

АКТИВНІСТЬ ІЗОФОРМ NO-СИНТАЗИ В ПЕЧІНЦІ ЩУРІВ ІЗ ТОКСИЧНИМ УРАЖЕННЯМ ПІСЛЯ ЧАСТКОВОЇ ГЕПАТЕКТОМІЇ

Кваліфікаційна робота

Рівень вищої освіти – перший (бакалаврський)

Виконала:

студентка 4 курсу, 400 А групи
спеціальності 091 Біологія

Андрійків Мар'яна Русланівна

Керівник:

кандидат біологічних наук,
асистент **Николайчук І.М.**

Анотація

Бакалаврська робота присвячена дослідженню активностей ізоформ NO-синтази та вмісту оксиду азоту в печінці щурів із токсичним ураженням після часткової гепатектомії.

Встановлено, що в здорових щурів після часткової гепатектомії підвищення вмісту оксиду азоту в мітохондріальній та цитозольній фракціях печінки відбувається на ранніх стадіях регенеративного процесу (24 та 48 год) переважно за рахунок активації конститутивної ізоформи NO-синтази.

Часткова резекція тканин печінки в тварин із токсичним ураженням ацетамінофеном супроводжується зростанням рівня NO в мітохондріальній фракції впродовж всього експериментального періоду з максимальними величинами на ранніх (24 год) та віддалених термінах (168 год) регенерації та одночасним підвищенням активності iNOS за даних умов.

У тварин із токсичним ураженням після часткової гепатектомії індукція зростання рівня NO в цитозольній фракції клітин печінки на ранніх (24 та 48 год) та аверсальних етапах (168 год) регенеративного процесу відбувається за рахунок посиленої активації індукцибельної NO-синтази на тлі зниження активності її конститутивної ізоформи.

Ключові слова: оксид азоту, NO-синтаза, печінка, ацетамінофен, часткова гепатектомія.

Annotation

The bachelor's thesis is devoted to the study of the activity of NO-synthase isoforms and the content of nitric oxide in the liver of rats with toxic damage after partial hepatectomy.

It was established that in healthy rats after partial hepatectomy, the increase in the content of nitric oxide in the mitochondrial and cytosolic fractions of the liver occurs at the early stages of the regenerative process (24 and 48 h) mainly due to the activation of the constitutive isoform of NO-synthase.

Partial resection of liver tissues in animals with toxic damage by acetaminophen is accompanied by an increase in the level of NO in the mitochondrial fraction throughout the entire experimental period, with maximum values at early (24 h) and long-term (168 h) regeneration and a simultaneous increase in iNOS activity under these conditions.

In animals with toxic damage after partial hepatectomy, the induction of an increase in the level of NO in the cytosolic fraction of liver cells at the early (24 and 48 h) and aversive stages (168 h) of the regenerative process occurs due to increased activation of inducible NO-synthase against the background of a decrease in the activity of its constitutive isoform.

Key words: nitric oxide, NO-synthase, liver, acetaminophen, partial hepatectomy.

Кваліфікаційна робота містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів наукових досліджень інших авторів мають посилання на відповідне джерело.

_____ **М.Р. Андрійків**

(підпис)

ЗМІСТ

ВСТУП.....	5
РОЗДІЛ І. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	7
1.1. Біохімічні особливості регенерації печінки.....	7
1.1.1. Регенерація після часткової гепатектомії.....	7
1.1.2. Регенерація печінки після гострого токсичного ураження.....	10
1.2. Структура та функції ізоформ NO-синтаз.....	12
1.3. Біологічна роль оксиду азоту при регенерації печінки.....	17
РОЗДІЛ ІІ. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	21
2.1. Об'єкти та матеріали досліджень.....	21
2.2. Одержання мітохондріальної фракції.....	22
2.3. Отримання цитозольної фракції.....	23
2.4. Визначення активності ізоформ NO-синтази.....	23
2.5. Визначення вмісту оксиду азоту.....	24
2.6. Статистичне опрацювання даних.....	25
РОЗДІЛ ІІІ. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ.....	26
ВИСНОВКИ.....	41
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	42
ДОДАТКИ.....	48

ВСТУП

Резекція та трансплантація печінки є найбільш ефективним методом лікування первинних і вторинних пухлин печінки, зокрема гепатобіліарної карциноми [1]. Як вирішення проблеми з відсутністю донорів органів, можливо часткове донорство печінки від живого донора через високий регенеративний потенціал печінки. Це явище регенерації печінки розвинулося для захисту організмів від природної втрати печінки, яка може бути спричинена харчовими токсинами або травмою [2].

Дослідження щодо регенерації печінки проводилися протягом останніх десятиліть, щоб виявити її механізм, однак це не повністю зрозуміло [3]. Найчастіше використовуваною експериментальною моделлю для вивчення регенерації печінки є часткова гепатектомія (ЧГ) на мишах або щурах, акуратно видаляючи 2 із 5 чітко сформованих часток печінки [4]. Зрілі гепатоцити, які раніше перебували в стані спокою у фазі G_0 , можуть проліферувати, щоб відновити масу печінки, виконуючи всі свої основні функції. Цей процес індукується надлишковою сигнальною мережею, що складається з мітогенних цитокінів, факторів росту та метаболічних факторів.

Оксид азоту (NO) є багатофункціональною сигнальною молекулою, яка бере участь у нейронній передачі, валідації судин та імунній відповіді. Ендогенний синтез NO відбувається за участю як ферментативних, так і неферментативних систем [5]. Ензиматичне утворення NO каталізується синтазою оксиду азоту (EC 1.14.13.39, NOS) шляхом п'ятиелектронного окиснення амінокислоти L-аргініну до L-цитруліну, утворюючи один еквівалент NO у присутності молекулярного кисню та NADPH [6].

На сьогодні ідентифіковано три ізоформи NOS: нейрональна NOS (NOS1 або nNOS), індукцйбельна NOS (NOS2 або iNOS) та ендотеліальна NOS (NOS3 або eNOS). NOS1 і NOS3 – конститутивні ферменти, які контролюються наявністю внутрішньоклітинного Ca^{2+} /кальмодулін. NOS2 є індукцйбельним ензимом, котрий регулюється на рівні транскрипції генів і експресується у відповідь на запальні або прозапальні медіатори [7]. NO,

синтезований NOS3 в ендотелії, вважається основним джерелом оксиду азоту для регуляції вазоактивності. NO також може бути синтезований мітохондріальною синтазою оксиду азоту (mtNOS), але існування mtNOS все ще обговорюється [8].

Будучи газоподібною молекулою, що швидко дифундує, фізіологічні функції NO значною мірою залежать від концентрації, часу та місця розташування. Протягом останніх років неодноразово повідомлялося про його суперечливу роль у різних фізіологічних і патологічних станах. При низьких концентраціях ($< 1\text{--}30$ нмоль) NO функціонує переважно через цГМФ-залежний шлях. Активація розчинної гуанілілциклази запускає каскад реакцій, що призводить до судинорозширювальних та ангіогенних ефектів, загальних для NO. Коли концентрація NO зростає, даний метаболіт індукує фосфорилування протеїнкіназ, які згодом можуть ініціювати захист від апоптозу. Тоді як концентрації NO < 100 нмоль призводять до захисту від апоптозу, ефекти NO в концентраціях > 400 нмоль викликають проапоптотичні реакції. Наприклад, фосфорилування p53, регулятора клітинного циклу, відбувається при підвищених концентраціях NO і призводить до активації білка та подальшої зупинки клітинного циклу. Концентрації NO, що наближаються та перевищують 1 мкмоль, так само призводять до апоптичних ефектів через нітрозилювання протеїнів [9].

Функцію NO у регенерації печінки вивчали на моделях трансгенних мишей. Mei та ін. повідомили, що eNOS необхідна для опосередкованого рецептором епідермального фактора росту (EGFR) під час прогресування клітинного циклу після гепатектомії [10].

Тому **метою роботи** дослідження активності ізоформ NO-синтази та вмісту оксиду азоту в клітинах печінки щурів із токсичним ураженням ацетамінофеном після часткової гепатектомії.

РОЗДІЛ I. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Біохімічні особливості регенерації печінки

1.1.1. Регенерація після часткової гепатектомії

Регенерація печінки після втрати печінкової тканини має вирішальне значення для відновлення гомеостатичної функції органу. Втрата маси печінки може бути викликана введенням гепатотоксисів (наприклад, чотирихлористого вуглецю, ацетамінофену тощо). Після цього відбувається запальна реакція, яка видаляє залишки тканини, а потім регенеративна реакція. Однак найчастіше регенерацію печінки вивчають шляхом виконання хірургічної процедури, під час якої видаляють 2/3 маси печінки у гризунів (щурів і мишей). Такий метод відомий як часткова гепатектомія (ЧГ) [11].

Через багаточасткову структуру печінки гризунів три з п'яти часток печінки (що становлять 2/3 маси печінки) можна видалити легкою хірургічною процедурою, не завдаючи жодних пошкоджень тканинам двох залишкових часток. Останні збільшуються в розмірі, щоб відновити сукупність, еквівалентну масі початкових п'яти часток. Процес у щурів і мишей завершується протягом 5-7 днів після операції [12]. Відтворюваність ЧГ із точки зору видаленої маси та точність визначення часу послідовності наступних подій зробила часткову резекцію кращим підходом для експериментального дослідження регенерації печінки. У клінічних умовах ця процедура також виконується на людях, щоб видалити поодинокі метастази в печінці або відновити функції після травми тощо [13].

Після часткової гепатектомії існує швидка та синхронізована компенсаторна регенеративна відповідь у решті тканини, яка збільшує кількість клітин і відновлює функцію органу. ЧГ запускає послідовність подій, які відбуваються впорядковано і можуть спостерігатися від перших 5 хвилин до 5-7 днів. Гепатоцити є першими клітинами, які беруть участь у синтезі ДНК. 2/3 часткової резекції печінки залишає залишкову 1/3 гепатоцитів. Вони проходять один раунд синтезу ДНК (що призводить до відновлення 60% гепатоцитів), пік якого досягається через 24 години для щурів і приблизно

через 36 годин для мишей. Другий менший відсоток клітин вступає в другий раунд синтезу ДНК і створює вихідну кількість гепатоцитів. Невелика хвиля апоптозу гепатоцитів, яка спостерігається наприкінці синтезу ДНК, свідчить про те, що це механізм корекції надмірної регенеративної відповіді [14].

Однією вагомою характеристикою регенераційного процесу після ЧГ є здатність печінки рости до повного відновлення розміру та функціональності органу. Таким чином широко визнано існування точної схеми подій (вивільнення та модуляція факторів росту та цитокінів), що контролюють послідовні етапи регенерації після часткової гепатектомії [15].

Часткова гепатектомія призводить до швидкої індукції більш ніж 100 генів, які не експресуються в нормальній печінці. Ці гени прямо чи опосередковано пов'язані з підготовчими подіями для входження гепатоцитів у клітинний цикл. Точна роль багатьох генів, що експресуються на ранній стадії регенерації печінки, не завжди зрозуміла, і ранні зміни в експресії генів слід розглядати як такі, що служать входженню гепатоцитів у клітинний цикл, а також моделюванню специфічних коригувань, які гепатоцити повинні зробити, щоб вони могли виконувати всі основні функції печінки під час проліферації клітин [16].

Події, що відбуваються в ранній період 0-1 год після ЧГ, часто називають «праймінгом». Цей термін є корисним, оскільки він позначає не лише події, пов'язані з підготовкою до входу в клітинний цикл, але також події та стратегії гепатоцитів, спрямовані на модифікацію моделей експресії генів, щоб вони продовжували виконувати свої гомеостатичні функції. Під час цієї фази початкові фактори включають інтерлейкін-6 (IL-6) і фактор некрозу пухлини альфа (TNF- α). Після зв'язування IL-6 з рецептором gp130 відбувається активація STAT3 і C/EBP бета/ядерного фактора-IL-6. Обидва цитокіни TNF- α та IL-6 запускають перехід G₀/G₁ у клітинному циклі. Тварини з дефіцитом IL-6 і TNFR1 не можуть досягти ініціації та регенераційної відповіді. Іншою зміною в найближчі години після ЧГ є індукція синтази оксиду азоту *in vivo* та вивільнення оксиду азоту (NO) [17].

Після праймування/ініціації протягом 2 годин індукуються кілька генів безпосередньої ранньої фази, пов'язаних з проліферацією гепатоцитів. До їх складу входять *c-fos*, *c-jun* тощо. Прогресування праймінгових/компетентних гепатоцитів через G_1 і подальша реплікація залежить від передачі сигналу, опосередкованого фактором росту гепатоцитів (HGF), трансформуючим фактором росту альфа (TGF α) і епідермальним фактором росту (EGF) іншим. Потім просування в клітинному циклі регулюється експресією циклінів і циклінзалежної кінази [16, 17].

Під час регенерації гіпертрофія гепатоцитів є першою відповіддю, а потім проліферація неепітеліального відділу (гіперплазія). Однак резецовані частки ніколи не відростають. Найбільш поширеним показанням до часткової гепатектомії є резекція первинної або вторинної пухлини печінки. Серед первинного раку печінки найбільш поширеною є гепатоцелюлярна карцинома, за якою слідує внутрішньопечінкова холангіокарцинома. Крім того, печінка є типовим місцем метастазування інших пухлин, переважно шлунково-кишкового походження. Під час гепатектомії, оскільки обсяг залишків печінки зменшується, ризик критичної печінкової недостатності зростає [18]. Тому резекція у пацієнтів із уже порушеною функцією печінки (наприклад, вірусний гепатит) є складною, а іноді навіть нездійсненною.

На регенерацію печінки впливає багато факторів. Відновлення інтактного кровотоку має вирішальне значення для регенерації печінки. Іншим важливим чинником регенерації після гепатектомії є використання пострезекційного лікування. Деякі з цих методів лікування спрямовані на кровопостачання пухлини і, отже, можуть також перешкоджати регенераційному потенціалу решти частини печінки, оскільки ці методи лікування часто неспецифічні. Інші важливі фактори, що беруть участь у стимулюючому ефекті регенеративної відповіді під час гепатектомії, включають жовчні кислоти, фактор некрозу пухлини-альфа, епідермальний фактор росту, фактор росту гепатоцитів, трансформуючий фактор росту альфа, інсулін та інтерлейкін-6 [19].

Згідно з регуляторною роллю макрофагів печінки, більшість цих стимулюючих цитокінів і факторів росту в основному секретуються макрофагами. Навпаки, кількість стеатозу визнається як негативний вплив на результат пацієнта. Регенерація у людей після гепатектомії також може спостерігатися після трансплантації живого донора. Ця процедура була реалізована через дефіцит донорських органів, при якій частина печінки дорослої людини трансплантується іншій дитині чи дорослому. Цікаво, що два дослідження показали, що регенерація з точки зору об'єму печінки була найбільш значною протягом перших двох тижнів після трансплантації, а приблизний максимальний об'єм печінки був досягнутий лише через два місяці. Цікаво, що печінка реципієнтів регенерувала швидше порівняно з печінкою донора [20].

1.1.2. Регенерація печінки після гострого токсичного ураження

У клінічних умовах гостре ураження печінки часто супроводжується пошкодженням печінки, печінковою енцефалопатією та порушенням синтезу білка. Гостра недостатність може бути спричинена різними причинами, найпоширенішими з яких є: інтоксикація ацетамінофеном (N-ацетил-пара-амінофенол), вірусні інфекції (гепатити А, В та Е), алкогольний гепатит та аутоімунний гепатит [21]. Інтоксикація ацетамінофеном є найпоширенішою причиною в західних країнах. Ця гепатотоксичність, викликана ліками, є складним процесом через взаємодію між залежними від часу та дози взаємодіями. Гостра печінкова недостатність після інтоксикації характеризується «гепатитом» із загибеллю клітин гепатоцитів, переважно в центролобулярній ділянці печінки людини, і часто супроводжується помітною інфільтрацією клітин Купфера, навантажених цероїдом. Безсумнівно, що ці макрофаги відіграють важливу роль у патогенезі і, отже, регенерації інтоксикації ацетамінофеном [22].

В іншому випадку гостра печінкова недостатність, викликана вірусним гепатитом, часто спостерігається при дифузному пошкодженні печінки без

типового зонального розподілу. Лікування пацієнтів із гострою печінковою недостатністю часто є підтримуючим і потребує спеціального лікування з урахуванням основної причини. Однак деякі пацієнти прогресують до стадії, коли спонтанне відновлення печінки вже неможливо, і трансплантація стає необхідною. Як правило, важливими факторами, пов'язаними з поганим результатом і, отже, меншою вірогідністю подолання (регенерації) гострої травми, є етіологія гострої печінкової недостатності, старший вік пацієнта та наявність печінкової енцефалопатії [21].

Початкова регенеративна реакція, викликана в умовах гострої печінкової недостатності, в основному забезпечується залишковими гепатоцитами. Лише коли ушкодження є стійким або ушкоджується значна частина гепатоцитів, клітини-попередники у каналі Герінга починають інтенсивно розмножуватися, щоб компенсувати цю масивну втрату гепатоцитів. Активація клітин-попередників розглядається як дуктулярна реакція, яка намагається підтримувати критичні функції печінки. Дослідження з використанням зразків гострої печінкової недостатності людини показало, що поріг у 50 % втрати гепатоцитів пов'язаний зі значним зниженням проліферативної здатності решти гепатоцитів. Цей поріг був необхідний для повної активації компартменту клітин-попередників. Активація дуктулярної реакції спостерігалася протягом першого тижня після травми. Однак диференціація активованих клітин-попередників у бік проміжних гепатоцитів і дорослих гепатоцитів була помічена лише опісля одного тижня після пошкодження. Ці проміжні гепатоцити мають проміжний розмір і все ще експресують деякі маркери клітин-попередників, але поступово втрачають ці маркери в процесі дозрівання. Ці знахідки свідчать про те, що клітини-попередники активуються та диференціюються до зрілих та функціональних гепатоцитів. Цікаво, що сигнальний шлях Wnt/ β -катеніну має величезне значення для гепатоцелюлярної регенерації. Дослідження показало, що сигнальний шлях Wnt/ β -катеніну активний у дуктулярній реакції пацієнтів із гострою печінковою недостатністю, на відміну від шляху Notch [23].

Відповідно, активація сигнального шляху Wnt/ β -катеніну показана під час регенерації гепатоцитів у мишей після лікування парацетамолом. Під час іншого клініко-патологічного дослідження пошкодження, спричиненого ацетамінофеном, пацієнти продемонстрували значну кореляцію між імуногістохімічним фарбуванням ядерного β -катеніну та індукцією гепатоцелюлярної регенерації [24].

Окрім того, не можна нехтувати впливом запального середовища на регенеративний процес. Екстенсивна оцінка імунної відповіді при пошкодженні АРАР печінки людини показала виснаження циркулюючих моноцитів та інфільтрацію печінкових макрофагів у некротичних ділянках. Виснаження моноцитів було найбільш поширеним у пацієнтів із гіршим результатом [21].

1.2. Структура та функції ізоформ NO-синтаз

Оксид азоту (NO) – це ендогенно утворений газ, який синтезується майже в усіх типах клітин, тканинах і органах. NO синтезується трьома ізоформами NO-синтаз (EC 1.14.13.39) на двох окремих стадіях монооксигенації, а саме нейрональною (nNOS або NOS1), індукцибельною (iNOS або NOS2) та ендотеліальною (eNOS або NOS3). Ці ізоформи демонструють характерні для типу клітин та тканин моделі експресії.

Усі три ізоформи використовують L-аргінін як субстрат, молекулярний кисень і NADPH як косубстрати. Зазначені ізоформи також використовують флавінаденіндинуклеотид (FAD), флавінмононуклеотид (FMN) і (6R)5,6,7,8-тетрагідро-L-біоптерин (BH4) як кофактори [25].

Усі білки NOS є гомодимерами. Функціональна NOS переносить електрони від NADPH через флавіни FAD і FMN у С-кінцевому домені редуктази до гему в N-кінцевому оксигеназному домені. Домен оксигенази також зв'язує основний кофактор BH4, молекулярний кисень і субстрат L-аргінін. У ділянці гему електрони використовуються для відновлення та активації O₂ і окиснення L-аргініну до L-цитруліну та NO. Послідовності,

розташовані поблизу цистеїнового ліганду гему, очевидно, також беруть участь у зв'язуванні L-аргініну та біоптерину.

Щоб синтезувати NO, фермент NOS проходить два етапи. На першому етапі NOS гідроксидує L-аргінін до N^ω-гідрокси-L-аргініну (який залишається значною мірою зв'язаним з ферментом). На другому етапі NOS окислює N^ω-гідрокси-L-аргінін до L-цитруліну та NO.

Декілька факторів регулюють ферментативну активність NOS, включаючи біодоступність субстрату та кофактора, рівні кальцію, рівні білка та димеризацію, а також посттрансляційні модифікації. Усі ізоформи NOS зв'язують кальмодулін. У nNOS та eNOS зв'язування кальмодуліну відбувається за рахунок збільшення внутрішньоклітинного Ca²⁺ (напівмаксимальна активність між 200 і 400 нмоль). Коли спорідненість кальмодуліну до NOS збільшується, це полегшує потік електронів від NADPH у редуктазному домені до гему в оксигеназному домені. У індукцйбельній NOS кальмодулін вже зв'язується при надзвичайно низьких внутрішньоклітинних концентраціях Ca²⁺ (нижче 40 нмоль) через іншу амінокислотну структуру сайту зв'язування кальмодуліну [26].

Усі білки NOS містять цинк-тіолатний кластер, утворений іоном цинку, тетраедрично скоординованим з двома мотивами CysXXXXCys (по одному вносить кожен мономер) на межі розділу димеру NOS. Цинк у NOS виконує структурну, а не каталітичну функцію.

NO, утворений NOS, може діяти на низку цільових ферментів і білків. Найважливішим фізіологічним сигнальним шляхом, стимульованим оксиду азоту, є активація розчинної гуанілатциклази та генерація циклічного GMP [25].

Нейрональна NO-синтаза. Нейрональна NOS конститутивно експресується в специфічних нейронах мозку. Активність ферменту регулюється Ca²⁺ і кальмодуліном. nNOS головного мозку зустрічається в клітинах у вигляді частинок і розчинних форм, а диференціальна субклітинна локалізація nNOS може сприяти її різноманітним функціям. NOS нейронів містить домен PDZ і може безпосередньо взаємодіяти з доменами PDZ інших

білків. Ці взаємодії визначають субклітинний розподіл і активність ферменту. Окрім тканини головного мозку, nNOS ідентифіковано за допомогою імуногістохімії в спинному мозку, симпатичних гангліях і надниркових залозах, в епітеліальних клітинах різних органів, у клітинах острівців підшлункової залози та гладкій мускулатурі судин. У ссавців найбільшим джерелом nNOS з точки зору тканинної маси є скелетні м'язи.

Нейрональна NOS бере участь у модулюванні фізіологічних функцій, таких як навчання, пам'ять і нейрогенез. У центральній нервовій системі nNOS опосередковує довгострокову регуляцію синаптичної передачі [27].

Ендотеліальна NO-синтаза. Ендотеліальна NOS в основному експресується в ендотеліальних клітинах. Проте ізофермент також був виявлений у серцевих міоцитах, тромбоцитах, певних нейронах головного мозку, у синцитіотрофобластах плаценти людини та епітеліальних клітинах ниркових каналців.

Подібно до nNOS, Ca^{2+} -активований кальмодулін важливий для регуляції активності eNOS. Ендотеліальна NOS синтезує NO пульсуючим чином, при цьому активність eNOS помітно зростає, коли внутрішньоклітинний Ca^{2+} підвищується. Ca^{2+} індукує зв'язування кальмодуліну з ферментом. Проте кілька інших білків також взаємодіють з eNOS і регулюють її активність. Наприклад, виявлено, що білок теплового шоку 90 (hsp90) асоціюється з eNOS і виступає алостеричним модулятором, активуючи фермент і сприяючи (повторному) з'єднанню eNOS. Фракція eNOS, яка локалізована в кавеолах може взаємодіяти з білком оболонки кавеоли – кавеоліном-1. Кавеолін-1 є тонізуючим інгібітором активності eNOS. Ця концепція доведена генетично, оскільки кровоносні судини мишей з дефіцитом кавеоліну-1 демонструють посилене ендотелій-залежне розслаблення. Механічно залучення кальмодуліну та hsp90 до eNOS може витіснити кавеолін-1 із ферменту, що призведе до активації ферменту [28].

Однак eNOS також може бути активована стимулами, які не призводять до тривалого збільшення внутрішньоклітинного Ca^{2+} , але все ще індукують

тривале вивільнення NO. Ця активація опосередковується фосфорилюванням ферменту. Білок eNOS може бути фосфорилюваний за кількома залишками серину (Ser), треоніну (Thr) і тирозину (Tyr). Фосфорилювання Ser1177 стимулює потік електронів у домені редуктази, підвищує чутливість ферменту до Ca^{2+} і є додатковим і незалежним механізмом активації eNOS [26].

Ендотеліальна NOS є гомеостатичним регулятором багатьох основних серцево-судинних функцій. NO, отриманий з ендотеліальної NOS, розширює всі типи кровоносних судин, стимулюючи розчинну гуанілатциклазу та збільшуючи рівень циклічного GMP у гладком'язових клітинах. Оксид азоту, що виділяється в просвіт судин, є потужним інгібітором агрегації тромбоцитів і адгезії до судинної стінки. Окрім захисту від тромбозу, це також запобігає вивільненню тромбоцитарних факторів росту, які стимулюють проліферацію гладкої мускулатури [29].

Індуцибельна NO-синтаза. Індуцибельна NOS зазвичай не експресується в клітинах, але її експресія може бути індукована бактеріальним ліпополісахаридом, цитокінами та іншими агентами. Хоча в основному ідентифікується в макрофагах, експресію ферменту можна стимулювати фактично в будь-якій клітині або тканині за умови, що відповідні індукуючі агенти були ідентифіковані. Після експресії iNOS постійно активна і не регулюється внутрішньоклітинними концентраціями Ca^{2+} [26].

Індукована NOS виробляє велику кількість NO, який є основним цитотоксичним метаболітом. Завдяки своїй спорідненості із залізом, зв'язаним з білками, NO може пригнічувати активність ключових ферментів, які містять залізо в своїх каталітичних центрах. До них належать залізо-сірчано-залежні ферменти (комплекси I і II), що беруть участь у мітохондріальному транспорті електронів, рибонуклеотидредуктаза (фермент, що обмежує швидкість реплікації ДНК) і цис-аконітаза (ключовий фермент у циклі лимонної кислоти).

Окрім того, вищі концентрації NO, які виробляються індукованими макрофагами, можуть безпосередньо впливати на ДНК клітин-мішеней і

викликати розриви та фрагментацію ланцюгів. Поєднання цих ефектів, ймовірно, лежить в основі цитостатичної та цитотоксичної дії NO на паразитарні мікроорганізми та певні пухлинні клітини. Цікаво, що неімунні клітини також можна спонукати цитокінами вивільняти кількість NO, достатню для впливу на сусідні клітини. Наприклад, показано, що активовані цитокінами ендотеліальні клітини лізують пухлинні клітини, а індуковані гепатоцити можуть використовувати NO для знищення спорозоїтів малярії [29].

Високий рівень NO, що виробляється активованими макрофагами (і, ймовірно, нейтрофілами та іншими клітинами), може бути не тільки токсичним для небажаних мікробів, паразитів або пухлинних клітин, але, коли виділяється в неправильному місці, може також завдати шкоди здоровим клітинам.

In vivo пошкодження клітин і тканин може бути пов'язане з самим радикалом NO або взаємодією NO з супероксидом (O_2^-), що призводить до утворення пероксинітриду ($ONOO^-$). Переважна більшість запальних та аутоімунних уражень характеризується великою кількістю активованих макрофагів і нейтрофілів. Ці клітини можуть виділяти значну кількість NO, що призводить до пошкодження навколишніх тканин [30].

Мітохондріальна NO-синтаза. У 1997 році Гафуріфар і Ріхтер припустили існування мітохондріальної NOS (mtNOS). Початкові звіти приписували mtNOS як варіант eNOS, а потім твердження про варіант iNOS, nNOS або зовсім неспорідненого ферменту [29].

Мітохондріальний геном не містить звичайного гена NOS, тому, якщо NOS присутня в мітохондріях, вона повинна бути переміщена за допомогою визначених транспортних систем у мітохондрії з цитоплазми. Однак немає доказів того, що звичайні ізоформи NOS мають транспортні послідовності, необхідні для проходження через внутрішню мітохондріальну мембрану. Тим не менш, деякі, але не всі дослідження надали докази того, що мітохондріальний варіант, названий mtNOS, може бути присутнім на внутрішній мітохондріальній мембрані або в матриксі. З іншого боку, звичайні

ізоформи NOS можуть бути пов'язані із зовнішньою мітохондріальною мембраною та являти собою альтернативне, зовнішньо регульоване джерело NO всередині мітохондрій.

Декілька дослідників намагалися визначити, чи є mtNOS незалежною генною одиницею чи продуктом трьох звичайних генів, що кодують NOS. Джуліві та його колеги використовували анти-iNOS та анти-nNOS антитіла для виявлення mtNOS. Цей білок 130 кДа значно менший, ніж очікується від nNOS, хоча сканування маси білка показало, що це альфа-ізоформа nNOS. Ще більше ускладнило проблему виявлення смуги мітохондріального білка 130 кДа з тими самими антитілами, які збереглися у мишей з нокаутом nNOS (неопубліковані спостереження Lasza та його колег).

Канаї та його колеги також використовували нокаutowаних тварин, щоб знайти молекулярну ідентичність mtNOS. Вони виміряли активність NOS в ізольованих мітохондріях серця за допомогою електрохімічного електроду та помітили, що активність була відсутня у мишей з нокаутом nNOS- α . Однак ці спостереження не були підтверджені прямим виявленням білка nNOS у мітохондріях. Використовуючи різні антитіла, кілька груп показали NOS-подібні смуги в препаратах мітохондрій без будь-якого переконливого загального результату.

Дослідження Бейтса та його колег вперше повідомили про імунореактивність eNOS у внутрішній мітохондріальній мембрані, і ці результати пізніше були відтворені незалежними дослідниками. Ці дослідники використовували імунозолоту електронну мікроскопію, яка лише показала наявність eNOS-подібного білка в мітохондріях у фіксованих препаратах. Підтверджувальні докази функціональної активності mtNOS були отримані за допомогою електронної мікроскопії шляхом виявлення активності NADPH-діафрази в мітохондріях. Пізніше повідомлялося про iNOS-подібну імунореактивність у мітохондріальних препаратах, і ці дослідження також представили дані, які вказують на те, що NO дійсно генерується ізольованими мітохондріальними препаратами [31].

Матрикс мітохондрій містить декілька ферментів, що споживають L-аргінін, які можуть ефективно конкурувати з гіпотетичною mtNOS за його субстрат, тим самим доводячи несприятливе середовище для NOS. Мітохондрії беруть участь у циклі сечовини і тому містять декілька ферментів, що метаболізують L-аргінін. Зовнішня мітохондріальна мембрана не є перешкодою для дифузії таких сполук, як L-аргінін. L-аргінін потрапляє в матрикс за допомогою специфічного транспортного процесу, який каталізується білком-транспортером аргініну у внутрішній мембрані. Усередині матриксу L-аргінін перетворюється на орнітин і цитрулін ферментами циклу сечовини, а потім ці метаболіти перетворюються назад на аргінін у цитозолі. Альтернативна доля L-аргініну може включати його перетворення на NO та L-цитрилін за допомогою mtNOS. Однак кінетика цих двох шляхів сприяє циклу сечовини навіть в умовах, оптимізованих для активності NOS, і в присутності інгібіторів аргінази. Таким чином, аргіназна активність препаратів мітохондрій печінки все ще на 1–2 порядки перевищує передбачувану активність mtNOS (неопубліковані результати) [31].

1.3. Біологічна роль оксиду азоту при регенерації печінки

За нормальних умов у печінці присутня лише конститутивна eNOS, а низький рівень NO, що виробляється eNOS, регулює печінкову перфузію. Проте iNOS легко регулюється в печінці за ряду станів, включаючи ендотоксемію, геморагічний шок, ішемію-реперфузію, сепсис, інфекцію, гепатит та регенерацію печінки. Після експресії iNOS у печінці постійно утворюється велика кількість NO, яка функціонує як важливий регулятор і ефектор під час запалення та інфекції. Оскільки печінка відіграє вирішальну роль у будь-яких метаболічних та імунних процесах, фізіологічні та патофізіологічні функції NO, що утворюється в печінці, спонукали до численних досліджень в останні роки. У печінці продемонстровано як цитопротекторну, так і цитотоксичну дію NO [32].

Однією чудовою характеристикою регенераційного процесу після ЧГ є здатність печінки рости до повного відновлення розміру та функціональності органу. Тому широко визнано існування точної схеми подій (вивільнення та модуляція факторів росту й цитокінів), що контролюють послідовні регенеративні етапи після часткової гепатектомії. Однак природа факторів і ранніх сигналів, пов'язаних із рекрутуванням клітин для входу в клітинний цикл поділу, ще далеко не повністю вивчена. Сучасний погляд базується на існуванні динамічного балансу між позитивним і негативним контролем. Рівновага між геном стимулятора та інгібітора клітинного циклу, що експресується після ЧГ, може пояснити, чому регенерація печінки є жорстко регульованим процесом росту. Протягом 30 хвилин після ЧГ індуються кілька генів, які сприяють регенерації. Серед цих генів відомі перетворювач сигналу та активації транскрипції-3 (STAT3), ядерний фактор κB (NF- κB), ССААТ/енхансер зв'язуючий білок β (C/EBP β) і активуючий білок 1 (AP-1), які відіграють спільну роль у внутрішньоклітинних сигнальних каскадах, що призводять до синтезу ДНК [12]. Ці фактори транскрипції регулюють експресію багатьох генів гепатоцитів, включаючи iNOS, яка регулюється протягом найближчих годин після ЧГ. NO починає вивільнятися впродовж 30 хвилин після часткової гепатектомії, досягаючи свого максимального рівня через 5 годин (фаза прогресування клітинного циклу) і повертаючись до базальних рівнів через 18 годин після операції. У зв'язку з цим групою науковців продемонстровано помітне зниження піку синтезу ДНК у гепатектомованих щурів, коли їм попередньо вводили два інгібітори iNOS (специфічний інгібітор, аміногуанідин, і неспецифічний, N G -мо-нометил-L -аргінін, L-NAME). Подібним чином *Rai* та ін. показали порушення регенерації печінки у мишей з дефіцитом iNOS. Ці результати свідчать про позитивний вплив NO на регуляцію регенеративного процесу на ранніх стадіях [33].

Цікаво, що цей NO, здається, доставляється виключно в печінці, і, очевидно, молекула повністю споживається в печінковій тканині. Цей висновок підтверджується спостереженням повної відсутності NO в крові, що

вимірюється через утворення нітроксил-гемоглобінового комплексу, а також відсутністю змін концентрації нітриту в плазмі, метаболіту, отриманого з NO, який є більш стабільний, ніж сам NO. Після ЧГ як печінкова активність iNOS, так і рівні інформаційної РНК iNOS були виявлені виключно в печінці, що вказує на те, що це місцевий ефект. Відносний внесок кожного типу клітин печінки (клітин Купфера, гепатоцитів і, можливо, ендотеліальних клітин) до загальної активності iNOS і синтезу NO, здається, відрізняються. Однак, оскільки NO може легко дифундувати через клітини, походження цієї молекули не є критичним для здатності сприяти внутрішньоклітинним змінам у сусідніх клітинах [34].

Докази свідчать про важливість цитокінів під час регенерації печінки. Коли великий шматок печінки видаляється за допомогою ЧГ, посилена локальна експресія TNF-а запускає вироблення іншого цитокіну, IL-6, і обидва цитокіни необхідні для ініціації подальшої проліферації гепатоцитів. Аналіз *in vivo* мишачих генів iNOS показує, що ні TNF-а, ні IL-6 самі по собі не є достатніми для активації транскрипції iNOS, але коли ці два цитокіни поєднуються, відбувається активація [35].

РОЗДІЛ II. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Об'єкти та матеріали досліджень

У даному дослідженні використовували 12-тижневих білих безпородних щурів із масою 130-160 г. Тварин поміщали в пластмасові клітки з дерев'яною попередньо простерилізованою стружкою в кімнаті з 12-годинним циклом світло/темрява в умовах віварію кафедри біохімії та біотехнології ЧНУ ім. Ю. Федьковича.

Обмежень у харчуванні не було, щури знаходились на стандартному раціоні віварію. На основі положень «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та наукових цілей» (Страсбург, 1986) та «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», ухвалених Шостим національним конгресом з біоетики (Київ, 2016), усі процедури під час експериментів на тваринах відповідали біоетичним нормам.

Моделювання гострого токсичного ураження печінки здійснювали, використовуючи ксенобіотик медикаментозного походження – парацетамол (ацетамінофен). Ацетамінофен вводили дослідним тваринам перорально за допомогою зонда у дозі 1250 мг/кг маси тіла тварини 1 раз на день впродовж 2 діб. Розчин парацетамолу готували у вигляді 1 % суспензії крохмального гелю [36, 37].

Щури за методом *Mitchell & Willenbring* [38] підлягали частковій гепатектомії, основою чого була резекція 2/3 тканини печінки після почергового перев'язування хірургічним шовком та резекції лівої латеральної та медіальної часток печінки (рис. 2.1.1).

ЧГ здійснювали переважно в ранковий час доби (7.30-8.00) в умовах анестезії. Після проведення хірургічних утручань тварин спочатку розміщували по одній особині в клітці, а вже через добу – по 3 особини.



Рис. 2.1.1. Схема почергового перев'язування та резекції часток печінки

У ході експерименту тварин поділили на 2 групи:

1 – здорові щури, яким проводили часткову резекцію тканин печінки (*К/ЧГ*);

2 – щури з токсичним ураженням ацетамінофеном, яким проводили часткову гепатектомію (*ТУ/ЧГ*);

Щурів умертвляли методом цервікальної дислокації під легким ефірним наркозом для забору зразків крові та тканин через 24 (фаза ініціації), 48 (період активної проліферації клітин), 72 (фаза термінації) та 168 годин (віддалені терміни) після проведення ЧГ.

2.2. Одержання мітохондріальної фракції

Для того, щоб виділити мітохондріальну фракцію клітин печінки використовували методом диференційного центрифугування [39]. Усі аніпуляції із тканинами печінки здійснювали в морозильній камері при температурі 0–4°C. Після вимочування в фізіологічному розчині тканини печінки подрібнювали ножицями та гомогенізували. У середовище для гомогенізації додавали 250 мМ розчин сахарози, 1 мМ EDTA, 10 мМ трис- HCl , рН 7,4. Гомогенат тканин печінки фільтрували через чотири шари марлі. Після осадження ядер шляхом центрифугування при 12 000 g впродовж 10 хв

отримували мітохондріальну фракцію. Чистоту фракції підтримували подвійним промиванням субклітинної фракції середовищем виділення без додавання EDTA.

2.3. Отримання цитозольної фракції

У дослідженнях як цитозольну фракцію використовували надосадову рідину (посмікросомальна фракція), що залишалася після осадження мікросомальної фракції. Після гомогенізації тканин печінки в 0,25 М розчині сахарози, відфільтровування, гомогенат піддавали центрифугуванню при 12000 g впродовж 15 хв для того, щоб осадити ядерну та мітохондріальну фракції. У методиці [40] зазначено, що до отриманого супернатанту необхідно додати іони Ca^{2+} і Mg^{2+} («до 9 об'ємів надосадової рідини – 1 об'єм 80 мМ розчину CaCl_2 та 1 об'єм 160 мМ розчину MgCl_2 у 10 мМ трис- HCl буфері, pH 7,4»). Після цього 10 хв при 4°C дослідні проби перемішували на магнітній мішалці та знову центрифугували при 10 000 g протягом 15 хв. Отриманий осад – мікросомальна фракція, надосадова рідина – постмікросомальна (цитозольна фракція).

2.4. Визначення активності ізоформ NO-синтази

Визначення активності NO-синтази в мітохондріальній та цитозольній фракціях клітин печінки здійснювали за умов температурного режиму 37°C. Середовище для інкубації (2,5 мл) містило реагенти наступного складу:

- 80 мМ трис- HCl буфер, pH 7,4,
- 5 мМ розчин CaCl_2 ,
- 0,15 мМ розчин *L*-аргініну,
- 0,12 мМ розчин NADPH.

Контрольні зразки були приготовлені аналогічно до дослідних, проте замість розчинів відновника (NADPH) та субстрату (*L*-аргініну) містили дистиллят.

Щоб ініціювати NO-синтазну реакцію до інкубаційного середовища вносили аліквоти досліджуваних субклітинних фракцій (200 мкл). Концентрація протеїну в зразку при цьому не перевищувала 50-75 мкг.

Дослідні проби оцінювали на спектрофотометрі CARY60 (США) навпроти контролю при довжині 340 нм. Після цього дослідні зразки інкубували на термостаті при температурі 37°C впродовж 20 хв. Щоб зупинити реакцію до середовища вносили розчин 1,5 М HClO_4 [41].

Активність NO-синтази виражали в наномолях NADPH, що окислювався через 1 хв в перерахунку на 1 мг загального протеїну в пробі.

«Активність Ca^{2+} -незалежної ізоформи NOS, яка згідно за даними літератури відповідає індукцибельній ізоформі NO-синтази, визначали аналогічно, додаючи в інкубаційне середовище хелатор Ca^{2+} 4 мМ EGTA замість CaCl_2 .

Активність Ca^{2+} -залежної ізоформи NOS, що відповідає конститутивній ізоформі NOS, розраховували як різницю між загальною активністю NOS і активністю Ca^{2+} -незалежної ізоформи NOS» [41].

2.5. Визначення вмісту оксиду азоту

Визначення вмісту оксиду азоту проводили уніфікованим методом [42], що ґрунтується на оцінці кількості NO_2^- , який є стабільним метаболітом оксиду азоту. Враховуючи те, що NO дуже швидко інактивується в оксидазній реакції, перетворюючись в нітрит (NO_2^-) або нітрат (NO_3^-), який швидко перетворюється до NO_3^- , то вміст оксиду азоту правомірно оцінювати за зміною NO_2^- [43].

До інкубаційного середовища вносили 2 М розчин HClO_4 , після чого центрифугували зразки 15 хв при 1500 об/хв. Вміст NO_2^- в цитозольній та мітохондріальній фракціях оцінювали спектрофотометрично при довжині хвилі 548 нм за інтенсивністю забарвлення фіолетово-червоного азокомплексу, який утворюється між NO_2^- , α -нафтилетиламіном та сульфаніловою кислотою.

Розрахунок кількості NO_2^- здійснювали за калібрувальною кривою, яку будували використовуючи різну серію розведень стандартного розчину NaNO_2 в 20 мМ калій-фосфатному буфері, рН 7,4, при додаванні реактиву Гріса.

Концентрацію протеїну в дослідних зразках визначали за методом Лоурі [44].

2.6. Статистичне опрацювання даних

Статистичне опрацювання отриманих результатів досліджень здійснювали, використовуючи пакет «Надбудови аналізу даних» програми *Microsoft Excel*. Обраховували основні статистичні показники за безпосередніми кількісними даними різних груп (середнє арифметичне значення – M ; стандартна похибка – m та середнє квадратичне відхилення – σ). Оцінку вірогідності різниці між статистичними характеристиками двох вибірок здійснювали, розраховавши коефіцієнт Стюдента. Розбіжності вважали достовірними при $P \leq 0,05$ [45].

РОЗДІЛ III. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Печінка має унікальну здатність регенерувати після пошкодження або хірургічної резекції. Хоча цю особливість печінки вивчали понад 100 років, тригер каскаду регенерації печінки залишається суперечливим. Нещодавні експериментальні дані підтверджують гіпотезу про те, що оксид азоту (NO) і простагландини, що вивільняються внаслідок збільшення співвідношення кровотоку до маси печінки після часткової гепатектомії, діють синергічно, щоб викликати регенерацію печінки [34].

Механізми, які дозволяють дорослим тканинам регенерувати при пошкодженні, недостатньо вивчені. Для початку регенерації печінки потрібні цитокіни, пов'язані з пошкодженням, фактор некрозу пухлини (TNF- α) та інтерлейкін-6 (IL-6), що включає активацію регульованих цитокінами факторів транскрипції, таких як NF- κ B і STAT3. Під час регенерації TNF α та IL-6 сприяють життєздатності гепатоцитів, а також проліферації, оскільки втручання, які пригнічують будь-який цитокін, не лише блокують синтез ДНК гепатоцитів, але також призводять до загибелі клітин печінки. Ці спостереження свідчать про те, що цитокіни індукують гепатопротекторні фактори в регенеруючій печінці. Враховуючи докази того, що оксид азоту може запобігати TNF-опосередкованій активації проапоптотичної протеази каспази 3 і захищати гепатоцити від цитокін-опосередкованої смерті, цитокін-індукована синтаза оксиду азоту (iNOS) може бути важливим гепатопротекторним фактором у відновлюючій печінці [46].

Оксид азоту є багатофункціональною сигнальною молекулою, яка бере участь у нейронній передачі, перевірці судин та імунній відповіді. Він синтезується трьома ізоформами синтази оксиду азоту (NOS). Конститутивна ендотеліальна NOS (eNOS) експресується в печінці для регулювання печінкової перфузії, індукцйбельна NOS (iNOS) експресується майже в кожному типі клітин печінки за певного стимулу, нейрональна NOS (nNOS), як вважають, відсутня в печінці через відсутність нейронних мережі [2].

Функцію NO у регенерації печінки вивчали на моделях трансгенних мишей. *Mei et al.* повідомили, що eNOS необхідна для опосередкованого рецептором епідермального фактора росту (EGFR) прогресування клітинного циклу після гепатектомії. *Rai et al.* повідомили про підвищений апоптоз гепатоцитів і надмірне накопичення ліпідів у гепатоцитах мишей після гепатектомії. Через те, що надмірне накопичення ліпідів у печінці часто корелює з недостатньою регенерацією печінки після ЧГ, і кілька доказів свідчать про те, що NO має функцію регулювання ліпідного обміну, дослідники припустили, що дефіцит NO у мишей з ЧГ впливатиме на β -окислення жирних кислот у гепатоцитах, а надмірне накопичення ліпідів у гепатоцитах може погіршувати їх проліферацію [47].

Результати проведених нами досліджень показали, що в мітохондріальній фракції клітин печінки контрольних щурів, яким проводили часткову гепатектомію (К/ЧГ), підвищення вмісту оксиду азоту спостерігається лише на початкових етапах регенерації печінки – в період праймінгу (24 год) та активної проліферації клітин (48 год) у 1,6 та 1,4 рази відповідно порівняно зі значеннями контролю (рис. 3.1). Водночас у групі тварин ТУ/ЧГ достовірне зростання даного показника зареєстровано впродовж усього експериментального періоду з максимальними значеннями на 24 год, після чого на 48 год та 72 год відбувається незначне зниження рівня NO, який все-таки перевищує значення як в групі контролю (К), так і в тварин групи ТУ (на 0 год) та активацією надмірного утворення на 168 год (рис. 3.1).

Якщо на початкових етапах регенеративного процесу такі зміни можна пояснити запуском сигнальних шляхів, то у віддалені терміни – проявом негативного впливу NO на клітинні структури з можливістю розвитку нітрозативного стресу.

Печінкова ішемія/реперфузійне пошкодження виникає у двох основних ситуаціях: після резекції або трансплантації печінки внаслідок аноксії чи ішемії самої печінки або через системну гіпоксію чи стани низького кровотоку, пов'язані із сепсисом чи шоком. Печінкова ішемія/реперфузія

пов'язана з підвищеним окислювальним стресом і мітохондріальною дисфункцією, що призводить до печінкової недостатності та/або полісистемної недостатності, а ступінь ураження пов'язаний із наявними захворюваннями печінки. Такі втручання, як передопераційна хіміотерапія або емболізація, можуть зробити печінку більш сприйнятливою до ішемічного стресу, тоді як попередні захворювання, такі як цироз і стеатоз, сприяють погіршенню функції печінки. У сфері трансплантації печінки ішемічне реперфузійне пошкодження є поширеною причиною первинної дисфункції трансплантата та підвищеної смертності та захворюваності [48].

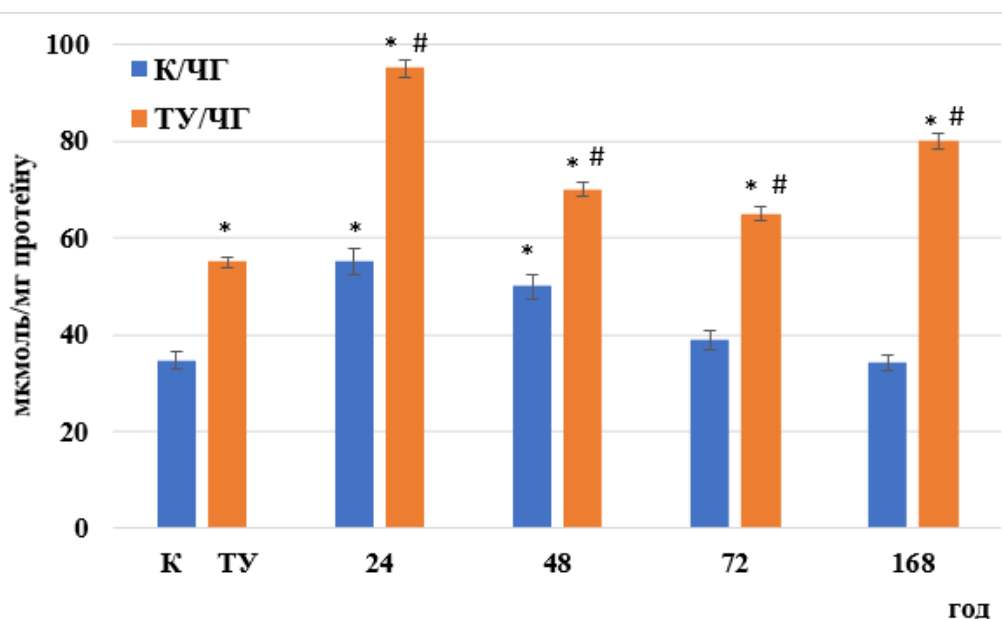


Рис 3.1. Вміст оксиду азоту в мітохондріальній фракції клітин печінки щурів за умов часткової гепатектомії

*Примітка: К – здорові (інтактні) тварини; ТУ – щури з токсичним ураженням; К/ЧГ, ТУ/ЧГ – щури, які підлягали частковій резекції тканин печінки; * – статистично достовірна різниця порівняно з контролем; $P \leq 0,05$; # – статистично достовірна різниця порівняно з групою К/ЧГ, $P \leq 0,05$.*

Пошкодження, яке спостерігається при ішемії та реперфузії, можна, принаймні частково, віднести до активних форм кисню (АФК) та азоту (АФА), оскільки спостерігається підвищений рівень утворення реактивних метаболітів, а також споживання антиоксидантів із апоптозом і загибеллю клітин. Під час періодів гіпоксії утворюються різні види АФК та АФА, які потім викликають посилене пошкодження клітин. Спочатку мітохондрії також

зменшуються через зміни в дихальному ланцюзі, як вторинна реакція на гіпоксію. Це призводить до зниження рівня АТФ, що спричиняє порушення мембранних іонів, включаючи приплив натрію через інгібування АТФ-залежної натрій/калієвої АТФ-ази. Подальший приплив натрію може викликати набряк і розрив клітини. Накопичення внутрішньоклітинного кальцію викликає активацію фосфоліпази клітинної мембрани, що спричиняє деградацію фосфоліпідів і пошкодження мембрани. Мітохондрії стають більш проникними, лізосоми та мембрани порушуються, викликаючи витік клітин, а самі клітини набухають [49].

Коли великі частки печінки ампутують шляхом часткової гепатектомії на дві третини, підвищена локальна експресія TNF- α запускає утворення інших цитокінів, включаючи IL-6, які необхідні для ініціації подальшої проліферації гепатоцитів. Гепатоцити експресують і вивільняють медіатори запалення після зараження молекулами стінки бактеріальної клітини та прозапальними цитокінами.

Тому отримані нами результати щодо підвищення рівня оксиду азоту в мітохондріальній фракції клітин печінки щурів групи К/ЧГ впродовж 48 год та групи ТУ/ЧГ протягом всього експериментального періоду узгоджуються з попередніми дослідженнями в розрізі даної тематики, які засвідчує активацію прозапальних цитокінів TNF- α та IL-6.

Пізня фаза ішемічного/реперфузійного пошкодження спричинена активацією нейтрофілів, АФК, TNF- α та IL-1 β і призводить до більш значного пошкодження, ніж спочатку спричинене клітинами Купфера. Т-лімфоцити CD4, опосередковані TNF- α та IL-1, прилипають до печінкових синусоїдів і можуть посилювати активацію клітин Купфера та загальний рекрутинг клітин за допомогою гранулоцитарного колонієстимулюючого фактора та інтерферону гамма (INF γ). Цитокіни, пов'язані з пошкодженням, регулюють транскрипцію багатьох генів гепатоцитів, включаючи синтазу оксиду азоту (NOS) – фермент, який каталізує утворення NO з аргініну [50].

Нами встановлено, що підвищення вмісту NO відбувається з одночасною активацією ізоформ NO-синтаз в мітохондріях печінки щурів. Щодо групи тварин К/ЧГ, то, починаючи з 24 год до 72 год (з максимумом на 48 год – період активної проліферації клітин) зареєстровано зростання конститутивної ізоформи ензиму на противагу iNOS, хоча як на ранній стадії регенерації, так і в період термінації значення активності cNOS вірогідно перевищують значення 0 год (рис. 3.2).

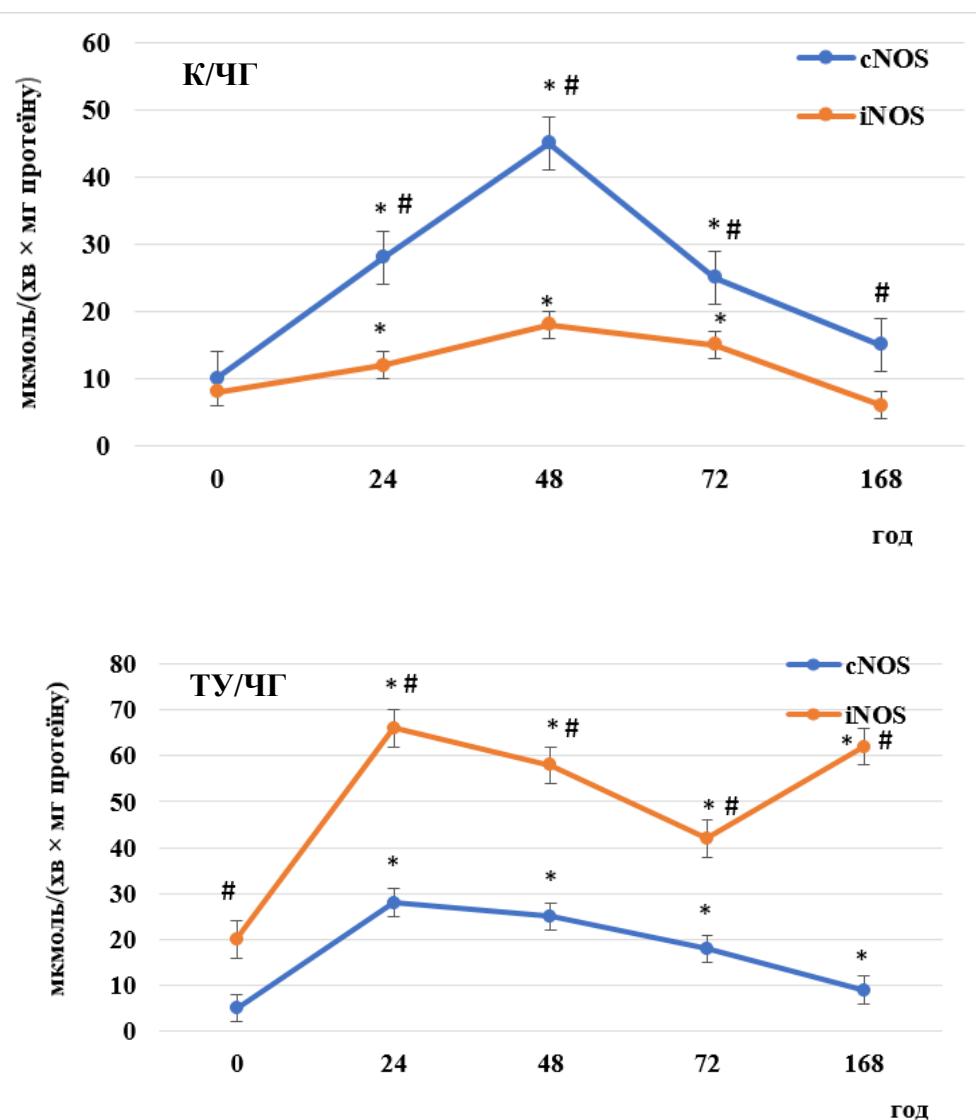


Рис. 3.2. Активність ізоформ NO-синтази в мітохондріальній фракції клітин печінки здорових щурів та тварин із токсичним ураженням за умов часткової гепатектомії

Примітка: cNOS – конститутивна NO-синтаза; iNOS – індукційна NO-синтаза; * – статистично достовірна різниця порівняно з 0 год; $P \leq 0,05$; # – статистично достовірна різниця між ізоформами cNOS та iNOS, $P \leq 0,05$.

У печінці активність конститутивної ізоформи представлена eNOS, що зазвичай виявляється в клітинах Купфера та на плазматичній мембрані гепатоцитів щурів. Крім того, функціональна eNOS ідентифікована і охарактеризована у синусоїдальних ендотеліальних клітинах печінки і може сприяти локальному розподілу перфузії та портального тиску.

В основному eNOS індукує вазодилатацію на рівні пресинусоїдів і синусоїдів, а також запобігає адгезії тромбоцитів, тромбозу. Дослідження на тваринах продемонстрували, що інгібування виробництва NO з eNOS може сприяти ішемії/реперфузійному пошкодженню [51].

Натомість в групі тварин ТУ/ЧГ спостерігається абсолютно протилежна тенденція змін активностей ізоформ NO-синтаз. По-перше, нами зареєстровано перерозподіл даних активностей з максимальною активацією індукцйбельної ізоформи впродовж всього експериментального періоду (рис. 3.2). По-друге, якщо в період праймінгу (24 год) активність iNOS досягає максимальних значень з подальшим зниженням до фази термінації (72 год), то дискусійним залишається питання активації iNOS у віддалений період регенеративного процесу (168 год) (рис. 3.2).

Детермінанти проліферації гепатоцитів під час регенерації печінки дуже складні, і між ініціацією синтезу ДНК і припиненням проліферативного процесу діють різні механізми. Контроль регенерації печінки та події, пов'язані з регуляцією росту органу, залишаються невідомими. Стає все більш очевидним, що апоптоз відіграє ключову роль у клітинному циклі. Багато білків, які можуть індукувати загибель клітин, є компонентами циклу клітинного поділу.

Відносна поширеність білків *Bax* і *Bcl-xL* є критичними факторами, що впливають на долю клітини; вони сприяють або виживанню клітин, або їх смерті, кінцевий результат якої значною мірою залежить від співвідношення *Bcl-xL/Bax*. Значне підвищення рівня NO в печінці (> 100%) (отримане або індуктором iNOS LPS, або прямим донором NO нітропрусиатом натрію (SNP, 2,5 мг/кг маси тіла, введений через 5 годин після ЧГ) індукує експресію

проапоптотичного білок *Bax* у мітохондріальній фракції, без змін антиапоптотичного білка *Bcl-xL*. Навпаки, коли збільшення NO є помірним, наприклад, на 35%, отриманим низькими дозами SNP (0,25 мг/кг маси тіла), проапоптотичний білок *Bax* залишається незмінним, тоді як антиапоптотичний білок *Bcl-xL* підвищується [32].

Механізм, за допомогою якого NO викликає зміни експресії гена *Bax/Bcl-xL*, залишається невідомим. Деякі дослідники зосередилися на *p53* як зв'язку між NO та генами *Bax/Bcl-2*, оскільки відомо, що NO індукує накопичення *p53*, який є прямим активатором транскрипції гена *Bax* та інгібітором транскрипції гена *Bcl-2*. *p53* діє як контрольна точка клітинного циклу, дозволяючи відновлювати пошкоджену ДНК. Вважається, що блокування переходу G1/S, що є результатом активації *p53*, викликає апоптоз у разі серйозного пошкодження ДНК.

Апоптотичний індекс показав, що високе збільшення NO викликає клітинну смерть шляхом апоптозу, тоді як помірне підвищення не змінює цей процес. Деякі результати дослідників свідчать про те, що високі рівні NO індують апоптоз шляхом накопичення *p53*, який індукує експресію *Bax* [33].

З іншого боку, у відповідь на ендотоксин або прозапальні цитокіни, як показано результатам попередніх досліджень, такі як фактор некрозу пухлини- α , IL-1 та інтерферон- γ , а також їх комбінації, iNOS швидко регулюється протягом годин у гепатоцитах і також у резидентних печінкових макрофагах (клітинах Купфера). Ці стимули часто діють синергічно, щоб індукувати експресію iNOS; однак IL-1 β сам по собі є ефективним стимулятором iNOS у печінці. Цитокіноопосередковане підвищення регуляції транскрипції гена iNOS потребує транскрипційного фактора ядерного фактора κB (NF- κB) як у тварин, так і у людей. Крім того, печінкові ендотеліальні клітини та зірчасті клітини також можуть виробляти NO через регуляцію iNOS. Таким чином, при запаленні печінки, що відбувається за умов токсичного ураження ацетамінофеном, гепатоцити знаходяться в середовищі, де NO генерується з навколишніх клітин, а також із самих гепатоцитів. Повідомлялося, що в

клітинних культурах максимальна продукція NO, яка розраховується як вивільнення нітриту, після стимуляції полісахаридами та/або цитокінами в гепатоцитах становить від 45 до 1200 нмоль $\text{NO}_2^-/10^6$ клітин на день, клітини Купфера – від 50 до 100 нмоль $\text{NO}_2^-/10^6$ клітин на день, а ендотеліальні клітини від 10 до 16 нмоль на день $\text{NO}_2^-/10^6$ клітин [35].

Синтаза оксиду азоту-2 (iNOS) експресується за цих умов, і високий синтез NO, який слідує, сприяє запальній відповіді в тканині печінки та бере участь у виникненні різних гепатопатій. Однак під час регенерації печінки, наприклад, після часткової гепатектомії, коли iNOS експресується у помірних рівнях, то це сприяє пригніченню апоптозу та прогресуванню клітинного циклу до відновлення розміру та функції органу [50], що може слугувати логічним поясненням змін у групі здорових щурів, яким проводили часткову гепатектомію (К/ЧГ) (рис. 3.2).

Аналіз *in vivo* мишачого гена iNOS показує, що ні TNF- α , ні IL-6 поодиночі не є достатніми для активації транскрипції iNOS, але в поєднанні ці два цитокіни регулюють транскрипцію iNOS так само, як ліпополісахариди (LPS), потужний індуктор iNOS [46], що узгоджується із попередніми результатами посиленої експресії даних цитокінів у тварин групи ТУ/ЧГ та, очевидно, призводить до активації індукцибельної ізоформи за даних експериментальних умов.

Оксид азоту є важливим медіатором запалення, особливо в самих гепатоцитах під час реперфузійного пошкодження. Експресія РНК iNOS збільшується приблизно через годину після реперфузії, причому підвищення активності спостерігається через п'ять годин після реперфузії. Чи є iNOS захисним чи шкідливим при ішемії/реперфузії, є суперечливим. Наприклад, у мишей з нокаутом iNOS розвивається менше теплової ішемії/реперфузії, але використання неспецифічних інгібіторів NOS, включаючи L-NNA та L-NAME, фактично збільшує пошкодження печінки [48].

Можна припустити, що пероксинітрит (ONOO^-) – продукт супероксидного аніону та NO, утвореного iNOS, може бути причиною

пошкодження. Пероксинітрит може викликати перекисне окислення ліпідів, інгібування дихального ланцюга мітохондрій, інгібування Na^+/K^+ -АТФази та/або окислювальні модифікації білка. Тобто різниця між захисним і руйнівним впливом може залежати від кількості та тривалості впливу NO, а також від стану печінки перед частковою гепатектомією і рівнем антиоксидантів, доступних для споживання АФК і АФА.

Вироблення NO шляхом посилення iNOS як у гепатоцитах, так і в клітинах Купфера призводить до стимуляції *Fas*. Це призводить до активації каспази 8 з подальшим підвищенням активності каспази 3 і, далі, вивільненням цитохрому *c* з мітохондрій у цитозоль з подальшою активацією апоптосом. Активація каспази 8 може сприяти обробці *Bid*, що зрештою призводить до апоптозу. Коли пероксинітрит підвищується, це викликає збільшення реактивних азотистих посередників, що може підвищити рівень проапоптозного білка *Bax*, а також вивільнення цитохрому *c* та активацію апоптосом. Пероксинітрит може відкривати перехідні пори мембрани і призводити до вивільнення цитохрому *c*.

Нещодавно інгібування відкриття МП ідентифіковано як нове місце дії для сигналізації NO при апоптозі. Інгібування відкриття МРТР призведе до меншої кількості цитохрому *c*, доступного для ініціації апоптозу. Це дослідження показує, що існує тонкий баланс між про- та антиапоптотичними властивостями NO на рівні мітохондрій [50].

Отже, у здорових щурів після часткової гепатектомії підвищення вмісту оксиду азоту в мітохондріальній фракції печінки відбувається на ранніх стадіях регенеративного процесу (24 та 48 год) переважно за рахунок активації конститутивної ізоформи NO-синтази. Часткова резекція тканин печінки в тварин із токсичним ураженням ацетамінофеном супроводжується зростанням рівня NO впродовж всього експериментального періоду з максимальними величинами на ранніх (24 год) та віддалених термінах (168 год) регенерації та одночасним підвищенням активності iNOS за даних умов.

Щодо вмісту оксиду азоту в цитозольній фракції клітин печінки, то в групі К/ЧГ спостерігається аналогічна тенденція підвищення рівня даного показника впродовж 48 год після проведення часткової резекції тканин печінки з максимальними величинами в період праймінгу (24 год) (рис. 3.3). Водночас даний показник у цитозолі клітин печінки щурів групи ТУ/ЧГ досягає максимальних значень на початкових стадіях регенеративного процесу із тенденцією до зниження в період термінації (72 год) та інтенсивним утворенням на 168 год (рис. 3.3).

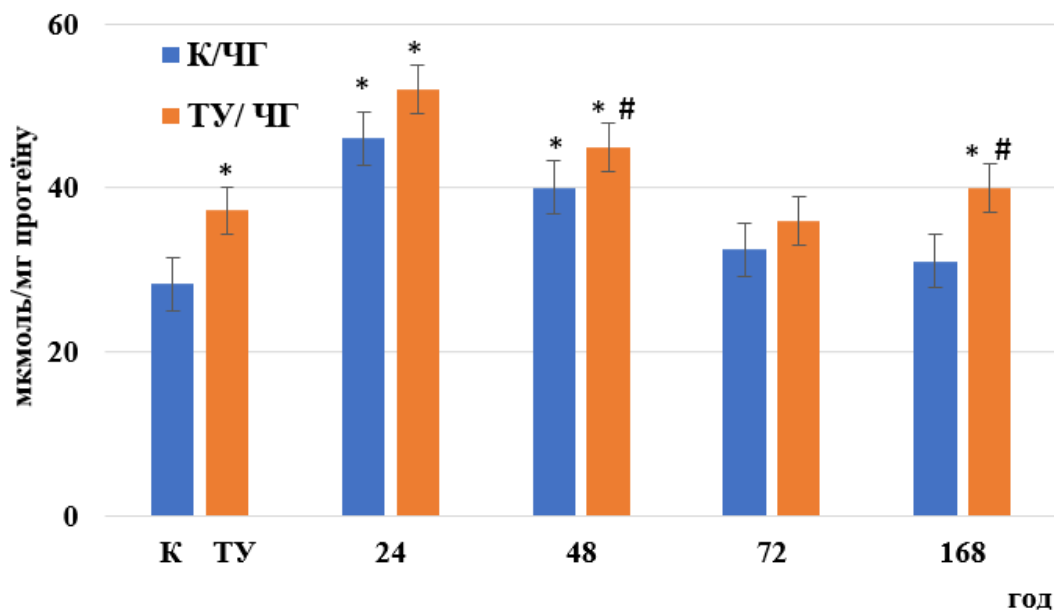


Рис 3.3. Вміст оксиду азоту в цитозольній фракції клітин печінки щурів за умов часткової гепатектомії

*Примітка: К – здорові (інтактні) тварини; ТУ – щури з токсичним ураженням; К/ЧГ, ТУ/ЧГ – щури, які підлягали частковій резекції тканин печінки; * – статистично достовірна різниця порівняно з контролем; $P \leq 0,05$; # – статистично достовірна різниця порівняно з групою К/ЧГ, $P \leq 0,05$.*

Однією з добре охарактеризованих функцій NO є медіатор судинної дилатації та проникності, а також його роль у судинному ремоделюванні. Ангіогенез, тобто утворення нових кровоносних судин, є складним процесом, який включає проліферацію та міграцію ендотеліальних клітин. Цей феномен необхідний для ремоделювання архітектури печінки після резекції печінки. Початкова хвиля проліферації гепатоцитів супроводжується проліферацією

ендотеліальних клітин і проникненням судинних гепатоцелюлярних острівців, що призводить до утворення новоутворених синусоїдів. Інформація, зібрана в результаті імуногістохімічних досліджень, вказує на добре відомі ангіогенні фактори, такі як васкулярний ендотеліальний фактор росту (VEGF), один із найпотужніших ангіогенних факторів, як головний медіатор проліферації ендотеліальних клітин у регенеруючій печінці [25].

Після ЧГ як гепатоцити, так і непаренхімні клітини експресують мРНК VEGF, що свідчить про те, що VEGF відіграє значну роль у цьому процесі. Гепатоцелюлярна продукція VEGF демонструє максимальні рівні між 48 і 72 годинами після ЧГ. Збільшення продукції VEGF гепатоцитами корелює зі збільшенням експресії рецептора VEGF на ендотеліальних клітинах після ЧГ. Крім того, останні дослідження показали, що інгібування ангіогенезу ангіостатином погіршує регенерацію печінки.

Відомо, що NO відіграє важливу роль у процесах васкуляризації, ангіогенезу та пермеабілізації тканин. Хоча зростає кількість доказів того, що NO має ангіогенну дію, частково опосередковану VEGF, немає одностайної думки з цього приводу [28].

Деякі автори повідомили, що екзогенне додавання донорів NO або підвищення рівня ендогенного NO посилює синтез VEGF у клітинах гладких м'язів судин щурів. Крім того, *Taniguchi et al.* показали, що експресія VEGF у регенеруючій печінці щура відбувається переважно в перипортальних гепатоцитах. Вони також продемонстрували, що VEGF бере участь у проліферації гепатоцитів, пов'язаної з проліферацією синусоїдальних ендотеліальних клітин після ЧГ у щурів [50].

Можна припустити, що подібні результати у групі К/ЧГ рівня оксиду азоту свідчать про те, що збільшення NO на ранніх етапах регенерації печінки ініціює адаптивну відповідь, яка призводить до активації факторів транскрипції, що діють як перетворювачі сигналу між цитоплазмою та ядром, що призводить до регуляції експресії VEGF.

Проте печінкові ендотеліальні та зірчасті клітини також можуть виробляти NO через регуляцію iNOS. Тож, при запаленні печінки, що підтверджено у тварин групи ТУ/ЧГЕ після часткової гепатектомії гепатоцити розміщені в середовищі, де NO генерується з навколишніх клітин, а також із самих гепатоцитів [2].

Відомо, що NO нітрозилує Cys-163 і, таким чином, може пригнічувати активність каспази 3 за допомогою прямого посттрансляційного механізму. У багатьох клітинах NO також сприяє накопиченню цГМФ, і показано, що лікування цГМФ пригнічує TNF-залежну індукцію активності каспази 3, тоді як лікування цГМФ-залежним інгібітором кінази скасовує цей ефект NO. Таким чином, NO також може перешкоджати активації каспази 3 через цГМФ-залежний механізм. Враховуючи зростаючу кількість доказів того, що каспаза 3 відіграє вирішальну роль у TNF-опосередкованій загибелі гепатоцитів, каспаза 3, здається, є логічною мішенню для NO у регенеруючій печінці, де гепатоцити піддаються впливу підвищених рівнів TNF- α [46].

Результати досліджень активності ізоформ NO-синтази в цитозольній фракції клітин печінки щурів групи К/ЧГ засвідчують, що зростання рівня NO на початкових стадіях регенеративного процесу (24 год та 48 год) пов'язано переважно з активацією конститутивної ізоформи NO-синтази. Однак, нами відмічено, що в даній групі тварин в період активної проліферації клітин незначно підвищується рівень iNOS порівняно з показниками 0 год (рис. 3.4).

Щодо групи тварин із токсичним ураженням, яким здійснювали часткову резекцію тканини печінки, то нами встановлено, що індукція індукцибельної NO-синтази в цитозольній фракції клітин печінки впродовж 48 год регенеративного процесу відбувається на тлі зниження активності конститутивної форми ензиму (рис. 3.4). Слід зауважити, що в даної групи тварин підвищення активності iNOS зареєстровано і на завершальних етапах регенерації (168 год).

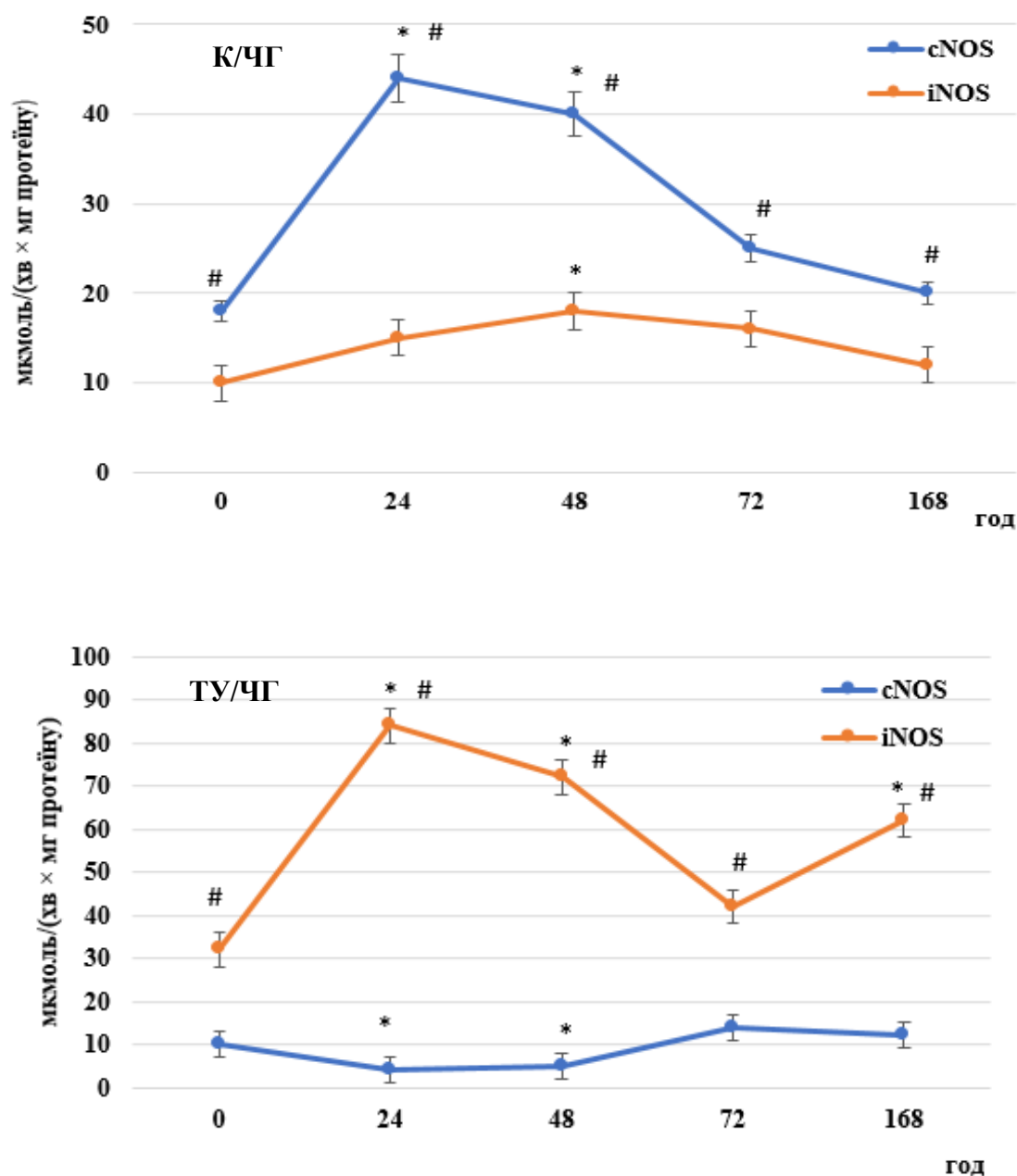


Рис. 3.4. Активність ізоформ NO-синтази в цитозольній фракції клітин печінки здорових щурів та тварин із токсичним ураженням за умов часткової гепатектомії

Примітка: cNOS – конститутивна NO-синтаза; iNOS – індукційна NO-синтаза; * – статистично достовірна різниця порівняно з 0 год; $P \leq 0,05$; # – статистично достовірна різниця між ізоформами cNOS та iNOS, $P \leq 0,05$.

Фіброз печінки — це стан, пов'язаний із збільшенням білків позаклітинного матриксу (ECM), включаючи колаген типу I і III, протеоглікани, фібронектин і ламінін. За нормальних умов матриксні металопротеїнази (MMP), що виробляються зірчастими клітинами, регулюють

продукцію ЕСМ. У патологічних станах із вираженим фіброзом відкладення колагену перевищує здатність ММР поглинати його, і таким чином утворюються додаткові відкладення колагену та рубці. Фіброз добре задокументований при багатьох хронічних захворюваннях печінки, включаючи гепатит, холестатичну хворобу, гемохроматоз, стеатогепатит і хронічну обструкцію венозного відтоку. Ці стани зазвичай починаються із фази запалення, яка прогресує до фіброзу після хронічного окисного стресу.

Під час запальної фази цитокіни, хемокіни та АФК супроводжуються інфільтрацією та посиленням іNOS. Лейкоцити і клітини Купфера здатні виробляти велику кількість NO і цитокінів, особливо TGF- β і TNF- α . Приплив клітин Купфера збігається з активацією зірчастих клітин. Активація призводить до збільшення проліферації, рухливості, скоротливості та синтезу ЕСМ.

Точний механізм активації зірчастих клітин неясний, але асоційовані білки були ідентифіковані. Схоже, що молекула цинкового пальця, KLF6, бере участь в активації багатьох клітин, включаючи зірчасті клітини. Цитокіни відіграють вирішальну роль у формуванні фіброзу. TGF β виробляється купферівськими та зірчастими клітинами. TGF β може стимулюватися IL-6 і АФК у пацієнтів з цирозом печінки, що свідчить про те, що терапевтичне втручання, яке включає виробництво TGF β або стимули TGF β , може виявитися корисним у пацієнтів з фіброзом печінки.

Роль NO у формуванні фіброзу не настільки чітко зрозуміла. У пацієнтів із цирозом печінки підвищений опір портального кровотоку асоціюється з порушенням біодоступності NO. У тваринних моделях індуковане зсувом виробництво NO з eNOS було послаблене порівняно з контрольними мишами. Знижена активність NOS із збільшенням зв'язування eNOS-кавеоліну також була відзначена, хоча рівні білка eNOS були такими ж, як у контрольній групі. Це свідчить про зниження функції eNOS, що призводить до відносного стану вазоконстрикції. АФК також причетні до зниження біодоступності NO в печінці з цирозом. Кореук та ін. відзначили зниження рівня SOD і підвищення рівня NO

в сироватці крові у пацієнтів з декомпенсованим цирозом порівняно з пацієнтами з компенсованим цирозом і здоровими контрольними групами, що вказує на антиоксидантну дисрегуляцію [48].

Отже, у тварин із токсичним ураженням після ЧГ індукція індукцйбельної NO-синтази в цитозольній фракції клітин печінки впродовж 48 год регенеративного процесу з посиленою активацією на завершальних етапах (168 год) відбувається на тлі зниження активності конститутивної ізоформи ензиму.

NO відіграє важливу та різноманітну роль під час регенерації печінки, з потенціалом бути або анти-, або про-апоптотичним. На ранніх стадіях регенерації печінки невелика кількість NO, що утворюється, здається необхідною і, можливо, достатньою для підвищення рівня антиапоптозного білка *Bcl-xL*, що призводить до захисту від апоптотичної смерті клітин. Крім того, цей рівень NO забезпечує максимальне підвищення *VEGF* після гепатектомії, що необхідно для підтримки синусоїдальної перфузії та індукування неоваскуляризації. Тому збільшення NO на на ранніх стадіях ЧГ переважно призводить до покращення регенерації печінки. Препарати, які можуть модулювати рівні NO, широко використовуються як терапевтичні засоби для сприятливої корекції судинного середовища. Це відкриває можливість використання цих препаратів або навіть створення нових гепатотропних препаратів, які регулюють рівень NO з метою покращення процесу регенерації печінки [2, 48].

ВИСНОВКИ

1. У здорових щурів після часткової гепатектомії підвищення вмісту оксиду азоту в мітохондріальній та цитозольній фракціях печінки відбувається на ранніх стадіях регенеративного процесу (24 та 48 год) переважно за рахунок активації конститутивної ізоформи NO-синтази.
2. Часткова резекція тканин печінки в тварин із токсичним ураженням ацетамінофеном супроводжується зростанням рівня NO в мітохондріальній фракції впродовж всього експериментального періоду з максимальними величинами на ранніх (24 год) та віддалених термінах (168 год) регенерації та одночасним підвищенням активності iNOS за даних умов.
3. У тварин із токсичним ураженням після часткової гепатектомії індукція зростання рівня NO в цитозольній фракції клітин печінки на ранніх (24 та 48 год) та авершальних етапах (168 год) регенеративного процесу відбувається за рахунок посиленої активації індукцибельної NO-синтази на тлі зниження активності її конститутивної ізоформи.