



УДК 591.436-116.9:577.161.1

І. О. Шмараков, Ю. Д. Морозевич, В. С. Бленер, М. М. Марченко

Біохімічні аспекти сигнальної функції ретиноїдів при регенерації печінки

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

Досліджено роль рецепторів ретиноевої кислоти та канонічної сигналізації ретиноїдів у регенерації печінки. З використанням моделі клітинно-специфічної абляції рецепторів ретиноевої кислоти шляхом активації домінантної негативної ізоформи (RAR α DN) показано, що необхідною умовою для повноцінної регенерації печінки, викликаній частковою гепатектомією, є реалізація ретиноевою кислотою її сигнальної функції, опосередкованої взаємодією зі специфічними ядерними рецепторами, як складова регенеративної відповіді. Функціонування ретиноїдозалежного сигнального шляху за участю канонічних ядерних рецепторів ретиноевої кислоти життєво важливе як для печінки при її гострому ураженні, так і для організму в цілому.

Зростаючий попит на нові стратегії у регенеративній медицині та попередженні раку потребує ґрунтовного розуміння молекулярних механізмів, які контролюють тканинно-специфічну клітинну проліферацію. Регенеруюча печінка — унікальна модель, що дозволяє використовувати біохімічні, генетичні та біотехнологічні засоби для розкриття молекулярних механізмів і вдосконалення стратегії метаболічної корекції патологій печінки [1–3]. Визначальна роль у повноцінній трансдукції сигналу відводиться ядерним рецепторам — представникам суперродини білкових транскрипційних регуляторів, що включає лігандозалежні рецептори ретиноевих кислот, стероїдних і тиреоїдних гормонів, вітаміну D₃ та інших ліпофільних лігандів. Вказані білкові фактори залучені в передачу внутрішньоклітинного сигналу, необхідного для ембріогенезу, органогенезу, клітинної проліферації, диференціації та гомеостазу [4]. Численні представники ядерних рецепторів, як і гени, що містять респонсивні елементи для їх гомо- та гетеродимерів, експресуються в печінці [4].

Особливу увагу в метаболічному контролі функціонування печінки та організму привертають ретиноїди (вітамін А та його метаболіти). Ретиноева кислота (РК) — основний транскрипційно активний ретиноїд — залучена у регуляцію більш ніж 500 генів [5]. Повністю-транс- та 9-цис-ізомери РК регулюють транскрипцію шляхом зв'язування з одним із шести ядерних рецепторів — рецепторами РК (RAR α , β , γ) та ретиноїд Х рецепторами

© І. О. Шмараков, Ю. Д. Морозевич, В. С. Бленер, М. М. Марченко, 2013

(RXR α , β , γ). Основна частина ретиноїдів (до 70%) локалізована в печінці, де депонується у вигляді ретинілефірів у спеціалізованих ліпідних краплях стелатних клітин, на які припадає до 80% запасів ретиноїдів печінки [6]. Цілком очевидно, що така висока концентрація ретиноїдів у печінці зумовлена необхідністю виконання цими біоактивними метаболітами важливих функцій, особливо у випадку гострого чи хронічного ураження органа, що потребує миттєвої регенеративної відповіді та підтримки метаболічного гомеостазу організму [7]. Водночас процеси гострого та хронічного ураження печінки (цироз, фіброз, неалкогольне ожиріння, гепатоклітинний рак) супроводжуються масивною втратою запасів ретиноїдів та поглиблюються при їх нестачі, що свідчить про безпосередню участь метаболітів вітаміну А в процесах регульованого відновлення тканини печінки [7].

У світлі розкриття сигнальної та метаболічної ролі ядерних рецепторів у функціонуванні тканин і органів залишається відкритим питання залучення цих білкових регуляторів у розвиток патологічних процесів та можливостей їх використання в метаболічній корекції патологій. Мета роботи — встановити роль рецепторів РК та канонічної сигналізації ретиноїдів у регенерації печінки.

Дослідження проводили на мишах масою 25–30 г та віком 2,5–3 міс., які знаходилися на стандартному раціоні віварію. Тварини були люб'язно надані лабораторією біології ретиноїдів Колумбійського університету міста Нью-Йорк, США. Утримання тварин та маніпуляції з ними проводили згідно з положеннями “Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та наукових цілей” (Страсбург, 1986) та “Загальних етичних принципів експериментів на тваринах”, ухвалених Першим національним конгресом з біоетики (Київ, 2001).

Використані в експериментальних дослідженнях тварини були трансгенними і містили у геномі ген домінантної негативної форми α ізоформи рецептора РК (*Rar α DN*). Оскільки повноцінна сигналізація ретиноїдів, яка опосередковується через канонічні рецептори, необхідна в процесах ембріонального та постембріонального розвитку, промоторна ділянка трансгена домінантної негативної форми екранувалася термінуючою послідовністю, відмежованою *loxP*-сайтом, що унеможливило транскрипцію вказаного трансгена. З метою селективної тканиноспецифічної активації транскрипції гена домінантної негативної форми тварин-носіїв цього гена схрещували з носіями трансгена рекомбінази *Cre*, зчепленої з промотором гена альбуміну. Оскільки ген альбуміну експресується тільки в печінці, яка є єдиним джерелом сироваткового альбуміну, експресія трансгена рекомбінази *Cre*, зчепленого з альбуміновим промотором, відбувається виключно в печінці. У результаті проведеного схрещування двох ліній трансгенних мишей отримали потомство з активованим у гепатоцитах геном домінантної негативної α ізоформи рецептора РК, не впливаючи на сигналізацію ретиноїдів в інших (у тому числі ембріональних) екстрагепатних тканинах (I група, дослідна, *Rar α DN^{lox/lox}; Alb-Cre^{+/+}*). Контрольну групу складали миші, отримані в результаті схрещування тварин з геном *Rar α DN* і тварин без гена *Cre*-рекомбінази (II група, контрольна, *Rar α DN^{lox/lox}; Alb-Cre^{-/-}*).

Білковий продукт гена домінантної негативної α ізоформи рецептора РК інгібує функціональну активність всіх ізоформ RAR, викликаючи їх абляцію, шляхом конкурентного незворотного зв'язування з респонсивними елементами (RARE) ретиноїдзалежних генів [8]. У результаті зникнення вільних місць для зв'язування повноцінні рецептори елімінуються шляхом протеолізу, а утворена РК, як сигнальна молекула, не може виконувати свою месенджерну функцію внаслідок відсутності лігандзв'язуючого домена в мутантного рецептора [8, 9].

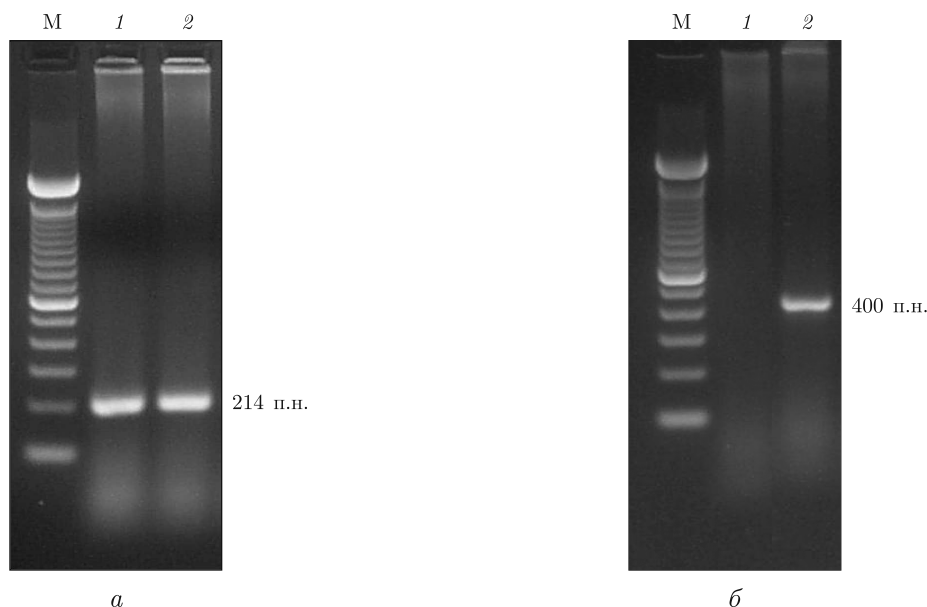


Рис. 1. Електрофореграма розподілу специфічних продуктів ампліфікації трансгенів *RaraDN* (а) та *Cre* (б): 1, 2 — результати генотипування тварин контрольної (*RaraDN^{flox/flox}; Alb-Cre^{-/-}*) та дослідної (*RaraDN^{flox/flox}; Alb-Cre^{+/+}*) груп відповідно; М — маркерний препарат Gene Ruler™ DNA Ladder Mix

Генотипування трансгенних тварин проводили методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) з використанням специфічних праймерів. Тварини кожної групи містили фланкований ген *RaraDN*, що підтверджувалося появою амплікона розміром 214 п. н. (рис. 1). Водночас геномна ДНК лише тварин дослідної групи давала позитивну ПЛР з появою амплікона розміром 400 п. н., що свідчило про наявність гена рекомбінази *Cre*, необхідної для активації домінантної негативної α ізоформи рецептора РК (див. рис. 1). Тварин дослідної і контрольної груп піддавали частковій гепатектомії (ЧГЕ), яку проводили в ранкові години в умовах анестезії за методом С. Mitchell, Н. Willenbring [10]. Евтаназію тварин (5–6 тварин на кожену групу) здійснювали під легким ефірним наркозом на 0, 12-ту, 24-ту, 36-ту, 48-му, 72-гу год та 7-му добу (168 год) після проведення ЧГЕ. Тварин зважували, видаляли регенеровану частину печінки, яку використовували для подальшого аналізу.

Сироватку отримували шляхом центрифугування крові при 8000 g протягом 15 хв. Ступінь гострого ураження тканини печінки оцінювали за ферментативною активністю аланінамінотрансферази в сироватці крові, яку визначали за допомогою стандартного набору (“Фелісіт Діагностика”, Дніпропетровськ) відповідно до інструкції виробника і виражали в МО/л. Рівень глюкози визначали глюкозооксидазним методом за допомогою стандартного набору (“Фелісіт Діагностика”, Дніпропетровськ) відповідно до інструкції виробника і виражали в мг/дкл. Ступінь фрагментації ядерної ДНК клітин печінки оцінювали методом мікроелектрофорезу ДНК індивідуальних клітин (метод “ДНК-комет”) [11]. Для максимально об’єктивної оцінки пошкодженості ядерної ДНК розраховували показник “моменту хвоста” з використанням програми TriTek CometScore™. Статистичну обробку результатів проводили з використанням *t*-критерію Стьюдента. Вірогідною вважали різницю при $P < 0,05$.

Результати досліджень показали, що сигналізація ретиноїдів через канонічні рецептори РК необхідна для повноцінної регенеративної відповіді ураженої тканини печінки. Аналіз

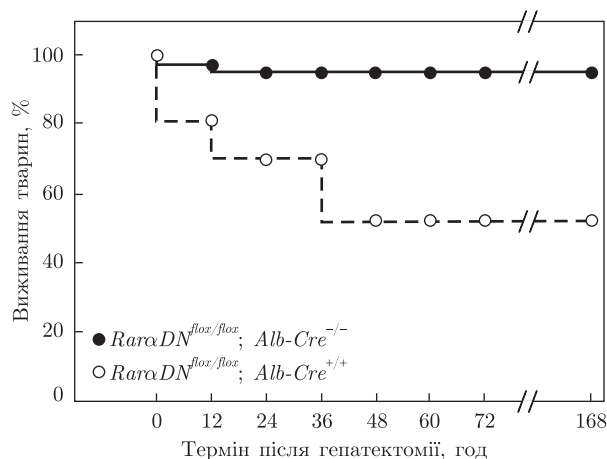


Рис. 2. Кумулятивна крива виживання тварин дослідної ($Rar\alpha DN^{flox/flox}; Alb-Cre^{+/+}$) і контрольної ($Rar\alpha DN^{flox/flox}; Alb-Cre^{-/-}$) груп після часткової гепатектомії

експериментальних даних засвідчив, що за умови 100% постопераційного виживання тварин обох груп вже на 12-ту год рівень летальності тварин дослідної групи становив 20%, досягаючи більше 50% через 2 доби (48 год). На противагу цьому виживання тварин контрольної групи знаходилося у межах експериментальної похибки та становило більше 95% (рис. 2).

Враховуючи високий рівень летальності тварин дослідної групи, в подальших дослідженнях ми сконцентрувалися на аналізі показників, отриманих у перші 2 доби після ЧГЕ, оскільки повнота метаболічної відповіді на гостре ураження печінки саме в цей період виявляється життєво важливою для організму. Реалізація первинного регенераційного сигналу спрямована передусім на активацію проліферативних процесів у частці печінки, що залишилася неушкодженою [3]. У результаті синхронного поділу кількість гепатоцитів протягом перших діб після гепатектомії повинна досягти величини, що відповідала б метаболічним потребам організму, а печінка — відновити порушений гомеостаз.

За даними аналізу постгепатектомійного відновлення паренхіми печінки встановлено зниження темпів її регенерації у тварин з порушеною канонічною сигналізацією ретиноїдів вже починаючи з 24-ї год. Водночас рівень відновлення паренхіми печінки тварин контрольної групи досягав вихідних величин (94%) вже на 72-гу год, у тварин з $RAR\alpha DN$ цей показник був нижчий на 26% і становив лише 60% доопераційної величини (рис. 3). Гістологічний аналіз регенеруючої печінки тварин дослідної групи показав наявність зон вогнищового некрозу вже через 24 год після ЧГЕ та значне статистично достовірне збільшення аланінамінотрансферазної активності в сироватці крові, що вказувало на глибокі порушення паренхіми. Аналіз ступеня фрагментації ядерної ДНК виявив ознаки її деградації в клітинах печінки тварин з активованою домінантною негативною формою α ізоформи рецептора РК, що виражалося в появі набору безладних фрагментів розмірами від 20 до 2,5 т. п. н. Водночас переважання комет S_3 і S_4 типу при проведенні мікроелектрофорезу ДНК гепатоцитів підтверджувало некротичний тип загибелі клітин регенеруючої печінки тварин з домінантною негативною α ізоформою RAR. У цій групі вже з 12-ї год після гепатектомії виявлялися комети з величиною моменту хвоста більше 50 мкм, а на 48-му год для більшої частини комет цей показник знаходився в діапазоні 100–200 мкм.

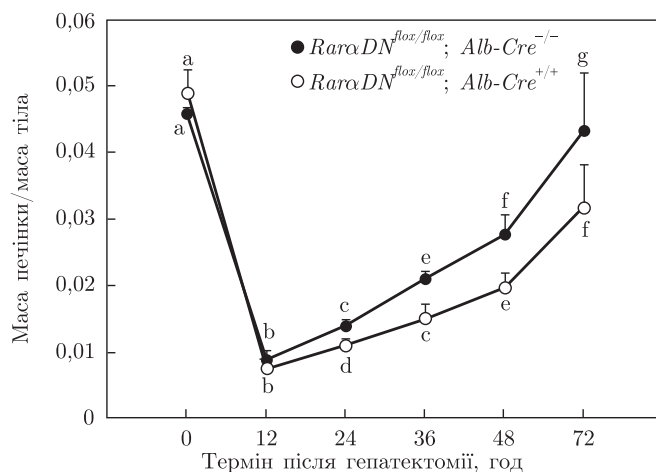


Рис. 3. Відновлення маси печінки у тварин дослідної ($RaraDN^{flox/flox}; Alb-Cre^{+/+}$) і контрольної ($RaraDN^{flox/flox}; Alb-Cre^{-/-}$) груп після часткової гепатектомії. Величини з буквеними індексами а-г — статистично достовірно відрізняються, $P < 0,05$

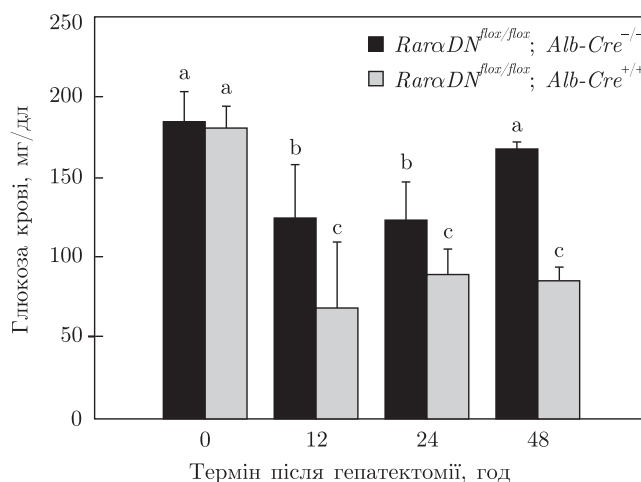


Рис. 4. Рівень глюкози в сироватці крові мишей після гепатектомії. Величини з буквеними індексами а, б, с статистично достовірно відрізняються, $P < 0,05$

Виявлене порушення регенераційних процесів супроводжувалося одночасним порушенням метаболічних функцій печінки. Характерною ознакою постопераційних метаболічних змін є розвиток енергетичної недостатності організму, що супроводжується гіпоглікемією вже у перші години після гепатектомії (рис. 4). Оскільки запаси глікогену після резекції 70% паренхіми печінки є обмеженими, значне навантаження лягає на глюконеогенез. Проте цей метаболічний шлях виявляється інгібованим, враховуючи пряму залежність експресії ключового ензиму глюконеогенезу фосфоенолпіруваткарбоксікінази від транскрипційної регуляції за прямою участю ретиноїдів [12]. Якщо у тварин контрольної групи рівень глюкози крові знижувався не більш ніж на 30% і повертався до вихідних значень через 48 год (див. рис. 4), у мишей з активованою домінантною негативною формою RAR цей показник зменшувався в три рази і не досягав навіть 50% доопераційної величини.

Отже, необхідною умовою для повноцінної регенерації печінки, викликаної ЧГЕ, є реалізація РК її сигнальної функції, опосередкованої взаємодією зі специфічними ядерними рецепторами, як складова регенеративної відповіді. Функціонування ретиноїдзалежного сигнального шляху за участю канонічних ядерних рецепторів РК є життєво важливим як для печінки при її гострому ураженні, так і для організму в цілому.

1. Fausto N., Campbell J. S., Riehle K. J. Liver regeneration // *Hepatology*. – 2006. – **43**, No 1. – P. 45–53.
2. Michalopoulos G. K. Liver regeneration after partial hepatectomy: critical analysis of mechanistic dilemmas // *Am. J. Pathol.* – 2010. – **176**. – P. 2–13.
3. Taub R. Liver regeneration: from myth to mechanism // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* – 2004. – **5**. – P. 836–847.
4. Bastien J., Rochette-Egly C. Nuclear retinoid receptors and the transcription of retinoid-target genes // *Gene*. – 2004. – **328**. – P. 1–16.
5. Balmer J., Blomhoff R. Gene expression regulation by retinoic acid // *J. Lipid Res.* – 2002. – **43**. – P. 1773–1808.
6. Blaner W. S., O'Byrne S. M., Wongsiriroj N. et al. Hepatic stellate cell lipid droplets: a specialized lipid droplet for retinoid storage // *Biochim. Biophys. Acta*. – 2009. – **1791**, No 6. – P. 467–473.
7. Shirakami Y., Lee S., Clugston R., Blaner W. Hepatic metabolism of retinoids and disease associations // *Ibid.* – 2012. – **1821**. – P. 124–136.
8. Damm K., Heyman R. A., Umesono K., Evans R. M. Functional inhibition of retinoic acid response by dominant negative retinoic acid receptor mutants // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 1993. – **90**. – P. 2989–2993.
9. Yanagitani A., Yamada S., Yasui S. Retinoic Acid Receptor & Dominant Negative Form Causes Steatohepatitis and Liver Tumors in Transgenic Mice // *Hepatology*. – 2004. – **40**, No 2. – P. 366–373.
10. Mitchell C., Willenbring H. A reproducible and well-tolerated method for 2/3 partial hepatectomy in mice // *Nat. Protoc.* – 2008. – **3**. – P. 1167–1170.
11. Камінський В. О., Луцик М. Д. Аналіз фрагментації ДНК індивідуальних клітин методом гель-мікроелектрофорезу: модифікація фарбування солями срібла для одержання постійних препаратів // *Укр. біохім. журн.* – 2005. – **77**, № 6. – С. 105–108.
12. McGrane M. M. Vitamin A regulation of gene expression: molecular mechanism of a prototype gene // *J. Nutr. Biochem.* – 2007. – **18**. – P. 497–508.

Чернівецький національний університет
ім. Юрія Федьковича

Надійшло до редакції 06.03.2013

И. А. Шмараков, Ю. Д. Морозевич, В. С. Бленер, М. М. Марченко

Биохимические аспекты сигнальной функции ретиноидов при регенерации печени

Исследована роль рецепторов ретиноевой кислоты и канонической сигнализации ретиноидов в регенерации печени. С использованием модели клеточно-специфической абляции рецепторов ретиноевой кислоты путем активации доминантной негативной изоформы (RAR α DN) показано, что необходимым условием для полноценной регенерации печени, вызванной частичной гепатэктомией, является реализация ретиноевой кислотой ее сигнальной функции, опосредованной взаимодействием со специфическими ядерными рецепторами, как составная регенеративного ответа. Функционирование ретиноидзависимого сигнального пути с участием канонических ядерных рецепторов ретиноевой кислоты жизненно важно как для печени при ее остром поражении, так и для организма в целом.

I. O. Shmarakov, Yu. D. Morozevich, W. S. Blaner, M. M. Marchenko

Biochemical aspects of retinoid signaling function during liver regeneration

The work is devoted to the role of retinoic acid receptors and retinoid canonical signaling in liver regeneration. Using a model of cell-specific ablation of retinoic acid receptors by activation of dominant negative isoform (RAR α DN), it is shown that an essential condition for a full liver regeneration caused by partial hepatectomy is the realization of retinoic acid signaling functions mediated by interaction with specific nuclear receptors as a component of regenerative response. Retinoid-dependent signaling pathway functioning, involving canonical nuclear retinoic acid receptors, is vital for the liver during its acute injury and organism as a whole.