острая интоксикация крыс тетрахлорметаном на фоне введения мелатонина приводила к более значительному снижению мембранного потенциала митохондрий (46%,  $P < 0,001$  при генерировании потенциала глутамат-зависимым дыханием) (рис. 3, таблица). В этой же экспериментальной группе при использовании сукцината в качестве субстрата наблюдали тенденцию к уменьшению мембранного потенциала (изменение составило 20%). Возможно, наблюдаемый нами эффект мелатонина обусловлен его способностью модулировать редокс-состояние клетки. Известно, что мелатонин, являясь эффективным скэвенджером свободных радикалов (гидроксильного радикала, монооксида азота, перекисей), обладает выраженными свойствами антиоксиданта [27]. Ранее нами было обнаружено [28], что введение мелатонина в фармакологических дозах ( $3 \times 10$  мг/кг массы тела) крысам при интоксикации тетрахлорметаном уменьшало степень деструктивных изменений в ткани печени. В то же время недавно была показана способность мелатонина в лейкемических клетках линии Jurkat усиливать генерацию свободных радикалов, приводя к увеличению чувствительности данных клеток к fas-индуцированному апоптозу, и данный прооксидантный эффект являлся специфичным для мелатонина и не был характерен для его предшественников [29]. При этом прооксидантные свойства мелатонина зависели от концентрации восстановленного глутатиона в клетке: чем ниже концентрация клеточного глутатиона, тем более выражена прооксидантная активность мелатонина ( $r = -0,8155$ ,  $P < 0,0001$ ) [29]. Известно, что первый комплекс дыхательной цепи является источником свободных радикалов в митохондриях [4], а мелатонин способен специфично

на внутренней мембране митохондрий (рис. 2). Известно, что генерируемый дыхательной цепью митохондрий электрохимический мембранный потенциал включает в себя как электрическую, так и химическую составляющую. Так как присутствие ионов фосфата в реакционной среде приводит к конверсии  $\Delta pH$  в электрический потенциал и вклад значения разницы рН в электрохимический потенциал становится относительно малым по сравнению с электрической составляющей, то разницей рН на внутренней мембране митохондрий в данном случае можно пренебречь [20, 24]. Величина мембранного потенциала митохондрий печени крыс контрольной группы, определяемая по калибровочному графику (таблица), соответствовала значениям потенциала, приводимым ранее для митохондрий другими авторами [20, 25, 26].

При остром токсическом поражении печени че-

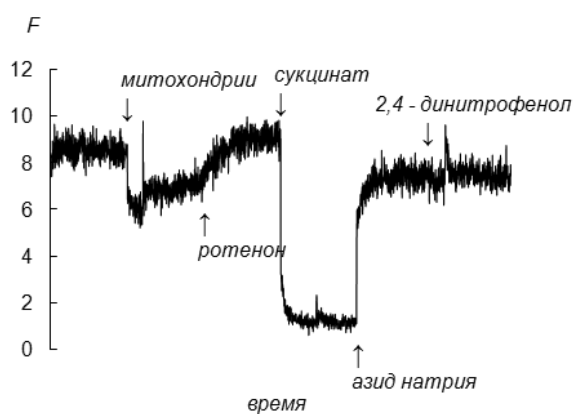


Рис. 3. Интенсивность флуоресценции зонда сафранина O в присутствии митохондрий печени крыс при острой интоксикации тетрахлорметаном на фоне введения мелатонина. Концентрация митохондрий – 0,3 мг белка/мл. Среда измерения мембранного потенциала: 0,125 М сахарозы, 0,02 М Трис-НСl, 0,05 М КСl, 0,02 М КН<sub>2</sub>РО<sub>4</sub>, 0,005 М MgSO<sub>4</sub>, 0,001 М ЭДТА, 8 мкМ сафранин O, рН 7,5. Стрелками указано последовательное внесение компонентов в среду измерения

воздействовать на данный комплекс [30]. В проведенной нами модели острой интоксикации крыс четыреххлористым углеродом мы также наблюдали резкое снижение содержания восстановленной формы глутатиона митохондрий (таблица), что отражает развивающийся при интоксикации окислительный стресс.

Уменьшение абсолютного значения потенциала митохондрий при интоксикации на фоне введения мелатонина может иметь определенный защитный эффект, уменьшая степень генерации свободных радикалов митохондриями. Так, ранее [31] было показано, что образование активных форм кислорода в митохондриях в состоянии 4 при истощении антиоксидантной защиты зависит от величины митохондриального мембранного потенциала. Кроме того, ингибирование дыхательной цепи и системы фосфорилирования митохондрий приводило к усилению генерации активных форм кислорода [31]. Ранее было показано значительное повреждение компонентов окислительно-фосфорилирующей системы митохондрий печени крыс при острой интоксикации четыреххлористым углеродом (4 г/кг массы тела) [32]. В нашем эксперименте интоксикация тетрахлорметаном также выражено нарушала сопряжение процессов окисления и фосфорилирования (данные не представлены). Обнаруженное нами отсутствие значительных изменений мембранного потенциала на фоне выраженного повреждения электрон-транспортной цепи митохондрий (таблица), возможно, способствовало генерации активных форм кислорода в митохондриях.

**Заключение.** При сравнении значений мембранных потенциалов митохондрий, определенных экспериментально с использованием калибровочной кривой, и потенциалов, рассчитанных теоретически, можно отметить, что оба используемых метода приводят к согласующимся результатам. Несмотря на это, существует определенное ограничение теоретического метода расчета мембранного потенциала митохондрий, обусловленное использованием ряда константных величин (константа дезагрегации зонда, объем матрикса митохондрий), что в неполной мере отражает степень изменения мембранного потенциала митохондрий в экспериментальных группах. Острая интоксикация крыс тетрахлорметаном связана с незначительным нарушением мембранного потенциала митохондрий (уменьшение потенциала в нашем эксперименте составило 7–11% при использовании глутамата и сукцината в качестве субстратов дыхания). Интоксикация на фоне введения мелатонина значительно нарушала митохондриальный потенциал, в первую очередь генерируемый с участием комплекса I (уменьшение потенциала составило 46% при использовании в качестве субстрата глутамат), что подтверждает специфическое взаимодействие мелатонина с данным комплексом. Ингибирование генерации потенциала комплексом I в результате введения мелатонина при сохранении активности сукцинат-зависимого пути переноса электронов может способствовать уменьшению степени эндогенной продукции активных форм кислорода митохондриями.

## Литература

1. Hafner R. P., Brown G. C., Brand M. D. // *Eur. J. Biochem.* 1990. Vol. 188. P. 313–319.
2. Duchon M. R. // *Mol. Aspects Medicine.* 2004. N 25. P. 365–451.
3. Duchon M. R. // *J. Physiol. (London).* 1999. Vol. 516. P. 1–17.
4. Han D., Canali R., Rettori D., Kaplowitz N. // *Molecular Pharmacology.* 2003. Vol. 64, N 5. P. 1137–1144.
5. Jo S. H., Son M. K., Koh H. J. et al. // *J. Biol. Chem.* 2001. Vol. 276, N 19. P. 16168–16176.
6. Kowaltowski A. J., Vercesi A. E. // *Free Radic. Biol. Med.* 1999. Vol. 26. P. 463–471.
7. Nohl H., Gille L. and Staniek K. // *Acta Biochemica Polonica.* 2004. Vol. 51, N 1. P. 223–229.
8. Arai M., Imai H., Koumura T., Yoshida M. et al. // *J. Biol. Chem.* 1999. Vol. 274, N 8. P. 4924–4933.
9. Martin E. J., Racz W. J. and Forkert P. G. // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2003. Vol. 304. P. 121–129.
10. Krahenbuhl L., Ledermann M., Lang C. and Krahenbuhl S. // *J. Hepatol.* 2000. Vol. 33, N 2. P. 216–223.
11. Krahenbuhl S., Stucki J. and Reichen J. // *Biochem. Pharmacol.* 1989. Vol. 38, N 10. P. 1583–1588.
12. Megli F. M. and Sabatini K. // *FEBS Lett.* 2004. Vol. 573. P. 68–72.
13. Gubskii I. I. // *Ukr Biokhim Zh.* 1982. Vol. 54, N 1. P. 46–49.
14. Tang X. H., Gao J., Fang F. et al. // *Am. J. Chin. Med.* 2005. Vol. 33, N 4. P. 627–637.
15. Nuydens R., Novalbos J., Dispersin G. et al. // *J. Neuroscience Methods.* 1999. Vol. 92. P. 153–159.
16. Labajova A., Kopranek J., Krivakova P. et al. // *Gen. Physiol. Biophys.* 2006. Vol. 25. P. 325–331.
17. Bunting J. R., Phan T. V., Kamali E. et al. // *Biophys. J.* 1989. Vol. 53. P. 979–993.
18. Akerman K. E. O., Jarvisalo J. O. // *Biochem. J.* 1980. N 192. P. 183–190.
19. Tomov T. T. // *J. Biochem. Biophys. Methods.* 1986. N 13. P. 29–38.

20. Akerman K. E. O., Wikström M. K. F. // FEBS Lett. 1976. Vol. 6, N 2. P. 191–197.
21. Ohta Y., Kongo–Nishimura M., Matura T. et al. // J. Pineal Res. 2004. N 36. P. 10–17.
22. Johnson D., Lardy H. A. // Methods Enzymology. 1967. Vol. 10. P. 94–96.
23. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. // J Biol Chem. 1951. Vol. 193. P. 265–275.
24. Moore A. L., Bonner W. D. // PlantPhysiol. 1982. N 70. P. 1271–1276.
25. Mildaziene V., Nauciene Z., Baniene R., Grigiene J. // Toxicological Sciences. 2002. Vol. 65. P. 220–227.
26. Nicholls D. G. // Eur. J. Biochem. 1974. Vol. 50. P. 305–315.
27. Tan D., Reiter R. J., Manchester L. C. et al. // Current Topics in Med. Chem. 2002. N 2. P. 181–197.
28. Чещевик В. Т., Заводник Л. Б., Лапшина Е. А., Заводник И. Б. // Веснік ГрГУ ім. Я. Купалы. 2009. № 1. С. 165–169.
29. Wölfler A., Caluba H. C., Abuja P. M. et al. // FEBS Lett. 2001. Vol. 502, N 3. P. 127–131.
30. Martin M., Macias M., Escames G., Reiter R. J. et al. // J. Pineal Res. 2000. N 28. P. 242–248.
31. Korshunov S. S., Skulachev V. P., Starkov A. A. // FEBS Lett. 1997. Vol. 416. P. 15–18.
32. Padma P., Setty O. H. // Life Sci. 1999. Vol. 64, N 25. P. 2411–2417.

*V. T. CHESHCHEVIK*

### MITOCHONDRIAL MEMBRANE POTENTIAL OF RAT HEPATOCYTES UNDER TOXIC INJURY

#### Summary

The changes in the membrane potential of rat liver mitochondria under acute carbon tetrachloride intoxication (4 g/kg of body weight) with and without treatment of rats by melatonin were evaluated using the fluorescence lipophilic probe safranin O. The intoxication with carbon tetrachloride tended to decrease the mitochondrial membrane potential (using glutamate but not succinate as substrate of respiration). The melatonin treatment (10 mg/kg of body weight) of control animals did not influence the membrane potential of hepatocyte mitochondria, while the melatonin treatment of intoxicated animals resulted in a significant decrease of mitochondrial membrane potential (by 46% when using glutamate but not succinate as a substrate). The inhibition of membrane potential generated by complex I while saving the activity of the electron transport succinate-dependent chain can promote to decrease the rate of endogenous reactive oxygen species production by mitochondria.