

УДК 576.311.347:577.352.38

ПОВРЕЖДЕНИЕ МИТОХОНДРИЙ ПЕЧЕНИ КРЫС ПРИ ИНТОКСИКАЦИИ ТЕТРАХЛОРМЕТАНОМ. ЭФФЕКТЫ МЕЛАТОНИНА

© 2010 г. Ю. З. Максимчик, И. К. Дремза, Е. А. Лапшина, В. Т. Чещевик*, Е. Ю. Судникович,
С. В. Забродская, И. Б. Заводник*

Научно-производственный центр Институт фармакологии и биохимии НАН Беларуси,
бул. Ленинского Комсомола, 50, Гродно, 230017 Беларусь

*Гродненский государственный университет им. Янки Купалы, ул. Э. Ожешко, 22, Гродно, 230023 Беларусь;
электронная почта: zavodnik_il@mail.ru

Поступила в редакцию 01.06.2009 г.

После доработки 10.02.2010 г.

Митохондрии играют ключевую роль в координации важнейших клеточных функций. Однако молекулярные механизмы повреждения митохондрий и роль митохондриальной дисфункции в патогенезе разнообразных расстройств еще не установлены. Цель настоящей работы – изучение механизмов повреждения митохондрий печени крыс при острой интоксикации тетрахлорметаном *in vivo* и изолированных митохондрий *in vitro*, обработанных гипохлорной кислотой (НОСІ), и выяснение возможности коррекции повреждений мелатонином. Гипохлорная кислота (50–300 мкМ), основной медиатор воспаления, эффективно подавляла дыхательную активность митохондрий, нарушая сопряжение процессов дыхания и фосфорилирования, но не изменяла при этом коэффициент фосфорилирования ADP/O. Гипохлорная кислота окисляла также внутримитохондриальный глутатион и сульфгидрильные группы митохондриальных белков, приводила к накоплению смешанных дисульфидов глутатиона с белками, ингибировала α -кетоглутаратдегидрогеназу митохондрий. Токсическое поражение печени крыс тетрахлорметаном в дозе 4 г/кг массы животного через 24 ч приводило к значительному нарушению дыхательной активности митохондрий: скорость сукцинат- и глутамат-зависимого дыхания, сопряженного с фосфорилированием (V_3), уменьшалась на 65%, $p < 0.001$, и 50%, $p < 0.01$ соответственно. Коэффициент дыхательного контроля приближался к 1, коэффициент фосфорилирования резко уменьшался. Одновременно мы наблюдали окисление внутримитохондриального глутатиона (на 25%, $p < 0.05$), рост активности глутатионпероксидазы (на 50%, $p < 0.05$), выраженную инактивацию сукцинатдегидрогеназы (на 35%, $p < 0.01$) и повышение уровня оксида азота в плазме крови крыс (на 45%, $p < 0.05$). Механизм окислительного повреждения митохондрий при интоксикации может быть связан с истощением пула внутримитохондриального глутатиона, окислительной модификацией митохондриальных ферментов. Введение мелатонина животным (3 раза по 10 мг/кг), получавшим тетрахлорметан, сопровождалось увеличением скорости дыхания в состоянии 3 на 30% ($p < 0.05$) (при использовании в качестве субстрата сукцината, но не глутамата), снижало активность глутатионпероксидазы митохондрий до контрольного уровня и предотвращало повышение уровня оксида азота, но не оказывало протекторного действия на процессы сопряжения дыхания и фосфорилирования в митохондриях. Таким образом, мелатонин в дозе 10 мг/кг массы тела не защищал митохондрии от нарушения функционального состояния при тяжелой интоксикации печени крыс тетрахлорметаном, но влиял на уровень оксида азота в плазме крови и активность глутатионпероксидазы митохондрий.

Ключевые слова: митохондрии печени крыс, тетрахлорметан, сукцинатдегидрогеназа, мелатонин, гипохлорная кислота.

Митохондрии играют ключевую роль в координации важнейших клеточных функций, поскольку служат не только источником энергетических эквивалентов, но и мишенью, декодером и

коммутатором внутриклеточных сигналов, генератором вторичных мессенджеров и проапоптотических факторов [1]. Повреждение митохондрий окислительными агентами и их последующая дисфункция могут приводить к гибели клетки по некротическому либо апоптотическому механизму [2, 3]. Недавно сформулирована концепция, согласно которой митохондрии функционируют как внутриклеточный “сток” об-

Сокращения: АЛТ – аланинаминотрансфераза, АСТ – аспартатаминотрансфераза, GSH – восстановленный глутатион, GSHPx – глутатионпероксидаза, PSH – белковые сульфгидрильные группы, PSSG – смешанные дисульфиды глутатиона с белками.

разующихся пероксидов, регулируемый ионами Ca^{2+} , а возрастание концентрации Ca^{2+} в митохондриях приводит к прооксидантному состоянию [4]. При нарушении редокс-сопряжения в пункте убихинон/цитохромы bc_1 , зависимо от физического состояния внутренней митохондриальной мембраны, наблюдается утечка электронов и образование свободных радикалов [5]. Активация свободнорадикальных процессов в митохондриях приводит к повреждению компонентов электронно-транспортной цепи, митохондриальной ДНК, не защищенной гистонами, нарушению целостности митохондриальной мембраны и изменению трансмембранного потенциала [2, 3].

Печень чрезвычайно чувствительна к токсическим воздействиям, благодаря центральной роли в метаболизме ксенобиотиков и портальной локализации [6]. Предполагают, что дисфункция митохондрий – это начальный этап проявлений гепатотоксичности, а сами митохондрии служат первичной мишенью токсинов [7]. Молекулярные механизмы токсического действия тетрахлорметана и других галогеналканов, широко используемых для моделирования таких гепатотоксических эффектов, как фиброз, жировая дегенерация, гибель гепатоцитов, описаны достаточно детально [8, 9]. Нарушение функций митохондрий под действием тетрахлорметана лежит в основе многих гепатоцитарных расстройств [8].

Учитывая ключевую роль дисфункции митохондрий в патогенезе многих заболеваний [10], коррекцию дыхательной активности митохондрий следует рассматривать как перспективный подход к лекарственной терапии, а компоненты дыхательной цепи – как мишени для специфического воздействия. Существенный интерес представляет поиск антиоксидантов, способных препятствовать развитию окислительных повреждений митохондрий (так называемая митохондриальная медицина) [10]. Недавно установлено, что эпифизарный гормон мелатонин – широко исследуемый антиоксидант – защищает митохондрии от генерации в них свободных радикалов [11]. Наиболее высокая внутриклеточная концентрация мелатонина обнаружена в митохондриях [12], что указывает на его непосредственное участие в функционировании этих органелл и модулировании их дыхательной активности [13]. Более того, в качестве одного из путей биотрансформации мелатонина рассматривают его окисление митохондриальным цитохромом c [12]. Однако точные механизмы регуляции мелатонином гомеостаза митохондрий и эффективности работы электронно-транспортной цепи остаются невыясненными.

Цель настоящей работы – изучить изменение функциональной активности митохондрий печени крыс при моделировании окислительных повреждений *in vitro*, экспонируя митохондрии H_2O_2 и *in vivo*, при токсическом воздействии тет-

рахлорметаном, а также оценить возможность коррекции митохондриальных повреждений мелатонином.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Реактивы. В работе использовали N-ацетил-5-метокситриптамин (мелатонин), гексагидрат динатриевой соли сукцината, натриевую соль L-глутамата, ADP, гипохлорит натрия (NaOCl), 5,5'-дителибис(2-нитробензойную кислоту) (реактив Элмана), трихлоруксусную кислоту (ТХУ), NADH, тетрахлорметан (CCl_4), восстановленный глутатион (GSH), *трет*-бутилгидропероксид (“Sigma-Aldrich”, США или “Steinheim”, Германия).

Экспериментальная модель. Эксперименты проводили на 40 крысах-самцах линии Wistar массой 200–250 г. Животные в течение недели были адаптированы к 12-часовому циклу смены световой (с 8 ч) и темновой (с 20 ч) фазы суток. CCl_4 вводили в 9 ч однократно внутривентрикулярно (в/ж) с помощью зонда в дозе 4 г/кг (50% раствор в оливковом масле, 2.5 мл/кг). Мелатонин вводили в виде 0.3% раствора в 0.9% растворе NaCl , содержащем 5% этанола, внутривентрикулярно (в/б) в дозе 10 мг/кг 3 раза: за 30 мин до введения CCl_4 , через 2 и 6 ч после его введения. Животные были разделены на четыре группы: 1) контроль – животные, получавшие оливковое масло (5 мл/кг веса тела) и физиологический раствор, содержащий 5% этанола (в том же объеме, что и раствор мелатонина, в/б); 2) мелатонин – животные, получавшие мелатонин в/б и оливковое масло в/ж; 3) CCl_4 – животные, получавшие CCl_4 в/ж и физиологический раствор в/б; 4) мелатонин + CCl_4 – животные, получавшие мелатонин и CCl_4 . В каждую группу входило 10 животных. Животных декапитировали через 24 ч после введения CCl_4 .

Выделение митохондрий и регистрация их дыхательной активности. После декапитации животных отбирали образцы крови, печень извлекали на холоду (0–4°C), осушали фильтровальной бумагой, взвешивали и гомогенизировали в среде выделения, содержащей 0.25 М сахарозу, 0.02 М трис- HCl и 0.001 М EDTA, pH 7.2. Митохондрии выделяли методом дифференциального центрифугирования [14]. Ядерную фракцию отделяли центрифугированием при 600 g в течение 10 мин при 4°C. Супернатант центрифугировали при 8500 g в течение 10 мин при 4°C, осадок митохондрий дважды промывали в среде выделения и ресуспендировали до концентрации белка 35–40 мг/мл. Концентрацию белка определяли по методу Лоури [15].

Скорость митохондриального дыхания регистрировали полярографически, используя изготовленный в лаборатории электрод Кларка,

Таблица 1. Активность аминотрансфераз, уровень билирубина и оксида азота в плазме крови крыс через 24 ч после острой интоксикации тетрахлорметаном, эффект мелатонина

| Показатели | Контроль | CCl ₄ | Мелатонин + CCl ₄ | Мелатонин |
|-------------------------------------|--------------|------------------|------------------------------|--------------|
| АЛТ, мккат/л | 0.78 ± 0.09 | 1.84 ± 0.04*** | 1.80 ± 0.04*** | 0.84 ± 0.10 |
| АСТ, мккат/л | 0.74 ± 0.05 | 1.31 ± 0.08*** | 1.30 ± 0.05*** | 0.76 ± 0.04 |
| Общий билирубин, мкмоль/л | 1.95 ± 0.41 | 15.15 ± 1.99*** | 15.87 ± 3.43** | 2.87 ± 0.39 |
| Конъюгированный билирубин, мкмоль/л | 0.65 ± 0.43 | 9.01 ± 2.44* | 11.90 ± 3.64* | 0.54 ± 0.37 |
| Общие нитриты, мкмоль/л | 27.14 ± 1.49 | 42.07 ± 4.40** | 27.50 ± 4.25# | 37.14 ± 5.96 |

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ по отношению к уровню в контроле.

$p < 0.05$ по отношению к уровню у животных, получавших тетрахлорметан.

встроенный в термостатируемую герметическую полярографическую ячейку, при 26.5°C. Для регистрации дыхания суспензию митохондрий (1 мг белка/мл) помещали в ячейку со средой инкубации (0.125 М сахараза, 0.02 М трис-HCl, 0.05 М KCl, 0.02 М KН₂PO₄, 0.005 М MgSO₄, 0.001 М EDTA, pH 7.5). В суспензию митохондрий вводили субстраты дыхания (*L*-глутамат – 4 мМ, сукцинат – 5 мМ) и ADP (180 мкМ, что соответствует 210 нмоль ADP в полярографической ячейке). Рассчитывали скорость дыхания митохондрий в различных метаболических состояниях: V_2 – скорость субстрат-зависимого дыхания, V_3 – скорость дыхания, сопряженного с фосфорилированием (после внесения ADP). Определяли показатели, характеризующие сопряжение процессов окисления и фосфорилирования в митохондриях: коэффициент дыхательного контроля (V_3/V_2) и коэффициент фосфорилирования – ADP/O (отношение количества внесенного ADP к количеству потребленного кислорода за время полного фосфорилирования).

Биохимические показатели митохондрий. Содержание GSH в митохондриальной фракции гепатоцитов определяли по методу Элмана [16], используя коэффициент молярной экстинкции $\epsilon_{412} = 13600 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$, содержание смешанных дисульфидов глутатиона с белками (PSSG) – согласно [17].

Для измерения глутатионпероксидазной активности 0.1 мл суспензии митохондрий ресуспендировали в 0.1 мл воды и разрушали, используя три цикла замораживания–оттаивания [4], разбавляли 10-кратным объемом изотонического фосфатного буфера (150 мМ NaCl, 10 мМ Na₂HPO₄, pH 7.4). Полученный образец (20 мкл) использовали для определения активности фермента [18]. Активность митохондриальной сукцинатдегидрогеназы определяли по скорости восстановления 2,6-дихлорфенолиндофенола, а активность α -кетоглутаратдегидрогеназы – по скорости восстановления NAD⁺ [19]. Активность маркерных ферментов повреждения клеточных

мембран – аланинаминотрансферазы (АЛТ) и аспартаатаминотрансферазы (АСТ), а также уровни свободного, конъюгированного и общего билирубина в плазме крови определяли, используя наборы реактивов (“Pliva-Lachema a.s.”, Чехия). Суммарный уровень нитритов и нитратов, отражающий генерацию оксида азота, измеряли в плазме крови с помощью реактива Грисса (N-(1-нафтил)этилендиаминдигидрохлорид, сульфаниламид) и металлического кадмия в качестве восстановителя [20].

Статистический анализ. Полученные результаты соответствовали закону нормального распределения вариационного ряда и были проанализированы параметрическим методом вариационной статистики с применением *t*-критерия Стьюдента. Результаты представляли как среднее 8–10 измерений ± стандартная ошибка среднего.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Параметры плазмы крови, характеризующие токсическое поражение печени крыс тетрахлорметаном. Токсический эффект тетрахлорметана мы регистрировали по возрастанию уровней общего (в 7.7 раза, $p < 0.001$) и конъюгированного (в 13.8 раза, $p < 0.01$) билирубина в плазме крови крыс через 24 ч после введения CCl₄ (табл. 1). Значительное повышение уровня конъюгированного билирубина свидетельствует о сохранении конъюгирующей функции печени при интоксикации. Одновременно в плазме крови крыс значительно увеличилась активность маркеров поражения печени – АЛТ (в 2.4 раза, $p < 0.001$) и АСТ (в 1.77 раза, $p < 0.001$). Введение мелатонина на фоне интоксикации CCl₄ не оказывало гепатопротекторного эффекта и не влияло на содержание АЛТ и АСТ в плазме крови крыс. Острая интоксикация сопровождалась значительным повышением уровня оксида азота в плазме крови (на 45%, $p < 0.05$) (табл. 1), что указывало на развитие сопутствующих воспалительных процессов. Введение мелатонина животным при интоксикации

Таблица 2. Параметры, характеризующие процессы окислительного фосфорилирования в митохондриях печени крыс, через 24 ч после острой интоксикации тетрахлорметаном, эффект мелатонина

| Группа животных | Скорость дыхания, нг-атом О/мин × мг белка | | Коэффициент дыхательного контроля, V_3/V_2 | Коэффициент фосфорилирования (ADP/O) |
|------------------------------|--|--|--|--------------------------------------|
| | в присутствии субстрата V_2 | сопряженного с фосфорилированием (в присутствии ADP) V_3 | | |
| Субстрат – глутамат | | | | |
| Контроль | 18.7 ± 2.3 | 63.1 ± 4.7 | 3.41 ± 0.32 | 1.6 ± 0.1 |
| CCl ₄ | 20.8 ± 4.6 | 27.5 ± 4.2** | 1.36 ± 0.51** | 0.0 |
| Мелатонин + CCl ₄ | 21.1 ± 3.5 | 29.5 ± 3.7** | 1.39 ± 0.53* | 0.0 |
| Мелатонин | 33.0 ± 3.6* | 73.4 ± 7.7 | 2.23 ± 0.22 | 1.7 ± 0.2 |
| Субстрат – сукцинат | | | | |
| Контроль | 47.8 ± 5.3 | 153.9 ± 11.2 | 3.20 ± 0.40 | 1.64 ± 0.1 |
| CCl ₄ | 61.6 ± 4.6 | 54.2 ± 3.6*** | 1.00 ± 0.12*** | 0.0 |
| Мелатонин + CCl ₄ | 60.2 ± 4.8 | 71.9 ± 5.0***# | 1.13 ± 0.13*** | 0.0 |
| Мелатонин | 53.6 ± 6.7 | 141.4 ± 15.4 | 2.6 ± 0.3 | 1.48 ± 0.2 |

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ по отношению к уровню в контроле.

$p < 0.05$ по отношению к уровню в группе животных, получавших тетрахлорметан.

CCl₄ практически восстанавливало исходный уровень NO, в то время как у контрольных животных уровень оксида азота в плазме крови не изменялся значительно в ответ на введение мелатонина (табл. 1). Полученные данные позволяют предполагать, что мелатонин, модулируя активность NO-синтазной системы, снижает гиперпродукцию оксида азота при интоксикации.

Дыхательная активность митохондрий печени крыс при токсическом поражении печени тетрахлорметаном. Параметры, характеризующие состояние окислительной, фосфорилирующей и сопрягающей функций митохондрий печени интактных животных и животных, подвергнутых действию тетрахлорметана и мелатонина (в качестве возможного гепатопротектора), при использовании в качестве субстратов окисления сукцината и L-глутамата представлены в табл. 2. Через 24 ч после острой интоксикации крыс тетрахлорметаном мы наблюдали нарушение дыхательной функции митохондрий. Так, скорость сукцинат-зависимого потребления кислорода (V_2) несколько увеличивалась (на 25%), скорость дыхания митохондрий в состоянии 3 (V_3) при использовании сукцината уменьшалась значительно (на 65%, $p < 0.001$) (табл. 2). В то же время скорость глутамат-зависимого дыхания (V_2) не изменялась, скорость глутамат-зависимого потребления кислорода, сопряженного с фосфорилированием (V_3), уменьшалась существенно (на 50%, $p < 0.01$) (табл. 2), и полностью отсутствовал выход в четвертое метаболическое состояние. Соответственно, коэффициент дыхательного контроля для экзогенных субстратов (сукцината, глутамата) приближался к единице, а коэффициент фосфо-

рилирования резко уменьшался, что отражало снижение эффективности использования кислорода митохондриями при синтезе АТФ. Трехкратное введение мелатонина в дозе 10 мг/кг на фоне поражения печени CCl₄ не приводило к выраженному восстановлению функциональной активности митохондрий, однако при сукцинат-зависимом дыхании митохондрий скорость фосфорилирующего окисления (V_3) в данной группе животных была выше (на 30%, $p < 0.05$), чем у животных, получавших только CCl₄. Следует отметить, что у интактных животных мелатонин увеличивал скорость глутамат-зависимого дыхания (V_2) на 60% ($p < 0.05$), V_3 – на 15% и уменьшал коэффициент дыхательного контроля по сравнению с контрольной группой животных. Однако при сукцинат-зависимом дыхании скорость потребления кислорода митохондриями в состоянии 3 уменьшалась незначительно (на 10%) при некотором снижении коэффициентов дыхательного контроля (на 15%) и фосфорилирования (на 25%) по сравнению с контрольной группой (табл. 2).

Таким образом, острая интоксикация крыс тетрахлорметаном (4 г/кг массы тела) приводила к резкому уменьшению скорости потребления кислорода, сопряженного с фосфорилированием, и полному разобщению процессов дыхания и фосфорилирования. Введение мелатонина повышало скорость дыхания, сопряженного с фосфорилированием, но не восстанавливало фосфорилирующую функцию митохондрий при интоксикации, несмотря на то что у интактных животных мелатонин усиливал дыхательную активность ми-

Таблица 3. Уровни восстановленного глутатиона, активностей глутатионпероксидазы и сукцинатдегидрогеназы в митохондриях печени крыс через 24 ч после острой интоксикации тетрахлорметаном: эффект мелатонина

| Показатель | Контроль | CCl ₄ | Мелатонин + CCl ₄ | Мелатонин |
|---|---------------|------------------|------------------------------|---------------|
| GSH, нмоль/мг белка | 10.22 ± 1.25 | 7.64 ± 2.27* | 5.89 ± 2.32** | 10.86 ± 2.41 |
| Глутатион-пероксидаза, нмоль GSH/мин на 1 мг белка | 32.62 ± 15.60 | 61.50 ± 12.98** | 38.83 ± 15.12 | 51.68 ± 19.17 |
| Сукцинат-дегидрогеназа, нмоль сукцината/мин на 1 мг белка | 27.88 ± 6.19 | 17.88 ± 2.24** | 16.53 ± 4.20** | 26.72 ± 6.28 |

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ по отношению к уровню в контроле.

тохондрий при использовании глутамата в качестве субстрата.

Ферментативная активность и содержание восстановленного глутатиона в митохондриях печени крыс при токсическом поражении тетрахлорметаном. Введение CCl₄ приводило к развитию окислительного стресса в митохондриях печени крыс. Так, содержание GSH в этих органеллах через 24 ч после введения CCl₄ уменьшалось на 25% ($p < 0.05$) (табл. 3), а содержание смешанных дисульфидов глутатиона с митохондриальными белками PSSG увеличилось (данные не представлены). Снижение содержания GSH в митохондриях крыс при интоксикации было связано со значительным повышением (на 50%, $p < 0.05$) активности митохондриальной глутатионпероксидазы (GSHPx) (табл. 3). Введение мелатонина не влияло на уровень GSH в митохон-

дриях печени и контрольных, и опытных животных. При этом мелатонин снижал активность GSHPx на 30% в митохондриях опытных животных и увеличивал ее на 40% в контрольной группе. Мы наблюдали выраженное снижение активности сукцинатдегидрогеназы митохондрий (на 35%, $p < 0.01$) при введении CCl₄ (табл. 3), что согласуется с меньшей дыхательной активностью митохондрий у этих животных. Введение мелатонина не влияло на активность фермента (табл. 3).

Окислительная модификация митохондрий печени крыс гипохлорной кислотой (HOCl) *in vitro*. Уровень гипохлорной кислоты в очаге воспаления достигает 200 мкМ [21], а митохондрии могут служить ее мишенью в клетке. HOCl, внесенная нами в суспензию митохондрий в концентрации 50–300 мкМ, нарушала дыхательную активность митохондрий (рис. 1). HOCl незначительно уве-

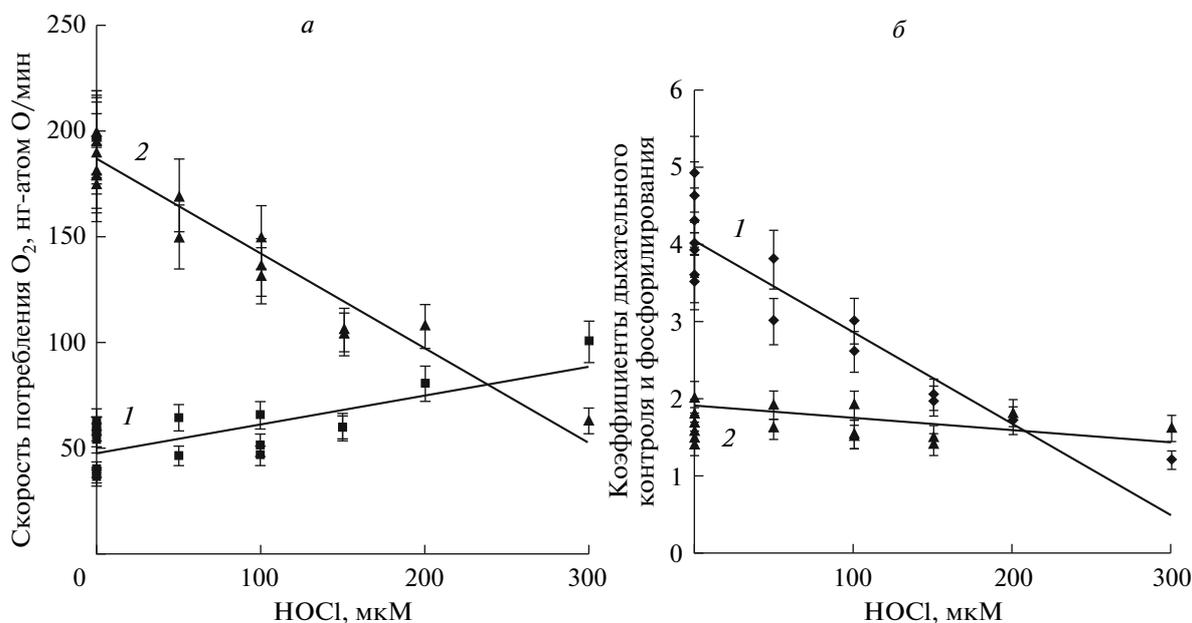


Рис. 1. Эффект гипохлорной кислоты на дыхательную активность митохондрий печени крыс. *a* – Скорость потребления кислорода в присутствии субстрата – сукцината V_2 (1), скорость фосфорилирующего окисления V_3 (2); *б* – коэффициент дыхательного контроля V_3/V_2 (1), коэффициент фосфорилирования ADP/O (2). HOCl в различных концентрациях вносили в суспензию митохондрий при 26.5°C за 5 мин до начала регистрации потребления кислорода.

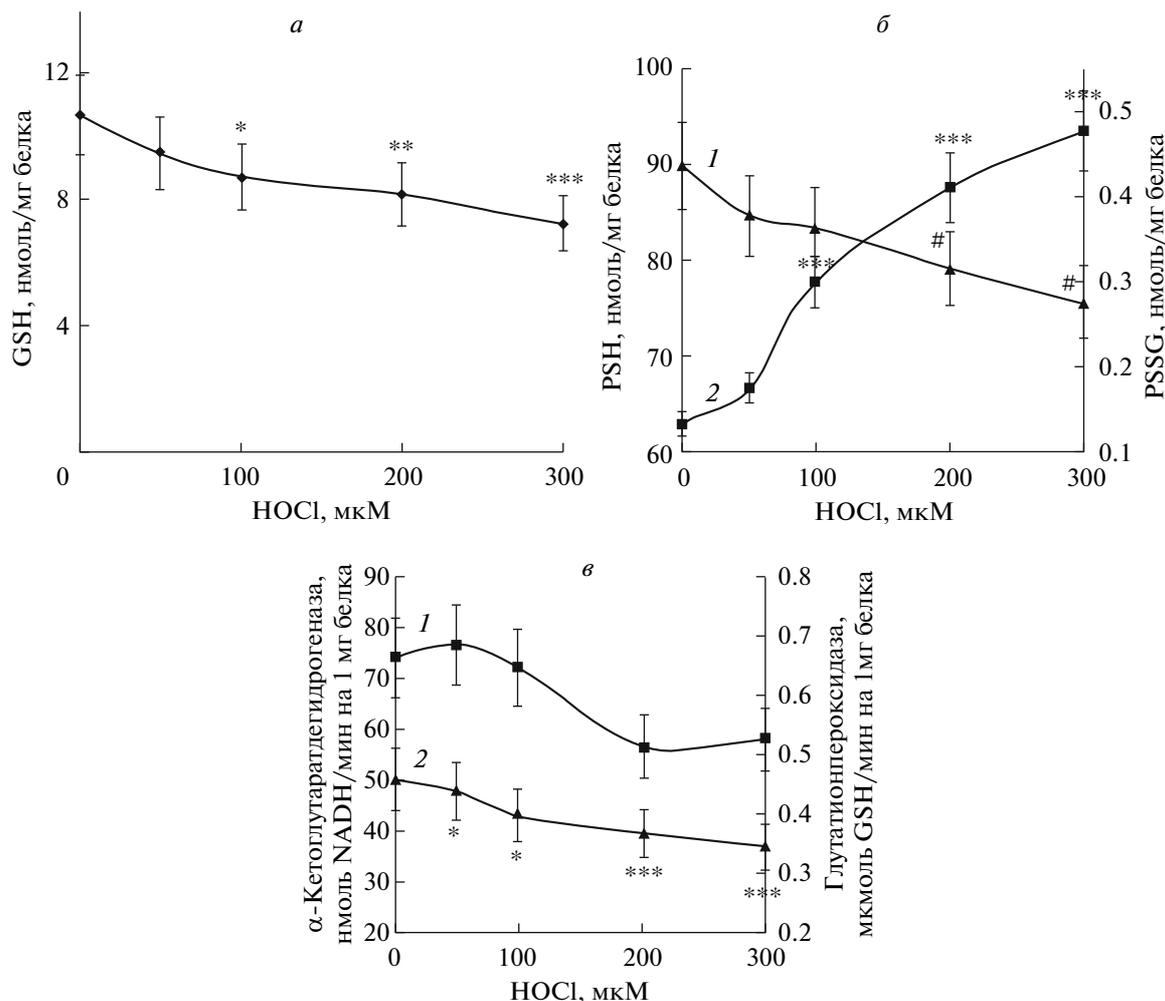


Рис. 2. Эффект гипохлорной кислоты на уровень восстановленного глутатиона GSH (а); общее содержание белковых сульфгидрильных групп PSH (1) и уровень смешанных дисульфидов глутатиона с белками PSSG (2) (б); и активность глутатионпероксидазы (1) и α -кетоглутаратдегидрогеназы (2) (в) в митохондриях печени крыс. Митохондрии (10–12 мг белка/мл) экспонировали различным концентрациям гипохлорной кислоты в течение 10 мин при 26.5°C. *, # – $p < 0.05$, ** – $p < 0.01$, *** – $p < 0.001$.

личивала скорость сукцинат-зависимого дыхания (V_2) и существенно снижала скорость потребления кислорода, сопряженного с фосфорилированием (V_3) (рис. 1а). Это приводило к уменьшению коэффициента дыхательного контроля без значительного изменения коэффициента фосфорилирования (рис. 1б). Подобные закономерности мы обнаружили и при использовании в качестве субстрата дыхания глутамата (данные не представлены). Уменьшение скорости дыхания в состоянии 3 было связано со снижением уровня сульфгидрильных групп (PSH) митохондриальных белков и митохондриального GSH (рис. 2а, б), в том числе за счет образования смешанных дисульфидов глутатиона с белками митохондрий, уровень которых возрастал (рис. 2б). Мы не наблюдали достоверного изменения ак-

тивности основного фермента антиоксидантной защиты митохондрий – глутатионпероксидазы. Однако HOCl существенно ингибировала один из ключевых ферментов цикла Кребса – α -кетоглутаратдегидрогеназу (рис. 2в). Поскольку скорость дыхания митохондрий, экспонированных HOCl, в состоянии 3 значительно уменьшалась, можно предположить, что HOCl в используемом диапазоне концентраций повреждает комплексы электронно-транспортной цепи митохондрий.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Ранее в многочисленных исследованиях было продемонстрировано нарушение структуры и функции митохондрий под действием тетрахлорметана (CCl_4). Так, при индуцированном CCl_4

циррозе снижается содержание митохондрий в клетках печени, нарушается их метаболизм и существенно уменьшается образование АТФ [22]. Известно, что в печени CCl_4 метаболизируется с участием цитохром Р450-зависимой системы, при этом образуется трихлорметильный радикал $\cdot\text{CCl}_3$, быстро разрушается цитохром Р450 и генерируются радикальные продукты, в том числе денильный радикал мембранных липидов L^\bullet , оксид LO^\bullet и пероксид LOO^\bullet липидные радикалы [23]. Инкубация изолированных гепатоцитов с CCl_4 приводит к нарушению кальциевого гомеостаза митохондрий, снижению внутриклеточной концентрации АТФ [24] и изменению проницаемости митохондрий. Введение крысам CCl_4 вызывает повышение уровня продуктов перекисного окисления липидов в митохондриях печени, значительно нарушает скорость потребления кислорода в третьем и четвертом метаболических состояниях, уменьшает содержание гема в митохондриях (на 60%) и активность цитохромоксидазы [25]. При хронической интоксикации крыс CCl_4 мембранный потенциал митохондрий снижается на 30 мВ, нарушается синтез АТФ и распределение холестерина и фосфолипидов в митохондриальной мембране, происходит набухание митохондрий [26].

В нашем эксперименте через 24 ч после введения CCl_4 в плазме крови животных возрастало содержание маркеров повреждения клеток печени (уровня билирубина, активности АЛТ и АСТ), что обусловлено воздействием на клеточные органы токсических метаболитов CCl_4 и образующихся свободных радикалов. Параллельно с этим мы наблюдали значительное нарушение митохондриального дыхания клеток печени и полное разобщение процессов окисления и фосфорилирования.

В предотвращении свободнорадикального повреждения компонентов электронно-транспортной цепи митохондрий главную роль играет уровень глутатиона [27]. Согласно нашим измерениям, уровень GSH в митохондриях печени составляет 10–12 нмоль/мг белка, что соответствует ранее опубликованным данным [28]. Нами установлено, что введение CCl_4 приводит к существенному уменьшению содержания GSH в митохондриях печени крыс, частично вследствие увеличения доли GSH, включенного в смешанные дисульфиды с митохондриальными белками, что отражает развитие окислительного стресса.

О прямом повреждении компонентов электронно-транспортной цепи митохондрий свидетельствует обнаруженное нами снижение активности сукцинатдегидрогеназы при токсическом поражении печени. Прямая корреляция между активностью фермента и уровнем GSH ($R^2 = 0.36$, $p < 0.05$) в митохондриях указывает на окислительное повреждение сукцинатдегидрогеназы

при интоксикации. Линейная зависимость между уровнем внутримитохондриального GSH и активностью АТФ-синтазы и, в конечном итоге, скоростью окислительного фосфорилирования в процессе регенерации печени при частичной гепатэктомии показана ранее [29]. Обнаруженное нами возрастание активности митохондриальной GSHPx при интоксикации компенсирует, на наш взгляд, уменьшение доступности GSH GSH-зависимым антиоксидантным ферментам. Введение мелатонина интоксцированным животным не приводило к повышению уровня глутатиона и активности сукцинатдегидрогеназы, что свидетельствует о глубоком в значительной степени необратимом повреждении митохондрий.

Один из факторов повреждения печени и медиатор цитотоксичности — гипохлорная кислота, уровень которой возрастает при избыточном воспалительном ответе и лейкоцитарной инфильтрации в ткани печени [30]. В наших экспериментах обработка митохондрий HOCl *in vitro* существенно нарушала их функциональную активность, ингибируя дыхание и значительно снижая коэффициент дыхательного контроля, возможно, в результате повреждения митохондриальной мембраны (соответственно, диссипации протонного градиента) и компонентов дыхательной цепи. Известно, что гипохлорная кислота и хлорамины вызывают окислительные повреждения клеточных белков и мембран, включая окисление сульфгидрильных групп, формирование хлоргидринов жирных кислот и холестерина [30]. Гипохлорная кислота, как недавно установлено, индуцирует набухание изолированных митохондрий печени крысы и митохондрий в линии клеток HepG2 гепатомы, а также падение мембранного потенциала, истечение цитохрома *c*, перестройку митохондрий, связанную с изменением мембранной проницаемости (mitochondrial permeability transition), и, как результат, гибель клеток по апоптотическому механизму [31].

Таким образом, дыхательная цепь митохондрий весьма чувствительна к внешним повреждающим воздействиям (HOCl , CCl_4). Механизм повреждения митохондрий клеток печени при интоксикации CCl_4 может быть связан с прямым повреждением компонентов цепи переноса электронов образующимися радикалами, нарушением целостности внутренней митохондриальной мембраны, истощением внутримитохондриального GSH, окислением сульфгидрильных групп митохондриальных белков, повреждающим действием повышенных концентраций оксида азота. В то же время коэффициент фосфорилирования ADP/O при воздействии CCl_4 *in vivo* снижался до нулевого значения, тогда как при окислительном воздействии HOCl *in vitro* оставался неизменным при резком уменьшении скорости окисления субстрата и коэффициента дыхательного контроля в

обоих случаях. Влияние агентов на фосфорилирующую функцию митохондрий качественно различается. Ранее было доказано, что разобщающий эффект свободных жирных кислот связан с функционированием ADP/АТФ- и аспарат/глутамат-антипортеров в митохондриях печени [32–34]. Об участии свободных жирных кислот, которые образуются в присутствии НОСІ в результате гидролиза фосфолипидов митохондриальных мембран, свидетельствует характер воздействия этого соединения на величину ADP/O и дыхательный контроль митохондрий.

Учитывая значительную роль митохондриальных повреждений в развитии токсического поражения печени и способность митохондрий специфически накапливать мелатонин, мы рассмотрели возможность коррекции нарушений активности митохондрий печени мелатонином. Участие мелатонина в реакциях антиоксидантной защиты и в качестве скэвенджера свободных радикалов на сегодняшний день хорошо известно [35]. Мелатонин позитивно влияет на митохондриальную электронно-транспортную цепь и процессы окислительного фосфорилирования [11–13]. Недавно установлено, что предварительное введение мелатонина (10 мг/кг) предотвращало развитие некротических изменений и окислительных повреждений ткани печени при интоксикации метанолом [36]. Ранее мы показали, что трехкратное введение мелатонина в дозе 15 мг/кг массы тела препятствовало развитию структурных и функциональных поражений печени крысы, индуцируемых CCl_4 [37]. В настоящем исследовании не обнаружено достоверного уменьшения уровня маркеров поражения печени в плазме крови крыс при введении мелатонина на фоне тяжелой интоксикации тетрахлорметаном. В то же время уровень оксида азота в плазме крови таких крыс достоверно уменьшался при введении мелатонина, что отражает его возможный противовоспалительный эффект. Ранее мы показали, что мелатонин способен модулировать уровень оксида азота в плазме крови и ткани аорты крыс при экспериментальном сахарном диабете и действовать как прямой скэвенджер NO [38].

Введение мелатонина (10 мг/кг \times 3) контрольным животным сопровождалось статистически значимым увеличением скорости нефосфорилирующего потребления кислорода митохондриями в состоянии 2 (V_2) при использовании в качестве субстрата *L*-глутамата. Следует отметить, что эффекты интоксикации и введения мелатонина, регистрируемые в присутствии глутамата, могут локализоваться как в матриксе митохондрий, так и в дыхательной цепи. При использовании в качестве субстрата сукцината скорость фосфорилирующего окисления (V_3) статистически значимо повышалась у животных, получавших CCl_4 на фоне введения мелатонина, по сравнению с животными,

получавшими только CCl_4 . Исходя из наших результатов, можно предположить, что мелатонин специфически взаимодействует с комплексом I и, возможно, частично предохраняет комплекс II от тяжелых повреждений при интоксикации. Введение мелатонина животным, получавшим CCl_4 , снижало также активность GSHPx до значений, отмеченных в контроле. Можно отметить, что нами обнаружена прямая корреляция между активностью митохондриальной GSHPx и уровнем оксида азота, которые изменяются при интоксикации животных и введении мелатонина. В то же время, показано, что оксид азота *in vitro* способен ингибировать GSHPx [39].

Обобщая полученные результаты, можно заключить, что при тяжелой интоксикации тетрахлорметаном введение мелатонина в дозе 10 мг/кг не защищает существенно функционирование системы окислительного фосфорилирования митохондрий печени крыс, но обладает способностью регулировать активность GSHPx митохондрий и уровень NO в плазме крови.

Авторы выражают признательность Расселу Райтеру (University of Texas Health Sciences Center, USA) за предоставленный препарат мелатонина и постоянный интерес к проводимым исследованиям.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Duchen M.R.* Mitochondria in health and disease: perspectives on a new mitochondrial biology // *Mol. Aspects Med.* 2004. V. 25. P. 365–451.
2. *Jo S.H., Son M.K., Koh H.J., Lee S.M., Song I.H., Kim Y.O., Lee Y.S., Jeong K.S., Kim W.B., Park J.W., Song B.J., Huh T.L.* Control of mitochondrial redox balance and cellular defense against oxidative damage by mitochondrial NADP⁺-dependent isocitrate dehydrogenase // *J. Biol. Chem.* 2001. V. 276. P. 16168–16176.
3. *Kowaltowski A.J., Vercesi A.E.* Mitochondrial damage induced by conditions of oxidative stress // *Free Radic. Biol. Med.* 1999. V. 26. P. 463–471.
4. *Zoccarato F., Cavallini L., Alexandre A.* Respiration-dependent removal of exogenous H₂O₂ in brain mitochondria: inhibition by Ca²⁺ // *J. Biol. Chem.* 2004. V. 279. P. 166–4174.
5. *Nohl H., Gille L., Staniek K.* The mystery of reactive oxygen species derived from cell respiration // *Acta Biochim. Pol.* 2004. V. 51. P. 223–229.
6. *Jaeschke H., Gores G.J., Cederbaum A.I., Hinson J.A., Pessayre D., Lemasters J.J.* Mechanisms of hepatotoxicity // *Toxicol. Sci.* 2002. V. 65. P. 166–176.
7. *Martin E.J., Racz W.J., Forkert P.G.* Mitochondrial dysfunction is an early manifestation of 1,1-dichloroethylene-induced hepatotoxicity in mice // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2003. V. 304. P. 121–129.
8. *Smuckler E.A.* Structural and functional changes in acute liver injury // *Environ. Health Perspect.* 1976. V. 15. P. 13–25.

9. Weber L.W., Boll M., Stampfl A. Hepatotoxicity and mechanism of action of haloalkanes: carbon tetrachloride as a toxicological model // *Crit. Rev. Toxicol.* 2003. V. 33. P. 105–136.
10. Fosslie E. Mitochondrial medicine – molecular pathology of defective oxidative phosphorylation // *Ann. Clin. Lab. Sci.* 2001. V. 31. P. 25–67.
11. Acuña-Castroviejo D., Martín M., Macías M., Escames G., León J., Khaldy H., Reiter R.J. Melatonin, mitochondria, and cellular bioenergetics // *J. Pineal Res.* 2001. V. 30. P. 65–74.
12. Reiter R.J., Tan D.X., Mayo J.C., Sainz R.M., Leon J., Czarnocki Z. Melatonin as an antioxidant: biochemical mechanisms and pathophysiological implications in humans // *Acta Biochim. Pol.* 2003. V. 50. P. 1129–1146.
13. Martín M., Macías M., Escames G., Reiter R.J., Agapito M.T., Ortiz G.G., Acuña-Castroviejo D. Melatonin-induced increased activity of the respiratory chain complexes I and IV can prevent mitochondrial damage induced by ruthenium red *in vivo* // *J. Pineal Res.* 2000. V. 28. P. 242–248.
14. Johnson D., Lardy H.A. // *Methods in Enzymology* / Eds Estabrook R., Pullman M. N.Y., London: Acad. Press, 1967. V. 10. P. 94–101.
15. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent // *J. Biol. Chem.* 1951. V. 193. P. 265–275.
16. Ellman G.L. Tissue sulfhydryl groups // *Arch. Biochem. Biophys.* 1959. V. 82. P. 70–77.
17. Rossi R., Cardaioli E., Scaloni A., Amiconi G., Di Simplicio P. Thiol groups in proteins as endogenous reductants to determine glutathione-protein mixed disulphides in biological systems // *Biochim. et biophys. acta.* 1995. V. 1243. P. 230–238.
18. Martinez J.I., Launay J.M., Dreux C. A sensitive fluorimetric microassay for the determination of glutathione peroxidase activity. Application to human blood platelets // *Anal. Biochem.* 1979. V. 98. P. 154–159.
19. Nulton-Persson A.C., Szweda L.I. Modulation of mitochondrial function by hydrogen peroxide // *J. Biol. Chem.* 2001. V. 276. P. 23357–23361.
20. Green L.C., Wagner D.A., Glogowski J., Skipper P.L., Wishnok J.S., Tannenbaum S.R. Analysis of nitrate, nitrite, and [¹⁵N] nitrate in biological fluids // *Anal. Biochem.* 1982. V. 126. P. 131–138.
21. Favero T.G., Colter D., Hooper P.F., Abramson J.J. Hypochlorous acid inhibits Ca²⁺-ATPase from skeletal muscle sarcoplasmic reticulum // *J. Appl. Physiol.* 1998. V. 84. P. 425–430.
22. Krähenbühl S., Stucki J., Reichen J. Mitochondrial function in carbon tetrachloride-induced cirrhosis in the rat. Qualitative and quantitative defects // *Biochem. Pharmacol.* 1989. V. 38. P. 1583–1588.
23. McCay P.B., Lai E.K., Poyer J.L., DuBose C.M., Janzen E.G. Oxygen- and carbon-centered free radical formation during carbon tetrachloride metabolism. Observation of lipid radicals *in vivo* and *in vitro* // *J. Biol. Chem.* 1984. V. 259. P. 2135–2143.
24. Albano E., Bellomo G., Carini R., Biasi F., Poli G., Dianzani M.U. Mechanisms responsible for carbon tetrachloride-induced perturbation of mitochondrial calcium homeostasis // *FEBS Lett.* 1985. V. 192. P. 184–188.
25. Ikeda K., Toda M., Tanaka K., Tokumaru S., Kojo S. Increase of lipid hydroperoxides in liver mitochondria and inhibition of cytochrome oxidase by carbon tetrachloride intoxication in rats // *Free Radic. Res.* 1998. V. 28. P. 403–410.
26. Tang X.H., Gao J., Fang F., Chen J., Xu L.Z., Zhao X.N., Xu Q. Hepatoprotection of oleanolic acid is related to its inhibition on mitochondrial permeability transition // *Am. J. Chin. Med.* 2005. V. 33. P. 627–637.
27. Hernández-Muñoz R., Díaz-Muñoz M., Chagoya de Sánchez V. Effects of adenosine administration on the function and membrane composition of liver mitochondria in carbon tetrachloride-induced cirrhosis // *Arch. Biochem. Biophys.* 1992. V. 294. P. 160–167.
28. Martensson J., Jain A., Frayer W., Meister A. Glutathione metabolism in the lung: inhibition of its synthesis leads to lamellar body and mitochondrial defects // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1989. V. 86. P. 5296–5300.
29. Vendemiale G., Guerrieri F., Grattagliano I., Didonna D., Muolo L., Altomare E. Mitochondrial oxidative phosphorylation and intracellular glutathione compartmentation during rat liver regeneration // *Hepatology.* 1995. V. 21. P. 1450–1454.
30. Schaur J.R., Jerlich A., Stelmazynska T. Hypochlorous acid as reactive oxygen species // *Curr. Topics Biophys.* 1998. V. 22. P. 176–185.
31. Whiteman M., Rose P., Siau J.L., Cheung N.S., Tan G.S., Halliwell B., Armstrong J.S. Hypochlorous acid-mediated mitochondrial dysfunction and apoptosis in human hepatoma HepG2 and human fetal liver cells: role of mitochondrial permeability transition // *Free Radic. Biol. Med.* 2005. V. 38. P. 1571–1584.
32. Skulachev V.P. Fatty acid circuit as a physiological mechanism of uncoupling of oxidative phosphorylation // *FEBS Lett.* 1991. V. 294. P. 158–162.
33. Samartsev V.N., Kozhina O.V. Oxidative stress as regulatory factor for fatty-acid-induced uncoupling involving liver mitochondrial ADP/ATP and aspartate/glutamate antiporters of old rats // *Biochemistry (Mosc.)* 2008. V. 73. P. 783–790.
34. Samartsev V.N., Markova O.V., Zeldi I.P., Smirnov A.V. Role of the ADP/ATP and aspartate/glutamate antiporters in the uncoupling effect of fatty acids, lauryl sulfate, and 2,4-dinitrophenol in liver mitochondria // *Biochemistry (Mosc.)* 1999. V. 64. P. 901–911.
35. Allegra M., Reiter R.J., Tan D.X., Gentile C., Tesoriere L., Livrea M.A. The chemistry of melatonin's interaction with reactive species // *J. Pineal Res.* 2003. V. 34. P. 1–10.
36. Kurcer Z., Oguz E., Fadilioglu E., Baba F., Koksal M., Olmez E. Melatonin improves methanol intoxication-induced oxidative liver injury in rats // *J. Pineal Res.* 2007. V. 43. P. 42–49.
37. Zavodnik L.B., Zavodnik I.B., Lapshina E.A., Belonovskaya E.B., Martinchik D.I., Kravchuk R.I., Bryszewska M., Reiter R.J. Protective effects of melatonin against carbon tetrachloride hepatotoxicity in rats // *Cell Biochem. Funct.* 2005. V. 23. P. 353–359.

38. Sudnikovich E.J., Maksimchik Y.Z., Zabrodskaia S.V., Kubyshin V.L., Lapshina E.A., Bryszewska M., Reiter R.J., Zavodnik I.B. Melatonin attenuates metabolic disorders due to streptozotocin-induced diabetes in rats // Eur. J. Pharmacol. 2007. V. 569. P. 180–187.
39. Asahi M., Fujii J., Suzuki K., Seo H.G., Kuzuya T., Hori M., Tada M., Fujii S., Taniguchi N. Inactivation of glutathione peroxidase by nitric oxide. Implication for cytotoxicity // J. Biol. Chem. 1995. V. 270. P. 21035–21039.

Rat Liver Mitochondria Impairment under Acute Carbon Tetrachloride-Induced Intoxication. Effects of Melatonin

Y. Z. Maksimchik¹, I. K. Dremza¹, E. A. Lapshina¹, V. T. Cheshchevik^{1,2}, E. Yu. Sudnikovich¹, S. V. Zabrodskaia¹, I. B. Zavodnik^{1,2}

¹ Institute of Pharmacology and Biochemistry, National Academy of Sciences of Belarus, BLK-50, Grodno, 230017 Belarus; e-mail: zavodnik_il@mail.ru

² Department of Biochemistry, Yanka Kupala State University, ul. Ozheshko, 22, Grodno, 230023 Belarus

The aim of the present work was to investigate the mechanisms of oxidative damage of rat liver mitochondria *in vitro*, under oxidative stress induced by hypochlorous acid (HOCl), and *in vivo*, under acute intoxication induced by carbon tetrachloride. Hypochlorous acid (50–300 μ M), the main inflammatory agent, inhibited liver mitochondria respiratory activity and caused uncoupling in the respiratory and phosphorylation processes. The toxic damage of rat liver after 24 h of acute carbon tetrachloride-induced intoxication (4 g/kg, intragastrically) was accompanied by a significant reduction in succinate- and glutamate-dependent respiration rates in state 3 (by 65%, $p < 0.001$, and by 50%, $p < 0.01$, respectively). The respiration control ratio approached 1, reflecting the loss of respiration control. The phosphorylation coefficient significantly decreased due to uncoupling of the oxidation and phosphorylation processes. The mitochondrial alterations were associated with oxidation of intramitochondrial GSH by 25% ($p < 0.05$), an inhibition of succinate dehydrogenase (complex II) by 35% ($p < 0.05$) and a rise of blood plasma nitric oxide level by 45% ($p < 0.05$). The impairment of mitochondrial respiratory function may result from the inhibition of enzymatic activities in the respiratory chain and the damage of mitochondrial membrane during intoxication and plays a key role in the development of CCl₄-induced hepatotoxicity. Melatonin administration under CCl₄-induced intoxication (three times at doses of 10 mg/kg) increased the rate of succinate oxidation in state 3 by 30% ($p < 0.05$) and reversed the increase in mitochondrial glutathione peroxidase activity. Melatonin prevented an elevation of nitric oxide level in the blood plasma of intoxicated animals but it did not protect mitochondrial functions under acute intoxication.