

## ІНТЕНСИВНІСТЬ ГЕНЕРУВАННЯ СУПЕРОКСИДНОГО АНІОН-РАДИКАЛА ТА ОКСИДУ АЗОТУ В КЛІТИНАХ ПЕЧІНКИ МИШЕЙ ПІСЛЯ ЧАСТКОВОЇ ГЕПАТЕКТОМІЇ

Г.П. КОПИЛЬЧУК, І.О. ШМАРАКОВ, І.М. БУЧКОВСЬКА

*Чернівецький національний університет імені Юрія Федьковича, вул. Коцюбинського, 2, м. Чернівці, 58012  
e-mail: ivannabuchkovska@mail.ru*

*У роботі досліджено інтенсивність продукування оксиду азоту та генерацію супероксидного аніон-радикала в мітохондріальній, постмікросомній та мікросомній фракціях клітин печінки мишей при частковій гепатектомії. Встановлено, що початкові етапи регенерації печінки, викликані частковою гепатектомією, супроводжуються посиленою генерацією активних метаболітів кисню та азоту в мітохондріальній, мікросомній та постмікросомній фракціях гепатоцитів. У групі контрольних тварин посилена генерація супероксиду та оксиду азоту спостерігається впродовж 2-х діб (12, 24 та 48 год). В мітохондріальній та постмікросомній фракціях нокаутних тварин інтенсифікація продукування NO спостерігається впродовж 48 год. Результати аналізу інтенсивності генерування супероксидного аніон-радикала вказують на підвищений рівень  $O_2^-$  в мітохондріальній фракції мишей  $Lrat^{-/-}$  на початкових етапах регенерації з максимальними значеннями через 12 год після часткової гепатектомії. Інтенсивність продукування супероксиду в цитозольній фракції печінки зростала на 70% порівняно з показниками контролю лише в першу добу після часткової резекції тканини, тоді коли  $NADPH$ -залежне продукування  $O_2^-$  в мікросомній фракції клітин печінки спостерігалася протягом 12, 24 і 48 год після проведеної гепатектомії.*

*Ключові слова: супероксид аніон, оксид азоту, вітамін А, ретиноїди, регенерація печінки, часткова гепатектомія*

**Вступ.** В останні роки дослідники (Mabuchi et al., 2004; Гарбузенко, 2008) звертають увагу на високі регенеративні можливості печінки, стимуляцію її компенсаторно-відновних процесів, що сприяють зворотності патологічних змін та нормалізації структури і функції органу. Печінка – гомеостатичний орган з широким функціонально-метаболічним профілем, здатний регенерувати при різних патологічних станах (Taub R., 2004; Fausto N., 2006).

Вітамін А та його метаболіти (ретиноїди) є необхідними для нормального росту, диференціації, контролю апоптозу та проліферації клітин (Grenier et al., 2007; Huang, 2009; Wongsiriroj, 2008; Gudas, 2012). Близько 80% всіх ретиноїдів, що присутні в організмі, знаходяться в печінці і 70% із них депонуються в ліпідних краплях стелатних клітин (клітинах Іто) (Shirakami et al., 2012). Дані літератури (Shirakami et al., 2012) свідчать, що розвиток патологічних процесів у печінці супроводжується зниженням запасів ретиноїдів та втратою стелатними клітинами ретиноїд-вмісних ліпідних крапель.

Часткова гепатектомія (ЧГЕ) є класичною моделлю вивчення процесів регенерації. Експериментальні дослідження (Гарбузенко, 2008) вказують, що фактори, які продукуються печінкою та позапечінковими тканинами, взаємодіючи між собою та специфічними рецепторами клітинних

мембран, регулюють даний компенсаторний процес. Вважається (Tuncyurek, 2006; Hortelano S., 2007; Гарбузенко Д.В., 2008), що гемодинамічне навантаження, якому піддаються клітини печінки, які залишилися після її резекції, активують індукцибельну NO-синтазу (iNOS), що супроводжується підвищенням продукування оксиду азоту (NO) як найбільш раннього маркера регенераційних процесів та інтенсифікацією генерації активних кисневих метаболітів.

За даними літератури (Дубинина, 2001; Чеснова и др., 2006; Бурлака та ін., 2010) основними попередниками активних форм кисню (АФК) є супероксидні радикал-аніони ( $O_2^-$ ), які постійно генеруються супероксид-продукуючими компонентами дихального ланцюга внутрішньої мембрани мітохондрій,  $NADPH$ -оксидазним комплексом мембран ендоплазматичного ретикула або в результаті ксантиноксидазної реакції в цитозолі клітин у відповідь на ендогенні та екзогенні стимули. Дисбаланс, що виникає між утворенням та інактивацією  $O_2^-$  із незворотнім наростанням концентрації останнього та його метаболітів в компартментах клітин, відіграє провідну роль у розвитку патологічних станів.

Мета роботи – дослідити вплив відсутності запасів ретиноїдів на рівень генерації супероксидного аніон-радикала та оксиду азоту в мітохондріаль-

ній, мікросомній та постмікросомній фракціях клітин печінки мишей після часткової гепатектомії.

**Об'єкт і методи.** Дослідження проводили на мишах лінії C57BL/6J масою 25-30 г, віком 2,5-3 місяці. У роботі з тваринами дотримувалися міжнародних рекомендацій згідно «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 взаємозв'язку між запасами ретиноїдів у печінці та її здатністю до регенерації нами використано трансгенних тварин *Lrat<sup>-/-</sup>* (експериментальна модель мишей, які не здатні синтезувати ретинілефіри в печінці внаслідок нокауту гена ензиму лецитин : ретинол-ацилтрансферази (LRAT, EC 2.3.1.135) і повністю позбавлені запасів ретиноїдів при збереженні нормальної секреції ретинолу до позапечінкових тканин).

Тварини піддавались частковій гепатектомії (ЧГЕ), яка полягала в резекції 2/3 тканини печінки. ЧГЕ проводили в ранкові години в умовах анестезії за методом (Mitchell & Willenbring, 2008). Групу дослідного контролю складали миші дикого типу (C57BL/6J) і трансгенні тварини (*Lrat<sup>-/-</sup>*), які піддавались лапаротомії без подальших хірургічних втручань. Евтаназію тварин проводили під легким ефірним наркозом на 12, 24, 48, 72 години та 7-му добу (168 годин) після проведення лапаротомії та часткової резекції тканини печінки.

Мітохондріальну фракцію клітин печінки отримували методом (Kitagawa et al., 1980). Мікросомну фракцію печінки отримували шляхом диференційного центрифугування (Schenkman, 1978). Ступінь забрудненості фракцій мембранами інших компартментів контролювали шляхом порівняльного визначення 5'-нуклеотидазної активності як специфічного маркера плазматичних мембран клітин печінки, сукцинатдегідрогеназної активності як маркера внутрішньої мембрани мітохондрій та глюкозо-6-фосфатазної активності – маркера ендоплазматичного ретикулуму.

Концентрацію NO, як продукта NO-синтазної реакції, визначали за методом (Hwang et al., 1994) шляхом реєстрації вмісту нітрит-аніона (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>), який є стабільним метаболітом оксиду азоту. Оскільки NO – висореакційна молекула з коротким періодом життя, яка швидко інактивується в оксидазній реакції з перетворенням в нітрит (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) або нітрат (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>), який швидко метаболізується, то рівень NO правомірно оцінювати за зміною NO<sub>2</sub><sup>-</sup> (Curran, 2001). NO<sub>2</sub><sup>-</sup> фіксували

спектрофотометрично при довжині хвилі 548 нм за інтенсивністю забарвлення фіолетово-червоного азокомплексу, що утворюється в реакції між сульфаниловою кислотою, NO<sub>2</sub><sup>-</sup> і  $\alpha$ -нафтилетиламіном, та визначали за калібрувальною кривою.

Рівень генерації супероксидного аніон-радикала в мітохондріальній та мікросомній фракціях клітин печінки мишей реєстрували із застосуванням теста з нітросинім тетразолієм (НСТ) (Костенко, 2000). Інтенсивність генерації O<sub>2</sub><sup>-</sup> в ксантиноксидазній реакції визначали за методом (Пескин и др., 1981) та оцінювали за окисленням адреналіну в аденохром.

Концентрацію протеїну визначали за методом Лоурі (Lowry et al., 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*). Різниці вважали достовірними при  $P \leq 0,05$ .

**Результати та їх обговорення.** Результати проведених досліджень показали, що початкові етапи регенерації печінки, викликані частковою гепатектомією, супроводжуються посиленою генерацією активних метаболітів кисню та азоту. При цьому основна частка продукування вказаних вільних радикалів припадає на мітохондріальну фракцію.

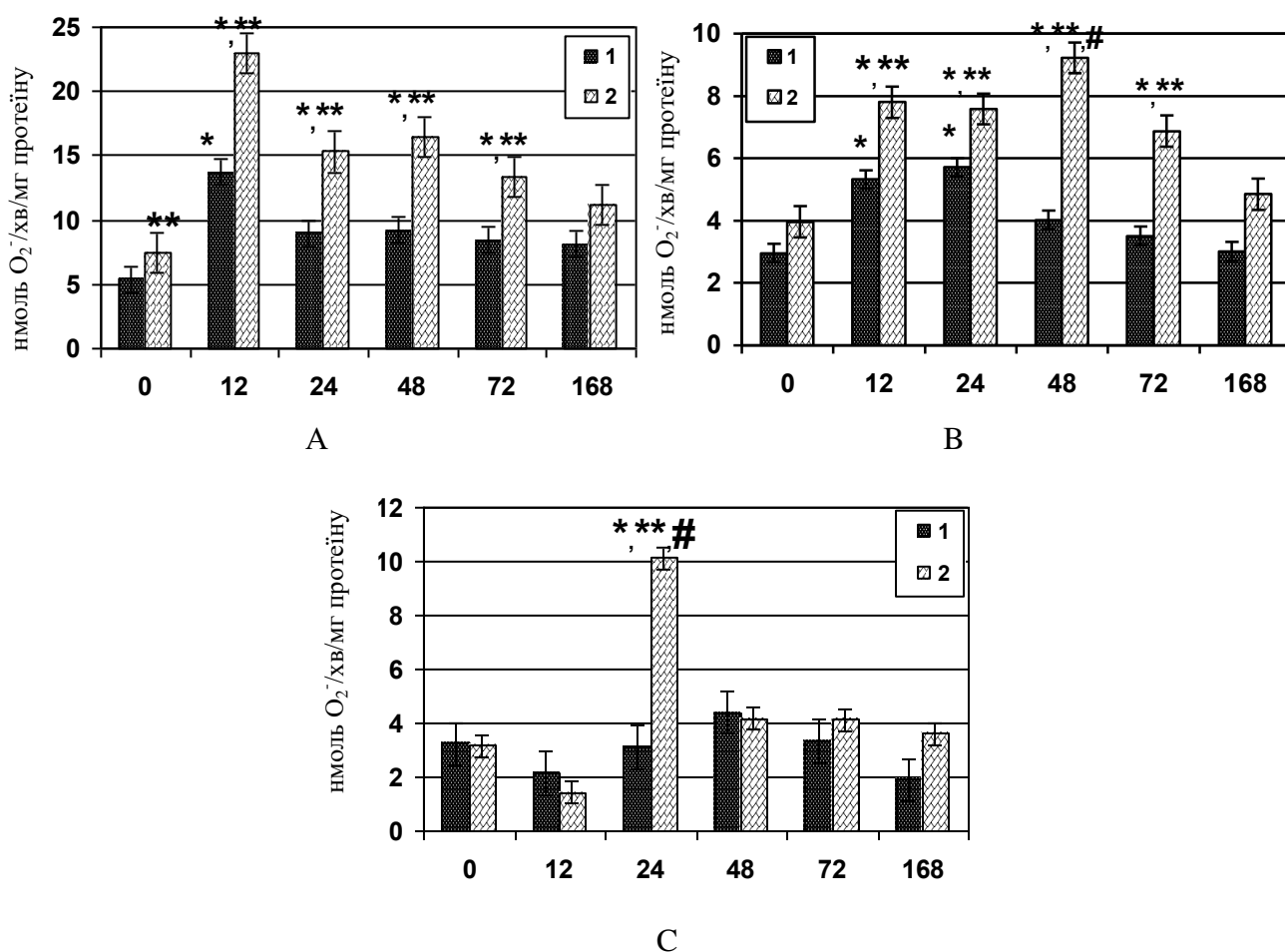
Відомо (Лю и др., 2006), що в мітохондріях зосереджена велика кількість редокс-переносників та центрів, потенційно здатних до одноелектронного відновлення кисню з утворенням радикала супероксид-аніону – попередника інших АФК. Численні дані (Виноградов и др., 2005; Бурлака та ін., 2010), отримані в експериментах з виділеними мітохондріями і субмітохондріальними фракціями, вказують на те, що головними супероксид-продукуючими компонентами дихального ланцюга є NADH: убіхінон-оксидоредуктаза (комплекс I) та убіхінон-цитохром *c* редуктаза (комплекс III). За фізіологічних умов майже 2% кисню конвертується в супероксидні радикали за умов витоку електронів із I та III комплексів електронтранспортних мембран мітохондрій (Виноградов и др., 2005; Лю и др., 2006) та зростає в 3-5 разів при гострих і хронічних ураженнях тканини. Крім того, при інтерпретації отриманих результатів, необхідно врахувати продукування O<sub>2</sub><sup>-</sup> в ході мітохондріального окислення за участю NADH-дегідрогенази (EC 1.6.99.3) та ліпоаміддегідрогенази (EC 1.6.4.3) (Близнецова и др., 2004).

При цьому продукування O<sub>2</sub><sup>-</sup> та NO в досліджуваних фракціях печінки мишей, яким проводили лапаротомію черевної порожнини без пода-

льших хірургічних втручань, впродовж усього експериментального періоду не перевищувало значення контролю.

Результати досліджень показали, що в мітохондріальній фракції клітин печінки мишей C57BL/6J (Рис.1., А) вже у період 12 год після ЧГЕ спостерігається підвищення генерації супероксидного аніон-радикала на 60% порівняно з вихідними показниками (0 год) та досягає контрольних величин вже на 24 год експерименту. Оскільки супероксид може бути залучений в регуляцію клітинного метаболізму (Чеснокова Н.П. и др., 2006), NADH-залежне продукування  $O_2^-$  на початкових етапах відновлення печінки, вірогідно, виступає одним із основних факторів запуску каскаду регенераційних реакцій після проведення

часткової гепатектомії. Водночас регенерація печінки трансгенних тварин *Lrat*<sup>-/-</sup> супроводжувалась посиленням інтенсифікації генерації супероксиду в мітохондріальній фракції (Рис.1., А), яка зберігалась впродовж 3-х діб (12, 24, 48 та 72 год) після часткової резекції тканини органу. Уже на 12 год після ЧГЕ продукування супероксидного аніон-радикала перевищувало 20 нмоль/хв/мг протеїну, в той час як вихідні показники в досліджуваній фракції печінки нокаутних мишей становили 7 нмоль/хв/мг протеїну. Виявлена тенденція прослідковувалась впродовж усього експерименту, причому показники продукування  $O_2^-$  в досліджуваній фракції клітин печінки нокаутних мишей протягом 3-х діб в 1,7 рази перевищували значення тварин дикого типу (Рис.1., А).



**Рис.1. Генерація  $O_2^-$  в мітохондріальній (А), мікросомній (В) та постмікросомній (С) фракціях клітин печінки мишей після часткової гепатектомії ( $M \pm m, n=10$ )**

Примітка: 1 – миші C57BL/6J, яким проводили часткову гепатектомію (контроль); 2 – миші *Lrat*<sup>-/-</sup>, які піддавались частковій резекції тканини печінки; \* – статистично достовірна різниця порівняно з показниками тварин на 0 год; \*\* – статистично достовірна різниця порівняно з показниками тварин C57BL/6J,  $P \leq 0,05$ ; # – статистично достовірна різниця порівняно з показниками попереднього часового проміжку в процесі регенерації печінки.

**Fig. 1.  $O_2^-$  generation in mitochondrial (A), microsomal (B) and postmicrosomal (C) fractions of mouse liver cells after partial hepatectomy ( $M \pm m, n = 10$ )**

Note: 1- C57BL/6J mice, subjected to partial hepatectomy (control), 2 - *Lrat*<sup>-/-</sup> mice, underwent partial resection of liver tissue; \* - statistically significant differences compared to 0 h values; \*\* - statistically significant differences compared to C57BL/6J animals,  $P \leq 0,05$ ; # - statistically significant differences compared to values of previous time period during liver regeneration.

Виявлена тенденція прослідковувалась впродовж усього експерименту, причому показники продукування  $O_2^-$  в досліджуваній фракції клітин печінки нокаутних мишей протягом 3-х діб в 1,7 рази перевищували значення тварин дикого типу (Рис.1., А). Поряд з NADH-супероксид-продукуючими комплексами мітохондрій інтенсивне утворення радикальних форм кисню відбувається за участю NADPH-залежних систем ендоплазматичного ретикулуму, де основна роль належить мікосомним монооксигеназам.

Результати проведених досліджень показали, що в мікосомній фракції клітин печінки мишей C57BL/6J після проведення часткової гепатектомії посилене продукування  $O_2^-$  спостерігається впродовж 2-х діб (12, 24 та 48 год) (Рис.1., Б). В той час як NADPH-індукована інтенсифікована продукція супероксиду в печінці нокаутних мишей залишається тривалий час і не знижується впродовж 72 год після ЧГЕ (Рис.1., Б). Дані літератури (Ляхович и др., 2005; Кузнецова и др., 2007) свідчать, що генерація супероксидного аніон-радикала в мікосомній фракції клітин печінки відбувається при активації цитохром Р-450-залежних оксидоредуктаз ендоплазматичного ретикулуму, автоокисленні самого цитохрому Р-450 та функціонуванні мембранозв'язаних оксидаз (Близнецова и др., 2004; Ляхович и др., 2005).

Відомо (Ляхович и др., 2005), що утворення активних кисневих метаболітів мікосомними монооксигеназами є важливим для зворотної негативної регуляції цитохрому Р-450, індукції ензимів 2 фази детоксикації та підвищення антиоксидантного захисту клітин. Вірогідно, підвищення продукування супероксидного аніон-радикала на початкових етапах регенерації печінки пов'язано з регуляторною роллю  $O_2^-$  в трансдукції клітинних сигналів в організмі. У роботах (Близнецова и др., 2004; Чеснокова и др., 2006)

показано, що утворення вільних радикалів, зокрема супероксиду, зумовлено, індукцією трансформації ксантиндегідрогенази в ксантинооксидазу, при цьому саме О-форма ксантинооксидази через її здатність генерувати цитотоксичні кисневі метаболіти ( $O_2^-$  та  $H_2O_2$ ) відіграє істотну роль в процесах оксидативного ураження клітин.

Результати досліджень показали, що продукція  $O_2^-$  в ході ксантинооксидазної реакції в постмікосомній фракції печінки мишей, нокаутних за геном *Lrat*, підвищувалась на 70% порівняно з показниками контрольних тварин лише на першу добу (24 год) після проведеної гепатектомії (Рис.1., В). Попередніми дослідженнями (Шмараков та ін., 2008) показано, що в процесі розвитку патологічних станів посилена генерація супероксиду пов'язана з конформаційними перебудовами ензиму, в основі яких лежить процес часткового аутоокислення сульфгідрильних груп ферменту, що супроводжує перехід його дегідрогеназної форми в оксидазну, в результаті чого на молекулі ензиму відкривається ділянка для зв'язування електронів з молекулярним киснем. Вірогідно, посилена генерація супероксидного аніон-радикала в постмікосомній фракції клітин печінки нокаутних мишей, відбувається за рахунок підвищення активності О-форми ксантинооксидази, наслідком чого є посилена продукція супероксиду.

Утворення активних метаболітів азоту визначається оксидом азоту (NO), що продукується в біологічних системах ферментативним шляхом, та є вторинним посередником у передачі клітинних сигналів (Близнецова и др., 2004). Відомо, що за умов оксидативного та нітрозативного стресів NO може виступати в ролі антиоксиданта (Takeuchi et al., 2007). З іншого боку, внаслідок взаємодії NO з супероксидом і молекулярним киснем утворюються активні метаболіти азоту – пероксинітрил, диоксид азоту та ін. (Szabo et al., 2007).

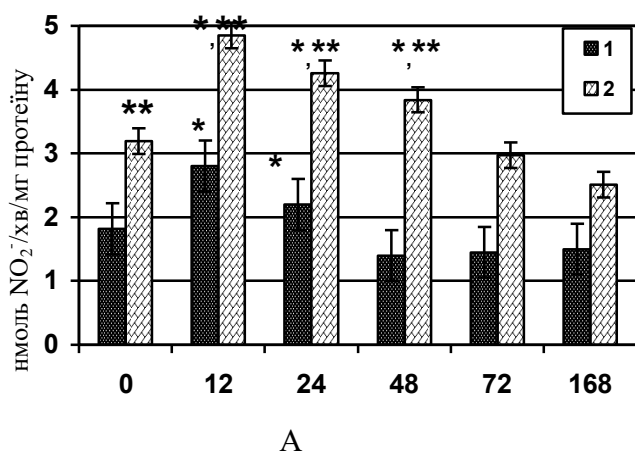


Рис.2. Вміст  $NO_2^-$  у мітохондріальній (А) та постмікосомній (В) фракціях клітин печінки мишей після часткової гепатектомії ( $M \pm m$ ,  $n=10$ )

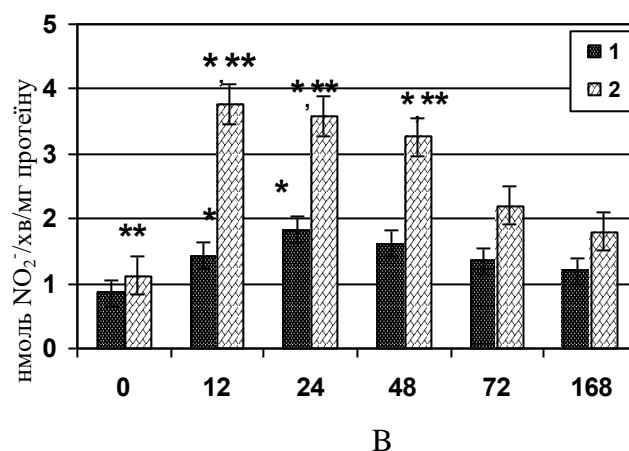


Fig. 2.  $NO_2^-$  content in mitochondrial (A) and postmitochondrial (B) fractions of mouse liver cells after partial hepatectomy ( $M \pm m$ ,  $n = 10$ )

Аналогічна тенденція до підвищення спостерігалась у випадку накопичення NO, утвореного в NO-синтазній реакції як в мітохондріальній (Рис.2., А), так і в постмікросомальній (Рис.2., Б) фракціях печінки мишей після ЧГЕ. Ранні етапи репаративної регенерації (12 та 24 год) в досліджуваних фракціях печінки мишей дикої супроводжуються підвищенням вмісту оксиду азоту порівняно з показниками контролю.

Дані літератури свідчать (Hortelano S., 2007) про регулятивну роль оксиду азоту в регенерації печінки після ЧГЕ. Після часткової гепатектомії індуковане вивільнення NO запускає процес регенерації печінки. Відомо (Zeini et al., 2005; Hortelano S., 2007), що розвиток оксидативного стресу після часткової гепатектомії, активує фактори транскрипції (NF-κB, STAT3, AP-1), які індукують експресію генів iNOS з посиленням продукування оксиду азоту в гепатоцитах та клітинах Купфера. Вірогідно, підвищення продукції NO на початкових етапах регенерації може бути наслідком активації фактора транскрипції NF-κB активними формами кисню, цитокінами та іншими медіаторами.

За даними літератури (Zhong et al., 2005), що повністю-тран-ретиноева та 13-цис-ретиноева кислоти шляхом активації рецепторів ретиноевої кислоти (RARα) модулюють продукування NO та інгібують транскрипцію гена iNOS. Ймовірно, відсутності запасів ретиноїдів в печінці нокаутних мишей створює передумови для посиленого синтезу NO в досліджуваних фракціях після часткової гепатектомії.

Важливим біохімічним аспектом в контексті виявленого нами посиленого продукування активних метаболітів кисню та азоту може бути поява синергічних ефектів, що не завжди позитивно відображається на процесах регуляції метаболізму в клітинах. Зокрема, за надмірного продукування NO взаємодіє з супероксидом з утворенням пероксинітриду, що шляхом модифікації тирозинових залишків викликає деструкцію багатьох ензимних систем (Szabo, 2007).

Якщо на початкових етапах регенерації NO виступає як внутрішньоклітинний посередник, то в періоди 48 та 72 год токсична дія оксиду азоту може виявлятися прямо (шляхом утворення нітрозильних комплексів із гемовим і негемовим залізом) та опосередковано (через активні форми азоту), які в ході реакцій S- і N-нітрузування, нітрування, окислення та дезамінування порушують функціонування біомолекул і субклітинних компонентів, спричиняють метаболічний дисбаланс та призводять до розвитку ендогенної інтоксикації організму.

**Висновки.** Отже, початкові етапи регенерації печінки мишей, викликані частковою гепатекто-

мією, супроводжуються посиленою генерацією активних метаболітів кисню та азоту. Водночас відсутність запасів ретиноїдів супроводжуються інтенсифікацією генерації супероксидного аніон-радикала та посиленням продукування оксиду азоту в мітохондріальній, мікросомній та цитозольній фракціях печінки мишей після часткової гепатектомії.

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

### Список літератури:

1. Бурлака А.П., Ганусевич І.І., Лук'яничук Є.В., Сидорик Є.П. Мітохондріальний редокс-контроль матричних металопротеїназ та метастазування у хворих на рак молочної залози / А.П. Бурлака, // Онкологія. – 2010. – Т. 12, №4. – С. 377 – 382.
2. Виноградов А.Д., Гривенникова В.Г. Генерация супероксид-радикала NADH:убихинон оксидоректазой митохондрий сердца // Биохимия. – 2005. – Т. 70, вып. 2. – С. 150– 159.
3. Гарбузенко Д.В. Механизмы компенсации структуры и функции печени при её повреждении и их практическое значение // Рос. журн. гастроэнтерол. гепатол. колопроктол. – 2008. – Т. 18, № 6. – С. 14 – 21.
4. Дубинина Е.Е. Роль активных форм кислорода в качестве сигнальных молекул в метаболизме тканей при состояниях окислительного стресса // Вопр. мед. химии. – 2001. – Т. 47, № 6. – С. 561– 581.
5. Костенко В.О., Цебржинський О.І. Продукція супероксидного аніон-радикала та оксиду азоту у тканині нирок після хірургічного втручання // Фізіол. журн. – 2000. – Т. 46, № 5. – С. 56 – 61.
6. Лю Б.Н., Лю М.Б., Исмаилов Б.И. Роль митохондрий в развитии и регуляции уровня окислительного стресса в норме, при клеточных патологиях и реверсии опухолевых клеток // Успехи соврем. биол. – 2006. – Т. 126, № 4. – С. 388 – 398.
7. Ляхович В.В., Вавилин В.А., Зенков Н.К., Меньщикова Е.Б. Активированные кислородные метаболиты в монооксигеназных реакциях // Бюл. СО РАМН. – 2005. – Т. 118, № 4. – С. 7 – 12.
8. Пескин А.В., Збарский И.Б. Исследование электронтранспортных систем в мембранах митохондрий и ядер печени крыс и гепатомы 22а // Биохимия. – 1981. – Т. 46, № 4. – С. 579 – 589.
9. Чеснокова Н.П., Понукалина Е.В., Бизенкова М.Н. Общая характеристика источников образования свободных радикалов и антиоксидантных систем // Успехи соврем. естетствозн. – 2006. – № 7. – С. 37 – 41.
10. Шмариков І.О., Марченко М.М. Ксантиноксидазна активність у тканинах печінки шурів у процесі онкогенезу // Укр. біохім. журн. – 2008. – Т. 80, № 6. – С. 86 – 91.
11. Curran R.D., Ferrari F.K. Nitric oxide and nitric oxide-generating compounds inhibit hepatocyte

- protein synthesis // FASEB J. – 2001. – Vol.5. – P.2085 – 2092.
12. Fausto N., Campbell J., Riehle K. Liver regeneration // *Hepatology*. – 2006. – Vol. 43. – P. 45 – 53.
  13. Grenier E., Maupas FS., Beaulieu JF. et al. Effect of retinoic acid on cell proliferation and differentiation as well as on lipid synthesis, lipoprotein secretion, and apolipoprotein biogenesis // *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* – 2007. – Vol. 293, N. 6. – P. 1178-1189.
  14. Gudas LJ. Emerging roles for retinoids in regeneration and differentiation in normal and disease states // *Biochim. Biophys. Acta*. – 2012. – Vol. 1821. – P. 213 – 221.
  15. Hortelano S., Zeini M., Casado M. Animal models for the study of liver regeneration: role of nitric oxide and prostaglandins // *Front Biosci.* – 2007. – Vol. 12. – P. 13 – 21.
  16. Huang J., Bi Y., Zhu GH. Retinoic acid signalling induces the differentiation of mouse fetal liver-derived hepatic progenitor cells // *Liver Int.* – 2009. – Vol. 29, N. 10. – P. 1569 – 1581.
  17. 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. – Vol. 264. – P. 711-715.
  18. Kitagawa Y., Sugimoto E. Estimation of the In Vivo Translational Activity of Rat Liver Mitochondria without Use of an Antibiotic // *J. Biochem.* – 1980. – Vol. 88, N. 3. – P. 689 – 693.
  19. Lowry O.H., Rosenbrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. Protein measurement with Folin phenol reagent // *J. Biol. Chem.* – 1951. – Vol. 123, № 1. – P.265 – 273.
  20. Mabuchi A., Mullaney I., Sheard P. et al. Role of hepatic stellate cell/hepatocyte interaction and activation of hepatic stellate cells in the early phase of liver regeneration in the rat // *J. Hepatol.* – 2004. – P. 40. – P. 910 – 916.
  21. Mitchell C., Willenbring H. A reproducible and well-tolerated method for 2/3 partial hepatectomy in mice // *Nat. Protoc.* – 2008. – Vol. 3. – P. 1167-1170.
  22. Schenkman J.B., Cinti D.L. Preparation of Microsomes with Calcium // *Methods in Enzymology*. – 1978. – Vol. 52. – P. 83-89.
  23. Shirakami Y., Lee S., Clugston R., Blaner W. Hepatic metabolism of retinoids and disease associations // *Biochim. Biophys. Acta*. – 2012. – Vol. 1821. – P. 124 – 136.
  24. Szabo S., Ischiropoulos H., Radi R. Peroxynitrite: biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics // *Nature Rev.* – 2007. – Vol. 6. – P. 662 – 680.
  25. Takeuchi K., Hatazava R., Tanigami M. Role of endogenous nitric oxide (NO) and NO synthase in healing of indomethacin-induced intestinal ulcers in rats // *Life Sci.* – 2007. – Vol. 80, N. 4. – P. 329 – 336.
  26. Taub R. Liver regeneration: from myth to mechanism // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* – 2004. – Vol. 5. – P. 836 – 847.
  27. Tuncyurek P., Yenisey C., Doger F. Nitric Oxide as an Independent Regulatory Factor in Regenerating Rat Liver // *Acta Chir Belg.* – 2006. – Vol. 106. – P. 581 – 587.
  28. Wongsiriroj N., Piantedosi R., Palczewski K. et al. The Molecular Basis of Retinoid Absorption // *J. Biol. Chem.* – 2008. – Vol. 283, N. 20. – P. 13510 – 13519.
  29. 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 proliferation // *FASEB J.* – 2005. – Vol. 19. – P. 995 – 997.
  30. Zhong J., Huang D. Effect of all-trans retinoic acid on orphan receptor APJ signaling in spontaneously hypertensive rats // *Cardiovascular Res.* – 2005. – Vol. 65. – P. 743 – 750.

## SUPEROXIDE ANION RADICAL AND NITRIC OXIDE GENERATION INTENSITY IN MOUSE LIVER AFTER PARTIAL HEPATECTOMY

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

*The intensity of nitric oxide and superoxide anion radical production in mitochondrial, microsomal and postmicrosomal fractions was studied in mouse liver after partial hepatectomy. It is determined that the initial stages of liver regeneration, caused by partial hepatectomy, are accompanied with generation of reactive oxygen and nitrogen metabolites in mitochondrial, microsomal and postmicrosomal fractions of liver cells. In control group animals increased generation of superoxide and nitric oxide observed during 2 days (12, 24 and 48 h). In mitochondrial and postmicrosomal fractions of knockout animals NO production intensification occurs within 48 hours. Analysis of superoxide anion radical generation intensity indicates elevated levels of  $O_2^-$  in the mitochondrial fraction of  $Lrat^{-/-}$  mice in the early stages of regeneration with maximal values at 12 h after partial hepatectomy. The intensity of superoxide production in the cytosol fraction of liver increased up to 70% from the control in the first day after partial resection, while NADPH-dependent  $O_2^-$ -production in the microsomal fraction of liver cells was observed for 12, 24 and 48 h after performed hepatectomy.*

*Key words: superoxide anion, nitric oxide, vitamin A, retinoids, liver regeneration, partial hepatectomy*

*Отримано редколегією 30.08.2011*