

СОСТОЯНИЕ ДЫХАТЕЛЬНОЙ ЦЕПИ МИТОХОНДРИЙ ПЕЧЕНИ КРЫС С ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫМ ТОКСИЧЕСКИМ ГЕПАТИТОМ

© А. П. Ширяева,¹ Е. В. Байдюк,¹ А. В. Аркадьева,¹ С. В. Оковитый,²
В. И. Морозов,¹ Г. А. Сакута¹

¹ Институт цитологии РАН и ² Кафедра фармакологии Военно-медицинской академии, Санкт-Петербург;
¹ электронный адрес: anyasun@mail.ru

С помощью полярографического метода измерения концентрации кислорода показано, что у крыс с экспериментальным токсическим гепатитом, индуцированным совместным введением этанола и CCl_4 в течение 4 нед, нарушена работа дыхательной цепи митохондрий гепатоцитов. Развитие токсического гепатита сопровождалось жировой дистрофией, фиброзом, повышением уровня триглицеридов и продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) в ткани печени. Скорость эндогенного дыхания изолированных гепатоцитов патологически измененной печени была на 34 % выше контроля. Добавление субстратов малата и пирувата не стимулировало дыхание клеток. Разобщитель окисления и фосфорилирования 2,4-динитрофенол вызывал увеличение скорости потребления кислорода гепатоцитами на 37 %, а добавление ингибитора I комплекса дыхательной цепи ротенона приводило к снижению дыхания на 27 %. Исследование скорости потребления кислорода изолированными митохондриями патологически измененной печени в присутствии глутамата и малата выявило повышение V_3 и V_4 на 70 и 56 % соответственно по отношению к контролю. Различий между показателями V_3 и V_4 при добавлении субстратов глутамата и малата или сукцината при токсическом гепатите не обнаружено, что указывает на отсутствие разобщения процессов окисления и фосфорилирования. Активность цитохром *c*-оксидазы (цитохром *c* : O_2 -оксидоредуктаза) у крыс с экспериментальным гепатитом была на 80 % выше, чем в контроле. Применение гипополипидемического препарата симвастина одновременно с токсическим воздействием уменьшало степень жирового перерождения печени, предотвращало активацию ПОЛ и вызывало снижение скорости эндогенного дыхания гепатоцитов. Добавление малата и пирувата, 2,4-динитрофенола и ротенона вызывало реакции, аналогичные таковым в контроле. На изолированных митохондриях показано разобщающее действие симвастина на дыхательную цепь в присутствии глутамата и малата. Применение симвастина не влияло на активность цитохром *c*-оксидазы. Высказано предположение о том, что в условиях патологии нарушена работа I комплекса дыхательной цепи, что ведет к образованию супероксид-аниона на уровне этого комплекса. В этих условиях функционирование других комплексов дыхательной цепи направлено на компенсацию дефекта НАДН-коэнзимQ-оксидоредуктазы.

Ключевые слова: гепатит, гепатоциты, митохондрии, дыхательная цепь, перекисное окисление липидов, симвастин.

Принятые сокращения: МТТ — 3-[4,5-диметил-2-тиазолил]-2,5-дифенилтетразолия бромид, ПОЛ — перекисное окисление липидов.

Заболевания печени занимают одно из ведущих мест по летальности среди населения. К наиболее тяжелым из них относятся гепатиты различной этиологии и алкогольное поражение печени, вследствие которых зачастую развивается цирроз. В последнее время получили распространение гепатиты и циррозы печени смешанной этиологии (Bosch et al., 1994; Lieber, 1994; Андреева и др., 1996).

Патологии печени, особенно связанные с ишемическими нарушениями, сопровождаются значительными изменениями функционального состояния дыхательной цепи митохондрий (Krähenbühl, Reichen, 1992). Основу дыхательной цепи составляет совокупность переносчиков электронов, встроенных во внутреннюю мембрану этих органелл. Переносчики организованы в 4 комплекса и включают в себя НАДН-коэнзимQ-оксидоредуктазу,

сукцинат-коэнзимQ-оксидоредуктазу, коэнзимQ-цитохром *c*-оксидоредуктазу и цитохром *c*-оксидазу. Синтез АТФ осуществляет АТФ-синтаза, локализованная во внутренней мембране митохондрий в непосредственной близости к электрон-транспортной цепи (Марри и др., 1993). Сведения о состоянии дыхательных комплексов митохондрий при патологии печени весьма противоречивы. Одни авторы полагают, что перенос электронов I и II комплексами дыхательной цепи при патологии печени нарушается (Krähenbühl et al., 1989; Nozu et al., 1992), тогда как другие рассматривают SCCR как наименее уязвимый комплекс, который не повреждается даже при циррозе печени (Cederbaum et al., 1974; Bottnus et al., 1982; Yang et al., 2004). Противоречивость данных, приводимых разными авторами, и важность проблемы создают предпосылки для проведения дополнительных ис-

следований дыхательной цепи гепатоцитов при патологии печени.

Большинство лекарственных препаратов, применяемых в терапии различных заболеваний, гепатотоксичны. Это связано с детоксикационной функцией печени, осуществляющей метаболизм поступающих в организм ксенобиотиков (Шерлок, Дули, 1999). Многие токсины, в том числе CCl_4 и алкоголь, а также лекарственные препараты активируют процессы образования свободных радикалов, усиливая повреждение печени (Britton, Vason, 1994). Ранее нами на модели комплексного токсического поражения печени CCl_4 и этанолом показано, что применение гипополипидемического препарата симвастатина одновременно с токсинами уменьшает степень развития жировой дистрофии печени и уровень холестерина в крови (Оковитый и др., 2004). Симвастатин — ингибитор 3-гидрокси-3-метил глутарил коэнзимА-редуктазы — фермента, участвующего в образовании холестерина в печени, обладает также антиоксидантным действием (Лякишев, 2001). Свободнорадикальное окисление, усиливающееся при патологии, может быть одним из механизмов повреждения дыхательной цепи митохондрий гепатоцитов. С этой точки зрения интересно было бы проверить возможность коррекции этим препаратом, обладающим гипополипидемической и антиоксидантной активностями, нарушений электрон-транспортной цепи митохондрий гепатоцитов при развитии токсического гепатита.

Цель нашей работы заключалась в исследовании на изолированных гепатоцитах и митохондриях состояния дыхательной цепи митохондрий гепатоцитов крыс с экспериментальным токсическим гепатитом и возможной коррекции симвастатином нарушений работы электрон-транспортной цепи митохондрий гепатоцитов.

Материал и методика

Экспериментальные животные и моделирование токсического гепатита. Исследования проведены на 36 крысах-самцах породы Вистар, масса которых в начале опыта составила 180—200 г. Животных содержали в стандартных условиях светового режима на стандартном рационе. Все животные были разделены на 4 группы. 1-я группа служила контролем (интактные крысы). На крысах 2-й и 3-й групп моделировали экспериментальный токсический гепатит (Strubelt et al., 1978; Венгеровский, 2000), для чего в течение 1 мес 2 раза в 1 нед интрагастрально вводили 50%-ный раствор CCl_4 в вазелиновом масле в дозе 0.2 мл/кг. При этом в качестве питья животные получали 5%-ный этанол. Крысам 3-й группы дополнительно интрагастрально вводили симвастатин в виде водной суспензии в дозе 1 мг/кг. Оценку действия самого препарата (контроль на препарат) проводили на 4-й группе животных, которым вводили симвастатин по той же схеме, что и крысам с патологией печени. Через 2 сут после последнего введения CCl_4 животных забивали, используя тиопенталовый наркоз.

Получение изолированных гепатоцитов из нормальной и патологически измененной печени крыс. Изолированные гепатоциты крыс получали по модифицированному методу Сеглена (Seglen, 1976). В течение 5 мин через воротную вену *in situ* проводили перфузию печени подогретым до 37 °C буфером

(pH 7.4), содержащим 8.3 г/л NaCl, 0.5 г/л KCl, 2.4 г/л HEPES, 2 г/л глюкозы и 5.5 мл/л 1 М NaOH. Далее печень извлекали, помещали в стерильную чашку Петри и измельчали на кусочки размером примерно 1 мм³. После промывки средой Игла, дополненной 0.1 % глюкозы, 0.01 М HEPES, 1 % сыворотки эмбрионов коров и 40 мкг/мл гентамицина, кусочки помещали в 0.5%-ный раствор коллагеназы IV (Sigma, США) в среде Игла с 0.1 М HEPES (pH 7.6). По истечении 5 мин инкубации в ферментативном растворе при 37 °C в условиях непрерывного встряхивания супернатант собирали и процедуру повторяли еще 2 раза, увеличив ее длительность до 20 мин, всякий раз заливая кусочки печени свежей порцией фермента. Объединенную суспензию гепатоцитов фильтровали через стерильный нейлоновый фильтр и клетки трижды промывали средой Игла, осаждая центрифугированием при 20 g. Жизнеспособность гепатоцитов оценивали по окраске трипановым синим, акридиновым оранжевым и бромистым этидием, а также с помощью МТТ-теста (Mossman, 1983). Жизнеспособность гепатоцитов составляла в разных экспериментах от 70 до 90 %. Количество изолированных гепатоцитов в суспензии определяли, подсчитывая клетки в камере Горяева.

Получение изолированных митохондрий из гепатоцитов. Митохондрии выделяли методом дифференциального центрифугирования по методу Джонсона и Лэрди (Jonson, Lardy, 1969) с небольшими изменениями. Кусочки печени гомогенизировали с помощью ручного гомогенизатора при 0 °C в среде 1, содержащей 250 мМ сахарозу (без Ca^{2+}), 3 мМ Tris и 0.5 мМ EGTA (pH 7.3). Гомогенат центрифугировали 5 мин при 700 g и 0 °C. Полученный супернатант центрифугировали 10 мин в среде 2, содержащей 250 мМ сахарозу (без Ca^{2+}) и 3 мМ Tris, pH 7.3, при 7000 g и 0 °C. Полученный митохондриальный осадок дважды промывали в среде 2, осаждая митохондрии центрифугированием при 7000 g. Количество белка определяли по Бредфорд (Bradford, 1976).

Определение сухой массы гепатоцитов. Сухую массу гепатоцитов определяли методом интерференционной микроскопии (Bayer, 1953; Bayer, Joseph, 1954) с помощью микроскопа МБИН-4, используя объектив 40 × 0.65. Суть метода заключается в измерении разности хода лучей, вносимой исследуемым объектом. По разности хода и площади объекта можно вычислить общее содержание (массу) плотных веществ в объекте по формуле

$$M = \frac{\delta \cdot S}{100 \cdot a}, \quad \delta = \frac{(I_1 - I_2) \cdot \lambda}{180},$$

где M — масса клетки, г, δ — разность хода лучей, см, S — площадь клетки, см², a — удельное приращение показателя преломления объекта (для глицерина оно составляет 0.00095 см³ · г⁻¹), I_1 — первый угол анализатора, град, I_2 — второй угол анализатора, град, λ — длина волны света, нм.

Площадь клетки S определяли с помощью анализатора изображений ВидеоТест, используя программу «Размер». На каждом препарате измеряли по 100 клеток.

Приготовление гистологических препаратов и мазков изолированных гепатоцитов. Гистологические срезы готовили по стандартной методике (Роскин, 1957). Кусочки печени крыс фиксировали в 10%-ном нейтральном формалине, заливали в парафиновые блоки, из которых с помощью микротомы приготавли-

ливали срезы толщиной 5 мкм. Срезы окрашивали гематоксилином—эозином или пикрофуксином по Ван Гизону (Пирс, 1962).

Препараты для интерферометрии готовили на стандартных предметных стеклах в виде мазков изолированных гепатоцитов, используя описанный ранее метод (Кудрявцева и др., 1970). Для этого измельченные кусочки печени помещали на 15 мин в смесь равных объемов 0.067 М К,Na-фосфатного буфера, pH 8.0, и 5%-ного раствора сахарозы. Затем кусочки переносили в 0.067 М К,Na-фосфатный буфер, pH 7.4, и выдерживали в течение 8 мин. Далее из кусочков печени готовили мазки клеток, которые фиксировали метанолом.

Оценка состояния дыхательной цепи митохондрий. Состояние дыхательной цепи митохондрий исследовали с помощью полярографического метода (Chance, Williams, 1956; Estabrook, 1967). При этом функциональное состояние НАДН-коэнзимQ-оксидоредуктазы (I комплекс), сукцинат-коэнзимQ-оксидоредуктазы (II комплекс) и коэнзимQ-цитохромс-оксидоредуктазы (III комплекс) оценивали с помощью специфических субстратов и ингибиторов данных комплексов, используя при работе на изолированных митохондриях следующие параметры.

1. V_4 (высокое содержание в среде инкубации субстратов — 5 мМ глутамат и 5 мМ малат (субстраты I комплекса) либо 5 мМ сукцинат (субстрат II комплекса) при отсутствии АДФ).

2. V_3 (условия те же, что и при определении V_4 , но в присутствии 200 мкМ АДФ; при этом фактором, лимитирующим скорость реакции, является сама дыхательная цепь).

3. V_d (условия те же, что и при определении V_4 , но в присутствии разобщителя окисления и фосфорилирования 30 мкМ 2,4-динитрофенола).

Кроме того, оценивали дыхательный контроль, представляющий собой отношение V_4 к V_3 .

При проведении исследования функционального состояния комплексов дыхательной цепи митохондрий на изолированных гепатоцитах использовали иные параметры.

1. Эндогенное дыхание V_0 (скорость потребления кислорода клетками на эндогенных субстратах).

2. Дыхание на экзогенных субстратах (5 мМ пируват и 5 мМ малат либо 5 мМ сукцинат).

3. Дыхание при воздействии на клетки 1 мкМ ротенона (ингибитор I комплекса) и 30 мкМ 2,4-динитрофенола (разобщителя окисления и фосфорилирования).

Определение активности цитохром с-оксидазы. Суспензию митохондрий (1 мг белка в 1 мл) вносили в инкубационную среду, содержащую 5 мМ аскорбиновую кислоту (донор электронов), 0.2 мМ $\text{Na}_2\text{ЭДТА}$, а также 10 мкМ цитохром с для устранения ограничения скорости реакции, связанной с его недостатком. Затем в реакционную смесь добавляли тетраметилпарафенилендиамин (120 мкМ; переносчик электронов с аскорбиновой кислоты на систему цитохромов), измеряя при этом скорость потребления кислорода (Estabrook, 1967). На основании полученных данных с помощью метода Лайнуивера—Берка рассчитывали активность цитохром с-оксидазы.

Определение параметров ПОЛ. Интенсивность ПОЛ исследовали, измеряя в гомогенате печени концентрацию диеновых конъюгатов и Шиффовых оснований (Bidlack, Dyel, 1959; Стальная, 1977).

Определение уровня триглицеридов. Уровень триглицеридов в печени крыс измеряли с помощью метода Готфрида и Розенберга (Gottfried, Rosenberg, 1973).

Статистическая обработка полученных данных. При статистической обработке данных рассчитывали средние арифметические и ошибку среднего. Достоверность различий средних оценивали, используя *t*-критерий Стьюдента. Различия считали достоверными при доверительной вероятности 0.95. Вычисления проводили с помощью программ Statistica 6.0.

Результаты

Гистологическая характеристика печени при экспериментальном токсическом гепатите. Комбинированное токсическое воздействие алкоголя и CCl_4 приводит к появлению в печени крыс признаков воспаления, жирового перерождения и фиброза. Дольковая структура органа нарушается. Паренхима печени оказывается пронизанной тяжами соединительной ткани (рис. 1, а). Гепатоциты, особенно по ходу соединительнотканых тяжей, сильно вакуолизированы и содержат большое количество липидных капель (рис. 1, а). Стенки сосудов утолщены и фиброзированы (рис. 2, а). В паренхиме печени, особенно вблизи сосудов, видны активированные клетки Купфера и лейкоцитарные инфильтраты (рис. 2, а). Поврежденная паренхима печени активно регенерирует, свидетельством чего являются часто встречающиеся митозы гепатоцитов, которые в норме практически отсутствуют (рис. 2, б).

В паренхиме печени крыс, которые одновременно с токсическим воздействием получали гипополипидемический препарат симвастатин, жировая дистрофия была выражена значительно слабее, однако на степени фиброирования паренхимы и активности воспалительных процессов применение симвастатина не сказывалось (рис. 1, б).

Морфология изолированных гепатоцитов нормальной и патологически измененной печени. Изолированные гепатоциты нормальной печени крыс имели правильную округлую форму с центрально расположенным ядром, четко очерченную плазматическую мембрану, большое количество цитоплазмы. Изолированные гепатоциты патологически измененной печени были значительно разнообразнее по размерам, встречались очень крупные клетки с большими полиплоидными ядрами. В цитоплазме часто присутствовали вакуоли, плазматическая мембрана имела множество выпячиваний. Доля неповрежденных гепатоцитов после их выделения как из нормальной, так и из патологически измененной печени варьировала в разных опытах от 70 до 90 %.

Определение триглицеридов в патологически измененной печени крыс. Развитие экспериментального токсического гепатита у крыс сопровождалось повышением уровня триглицеридов (рис. 3). Использование симвастатина вызывало достоверное снижение уровня триглицеридов в печени крыс 3-й группы по сравнению с группой 2 ($P < 0.02$) и в группе 4 по сравнению с группой 1 ($P < 0.05$).

Измерение сухой массы клеток печени. У крыс, получавших CCl_4 и этанол, развивалась значительная гипертрофия, о чем свидетельствует почти двукратное увеличение средней сухой массы клеток (табл. 1).

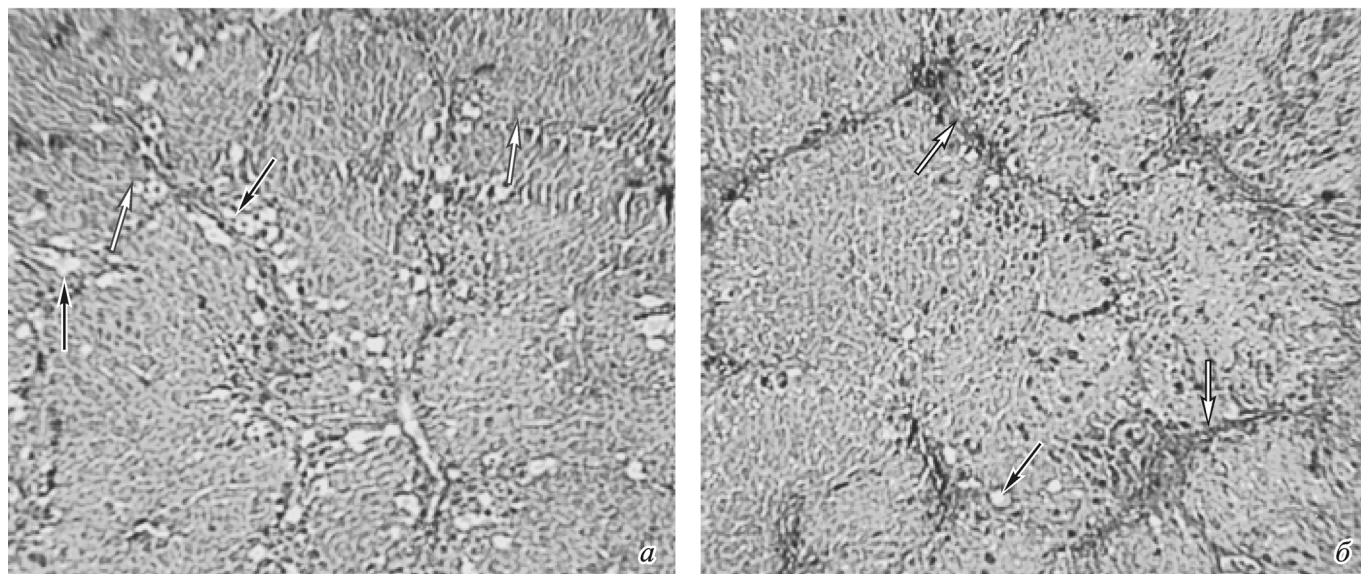


Рис. 1. Гистологические срезы печени крыс.

а — экспериментальный токсический гепатит, *б* — то же в условиях применения симвастатина. Окраска по Ван Гизону. Черными стрелками указаны жировые капли, белыми стрелками — прослойки соединительной ткани. Об. 6.3×0.12 .

В условиях применения симвастатина гипертрофия гепатоцитов практически не развивалась.

Состояние дыхательной цепи митохондрий изолированных гепатоцитов. Результаты измерения скорости потребления кислорода изолированными гепатоцитами 1-й (контроль), 2-й (токсический гепатит) и 3-й (токсический гепатит + симвастатин) групп приведены в табл. 2. Видно, что скорость эндогенного дыхания гепатоцитов 2-й группы на 34 % выше, чем в контроле.

Добавление субстратов малата и пирувата не стимулировало дыхание клеток. 2,4-Динитрофенол вызывал увеличение дыхания гепатоцитов на 37 % по сравнению с эндогенным дыханием клеток. Присутствие ротенона в

суспензии изолированных гепатоцитов животных 2-й группы снижало скорость потребления кислорода на 27 % по сравнению с дыханием на малате и пирувате. Это снижение было в 2 раза меньше, чем в контрольной группе (–59 %).

Скорость эндогенного дыхания гепатоцитов крыс 3-й группы была на 30 % ниже, чем в контроле, и на 48 % ниже эндогенного дыхания гепатоцитов животных 2-й группы (табл. 2).

В отличие от гепатоцитов крыс 2-й группы добавление малата и пирувата к суспензии гепатоцитов животных 3-й группы увеличивало дыхание клеток на 56 % относительно эндогенного дыхания. 2,4-Динитрофенол, добавленный в суспензию гепатоцитов крыс 3-й группы,

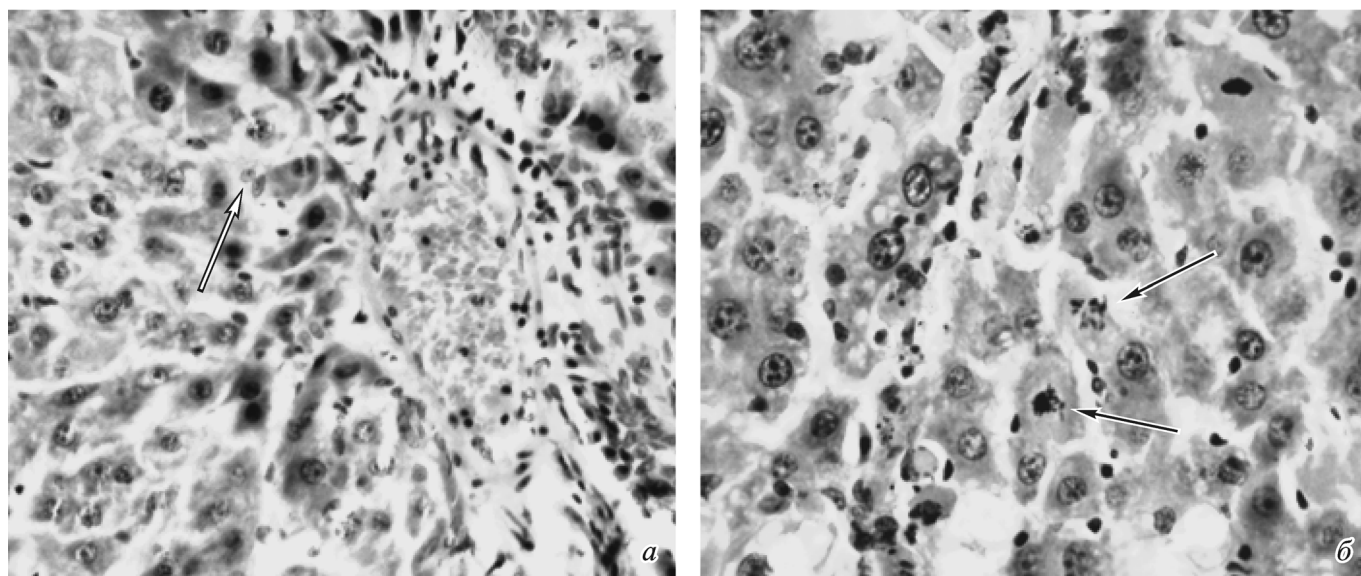


Рис. 2. Гистологические срезы печени с экспериментальным токсическим гепатитом.

Окраска гематоксилином—эозином. Об. 25×0.5 (*а*), 40×0.65 (*б*). Черными стрелками указаны митозы, белыми стрелками — клетки Купфера.

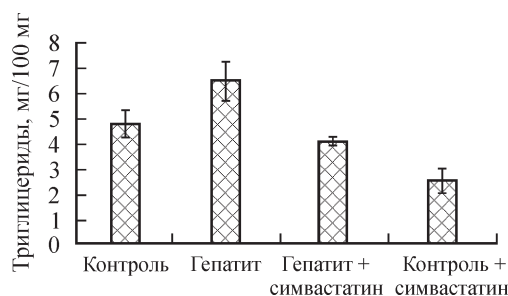


Рис. 3. Содержание триглицеридов в печени крыс.

 $M \pm m, n = 5$.

Т а б л и ц а 1

Результаты измерения сухой массы гепатоцитов

Показатель	Контроль	Гепатит	Гепатит + симваcтатин
Сухая масса, пг	1422 ± 34	2271 ± 160 ^a	1743 ± 170 ^b
Количество крыс	5	6	5

^a $P < 0.01$ относительно группы контроля. ^b $P < 0.05$ относительно группы гепатита, $M \pm m$.

Т а б л и ц а 2

Скорость потребления кислорода гепатоцитами при добавлении субстратов (малат + пируват), ингибитора (ротенон) и разобщителя (2, 4-динитрофенол) дыхательной цепи $M \pm m, n = 5$

Скорость потребления кислорода, нмоль O_2 · млн кл. ⁻¹ · мин ⁻¹	Контроль	Гепатит	Гепатит + симваcтатин
Эндогенное дыхание V_0	14.0 ± 0.8	18.8 ± 13.2 ^{a,1}	9.9 ± 0.3 ^{a,1/6,2}
Малат (1 mM) + пируват (5 mM)	19.4 ± 0.9	18.7 ± 5.2	15.5 ± 1.2
2,4-Динитрофенол, 5 мкМ	18.5 ± 0.7	25.2 ± 9.1	14.3 ± 1.0
Ротенон, 5 мкМ	8.0 ± 0.5	13.7 ± 1.1	8.5 ± 0.7

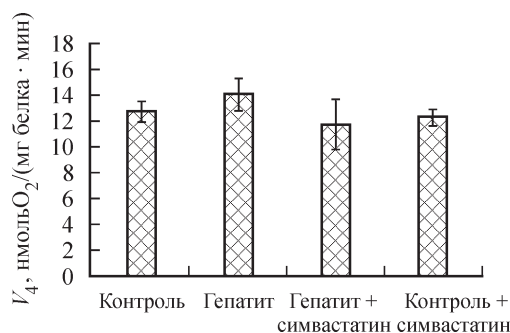
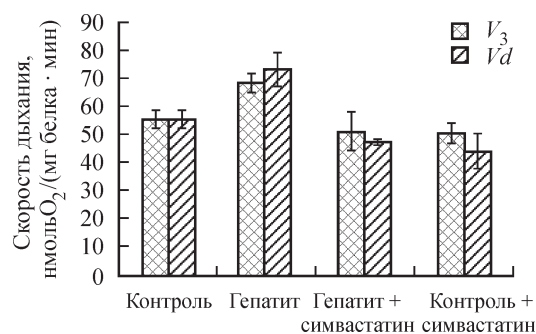
^a $P < 0.05$. ^b $P < 0.02$. ¹ Сравнение с контролем. ² Сравнение с гепатитом.

Рис. 4. Скорость потребления кислорода митохондриями гепатоцитов в состоянии 4 на сукцинате.

 $M \pm m, n = 5$.Рис. 5. Скорость потребления кислорода митохондриями гепатоцитов в состоянии 3 (V_3) и в присутствии динитрофенола (V_d) на сукцинате. $M \pm m, n = 5$.

вызывал увеличение дыхания на 44 %. Относительная стимуляция дыхания в этом случае практически не отличалась от ответа на 2,4-динитрофенол гепатоцитов животных 2-й группы. Таким образом, по степени сопряжения окисления и фосфорилирования различий между гепатоцитами крыс трех групп обнаружено не было.

Скорость дыхания гепатоцитов крыс 3-й группы в ответ на добавление ротенона снижалась на 45 % по сравнению с дыханием на малате и пирувате. Данный ответ был достоверно больше, чем во 2-й группе, но меньше, чем в контрольной. Это может свидетельствовать о меньшем повреждении 1-го участка дыхательной цепи в присутствии симваcтатина.

Состояние дыхательной цепи изолированных митохондрий печени крыс. Клеточное дыхание (скорость потребления кислорода клеткой) может зависеть от таких неспецифических факторов, как проницаемость мембраны, активность лизосом и т. д. Для того чтобы исключить вклад этих факторов в результаты оценки дыхания изолированных гепатоцитов, мы провели исследование состояния дыхательной цепи на изолированных митохондриях.

Интенсивность дыхания митохондрий, выделенных из печени крыс 2-й и 3-й групп, на сукцинате как субстрате в состоянии 4 (V_4) и дыхательный контроль не отличались от соответствующих контрольных значений (рис. 4). Различий между показателями V_3 и V_d на сукцинате для митохондрий из печени крыс 2-й и 3-й групп мы не обнаружили, что указывает на отсутствие разобщения процессов окисления и фосфорилирования (рис. 5). Эти данные сходны с данными, полученными при изучении сопряжения окисления и фосфорилирования на гепатоцитах крыс 2-й и 3-й групп. В 1-й и 4-й группах крыс параметр V_d достоверно не отличался от V_3 , что говорит о полном сопряжении процессов окисления и фосфорилирования (рис. 5). Показатель V_3 митохондрий крыс 2-й группы оказался на 23 % выше ($P < 0.05$), чем в контроле. В 3-й и 4-й группах животных V_3 не отличался от контроля (рис. 5). Приведенные данные свидетельствуют о том, что при экспериментальном гепатите функциональная активность дыхательной цепи митохондрий гепатоцитов повышена.

Результаты исследования дыхания митохондрий на глутамате и малате показали повышение скорости V_4 митохондрий крыс 2-й группы на 56 % ($P < 0.01$) по сравнению с контролем (рис. 6). V_4 митохондрий крыс 3-й и 4-й групп не отличалась от контроля. Дыхательный кон-

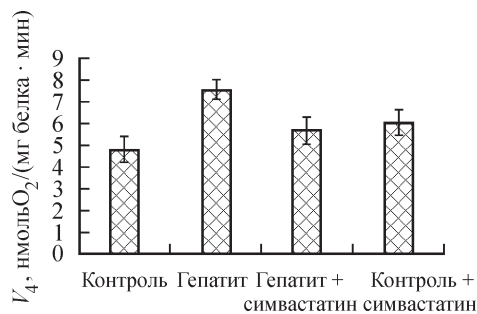


Рис. 6. Скорость потребления кислорода митохондриями гепатоцитов в состоянии 4 на глутамате и малате.

$M \pm m, n = 5$.

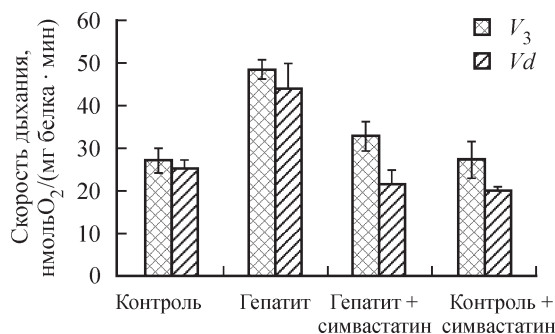


Рис. 7. Скорость потребления кислорода митохондриями гепатоцитов в состоянии 3 (V_3) и в присутствии динитрофенола (V_d) на глутамате и малате.

$M \pm m, n = 5$.

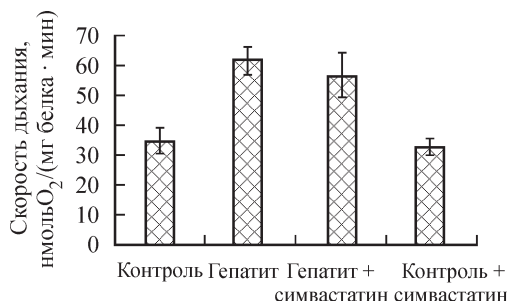


Рис. 8. Активность цитохром *c*-оксидазы.

$M \pm m, n = 5$.

Таблица 3

Содержание Шиффовых оснований и диеновых конъюгатов в печени крыс, $M \pm m, n = 6$

Вариант опыта	Шиффовы основания, отн. ед.	Диеновые конъюгаты, мкмоль/л
Контроль	172 ± 22	12.5 ± 1.8
Гепатит	421 ± 49 ^{a,1}	31.6 ± 2.1 ^{6,1}
Гепатит + симва- статин	102 ± 15 ^{b,1/6,2}	18.6 ± 2.7 ^{a,2}
Контроль + симва- статин	99 ± 7 ^{b,1}	4.5 ± 0.8 ^{a,1}

^a $P < 0.01$. ⁶ $P < 0.001$. ^b $P < 0.05$. ¹ Относительно контроля.
² Относительно гепатита.

троль во всех группах был на уровне контроля. Различий между показателями V_3 и V_d на глутамате и малате во 2-й группе не обнаружено, что указывает на отсутствие разобщения процессов окисления и фосфорилирования (рис. 7). В 3-й и 4-й группах животных, получавших симва-статин, различия между показателями V_3 и V_d митохондрий составили 34 ($P < 0.05$) и 27 (недостаточно) % соответственно. Значение показателя V_3 митохондрий 2-й группы крыс превысило таковое контрольной группы на 70 % ($P < 0.001$). В 3-й и 4-й группах показатель V_3 не имел достоверных отличий от контроля (рис. 7).

Активность цитохром *c*-оксидазы. Результаты измерения активности цитохром *c*-оксидазы показали, что у крыс с экспериментальным гепатитом активность цитохром *c*-оксидазы на 80 % ($P < 0.01$) выше по сравнению с контролем (рис. 8). У крыс 3-й группы активность цитохром *c*-оксидазы была такой же, как при экспериментальном гепатите. Введение симва-статина контрольным животным не приводило к изменению активности цитохром *c*-оксидазы.

Активность процессов ПОЛ в печени крыс. Результаты исследования ПОЛ показали, что содержание Шиффовых оснований и диеновых конъюгатов в гомогенатах печени крыс с экспериментальным гепатитом превышало контроль на 145 ($P < 0.05$) и 153 ($P < 0.05$) % соответственно (табл. 3). Применение симва-статина одновременно с введением токсинов предотвращало активацию процессов ПОЛ в печени крыс. Исследованные показатели у крыс 3-й группы не отличались от контрольных значений. Введение симва-статина контрольным животным приводило к достоверному снижению показателей ПОЛ (табл. 3).

Обсуждение

Проведенное исследование показало, что у крыс с токсическим гепатитом нарушается работа NCCR участка (I комплекс) дыхательной цепи митохондрий гепатоцитов. Об этом свидетельствует тот факт, что интенсивность дыхания изолированных гепатоцитов не изменяется при добавлении в среду инкубации субстратов малата и пирувата (табл. 2). Кроме того, добавление ротенона — ингибитора I комплекса дыхательной цепи — вызывает лишь незначительное снижение дыхания изолированных гепатоцитов (табл. 2). Нарушение работы I комплекса дыхательной цепи митохондрий гепатоцитов при патологии, в частности при циррозе печени, выявлено в ряде работ (Jikko et al., 1984; Krähenbühl et al., 1992, 2000; Yang et al., 2004). Существует предположение о том, что причиной повреждения NCCR является повышение уровня свободных радикалов (Yang et al., 2004).

Известно, что CCl_4 и этанол являются мощными активаторами процесса ПОЛ (Slater, 1966; McCay et al., 1980; Chiarpotto et al., 1981). Наши данные по измерению концентрации диеновых конъюгатов и Шиффовых оснований подтверждают то, что в ткани печени при токсическом гепатите происходит повышение уровня ПОЛ. Продукты ПОЛ обладают высокой реакционной активностью и способны взаимодействовать как с белками, так и с липидами, инициируя при этом свободнорадикальное окисление клеточных мембран, в том числе и внутренней мембраны митохондрий, в которой локализованы комплексы дыхательной цепи (Krähenbühl, Reichen, 1992). Однако в чем именно выражается повреждение

дыхательной цепи митохондрий и как она функционирует при патологии печени, остается неясным.

Мы обнаружили, что скорость эндогенного дыхания изолированных гепатоцитов крыс с токсическим гепатитом на 34 % выше, чем в контроле. Однако повышенное потребление кислорода не обязательно связано с процессами окислительного фосфорилирования, так как кислород может расходоваться в процессах, не связанных с работой цитохром *c*-оксидазы. Результаты исследования сопряжения процессов окисления и фосфорилирования как на изолированных гепатоцитах, так и на изолированных митохондриях, указывают на то, что разобщение этих процессов отсутствует. Возможно, это связано с тем, что в первом участке дыхательной цепи происходит перенос электронов на кислород, а не на железосерные центры НАДН-коэнзим Q -оксидоредуктазы. Дыхательная цепь митохондрий, а именно НАДН-коэнзим Q -оксидоредуктаза и коэнзим Q -цитохром *c*-оксидоредуктаза способны осуществлять одноэлектронное восстановление кислорода до супероксид-аниона (Скулачев, 2001). Однако в гепатоцитах нормальной печени интенсивность этого процесса ничтожно мала, поэтому он не оказывает ощутимого влияния на работу дыхательной цепи, так как существует система антиоксидантной защиты в самих митохондриях (Агол, 1996). Можно предположить, что нарушение работы I комплекса дыхательной цепи в митохондриях гепатоцитов крыс с токсическим гепатитом связано с нарушением транспорта электронов этим комплексом, что приводит к образованию большого количества супероксид-аниона. Это может объяснить увеличение потребления кислорода митохондриями гепатоцитов патологически измененной печени. В свою очередь цитохром *c* может окислять образовавшийся супероксид-анион. Далее восстановленный цитохром *c* переносит электроны на цитохром *c*-оксидазу (Скулачев, 2001). Повышение активности цитохром *c*-оксидазы митохондрий гепатоцитов крыс с токсическим гепатитом, обнаруженное нами, вполне согласуется с высказанным предположением.

Данные по измерению дыхательного контроля гепатоцитов крыс с токсическим гепатитом также указывают на то, что увеличение активности цитохром *c*-оксидазы является механизмом, компенсирующим нарушение работы I комплекса дыхательной цепи, что позволяет митохондриям справиться с энергообразующей функцией в условиях «утечки» кислорода на образование супероксид-аниона.

Исследование дыхания изолированных митохондрий на сукцинате показало, что ни V_4 , ни дыхательный контроль митохондрий животных с токсическим гепатитом не отличались от соответствующих контрольных значений. Различий между показателями V_3 и V_d также не было обнаружено. Эти данные свидетельствуют о том, что состояние II комплекса дыхательной цепи (сукцинат-коэнзим Q -оксидоредуктаза) при патологии печени не отличается от нормы. Показатель V_3 как на малате и глутамате, так и на сукцинате для митохондрий гепатоцитов крыс с токсическим гепатитом был выше такового для контрольных животных. Причины такого увеличения нам пока неясны. Возможно, это связано с повышением функциональной активностью АТФ-синтазы и(или) усиленной продукцией супероксид-аниона. Для подтверждения данного предположения, очевидно, необходимо изучение синтеза АТФ и продукции супероксид-аниона.

Результаты исследования развития токсического поражения печени в условиях применения симвастатина показали, что этот препарат предотвращает развитие жировой

дистрофии печени, а также приводит к снижению уровня ПОЛ. На это указывают данные гистологического исследования, оценки уровня триглицеридов, диеновых конъюгатов и Шиффовых оснований. Кроме того, симвастатин снижал скорость эндогенного дыхания изолированных гепатоцитов крыс с токсическим гепатитом. Однако для изолированных митохондрий показатель V_4 на малате и глутамате не имел достоверных отличий от контроля. Возможно, это является следствием того, что симвастатин в силу своих антиоксидантных свойств может снижать степень повреждения, связанного со свободнорадикальным окислением. Данные по измерению параметров V_3 и V_d указывают на то, что симвастатин оказывает разобщающее действие на дыхательную цепь (рис. 7). Однако этот эффект проявляется при измерении показателей V_3 и V_d только на субстратах I комплекса, что позволяет предположить, что симвастатин каким-то образом влияет на функционирование I комплекса дыхательной цепи.

Таким образом, полученные данные позволяют нам выдвинуть гипотезу о том, что при токсическом гепатите происходит нарушение работы I комплекса дыхательной цепи, связанное с утечкой электронов на кислород и с образованием супероксид-аниона. При этом выявленные изменения в работе других комплексов дыхательной цепи, по-видимому, носят компенсаторный характер и направлены на сохранение энергообразующей функции митохондрий. Несмотря на то что симвастатин обладает выраженным гиполипидемическим и антиоксидантным действием, он оказывает разобщающий эффект на процессы окисления и фосфорилирования клеточного дыхания, что ведет к излишней нагрузке на дыхательную цепь.

Список литературы

- Агол В. И. 1996. Генетически запрограммированная смерть клетки. Сорос. образоват. журн. 6 : 20—24.
- Андреева Р. М., Самсонов В. А., Федорова Л. А., Некачалов В. В. 1996. Клинико-морфологическая характеристика рака печени. Вopr. онкол. 42 : 91—92.
- Венгеровский А. И. 2000. Методические указания по изучению гепатоцитарной активности фармакологических веществ. В кн.: Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. М.: Ремедиум. 228—231.
- Кудрявцева М. В., Кудрявцев Б. Н., Розанов Ю. М. 1970. Определение количества гликогена в клетках печени крыс с использованием флуоресцентного красителя аурамина. Цитология. 12 : 1060—1067.
- Лякишев А. А. 2001. Терапия статинами: точка зрения клинического фармаколога. Рус. мед. журн. 9 : 48—50.
- Марри Р., Греинер Д., Мейес П., Родуэлл В. 1993. Биология человека. М.: Мир. 384 с.
- Оковитый С. В., Ярославцев М. Ю., Сакута Г. А., Литанюк А. П., Шуленин С. Н., Кудрявцев Б. Н. 2004. Особенности действия симвастатина при экспериментальной гепатопатии у крыс. Гепатология. 5 : 4—7.
- Пирс Э. 1962. Гистохимия. Теоретическая и прикладная. М.: Изд-во иностр. лит-ры. 962 с.
- Роскин Г. И. 1957. Микроскопическая техника. М.: Советская наука. 467 с.
- Скулачев В. П. 2001. Явление запрограммированной смерти. Митохондрии, клетки и органы: роль активных форм кислорода. Сорос. образоват. журн. 7 : 4—10.
- Стальная И. Д. 1977. Метод определения диеновых конъюгатов ненасыщенных жирных кислот. В кн.: Современные методы в биологии. М.: Медицина. 178 с.
- Шерлок Ш., Дули Дж. 1999. Заболевания печени и желчных путей: практическое руководство. М.: Гэотар Медицина. 864 с.

- Barer R. 1953. Determination of dry mass, thickness, solid and water concentration in living cells. *Nature*. 172 : 1097—1098.
- Barer R., Joseph S. 1954. Refractometry of living cells. I. Basic principles. *Quart. J. Microscop. Sci.* 95 : 399—423.
- Bidlack W. R., Dyl A. L. 1959. Damage of microsomal membrane by lipid peroxidation. *Lipids*. 8 : 177—182.
- Bosch J., Bruix J., Mas A., Navasa M., Rodes J. 1994. Rolling review: the treatment of major complications of cirrhosis. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 8 : 639—657.
- Bottenus R., Spach P., Filus S., Cunningham C. 1982. Effect of chronic ethanol consumption on energy-linked processes associated with oxidative phosphorylation: proton translocation and ATP-Pi exchange. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 105 : 1368—1373.
- Bradford M. M. 1976. Rapid and sensitive method for the quantitation of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analyt. Biochem.* 72 : 248—254.
- Britton R. S., Bacon B. R. 1994. Role of free radicals in liver diseases and hepatic fibrosis. *Hepatogastroenterology*. 41 : 343—348.
- Cederbaum A., Lieber C., Rubin E. 1974. Effects of chronic ethanol treatment on mitochondrial functions damage to coupling site I. *Arch. Biochem. Biophys.* 165 : 560—569.
- Chance B., Williams G. 1956. The respiratory chain and oxidative phosphorylation. *Adv. Enzymol.* 17 : 65—134.
- Chiarpotto E., Olivero J., Albano E. 1981. Studies on lipid peroxidation using whole liver cells. *Experientia*. 37 : 396—397.
- Estabrook R. W. 1967. Mitochondrial respiratory control and the polarographic measurement of ADP:O ratios. *Methods Enzymol.* 10 : 41—47.
- Gottfried S. P., Rosenberg B. 1973. Improved manual spectrophotometric procedure for determination of triglycerides. *Clin. Chem.* 19 : 1077—1078.
- Jikko A., Taki Y., Nakamura N. 1984. Adenylate energy charge and cytochrome *a* (a_3) in the cirrhotic rat liver. *J. Surg. Res.* 37 : 361—368.
- Jonson D., Lardy H. 1969. Isolation of liver or kidney mitochondria. In: *Methods in Enzymology*. New York: Acad. Press. 10 : 94—96.
- Krähenbühl L., Ledermann M., Lang C., Krähenbühl S. 2000. Relationship between hepatic mitochondrial function *in vivo* and *in vitro* in rats with carbon tetrachloride-induced liver cirrhosis. *Hepatology*. 33 : 216—223.
- Krähenbühl S., Reichen J. 1992. Adaptation of mitochondrial metabolism in liver cirrhosis: different strategies to maintain a vital function. *Scand. J. Gastroenterol.* 27 : 90—96.
- Krähenbühl S., Stucki J., Reichen J. 1989. Mitochondrial function in carbon tetrachloride-induced cirrhosis in the rat: qualitative and qualitative defects. *Biochem. Pharmacol.* 38 : 1583—1588.
- Krähenbühl S., Stucki J., Reichen J. 1992. Reduced activity of the electron transport chain in liver mitochondria isolated from rats with secondary biliary cirrhosis. *Hepatology*. 15 : 1160—1166.
- Lieber C. S. 1994. Hepatic and metabolic effect of ethanol: pathogenesis and prevention. *Ann. Med.* 26 : 325—330.
- McCay P. B., Nogishi T., Lai E. K. 1980. Relationship between the loss of a specific microsomal cytochrome P-450 and the formation of CCl_3 from CCl_4 . *Fed. Proc.* 39 : 612—615.
- Mossman T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation cytology assays. *J. Immunol. Methods*. 65 : 55—63.
- Nozu F., Takeyama N., Tanaka T. 1992. Changes of hepatic fatty acid metabolism produced by chronic thioacetamide administration in rats. *Hepatology*. 15 : 1099—1106.
- Seglen P. 1976. Preparation of isolated rat liver cells. *Meth. Cell Biol.* 13 : 29—83.
- Slater T. F. 1966. Necrogenic action of CCl_4 in the rat: speculate mechanism based on activation. *Nature*. 209 : 36—40.
- Strubelt O., Obermier F., Siegers C. P. 1978. Increased carbon tetrachloride hepatotoxicity after low-level ethanol consumption. *Toxicology*. 10 : 261—270.
- Yang S., Tan T. M. C., Wee A., Leow C. K. 2004. Mitochondrial respiratory function and antioxidant capacity in normal and cirrhotic livers following partial hepatectomy. *Cell. Mol. Life Sci.* 61 : 220—229.

Поступила 24 V 2006

HEPATOCTE MITOCHONDRION RESPIRATORY CHAIN IN RATS WITH EXPERIMENTAL TOXIC HEPATITIS

A. P. Shiryayeva,^{1,*} E. V. Baydyuk,¹ A. V. Arkadieva,¹ S. V. Okovityi,² V. I. Morozov,¹ G. A. Sakuta¹

¹ Institute of Cytology RAS, and ² Department of Pharmacology, Military Medical Academy, St. Petersburg;

* e-mail: anyasun@mail.ru

The purpose of this study was to examine hepatocyte mitochondrion respiratory chain in rats subjected to ethanol and CCl_4 administration within 4 weeks to induce an experimental hepatitis. Oxygen consumption was determined as a measure of mitochondrion respiration chain function. The development of liver pathology was accompanied by fat accumulation, fibrosis, triglycerides and lipid peroxidation increase. Respiratory chain characteristics damage was found. Endogenous oxygen consumption by hepatocytes isolated from pathological liver was found 34 % higher compared to control. Exogenous malate and pyruvate substrates delivery didn't stimulate cell respiration. Rotenone (the inhibitor of the I complex) decreased 27 % oxygen consumption by pathological hepatocytes while dinitrophenol produced 37 % cell respiration increase. States 3 (V_3) and 4 (V_4) mitochondrial respiration with malate + glutamate as substrates were found to be 70 and 56 % higher accordingly compared to control level. V_3 and V_4 (dinitrophenol respiration) for mitochondria from pathological liver didn't differ from control when being tested with malate + glutamate or succinate as substrates. Cytochrome *c* oxidase activity increased (+ 80 %) as compared to control. Administration of hypolipidemic agent simvastatin simultaneously with ethanol and CCl_4 resulted in decrease liver fat accumulation, fibrosis and peroxidation products. Simvastatin administration caused hepatocyte endogenous respiration decrease while malate + pyruvate, dinitrophenol or rotenone delivery produced oxygen consumption alterations similar to control. However, when isolated mitochondria from liver of simvastatin treated animals being tested the decrease of oxidative phosphorylation coupling for substrates malate + glutamate was found. While simvastatin did not cause changes in cytochrome *c* oxidase activity. We propose the hypothesis that the NCCR complex in rat mitochondria with experimental toxic hepatitis works extensively on superoxydianion production. Alterations of SCCR, Coenzyme Q-cytochrome *c*-reductase, cytochrome *c* oxidase and ATP-synthase activities have an adaptive nature to compensate for impaired NCCR function.

Key words: hepatitis, hepatocytes, mitochondrion, respiratory chain, lipid peroxidation, simvastatin.