

Д. В. Черкашина, О. М. Ткачова, О. Ю. Сомов,  
О. С. Лебединський, О. А. Семенченко,  
академік НАН України В. І. Грищенко, О. Ю. Петренко

## Прооксидантно-антиоксидантний баланс у печінці щурів після холодової ішемії в присутності 2,4-динітрофенолу та наступної реперфузії

*The influence of the presence of an oxidative phosphorylation uncoupler 2,4-dinitrophenol (DNP) in a storage solution on the pro-oxidant/antioxidant balance in rat liver after 18-h cold ischemia and the following normothermic reperfusion is investigated. The presence of DNP on the cold ischemia stage led to the partial mitochondrial uncoupling, which was confirmed by suppression of lipid peroxidation intensity with prevention of antioxidant enzyme activity decrease (catalase, GSH-peroxidase, GSH-reductase). After the DNP removal during the following normothermic reperfusion, the gradual recovery of oxidative phosphorylation coupling occurs. This fact results in the improvement of the pro-oxidant/antioxidant liver state: a low level of TBA-active products and a high activity of catalase, GSH-peroxidase, and G6PDH are preserved. Thus, the supplementation of a storage solution with DNP seems to be the perspective approach to the prevention of isolated liver ischemia-reperfusion injury.*

Розвиток внутрішньоклітинного оксидативного стресу є одним з основних ушкоджуючих факторів при ішемії печінки, у тому числі холодовій, а також при наступній реоксигенації [1]. При перенесенні електронів у електрон-транспортному ланцюзі мітохондрій утворюються активні форми кисню (АФК), серед яких найбільш реакційноздатними є супероксиданіон  $O_2^{\bullet-}$ , пероксид водню  $H_2O_2$  та гідроксильний радикал  $\bullet OH$  [2]. Ці органели щодо продукції АФК перебувають на першому місці в низці мітохондрії > мікосоми > ядра. Феномен розвитку оксидативного стресу при реоксигенації після ішемії — “кисневий парадокс”, полягає в тому, що, з одного боку, поява молекулярного кисню необхідна для відновлення нормальної функції органа, а з іншого — саме реоксигенація є критичним фактором у стрімкому розвитку вільнорадикальних процесів у ішемізованих клітинах [3]. При цьому швидкість утворення АФК у мітохондріях безпосередньо залежить від ступеня сполученості дихального ланцюга і різко зростає при його блокаді, що приводить до відновлення переносників електронів і посилення їхнього витоку [4]. Таким чином, роз’єднання процесів окиснювального фосфорилування при ішемії може обумовлювати пригнічення процесів утворення АФК у мітохондріях, що, у свою чергу, може сприяти покращенню прооксидантно-антиоксидантного балансу при ішемії та при реоксигенації.

2,4-динітрофенол (ДНФ) — класичний роз’єднувач окиснювального фосфорилування, що легко проникає в клітини й мітохондрії. На моделях фокальної церебральної [5] і теплової печінкової [6] ішемії показано, що ДНФ запобігає ішемічним ушкодженням, знижує інтенсивність вільнорадикальних процесів і поліпшує функцію мітохондрій. Однак на моделі довгострокової холодової ішемії ізольованої печінки подібні експерименти не проводилися.

Мета роботи — вивчення впливу ДНФ, внесеного в середовище гіпотермічного зберігання (ГЗ), на прооксидантно-антиоксидантний баланс у печінці щурів після холодової ішемії й наступної нормотермічної реперфузії (НР).

Органи для моделювання гіпотермічного зберігання печінки отримували з білих безпородних щурів-самиць масою 200–250 г ( $n = 16$ ), які утримувалися в стандартних умовах віварію. Маніпуляції з тваринами проводили відповідно до правил “Європейської конвенції по захисту хребетних тварин, використовуваних для експериментальних і інших наукових цілей” (м. Страсбург, 1985 р.). Усі маніпуляції з тваринами виконували під наркозом із використанням діетилового ефіру.

Печінки були розділені на дві групи: 1 — контрольна, органи зберігали в середовищі без внесення ДНФ, 2 — дослідна, до середовища зберігання органів вносили ДНФ (кінцева концентрація — 100 мкМ).

Як консервуюче середовище використано сахарозо-фосфатний розчин, розроблений у нашій лабораторії [7], доповнений 1% поліетиленгліколем (ПЕГ-8000).

Після анестезії черевну порожнину тварин розтинали, до *v. cava* вводили гепарин (100 Од), після чого накладали лігатуру під *v. porta* і вводили до неї голку. Одразу після початку перфузії надсікали *v. cava inf.* для забезпечення відтоку перфузата з печінки. Орган відмивали від крові 25–40 мл охолодженого розчину Хенкса. Потім консервуючий розчин (50 мл), охолоджений до 0 °С, прокачували за допомогою перистальтичного насоса з перфузійним потоком 20–30 мл/хв. Після перфузії до *v. porta* вводили катетер, печінку ізолювали, переносили в пластикові бюкси з консервуючим розчином і зберігали в побутовому холодильнику при 4 °С протягом 18 год.

Після холодового зберігання орган відмивали сольовим розчином, що містив 1% бичачого сироваткового альбуміну у відкритій системі (для видалення роз’єднувача), а потім перфузували в рециркулюючій системі. Загальний час реперфузії становив 60 хв,  $T = 37$  °С. Перед початком реперфузії середовище насичували повітрям протягом 5 хв і доповнювали глюкозою (1 мг/моль). Швидкість потоку підтримували в діапазоні 3–4,5 мл/(г тканини·хв.) при гідростатичному тиску 30–40 мм вод. ст. Перед початком і наприкінці реперфузії відбирали зразки тканини печінки (1 г) для подальших досліджень.

Для вивчення біохімічних показників печінку гомогенізували в 50 мМ *tris*-HCl буфері, що містив 50 мМ NaCl (рН 7,4).

Базальний рівень ТБК-активних продуктів у ліпідній фракції гомогенатів печінки, що екстрагується бутанолом, визначали за методом, що ґрунтується на колориметричному визначенні інтенсивності поглинання комплексу продуктів пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ) з тіобарбітуровою кислотою (ТБК) [8]. Інтенсивність індукованого ПОЛ визначали за швидкістю накопичення ТБК-активних продуктів протягом інкубації аліквот гомогенату в прооксидантному буфері, що містив 50 мМ *tris*-HCl, 50 мМ NaCl, 0,25 мМ аскорбату та 12 мкМ FeSO<sub>4</sub> ( $T = 37$  °С, час інкубації — 10 хв) [9].

Активності ферментів системи антиоксидантного захисту в гомогенатах печінки вимірювали при постійному термостатуванні й перемішуванні. Умови визначення для кожного з них були такі:

каталаза — 0,01 М К-фосфатний буфер (рН 7,4), 0,5 мМ ЕДТА, 15 мМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>;  $T = 37$  °С, довжина хвилі 240 нм [10];

GSH-пероксидаза — 0,3 М KН<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (рН 7,0), 3 мМ ЕДТА, 1,5 мМ NaN<sub>3</sub>, 32,5 мМ GSH, 7,5 мМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>;  $T = 23$  °С, довжина хвилі 260 нм [11];

GSH-редуктаза — 0,1 М К-фосфатний буфер (рН 7,4), 0,1 мМ НАДФН, 0,5 мМ ЕДТА, 1 мМ GSSG;  $T = 37$  °С, довжина хвилі 340 нм [12];

Г6ФДГ — 0,13 М *tris*-HCl (рН 7,6), 80 мМ MgCl<sub>2</sub>, 3,5 мМ НАДФ<sup>+</sup>, 7,5 мМ глюкозо-6-фосфату;  $T = 37$  °С, довжина хвилі 340 нм [13].

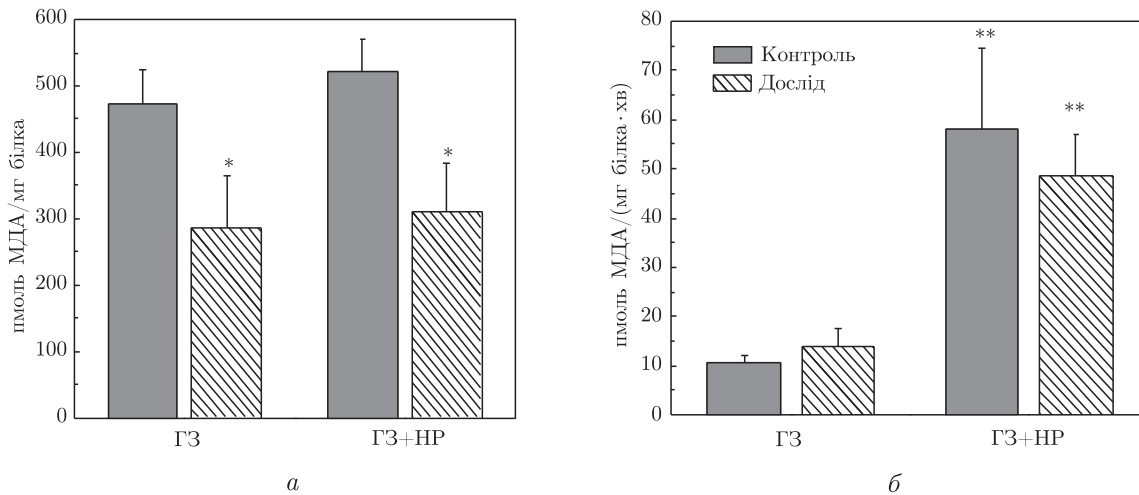


Рис. 1. Базальний рівень (а) і швидкість накопичення (б) ТБК-активних продуктів у печінці після 18 год холодового зберігання та наступної реперфузії.

\* —  $p < 0,05$  відносно контролю; \*\* —  $p < 0,05$  відносно зберігання

Вміст білка визначали біуретовим методом.

Виміри інтенсивності поглинання зразків проводили на спектрофотометрі “Сару-50” (Австралія).

Отримані результати обробляли статистично за допомогою пакета програм “Statistica v.5.5” і “Origin 6.0”. Дані оцінювали, використовуючи параметричний критерій Стюдента–Фішера, виражали у вигляді  $M \pm m$ . Достовірно відмінними вважали результати при  $p < 0,05$ .

Ефективну концентрацію ДНФ у середовищі зберігання було визначено в серії попередніх експериментів, у яких печінку щурів насичували середовищем, що містило різні концентрації ДНФ, зберігали протягом 1 год за умов гіпотермії, а потім відмивали. Критерієм ефективності вважали пригнічення інтенсивності процесів ПОЛ. Мінімальна ефективна кінцева концентрація ДНФ у консервуючому середовищі становила 100 мкМ. За такої концентрації ДНФ відбувалося стійке дворазове зниження рівня ТБК-активних продуктів у печінці як на етапі зберігання, так і після наступної реперфузії. У зв’язку з цим у подальших дослідженнях у середовище ГЗ вносили ДНФ у кінцевій концентрації 100 мкМ.

Після 18 год ГЗ печінки базальний рівень ТБК-активних продуктів у контрольній групі становив  $(471,8 \pm 52,3)$  пмоль МДА/мг білка. Після реперфузії істотних змін цього показника не спостерігалось. Внесення ДНФ у середовище ГЗ приводило до зниження в 1,7 раза базального рівня ТБК-активних продуктів як після консервування, так і після реперфузії ( $p < 0,05$ ) (рис. 1, а).

Щодо швидкості накопичення ТБК-активних продуктів спостерігалась інша динаміка. Після ГЗ було виявлено досить низьку інтенсивність індукованого ПОЛ в обох групах — на рівні 10–14 пмоль МДА/(мг білка·хв). Після НР відбувалося 5-разове збільшення показника; внесення ДНФ не запобігало цьому підвищенню ( $p < 0,001$ ) (див. рис. 1, б).

Для розуміння механізмів часткового пригнічення вільнорадикальних процесів необхідно було оцінити стан системи антиоксидантного захисту. В експериментах вивчалися активності основних ферментів цієї системи — каталази, GSH-пероксидази, GSH-редуктази, Г6ФДГ.

Після 18 год ГЗ у контрольній групі каталазна активність становила ( $76,1 \pm 18,7$ ) мкмоль  $H_2O_2$ /(мг білка · хв), 60-хвилинна реперфузія печінки не впливала на цей показник. У дослідній групі активність ферменту достовірно перевищувала контроль в 1,5 раза як після ГЗ, так і після реперфузії ( $p < 0,05$ ) (табл. 1).

Подібна динаміка спостерігалася і у відношенні GSH-пероксидазної активності, однак на етапі ГЗ достовірних відмінностей між контрольною й дослідною групою не виявлено, що може бути обумовлено високою гетерогенністю значень у дослідній групі. Після НР активність ферменту за умов внесення в середовище зберігання ДНФ була в 1,4 раза вищою, ніж у контролі ( $p < 0,05$ ) (див. табл. 1).

Як після 18 год ГЗ печінки, так і після НР (див. табл. 1) у контрольній групі спостерігалися низькі значення GSH-редуктазної активності на рівні 4–5 нмоль НАДФН/(мг білка · хв). Внесення ДНФ частково (на 25%) запобігало зниженню GSH-редуктазної активності лише на етапі ГЗ ( $p < 0,05$ ), наступна реперфузія нівелювала ці зміни.

Щодо Г6ФДГ активності виявлено, що достовірно її збільшення в дослідній групі відносно контрольної відбувалося тільки після 18 год ГЗ і наступної НР ( $p < 0,05$ ). Однак після ГЗ спостерігалась тенденція до її підвищення, невірогідність якого, як і у випадку GSH-пероксидазної активності, може бути обумовлена високою гетерогенністю значень у дослідній групі (див. табл. 1).

Таким чином, внесення до консервуючого середовища 100 мкМ ДНФ дозволило покращити прооксидантно-антиоксидантний стан печінки після ГЗ, головним чином за рахунок попередження пригнічення активності антиоксидантних ферментів та зменшення інтенсивності вільнорадикальних процесів. Можливим поясненням може бути попередження утворення супероксиданіона в мітохондріях при їхньому частковому роз'єднанні, що, у свою чергу, перешкоджає розвитку внутрішньоклітинного оксидативного стресу.

Слід відзначити, що каталаза є ферментом, що може бути прямо інактивований продуктами ПОЛ [14]. Таким чином, при зберіганні печінки в присутності ДНФ, імовірно, відбувається саме запобігання зниженню активності ферменту, а не її відновлення. Більш важливим фактором у запобіганні розвитку внутрішньоклітинного оксидативного стресу мітохондріального походження є нормалізація активності GSH-пероксидази, що відповідає за утилізацію пероксиду водню, утвореного в ході роботи електрон-транспортного ланцюга мітохондрій, у нашому випадку роз'єднаних ДНФ, тому що каталаза в цих органелах відсутня. Неповна кореляція між GSH-пероксидазною і редуктазною активностями має свої пояснення. Відомо, що поповнення пула відновленого глутатіону можливе двома шляхами:

Таблиця 1. Активність антиоксидантних ферментів у гомогенатах печінки після гіпотермічного зберігання й нормотермічної реперфузії ( $M \pm m$ ,  $n = 5-7$ )

Показник	Контроль		Дослід	
	ГЗ	ГЗ + НР	ГЗ	ГЗ + НР
Каталазна активність, мкмоль $H_2O_2$ /(мг білка · хв)	$76,1 \pm 18,7$	$78,6 \pm 13,0$	$110,7 \pm 29,2^*$	$110,0 \pm 16,6^*$
GSH-пероксидазна активність, мкмоль GSSG/(мг білка · хв)	$0,176 \pm 0,03$	$0,189 \pm 0,02$	$0,240 \pm 0,07$	$0,274 \pm 0,07^*$
GSH-редуктазна активність, нмоль НАДФН/(мг білка · хв)	$5,0 \pm 0,7$	$4,5 \pm 0,6$	$6,8 \pm 1,0^*$	$5,7 \pm 1,6$
Г6ФДГ активність, нмоль НАДФН/(мг білка · хв)	$13,0 \pm 3,3$	$12,7 \pm 2,3$	$17,9 \pm 6,2$	$20,6 \pm 3,6^*$

\* $p < 0,05$  відносно контролю.

відновленням у глутатіонредуктазній реакції й біосинтезом *de novo* за допомогою ключового ферменту гамма-глутамілцистеїнілсинтетази. Нормальні значення GSH-редуктазної активності на етапі ГЗ можуть бути обумовлені низьким рівнем пероксидних процесів і пов'язаним із цим нормальним функціонуванням GSH-залежної системи, без її перенавантаження.

За умов НР видалення ДНФ відбувається поступово, отже, мембранний потенціал, що був знижений або розсіяний у процесі ГЗ, також повільно відновлюється. За відсутності ДНФ у консервуючому розчині при реперфузії печінки відновлення мембранного потенціалу відбувається значно швидше, що приводить до утворення мітохондріями АФК, ініціації процесів ПОЛ з можливим вивільненням вільних жирних кислот. Подальше окиснення останніх може спричинити утворення агресивних сполук, здатних ушкоджувати мітохондріальну ДНК, аконітазу й інші важливі матрикслокалізовані компоненти мітохондрій [15].

На етапі реперфузії, імовірно, діють інші механізми, які дозволяють запобігти збільшенню базального рівня ТБК-активних продуктів, але не в змозі вплинути на інтенсивність індукованого ПОЛ. Повернення органа до фізіологічних температур сприяє оптимізації роботи антиоксидантних ферментів. Таким чином, незважаючи на інтенсивну реоксигенацію клітин, що сприяє запуску процесів ПОЛ, включаються додаткові захисні механізми, що реалізуються ферментативною системою антиоксидантного захисту. А видалення з печінки роз'єднувача при реперфузії, що дозволяє повноцінно функціонувати мітохондріям, може приводити до підвищення реактивності прооксидантної системи, але не впливати на сукупну кількість вільних радикалів.

Що стосується глутатіонзалежної системи, то на етапі реперфузії поповнення пула глутатіону можливе шляхом біосинтезу, що обумовлюється, зокрема, поліпшенням роботи мітохондрій, передчасному ушкодженню яких запобігає ДНФ. Активність GSH-редуктази багато в чому залежить від наявності відновного еквівалента НАДФН, що генерується в Г6ФДГ реакції.

Деяка невідповідність у динаміці GSH-залежних ферментів і Г6ФДГ може свідчити про те, що пул НАДФН перерозподіляється у зв'язку зі зміненими потребами клітини в окиснювально-відновних еквівалентах. Крім того, не варто нехтувати тим фактом, що НАДФН є молекулою, яка стабілізує структуру каталази, тому, імовірно, що на тлі підвищення швидкості утворення ТБК-активних продуктів після реперфузії висока активність каталази обумовлена достатньою кількістю НАДФН, а пул GSH поповнюється за рахунок біосинтезу *de novo*.

Таким чином, у роботі вперше показано, що внесення в середовище зберігання роз'єднувача мітохондріального окиснювального фосфорилювання 2,4-динітрофенолу забезпечує захисний ефект, що реалізується, зокрема, завдяки позитивним змінам прооксидантно-антиоксидантного балансу в ізольованій печінці.

1. *Jassem W., Fuggle S. V., Rela M. et al.* The role of mitochondria in ischemia/reperfusion injury // *Transplantation*. – 2002. – **27**, No 73. – P. 493–499.
2. *Grace P. A.* Ischemia-reperfusion injury // *Brit. J. Surg.* – 1994. – **81**. – P. 637–647.
3. *Myers C. L., Weiss S. J., Kirsh M. M. et al.* Involvement of hydrogen peroxide and hydroxyl radical in the “oxygen paradox”: Reduction of creatine kinase release by catalase, allopurinol or deferoxamine, but not by superoxide dismutase // *J. Mol. and Cell. Cardiol.* – 1985. – **17**. – P. 675–684.
4. *St-Pierre J., Buckingham J. A., Roebeck S. J. et al.* Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain // *J. Biol. Chem.* – 2002. – **277**, No 47. – P. 44784–44790.
5. *Korde A. S., Pettigrew L. C., Craddock S. D., Maragos W. F.* The mitochondrial uncoupler 2,4-dinitrophenol attenuates tissue damage and improves mitochondrial homeostasis following transient focal cerebral ischemia // *J. Neurochem.* – 2005. – **94**, No 6. – P. 1676–1684.

6. Okuda M., Lee H. C., Kumar C., Chance B. Comparison of the effect of a mitochondrial uncoupler, 2, 4-dinitrophenol and adrenaline on oxygen radical production in the isolated perfused rat liver // *Acta physiol. scand.* – 1992. – **145**, No 2. – P. 159–168.
7. Kravchenko L. P., Petrenko A. Yu., Somov A. Yu. et al. Respiratory activity of isolated rat hepatocytes following cold storage and subsequent rewarming: a comparison of sucrose-based and University of Wisconsin solutions // *Cryobiology.* – 2001. – **42**, No 3. – P. 218–221.
8. Ohkawa H., Ohishi N., Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction // *Anal. Biochem.* – 1979. – **95**, No 2. – P. 351–358.
9. Buege J. A., Aust S. D. *Methods of Enzymology* / Ed. S. Fleisher, I. Packer. – New York: Academic Press, 1978. – P. 302–310.
10. Aebi H. Catalase in vitro // *Methods Enzymol.* – 1984. – **105**. – P. 121–127.
11. Rotruck J. T., Pope A. L., Ganther H. E. et al. Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase // *Science.* – 1973. – **179**, No 73. – P. 588–590.
12. Carlberg I., Mannervik B. Glutathione reductase // *Methods Enzymol.* – 1985. – **113**. – P. 484–490.
13. Rudack D., Chisholm E. M., Holten D. Rat liver glucose 6-phosphate dehydrogenase // *J. Biol. Chem.* – 1971. – **246**. – P. 1249–1254.
14. Pigeolet E., Corbisier P., Houbion A. et al. Glutathione peroxidase, superoxide dismutase, and catalase inactivation by peroxides and oxygen derived free radicals // *Mech. Ageing Dev.* – 1990. – **51**, No 3. – P. 283–297.
15. Jin Y., McEwen M. L., Nottingham S. A. et al. The mitochondrial uncoupling agent 2,4-dinitrophenol improves mitochondrial function, attenuates oxidative damage, and increases white matter sparing in the contused spinal cord // *J. Neurotrauma.* – 2004. – **21**, No 10. – P. 1396–1404.

*Інститут проблем кріобіології  
і кріомедицини НАН України, Харків*

*Надійшло до редакції 16.04.2007*