

УДК 615.099.08+612.354  
©Коллектив авторов

## ГЕПАТОТОКСИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ АЦЕТАМИНОФЕНА. ПРОТЕКТОРНЫЕ СВОЙСТВА ПРОИЗВОДНЫХ ТРИПТОФАНА

*И.К. Дремза<sup>1\*</sup>, В.Т. Чещевик<sup>1,2</sup>, С.В. Забродская<sup>1</sup>, Ю.З. Максимчик<sup>1</sup>,  
Е.Ю. Судникович<sup>1</sup>, Е.А. Лапина<sup>1</sup>, И.Б. Заводник<sup>1,2</sup>*

<sup>1</sup>Научно-производственный центр “Институт фармакологии и биохимии НАН Беларуси”, Бульвар Ленинского Комсомола – 50, 230017 Гродно, Беларусь; тел.: +375 152 437935; факс: +375 152 434121; эл. почта: idremza@rambler.ru

<sup>2</sup>Гродненский государственный университет имени Янки Купалы, Гродно, Беларусь

При интоксикации крыс ацетаминофеном (АРАР) (500-1500 мг/кг, внутривенно) наблюдали значительное дозозависимое снижение уровня цитоплазматического и внутримитохондриального восстановленного глутатиона (GSH) в ткани печени (при дозе 1500 мг/кг на 60% и 33%, соответственно). В большей степени истощался цитоплазматический GSH по сравнению с митохондриальным. Одновременно, нами не было обнаружено существенной инактивации митохондриальных ферментов: сукцинатдегидрогеназы,  $\alpha$ -кетоглутаратдегидрогеназы, глутатионпероксидазы, а также снижения дыхательной активности митохондрий печени крыс, подвергшихся интоксикации АРАР, несмотря на значительное истощение митохондриального GSH. Мы исследовали при АРАР-индуцируемой интоксикации гепатопротекторные свойства производных триптофана – мелатонина и N-ацетил-N-нитрозотриптофана (NNT) – донора оксида азота. Известный антиоксидант – гормон эпифиза мелатонин (10 мг/кг), существенно не предохраняя внутримитохондриальный GSH, уменьшал степень токсического поражения печени, о чем свидетельствовало снижение активности маркерных ферментов повреждения клеток печени (АлТ, АсТ) и содержания общего билирубина в плазме крови интоксигированных крыс, в то время как NNT не оказывал гепатопротекторного действия.

**Ключевые слова:** ацетаминофен, мелатонин, тканевое дыхание, окислительный стресс, гепатотоксичность, гепатопротекторы.

**ВВЕДЕНИЕ.** Ацетаминофен (парацетамол, АРАР), широко используемый в качестве анальгетического и пиральгетического средства, вызывает существенные повреждения центральнолобулярных областей печени при передозировке [1]. Одновременно, АРАР широко используется как модельный токсин для выяснения механизмов гепатотоксичности и поиска новых гепатопротекторов. До настоящего времени наиболее эффективным клиническим средством предотвращения гепатотоксичности АРАР остается N-ацетилцистеин [2].

Механизмы гепатотоксичности АРАР широко исследуются, активно разрабатываются способы предотвращения и коррекции повреждений печени АРАР. Известно, что значительная часть препарата подвергается конъюгированию с глюкуроновой кислотой или сульфатом и экскретируется из организма, в то же время часть АРАР метаболизируется системой цитохрома Р450 печени [3]. В результате образуется высокореакционное производное N-ацетил-*n*-бензохинонимин, быстро реагирующий с восстановленным глутатионом (GSH). [3]. Метаболизм АРАР приводит к истощению GSH в печени [4]. Реакционный метаболит АРАР также ковалентно модифицирует (арилирует) клеточные белки [5]. Развивающийся окислительный стресс, активные формы

\* - адресат для переписки

## ГЕПАТОТОКСИЧНОСТЬ АЦЕТАМИНОФЕНА И ТРИПТОФАНОВЫЕ ГЕПАТОПРОТЕКТОРЫ

кислорода и азота, как предполагают, также участвуют в повреждении и гибели гепатоцитов. Так доказано, что пероксинитрит выступает в роли активного медиатора АРАР-индуцируемого некроза гепатоцитов [6]. В то же время молекулярные механизмы гибели клетки, инициируемые истощением глутатиона в результате метаболических превращений АРАР, остаются невыясненными [2]. Знание последовательности событий от модификации мишеней до некротической гибели клетки позволит лучше представлять общие закономерности гепатотоксичности и способы её коррекции. Ранее было продемонстрировано, что нарушение в митохондриях клеток печени реакции фосфорилирования и, соответственно, энергетического гомеостаза клетки связаны непосредственно с АРАР-индуцируемой гепатотоксичностью [7]. Экспонирование изолированных гепатоцитов мыши токсическим концентрациям АРАР (5 мМ) приводит к специфическому повреждению комплексов I и II митохондрий при одновременном уменьшении уровня ADP как в цитоплазме, так и в митохондриях клеток [7].

Цель настоящей работы – дальнейшее исследование механизмов гепатотоксичности АРАР у крыс и поиск возможных гепатопротекторов, сравнение патобиохимических процессов, развивающихся в цитоплазме и митохондриях клеток печени при введении больших доз АРАР, выяснение возможности использования в качестве гепатопротекторов производных триптофана: мелатонина (Mel) и N-ацетил-N-нитрозотриптофана (NNT).

**МЕТОДИКА.** Эксперименты выполнены на 40 крысах-самцах линии Wistar массой 200–250 г. Животные были адаптированы в течение недели к 12-часовому циклу смены световой (с 8 ч) и темновой (с 20 ч) фаз суток и разбиты на 5 групп: “контроль”, “АРАР”, “АРАР+NNT”, “АРАР+Mel”, “NNT”. В 9 час утра животным в группах “АРАР”, “АРАР+NNT”, “АРАР+Mel” вводили ацетаминофен в виде 1% суспензии крахмала в дозе 1500 мг/кг массы тела, внутривентрикулярно (в/ж), животным в группах “контроль” и “NNT” вводили 1% суспензию крахмала (в/ж). Через 4 и 6 часов животным в группах “АРАР+NNT” и “NNT” вводили раствор NNT (2 мг/кг), внутривентрикулярно (в/б), животным в группе “АРАР+Mel” вводили мелатонин (10 мг/кг, в/б), животным в группах “контроль” и “АРАР” вводили 0,9% раствор NaCl (в тех же объемах, что и растворы NNT и мелатонина, в/б). Мелатонин (8,6 мг) непосредственно перед введением растворяли в 150 мкл этанола, затем доводили объем до 2 мл раствором 0,9% NaCl, NNT (1,86 мг) растворяли в 90 мкл этанола и доводили объем до 2 мл раствором 0,9% NaCl. Через 24 часа после введения ацетаминофена животных декапитировали и брали образцы крови и тканей.

*В работе использовали:* N-ацетил-5-метокситриптамин (мелатонин), сукцинат (калиевая соль), L-глутамат (натриевая соль), ADP (динатриевая соль), сахароза,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , KCl,  $\text{MgSO}_4$ , NaCl,  $\text{NaNO}_2$ , этилендиамин-тетраацетат (ЭДТА), Трис-HCl, 5,5'-дитиобис-(2-нитробензойная кислота) (реактив Элмана), этилацетат, трихлоруксусная кислота (ТХУ), N-ацетил-D,L-триптофан (“Sigma-Aldrich”, США или “Steinheim”, Германия), АРАР – препарат Panadol (парацетамол, “GlaxoSmithKlain”).

*Синтез N-ацетил-N-нитрозотриптофана.* N-ацетил-D,L-триптофан (526 мг) и нитрат натрия (162 мг) смешивали в пробирке с 20 мл бидистиллированной воды в течение двух часов, в темноте, при комнатной температуре. Полученную реакционную смесь желтого цвета охлаждали до 1°C и прибавляли к ней 10 мл 1 М соляной кислоты, охлажденной до такой же температуры. Образовавшийся осадок желтого цвета экстрагировали этилацетатом (60 мл, 1°C), затем органический слой отделяли, а оставшийся раствор выпаривали при комнатной температуре в вакууме и получали около 500 мг N-ацетил-N-нитрозо-D,L-триптофана. Степень чистоты препарата контролировали методами тонкослойной хроматографии и спектрофотометрии ( $\epsilon_{335}=6 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ).

*Выделение митохондрий и регистрация их дыхательной активности.* После декапитации животных брали образцы крови, неперфузированную

печень извлекали на холоду (0-4°C), осушали фильтровальной бумагой, взвешивали и гомогенизировали в среде выделения, содержащей 0,25 М сахарозу, 0,02 М Трис-НСl и 0,001 М ЭДТА, рН 7,2, при 4°C. Для выделения митохондрий использовали метод дифференциального центрифугирования [8]. Ядерную фракцию клеток печени удаляли центрифугированием при 600 g в течение 10 мин. Для осаждения митохондрий полученный супернатант центрифугировали при 8500 g в течение 10 мин при 4°C, далее митохондриальный осадок дважды промывали в среде выделения и ресуспендировали таким образом, чтобы концентрация белка, определяемая нами по методу Лоури [9], составила 35-40 мг/мл.

Скорость митохондриального дыхания регистрировали полярографически [10], используя изготовленный в лаборатории электрод типа Кларка, встроенный в термостатируемую герметическую ячейку объемом 1,15 мл при 26,5°C. Полярографический электрод калибровали, продувая ячейку воздухом (рO<sub>2</sub> воздуха) и газообразным азотом (рO<sub>2</sub> = 0 мм рт. ст.). Суспензию митохондрий (1 мг белка/мл) вносили в ячейку со средой инкубации (0,125 М сахароза, 0,02 М Трис-НСl, 0,05 М КСl, 0,02 М КН<sub>2</sub>РO<sub>4</sub>, 0,005 М MgSO<sub>4</sub>, 0,001 М ЭДТА, рН 7,5), затем вводили субстраты дыхания (сукцинат – 5 мМ, L-глутамат - 4 мМ) и ADP (180 мкМ). Рассчитывали скорость дыхания митохондрий в различных метаболических состояниях: V<sub>1</sub> – скорость эндогенного (базального) дыхания, V<sub>2</sub> – скорость субстрат-зависимого дыхания, V<sub>3</sub> – скорость дыхания, сопряжённого с фосфорилированием (после внесения ADP), V<sub>4</sub> – скорость дыхания после расходования внесённого ADP. Определяли показатели, характеризующие сопряжение процессов окисления и фосфорилирования в митохондриях: коэффициент акцепторного контроля (АК=V<sub>3</sub>/V<sub>2</sub>), коэффициент дыхательного контроля (ДК=V<sub>3</sub>/V<sub>4</sub>) и коэффициент фосфорилирования АДФ/О. Скорости дыхания митохондрий в различных метаболических состояниях выражали в нанограммах-атомах кислорода потребляемого за 1 мин в расчете на 1 мг белка митохондрий.

*Исследование биохимических показателей.* Содержание восстановленного глутатиона (GSH) и белковых сульфгидрильных групп (PSH) определяли в суспензии изолированных митохондрий и постмитохондриальной фракции гепатоцитов по методу Элмана [11], используя коэффициент молярной экстинкции  $\epsilon_{412} = 13600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ . К 0,1 мл суспензии митохондрий добавляли 0,1 мл 25% ТХУ и подвергали 3-м циклам замораживания-оттаивания. Затем центрифугировали при 6000 g в течение 3 мин и к 0,15 мл полученного супернатанта прибавляли 1,2 мл 0,5 М фосфатного буфера (рН 7,8) и 50 мкл раствора реактива Элмана (5 мМ). Осадок использовали для определения содержания смешанных дисульфидов глутатиона с белками (PSSG) по методу, описанному Rossi с соавт. [12]. При определении концентрации GSH в постмитохондриальном супернатанте исключали процедуру замораживания-оттаивания.

Для измерения активности глутатионпероксидазы 0,1 мл суспензии митохондрий ресуспендировали в 0,1 мл H<sub>2</sub>O и разрушали, подвергая 3-м циклам замораживания-оттаивания [13], затем разбавляли 10-кратным объёмом изотонического фосфатного буфера (150 мМ NaCl, 10 мМ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, рН 7,4). 20 мкл полученного образца использовали для определения активности фермента по методу Martinez с соавт. [14]. Активность каталазы определяли по методу Aebi H. [15]. В кювету вносили 1,0 мл 54 мМ перекиси водорода (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) и 2,0 мл 50 мМ фосфатного буфера (рН=7,8). В опытную пробу добавляли 50 мкл исследуемого образца и в течение 1 минуты регистрировали изменение оптической плотности при 240 нм (t=24°C). Активность фермента выражали в микромолях разрушенной H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/мин/мг белка. Использовали коэффициент молярной экстинкции H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, равный 36 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>.

Активность сукцинатдегидрогеназы в митохондриях определяли по скорости восстановления 2,6-дихлорфенолиндофенола, а активность  $\alpha$ -кетоглутаратдегидрогеназы - по скорости восстановления NAD<sup>+</sup> [16].

## ГЕПАТОТОКСИЧНОСТЬ АЦЕТАМИНОФЕНА И ТРИПТОФАНОВЫЕ ГЕПАТОПРОТЕКТОРЫ

Активность маркерных ферментов повреждения гепатоцитов аланинаминотрансферазы (АлТ) и аспартатаминотрансферазы (АсТ), а также уровень общего билирубина в плазме крови оценивали, используя наборы реактивов ("Pliva-Lachema a.s.", Чехия).

**Статистический анализ.** Полученные значения регистрируемых параметров в группах соответствовали закону нормального распределения вариационного ряда и были проанализированы параметрическими методами вариационной статистики с применением t-критерия Стьюдента. Результаты представлены как среднее значение 8-10 измерений  $\pm$  стандартное отклонение.

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.** Интоксикация крыс АРАР приводила к дозозависимому истощению GSH в цитоплазме клеток печени (рис. 1), доза 1500 мг/кг массы тела животного уменьшала его содержание на 60% ( $p < 0,05$ ); одновременно, мы обнаружили выраженное уменьшение содержания GSH в митохондриях клеток печени, однако, не столь значимое, как в цитоплазме. При той же дозе 1500 мг/кг уменьшение содержания GSH составило 33% ( $p < 0,05$ ). Следует отметить значительные различия в концентрации GSH в цитоплазме и митохондриях, уровень GSH в которых, согласно нашим измерениям, составляет 12-15% от уровня в цитоплазме. Известно, что восстановленный глутатион синтезируется в цитоплазме клеток печени и часть его транспортируется в митохондриальный матрикс, где играет определяющую роль в защите от электрофильного и окислительного стресса [17, 18]. Контролируя генерацию свободных радикалов электронтранспортной цепью митохондрий, GSH определяет развитие патологических процессов и гибель клеток, индуцируемую интоксикацией [17]. Истощение глутатиона в митохондриях может быть следствием нарушения его транспорта из цитоплазмы в митохондрии при интоксикации [19].

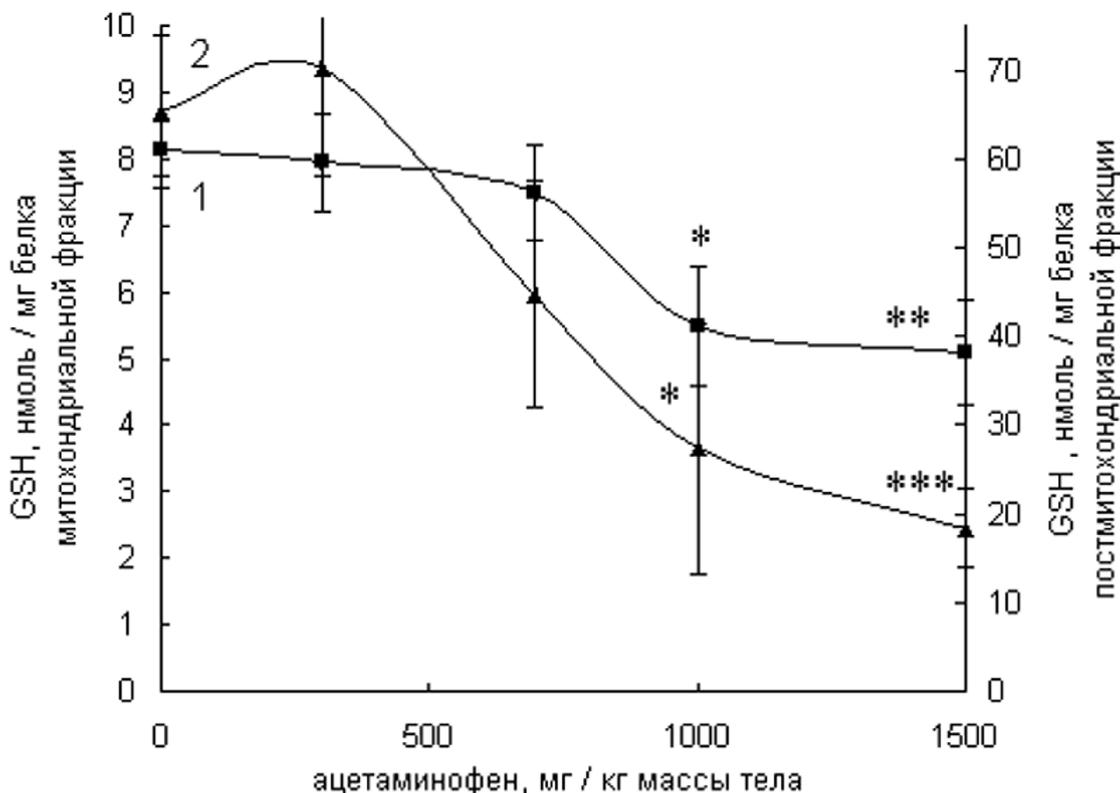


Рисунок 1.

Токсическое поражение печени крыс ацетаминофеном: зависимость содержания восстановленного глутатиона в митохондриях (1) и постмитохондриальной фракции (2) клеток печени от дозы вводимого препарата (\*-, \*\*-, \*\*\* - статистически достоверно по отношению к контролю;  $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$ ,  $p < 0,001$ , соответственно).

Рисунок 2 демонстрирует выраженный гепатотоксический эффект APAP, который мы наблюдали только при дозах препарата 1000-1500 мг/кг массы тела животного. Активность ферментов-маркеров повреждения клеток печени и уровень общего билирубина в плазме крови крыс при интоксикации APAP (1500 мг/кг массы тела) возрастали в 3,7 ( $p < 0,001$ ) в случае АлТ, в 1,9 раза ( $p < 0,05$ ) в случае АсТ и в 1,5 раза ( $p < 0,05$ ) в случае общего билирубина. Ранее Reid и соавторы [20] постулировали ключевую роль развивающегося окислительного стресса, рассеяния мембранного потенциала митохондрий и перехода, связанного с резким ростом проницаемости внутренней мембраны митохондрий (mitochondrial permeability transition, MPT) в гепатотоксичности ацетаминофена.

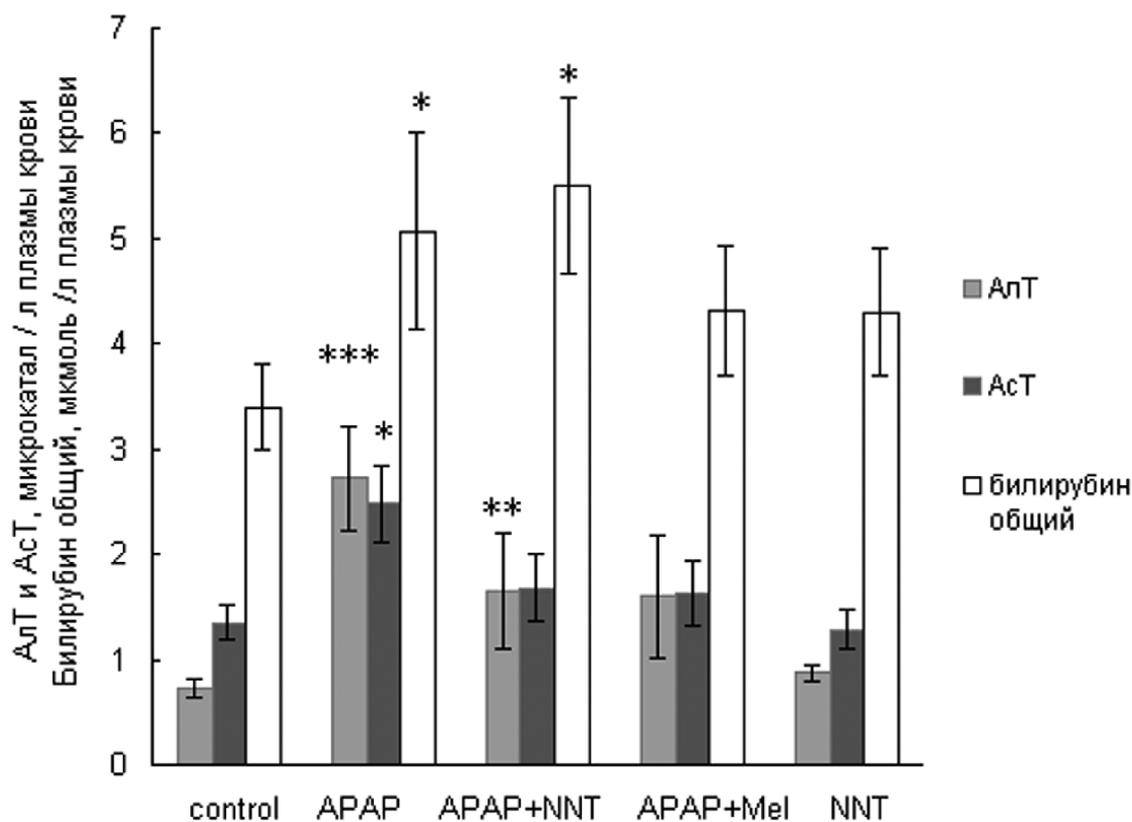


Рисунок 2.

Острая интоксикация крыс APAP (1500 мг/кг в 1% крахмальной суспензии), протекторный эффект производных триптофана (двукратное внутрибрюшинное введение NNT - 2 мг/кг и мелатонина - 10 мг/кг): активность аспаратаминотрансферазы, активность аланинаминотрансферазы и уровень общего билирубина в плазме крови крыс (\*-, \*\*-, \*\*\* - статистически достоверно по отношению к контролю;  $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$ ,  $p < 0,001$ , соответственно).

В то же время нами не обнаружено существенного повреждения электронтранспортной цепи митохондрий печени крыс при интоксикации APAP (табл. 1). Несмотря на продемонстрированное ранее специфическое ингибирование сукцинатдегидрогеназы митохондрий (комплекс II дыхательной цепи) изолированных гепатоцитов мыши в присутствии 50 мкМ N-ацетил-n-бензохинонимина, продукта метаболизма APAP [7], мы не обнаружили снижения активности данного фермента в митохондриях печени крыс при

## ГЕПАТОТОКСИЧНОСТЬ АЦЕТАМИНОФЕНА И ТРИПТОФАНОВЫЕ ГЕПАТОПРОТЕКТОРЫ

интоксикации АРАР вплоть до дозы 1500 мг/кг массы тела животного (табл. 1). Мы также не наблюдали ингибирования одного из ключевых ферментов цикла Кребса –  $\alpha$ -кетоглутаратдегидрогеназы при интоксикации (табл. 1). Активность сукцинатдегидрогеназы как и  $\alpha$ -кетоглутаратдегидрогеназы митохондрий, даже несколько возрастали (8-10%) при дозе 700-1500 мг АРАР/кг массы животного.

Таблица 1. Токсическое поражение печени крыс ацетаминофеном: зависимость параметров потребления кислорода митохондриями и активности митохондриальных ферментов от дозы вводимого препарата.

Параметры, характеризующие состояние митохондрий	Контроль	300 мг/кг массы	700 мг/кг массы	1000 мг/кг массы
Сукцинатдегидрогеназа, нмоль сукцината /мин/мг белка	51,5 ± 3,1	53,4 ± 5,3	56,0 ± 1,9*	56,0 ± 6,3
$\alpha$ -кетоглутарат-дегидрогеназа, нмоль $K_3[Fe(CN)_6]$ /мин/мг белка	34,0 ± 3,6	37,6 ± 2,2	36,1 ± 2,9	36,7 ± 6,8
Глутатионпероксидаза, мкмоль GSH /мин/ мг белка	0,72 ± 0,06	0,66 ± 0,09	0,82 ± 0,13	0,83 ± 0,11
Скорость АДФ-зависимого потребления кислорода (субстрат - сукцинат), нг ат $O_2$ /мин/мг белка	131 ± 24	158 ± 26	139 ± 24	151 ± 21
Скорость АДФ-зависимого потребления кислорода (субстрат - глутамат), нг ат $O_2$ /мин/мг белка	53,4 ± 16,3	57,4 ± 19,3	62,8 ± 22,1	58,3 ± 19,2
Коэффициент дыхательного контроля (сукцинат)	4,6 ± 1,0	5,4 ± 2,0	6,1 ± 2,8	5,5 ± 2,1
Коэффициент фосфорилирования (сукцинат)	1,26 ± 0,23	1,15 ± 0,17	1,33 ± 0,20	1,26 ± 0,24

Примечание: \* - статистически достоверно по отношению к контролю,  $p < 0,05$ .

Скорость потребления кислорода при использовании в качестве субстрата сукцината в метаболическом состоянии 3 ( $V_3$ ) также возрастала (на 20%), что приводило к росту коэффициента дыхательного контроля ( $V_3/V_4$ ) (табл. 1). Коэффициент фосфорилирования при этом не изменялся, что указывает на отсутствие существенных изменений дыхательной активности митохондрий печени крыс при интоксикации АРАР.

Следует отметить, что мы не обнаружили значимого уменьшения содержания белковых сульфгидрильных групп в постмитохондриальной фракции клеток печени при интоксикации АРАР (табл. 2). В то же время содержание смешанных дисульфидов глутатиона с белками гепатоцитов уменьшалось при интоксикации на 45% ( $p < 0,05$ ). Это может быть связано с уменьшением содержания GSH в клетках печени за счет образования его конъюгатов с метаболитом АРАР - N-ацетил-бензохинониминном, а не за счет образования его дисульфидной формы - GSSG. Вероятно, что в этих условиях не наблюдалось значительной конъюгации реакционного метаболита АРАР с цистеиновыми

остатками белков гепатоцитов. Интоксикация, не изменяя существенно или даже несколько увеличивая активность глутатионпероксидазы, приводила к выраженному ингибированию (на 40%,  $p < 0,05$ ) активности каталазы в митохондриях ткани печени крыс (табл. 2). Согласно современным представлениям, при поступлении в организм токсического количества АРАР развивается некротическая (онкотическая) гибель клеток печени, являющаяся результатом нарушения функциональной активности митохондрий и истощения АТФ, нарушения кальциевого гомеостаза, интенсивной фрагментации ДНК, модификации клеточных белков и протеолиза [2].

Таблица 2. Содержание белковых сульфгидрильных групп (PSH), смешанных дисульфидов глутатиона с белками (PSSG) в митохондриях и активность каталазы в постмитохондриальной фракции ткани печени крыс при острой интоксикации ацетаминофеном; протекторный эффект производных триптофана.

Параметры, характеризующие редокс-баланс клеток печени	Контроль	АРАР	АРАР+NNT	АРАР+Mel	NNT
PSH, нмоль/мг белка	125±8	123±14	122±11	118±9	123±10
PSSG, нмоль/мг белка	0,76±0,3	0,43±0,23*	0,62±0,32	0,63±0,16	0,62±0,25
Каталаза, мкмоль H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /мин/мг белка	349±84	204±73*	261±58*	229±51*	349±125

Примечание: \*- статистически достоверно по отношению к контролю,  $p < 0,05$ .

Одной из задач настоящей работы был поиск гепатопротекторов, препятствующих развитию токсического поражения печени АРАР. Ранее нами был обнаружен гепатопротекторный эффект гормона эпифиза мелатонина при интоксикации крыс тетрахлорметаном. Введение мелатонина на фоне интоксикации препятствовало структурным повреждениям ткани печени, в первую очередь, гидропической и жировой дистрофии, некротическим изменениям и лейкоцитарной инфильтрации [21]. В качестве возможных гепатопротекторов мы исследовали производные аминокислоты триптофана - мелатонин и NNT. N-ацетил-N-нитрозотриптофан представляет собой донор оксида азота. Ранее было показано, что NCX-100, NO-производное урсодезоксихолевой кислоты, активно освобождает оксид азота в печени крыс, но не урсодезоксихолевая кислота, выражено предотвращало гибель животных, некротическую и апоптотическую гибель гепатоцитов, накопление в печени медиаторов воспаления IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  при интоксикации мышей АРАР в дозе 330 мкмоль/кг [22]. Авторы продемонстрировали, что в культуре гепатоцитов мыши гибель клеток, индуцируемая АРАР, коррелирует с гиперполяризацией митохондриальных мембран, сопровождающейся последующей деполяризацией, выходом цитохрома *c* в цитозоль, расщеплением прокаспазы-3 и -9 [22]. В нашем эксперименте предварительное введение NNT и мелатонина не защищало существенно окисление GSH в ткани печени крыс при интоксикации. Наиболее значимым эффектом вводимых производных триптофана оказалось уменьшение гепатотоксичности АРАР в присутствии мелатонина: в плазме крови при введении мелатонина уменьшалась активность АлТ в 1,7 раза, уровень общего билирубина – 1,2 раза по сравнению с соответствующими значениями в плазме крови интоксигированных животных (рис. 2). Кроме того, введение животным NNT и мелатонина на фоне интоксикации АРАР восстанавливало уровень смешанных дисульфидов глутатиона с клеточными белками (табл. 2).

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ.** Интоксикация АРАР, в соответствии с многочисленными наблюдениями, приводила, в первую очередь, к выраженному истощению цитоплазматического и внутримитохондриального GSH, уровень которого уменьшался при дозе препарата 1500 мг/кг массы тела животного на 60% и 33% соответственно. Следует отметить, что истощение цитоплазматического GSH было более выражено по сравнению с митохондриальным, свидетельствуя, возможно, о возрастании количества конъюгатов глутатиона с продуктом деградации - АРАР - N-ацетил-бензохинониминном, образуемым системой микросомального окисления.

Наиболее значимым эффектом исследуемых нами производных триптофана является торможение мелатонином процесса гепатолиза, сопровождающего интоксикацию АРАР и, соответственно, повышения активности АлТ, АсТ и уровня общего билирубина в плазме крови.

В наших экспериментах не было обнаружено существенного нарушения дыхательной активности митохондрий печени крыс, подвергшихся интоксикации АРАР в дозе до 1500 мг/кг массы тела. Одновременно, мы не наблюдали инактивации митохондриальных ферментов, сукцинатдегидрогеназы,  $\alpha$ -кетоглутаратдегидрогеназы, глутатионпероксидазы, несмотря на значительное истощение митохондриального GSH.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Bessems J.G., Vermeulen N.P. (2001) Crit. Rev. Toxicol., **35**, 55-138.
2. Jaeschke H., Bajat M.L. (2006) Toxicological Science., **89**, 31-41.
3. Nelson S.D. (1990) Semin. Liver. Dis., **10**, 267-278.
4. Mitchell J.R., Thorgeirsson S.S., Potter W.Z., Jollow D.J., Keiser H. (1974) Clin. Pharmacol Ther., **16**(4), 676-684.
5. Cohen S.D., Khairallah E.A. (1997) Drug. Metab. Rev., **29**, 59-77.
6. Knight T.R., Ho Y.S., Farhood A., Jaeschke H. (2002) J. Pharmacol. Exp. Ther., **303**, 468-475.
7. Burcham P.C., Harman A.W. (1991) J. Biol. Chem., **266**, 5049-5054.
8. Johnson D., Lardy H.A. (1967) Methods Enzymol., **10**, 94-101.
9. Lowry O.H., Rosebrough H.J., Farr R.L., Randall R.G. (1951) J. Biol. Chem., **193**, 265-272.
10. Уильямс Б., Уилсон К. (1978) в сб.: Методы практической биохимии (пер с англ., под ред. С.Е. Северина и А.Д. Виноградова), М. "Мир", сс. 235-244.
11. Ellman G. (1959) Arch. Biochem. Biophys., **82**, 70-77.
12. Rossi R., Cardaioli E., Scaloni A., Amiconi F., Di Simplicio P. (1995) Biochim. Biophys. Acta, **1243**, 230-238.
13. Zoccarato F., Cavallini L., Alexandre A. (2004) J. Biol. Chem., **279**, 4166-4174.
14. Martinez J.I., Launay J.M., Dreux C. (1979) Anal. Biochem., **98**, 154-159.
15. Aebi H. (1984) Methods Enzymol., **105**, 121-126.
16. Nulton-Persson A.C., Szweda L.I. (2001) J. Biol. Chem., **276**, 23357-23361.
17. Fernandez-Checa J.C., Kaplowitc N. (2005) Toxicol. Appl. Pharmacol., **204**, 263-273.
18. Кулинский В.И., Колесниченко Л.С. (2009) Биомед. химия, **55**, 255-277.
19. Fernandez-Checa J.C., Garcia-Ruiz C., Colell A., Morales A., Mari M., Miranda M., Ardite E. (1998) Biofactors, **8**, 7-11.
20. Reid A.B., Kurten R.C., McCullough S.S., Brock R.W., Hinson J.A. (2005) J. Pharmacol. Exper. Ther., **312**, 509-516.

21. *Zavodnik L.B., Zavodnik L.B., Lapschina E.A., Belonovskaya E.B., Martinchik D.I., Kravchuk R.I., Bryszewska M., Raiter R.J.* (2005) *Cell Biochem. Funct.*, **23**, 353-359.
22. *Fiorucci S., Antonelli E., Distrutti A., Menkarelli A., Farneti S., Del Soldato P., Morelli A.* (2004) *Br. J. Pharmacol.*, **143**, 33-42.

Поступила: 20. 01. 2009.

**HEPATOTOXIC EFFECTS OF ACETAMINOPHEN.  
PROTECTIVE PROPERTIES OF TRYPTOPHAN-DERIVATIVES**

*I.K. Dremza<sup>1</sup>, V.T. Cheshchevik<sup>1,2</sup>, S.V. Zabrodskaya<sup>1</sup>, Y.Z. Maksimchik<sup>1</sup>, E.Ju. Sudnikovich<sup>1</sup>,  
E.A. Lapshina<sup>1</sup>, I.B. Zavodnik<sup>1,2</sup>*

<sup>1</sup>Institute of Pharmacology and Biochemistry, National Academy of Sciences of Belarus, 50 BLK, 230017 Grodno, Belarus; tel.: +375 152 437935; fax: +375 152 434121; e-mail: idremza@rambler.ru

<sup>2</sup>Department of Biochemistry, Yanka Kupala State University, Grodno, Belarus

Rat intoxication with acetaminophen (APAP) (500-1500 mg/kg body weight intragastrically) caused a considerable dose-dependent decrease in reduced glutathione (GSH) level in both liver cellular cytoplasm and mitochondria (at the dose 1500 mg/kg body weight by 60% and 33%, respectively). The cytoplasmic GSH level decreased more pronounced by comparison with that in mitochondria. At the same time, we did not observe any inactivation of the mitochondrial enzymes: succinate dehydrogenase,  $\alpha$ -ketoglutarate dehydrogenase, glutathione peroxidase despite of mitochondrial GSH consumption; also we did not observe any decrease in the respiratory activity of liver mitochondria isolated from APAP-intoxicated rats. A tryptophan derivative, melatonin (10 mg/kg body weight), did not prevent intramitochondrial GSH oxidation, but decreased the hepatotoxicity of APAP, diminishing the activities of ALT and AsT as well as bilirubin level in blood plasma of intoxicated rats. N-acetyl-nitrosotryptophan (a nitric oxide donor) did not exhibit any hepatoprotective effects.

**Key words:** acetaminophen, melatonin, tissue respiration, oxidative stress, hepatotoxicity, hepatoprotectors.