

АНН 124000  
1039)

Министерство образования Республики Беларусь  
Белорусский государственный университет  
Национальная академия наук Беларуси  
Институт биофизики и клеточной инженерии  
Белорусский республиканский фонд фундаментальных исследований



80-ЛЕТИЮ НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ НАУК БЕЛАРУСИ ПОСВЯЩАЕТСЯ

# МОЛЕКУЛЯРНЫЕ, МЕМБРАННЫЕ И КЛЕТОЧНЫЕ ОСНОВЫ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ БИОСИСТЕМ

МЕЖДУНАРОДНАЯ НАУЧНАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ

ВОСЬМОЙ СЪЕЗД БЕЛОРУССКОГО ОБЩЕСТВЕННОГО  
ОБЪЕДИНЕНИЯ ФОТОБИОЛОГОВ И БИОФИЗИКОВ

25–27 июня 2008 г., Минск, Беларусь

СБОРНИК СТАТЕЙ

В двух частях

Часть 1

Минск  
«Издательский центр БГУ»  
2008

Национальная  
библиотека  
Беларусі

## МЕМБРАННЫЙ ПОТЕНЦИАЛ МИТОХОНДРИЙ ПЕЧЕНИ КРЫС ПРИ ОСТРОЙ ИНТОКСИКАЦИИ ТЕТРАХЛОРМЕТАНОМ

В.Т. Чещевик<sup>1</sup>, Ю.З. Максимчик<sup>2</sup>, А.А. Маскевич<sup>1</sup>, И.Б. Заводник<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Гродненский государственный университет им. Я. Купалы,  
Гродно, Беларусь

<sup>2</sup>ГУ «НПЦ «Институт фармакологии и биохимии НАН Беларуси»,  
Гродно, Беларусь

Нарушения интегральности митохондриальной мембраны, дисфункции митохондрий играют решающую роль в процессах гибели клетки [1]. Электрохимический мембранный потенциал – важнейший параметр, характеризующий функциональное состояние митохондрий.

Цель настоящей работы – выяснить изменения величины мембранного потенциала митохондрий печени крыс при токсическом поражении, используя потенциал-чувствительный флуоресцентный зонд сафранин О.

*Материалы и методы.* Для исследования использовали митохондрии, изолированные из печени крыс-самцов линии Wistar массой 200-250 г. Декапитацию животных осуществляли через 24 часа после острой интоксикации тетрахлорметаном (4 г/кг массы тела). В качестве протектора использовали антиоксидант мелатонин [2], который вводили трехкратно внутрибрюшинно в дозе 10 мг/кг за 0,5 до и через 2 и 6 часов после интоксикации. В работе использовали зонд сафранин О, валиномицин, 2,4-динитрофенол (Sigma Aldrich, Steinheim, Germany).

*Результаты и их обсуждение.* Измерение трансмембранного потенциала митохондрий гепатоцитов осуществляли по интенсивности флуоресценции катионного липофильного зонда сафранина О ( $\lambda_{ex} = 495$  нм,  $\lambda_{em} = 586$  нм). Мембранный электрохимический потенциал митохондрий (отрицательный на внутренней стороне) приводит к аккумулярованию зонда внутри органелл, его димеризации и тушению флуоресценции [3]. Калибровали интенсивность флуоресценции зонда при помощи 2,4-динитрофенола, вызывающего полную диссипацию мембранного потенциала митохондрий. Теоретический расчет мембранного потенциала митохондрий осуществляли по уравнению:

$$E = 59 \log_{10} \{ \delta ( \epsilon ( K_{Dm} / 2 [D] ) ( 1 - \delta )^{-1/2} - 1 ) \},$$

где  $E$  – трансмитохондриальный поверхностный потенциал, мВ;  $[D]$  – концентрация зонда в суспензии, М;  $K_{Dm}$  – константа дезагрегации зонда, ее принимали равной  $5 \times 10^{-4}$  М;  $c$  – отношение интенсивности флуоресценции зонда в присутствии энергизованных митохондрий к интенсивности флуоресценции зонда в присутствии митохондрий и 2,4 – динитрофенола;  $\delta$  – коэффициент, равный отношению митохондриального матриксного объема к общему объему суспензии митохондрий [4].

Экспериментальное определение мембранного потенциала митохондрий выполняли по калибровочному графику зависимости интенсивности флуоресценции зонда от величины мембранного потенциала. Построение калибровочного графика осуществляли, используя уравнение Нернста для расчета калиевого диффузионного потенциала митохондрий:

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

где  $[K^+]_{in}$  принималась равной 125 мМ и  $[K^+]_{out}$  равна концентрации калия в среде.

Для построения калибровочного графика митохондрии (1 мг/мл) ресуспендировали в среде: 0,2 М сахароза, 2,5 мМ  $MgSO_4$ , 1 мМ ЭДТА, 0,02М Трис-НСl (рН 7,5), содержащей 8 мкМ сафранина. Изменение внемитохондриальной концентрации ионов калия (в диапазоне 0-20 мМ) в присутствии ионофора валиномицина приводит в случае энергизованных митохондрий (в качестве субстрата использовали 5 мМ сукцинат натрия) к поступлению ионов калия внутрь митохондрий, падению потенциала и истечению катионного красителя сафранина О из органелл. Пересечение графика с осью абсцисс соответствует потенциалу Доннана, возникающему в дезэнергизованных митохондриях в результате равновесного распределения ионов калия, и равному в митохондриях печени крыс, согласно нашим измерениям, - 65 мВ.

Мембранные потенциалы митохондрий печени крыс, определенные экспериментально и рассчитанные теоретически представлены в таблице 1.

Если сравнить значения мембранных потенциалов митохондрий, определенных экспериментально с использованием калибровочной кривой, и потенциалов, рассчитанных теоретически, то можно отметить, что оба используемых метода приводят к согласующимся результатам.

Мембранный потенциал митохондрий печени крыс, определяемый по калибровочному графику, соответствует значениям потенциала, приводимым ранее для митохондрий другими авторами [5].

Таблица. Мембранный потенциал митохондрий печени крыс

Группы	Потенциал, рассчитанный теоретически, мВ		Потенциал, определенный экспериментально, мВ	
	глутамат	сукцинат	глутамат	сукцинат
контроль	-163,5 ± 10,6	-187,4 ± 10,6	-140,8 ± 25,0	-170,2 ± 10,7
СС14	-156,7 ± 9,4	-188,1 ± 28,8	-125,0 ± 22,9	-158,8 ± 38,2
СС14+мелатонин	-143,7 ± 4,1**	-172,6 ± 30,8	-75,26 ± 23,5***	-136,5 ± 41,0
мелатонин	-170,1 ± 6,3	-192,3 ± 7,1	-154,4 ± 9,7	-176,1 ± 5,7

\*\* -  $p < 0,01$ , по отношению к контрольным значениям

\*\*\* -  $p < 0,001$ , по отношению к контрольным значениям

При остром токсическом поражении печени тетрахлорметаном наблюдали тенденцию к уменьшению мембранного потенциала митохондрий при использовании глутамата в качестве субстрата. При использовании сукцината в качестве субстрата дыхания не наблюдали деполяризации мембраны митохондрий при интоксикации по сравнению с группой контроля. Эффект интоксикации на мембранный потенциал на фоне введения мелатонина был значительно более выражен (46,5 %,  $p < 0,001$  при генерировании потенциала глутамат-зависимым дыханием). Можно предположить избирательное повреждение комплекса I митохондриальной дыхательной цепи при интоксикации или диссипацию потенциала нарушением проницаемости митохондриальной мембраны.

### Литература

1. Duchen M.R. Mitochondria in health and disease: perspectives on a new mitochondrial biology //Mol. Aspects Medicine. –2004. –№25. –P.365–451.
2. Ohta Y., Kongo-Nishimura M., Matsura T. et al. Melatonin prevents disruption of hepatic reactive oxygen species metabolism in rats treated with carbon tetrachloride //J. Pineal Res. –2004. –№ 36. –P.10–17.
3. Moore A.L., Bonner W.D. Measurements of membrane potentials in plant mitochondria with the safranine method //PlantPhysiol. –1982. –№ 70. –P.1271–1276.
4. Bunting J.R., Phan T.V., Kamali E. et al. Fluorescent cationic probes of mitochondria. Metrics and mechanism of interaction //Biophys. J. – 1989. –V.53. –P.979–993.
5. Akerman K.E.O., Järvisalo J.O. Effects of ionophores and metabolic inhibitors on the mitochondrial membrane potential within isolated hepatocytes as measured with the safranine method //Biochem. J. –1980. –№ 192. –P.183–190.