

М. М. Марченко, Г. П. Копильчук, І. М. Бучковська,
І. О. Шмараков

Інтенсивність продукування оксиду азоту при регенерації печінки за умов відсутності запасів ретиноїдів

(Представлено членом-кореспондентом НАН України С. О. Костериним)

Досліджено інтенсивність продукування оксиду азоту (NO) та зміни NO-синтазної активності в мітохондріальній та цитозольній фракціях клітин печінки мишей при регенерації печінки за умов відсутності запасів ретиноїдів. Встановлено, що регенерація печінки тварин з фізіологічним рівнем ретинілефірів супроводжується посиленням утворенням NO та активацією NO-синтази в обох фракціях клітин лише на початкових етапах (12 та 24 год) після часткової гепатектомії. Результати аналізу інтенсивності продукування NO в мітохондріальній та цитозольній фракціях клітин печінки мишей $Lrat^{-/-}$ вказують на підвищений рівень NO протягом усього експерименту з максимальними значеннями через 12 год після часткової гепатектомії.

Внаслідок широкого спектра біологічної дії оксид азоту (NO) розглядається як один із месенджерів внутрішньо- та міжклітинної сигналізації [1, 2]. Доведено, що NO виявляє різнобічну дію: як інгібітор або агоніст передачі інформації в гепатоцитах [1], про- та антиоксидант [3], інгібітор чи активатор апоптозу [2]. NO в організмі синтезується за участю ензиму синтази оксиду азоту (NOS), яка представлена трьома ізоформами [1, 3].

Результати експериментальних досліджень засвідчують як інгібуючий [4], так і активуючий [5] вплив ретиноїдів на синтез NO та експресію генів індукцибельної NO-синтази (iNOS, II тип) залежно від дози. Водночас припускається, що гемодинамічне навантаження, якого зазнають клітини печінки після резекції, супроводжуються активацією iNOS з посиленням продукуванням NO як найбільш раннього маркера регенераційних процесів [6, 7]. Також показано регуляторну роль NO під час регенерації печінки, викликаної частковою гепатектомією (ЧГЕ) [6–8]. Стресіндуковане вивільнення NO запускає каскад компенсаторних реакцій, необхідних для реалізації внутрішньоклітинної відповіді організму на гостре тканинне ураження [9].

Ми ставили за мету дослідити інтенсивність продукування NO та рівень NO-синтазної активності в мітохондріальній та цитозольній фракціях клітин печінки мишей за умов ЧГЕ та відсутності запасів ретиноїдів.

Матеріали та методи дослідження. Дослідження проводили на мишах лінії C57BL/6J масою 25–30 г, віком 2,5–3 міс. Утримання тварин і маніпуляції з ними здійснювали згідно з положеннями “Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та наукових цілей” (Страсбург, 1986), “Загальних етичних принципів експериментів на тваринах”, ухвалених Першим національним конгресом з біоетики (Київ, 2001).

Для встановлення однозначного метаболічного взаємозв’язку між запасами ретиноїдів у печінці та її здатністю до регенерації мишей C57BL/6J (дослідний контроль) і $Lrat^{-/-}$

(тварини, які не здатні синтезувати ретинілестери в печінці внаслідок нокауту гена ензиму лецитин:ретинолацилтрансферази (LRAT, 2.3.1.135), і тому повністю позбавлені запасів ретиноїдів) піддавали ЧГЕ шляхом резекції 2/3 тканини печінки [10].

Дослідні тварини поділені на групи:

миші C57BL/6J та $Lrat^{-/-}$, яких піддавали частковій резекції тканини печінки (C57BL/6J + ЧГЕ; $Lrat^{-/-}$ + ЧГЕ);

миші C57BL/6J та $Lrat^{-/-}$, яким проводили лапаротомію (ЛАП) без подальших хірургічних втручань з метою імітації гострої фази як складової частини відповіді на ЧГЕ (C57BL/6J + ЛАП; $Lrat^{-/-}$ + ЛАП).

Евтаназію тварин здійснювали під легким ефірним наркозом на початкових стадіях (12, 24 год), у період активної проліферації клітин (48 год) та на завершальних етапах (72, 168 год) регенерації печінки.

Мітохондріальну фракцію клітин печінки отримували за методом [11]. Ступінь забрудненості мітохондріальної фракції контролювали шляхом порівняльного визначення сукцинатдегідрогеназної активності (1.3.99.1) як специфічного маркера внутрішньої мембрани мітохондрій та активності глюкозо-6-фосфатази (3.1.3.9) — специфічного маркера ендоплазматичного ретикулума, у фракціях мікросом та мітохондрій.

Визначення NO-синтазної активності (NOS, 1.14.13.39) проводили за методом [12]. Активність NOS розраховували як різницю між показниками екстинкції субстратного та безсубстратного окиснення NADPH та виражали в нмолях окисненого NADPH за 1 хв на мг протеїну.

Рівень продукування NO визначали за модифікованим методом [13] шляхом реєстрації вмісту нітрит-аніона (NO_2^-), який є стабільним метаболітом NO. Оскільки NO — високо-реакційна молекула з коротким періодом життя, яка швидко інактивується в оксидазній реакції з перетворенням у нітрит (NO_2^-) або нітрат (NO_3^-), який швидко метаболізується, то рівень NO правомірно оцінювати за зміною NO_2^- [14].

Концентрацію протеїну визначали за методом Лоурі (1951).

Статистичну обробку експериментальних результатів проводили з використанням пакета аналізу даних у Microsoft Excel. Для визначення вірогідних відмінностей між середніми величинами використовували критерій Стьюдента (t). Різницю вважали достовірною при $P \leq 0,05$.

Результати та їх обговорення. Результати проведених досліджень засвідчують посилене продукування NO (табл. 1) та підвищення рівня NO-синтазної активності (рис. 1, *a*) в мітохондріальній фракції клітин печінки мишей C57BL/6J лише на початкових етапах регенерації (12 та 24 год).

Згідно з даними літератури [7, 15], за умов розвитку оксидативного стресу після часткової резекції тканини печінки відбувається активація факторів транскрипції (NF- κ B, STAT3, AP-1), які індукують експресію генів iNOS з посиленням продукуванням NO в гепатоцитах та клітинах Купфера. Вірогідно, у нашому випадку підвищене продукування NO та активація NOS на початкових етапах регенерації печінки може бути наслідком активації певних факторів транскрипції, цитокінів та інших медіаторів як відповідь класу сигнальних молекул, що здійснюють міжклітинну комунікацію і регуляцію біохімічних процесів у тканинах та системах організму, на розвиток гострого тканинного ураження [1, 2].

Водночас у досліджуваній фракції клітин печінки нокаутних тварин надмірне утворення NO (див. табл. 1) та активація NOS (див. рис. 1) спостерігалось протягом 48 год після ЧГЕ з максимальними значеннями на 12 год експерименту. При цьому показники ензиматичної

активності NOS та вмісту NO в мітохондріальній фракції клітин печінки мишей $Lrat^{-/-}$ протягом усього експериментального періоду залишалися вищими порівняно зі значеннями тварин дослідного контролю.

Оскільки повністю-*транс*-ретиноева кислота інгібує транскрипцію гена iNOS та модулює продукування NO [5], відсутність запасів ретиноїдів у печінці, ймовірно, створює передумови для посиленої активації NOS та зростання рівня NO в досліджуваній фракції після ЧГЕ. Припускається, що дія NO *in vivo* може бути спрямована на модуляцію потенціалу та блокування мітохондріальних пор через модифікацію “критичних” тіолів трансмембранного протеїнового комплексу, що призводить до порушення роботи мітохондріального електротранспортного ланцюга із посиленою генерацією супероксидного аніон-радикала [1, 11]. При патологічній гіпергенерації NO може реагувати з O_2^- , у результаті чого утворюється токсичний продукт — пероксинітрит [15], вірогідність утворення якого значно збільшується, оскільки NO — єдина біомолекула, що конкурує із супероксиддисмутазою за супероксид.

При цьому показники кількісного вмісту NO та рівня NO-синтазної активності в печінці мишей, яким проводили лапаротомію без подальших хірургічних втручань, протягом усього експериментального періоду не перевищували значення контролю (0 год) в обох дослідних групах тварин.

Існують дані про безпосередню роль iNOS в пригніченні метаболічних процесів, що відбуваються в цитозолі клітини. Ефекти NO, опосередковані дією NOS, виявляються в інгібуванні глікогеногенезу, глікогенолізу та основних етапів гліколітичної оксидоредукції [2].

Нами встановлено зростання рівня NO-синтазної активності в цитозольній фракції клітин печінки мишей обох дослідних груп після ЧГЕ (див. рис. 1, б). Активація NOS в досліджуваній фракції печінки нокаутних тварин простежується протягом 3 дб після часткової резекції тканини та вірогідно перевищує показники мишей C57BL/6 J протягом усього експериментального періоду. Ймовірно, що відсутність запасів ретиноїдів у печінці посилює утворення цитокінів, які ініціюють пускові механізми регенерації та можуть діяти як тригери, що переключають синтез NO із конститутивної ізоформи NO-синтази на індукційну [8, 15].

Таблиця 1. Рівень NO в мітохондріальній та цитозольній фракціях клітин печінки мишей C57BL/6J та $Lrat^{-/-}$ за умов часткової гепатектомії, нмоль NO_2^- /мг протеїну

Група тварин	Термін дослідження, год					
	0	12	24	48	72	168
Мітохондріальна фракція						
C57 + ЛАП		1,41 ± 0,13	1,33 ± 0,12	1,15 ± 0,11	1,51 ± 0,09	1,22 ± 0,10
C57 + ЧГЕ	1,84 ± 0,17	2,80 ± 0,23*	2,34 ± 0,14*	1,45 ± 0,10	1,53 ± 0,12	1,54 ± 0,13
$Lrat^{-/-}$ + ЛАП		2,90 ± 0,15	2,60 ± 0,13	2,53 ± 0,21	2,46 ± 0,23	2,54 ± 0,26
$Lrat^{-/-}$ + ЧГЕ	3,26 ± 0,13**	4,95 ± 0,26***	4,33 ± 0,46***	4,27 ± 0,27***	2,92 ± 0,30**	2,54 ± 0,50**
Цитозольна фракція						
C57 + ЛАП		0,8 ± 0,06	0,7 ± 0,04	0,8 ± 0,04	0,8 ± 0,06	0,8 ± 0,02
C57 + ЧГЕ	0,8 ± 0,10	1,4 ± 0,13*	1,8 ± 0,18*	1,6 ± 0,19*	1,05 ± 0,10	1,2 ± 0,14
$Lrat^{-/-}$ + ЛАП		1,1 ± 0,07	1,1 ± 0,14	1,0 ± 0,17	1,2 ± 0,03	1,1 ± 0,16
$Lrat^{-/-}$ + ЧГЕ	1,2 ± 0,08**	3,8 ± 0,29***	3,6 ± 0,20***	3,3 ± 0,34***	3,2 ± 0,23***	1,1 ± 0,21

Примітка. 0 год — значення, що відповідають показникам інтактних тварин (контроль). * Статистично достовірна різниця порівняно з показниками контролю, $P \leq 0,05$. ** Статистично достовірна різниця порівняно з показниками тварин C57BL/6J, $P \leq 0,05$.

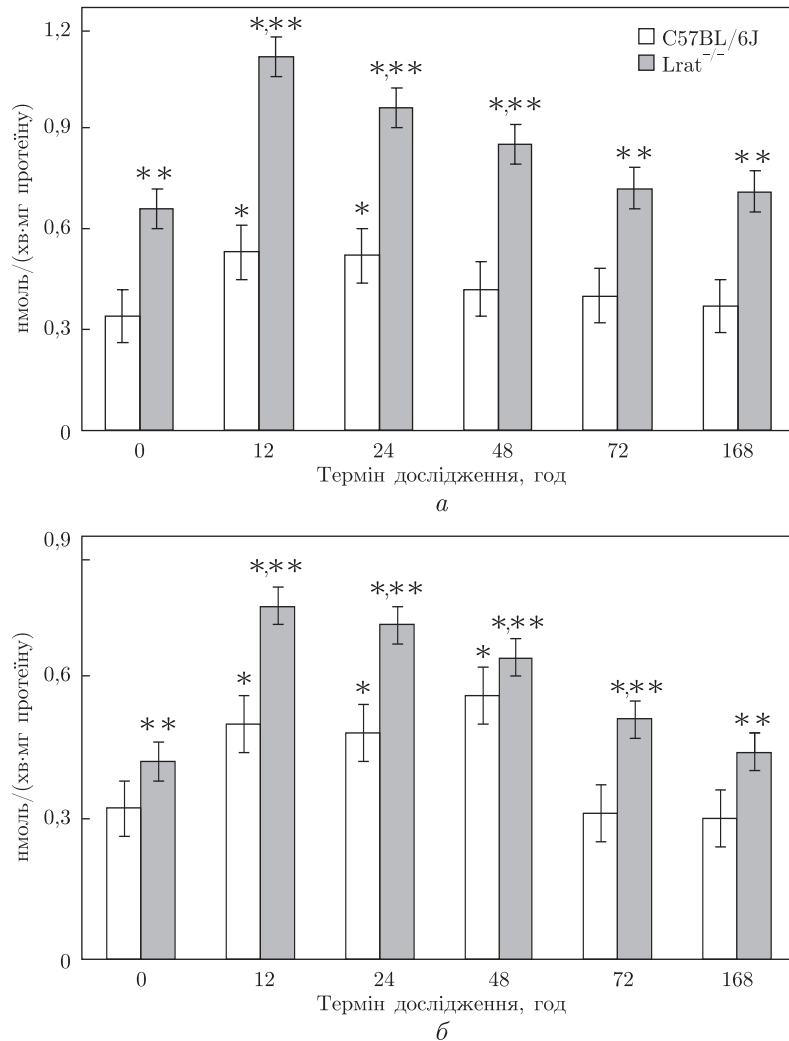


Рис. 1. NO-синтазна активність в мітохондріальній (а) та цитозольній (б) фракціях клітин печінки мишей C57BL/6J та Lrat^{-/-} за умов часткової гепатектомії. 0 год — значення, що відповідають показникам інтактних тварин (контроль); * — статистично достовірна різниця порівняно з показниками контролю, $P \leq 0,05$; ** — статистично достовірна різниця порівняно з показниками тварин C57BL/6J, $P \leq 0,05$

Результати досліджень свідчать про посилене продукування NO в цитозольній фракції клітин печінки мишей Lrat^{-/-} протягом 3 діб (72 год) після ЧГЕ (див. табл. 1). Можна припустити, що якщо на початкових етапах регенерації NO виступає як внутрішньоклітинний посередник, то в періоди 48 та 72 год його токсична дія може виявлятися прямо шляхом утворення нітрозильних комплексів та опосередковано через активні форми азоту, які в ході реакцій S- і N-нітрузування, нітрування та дезамінування порушують функціонування біомолекул і субклітинних компонентів, спричиняють метаболічний дисбаланс та призводять до розвитку ендогенної інтоксикації організму [1, 2, 15]. Гіперпродукцією NO може бути зумовлено інгібування гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогенази шляхом рибозилування і нітрозилування, що призводить до гальмування гліколізу і, як наслідок, до порушення енергетичного метаболізму [7, 15].

Отже, відсутність запасів ретиноїдів у клітинах регенеруючої печінки супроводжується посиленням продукуванням NO за рахунок активації NOS з максимальними значеннями на 12 год після ЧГЕ.

Автори висловлюють щирю подяку проф. В. С. Бленеру (Колумбійський університет, США) за люб'язно надані лінії трансгенних мишей для проведення досліджень.

1. Дмитренко Н. П., Холиан А. Роль взаимодействия путей метаболизма формальдегида и оксида азота в механизме их токсического действия. 2. Токсическое действие оксида азота // Укр. біохім. журн. – 2005. – **77**, № 5. – С. 5–23.
2. Takeuchi K., Hatazawa R., Tanigami M. Role of endogenous nitric oxide (NO) and NO synthase in healing of indomethacin-induced intestinal ulcers in rats // Life Sci. – 2007. – **80**, No 4. – P. 329–336.
3. Fitzhugh A. L., Keefer L. K. Diazeniumdiolates: pro – and antioxidant applications of the “NOates” // Free Radic. Biol. Med. – 2000. – **28**, No 10. – P. 1463–1469.
4. Oh G. S., Pae H. O., Seo W. G. et al. Inhibitory effect of retinoic acid on expression of inducible nitric oxide synthase gene in L929 cells // Immunopharm. Immunotoxicol. – 2001. – **23**, No 3. – P. 335–342.
5. Kang M. K., Yoon Y. E., Yang J. Y. et al. Protective effect of retinoic acid on interleukin – 1 β -induced cytotoxicity of pancreatic β -cells // Mech. Ageing and Develop. – 2004. – **125**, No 7. – P. 483–490.
6. Tuncyurek P., Yenisey C., Doger F. et al. Nitric Oxide as an Independent Regulatory Factor in Regenerating Rat Liver // Acta Chir Belg. – 2006. – **106**, No 5. – P. 581–587.
7. Hortelano S., Zeini M., Casado M. et al. Animal models for the study of liver regeneration: role of nitric oxide and prostaglandins // Front Biosci. – 2007. – No 12. – P. 13–21.
8. Díaz-Guerra M. J., Velasco M., Martín-Sanz P., Boscá L. Nuclear factor kappaB is required for the transcriptional control of type II NO synthase in regenerating liver // Biochem J. – 1997. – **326**, No 3. – P. 791–797.
9. Jia C. Advances in the regulation of liver regeneration // Expert Rev. Gastroenterol. Hepatol. – 2011. – **5**, No 1. – P. 105–121.
10. Mitchell C. A., Willenbring H. Reproducible and well-tolerated method for 2/3 partial hepatectomy in mice // Nat. Protoc. – 2008. – **3**, No 7. – P. 1167–1170.
11. Аконова О. В., Сагач В. Ф. Индукция открытия митохондриальной поры под действием Ca²⁺ в миокарде крыс // Укр. біохім. журн. – 2004. – **76**, № 1. – С. 48–55.
12. Vodovotz Y., Know N. S., Popischil M. et al. Inactivation of nitric oxide synthase after prolonged incubation of mouse macrophages with IFN-gamma and bacterial lipopolysaccharide // J. Immunol. – 1994. – **152**, No 8. – P. 4110–4118.
13. Hwang S., Lopeç C. A., Heck D. E. et al. Osteopontin inhibits induction of nitric oxide synthase gene expression by inflammatory mediators in mouse kidney epithelial // J. Biol. Chem. – 1994. – **264**, No 1. – P. 711–715.
14. Curran R. D., Ferrari F. K., Kispert P. H. et al. Nitric oxide and nitric oxide-generating compounds inhibit hepatocyte protein synthesis // FASEB J. – 2001. – **5**, No 7. – P. 2085–2092.
15. Zeini M., Hortelano S., Traves G. Assessment of a dual regulatory role for NO in liver regeneration after partial hepatectomy: protection against apoptosis and retardation of hepatocyte pro-liferation // FASEB J. – 2005. – **19**, No 8. – P. 995–997.

М. М. Марченко, Г. П. Копыльчук, И. М. Бучковская, И. А. Шмараков

Интенсивность образования оксида азота при регенерации печени в условиях отсутствия запасов ретиноидов

Исследованы интенсивность образования оксида азота (NO) и изменения активности NO-синтазы в митохондриальной и цитозольной фракциях клеток печени мышей при регенерации печени в условиях отсутствия запасов ретиноидов. Установлено, что регенерация печени животных с физиологическим уровнем ретинилэфиров сопровождается усиленным образованием NO и активацией NO-синтазы в обеих фракциях клеток только на ранних этапах (12 и 24 ч) после частичной гепатэктомии. Результаты анализа интенсивности образования NO в митохондриальной и цитозольной фракциях клеток печени мышей $Lrat^{-/-}$ указывают на повышенный уровень NO на протяжении всего эксперимента с максимальными значениями через 12 ч после частичной гепатэктомии.

M. M. Marchenko, G. P. Kopylchuk, I. M. Buchkovska, I. O. Shmarakov

The intensity of nitric oxide production during liver regeneration in the absence of retinoid stores

The intensity of nitric oxide production and changes in the NO-synthase activity in mitochondrial and cytosolic fractions of mouse liver cells are studied during the liver regeneration in the absence of retinoid stores. It is determined that the liver regeneration in animals with physiological levels of retinyl esters is accompanied with the increased NO formation and the NO-synthase activation in mitochondrial and cytosolic fractions only at the initial stages (12 and 24 h) after partial hepatectomy. The analysis of the intensity of nitric oxide production in mitochondrial and cytosolic fractions of liver cells in $Lrat^{-/-}$ mice indicates elevated NO levels throughout the experiment with maximum values in 12 h after partial hepatectomy.