

**В.Ф. Сагач, Е.Ф. Кахановський, В.С. Горбовець**

## **Відкривання мітохондріальної пори за умов оксидативного стресу при ішемії–реперфузії тканин стегна**

*Исследования проводились на 17 особах с острым тромбозом бедренной артерии с целью выявления стабильного митохондриального фактора, высвобождаемого в кровь при ишемии–реперфузии нижних конечностей, а также изучения возможности его использования в качестве маркера открывания митохондриальной поры при оксидативном стрессе. Определяли содержание малонового диальдегида (МДА) как показателя оксидативного стресса и ферментативную активность каталазы, с помощью которой можно оценивать состояние антиоксидантной защиты, а также высвобождение митохондриального фактора в качестве маркера открывания митохондриальной поры при ишемии–реперфузии, сопровождающей оперативное вмешательство. Анализ полученных результатов свидетельствует о том, что в условиях ишемии–реперфузии нижних конечностей, показатели состояния анти- и прооксидантной систем изменялись характерным для оксидативного стресса образом: содержание МДА в крови при реперфузии нижних конечностей повышалось, а активность каталазы, наоборот, снижалась. Впервые было показано, что при реперфузии нижних конечностей в кровь высвобождается митохондриальный фактор, регистрируемый с помощью спектрофотометрического метода на длине волны 245 нм, который сопровождает открывание митохондриальной поры. Полученные результаты указывают на то, что определение митохондриального фактора, высвобождающегося в кровь при реперфузии нижних конечностей, может служить эффективным способом в диагностике развития оксидативного стресса в поврежденных тканях при ишемии–реперфузии нижних конечностей.*

### **ВСТУП**

Нині порушення діяльності серцево-судинної системи є одними з найбільш вагомих соціальних проблем у зв'язку з їх широким розповсюдженням і тяжкими наслідками. Порушення в артеріях нижніх кінцівок складають 80 % загальної патології артеріальної системи. Щорічна кількість випадків критичної ішемії кінцівок варіює від 50 до 100 на кожні 100 тис. населення [11]. Висока летальність, тривала та стійка інвалідизація, значний період непрацездатності – соціальні проблеми, що складно вирішуються, це зумовлює актуальність проблеми ішемічного ушкодження нижніх

кінцівок при судинній патології. При гострому артеріальному тромбозі нижніх кінцівок звичайно проводиться хірургічна тромбоектомія для відновлення артеріального кровотоку в ушкодженій кінцівці. На жаль, ця операція часто супроводжується розвитком ішемічно-реперфузійного синдрому, мультифакторного процесу ушкодження та дисфункції тканин, що проявляється в порушенні цілісності клітинних мембран, активації процесів апоптозу і некрозу клітин внаслідок порушення енергетичного та іонного обміну, а також збільшення продукції токсичних форм кисню [3, 10, 12, 15, 19]. Внутрішньоклітинною мішенню ушкодження є мітохондрії, в яких

© В.Ф. Сагач, Е.Ф. Кахановський, В.С. Горбовець

під впливом несприятливих факторів відбувається раптове збільшення проникності обох мітохондріальних мембран і відкриття мітохондріальної пори (МП). Останнє, в свою чергу, супроводжується виходом із мітохондрій цілої низки речовин з молекулярною масою до 1500 Да, включаючи цитохром *c*, фактор індукції апоптозу та інші проапоптотичні білки [14, 17, 18], для яких внутрішня мітохондріальна мембрана за фізіологічних умов є непроникною. Ці метаболіти запускають процес розвитку порушень, які призводять до загибелі клітин. На підставі даних експериментів, присвячених визначенню за допомогою спектрофотометричної реєстрації стабільного фактора, який вивільнюється під час реперфузії ізолюваного за методом Лангендорфа, ішемізованого серця експериментальних тварин, запропоновано метод ранньої діагностики наслідків ішемії–реперфузії [8, 9, 16]. Зокрема, було показано, що відкриття МП є ключовим моментом у порушеннях функціонального стану клітин міокарда і розвитку їх ушкоджень. Вивчення ролі змін проникності мітохондріальних мембран клітин і відкриття МП при ішемії–реперфузії нижніх кінцівок до цього часу не проводилося.

Метою нашої роботи було з'ясування можливої участі відкриття МП, яке супроводжується вивільненням мітохондріального фактора (МФ) у кров пацієнтів, прооперованих з приводу гострої оклюзії стегново-підколінного сегмента стегнової артерії, і наступного розвитку пов'язаного з цим оксидативного стресу.

## МЕТОДИКА

Обстежено 17 дорослих пацієнтів (7 жінок і 10 чоловіків), які були прооперовані з приводу гострої оклюзії стегново-підколінного сегмента *a. femoralis*. Середній вік пацієнтів становив  $(73,9 \pm 1, 85)$  років. Час ішемії – від 1 до 120 год, в середньому  $26,3$  год  $\pm 10,2$  год. Усі пацієнти страждали на

супутню соматичну патологію: ішемічна хвороба серця, гіпертонічна хвороба, облітеруючий атеросклероз нижніх кінцівок, цукровий діабет II типу. Ступінь ішемії ушкодженої нижньої кінцівки визначали згідно з класифікацією Савельєва [7]. Для ішемії Ia ступеня властивим є відчуття оніміння, охолодження, парестезії, для Ib ступеня – поява болю. При ішемії II ступеня спостерігаються порушення чутливості та активних рухів у суглобах кінцівок: парез (IIa) і параліч (IIb). Ішемія III ступеня характеризується початком некротичних змін. Забір проб крові проводили перед початком оперативного втручання із стегнової вени ушкодженої кінцівки і через 20 хв реперфузії, після відновлення кровотоку в ураженій кінцівці. Зважаючи на особливості оперативного втручання, більш раннє взяття проб крові було неможливим. Кров відбирали в пробірки та доставляли в лабораторію для проведення дослідження. Маркером оксидативного стресу був малоновий діальдегід (МДА) за методикою Коробейникової в реакції з тіобарбітуровою кислотою [4], стан антиоксидантної системи оцінювали за активністю каталази, який визначали в сироватці крові [5]. Як показник відкриття МП внаслідок ішемії–реперфузії, використовували МФ [6]. Для його визначення кров центрифугували при  $3000 \text{ хв}^{-1}$  протягом 10 хв, відбирали отриману сироватку і осаджували білки додаванням трихлороцтової кислоти (ТХО), з кінцевою концентрацією в розчині 5 %. Для цього змішували 0,1 мл 50 % ТХО з 1 мл сироватки. Розчин ретельно перемішували і залишали на 10 хв. Далі його знову центрифугували протягом 15 хв і отримували надосадову рідину. Оптичну густину поглинання надосадової рідини визначали за допомогою спектрофотометра «Specord 200M» (Німеччина). Виміри проводили в ультрафіолетовій ділянці спектра в діапазоні довжин хвиль від 230 до 260 нм. Залежність оптичної густини від довжини хвилі будували за допомогою програми Мі-

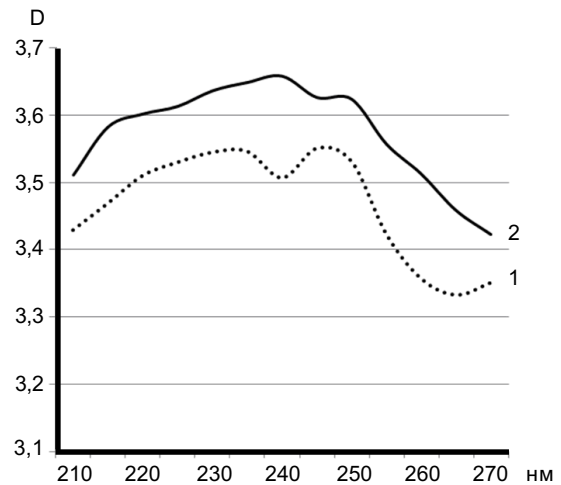
Microsoft Office Excel 2007. Статистичний аналіз отриманих результатів здійснювали за допомогою критерію t Стьюдента, використовуючи стандартну комп'ютерну програму Statistica 299 Edition (StatSoft, Inc, США). Як статистично значимі розглядали відміни з  $P < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Аналіз ступеня ішемії нижніх кінцівок пацієнтів показав, що 17,6 % відчували біль (Ib); у 41,2 % спостерігались порушення чутливості та активних рухів в суглобах кінцівок (IIa); у 29,4 % – порушення чутливості й активних рухів у суглобах кінцівок (IIb); у 11,8 % відмічалась м'язова контрактура (IIIb).

У венозній крові, взятої із стегнової вени ураженої кінцівки, вміст МДА при ішемії становив у середньому  $5,0$  нмоль/л  $\pm 1,4$  нмоль/мл. Після відновлення артеріального кровотоку спостерігалось його достовірне підвищення на 42,5 % ( $P < 0,05$ ). Активність каталази після реперфузії достовірно знижувалася на 137,5 % ( $P < 0,05$ ), порівняно з її значеннями до реперфузії (таблиця). В крові, як у період ішемії, так і при реперфузії, було виявлено МФ, який оцінювали за зміною оптичної густини (рисунок). Рівень МФ достовірно збільшувався через 20 хв реперфузійного періоду з  $3,57 \pm 0,01$  до  $3,65 \pm 0,03$  ( $P < 0,05$ ). Як відомо, МФ вивільнюється із мітохондріального матриксу через неселективні мегаканали, які отримали назву мітохондріальна пора. Утворення таких неселективних каналів було вперше відмічено в умовах підвищеної концентрації  $Ca^{2+}$  в суспензії ізольованих мітохондрій [14]. Більше десяти років

потрібно було для з'ясування структури пори та її функціональної значущості. Нині відомо, що МП складається з трьох білкових структур – потенціалзалежного аніонного каналу на зовнішній мітохондріальній мембрані, АТФ–АДФ-транслокази на внутрішній мембрані та циклофіліну Ду матриксі. Крім  $Ca^{2+}$ , відкриванню пори сприяють оксидативний стрес і вільні радикали, які при цьому утворюються [16, 20]. Отримані нами результати корелюють з одержаними раніше даними про те, що постреперфузійні порушення діяльності серця пов'язані зі зміною проникності мітохондріальних мембран кардіоміоцитів внаслідок відкривання МП [13]. В експериментах на ізольованому серці морських свинок, на моделі ішемії–реперфузії було показано, що крім коронароконстрикції, аритмії та пригнічення скоротливої активності в розчині, що відтікає від репер-



Зміни оптичної густини поглинання сироватки крові, отриманої як в період ішемії, так і після реперфузії: 1 – ішемія, 2 – реперфузія

Показники окиснювального стресу та антиоксидантного захисту при ішемії–реперфузії в нижніх кінцівках людини ( $M \pm m$ ,  $n = 17$ )

Показник	Ішемія	Реперфузія
Малоновий діальдегід, нмоль/мл	$5,0 \pm 1,4^*$	$7,2 \pm 1,1^*$
Каталаза, мкат/л	$191,9 \pm 42,0^*$	$80,7 \pm 11,6^*$
Мітохондріальний фактор	$3,57 \pm 0,01^*$	$3,65 \pm 0,03^*$

\* $P < 0,05$  статистично значущі відміни між показниками в період ішемії і реперфузії

фузованого серця, за допомогою спектрофотометричного методу при довжині хвилі 250 нм реєстрували появу в перфузаті стабільної речовини [9]. Мітохондріальне походження цього фактора було підтверджено в експериментах на ізольованих мітохондріях за допомогою активаторів та інгібіторів МП. Відмічене нами зниження активності каталази в крові в періоді реперфузії можливо пов'язано з виснаженням антиоксидантної системи та інтенсифікацією перекисного окиснення ліпідів, що підтверджується підвищенням вмісту МДА. Ці зміни вказують на ішемічно-реперфузійне пошкодження мембран клітин, що надалі може призвести до розвитку патологічного стану *no-reflow*. Феномен *no-reflow*, як відомо, залежить від термінів ішемізації, а при тотальній ішемії зміни в скелетній мускулатурі починаються через 3 год, після 68 год її розвитку ці зміни стають незворотними [2, 12]. Широко вживані в клінічній практиці маркери оксидативного стресу, такі, як каталаза і МДА є достатньо динамічними показниками. Вони здатні як підвищуватися, так і знижуватися в різні часові проміжки ішемії та реперфузії, оскільки їх вміст залежить від багатьох чинників, серед яких істотними є тривалість ішемії, наявність супутніх захворювань, початковий функціональний стан системи антиоксидантного захисту [1]. На відміну від них, МФ, який розглядається як маркер відкриття МП, був виявлений нами в усіх пацієнтів незалежно від тривалості ішемії і супутніх захворювань, він достовірно збільшувався в реперфузійному періоді. Вивільнення МФ у кров свідчить про збільшення проникності мітохондріальних мембран клітин судинної системи, тим самим сприяє відкриттю МП. Через пору, що відкрилася, з мітохондріального матриксу в цитозоль клітини вивільнюється велика кількість токсичних речовин. Вивільнення МФ спостерігалось в умовах пригнічення ферменту, що включений до системи антиоксидантного захисту (ката-

лаза), водночас значно посилювалася ферментативна активність ферменту прооксидантної системи організму (МДА). Спектр поглинання МФ характеризувався двома максимумами при довжинах хвиль 235 нм (I пік) і 245 нм (II пік). Причина наявності двох максимумів вимагає подальшого вивчення.

Таким чином, у проведеному дослідженні показано, що в умовах ішемії–реперфузії нижніх кінцівок людини, показники стану анти- і прооксидантної системи (активність каталази і МДА) зазнавали характерних для оксидативного стресу змін: вміст МДА під час реперфузії нижніх кінцівок підвищувався, а активність каталази, навпаки, знижувалася. При ішемії і в період реперфузії в крові виявлено стабільний МФ, з максимумом поглинання при  $\lambda=245$  нм, який вважають циклоспоринзалежним [6, 8, 9]. Саме він свідчить про відкриття МП. Слід відмітити наявність додаткового піку низькомолекулярних речовин з максимумом поглинання при  $\lambda=235$  нм. Чим зумовлена його поява, поки що не зрозуміло, але аналогічний пік спостерігали дослідники в експериментах на старих щурах. Якщо взяти до уваги, що в нашій роботі обстежувались особи похилого віку, то не виключено, що ця особливість спектра поглинання МФ носить загальний характер.

На підставі змін вмісту МДА, активності каталази, а також появи МФ, можна зробити висновок про те, що у обстежених пацієнтів ішемічно-реперфузійне пошкодження нижніх кінцівок супроводжувалося розвитком оксидативного стресу.

Отримані результати свідчать про те, що ішемія–реперфузія, яка спостерігається у пацієнтів при оперативному втручанні з приводу тромбозу нижніх кінцівок, як і в умовах експерименту на ізольованому серці тварин та експериментах *in vivo* супроводжується вивільненням у кров МФ, а також пригніченням ферментативної активності каталази, що становить важливу ланку антиоксидантного захисту, і значним посиленням МДА, що є показником розвитку оксидативного стресу.

V. F. Sagach, E. F. Kachanovsky, V. S. Gorbovetz

**THE MITOCHONDRIAL PERMEABILITY TRANSITION PORE OPENING UNDER OXIDATIVE STRESS AT ISCHEMIA/REPERFUSION IN THE FEMORAL TISSUE**

The study was conducted within a group of 17 patients suffering from thrombosis in the femoral artery to identify a mitochondrial factor release into the blood at ischemia/reperfusion in the lower extremities. To test the mitochondrial factor as a possible marker of the mitochondrial permeability transition pore opening under oxidative stress we determined the rates of oxidative stress (malonic dialdehyde, MDA), oxidative protection (catalase) and mitochondrial factor release under ischemia/reperfusion induced by surgical operation. It has been shown that the parameters of pro- and antioxidant systems changed in a way characteristic of oxidative stress: content of MDA in the blood at reperfusion increased, but activity of catalase decreased. We were the first to record the mitochondrial factor release into the blood of the femoral artery on the wave length of 245 nm using spectrophotometry. The data obtained indicate that mitochondrial factor might serve as an effective way of diagnostics of oxidative stress in injured tissues at ischemia/reperfusion in the lower extremities.

*O. O. Bogomoletz Institute of Physiology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv; Kyiv Municipal Clinical Hospital №8, department of Vascular Surgery, Ukraine*

**СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ**

- Биленко М.В. Ишемические и реперфузионные повреждения органов (молекулярные механизмы, пути предупреждения и лечения). – М.: Медицина, 1989. – 368 с.
- Гавриленко А.В., Дементьева И.И., Майтесян Д.А. и др. Реперфузионный синдром у больных с хронической ишемией нижних конечностей // Ангиология и сосудистая хирургия. – 2002. – 8, № 3. – С.90–95.
- Залесский В.Н., Гавриленко Т.И., Фильченков А.А. Апоптоз при ишемии и реперфузии миокарда // Лікарська справа. – 2002. – № 1. – С. 8–15.
- Коробейникова Э.Н. Модификация определения продуктов перекисного окисления липидов в реакции с тиобарбитуровой кислотой // Лаб. дело. – 1989. – №7. – С. 8–9.
- Корольюк М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Г., Токарев В.Е. Метод определения активности каталазы // Там же. – 1988. – №1. – С. 16–19.
- Надточій С.М. Вплив активації мітохондріальної пори на діяльність серця : Автореф. дис. ... канд. біол. наук. – К., 2003. – 23 с.
- Савельев В.С., Кошкин В.М. Критическая ишемия нижних конечностей. – М.: Медицина, 1997. – 160 с.
- Сагач В.Ф., Дмитрієва А.В., Шиманська Т.В., Надточій С.М. Фактор, який вивільнюється під час реперфузії ішемізованого серця, дослідження впливу на міокард, коронарні та периферичні судини // Фізіол. журн. – 2002. – 48, №1. – С. 3–8.
- Сагач В.Ф., Шиманська Т.В., Надточій С.М. Фактор, який вивільнюється під час реперфузії ішемізованого серця, може бути маркером відкриття мітохондріальної пори // Там само. – 2003. – 49, №4. – С. 7–13.
- Хитров Н.К., Саркисов Д.С., Пальцев М.А. Руководство по общей патологии человека. – М.: Медицина, 1999.
- European working group on critical limb ischemia. Second european consensus document on chronic critical leg ischemia // Circulation. – 1991. – 84 (supp 1). – P. 411–426.
- Blaisdell F.W. The pathophysiology of skeletal muscle ischemia and the reperfusion syndrome: a review // Cardiovascular. Surg (England). – 2002. – 10, № 6. – P.620–630.
- Crompton M. Mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death // Biochem. J. – 1999. – 341. – P.233–249.
- Hunter P., Haworth R., Sousard J. Relationship between configuration, function and permeability in calcium-treated mitochondria // J. Biol. Chem. – 1976. – 251. – P.5069–5077.
- Ichas F., Mazat J.P. From calcium signaling to cell death: two conformations for the mitochondrial permeability transition pore. Switching from low- to high-conductance state // Biochim. and Biophys. Acta. – 1998. – 1366, №1–2. – P.33–50.
- Jassem W., Fuggle S. V., Rela M., Koo D. D., Heaton N. D. The role of mitochondria in ischemia reperfusion injury // Transplantation. – 2002. – 73, №4. – P. 493–499.
- Kowaltowski A., Castilho R.F., Vercesi A.E. Mitochondrial permeability transition and oxidative stress // FEBS Lett. – 2001. – 495. – P.12–15.
- Kroemer G. Mitochondrial control of apoptosis: an introduction // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2003. – 304, №3. – P.433–435.
- Kroemer G. Mitochondrial control of apoptosis: an overview // Biochem. Soc. Symp. – 1999. – 66. – P.1–15.
- Pozzi S., Malferrari G., Buinno I. et al. Low-flow ischemia and hypoxia stimulate apoptosis in perfused hearts independently of reperfusion // Cell Physiol. Biochem. (Switzerland). – 2002. – 12, №1. – P. 39–46.
- Zorov D. B., Filburn C. R., Klotz L-O. et al. Reactive oxygen species (ROS)-induced ROS release: a new phenomenon accompanying induction of the mitochondrial permeability transition in cardiac myocytes // J.Exp. Med. – 2000. – 192, №7. – P.1001–1014.

*In-t фізіології ім. О.О.Богомольця НАН України, Київ; Міська клін. лікарня № 8, Київ e-mail: Kachanovsky @ voliacable. com*

*Матеріал надійшов до редакції 10.12.2007*