

## Влияние антиоксидантов на каталитическую активность дыхательной цепи транспорта электронов митохондрий печени крыс при отравлении парацетамолом

И. С. Блажчук, В. Н. Коваленко, А. М. Шаяхметова, А. К. Воронина, И. В. Кузьменко<sup>1</sup>

Институт фармакологии и токсикологии АМН Украины  
Ул. Эжена Потье, 14, Киев, 03057, Украина

<sup>1</sup>Институт биохимии им. А. В. Палладина НАН Украины  
Ул. Леонтовича, 30, Киев, 01030, Украина

*Показано, что при остром отравлении крыс парацетамолом в митохондриях печени повышается уровень супероксидных анионов и гидроперекисей более чем в 2 раза по сравнению с интактными животными. Это сопровождается ингибированием каталитической активности как НАДН-, так и сукцинат-цитохром с-редуктазных комплексов цепи транспорта электронов почти на 35 %. Пероральное введение двух производных  $\alpha$ -токоферолацетата с различной длиной изопреноидной цепи способствует повышению антиоксидантного статуса митохондрий и восстановлению активности исследованных ферментных систем независимо от строения боковой цепи аналогов витамина Е.*

**Введение.** В основе патогенеза гибели клеток печени при передозировке парацетамола (ПА) лежит взаимодействие его высокореактивного метаболита N-ацетилбензохинонимина с цистеином мембранных белков эндоплазматического ретикулума, митохондрий и ядра [1, 2]. В некоторых работах постулируется теория ковалентного связывания метаболита парацетамола с макромолекулами клеток [2, 3], а в исследованиях более позднего времени появилось достаточно данных в пользу новых версий механизмов цитотоксического действия этого электрофильного соединения. Оказалось, что помимо реакций арилирования N-ацетилбензохинонимин способен осуществлять обратимое окисление тиоловых групп белков, в том числе ряда ключевых ферментов метаболизма, контролирующих уровень цитозольного  $Ca^{2+}$  [4, 5], окислительно-

восстановительных ферментов митохондриального дыхания [5, 6] и др., вызывая их инактивацию [7, 8]. В опытах *in vitro* на изолированных гепатоцитах мышей [9], а также на культуре гепатоцитов крыс [10] показано, что прооксидантное действие этого метаболита сопровождается инициацией процессов свободнорадикального окисления и образования активных форм кислорода [11], дополнительно взаимодействующих с биомолекулами, включая ДНК, что приводит к их повреждению [12].

Показано, что нарушение структурно-функциональных свойств митохондрий является наиболее ранним проявлением интоксикации ПА [6, 8].

Целью настоящей работы явилось изучение *in vitro* влияния антиоксидантов на ферментативную активность основных комплексов цепи транспорта электронов и состояния процессов перекисного окисления липидов в митохондриях печени крыс в условиях острого отравления ПА.

Материалы и методы. Исследования проводи-

© И. С. БЛАЖЧУК, В. Н. КОВАЛЕНКО, А. М. ШАЯХМЕТОВА, А. К. ВОРОНИНА, И. В. КУЗЬМЕНКО, 1999

ли на белых крысах-самцах массой тела 160—170 г, которые были разделены на четыре группы не менее чем по 6—10 животных в каждой. Крысы содержались в условиях вивария на стандартном рационе при свободном доступе к воде. ПА вводили перорально зондом на протяжении 2 сут в дозе 1250 мг/кг массы тела, что составляет 1/2  $DL_{50}$  в 2 %-м крахмальном геле. Антиоксиданты  $\alpha$ -токоферолацетат и его короткоцепочечный аналог вводили опытным группам крыс перорально в оливковом масле в эквимолярных дозах 15 и 10 мг/кг массы тела в сутки соответственно. Производные витамина Е вводили зондом в течение 3 сут ежедневно в лечебно-профилактическом режиме: за 24 ч до введения ПА, в виде двух половинных доз за 1 ч до и через 2 ч после введения ПА в течение 2 сут. Используемые терапевтические дозы  $\alpha$ -токоферола превышают физиологическую потребность самцов крыс в витамине Е (3,5 мг/кг) [13] в четыре раза исходя из рекомендаций, согласно которым фармакотерапевтическая доза не должна превышать физиологическую в 2—4 раза [14].

Через 24 ч после последнего введения парацетамола и последующей легкой анестезии эфиром животных умерщвляли методом цервикальной дислокации, печень перфузировали 1 %-м раствором KCl и гомогенизировали в 0,05 М трис-HCl буфере, рН 7,4. Митохондриальную фракцию получали согласно общепринятому методу дифференциального центрифугирования [15]. Все процедуры выполняли при температуре 4 °С.

Сукцинат-цитохром *c*-редуктазную [16] и НАДН-цитохром *c*-редуктазную активность [17] митохондрий печени определяли спектрофотометрически при длине волны 550 нм, регистрируя увеличение оптической плотности восстановленного цитохрома *c*. Активность ферментов рассчитыва-

ли в нмолях окисленного субстрата за 1 мин на 1 мг белка митохондрий с использованием коэффициента молярной экстинкции  $18,5 \text{ мМ}^{-1} \text{ см}^{-1}$ .

Активность свободнорадикальных процессов в митохондриях определяли по образованию супероксиданиона согласно [18], содержание гидроперекисей липидов в митохондриальной фракции измеряли, как указано в работе Романовой и Стальной [19]. Скорость образования продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (ТБК), после индукции процессов ПОЛ аскорбиновой кислотой определяли по [20].

Белок определяли по методу Лоури [21].

Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение. Нами показано, что развитие острого отравления крыс ПА сопровождается снижением НАДН-цитохром *c*-редуктазной активности митохондрий печени крыс на 33,8 % по сравнению с интактными животными (табл. 1). Полученные данные совпадают с результатами опытов *in vitro*, в которых также наблюдалось снижение активностей НАДН-дегидрогеназы и сукцинатдегидрогеназы после введения ПА в культуру гепатоцитов мышей [22].  $\alpha$ -Токоферолацетат и его короткоцепочечный аналог, введенные в лечебно-профилактическом режиме, повышали активность исследуемого ферментного комплекса почти на 30 % по сравнению с нелечеными животными, что свидетельствует о корригирующем влиянии исследуемых производных  $\alpha$ -токоферола в отношении НАД-зависимого участка цепи транспорта электронов митохондрий.

Исследование сукцинат-цитохром *c*-редуктазной активности митохондрий в условиях острого отравления ПА выявило снижение активности дан-

Таблица 1  
НАДН- и сукцинат-цитохром *c*-редуктазная активности митохондрий печени крыс в условиях отравления парацетамолом и после лечебно-профилактического введения  $\alpha$ -токоферолацетата (ТА) и его короткоцепочечного производного (ТАК) (нмоль  $\cdot$  мин<sup>-1</sup>  $\cdot$  мг<sup>-1</sup> белка;  $M \pm m$ ,  $n \geq 6$ )

Группа животных	НАДН-цитохром <i>c</i> -редуктазная система	Сукцинат-цитохром <i>c</i> -редуктазная система
Интактные	552,33 ± 34,17**	28,04 ± 2,05**
Парацетамол	365,69 ± 21,27*	17,83 ± 1,41*
Парацетамол + ТА	464,26 ± 35,54**	21,47 ± 2,32
Парацетамол + ТАК	479,36 ± 33,28**	20,46 ± 1,83**

Примечание. Здесь и в табл. 2 \* $p < 0,05$  — отличия, достоверные по сравнению с интактными животными; \*\* $p < 0,05$  — отличия, достоверные по сравнению с нелечеными животными

ного комплекса на 36,4 % по сравнению с нормой (табл. 1). Ингибирующее действие ПА может быть обусловлено как ковалентным связыванием его метаболита с SH-группами сукцинат-зависимого ферментного комплекса [23], так и с его способностью к инициации реакций свободнорадикального окисления [24]. Аналогичные результаты получены нами ранее при исследовании влияния  $CCl_4$  и тетрациклина на активность данного ферментного комплекса в условиях острого отравления [25]. Введение производных витамина Е способствовало повышению ферментативной активности сукцинат-зависимого дыхания митохондрий (табл. 1) почти на 25 % по сравнению с контрольными животными. Таким образом, в условиях острого отравления крыс ПА пероральное введение исследуемых антиоксидантов независимо от длины их изопреноидной цепи нормализует активность I—III и II—III комплексов цепи транспорта электронов митохондрий печени.

Учитывая предположение, что одним из механизмов цитотоксичности ПА на молекулярном уровне является активация свободнорадикального окисления [26], нами изучено влияние данной патологии на некоторые показатели процессов перекисного окисления липидов. Как следует из результатов, представленных в табл. 2, в мембранах митохондрий крыс, отравленных ПА, наблюдается повышение уровня образования супероксидного аниона в 2,5 раза по сравнению с нормой. Это подтверждают данные, согласно которым биотрансформация ПА *in vivo* сопровождается образованием супероксидного аниона [26]. Применение антиоксидантов, особенно короткоцепочечного аналога  $\alpha$ -токоферолаацетата, снижало данный показатель практически до уровня интактных животных. По-

следнее является подтверждением того, что в реализации антиоксидантной активности токоферолов ведущая роль принадлежит структуре хроманового цикла [27], а не фитильной цепи.

Исследование гидроперекисей липидов в митохондриях крыс в условиях передозировки ПА (табл. 2) свидетельствует о повышении их уровня в 2,3 раза по сравнению с интактными животными. Введение крысам витамина Е и его аналога позволило существенно снизить этот показатель, что указывает на выраженную антиокислительную активность производного витамина Е с укороченной боковой цепью и его высокую эффективность в отношении регуляции процессов перекисного окисления липидов в митохондриальных мембранах.

Несмотря на выявленные нами изменения в содержании гидроперекисей, изучение скорости аскорбатзависимого образования в митохондриальной фракции вторичных продуктов перекисного окисления липидов, реагирующих с ТБК, не выявило достоверных различий между экспериментальными группами. Очевидно, это можно объяснить вовлечением доли перекисных соединений в процессы тканевого дыхания [28], что подтверждают данные литературы о реализации в митохондриях двух механизмов утилизации первичных продуктов окисления липидов, один из которых включает дальнейшие стадии ПОЛ, а другой обеспечивает энергетические реакции митохондрий за счет использования перекисных соединений в качестве субстратов дыхания [29].

На основании полученных данных можно сделать вывод о том, что в условиях острого отравления ПА происходит ингибирование активности НАД- и сукцинат-зависимых путей окисления субстратов в дыхательной цепи митохондрий клеток

Таблица 2  
Показатели перекисного окисления липидов в митохондриях печени крыс, отравленных парацетамолом, и после лечебно-профилактического введения  $\alpha$ -токоферолаацетата (ТА) и его короткоцепочечного производного (ТАК) ( $M \pm m$ ,  $n > 6$ )

Показатель	Экспериментальные группы			
	Интактные	Парацетамол	Парацетамол + ТА	Парацетамол + ТАК
Уровень супероксид-аниона, нмоль ДХФ <sup>-</sup> ·мин <sup>-1</sup> ·мг <sup>-1</sup> белка	1,038±0,126**	2,630±0,126*	2,03±0,036***	1,250±0,320**
Гидроперекиси, %	100,0±0,0**	229,7±16,7*	99,25±0,51**	94±0,25**
Скорость накопления ТБК-реагирующих продуктов, мкмоль·мин <sup>-1</sup> ·мг <sup>-1</sup> белка	1,996±0,164	2,016±0,257	1,826±0,586	1,803±0,422

печени крыс. Это может быть как результатом взаимодействия высокореактивных метаболитов ПА с их структурными компонентами, так и следствием дестабилизирующего действия продуктов свободнорадикального окисления на структуру и функционирование митохондрий печени. Введение антиоксидантов —  $\alpha$ -токоферолацетата и его короткоцепочечного производного — нормализует функционирование изучаемых систем, очевидно, как за счет мембраностабилизирующих свойств, так и высокой антиокислительной и антирадикальной активности. Причем производное витамина Е с укороченной боковой цепью не уступает, а в отдельных случаях и превосходит фармакопейный прототип, что позволяет сделать вывод о его перспективности в качестве эффективного препарата, способствующего нормализации в клетках процессов биоэнергетики в условиях токсического воздействия ксенобиотиков.

I. С. Блажчук, В. Н. Коваленко, А. М. Шаяхметова,  
А. К. Воронина, I. В. Кузьменко

Вплив антиоксидантів на каталітичну активність дихального ланцюга транспорту електронів митохондрий печінки щурів при отруєнні парацетамолом

#### Резюме

Показано, що при гострому отруєнні щурів парацетамолом у митохондріях печінки зростає рівень супероксидних аніонів та гідроперексидів більше ніж у 2 рази порівняно з інтактними тваринами. Це супроводжується пригніченням каталітичної активності як НАДН-, так і сукцинат-цитохром с-редуктазних комплексів ланцюга транспорту електронів майже на 35%. Пероральне введення двох похідних  $\alpha$ -токоферолацетату з різною довжиною ізопреноїдного ланцюга сприяє підвищенню антиоксидантного статусу митохондрий та відновленню активності досліджуваних ферментних систем незалежно від будови бокового ланцюга аналогів вітаміну Е.

I. S. Blazhchuk, V. N. Kovalenko, A. M. Shayakhmetova,  
A. K. Voronina, I. V. Kuzmenko

Influence of antioxidants on catalytic activity of the respiratory chain of mitochondria electronic transport in rat liver at paracetamol intoxication

#### Summary

Over 2-fold increase in superoxide anion and hydroperoxide level was revealed in rat liver mitochondria at acute paracetamol intoxication. It is accompanied with about 35% decrease in both NAD- and succinate-cytochrome c oxidoreductase activities. Peroral administration of two  $\alpha$ -tocopherol acetate derivatives with different length of a isoprenoid chain promotes an increase in antioxidant status of mitochondria and reduction of the activity of the enzyme systems independently on the structure of the side chain of vitamin E analogs.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Hinson J. A., Pumford N. R., Roberts D. W. Mechanism of acetaminophen toxicity: Immunochemical detection of drug-

- protein adducts // Drug. Metab. Rev.—1995.—27.—P. 72—92.
- Manautou J. E., Chen C., McCann D. J. In vivo covalent binding of acetaminophen to canalicular and basolateral membrane proteins in mouse liver // Toxicol. Lett.—1998.—95.—P. 161.
- Miners D. J., Kissinger P. T. Evidence for the involvement of N-acetylbenzoquinoneimine in acetaminophen toxicity // Biochem. Pharmacol.—1979.—28.—P. 3285—3291.
- Moor M., Thor H., Moor G., Nelson S., Moldeus P., Orrenius S. The toxicity of acetaminophen and N-acetylbenzoquinoneimine in isolated hepatocytes is associated with thiol depletion and increased cytosolic  $Ca^{2+}$  // J. Biol. Chem.—1985.—260.—P. 13035—13040.
- Le-Quoc K., Le-Quoc P. Control of the mitochondrial inner membrane permeability by sulfhydryl groups // Arch. Biochem. and Biophys.—1982.—216, N 2.—P. 639—651.
- Burcham P. C., Harman A. W. Effect of acetaminophen hepatotoxicity on hepatic mitochondrial and microsomal calcium contents in mice // Toxicol. Lett.—1998.—44.—P. 91—99.
- Корнеев А. А., Комиссарова И. А. Молекулярные механизмы формирования адаптивных реакций дыхательной цепи // Успехи соврем. биологии.—1994.—114, № 4.—С. 467—474.
- Мануйлов В. Г., Иванова В. Ф., Пузырев А. А. Структурный гомеостаз некоторых органов при действии антропогенных факторов // Гигиена и санитария.—1994.—№ 1.—С. 30—32.
- Adamson G. M., Harman A. W. A role of the glutathion peroxidase/reductase enzyme system in the protection from paracetamol toxicity in isolated mouse hepatocytes // Biochem. Pharmacol.—1989.—38.—P. 3323—3330.
- Kyle M. E., Miccadei S., Nakae D., Farber J. L. Superoxide dismutase and catalase protect cultured hepatocytes from the cytotoxicity of acetaminophen // Biochem. and Biophys. Res. Commun.—1989.—149.—P. 889—896.
- Harman A. W., Adamson G. M., Shaw S. G. Protection from oxidative damage in mouse liver cells // Toxicol. Lett.—1992.—64/65.—P. 581—587.
- Farber J. L., Kyle M. E., Coleman J. B. Diology of disease: mechanisms of cell injury by activated oxygen species // Lab. Invest.—1990.—62.—P. 670—679.
- Труфанов А. В. Биохимия витаминов и антивитаминов.—М.: Колос, 1972.—328 с.
- Хашимова М. Р., Имамова Е. А. Некоторые показатели метаболизма печени при действии различных доз витамина Е // Здравоохранение Таджикистана.—1989.—№ 4.—С. 92—94.
- Schneider V. C. Intracellular distribution of enzymes. III. The oxidation of octanoic acid by rat liver fraction // J. Biol. Chem.—1948.—176.—P. 259—262.
- Howard D. T. Preparation and properties of succinic-cytochrome c reductase (complex II—III) // Meth. Enzymol.—1967.—10.—P. 213—215.
- Hatefi J., Rieske J. S. The preparation and properties of DPNH-cytochrome c reductase (complex I—III of respiratory chain) // Meth. Enzymol.—1967.—10.—P. 225—231.
- Babior B. M., Kinner R. S., Create J. F. Biological defense mechanism. The production of leukocytes of superoxide, a potential bactericidal agent // J. Clin. Invest.—1973.—52.—P. 741—744.
- Романова Л. А., Стальная И. Д. Метод определения гидроперексидов липидов с помощью тиоцианата аммония // Соврем. методы в биологии / Под ред. В. Н. Ореховича.—М., 1977.—С. 64—66.

20. *Стальная И. Д., Гаришвили Т. Г.* Метод определения малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты // *Соврем. методы в биологии* / Под ред. В. Н. Ореховича.—М., 1977.—С. 44—46.
21. *Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Raudall R. J.* Protein measurement with the Folin phenol reagent // *J. Biol. Chem.*—1951.—193.—Р. 265—275.
22. *Burcham P. C., Harman A. W.* Acetaminophen toxicity results in site-specific mitochondrial damage in isolated mouse hepatocytes // *J. Biol. Chem.*—1991.—266, N 8.—Р. 5049—5054.
23. *Торчинский Ю. М.* Сера в белках.—М.: Наука, 1977.—302 с.
24. *Венгеровский А. И., Саратиков А. С.* Механизмы гепатотоксичности парацетамола // *Фармакология и токсикология.*—1991.—54, № 1.—С. 76—80.
25. *Коваленко В. Н., Блажчук И. С., Шаяхметова А. М., Кузьменко И. В.* Коррекция производным  $\alpha$ -токоферлацетата активности некоторых ферментов цепи транспорта электронов митохондрий печени крыс при токсических поражениях печени // *Укр. біохім. журн.*—1999.—№ 4.—С. 30—34.
26. *Thomsen M. C.* Oxidative metabolism of acetaminophen (paracetamol) to a reactive species: Involved cytochrome P 450 enzymes and target toxicity related to covalent binding // *Ugeskr. Leager.*—1996.—158, N 28.—Р. 4095—4096.
27. *Поскрипко Ю. А.* Антирадикальна та антиокислювальна активність структурно модифікованих аналогів  $\alpha$ -токоферолу // *Ліки.*—1998.—№ 2.—С. 76—80.
28. *Маноїлов С. Е., Седых Н. В.* К вопросу о механизме окисления сукцината в печени белых крыс // *Бюл. экперим. биологии и медицины.*—1996.—№ 5.—С. 524—525.
29. *Семенова В. Л., Ярош А. М.* Влияние гипоксии на окислительное фосфорилирование и перекисное окисление липидов митохондрий печени крыс при воспалении легких // *Укр. біохім. журн.*—1991.—63, № 2.—С. 95—101.

УДК 615.9:616.36-099:576.24:577.161.3  
Поступила в редакцию 24.02.99