

На правах рукописи

ШИРЯЕВА

Анна Петровна

**ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ ДЫХАТЕЛЬНОЙ ЦЕПИ
МИТОХОНДРИЙ ГЕПАТОЦИТОВ КРЫС ПРИ
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ТОКСИЧЕСКОМ ГЕПАТИТЕ**

специальность

03.00.25 – гистология, цитология, клеточная биология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Санкт-Петербург

2008

Работа выполнена в Лаборатории клеточной патологии Института цитологии РАН, Санкт-Петербург

Научные руководители:

кандидат биологических наук

Сакута Галина Анатольевна

доктор биологических наук

Морозов Владимир Игоревич

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук

Гамалей Ирина Акивовна

доктор биологических наук, профессор

Савина Маргарита Васильевна

Ведущее учреждение:

Научно-исследовательский институт
экспериментальной медицины РАМН,

Санкт-Петербург

Защита состоится 22 февраля 2008 года в 13:00 часов на заседании

Диссертационного совета Д.002.230.01 при Институте цитологии РАН по

адресу: 194064, Санкт-Петербург, Тихорецкий пр., 4.

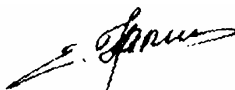
E-mail: cellpath@mail.cytspb.rssi.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института цитологии РАН
(194064, Санкт-Петербург, Тихорецкий пр., 4)

Автореферат разослан 22 января 2008 года.

Ученый секретарь Диссертационного совета,

кандидат биологических наук



Е.В. Каминская

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Заболевания печени занимают одно из ведущих мест по летальности среди населения (Рябинин, 2002). К наиболее тяжелым из них относятся гепатиты различной этиологии и алкогольное поражение печени, вследствие которых зачастую развивается цирроз. Развитие токсического гепатита сопровождается активацией как дегенерации, так и регенерации печени и соотношение этих процессов оказывает решающее влияние на исход заболевания. Успех регенерации зависит от того, насколько эффективен энергетический метаболизм гепатоцитов, который целиком определяется состоянием дыхательной цепи митохондрий.

Дыхательная цепь представляет собой сложную мультикомпонентную структуру, состоящую из пяти комплексов, локализованных во внутренней мембране митохондрий: НАДН-СоQ-оксидоредуктаза (комплекс I), сукцинат-СоQ-оксидоредуктаза (комплекс II), СоQ-цитохромС-оксидоредуктаза (комплекс III), цитохром с оксидаза (комплекс IV) и АТФ-синтаза. Непосредственный синтез АТФ осуществляет АТФ-синтаза, локализованная во внутренней мембране митохондрий в непосредственной близости к электрон-транспортной цепи (Nicholls, Ferguson, 2002; Rubinstein et al., 2003).

Сведения о состоянии дыхательной цепи при токсическом гепатите весьма противоречивы и недостаточны. Так, некоторые авторы утверждают, что компоненты дыхательной цепи при патологии печени серьезно повреждаются, следствием чего является снижение синтеза АТФ (Krähenbühl et al., 1989; Nozu et al., 1992; Hwang, Ismail-Beigi, 2003). Однако детальные исследования механизмов этих нарушений не проведены. Другие авторы считают, что компоненты дыхательной цепи не повреждаются, но могут изменять свою функциональную активность (Cederbaum et al., 1974; Bottenus et al., 1982; Yang et al., 2004). Важно подчеркнуть также, что обычно состояние дыхательной цепи митохондрий изучают в рамках уже сложившейся патологии печени, используя модели, предполагающие применение длительных сроков (более двух месяцев) отравления животных, когда компенсаторные механизмы

в клетке практически истощены и преобладают процессы деградации. Вместе с тем важно изучить состояние дыхательной цепи митохондрий в ранний период развития патологии, когда компенсаторные механизмы клетки активированы в ответ на повреждающее воздействие токсических веществ. Такие данные могут помочь в разработке адекватной тактики лечения токсического гепатита.

Патологические процессы, развивающиеся в печени при токсическом гепатите, как вследствие непосредственного воздействия токсинов, так и в результате нарушения механизма их детоксикации, приводят к окислительному стрессу (Noyan et al., 2006; Esrefoglu et al., 2007; Raja et al., 2007). Окислительный стресс вызывает повышение внутриклеточной генерации активных форм кислорода (АФК) и окислительное повреждение молекулярных структур клетки (Андреев и др., 2005; Avasarala et al., 2006; Wang, Cederbaum, 2006).

Митохондрии концентрируют в себе бóльшую часть окислительных метаболических путей и содержат многочисленные редокс-переносчики и сайты, потенциально способные к одноэлектронному восстановлению кислорода до супероксидного аниона ($O_2^{\bullet-}$) - предшественника других АФК (Андреев и др., 2005; Cadenas et al., 1977; Lenaz, 2001). В дыхательной цепи митохондрий в норме роль основных генераторов $O_2^{\bullet-}$ отводят комплексам I (Cadenas et al., 1977; Lenaz, 2001) и III (Boveris, Chance, 1973; Turrens, Boveris, 1980). В гепатоцитах нормальной печени интенсивность продукции $O_2^{\bullet-}$ очень мала. Так, митохондрии в состоянии 4 (V_4) по Чансу продуцируют 0.6-1 нмоль H_2O_2 за 1 мин на 1 мг белка, что составляет примерно 2 % от всего потребляемого ими кислорода (Liu, 1997). Вырабатываемый при этом $O_2^{\bullet-}$ может быть вовлечен в регуляцию клеточного метаболизма или элиминирован митохондриальной супероксиддисмутазой (Mn-SOD) (Liu, 1997; Turrens, 1997). При патологиях печени уровень продукции АФК в митохондриях гепатоцитов значительно возрастает (Андреев и др., 2005; Yang et al., 2004), однако механизм усиления продукции $O_2^{\bullet-}$ в дыхательной цепи митохондрий практически не изучен.

Исходя из вышесказанного, **цель** настоящей работы состояла в исследовании состояния дыхательной цепи митохондрий гепатоцитов крыс с экспериментальным токсическим гепатитом, вызванным комбинированным воздействием этанола и CCl_4 . В рамках цели исследования были сформулированы следующие **задачи**:

- 1) получить гистологическую и биохимическую характеристики печени крыс, подвергавшихся комбинированному воздействию этанола и CCl_4 в течение 1 мес;
- 2) провести ингибиторный анализ скорости дыхания изолированных гепатоцитов и митохондрий крыс с токсическим гепатитом;
- 3) исследовать продукцию $\text{O}_2^{\bullet-}$ различными комплексами дыхательной цепи митохондрий крыс с токсическим гепатитом;
- 4) изучить состояние антиоксидантной системы митохондрий гепатоцитов крыс с токсическим гепатитом;
- 5) исследовать энергообразующую функцию печени крыс с токсическим гепатитом.

Научная новизна. Ряд результатов, полученных нами при исследовании состояния дыхательной цепи митохондрий гепатоцитов крыс при патологии печени, носит приоритетный характер. В частности, впервые в рамках одной экспериментальной модели проведены исследования состояния дыхательной цепи митохондрий на изолированных гепатоцитах, митохондриях и субмитохондриальных частицах. При этом параметры, характеризующие функциональное состояние дыхательной цепи митохондрий, были измерены у каждого животного индивидуально. Впервые установлено, что при токсическом гепатите повышенное потребление кислорода митохондриями и гепатоцитами связано с продукцией $\text{O}_2^{\bullet-}$ дыхательной цепью митохондрий. Основной вклад в продукцию $\text{O}_2^{\bullet-}$ вносит комплекс I. Кроме того, впервые проведено детальное исследование мест продукции $\text{O}_2^{\bullet-}$ в дыхательной цепи митохондрий гепатоцитов крыс с токсическим гепатитом. Полученные в работе данные позволяют рассматривать усиление продукции $\text{O}_2^{\bullet-}$ не только в качестве

основной составляющей патологического процесса, но также как компенсаторный механизм, позволяющий поддерживать электрон-транспортную функцию дыхательной цепи митохондрий в условиях ее частичной блокады в комплексе I.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Скорости потребления кислорода как изолированными гепатоцитами, так и изолированными митохондриями повышены при токсическом гепатите.
2. Повышенное потребление кислорода изолированными гепатоцитами и митохондриями крыс с токсическим гепатитом связано с усилением продукции $O_2^{\cdot-}$ дыхательной цепью митохондрий.
3. Усиление продукции $O_2^{\cdot-}$ при токсическом гепатите определяется, главным образом, частичной блокадой переноса электронов в комплексе I дыхательной цепи митохондрий, хотя степень сопряжения окисления и фосфорилирования дыхательной цепи остается высокой.
4. Повышенную продукцию $O_2^{\cdot-}$ при токсическом гепатите можно рассматривать не только в качестве составляющей патологического процесса, но также как компенсаторный механизм, позволяющий поддерживать электрон-транспортную функцию дыхательной цепи митохондрий в условиях ее частичной блокады.
5. Увеличение активности цитохром с оксидазы (комплекс IV) при токсическом гепатите также можно рассматривать как один из компонентов компенсаторного механизма, направленного на нейтрализацию повышенного количества $O_2^{\cdot-}$.
6. Активности основных ферментов антиоксидантной защиты митохондрий Mn-SOD и глутатионпероксидазы при токсическом гепатите снижены, что способствует развитию окислительного стресса в гепатоцитах.
7. Несмотря на то, что степень сопряжения окисления и фосфорилирования, а также скорость потребления кислорода высокие, содержание АТФ в печени падает.

Теоретическая и практическая значимость. Работа имеет фундаментальную направленность, однако изучение функционирования дыхательной цепи митохондрий при токсическом гепатите на ранних стадиях развития патологии, когда в клетке активированы компенсаторные процессы в ответ на повреждение, поможет в разработке оптимальной тактики профилактики и лечения данной патологии.

Апробация работы. Материалы работы были представлены на 8-м Международном конгрессе по клеточной биологии (Ницца, Франция, 2004); Международном симпозиуме «Стволовые клетки, регенерация, клеточная терапия» (Санкт-Петербург, 2004); 10-й Пущинской школе-конференции молодых ученых (Пущино, 2006); Международном симпозиуме «Биоэлектрохимия 2007» (Тулуза, Франция, 2007).

Финансовая поддержка работы. Работа выполнена при финансовой поддержке Правительства Санкт-Петербурга в рамках персональных грантов (стипендий) 2006 года для студентов и аспирантов из вузов и академических институтов Санкт-Петербурга.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 6 работ.

Структура диссертации. Диссертационная работа состоит из следующих глав: Введение, Обзор литературы, Материалы и методы, Результаты, Обсуждение, Выводы и Список цитируемой литературы, включающий 197 источников. Работа изложена на 112 страницах и содержит 32 рисунка и 5 таблиц.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объекты исследования. Исследования проведены на 50 крысах-самцах Вистар, вес которых в начале опыта составил 180-200 г. Животных содержали в стандартных условиях светового режима и на стандартном рационе. Все животные были разделены на 2 группы. 1-я группа служила контролем (интактные крысы), а у крыс 2-й группы вызывали экспериментальный токсический гепатит (Strubelt et al., 1978; Венгеровский и др., 2000), для чего

животным в течение месяца два раза в неделю 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. Через 1 нед после последнего введения CCl_4 крыс умерщвляли, используя тиопенталовый наркоз.

Приготовление препаратов. Гистологические срезы готовили по стандартной методике (Роскин, 1957). Срезы окрашивали гематоксилином-эозином или пикрофуксином по Ван Гизону (Пирс, 1962).

Получение изолированных гепатоцитов, изолированных митохондрий и субмитохондриальных частиц. Изолированные гепатоциты крыс получали по модифицированному методу Сеглена с использованием коллагеназы IV (Seglen, 1976). Жизнеспособность гепатоцитов оценивали по окраске трипановым синим, акридиновым оранжевым и бромистым этидием, а также с помощью МТТ-теста (Mossman, 1983). Количество изолированных гепатоцитов в суспензии определяли, подсчитывая клетки в камере Горяева. Клетки культивировали в CO_2 -инкубаторе при 37 °С. Митохондрии выделяли методом дифференциального центрифугирования по методу Джонсона и Лэрди (Jonson, Lardy, 1969). Субмитохондриальные частицы получали из изолированных митохондрий печени крыс с помощью дифференциального центрифугирования (Hegero, Varja, 2000). Количество белка определяли по Бредфорд (Bradford, 1976).

Цитохимические методы. Для анализа морфологического состояния митохондрий гепатоциты окрашивали флуоресцентным красителем - родамином 123 по методу Джонсона с соавторами (Johnson et al., 1980). Для сохранения жизнеспособности гепатоцитов во время микроскопирования покровные стекла с монослоем клеток помещали на предметное стекло с предварительно подготовленной герметичной камерой, заполненной подогретой культуральной средой. Флуоресценцию окрашенных гепатоцитов возбуждали светом 480 нм и наблюдали с помощью флуоресцентного конфокального микроскопа Leica (Германия).

Параметры оценки функционального состояния дыхательной цепи митохондрий. Измерение скорости потребления кислорода изолированными гепатоцитами и митохондриями проводили с помощью полярографического метода с использованием платинового электрода типа Кларка (Chance, Williams, 1956; Estabrook, 1967). Функциональное состояние НАДН-CoQ-оксидоредуктазы (комплекс I), сукцинат-CoQ-оксидоредуктазы (комплекс II), CoQ-цитохром *c*-оксидоредуктазы (комплекс III) оценивали с помощью специфических субстратов и ингибиторов данных комплексов, используя при работе на изолированных митохондриях следующие параметры:

- V_4 – скорость дыхания в состоянии 4 по Чансу (при высоком содержании в среде инкубации субстратов - 5 мМ глутамата и 5 мМ малата (субстраты комплекса I), либо 5 мМ сукцината (субстрат комплекса II) при отсутствии АДФ);
- V_3 – скорость дыхания в состоянии 3 по Чансу (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);
- V_{unc} – скорость разобщенного дыхания (условия те же, что и при определении V_4 , но в присутствии 30 мкМ 2,4-динитрофенола – разобщителя окисления и фосфорилирования);
- дыхательный контроль – отношение V_4 к V_3 .

При исследовании функционального состояния комплексов дыхательной цепи митохондрий на изолированных гепатоцитах использовали иные параметры:

- V_0 – эндогенное дыхание (скорость потребления кислорода клетками на эндогенных субстратах);
- дыхание на экзогенных субстратах (5 мМ глутамата и 5 мМ малата либо 5 мМ сукцината);
- дыхание при воздействии на клетки 1 мкМ ротенона (ингибитора комплекса I) и 30 мкМ 2,4-динитрофенола (разобщитель окисления и фосфорилирования).

Биохимические методы. Активность цитохром *c* оксидазы определяли полярографическим методом (Estabrook, 1967) с использованием аскорбиновой кислоты (донор электронов), дигитонина (перфоратор мембраны), цитохрома *c* для устранения ограничения скорости реакции, связанной с его недостатком, и тетраметилпарафенилендиамина (переносчик электронов с аскорбиновой кислоты на систему цитохромов).

Адениловые нуклеотиды в образцах измеряли методом ионообменной хроматографии с применением хроматографа марки Knauer (Германия) и колонок, заполненных сорбентом Separon SGX NH₂ (150 × 3.3 мм, 5 мкм) и Diasorb amine (120 × 1 мм, 5 мкм) при длине волны 260 нм. В качестве элюента использовали 0.35 М КН₂РO₄-Na₂НРO₄ буфер, рН 6.8. Для разделения АТФ, АДФ и АМФ применяли линейную градиентную элюцию фосфатным буфером (0 – 0.35 М).

Скорость образования O₂^{•-} субмитохондриальными частицами определяли по методу, основанному на окислении адреналина O₂^{•-} (Misra, Fridovich, 1972). При расчете скорости продукции O₂^{•-} для каждой пробы из скорости реакции без СОД вычитали скорость реакции с СОД, принимая во внимание то, что коэффициент молярной экстинкции образующегося адrenoхрома составляет 4.0·10³ (моль/л)⁻¹·см⁻¹ (Tagrey, 2001). Для локализации мест продукции O₂^{•-} в дыхательной цепи митохондрий использовали субстраты и специфические ингибиторы цепи переноса электронов: НАДН - 10 мМ, сукцинат - 5 мМ, ротенон - 5 мкМ, антимицин А - 10 мкМ, миксотиазол - 10 мкМ.

Интенсивность перекисного окисления липидов исследовали, измеряя в гомогенате печени концентрацию диеновых конъюгатов (Гаврилов, Мишкорудная, 1983) и Шиффовых оснований (Таранова, Нилова, 1986). Уровень триглицеридов в печени крыс измеряли с помощью колориметрического метода (Прохорова, 1992). Активность митохондриальной Mn-СОД определяли методом Флоха и Оттинга (Flohe, Ötting, 1984). Активность митохондриальной глутатионпероксидазы определяли методом Флоха и Гунцлера (Flohe, Günzler, 1984). Глутатион определяли по скорости

восстановления 5,5'-дителиобис-(2-бензойной кислоты), которая пропорциональна количеству присутствующего в пробе GSH или GSSG (Tietze, 1969; Hazelton, Lang, 1980).

Статистическая обработка полученных данных. Статистическую обработку данных проводили с помощью *t*-критерия Стьюдента, используя стандартные пакеты программ для персонального компьютера OriginPro 8.0 и SigmaPlot. Различия считали достоверными при доверительной вероятности 0.95.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Гепатиты токсической природы получают все большее распространение в мире, что определяет большой интерес исследователей к данной проблеме (Рябинин, 2002). По общему мнению исследователей ключевым звеном патологического процесса является нарушение работы дыхательной цепи митохондрий гепатоцитов, в основе которого лежит усиление продукции АФК – окислительный стресс (Avasarala et al., 2006; Wang, Cederbaum, 2006). Вместе с тем литературные данные, посвященные исследованию состояния дыхательной цепи митохондрий при токсическом гепатите, не полны и весьма противоречивы (Morimoto et al., 1988; Krähenbühl et al., 1989; Harvey et al., 2000; Yang et al., 2004). Мы полагаем, что противоречивость данных может быть связана с использованием моделей, предполагающих применение различных сроков отравления такими токсическими агентами, как тиоацетамид, алкоголь и CCl₄. Подавляющее большинство авторов используют длительное (более 2 мес) отравление животных (Jikko et al., 1984; Morimoto et al., 1988; Krähenbühl et al., 1989; Harvey et al., 2000; Yang et al., 2004; Son et al., 2007). Вместе с тем важно подчеркнуть, что развитие хронического токсического гепатита представляет многостадийный процесс. На первой стадии происходит активация компенсаторных механизмов клетки в ответ на повреждающее воздействие токсических веществ. В течение следующей стадии клетка активно сопротивляется воздействию, используя все свои компенсаторные механизмы, а

по их исчерпанию наступает конечная стадия развития патологии, которая приводит к необратимым структурным и функциональным нарушениям клеточных компонентов. Стадийный характер, по-видимому, носит и развитие нарушений в функционировании дыхательной цепи. При этом и интенсивность электронного транспорта, и активность комплексов дыхательной цепи в отдельности, и синтез АТФ могут определяться стадией развития токсического гепатита. Основываясь на данных разных авторов мы выявили зависимость функционального состояния дыхательной цепи митохондрий гепатоцитов от продолжительности воздействия токсическими агентами (рис. 1). На рисунке видно, что на длительных сроках отравления токсическими агентами интенсивность работы дыхательной цепи митохондрий значительно снижена. Снижение интенсивности дыхания гепатоцитов указывает на уже сложившуюся патологию печени, когда компенсаторные механизмы в клетке практически истощены и преобладают процессы деградации гепатоцитов. Вместе с тем для понимания сущности патологического механизма важно изучить состояние дыхательной цепи митохондрий на других этапах развития патологии, когда компенсаторные механизмы клетки активированы в ответ на повреждающее воздействие токсических веществ. В соответствие с этим в нашей работе была использована модель индукции токсического гепатита, основанная на введении токсических веществ в течение 1 мес.

Наряду с активно развивающимися патологическими процессами в печени при токсическом гепатите протекают регенераторные процессы. От полноты и скорости регенерации зависит восстановление и поддержание функций пораженной печени. Полноценность регенераторных процессов при токсическом гепатите в значительной мере определяется адекватностью энергетического метаболизма в печени, а именно состоянием дыхательной цепи митохондрий.

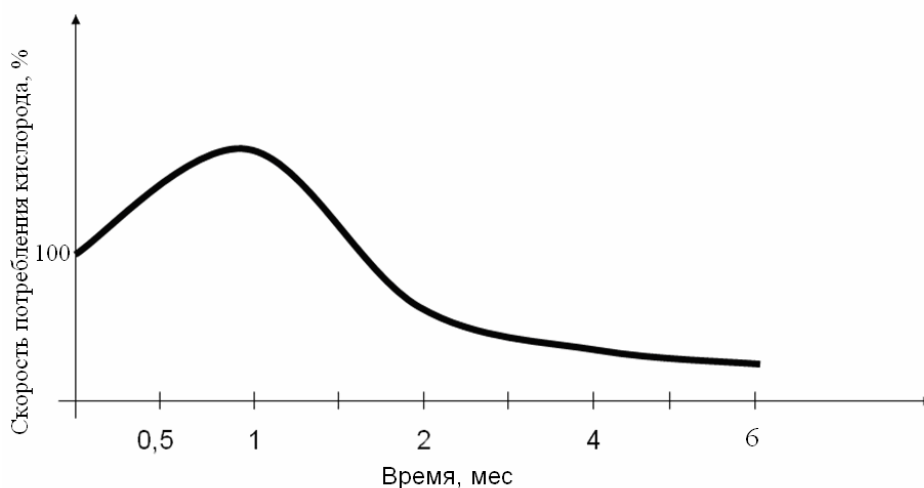


Рис. 1 Зависимость скорости потребления кислорода митохондриями от продолжительности воздействия токсическими агентами. Кривая построена на основе данных литературы: Ширяева и др., 2007; Jikko et al., 1984; Morimoto et al., 1988; Krähenbühl et al., 1989; Harvey et al., 2000; Yang et al., 2004; Son et al., 2007.

Таблица 1

Скорость потребления кислорода гепатоцитами при добавлении малата и пирувата, ротенона и 2,4-динитрофенола

Скорость потребления кислорода, нмоль O_2 ·мин ⁻¹ ·10 ⁶ кл ⁻¹	Контроль	Гепатит
Эндогенное дыхание V_0	14.0 ± 0.8	18.8 ± 1.7 *
Малат (1мМ) + пируват (5мМ)	19.4 ± 0.9	18.7 ± 1.5
2,4-Динитрофенол (5мкМ)	18.5 ± 0.7	25.2 ± 5.1
Ротенон (5мкМ)	8.0 ± 0.5	13.7 ± 1.1
Цианид	1.4 ± 0.9	6.0 ± 1.0 *

Примечание: $X \pm S.E.$, $N = 15$, * $P < 0.05$ при сравнении с контролем.

Проведенное исследование показало, что скорости дыхания как изолированных гепатоцитов, так и изолированных митохондрий крыс с токсическим гепатитом достоверно выше, чем в контроле. Так, эндогенное дыхание гепатоцитов крыс с токсическим гепатитом было повышено на 34 % (табл. 1), а скорости дыхания митохондрий в состояниях 3 (V_3) и 4 (V_4) на субстратах комплекса I дыхательной цепи превышали контрольные значения на 77 и 56 % соответственно (рис. 2, 3). Скорость дыхания V_3 митохондрий опытной группы на субстрате комплекса II была также выше по сравнению с контролем (рис. 4), однако скорость дыхания V_4 не отличалась от контроля (рис. 5).

В экспериментах, проведенных на изолированных гепатоцитах, было показано, что степень ингибирования скорости дыхания ротеноном (ингибитор

комплекса I) в опытной группе существенно меньше (-27 %), чем в контроле (-59 %) (табл. 1). Отличия скоростей дыхания V_3 и V_4 изолированных митохондрий опытной группы от контроля на субстратах комплекса I были выше, чем на субстрате комплекса II. Это указывает на то, что функционирование комплекса I дыхательной цепи митохондрий при токсическом гепатите существенно отличается от контроля.

Возникает вопрос: почему повышено поглощение кислорода митохондриями гепатоцитов крыс с токсическим гепатитом и с работой каких комплексов дыхательной цепи оно связано?

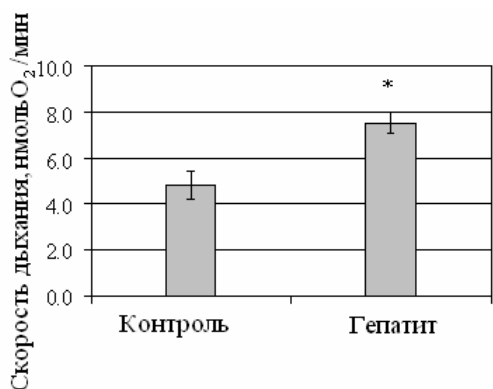


Рис. 2. Скорости потребления кислорода в состоянии 4 (V_4) митохондриями гепатоцитов (на 1 мг белка) контрольных крыс и крыс с токсическим гепатитом. Субстраты: глутамат и малат. $X \pm S.D.$, $N=15$, * $P < 0.05$ при сравнении с контролем.

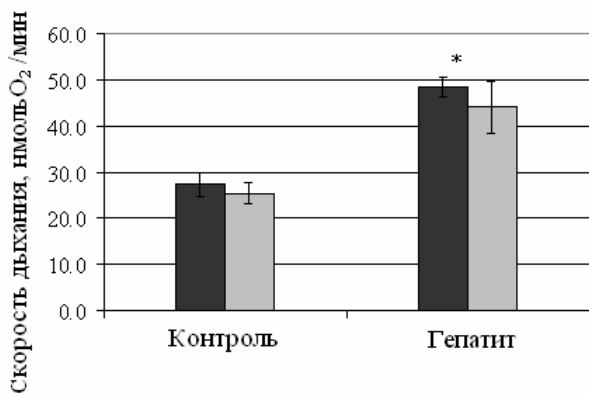


Рис. 3. Скорости потребления кислорода митохондриями (на 1 мг белка) в состоянии 3 (V_3) (черные столбики) и в присутствии динитрофенола (V_{unc}) (серые столбики) контрольных и опытных крыс. Субстраты: глутамат и малат. $X \pm S.D.$, $N=15$, * $P < 0.05$ при сравнении с контролем.

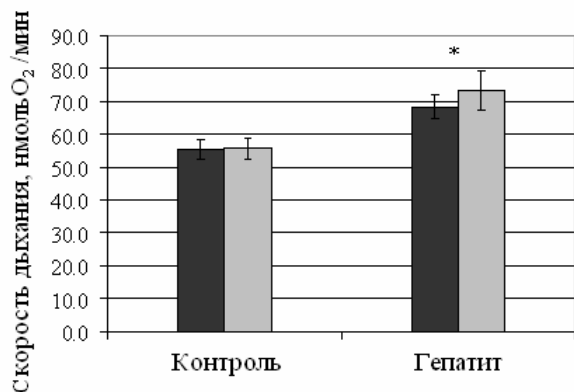


Рис. 4. Скорости потребления кислорода митохондриями (на 1 мг белка) в состоянии 3 (V_3) (черные столбики) и в присутствии динитрофенола (V_{unc}) (серые столбики) контрольных и опытных крыс. Субстрат: сукцинат. $X \pm S.D.$, $N=15$, * $P < 0.05$ при сравнении с контролем.

Можно предположить, что повышенное потребление кислорода митохондриями гепатоцитов при токсическом гепатите связано с усилением продукции АФК. Известно, что не весь кислород, потребляемый митохондриями, расходуется в процессе окислительного фосфорилирования при работе цитохром *c* оксидазы (Boveris, Chance, 1973; Liu, 1997). В норме 1 – 2 % кислорода уходит на выработку дыхательной

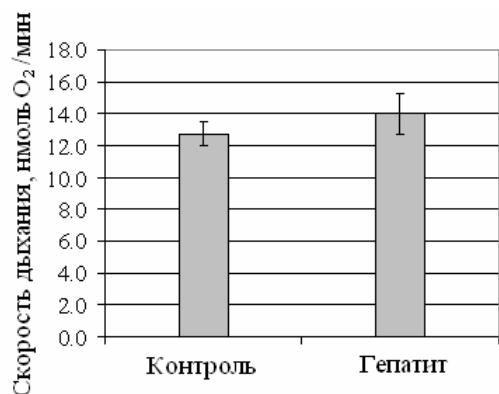


Рис. 5. Скорости потребления кислорода в состоянии 4 (V_4) митохондриями гепатоцитов (на 1 мг белка) контрольных крыс и крыс с токсическим гепатитом. $X \pm S.D.$, $N = 15$. Субстрат: сукцинат.

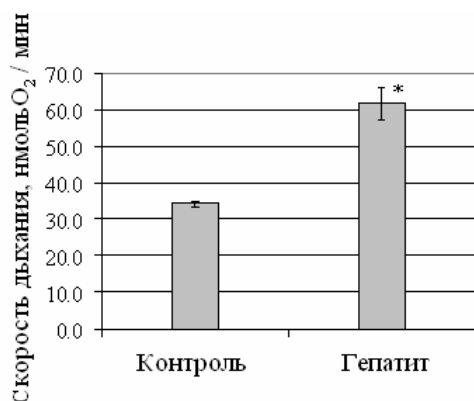


Рис. 6. Изменение активности цитохром *c* оксидазы (в расчете на 1 мг МХ белка) в печени крыс с токсическим гепатитом. $X \pm S.D.$, $N = 15$, * $P < 0.05$ при сравнении с контролем.

цепью $O_2^{\cdot-}$ (Boveris, Chance, 1973, Turrens, 1997; Liu, 1997). В дыхательной цепи митохондрий выявлено несколько сайтов образования $O_2^{\cdot-}$ (рис. 7). Предполагают, что два или более таких сайта находятся в комплексе I (Гривенникова, Виноградов, 2003; Fridovich, 1974; Kotlyar et al., 1990; Genova et al., 2001; Kushnareva et al., 2002; Turrens, 2003). При этом основные сайты выявлены на флавинмоноклеотидном участке и участке передачи электронов между железо-серными кластерами и убихиноном (Cadenas et al., 1977, Turrens, Boveris, 1980).

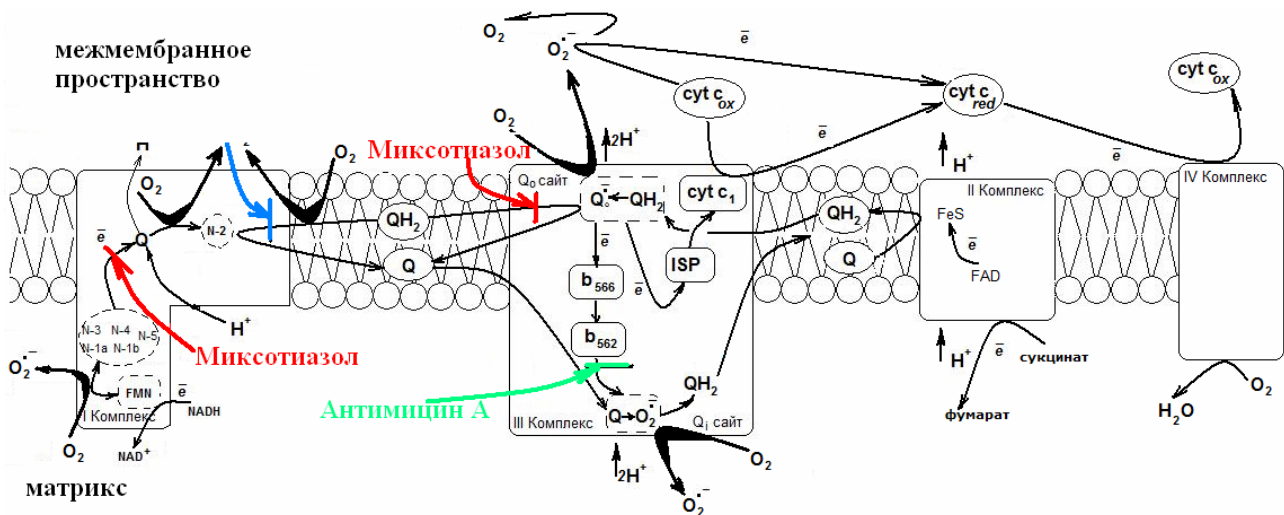


Рис. 7. Дыхательная цепь митохондрий с указанием предположительных мест продукции $O_2^{\bullet-}$ и мест воздействия использованных в работе ингибиторов.

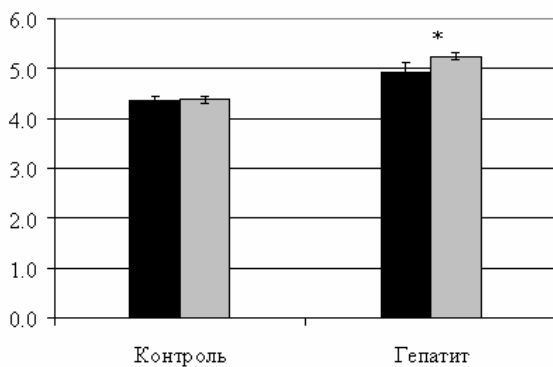


Рис. 8. Сравнение показателей дыхательного контроля в присутствии (серые столбики) и в отсутствие динитрофенола (черные столбики) митохондрий контрольной и опытной групп. Субстрат: сукцинат. $X \pm S.D.$, $N=15$, * $P < 0.05$ при сравнении с контролем.

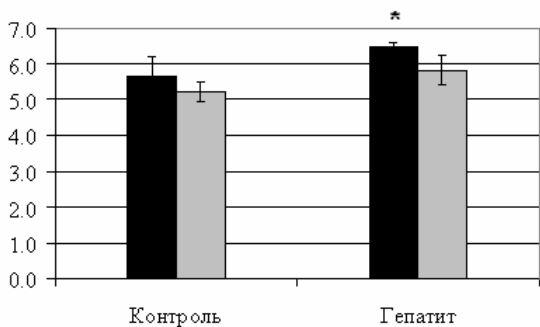


Рис. 9. Сравнение показателей дыхательного контроля в присутствии (серые столбики) и в отсутствие динитрофенола (черные столбики) для митохондрий контрольной и опытной групп. Субстраты: глутамат и малат. $X \pm S.D.$, $N=15$, * $P < 0.05$ при сравнении с контролем.

В комплексе III также происходит образование $O_2^{\bullet-}$ при окислении и восстановлении убихинона (Turrens et al., 1985; Nicholls, Budd, 2000; Grivennikova, Vinogradov, 2006). Комплекс I дыхательной цепи рассматривают как один из основных источников АФК в клетке при патологии (Varja, Herrero,

1998; Barja, 1999; Nicholls, 2002; Trojanowski, 2003). Для того, чтобы оценить долю потребляемого кислорода, не связанного с работой цитохром *c* оксидазы, мы использовали ее специфический ингибитор – цианид. В присутствии цианида дыхание гепатоцитов крыс с токсическим гепатитом снижалось на 70 %, тогда как в контроле степень этого ингибирования составила 93 % (табл. 1). Данный факт свидетельствует о том, что часть потребляемого митохондриями кислорода при токсическом гепатите расходуется, не доходя до конечного звена дыхательной цепи – цитохром *c* оксидазы. Скорость потребления кислорода митохондриями крыс с токсическим гепатитом в состоянии V_3 на сукцинате и ротеноне была незначительно выше по сравнению с контролем. Основываясь на этих данных, можно предположить, что комплексы II и III также могут участвовать в продукции $O_2^{\cdot-}$, наряду с комплексом I. Вместе с тем, основываясь на данных литературы о том, что комплекс II обладает наименьшей способностью к продукции $O_2^{\cdot-}$ по сравнению с остальными комплексами дыхательной цепи (McLennan, Esposito, 2000), можно полагать, что вклад комплекса II в продукцию $O_2^{\cdot-}$ при токсическом гепатите незначителен. В связи с тем, что доля избыточного дыхания митохондрий крыс опытной группы на субстратах малате и глутамате выше, чем на сукцинате и ротеноне, мы предполагаем, что вклад комплекса I в продукцию $O_2^{\cdot-}$ значительно преобладает над вкладом комплекса III.

Изменение работы комплекса I, связанное, по-видимому, с нарушением транспорта электронов (утечка электронов на кислород), как раз и может быть причиной повышенной продукции $O_2^{\cdot-}$. Избыточный $O_2^{\cdot-}$ может окисляться цитохромом *c*, который в свою очередь переносит электроны на цитохром *c* оксидазу (рис. 7) (Kowaltowski, Vercesi, 1999). Этот механизм хорошо согласуется с обнаруженным нами повышением на 80 % активности цитохром *c* оксидазы митохондрий гепатоцитов крыс с токсическим гепатитом (рис. 6).

Вместе с тем результаты исследования сопряжения процессов окисления и фосфорилирования на изолированных гепатоцитах и на изолированных митохондриях указывают на то, что разобщение этих процессов отсутствует как

на субстратах комплекса I, так и на субстратах комплекса II дыхательной цепи. Различий между параметрами V_{unc} и V_3 на сукцинате с ротеноном и глутамате с малатом в опытной группе не обнаружено (рис. 3, 4). Дыхательные контроли оказались не только не ниже соответствующих значений контрольной группы, но даже превысили их (рис. 8, 9). Кажется парадоксальным, что митохондрии при патологии имеют высокий дыхательный контроль. В ряде работ показано, что при токсическом гепатите дыхательный контроль, а также степень сопряжения окисления и фосфорилирования снижаются (Jikko et al., 1984; Krähenbühl et al., 1992a). Однако наши данные указывают на высокую степень сопряжения окисления и фосфорилирования митохондрий гепатоцитов на ранней стадии развития токсического гепатита. Высокий дыхательный контроль определяется, по-видимому, увеличением скорости дыхания в состоянии V_3 , что свидетельствует о высокой электронной проводимости самой дыхательной цепи.

Наиболее часто используемые длительные модели развития патологии печени вызывают истощение компенсаторных механизмов клетки, приводят к повреждению дыхательной цепи, снижению дыхательного контроля и степени сопряжения процессов окисления и фосфорилирования (Jikko et al., 1984; Krähenbühl et al., 1992a). В рамках нашей относительно непродолжительной модели (1 мес) общая активация компенсаторных механизмов гепатоцита включает и активацию митохондриальных резервов, направленную на обеспечение возросшей потребности клетки в энергии. Увеличение скорости транспорта электронов по переносчикам дыхательной цепи митохондрий, а также высокий дыхательный контроль и степень сопряжения окисления и фосфорилирования при токсическом гепатите, выявленные нами, подтверждают предположение об активации митохондриальных резервов, обеспечивающих создание необходимого электрохимического потенциала. Показано, что тесное сопряжение окисления и фосфорилирования в митохондриях является необходимым условием продукции АФК дыхательной цепью (Hinkle et al., 1967; Turrens, 2003).

Данные, полученные при исследовании параметров дыхания изолированных гепатоцитов и митохондрий крыс, позволяют сформулировать гипотезу о том, что при токсическом гепатите происходит нарушение работы комплекса I дыхательной цепи, связанное с утечкой электронов на кислород и образованием $O_2^{\bullet-}$. Выявленные при этом изменения в активности цитохром с оксидазы, по-видимому, носят компенсаторный характер и направлены на сохранение энергообразующей функции митохондрий.

Для проверки выдвинутой гипотезы мы исследовали продукцию $O_2^{\bullet-}$ дыхательной цепью митохондрий. Полученные в работе данные, характеризующие продукцию $O_2^{\bullet-}$ субмитохондриальными частицами крыс с токсическим гепатитом, указывают на то, что в комплексе I существует некоторое препятствие, ограничивающее продвижение электронов. Так, скорость продукции $O_2^{\bullet-}$ в присутствии НАДН субмитохондриальными частицами крыс с токсическим гепатитом была в 2.5 раза выше, чем в контроле. Добавление ротенона, который блокирует передачу электронов в комплексе I с железосерных кластеров на окисленный убихинон (Herrero, Barja, 2000; Андреев и др., 2005), к субмитохондриальным частицам опытной группы в присутствии НАДН не привело к изменению скорости продукции $O_2^{\bullet-}$. Скорость продукции $O_2^{\bullet-}$ в контрольной группе в присутствии НАДН с ротеноном соответствовала таковой $O_2^{\bullet-}$ в опытной группе в присутствии одного НАДН (рис. 10). Появление препятствия в транспорте электронов по переносчикам комплекса I может приводить к тому, что часть электронов пойдет на образование $O_2^{\bullet-}$ (рис. 7).

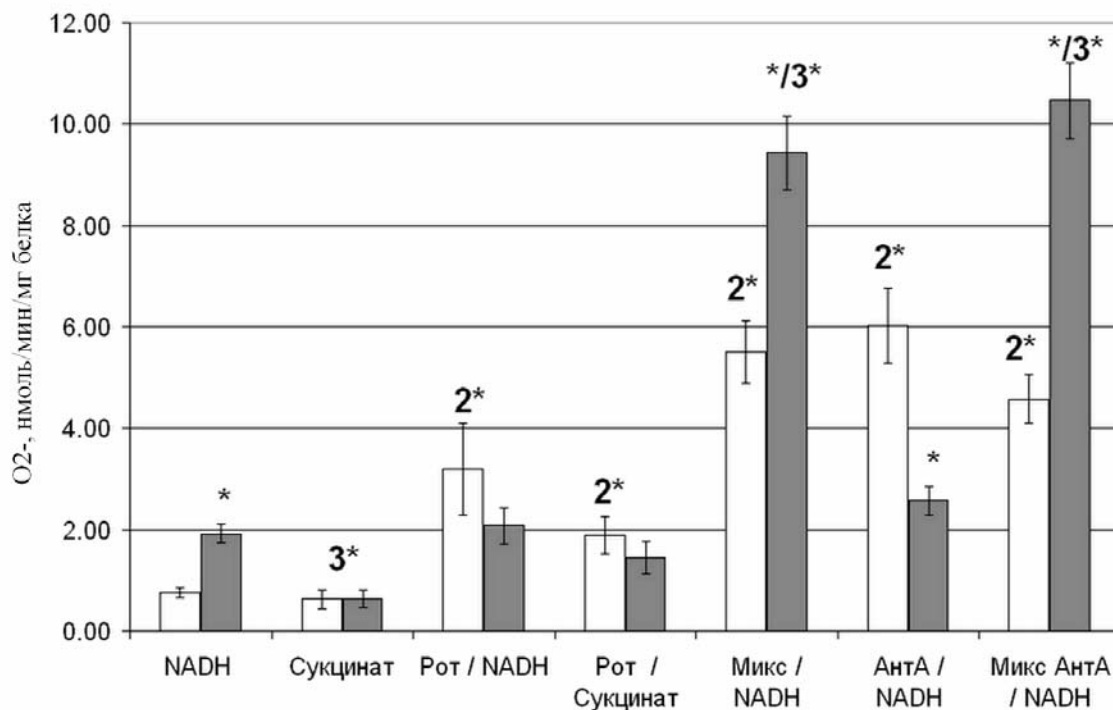


Рис. 10. Продукция $O_2^{\bullet-}$ субмитохондриальными частицами гепатоцитов крыс в норме (белые столбики) и при токсическом гепатите (серые столбики). $X \pm S.D.$, $N = 15$, * $P < 0.05$ при сравнении с контролем; 2* $P < 0.05$ относительно скорости продукции $O_2^{\bullet-}$ СМЧ в контроле при добавлении НАДН; 3* $P < 0.05$ то же, но в рамках опытной группы. Сокращения: Рот – ротенон; Микс – миксотиазол; Ант А – антимицин А.

Для оценки вклада в продукцию $O_2^{\bullet-}$ остальных комплексов дыхательной цепи мы провели измерение скорости продукции $O_2^{\bullet-}$ в присутствии миксотиазола и антимицина А, имеющих отличные от ротенона сайты ингибирования электронного транспорта в дыхательной цепи. Миксотиазол имеет два сайта воздействия (рис. 7), блокируя окисление CoQ в центре Q_p комплекса III и частичное восстановление CoQ в комплексе I (Ortega-Sáenz et al., 2003; Ward, 2003). Антимицин А подавляет передачу электронов с цитохрома b566 на окисленный убихинон в комплексе III, тем самым препятствуя восстановлению убихинона (Андреев и др., 2005; Grivennikova, Vinogradov, 2006). Миксотиазол в норме вызывает многократное увеличение продукции АФК комплексом I, а антимицин А - комплексом III. Совместное действие миксотиазола и антимицина А проявляется в небольшом снижении продукции $O_2^{\bullet-}$ комплексом III (Андреев и др., 2005). Уровень продукции $O_2^{\bullet-}$ субмитохондриальными частицами опытной группы в присутствии

миксотиазола и НАДН на 72 % выше, чем в контроле в тех же условиях (рис. 7). Данный факт указывает на то, что интенсивность электронного транспорта по дыхательной цепи митохондрий опытных крыс намного выше, чем в контроле. Напротив, в присутствии антимицина А продукция $O_2^{\bullet-}$ субмитохондриальными частицами опытных крыс была ниже, чем в контроле, но не отличалась от скорости продукции $O_2^{\bullet-}$ субмитохондриальными частицами опытных крыс в присутствии ротенона и НАДН. Следовательно, либо продукция $O_2^{\bullet-}$ комплексом III при гепатите очень низкая, либо весь образующийся в комплексе III $O_2^{\bullet-}$ утилизируется в рамках компенсаторного механизма с участием цитохрома *c* и цитохром *c* оксидазы. Цитохром *c* может окислять образовавшийся $O_2^{\bullet-}$ и переносить его на цитохром *c* оксидазу, которая, в свою очередь, восстанавливает кислород до воды (Korshunov et al., 1999; Андреев и др., 2005). Выявленное нами ранее почти двукратное увеличение активности цитохром *c* оксидазы при токсическом гепатите подтверждает такую возможность (Ширяева и др., 2007). По-видимому, результат совместного действия миксотиазола и антимицина А в опытной группе, определяется действием одного миксотиазола в комплексе I. Эти данные также подтверждают предположение о существовании в комплексе I дыхательной цепи митохондрий при токсическом гепатите препятствия в транспорте электронов.

Данные по измерению скорости продукции $O_2^{\bullet-}$ на субстрате комплекса II дыхательной цепи – сукцинате не выявили каких-либо отличий между крысами опытной и контрольной групп. Следовательно, при токсическом гепатите комплекс II не участвует в выработке АФК.

Митохондрии млекопитающих обладают эффективной системой защиты от АФК (Андреев и др., 2005; Li et al., 1995). Устранение первичных АФК ($O_2^{\bullet-}$ и H_2O_2) осуществляют Mn-содержащая СОД и глутатионпероксидаза. Mn-СОД, расположенная в митохондриальном матриксе, ускоряет дисмутацию $O_2^{\bullet-}$ в H_2O_2 , защищая от $O_2^{\bullet-}$ железосерные кластеры, входящие в состав комплексов дыхательной цепи (Gardner et al., 1995). Глутатионпероксидаза утилизирует

Антиоксидантный статус митохондрий гепатоцитов крыс в норме и при хроническом токсическом гепатите

Показатели	Контроль	Опыт
Мп-СОД, ед/мг белка	5.8 ± 0.4	3.8 ± 0.1 *
Глутатионпероксидаза, нмоль/мин/мг белка	466 ± 14	345 ± 32 *
Глутатион, нмоль/мг белка	2.6 ± 0.3	2.1 ± 0.1
Глутатион восст., нмоль/мг белка	2.0 ± 0.3	1.6 ± 0.1
Глутатион окисл., нмоль/мг белка	0.60 ± 0.06	0.50 ± 0.06

Примечание. $X \pm S. E.$, $N = 15$, * $P < 0.01$ при сравнении с контролем.

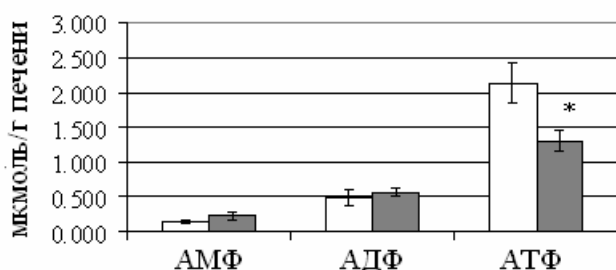


Рис. 11. Содержание адениловых нуклеотидов в печени контрольных крыс (белые столбики) и крыс с токсическим гепатитом (серые столбики), индуцированным применением CCl_4 и этанола. $X \pm S. D.$, $N = 15$, * $P < 0.01$.

H_2O_2 посредством окисления восстановленного глутатиона (Li et al., 1995). Активность систем удаления АФК в норме очень высока, однако при патологии скорость выработки АФК митохондриями может превышать скорость их утилизации системой антиоксидантной защиты (Андреев и др., 2005). При исследовании основных ферментов антиоксидантной защиты митохондрий оказалось, что активности Мп-СОД и глутатионпероксидазы при токсическом гепатите снижены на 34 % и 26 % соответственно (табл. 2). Продукты окислительного стресса могут подавлять компоненты антиоксидантной системы (Bota, Davies, 2002), что, возможно, и является причиной выявленного нами снижения антиоксидантных ферментов митохондрий при токсическом гепатите. Возможно также появление модифицированных окислением белков электрон-транспортной цепи, которые могут привести к нарушению работы дыхательной цепи, усилению окислительного стресса и снижению синтеза АТФ. Результаты наших исследований выявили снижение на 45 % содержания АТФ в печени животных с токсическим гепатитом (рис. 11). Снижение синтеза АТФ и активности глутатионпероксидазы обнаружено также при хроническом

алкогольном поражении печени (Bailey et al., 2006) и при циррозе печени (Balkan et al., 2001). Следовательно, при гепатите в условиях окислительного стресса антиоксидантная система не обеспечивает эффективную утилизацию АФК, образующихся в митохондриях, что в свою очередь может усугублять патологический процесс.

Данные, полученные при изучении продукции $O_2^{\bullet-}$ субмитохондриальными частицами позволяют заключить, что выработка $O_2^{\bullet-}$ дыхательной цепью митохондрий при токсическом гепатите значительно увеличена. Основным местом выработки $O_2^{\bullet-}$ является комплекс I, тогда как вклад комплекса III в продукцию $O_2^{\bullet-}$ при токсическом гепатите незначителен. Усиление продукции $O_2^{\bullet-}$, вероятно, можно рассматривать не только как составляющую патологического процесса, но также и как компенсаторный механизм, позволяющий митохондриям сохранить электрон-транспортную функцию дыхательной цепи в условиях частичной блокады комплекса I. Однако действие такого компенсаторного механизма недостаточно, что выражается в значительном снижении уровня АТФ в печени при токсическом гепатите.

ВЫВОДЫ

1. Скорость дыхания изолированных гепатоцитов и митохондрий при токсическом гепатите повышена. При этом степень сопряжения окисления и фосфорилирования в дыхательной цепи митохондрий остается высокой.
2. Продукция $O_2^{\bullet-}$ дыхательной цепью митохондрий гепатоцитов при токсическом гепатите повышена; основной вклад в эту продукцию вносит комплекс I дыхательной цепи вследствие частичного блокирования переноса электронов в этом комплексе.
3. Усиление продукции $O_2^{\bullet-}$ можно рассматривать не только в качестве основной составляющей патологического процесса, но также как компенсаторный механизм, позволяющий поддерживать электрон-

транспортную функцию дыхательной цепи митохондрий в условиях ее частичной блокады в комплексе I.

4. Активность антиоксидантной системы митохондрий гепатоцитов при токсическом гепатите снижена, что проявляется в уменьшении активностей Mn-SOD и глутатионпероксидазы.
5. Содержание АТФ в печени при токсическом гепатите снижено, что указывает на ослабление энергообразующей функции митохондрий гепатоцитов.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Оковитый С.В., Ярославцев М.Ю., Сакута Г.А., Литанюк (Ширяева) А.П., Шуленин С.Н., Кудрявцев Б.Н. 2004. Особенности действия симвастатина при экспериментальной гепатопатии у крыс. Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. Приложение гепатология, 5: 4-7.
2. Сакута Г.А., Байдюк Е.В., Литанюк (Ширяева) А.П., Морозов В.И., Оксман А.Я.. 2004. Исследование цитопротекторного действия глюкурала на изолированные гепатоциты крыс. Тезисы Междунар. Симпозиума «Стволовые клетки, регенерация, клеточная терапия» Цитология, 46(10): 938.
3. Litanyuk (Shiryayeva) A., Baydiuk E., Sakuta G., Okovityi S. 2004. Oxygen consumption of rats hepatocytes in cirrhotic liver. Abstracts of 8th International World Congress of Cell Biology. Nice, France. ELSO 2004 Proseedings.
4. Сакута Г.А., Байдюк Е.В., Литанюк (Ширяева) А.П., Морозов В.И., Оксман А.Я.. 2005. Глюкурал как цитопротектор. Исследование на изолированных гепатоцитах крысы Инф. Бюлл. «Клеточные культуры» СПб., 20: 58-63.
5. Литанюк (Ширяева) А.П. 2006. Активность дыхательной цепи митохондрий гепатоцитов крыс с экспериментальным стеатогепатитом. Тезисы докладов 10-й Пущинской школы-конференции молодых ученых. «Биология – наука XXI века». Пущино, стр.113.

6. **Ширяева А.П.**, Байдюк Е.В., Аркадьева А.В., Оковитый С.В., Морозов В.И., Сакута Г.А. 2007. Состояние дыхательной цепи митохондрий печени крыс с экспериментальным токсическим гепатитом. Цитология, 47(2):125-132. Англ. пер.: **Shiryayeva A.P.**, Baidyuk E.V., Arkadieva A.V., Okovityy S.V., Morozov V.I., Sakuta G.A.. 2007. State of liver mitochondrial respiratory chain in rats with experimental toxic hepatitis. Cell and Tissue Biology, 1(2): 169-177.

СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

Avasarala et al., 2006, Toxicology, 228: 310 – 322; Bailey et al., 2006, Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver. Physiol. 291(5): G857 – 867; Balkan et al., 2001, Hum. Exp. Toxicol. 20: 251 – 254; Barja, 1999, J. Bioenerg. Biomembr. 31(4): 347 – 366; Bota, Davies, 2002, Nat. Cell. Biol. 4: 674 – 680; Bottenus et al., 1982, Biochem. Biophys. Res. Commun. 105: 1368 – 1373; Boveris, Chance, 1973, Biochem. J. 134(3): 707 – 716; Cadenas et al., 1977, Arch. Biochem. Biophys. 180: 248 – 257; Cederbaum et al., 1974, Arch. Biochem. Biophys. 165: 560 – 569; Esrefoglu et al., 2007, Exp. Toxicol. Pathol. 58(5): 367 – 374; Fridovich, 1974, Eur J Biochem. 180(1):173 – 80; Gardner et al., 1995, J. Biol. Chem. 270: 13399 – 13405; Genova et al., 2001, FEBS Lett. 505(3): 364 – 368; Grivennikova, Vinogradov, 2006, Biochim. Biophys. Acta. 1757: 553 – 561; Harvey et al., 2000, J. Pharmacol. Exp. Therap. 293: 641 – 645; Herrero, Barja, 2000, J. Bioenerg. Biomembr. 32: 609 – 615; Hinkle et al., 1967, J. Biol. Chem. 242: 5169 – 5173; Hwang, Ismail-Beigi, 2003, Am. J. Physiol., 281: C1365 – C1372; Jikko et al., 1984, J. Surg. Res. 37: 361 – 368; Jonson, Lardy, 1969, Methods in Enzymology. N.-Y.: Acad. Press. 10: 94 – 96; Korshunov et al., 1999, FEBS Lett. 462: 192 – 198; Kotlyar et al., 1990, FEBS Lett. 264(1): 17 – 20; Kowaltowski, Vercesi, 1999, Free Radic. Biol. Med. 26: 463 – 71; Krähenbühl et al., 1989, Biochem. Pharmacol. 38: 1583 – 1588; Kushnareva et al., 2002, Biochem. J. 368: 545 – 553; Lenaz, 2001, IUBMB Life. 52: 159 – 164; Liu, 1997, Biosci. Rep. 17: 259 – 272; McLennan, Esposti, 2000, J. Bioenerg. Biomembr. 32: 153 – 162; Morimoto et al., 1988, Clin. Sci. 74: 485 – 489; Mossman, 1983, J. Immunol. Methods. 65: 55 – 63; Nicholls, Ferguson, 2002, Int. J. Biochem. Cell. Biol. 34(11): 1372 – 1381; Noyan et al., 2006, Cell Biol. Toxicol. 22(6): 381 – 391; Nozu et al., 1992, Hepatology. 15: 1099 – 1106; Ortega-Sáenz et al., 2003, J Physiol. 548(Pt 3): 789 – 800; Raja et al., 2007, J. Ethnopharmacol. 109(1): 41 – 47; Rubinstein et al., 2003, EMBO J. 22(23): 6182 – 6192; Trojanowski, 2003, Exp. Neurol. 179(1): 6 – 8; Turrens, 2003, J. Physiol. 552: 335 – 344; Turrens, Boveris, 1980, Biochem. J. 191: 421 – 427; Wang, Cederbaum, 2006, J. Pharmacol. Exp. Ther. 317(1): 44 – 52; Yang et al., 2004, Cell. Mol. Life Sci. 61: 220 – 229; Андреев и др., 2005, Биохимия. 70: 246 – 264; Гривенникова, Виноградов, 2003, Успехи биологической химии. 43: 19 – 57; Рябинин, 2002, Вестник трансплантологии и искусственных органов. 1: 42 – 49; Ширяева А.П. и др., 2007, Цитология. 47: 125 – 132.