

Дыхательная активность и прооксидантно-антиоксидантный баланс печени крыс после гипотермического хранения в присутствии бенциклана фумарата

UDC 577.352.3.085.2:612.35.014.43

I.A. SOSIMCHUK, D.V. CHERKASHINA, A.YU. SOMOV, A.YU. PETRENKO*

Respiratory Activity and Pro-Oxidant/Antioxidant Balance of Rat Liver after Hypothermic Storage in Presence of Bencyclane Fumarate

Исследовано влияние бенциклана фумарата на дыхательные параметры митохондрий, интенсивность перекисных процессов и активность ферментов системы антиоксидантной защиты печени крыс после гипотермического хранения и нормотермической реперфузии. Показано разобщающее действие бенциклана на процессы окислительного фосфорилирования в митохондриях печени крыс как после хранения, так и после реперфузии. После холодового хранения печени крыс в присутствии 1 мМ бенциклана фумарата наблюдалось частичное предотвращение повышения базального уровня ТБК-активных продуктов и снижения активности антиоксидантных ферментов.

Ключевые слова: бенциклана фумарат, гипотермическое хранение печени, нормотермическая реперфузия, дыхательные параметры, перекисные процессы, антиоксидантные ферменты.

Досліджено вплив бенциклана фумарату на дихальні параметри мітохондрій, інтенсивність перекисних процесів та активність ферментів системи антиоксидантного захисту печінки шурів після гіпотермічного зберігання та нормотермічної реперфузії. Показана роз'єднуюча дія бенциклану на процеси окислювального фосфорилування у мітохондріях печінки шурів як після зберігання, так і після реперфузії. Після холодового зберігання печінки шурів за присутності 1 мМ бенциклана фумарату спостерігалось часткове попередження підвищення базального рівня ТБК-активних продуктів та зниження активності антиоксидантних ферментів.

Ключові слова: бенциклана фумарат, гіпотермічне зберігання печінки, нормотермічна реперфузія, дихальні параметри, перекисні процеси, антиоксидантні ферменти.

The influence of bencyclane fumarate on mitochondria respiratory parameters, peroxidation process intensity and antioxidant enzyme activity of rat liver after hypothermic storage and normothermic reperfusion was investigated. The uncoupling effect of bencyclane on oxidative phosphorylation processes was shown both after storage and reperfusion. Partial prevention of TBARS basal level increase and antioxidant enzyme activity decrease in liver after cold storage in the presence of 1 mM of bencyclane were observed.

Key words: bencyclane fumarate, liver hypothermic storage, normothermic reperfusion, respiratory parameters, peroxidation processes, antioxidant enzymes.

Использование околонулевых температур (0...6°C) является одним из самых распространённых и эффективных способов хранения органов для дальнейшей трансплантации. Однако проблема потери жизнеспособности и восстановления функции печени после гипотермического хранения (ГХ) по-прежнему существует. Большое значение для сохранения функциональной активности органа имеет состав консервирующего раствора. Сахарозо-солевой раствор (ССР) позволяет поддерживать жизнеспособность печени после ГХ на уровне с общепринятым в международной практике раствором Университета Висконсин (UW) [17]. Тем не менее хранение органа свыше 18 ч приводит к необратимым метаболическим нарушениям. В связи с этим усовершенствование консервирующих сред является перспективным направлением для увеличения сроков безопасного ГХ органов.

Институт проблем криобиологии и криомедицины
НАН Украины, г. Харьков

* Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию:
ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: +38 (057) 373-41-35, факс: +38 (057) 373-30-84, электронная почта: cryo@online.kharkov.ua

Use of about-zero temperatures (0...6°C) is one of the most spread and effective ways to store the organs for following transplantation. However the problem of the viability loss and restoration of liver function after hypothermic storage (HS) has still existed. Sucrose-saline solution (SSS) enables to maintain liver viability after HS at the same level with traditionally used in international practice solution of the University of Wisconsin (UW) [17]. Nevertheless the storage of the organs more than 18 hrs results in irreversible metabolic impairments. In this connection the improving of preservation media is perspective direction to increase the terms of safe organ HS.

Taking into account the hypothesis of "mild uncoupling" [16], according to which the reduction of "surplus" membrane potential causes the decrease of the production of reactive oxygen species (ROS), we suppose that supplementation of the storage solution with

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

* To whom correspondence should be addressed: 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.: +380 57 373 4135, fax: +380 57 373 3084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

Учитывая гипотезу "мягкого разобщения" [16], согласно которой снижение "избыточного" мембранного потенциала вызывает уменьшение продукции активных форм кислорода (АФК), мы предположили, что дополнение раствора хранения разобщителем окислительного фосфорилирования (ОФ) может привести к снижению образования АФК, а следовательно, повреждения печени в условиях ишемии/реперфузии. Были проведены исследования с использованием классического разобщителя 2,4-динитрофенола (ДНФ). Показано, что его присутствие в ССР на этапе ГХ с последующим удалением в начале нормотермической реперфузии (НР) благоприятно влияло на состояние органа, что проявлялось в снижении интенсивности свободнорадикальных процессов и предупреждении угнетения активности ферментов системы антиоксидантной защиты печени [5]. Кроме того, ДНФ оказывал защитное действие на сопряжённость ОФ, сохраняя дыхательный контроль на высоком уровне [4]. Однако возможность клинического применения ДНФ ограничена его высокой токсичностью [8], что обуславливает необходимость поиска веществ, обладающих такими же свойствами, но не имеющих побочных эффектов. Важным критерием выбора веществ является принадлежность искомого соединения к лекарственным препаратам.

Наше внимание привлёк бенциклан fumarate (БФ) – действующее вещество фармакологического препарата "Галидор[®]", который относится к группе миотропных спазмолитиков. Он широко применяется при лечении хронического эндартериита и других нарушений кровообращения. Известно, что БФ является блокатором фосфодиэстеразы и серотониновых сигналов, а также кальциевым антагонистом. Антиспастический эффект БФ был исследован при ишемии головного мозга и кишечника [2, 6]. Barut и соавторы [6] показали, что БФ эффективен при постишемических повреждениях тканей кишечника, которые происходят из-за формирования АФК. Предобработка крыс БФ приводила к снижению интенсивности процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ), повышению активности антиоксидантных ферментов, тем самым оказывая защитный эффект и смягчая повреждение слизистой оболочки кишечника.

Вместе с тем на уровне изолированных митохондрий показана способность БФ разобщать ОФ [1]. Можно предположить, что в результате разобщения ОФ создаётся дефицит АТФ для сократительной функции мышечных волокон, что и обуславливает сосудорасширяющее и антиспастическое действия препарата. Однако на более высоком клеточном, а тем более органном уровне разобщающее действие БФ не исследовалось.

Цель работы – исследование влияния БФ на энергетические параметры митохондрий, а также

the uncoupler of oxidative phosphorylation (OP) may lead to the reduction of the ROS formation and, consequently, of the liver damage under conditions of ischemia/reperfusion. The experiments using classic uncoupler 2,4-dinitrophenol (DNP) were performed. It was shown that its presence in SSS at the stage of HS with following removal at the start of normothermic reperfusion (NR) favorably affected the state of organ manifesting in the reduced intensity of free radical processes and preventing of suppression of the activity of liver antioxidant defense enzymes [5]. In addition, DNP rendered protective effect on the coupling of OP keeping the respiratory control index at a high level [4]. However, the possibility of clinical application of DNP is restricted with its high toxicity [8], which stipulates the need in the search of the substances with the same properties but with no side effects. An important criterion of the substance selection is the belonging of initial compound to medical products.

Bencyclane fumarate (BF) attracted our attention, it is an acting substance of pharmacological formulation Halidor[®], which is referred to the group of myotropic spasmolytics. It is widely used for the treatment of chronic endarteritis and other disorders of blood circulation. BF is known to be the blocking agent of phosphoesterase and serotonin signals as well as calcium antagonist. Anti-spastic effect of BF was studied during ischemia of brain and intestine [2, 6]. Barut and co-authors [6] have shown that BF is effective at post-ischemic lesions of intestine tissues occurring due to the formation of ROS. BF pre-treatment results in the reduced intensity of lipid peroxidation (LPO), increase of the activity of antioxidant enzymes, which thereby protectively affect and mitigate the lesion of intestine mucous membrane.

Along with this the ability of BF to uncouple OP was shown in isolated mitochondria [1]. One can suppose that OP uncoupling results in the deficit of ATP for contractile function of muscular fibers, which stipulates vasodilating and anti-spastic effect of the formulation. However, at higher cell and moreover at organ level the uncoupling effect of BF was not investigated.

The research aim is the study of BF effect on energetic parameters of mitochondria, as well as LPO and antioxidant defense after HS and NR of isolated rat liver.

Materials and methods

The experiments were carried-out in white breedless male rats (n = 42) in accordance with the "General principles of the experiments in animals", adopted by the 3rd National Congress in Bioethics (Kiev, 2007). Diethyl ether was used as narcosis.

The peritoneal cavity of anesthetized animals was opened, the ligature was laid under *v. porta*, the nee-

показатели ПОЛ и антиоксидантной защиты после ГХ и НР изолированной печени крыс.

Материалы и методы

Эксперименты проводили на белых беспородных крысах-самках ($n = 42$) в соответствии с "Общими принципами экспериментов на животных", одобренными III Национальным конгрессом по биоэтике (Киев, 2007). Для наркоза использовали диэтиловый эфир.

Анестезированным животным вскрывали брюшную полость, под *v. porta* закладывали лигатуру, вводили и закрепляли в ней иглу. После начала перфузии надсекали *v. cava inf.* для обеспечения оттока перфузата из печени. Орган отмывали от крови охлаждённым физиологическим раствором (30–50 мл) с использованием перистальтического насоса. Печень животных насыщали 50 мл охлаждённого до 4°C ССР (250 мМ сахарозы, 1 мМ $MgSO_4$, 0,5 мМ $CaCl_2$, 15 мМ Na_2HPO_4 , 30 мМ KH_2PO_4 , ПЭГ-8000, pH 7,4) [4, 5]. После насыщения органа раствором хранения в *v. porta* вводили катетер, орган выделяли и хранили при температуре 0...4°C в течение 18 ч. Было сформировано 3 экспериментальные группы: 1 – интактная (свеже-изолированная печень); 2 – контрольная (печень хранили в ССР без добавок); 3 – опытная (ССР дополняли БФ). Количество животных в каждой группе составляло 5–7.

В работе использовали препарат для инъекций "Галидор®" (ОАО "Фармацевтический завод ЭГИС", Венгрия), содержащий 50 мг БФ в ампуле.

После ГХ печень отмывали 20 мл реперфузионного раствора, содержащего 1% бычьего сывороточного альбумина, в открытой системе, затем перфузировали в рециркулирующей системе. Общее время реперфузии – 60 мин при 37°C. Для НР использовали раствор Krebs-Рингер-бикарбонат, который насыщали карбогеном в течение 5 мин. Скорость потока регулировали в диапазоне 3–4,5 мл/мг ткани/мин при гидростатическом давлении 30–40 мм вод. ст.

Митохондрии выделяли из свежеизолированной печени методом дифференциального центрифугирования [17]. Набухание органелл в 0,1 М растворе NH_4NO_3 исследовали при длине волны 546 нм в кювете объёмом 3 мл при 26°C и постоянном перемешивании.

Дыхательные параметры определяли в суспензии митохондрий, а также в 20%-х (w/v) гомогенатах печени (среда гомогенизации – 300 мМ сахарозы, 2 мМ ЭДТА, 10 мМ трис-НСl, pH 7,4).

Поглощение кислорода измеряли с помощью закрытого платинового электрода Кларка в термостатируемой ячейке объёмом 1 мл при 26°C на полярографе "Rank Brother" model 20, соединённом

dle was introduced and fixed in it. After the start of perfusion *v. cava inf.* was notched to provide the outflux of perfusate from liver. Organ was washed-out from blood with cooled physiological solution (30–50 ml) using peristaltic pump. The liver of animals was saturated with 50 ml of cooled down to 4°C SSS (250 mM sucrose, 1 mM $MgSO_4$, 0.5 mM $CaCl_2$, 15 mM Na_2HPO_4 , 30 mM KH_2PO_4 , PEG-8000, pH 7.4) [4, 5]. After organ saturation with the storage solution the catheter was introduced into *v. porta*, the organ was isolated and stored at the temperatures of 0...–4°C for 18 hrs. There were formed 3 experimental groups: 1 – intact (freshly isolated liver); 2 – control (liver was stored in SSS with no additives); 3 – experimental (SSS was added with BF). The number of animals in each group made 5–7 individuals.

In the research there was used the preparation for the injection, Halidor® (JSC "Pharmaceutical Plant EGIS", Hungary) containing 50 mg BF in the ampoules.

After HS the liver was washed-out with 20 ml of reperfusion solution containing 1% of bovine serum albumin, in an open system, then it was perfused in recycling system. Total reperfusion time was 60 min at 37°C. For NR the solution Krebs-Ringer-bicarbonate, saturated with carbogen for 5 min was used. The flux rate was controlled within the range of 3–4.5 ml/mg of tissue/min at hydrostatic pressure of 30–40 mm of H_2O .

Mitochondria were isolated from freshly isolated liver by means of differential centrifugation [17]. Swelling of organelles in 0.1 M NH_4NO_3 was studied at the wavelength of 546 nm in 3 ml cell at 26°C and constant mixing.

Respiratory parameters were examined in the suspension of mitochondria as well as in 20% (w/v) liver homogenates (homogenization medium – 300 mM sucrose, 2 mM EDTA, 10 mM tris-HCl, pH 7.4).

The consumption of oxygen was measured using closed platinum Clark's electrode in thermostated well of 1 ml at 26°C with polarograph "Rank Brother" model 20 connected to personal computer. The measurement medium contained 200 mM mannite, 50 mM sucrose, 1 mM EDTA, 10 mM KH_2PO_4 , 30 mM Tris-HCL (pH 7.4). 30–50 μ l homogenate were introduced into a well. Respiration substrate was succinate (8 mM). OP was initiated with adding ADP (250 μ M). The uncoupling of respiration and phosphorylation were caused by DNP (100 μ M). The curves for oxygen consumption were calculated according to Estabrook [9]. The respiration rate was expressed in nmol O_2 /mg of protein/min.

Basal level of TBA-active products was examined in 20% (w/v) liver homogenates (homogenization medium – 50 mM tris-HCl, 50 mM NaCl, pH 7.4) according to the method [5], based on the measuring of absorption intensity at 535 nm of butanol-extracting complex of LPO products with thiobarbituric acid

с персональным компьютером. Среда измерения содержала 200 мМ маннита, 50 мМ сахарозы, 1 мМ ЭДТА, 10 мМ KH_2PO_4 , 30 мМ Tris-HCl (pH 7,4). В ячейку вносили 30–50 мкл гомогената. Субстратом дыхания служил сукцинат (8 мМ). Окислительное фосфорилирование инициировали добавкой АДФ (250 мкМ). Разобщение дыхания и фосфорилирования вызывали внесением ДНФ (100 мкМ). Расчет кривых поглощения кислорода проводили согласно Estabrook [9]. Скорость дыхания выражали в нмоль O_2 /мг белка/мин.

Базальный уровень ТБК-активных продуктов определяли в 20%-х (w/v) гомогенатах печени (среда гомогенизации – 50 мМ трис-HCl, 50 мМ NaCl, pH 7,4) по методу [5], который основан на измерении интенсивности поглощения при 535 нм бутанол-экстрагируемого комплекса продуктов ПОЛ с тиобарбитуровой кислотой (ТБК). Базальный уровень выражали в пмоль МДА/мг белка.

Активность ферментов системы антиоксидантной защиты в гомогенатах печени измеряли спектрофотометрически при постоянном термостатировании и перемешивании. Условия определения для каждого из них были следующие: каталаза – 0,01 М К-фосфатный буфер (pH 7,4), 0,5 мМ ЭДТА, 15 мМ H_2O_2 ; T = 37°C, λ (длина волны) = 240 нм; глутатионпероксидаза (ГП) – 0,3 М KH_2PO_4 (pH 7,0), 3 мМ ЭДТА, 1,5 мМ NaN_3 , 32,5 мМ GSH, 7,5 мМ H_2O_2 ; T = 23 °C, λ = 260 нм; глутатионредуктаза (ГР) – 0,1 М К-фосфатный буфер (pH 7,4), 0,1 мМ НАДФН, 0,5 мМ ЭДТА, 1 мМ GSSG; T = 37°C, λ = 340 нм; глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа (Г6ФДГ) – 0,13 М трис-HCl (pH 7,6), 80 мМ MgCl_2 , 3,5 мМ НАДФ⁺, 7,5 мМ глюкозо-6-фосфата; T = 37 °C, λ = 340 нм [5].

Содержание белка в суспензии митохондрий и гомогенатах печени определяли биуретовым методом.

Все спектрофотометрические исследования проводили на спектрофотометре "Cary 50" (Австралия).

Полученные результаты обрабатывали статистически с помощью пакета программ "Statistica v.5.5" и "Origin 7.5". При оценке данных использовали параметрический критерий Стьюдента (для дыхательных параметров) и непараметрический критерий Манна-Уитни (для показателей прооксидантно-антиоксидантного состояния), данные выражали в виде $M \pm m$. Достоверно отличными считали результаты при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Предварительно были проведены эксперименты на изолированных митохондриях печени крыс. Из рис. 1 видно, что инкубация в 0,1 М NH_4NO_3 не вызывала набухания митохондрий, что свидетельствует о низкой пассивной проницаемости внутренней мембраны для ионов водорода. Внесение БФ

(ТБА). Basal level was expressed in pmol MDA/mg of protein.

Activity of enzymes of the antioxidant defense system in liver homogenates was measured spectrophotometrically at constant thermostating and mixing. The conditions of examining for each of them were as follows: catalase – 0.01 M K-phosphate buffer (pH 7.4), 0.5 mM EDTA, 15 mM H_2O_2 ; T = 37°C, λ (wave length) = 240 nm; glutathione peroxidase (GP) – 0.3 M KH_2PO_4 (pH 7.0), 3 mM EDTA, 1.5 mM NaN_3 , 32.5 mM GSH, 7.5 mM H_2O_2 ; T = 23°C, λ = 260 nm; glutathione reductase (GR) – 0.1 M K-phosphate buffer (pH 7.4), 0.1 mM NADPH, 0.5 mM EDTA, 1 mM GSSG; T = 37°C λ = 340 nm; glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) – 0.13 M tris-HCl (pH 7.6), 80 mM MgCl_2 , 3.5 mM NADPH⁺, 7.5 mM glucose-6-phosphate; T = 37°C, λ = 340 nm [5].

Protein content in the suspension of mitochondria and liver homogenates was found with biuret method.

All spectrophotometrical studies were carried-out by means of spectrophotometer Cary 50 (Australia).

The findings were statistically processed by means of the software Statistica v. 5.5 and Origin 7.5. When assessing the data there were used parametrical criterion of Student (for respiratory parameters) and non-parametrical one of Mann-Whitney (for the indices of pro-oxidant – antioxidant state), the data were expressed as $M \pm m$. The results were considered as statistically different at $p < 0.05$.

Results and discussion

Preliminary the experiments in isolated mitochondria of rat liver were carried-out. Fig.1 shows that incubation in 0.1 M NH_4NO_3 did not cause the mitochondria swelling, testifying to a low passive permeability of inner membrane for hydrogen ions. Introduction of BF in concentration of 0.3 mM led to high amplitude swelling of mitochondria, which manifested in sharp and significant reduction of optical density of the suspension under incubation. This allows to state that the presence of BF increases the proton permeability of mitochondria inner membrane, *i. e.* it is protonophore as well as classic uncoupling agents.

In addition, it has been shown that BF even at quite low final concentration (0.07 mM) stimulated respiration in the state 4 during oxidation with isolated mitochondria of NAD-dependent substrates, and in case with succinate it started the uncoupling of respiration and OP at the concentration in the well of 0.2–0.35 mM. Maximum uncoupling was recorded at BF concentration of 0.7 mM, further rise in BF concentration caused the reduction in the rate of oxygen consumption by mitochondria in the state 4.

To select an optimal concentration of BF in storage solution there were done preliminary studies of respiratory parameters of homogenates after liver HS in SSS with the following concentrations of BF: 0.05, 0.1,

в концентрации 0,3 мМ приводило к высокоамплитудному набуханию митохондрий, которое проявлялось в резком и значительном снижении оптической плотности инкубируемой суспензии. Это позволяет утверждать, что присутствие БФ приводит к повышению протонной проницаемости внутренней мембраны митохондрий, т. е. он является протонофором, как и классические разобщители.

Кроме того, было показано, что БФ уже в довольно низкой конечной концентрации (0,07 мМ) стимулировал дыхание в состоянии 4 при окислении изолированными митохондриями НАД-зависимых субстратов, а в случае с сукцинатом он начал разобщать дыхание и ОФ при концентрации в ячейке 0,2–0,35 мМ. Максимальное разобщение регистрировалось при концентрации БФ 0,7 мМ, дальнейшее повышение концентрации БФ вызывало снижение скорости потребления кислорода митохондриями в состоянии 4.

Для выбора оптимальной концентрации БФ в растворе хранения были проведены предварительные исследования дыхательных параметров гомогенатов после ГХ печени в ССР со следующими концентрациями БФ: 0,05, 0,1, 0,5 и 1 мМ. Было показано, что введение в среду хранения БФ в диапазоне концентраций 0,05–0,5 мМ не оказывает существенного влияния на скорость потребления кислорода. При концентрации 1 мМ БФ вызывал разобщение ОФ. Основываясь на этом, в последующих экспериментах в среду ГХ печени крыс вводили 1 мМ БФ.

В таблице приведены результаты исследования дыхательных параметров печени крыс, подвергнутой ГХ и НР в присутствии 1 мМ БФ и без него. В интактной группе дыхательные параметры при окислении сукцината V_4 , V_3 , V_{3p} составляли $1,44 \pm 0,1$, $7,02 \pm 0,7$ и $7,79 \pm 0,7$ нмоль O_2 /мг белка/мин соответственно. Дыхательный контроль (ДК) был на уровне $4,87 \pm 0,2$.

Гипотермическое хранение печени без БФ приводило к увеличению скорости поглощения кислорода V_3 и разобщённого дыхания в 1,4 раза. При этом скорость в состоянии 4 возрастала в 1,7 раза, что проявлялось в достоверном снижении ДК в 1,2 раза. Последующая НР не влияла на V_3 , но приводила к дальнейшему увеличению скорости V_4 в 1,7 раза и связанному с ним снижению ДК по сравнению с ГХ.

В опытной группе после ГХ скорость дыхания в состоянии 4 была достоверно выше в 1,6 раза, чем в контроле, что обусловило соответствующее понижение ДК. Последующая НР вызывала повышение V_4 в 1,5 раза по отношению к ГХ. Дыхательный контроль достоверно снижался в 1,3 раза.

Как видно из рис. 2, базальный уровень ТБК-активных продуктов, который в группе 1 составлял

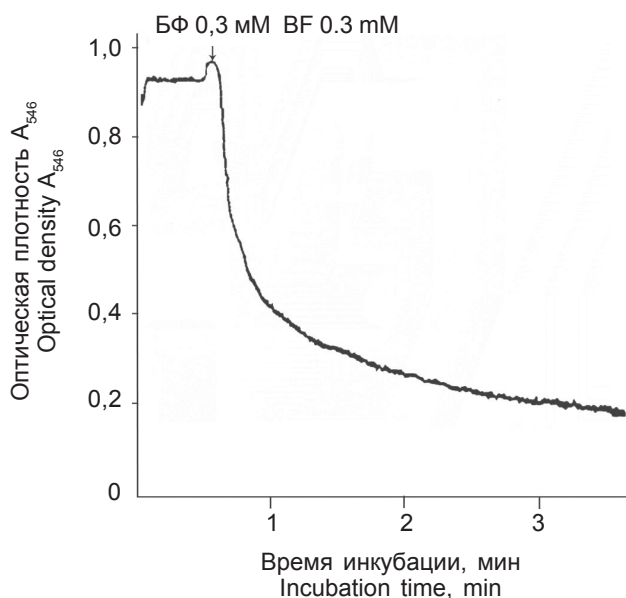


Рис. 1. Снижение оптической плотности митохондрий, инкубированных в нитрате аммония в присутствии БФ.

Fig. 1. Reduction of optical density of mitochondria incubated in ammonium nitrate in the presence of BF

0,5, and 1 mM. It was demonstrated that introduction into the storage medium of BF within the concentration range of 0.05–0.5 mM do not significantly affect the rate of oxygen consumption. At the concentration of 1 mM BF caused the uncoupling of OP. With basing on this in the following experiments into HS medium of rat liver 1 mM BF was introduced.

The table presents the research results as for respiratory parameters of rat liver subjected to HS and NR in the presence of 1mM BF and without it. In intact group the respiratory parameters during succinate oxidation V_4 , V_3 , V_{3unc} made 1.44 ± 0.1 , 7.02 ± 0.7 and 7.79 ± 0.7 nmol O_2 /mg of protein/min, correspondingly. Respiratory control index (RCI) was at the level of 4.87 ± 0.2 .

Hypothermic storage of liver without BF resulted in the rise in the rate of oxygen consumption V_3 and uncoupled respiration in 1.4 times. Herewith the rate in the state 4 increased in 1.7 times that was manifested in statistically significant reduction of RCI in 1.2 times. The following NR did not affect V_3 , but led to the rise in the rate V_4 in 1.7 times and related to it reduction in RCI if compared with HS.

In the experimental group after HS the respiration rate in the state 4 was statistically and significantly higher than in the control, which stipulated the corresponding reduction in RCI. The following NR caused the rise in V_4 in 1.5 times in respect of HS. The respiratory control index statistically and significantly reduced in 1.3 times.

As Fig. 2 shows the basal level of TBA-active products, which in the group 1 made 369.2 ± 26.2 pmol MDA/mg of protein, after HS increased by 30% and

Влияние БФ на дыхательную активность гомогенатов печени после 18 ч гипотермического хранения и нормотермической реперфузии
BF effect on respiratory activity of liver homogenates after 18 hr hypothermic storage and normothermic reperfusion

Дыхательные параметры Respiratory parameters	Группа 1 Group 1	Группа 2 Group 2		Группа 3 Group 3	
		ГХ HS	ГХ + НР HS + NR	ГХ HS	ГХ + НР HS + NR
V_4	$1,44 \pm 0,1$	$2,50 \pm 0,4^1$	$4,20 \pm 0,6^{1,3}$	$4,05 \pm 0,5^{1,2}$	$6,10 \pm 0,8^{1,2,3}$
V_3	$7,02 \pm 0,7$	$9,85 \pm 1,1^1$	$10,10 \pm 1,2^1$	$10,26 \pm 1,4^1$	$11,50 \pm 2,5^1$
V_{3p} V_{3unc}	$7,79 \pm 0,7$	$10,71 \pm 1,3^{1,2}$	$9,30 \pm 2,0$	$11,26 \pm 0,9^1$	$10,50 \pm 2,3$
ΔК RCI	$4,87 \pm 0,2$	$3,94 \pm 0,6^1$	$2,50 \pm 0,3^{1,3}$	$2,40 \pm 0,3^{1,2}$	$1,80 \pm 0,3^{1,2}$

Примечание: ¹ – $p < 0,05$ относительно группы 1; ² – $p < 0,05$ относительно группы 2; ³ – $p < 0,05$ относительно ГХ.

Notes: ¹ – $p < 0.05$ in respect of the group 1; ² – $p < 0.05$ in respect of the group 2; ³ – $p < 0.05$ in respect of the HS.

$369,2 \pm 26,2$ пмоль МДА/мг белка, после ГХ увеличивался на 30%, а последующая НР не приводила к достоверным изменениям по сравнению с ГХ (группа 2). Дополнение раствора хранения БФ снижало данный показатель после ГХ почти в 2 раза относительно контроля. Последующая реперфузия вызывала повышение базального уровня ТБК-активных продуктов в 1,5 раза по отношению к ГХ, хотя он и оставался достоверно ниже значений в группе 2.

Активность каталазы в норме составляла $123,2 \pm 15,9$ мкмоль H_2O_2 /мг белка/мин (рис. 3, а). Этот показатель снижался после ГХ почти в 2 раза, дальнейшая НР не приводила к дополнительным его изменениям. Присутствие БФ в растворе хранения полностью предотвращало снижение активности каталазы после ГХ. Однако после НР этот показатель достоверно снижался до контрольных значений по сравнению с ГХ.

Подобная динамика наблюдалась и в отношении активности Г6ФДГ, которая в интактной группе составляла $18,1 \pm 3,4$ нмоль НАДФН/мг белка/мин. После ГХ этот показатель достоверно снижался в контрольной группе в 1,4 раза, оставаясь на том же уровне и после НР. В группе 3 активность Г6ФДГ после ГХ была выше контроля и находилась на уровне интактной группы. После НР показатель снижался в 1,5 раза по сравнению с ГХ (рис. 3, б).

Активность ГП в интактной группе составляла $0,296 \pm 0,05$ мкмоль GSSG/мг белка/мин (рис. 3, в). Показатель снижался в 1,8 раза после ГХ, последующая НР на него практически не влияла. В присутствии БФ активность ГП только после ГХ была выше контрольных значений на 20%, а после реперфузии не отличалась от них.

NR did not lead to statistically significant changes if compared with HS (group 2). Addition of BF to the storage solution BF reduced this index after HS almost twice in respect of the control. Normothermic reperfusion caused the rise in basal level of TBA-active products in 1.5 times in respect of HS, though it remained lower than the values in the group 2.

Catalase activity in the norm made 123.2 ± 15.9 $\mu\text{mol } H_2O_2 / \text{mg of protein/min}$ (Fig. 3a). This index reduced after HS almost twice, further NR did not result in its additional changes. The presence of BF in storage solution completely prevented the reduction in catalase activity after HS. However, following NR reduced this index statistically and significantly to the control values if compared with HS.

Similar dynamics was observed also for the activity of G6PDH, which in intact group made 18.1 ± 3.4 nmol NADPH/mg of protein/min. After HS this index statistically and significantly reduced in the control group in 1.4 times remaining at the same level after NR too. In the group 3 the activity of G6PDH after HS was higher than the control and was at the level of

group 2. Addition of BF to the storage solution BF reduced this index after HS almost twice in respect of the control. Normothermic reperfusion caused the rise in basal level of TBA-active products in 1.5 times in respect of HS, though it remained lower than the values in the group 2.

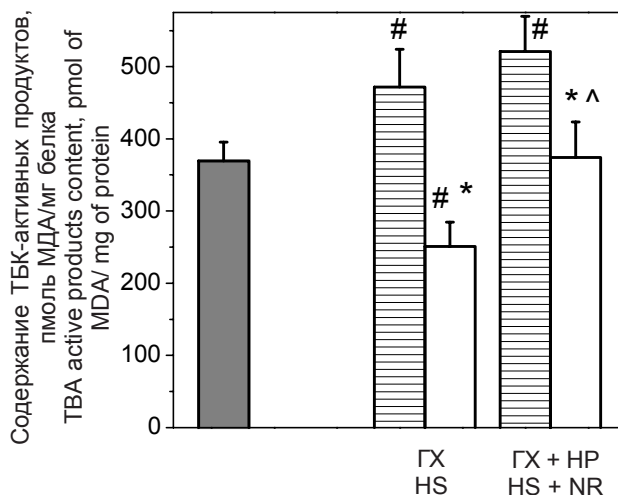


Рис. 2. Влияние БФ на базальный уровень ТБК-активных продуктов в печени после ГХ и НР: ■ – группа 1; ▨ – группа 2; □ – группа 3; # – $p < 0,05$ относительно группы 1; * – $p < 0,05$ относительно группы 2; ^ – $p < 0,05$ относительно ГХ.

Fig. 2. Effect of BF on basal level of TBA-active products in liver after HS and NR: ■ – group 1; ▨ – group 2; □ – group 3; # – $p < 0.05$ in respect of the group 1; * – $p < 0.05$ in respect of the group 2; ^ – $p < 0.05$ in respect of the HS.

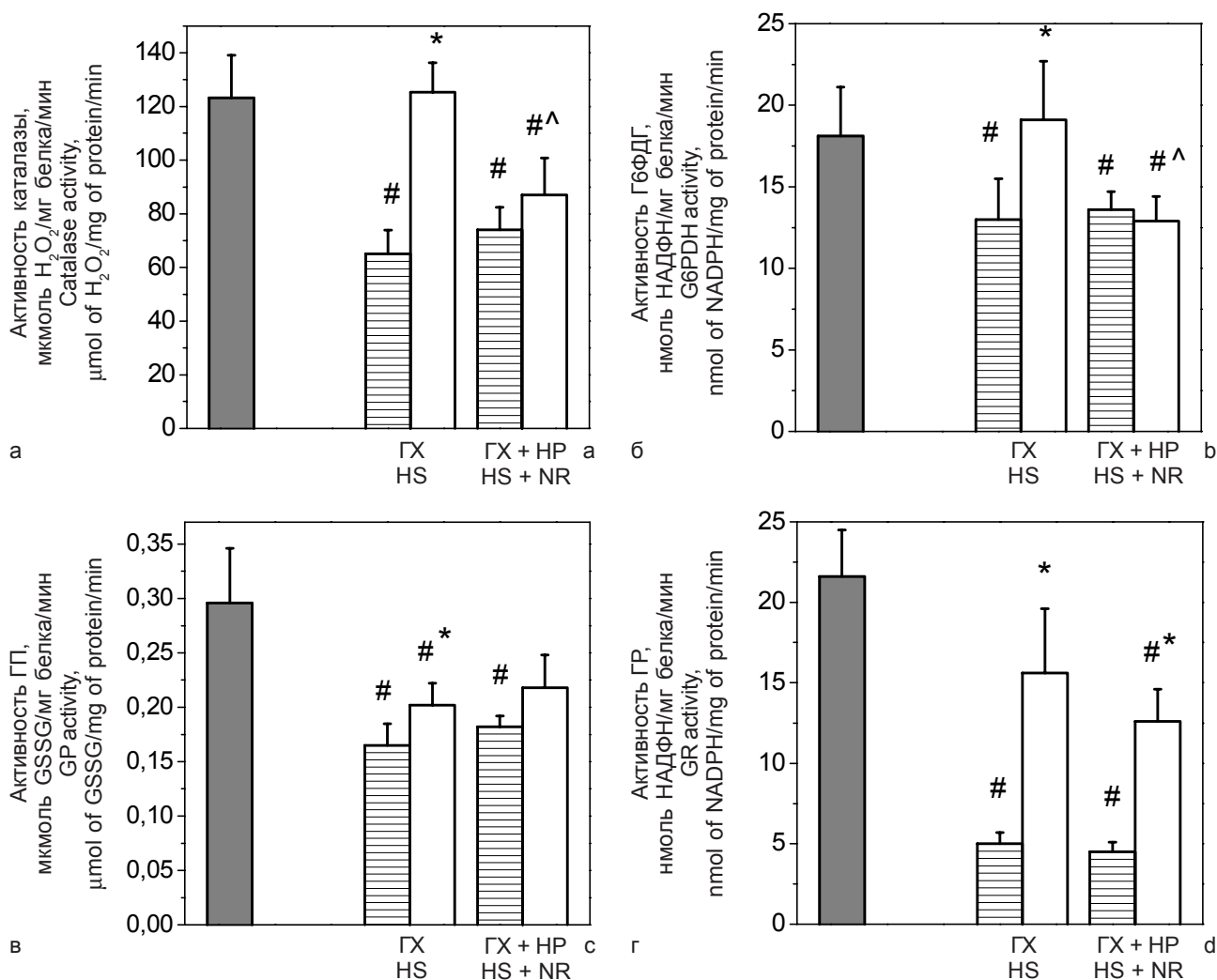


Рис. 3. Влияние БФ на активность ферментов системы антиоксидантной защиты печени: а – каталаза; б – Г6ФДГ; в – ГП; г – ГР; ■ – группа 1; ▨ – группа 2; □ – группа 3; # – $p < 0,05$ относительно группы 1; * – $p < 0,05$ относительно группы 2; ^ – $p < 0,05$ относительно ГХ.

Fig. 3. BF effect on activity of enzymes of liver antioxidant defense system: a – catalase; b – G6PDH; c – GP; d – GR; ■ – group 1; ▨ – group 2; □ – group 3; # – $p < 0.05$ in respect of the group 1; * – $p < 0.05$ in respect of the group 2; ^ – $p < 0.05$ in respect of the HS.

Активность ГР в группе 1 составляла $21,6 \pm 2,9$ нмоль НАДФН/мг белка/мин (рис. 3, г). После ГХ наблюдалось более чем 4-кратное уменьшение активности фермента, которое сохранялось после НР. В группе 3 показатель был в 3 раза выше контрольных значений как после ГХ, так и после НР.

Полученные данные свидетельствуют о том, что предполагаемый защитный эффект БФ, основанный на его разобщающем действии, в отношении ишемически-реперфузионных повреждений митохондрий печени реализуется лишь частично. Чтобы убедиться в этом, достаточно сравнить приведенные результаты с полученными ранее при использовании разобщителя ДНФ [4, 5].

При исследовании влияния БФ в составе среды ГХ на дыхательные параметры митохондрий печени было показано, что хранение приводило к

intact group. After NR the index reduced in 1.5 times if compared with HS (Fig. 3b).

Activity of GP in intact group made 0.296 ± 0.05 μmol GSSG/mg of protein/ min (Fig. 3c). The index decreased in 1.8 times after HS, the following NR almost did not affect it. In the presence of BF the activity of GP only after HS was higher that the control values by 20% and after reperfusion did not differ from them.

Activity of GR in the group 1 made 21.6 ± 2.9 nmol NADPH/ mg of protein/ min (Fig. 3d). After HS more than 4-fold reduction in enzyme activity was observed, it was kept after NR. In the group 3 the index was 3 times higher than the control values both after HS and NR.

The obtained results testify to the fact that the supposed protective effect of BF, based on its uncoupling

увеличению скорости дыхания во всех состояниях. Так как значение V_3 росло параллельно с V_{3p} , мы не можем это связать с усилением активности пятого комплекса дыхательной цепи, т. е. АТФ-синтазы. По всей видимости, в этом случае увеличение скорости дыхания обусловлено активацией ферментов цикла трикарбоновых кислот, участвующих в окислении субстрата, что может быть связано с адаптацией к ишемии электрон-транспортной цепи [11]. Кроме того, значительное увеличение V_4 свидетельствует о повышении протонной проницаемости внутренней мембраны митохондрий в условиях ишемии [13], что является причиной разобщения ОФ и снижения ДК.

Дальнейшая НР печени усугубляла процессы роста скорости дыхания в состоянии 4 и снижения ДК. Присутствие в среде БФ приводило к ещё большему увеличению проводимости мембраны для протонов после ГХ по сравнению с контролем, что и демонстрировало его разобщающие свойства. Сходная ситуация наблюдалась и в случае с ДНФ. Однако в отличие от ситуации с ДНФ, когда после реперфузии скорость дыхания в состоянии V_4 снижалась в 2 раза по сравнению с контролем, что способствовало увеличению степени сопряжения ОФ и повышению ДК [4], БФ приводил к ещё большему разобщению.

Присутствие в среде хранения БФ оказалось эффективным в отношении предупреждения перекисных процессов в печени. Базальный уровень ТБК-активных продуктов в контрольной группе увеличивался после ГХ и оставался таким же высоким после НР, свидетельствуя об индукции процессов ПОЛ в ходе ишемии/реперфузии. Данный показатель был значительно ниже в присутствии БФ на всех этапах эксперимента. Этот эффект может быть связан с предполагаемой способностью разобщителя снижать продукцию АФК, тем самым предотвращая усиление ПОЛ. В случае с ДНФ уровень ТБК-активных продуктов был одинаково низким как после ГХ, так и НР [5]. Бенциклана фумарат лишь частично предотвращал повышение этого показателя после НР по сравнению с ГХ, хотя он и оставался достоверно ниже контроля.

В отношении активности ферментов системы антиоксидантной защиты также наблюдались различия между действием ДНФ и БФ. Активность всех ферментов достоверно снижалась в контрольной группе уже на этапе хранения и оставалась низкой после реперфузии. Эти данные соответствуют результатам работ по исследованию активности ферментов в условиях оксидативного повреждения после ишемии/реперфузии [14, 15]. Защитное действие БФ относительно ферментов антиоксидантной защиты было выявлено в основном на этапе ГХ. Его присутствие в среде хранения

effect in respect of ischemia/reperfusion damage of liver mitochondria is realized just partially. To confirm this, the presented results could be compared with recent data on using of uncoupling agent DNP [4, 5].

When studying the effect of BF as a component of HS medium on respiratory parameters of liver mitochondria it has been shown that the storage resulted in the rise of respiration rate in all the states. Since V_3 increased in parallel with V_{3unc} we can not refer this to the strengthening of the activity of the fifth complex of respiratory chain, i. e. ATP-synthase. Evidently in this case the rise in the respiration rate is stipulated with the activation of enzymes of the tricarboxylic acid cycle participating in the oxidation of the substrate, that may be related to the adaptation to ischemia of electron-transport chain [11]. In addition, significant rise in V_4 testifies to an increase of proton permeability of mitochondria inner membrane under ischemia conditions [13], that is the cause of OP uncoupling and RCI reduction.

Further NR of liver aggravated the processes of the increased respiration rate in the state 4 and RCI decrease. The presence of BF in the medium led to much more rise in the permittivity of membrane for protons after HS if compared with the control, that was also demonstrated its uncoupling properties. Similar situation was observed in the case with DNP too. However in contrast to the situation with DNP, when after reperfusion the respiration rate in the state V_4 reduced twice versus the control, that testified to the rise in the extent of OP coupling and increased in RCI [4], BF led to much bigger uncoupling.

The presence of BF in the storage medium was effective for prevention of peroxidation processes in liver. Basal level of TBA-active products in the control group increased after HS and remained the same high after NR, testifying to the induction of LPO processes during ischemia/reperfusion. This index was significantly lower in BF presence at all the stages of experiment. This effect may be related to the supposed ability of uncoupling agent to decrease the production of ROS, thereby preventing LPO strengthening. In the case of DNP the level of TBA-active products was equally low both after HS and NR [5]. Bencyclane fumarate only partially prevented the rise in this index after NR if compared with HS, although it had remained statistically lower than the control.

As for the activity of enzymes of the antioxidant defense system the differences between the effect of DNP and BF were observed. The activity of all the enzymes statistically and significantly decreased in the control group even at the storage stage and remained low after reperfusion. These data conform the results of the researches on the studying the activity of enzymes under conditions of oxidative damage after ischemia/reperfusion [14, 15]. Protective effect of BF

полностью предотвращало наблюдаемое в контроле снижение активности каталазы и Г6ФДГ после ГХ. Последующая реперфузия нивелировала этот эффект, полученные данные не отличались от контрольных значений. Активность ГП тоже была достоверно выше контроля только после ГХ, хотя и не достигала интактного уровня. Исключение составляла ГР, активность которой была выше показателей контрольной группы как после ГХ, так и после НР, но ниже значения интактной группы.

Некоторое несоответствие в динамике глутатион-зависимых ферментов и Г6ФДГ можно объяснить следующим образом. Снижение активности ГП после реперфузии, видимо, связано не с недостатком субстрата (восстановленного глутатиона), а с повреждением самого фермента. Косвенным свидетельством этого предположения является сохранение на всех этапах эксперимента высокой активности ГР, которая катализирует реакцию восстановления окисленного глутатиона. В этом случае ее субстратом после реперфузии, видимо, служит окисленный глутатион, образованный не ферментативно, в результате непосредственного взаимодействия GSH со свободными радикалами [10].

Глутатионредуктаза, как известно, является НАДФН-зависимым ферментом. Образование НАДФН в пентозофосфатном шунте обеспечивает работу Г6ФДГ. Однако в связи с тем, что её активность в присутствии БФ достоверно выше контрольных значений только после ГХ, можно предположить, что необходимый для глутатионредуктазы НАДФН после реперфузии поступает от других НАДФН-генерирующих систем (малик-фермент, изоцитратдегидрогеназа), которые могут частично компенсировать количество восстановленных эквивалентов [12].

Защитное действие присутствия ДНФ в среде хранения главным образом проявлялось на этапе НР. Исключением являлась ГР, активность которой была выше контрольных значений только после ГХ, а поступление GSH после реперфузии для нормального функционирования ГП объяснялось его биосинтезом *de novo* с помощью гамма-глутаминцистеинилсинтетазы, а не восстановлением редуктазой. В условиях НР удаление ДНФ происходило постепенно, а значит и мембранный потенциал, который снизился во время ГХ, восстанавливался постепенно, тем самым не создавая предпосылок для быстрого образования АФК и инициации ПОЛ.

Так как защитный эффект ДНФ реализуется на этапе НР только после его удаления, чего не наблюдается в случае с БФ, можно предположить, что различие в их действии заключается в том, что ДНФ связывается сывороточным альбумином [3] и практически полностью удаляется из митохонд-

as for the enzymes of antioxidant defense was revealed mainly at the stage of HS. Its presence in storage medium completely prevented the observed in the control reduction of activity of catalase and G6PDH after HS. Following reperfusion neutralizes this effect, the findings did not differ from the control values. Activity of GP was statistically higher than the control only after HS, though it did not reach the intact level. The exception was GR, the activity of which was higher than the indices of the control group both after HS and after NR, but lower than those of the intact group.

Some mismatching in the dynamics of glutathione-dependent enzymes and G6PDH may be explained as follows. The decrease in GP activity after reperfusion is likely related not to the lack of substrate (reduced glutathione) but to the damage of the enzyme itself. Indirect proof of this supposition is the keeping of high activity of GR at all the stages of the experiment, which catalyzes the reaction of reduction of the oxidized glutathione. In this case its possible substrate after reperfusion perhaps serves oxidized glutathione, formed not with enzymes as a result of direct interaction of GSH with free radicals [10].

Glutathione reductase as it is known is NADPH-dependent enzyme. The formation of NADPH in pentosephosphate shunt is provided by the activity of G6PDH. However, due to the fact that its activity in BF presence is statistically higher than the control values only after HS one can suppose that essential for GR NADPH after reperfusion comes from other NADPH-generating systems (malic-enzyme, isocitrate dehydrogenase), capable of partial compensation of the number of reduced equivalents [12].

Protective effect of DNP presence in the storage medium was mainly manifested at the NR stage. The exception was GR, the activity of which was higher than the control values only after HS, and GSH entering after reperfusion for normal functioning of GP was explained by its biosynthesis *de novo* by means of gamma-glutamine cysteinyl synthetase, but not reduction with reductase. Under NR conditions DNF was removed gradually and therefore the membrane potential, which was reduced during HS recovered gradually, thereby not creating the preconditions for a rapid ROS formation and LPO initiation.

Since the protective effect of DNP is implemented at the stage of NR just after its removal, that is not observed in the case with BF, one may suppose that the difference in their effect consists in the fact that DNP binds the serum albumin [3] and is quite completely removed from mitochondria during washing-out prior to NR, enabling them to recover of the integrity of metabolic processes. As for the BF, according to the data on its pharmacokinetics [7] it in a greater extent circulates in blood in a free state (only 30% of preparation is bound with plasma proteins), *i. e.* its potential

рий в ходе отмывки перед НР, позволяя им восстановить целостность метаболических процессов. Что же касается БФ, то согласно данным о его фармакокинетике [7], он в большей степени циркулирует в крови в свободном виде (только 30% препарата связывается с плазменными белками), т. е. его потенциальная способность связаться с альбумином и быть удаленным из печени перед реоксигенацией достаточно мала. Таким образом, несмотря на то, что это свойство относится к преимуществам БФ с точки зрения фармакологической эффективности, оно же существенно минимизирует возможность удаления препарата из печени при НР и снижает потенциал его применения как компонента консервирующего раствора. В связи с этим поиск веществ, которые обладают свойствами "мягкого разобщителя", но при необходимости могут быть удалены на этапе НР, остаётся актуальным для разработки новых подходов в ГХ органов.

Выводы

1. На изолированных митохондриях печени крыс показано, что разобщающее действие БФ обусловлено увеличением протонной проводимости внутренней мембраны.

2. Введение БФ в среду ГХ печени крыс вызвало разобщение ОФ, что сопровождалось снижением базального уровня ТБК-активных продуктов и предотвращением снижения активности антиоксидантных ферментов.

3. На этапе НР положительный эффект БФ на перекисные процессы и систему антиоксидантной защиты значительно ослаблялся, что ограничивает перспективу его применения как компонента сред ГХ органов.

Литература

1. Белоус А.М., Лемешко В.В., Ясайтис А.А. Галидор, 1-бензил-1-(3'-диметиламинопропокси) циклогептан-фумарат, как разобщитель и ингибитор дыхательной цепи // Биохимия.– 1976.– Т. 41, №5.– С. 881–885.
2. Бойко А.Н., Кабанов А.А., Камчатнов П.Р. и др. Применение галидора в лечении хронической ишемии мозга // Инсульт: приложение к журн. неврол. и психиат. им. С.С. Корсакова.– 2005.– №15.– С. 45–50.
3. Луйк А.И., Лукьянчук В.Д. Параметры взаимодействия нитрофенолов различного химического строения с альбумином и их токсичность // Вопр. мед. химии.– 1982.– №5.– С. 48–50.
4. Черкашина Д.В., Ткачова О.М., Сомов О.Ю. та ін. Вплив 2,4-динітрофенолу на дихальну активність та вміст АТФ у печінці щурів після гіпотермічного зберігання та нормотермічної реперфузії // Укр. біохім. журн.– 2008.– Т. 80, №2.– С. 55–59.
5. Черкашина Д.В., Ткачова О.М., Сомов О.Ю. та ін. Прооксидантно-антиоксидантний баланс у печінці щурів

ability of binding with albumin and be removed from liver prior to re-oxygenation was quite low. Thus, in spite of fact that this property is related to the advantages of BF as for pharmacological efficiency, it significantly minimizes the possibility of the preparation removal from liver during NR and reduces the potential of its application as the component of preservation solution. In this connection the search for the substances with the properties of "mild uncoupler", which may be removed if necessary at the stage of NR, has remained an actual one for the designing the new approaches in organ HS.

Conclusions

1. In rat liver isolated mitochondria there has been shown that uncoupling effect of BF is stipulated with an increase in proton conductivity of inner membrane.

2. Introduction of BF into HS medium of rat's liver caused the uncoupling of OP, which accompanied with the decrease in basal level of TBA-active products and prevention of the reduction in the activity of antioxidant enzymes.

3. At the stage of NR a positive effect of BF on peroxidation processes and antioxidant defence system was significantly wakened, that restricts the perspective of its application as the component of HS media of organs.

References

1. Belous A.M., Lemeshko V.V., Yasajtis A.A. Halidor, 1-benzyl-1(3'-dimethylaminopropoxy) cycloheptane fumarate as uncoupler and inhibitor of respiratory chain // Biokhimiya.– 1976.– Vol. 41, N5.– P. 881–885.
2. Bojko A.N., Kabanov A.A., Kamchatnov P.R. et al. Application of halidor in treatment of chronic brain ischemia // Stroke: Annex to the Journal of Neurology and Psychiatry named by S.S. Korsakov.– 2005.– Vol. 15.– P. 45–50.
3. Lujk A.I., Lukyanchuk V.D. Parameters of interaction of nitrophenols of different chemical structure with albumin and their toxicity // Vopr. Med. Khimii.– 1982.– N5.– P. 48–50.
4. Cherkashina D.V., Tkachova O.M., Somov O.Yu. et al. Effect of 2,4-dinitrophenol on respiratory activity and ATP content in rat liver after hypothermic storage and normothermic reperfusion // Ukr. Biokhim. Zhurn.– 2008.– Vol. 80, N2.– P. 55–59.
5. Cherkashina D.V., Tkachova O.M., Somov O.Yu. et al. Prooxidant-antioxidant balance in rat liver after cold ischemia in presence of 2,4-dinitrophenol and following reperfusion // Dopovidi NAN Ukrainy.– 2007.– N10.– P. 168–173.
6. Barut I., Tarhan O. R., Kapucuoglu N. et al. Effect bencyclane fumarate on intestinal ischemia reperfusion injury // ANZ J. Surgery.– 2008.– Vol. 78, N6.– P. 476–481.
7. Bock P.R. A contribution to the pharmacokinetics of bencyclane (Fludilat) in man // Int. J. Clin. Pharmacol. Biopharm.– 1976.– Vol. 13, N4.– P. 246–252.
8. De Felice F.G., Ferreira S.T. Novel neuroprotective, neurotogenic and anti-amyloidogenic properties of 2,4-dinitrophenol: the gentle face of Janus // IUBMB Life.– 2006.– Vol. 58, N4.– P. 185–191.

- після холодової ішемії в присутності 2,4-динітрофенолу та наступної реперфузії // Доповіді НАН України. – 2007. – №10. – С. 168–173.
6. Barut I., Tarhan O. R., Kapucuoglu N. et al. Effect bencyclane fumarate on intestinal ischemia reperfusion injury // ANZ J. Surgery. – 2008. – Vol. 78, N6. – P. 476–481.
 7. Bock P.R. A contribution to the pharmacokinetics of bencyclane (Fludilat) in man // Int. J. Clin. Pharmacol. Biopharm. – 1976. – Vol. 13, N4. – P. 246–252.
 8. De Felice F.G., Ferreira S.T. Novel neuroprotective, neurotogenic and anti-amyloidogenic properties of 2,4-dinitrophenol: the gentle face of Janus // IUBMB Life. – 2006. – Vol. 58, N4. – P. 185–191.
 9. Estabrook R.W. Methods in Enzymology. – New York: Academic Press, 1967. – 41 p.
 10. Griffith O.W. Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis // Free Rad. Biol. Med. – 1999. – Vol. 27, N9-10. – P. 922–935.
 11. Krasinskaya I.P., Marshansky V.N., Dragunova S.F. et al. Relationships of respiratory chain and ATP-synthetase in energized mitochondria // FEBS Lett. – 1984. – Vol. 13, N167. – P. 176–180.
 12. Pandolfi P.P., Sonati F., Rivi R. et al. Targeted disruption of the housekeeping gene encoding glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PD): G6PD is dispensable for pentose synthesis but essential for defense against oxidative stress // EMBO J. – 1995. – Vol. 14, N21. – P. 5209–5215.
 13. Sammut I.A., Thorniley M.S., Simpkin S. et al. Impairment of hepatic mitochondrial respiratory function following storage and orthotopic transplantation of rat livers // Cryobiology. – 1998. – Vol. 36, N1. – P. 49–60.
 14. Sewerynek E., Reiter R.J., Melchiorri D. et al. Oxidative damage in the liver induced by ischemia-reperfusion: protection by melatonin // Hepatogastroenterology. – 1996. – Vol. 43, N10. – P. 898–905.
 15. Singh I., Gulati S., Orak J.K. et al. Expression of antioxidant enzymes in rat kidney during ischemia-reperfusion injury // Mol. Cell Biochem. – 1993. – Vol. 125, N2. – P. 97–104.
 16. Skulachev V.P. Lowering of intracellular O₂ concentration as a special function of respiratory systems of cells // Biochemistry. – 1994. – Vol. 59, N12. – P. 1433–1434.
 17. Somov A.Yu., Semenchenko O.A., Green C. et al. Mitochondrial function after liver preservation in high or low ionic-strength solutions: a comparison between UW-based and sucrose-based (SBS) solution // Cryoletters. – 2009. – Vol. 30, N1. – P. 1–12.
 9. Estabrook R.W. Methods in Enzymology. – New York: Academic Press, 1967. – 41 p.
 10. Griffith O.W. Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis // Free Rad. Biol. Med. – 1999. – Vol. 27, N9-10. – P. 922–935.
 11. Krasinskaya I.P., Marshansky V.N., Dragunova S.F. et al. Relationships of respiratory chain and ATP-synthetase in energized mitochondria // FEBS Lett. – 1984. – Vol. 13, N167. – P. 176–180.
 12. Pandolfi P.P., Sonati F., Rivi R. et al. Targeted disruption of the housekeeping gene encoding glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PD): G6PD is dispensable for pentose synthesis but essential for defense against oxidative stress // EMBO J. – 1995. – Vol. 14, N21. – P. 5209–5215.
 13. Sammut I.A., Thorniley M.S., Simpkin S. et al. Impairment of hepatic mitochondrial respiratory function following storage and orthotopic transplantation of rat livers // Cryobiology. – 1998. – Vol. 36, N1. – P. 49–60.
 14. Sewerynek E., Reiter R.J., Melchiorri D. et al. Oxidative damage in the liver induced by ischemia-reperfusion: protection by melatonin // Hepatogastroenterology. – 1996. – Vol. 43, N10. – P. 898–905.
 15. Singh I., Gulati S., Orak J.K. et al. Expression of antioxidant enzymes in rat kidney during ischemia-reperfusion injury // Mol. Cell Biochem. – 1993. – Vol. 125, N2. – P. 97–104.
 16. Skulachev V.P. Lowering of intracellular O₂ concentration as a special function of respiratory systems of cells // Biochemistry. – 1994. – Vol. 59, N12. – P. 1433–1434.
 17. Somov A.Yu., Semenchenko O.A., Green C. et al. Mitochondrial function after liver preservation in high or low ionic-strength solutions: a comparison between UW-based and sucrose-based (SBS) solution // Cryoletters. – 2009. – Vol. 30, N1. – P. 1–12.

Accepted in 13.04.2010

Поступила 13.04.2010
Рецензент А.Ю. Семенченко