



Вісник Дніпропетровського університету. Біологія, екологія.
 Visnik Dnipropetrovs'kogo universitetu. Seriâ Biologiâ, ekologiâ
 Visnyk of Dnipropetrovsk University. Biology, ecology.

Visn. Dnipropetr. Univ. Ser. Biol. Ekol. 2014. 22(1), 3–7.

doi:10.15421/011401

ISSN 2310-0842 print
 ISSN 2312-301X online

www.ecology.dp.ua

УДК 577.161.1:616.36-008.9

Особливості генерування активних форм кисню та азоту за гострої гепатотоксичності

І.О. Шмараков, В.Л. Борщовецька, М.М. Марченко

Чернівецький національний університет імені Юрія Федьковича, Чернівці, Україна

Розвиток більшості патологічних станів відбувається за вільнорадикальним механізмом, що на клітинному рівні характеризується посиленням продукування вільних радикалів, серед яких особливе місце належить активним формам кисню та азоту (АФК/АФА). Основними продуцентами вільнорадикальних форм кисню виступають передусім мембранні електронтранспортні NADH-залежні системи мітохондрій, NADPH-залежні системи ендоплазматичного ретикулуму, а також цитозольні оксидоредуктазні ферменти та мультиферментні комплекси. У роботі встановили особливості генерування супероксидного аніон радикала ($O_2^{\cdot-}$) як первинної активної форми кисню та оксиду азоту (NO^{\cdot}) в умовах тіоацетамід-індукованої гепатотоксичності. У виділених методом диференційного центрифугування субклітинних фракціях (мітохондріальна, мікосомна, постмікосомна) печінки мишей лінії C57BL/6J встановлено особливості NAD(P)H-залежного генерування супероксидного аніон радикала ($O_2^{\cdot-}$) як первинної активної форми кисню та оксиду азоту (NO^{\cdot}) в умовах тіоацетамід-індукованої гепатотоксичності та застосування фармакологічних доз вітаміну А. Розвиток гострої гепатотоксичності, індукованої одноразовим інтраперитонеальним введенням 500 мг/кг тіоацетаміду, супроводжується зростанням інтенсивності продукування супероксидного аніон радикала та оксиду азоту мікосомною та цитозольною фракціями клітин печінки, але не мітохондріальною фракцією. Уведення фармакологічних доз вітаміну А (3000 МО) не викликає гепатопротекторного ефекту, проте посилює продукування активних форм кисню та азоту в печінці за гострої гепатотоксичності.

Ключові слова: гепатотоксичність; супероксид; оксид азоту; вітамін А

Reactive oxygen and nitrogen species generation features under conditions of acute hepatotoxicity

I.O. Shmarakov, V.L. Borschovetska, M.M. Marchenko

Y. Fedkovych Chernivtsi National University, Chernivtsi, Ukraine

Development of the most of pathological conditions occurs by free radical mechanism which is characterized by increased free radical production at the cellular level, especially reactive oxygen and nitrogen species (ROS/RNS). The main producers of reactive oxygen species are, first of all, membrane bound NADH-dependent mitochondrial and NADPH-dependent endoplasmic reticulum electron transport systems, cytosolic oxidoreductase enzymes and multienzyme complexes. The aim of the study was to determine the features of generation of superoxide anion radical ($O_2^{\cdot-}$) as the primary reactive oxygen species, and nitric oxide (NO^{\cdot}) under conditions of thioacetamide-induced hepatotoxicity. The features of NAD(P)H-dependent generation of superoxide anion radical ($O_2^{\cdot-}$) as the primary reactive oxygen species, and nitric oxide (NO^{\cdot}) in subcellular (mitochondrial, microsomal and post-microsomal) fractions of C57BL/6J mouse liver cells isolated by the method of differential centrifugation were determined under conditions of thioacetamide-induced hepatotoxicity and supplementation with pharmacological doses of vitamin A. It was found that the development of acute hepatotoxicity induced by single intraperitoneal administration of 500 mg/kg of thioacetamide was accompanied by increased intensity of superoxide anion radical and nitric oxide production in microsomal and cytosolic fractions of liver cells, but not in mitochondrial fraction. Consumption of the pharmacological doses of vitamin A (3000 IU) has no hepatoprotective effect, however, it enhances the production of reactive oxygen and nitrogen species in the liver during acute hepatotoxicity.

Keywords: hepatotoxicity; superoxide; nitric oxide; vitamin A

*Чернівецький національний університет імені Юрія Федьковича, вул. Лесі Українки, 25, Чернівці, 58000, Україна
 Y. Fedkovych Chernivtsi National University, Lesia Ukrainka str., 25, Chernivtsi, 58000, Ukraine.
 Tel.: +38-067-372-37-47. E-mail: igor.shmarakov@gmail.com*

Вступ

Розвиток більшості патологічних станів відбувається за вільнорадикальним механізмом, що на клітинному рівні характеризується посиленням продукування вільних радикалів, серед яких особливе місце належить активним формам кисню та азоту (АФК/АФА) (D'Alessandro et al., 2011). Основними продуцентами вільнорадикальних форм кисню виступають передусім мембранні електронтранспортні NADH-залежні системи мітохондрій, NADPH-залежні системи ендоплазматичного ретикулу (Poyton et al., 2009; D'Alessandro et al., 2011; Uchi et al., 2013), а також цитозольні оксидоредуктазні ферменти та мультиферментні комплекси (Robert and Robert, 2013).

Водночас активні форми азоту можуть утворюватися за участі NO-синтази (He et al., 2010) та ксантиноксидази (Cantu-Medellin and Kelley, 2013b). Функціонуючи як елементи редоксзалежних сигнальних і метаболічних шляхів, активні форми кисню та азоту виконують передусім регуляторну роль у формуванні повноцінної відповіді біологічних систем на метаболічні та фізіологічні стимули, гостре та хронічне ураження тощо (Leach et al., 2001; Urtasun et al., 2008; Powers et al., 2011; Zhu et al., 2012).

Надлишкове та неконтрольоване утворення АФК/АФА виступає тригером у розвитку глибоких оксидативних пошкоджень клітинних компартментів, поглиблюючи розвиток патологічного процесу (Jaeschke et al., 2002; Urtasun et al., 2008; Muriel, 2009).

Нині проблема патологій печінки, у тому числі гепатиту, фіброзу, цирозу та гепатоклітинної карциноми, виявляється надзвичайно гострою, враховуючи постійно зростаюче токсичне навантаження та пов'язаний із цим оксидативний стрес у цьому основному метаболічному та провідному детоксуючому органі. Спільною особливістю вказаних патологій виявляється втрата запасів ретиноїдів (вітаміну А та його метаболітів) внаслідок активації стелатних клітин печінки, що може вказувати на їх інтенсивне використання за розвитку відповіді печінки на розвиток патологій (Shirakami et al., 2012; Urtasun et al., 2008). Проте метаболічна роль вивільнених ретиноїдів досі залишається незрозумілою – виконання протективних функцій чи поглиблення патологічного процесу.

У зв'язку з цим питання ефективності застосування аліментарних ретиноїдів із гепатопротекторною метою залишається відкритим, оскільки вимагає глибокого розуміння молекулярних механізмів залучення ретиноїдів у патологічний процес взагалі та у розвиток гепатотоксичності зокрема. Незважаючи на значні досягнення та постійне надходження нових відомостей про біохімічні основи токсичного ураження печінки, деякі питання все ще потребують більшої деталізації. Враховуючи вищевикладене, метою роботи було встановити особливості генерування супероксидного аніон радикала ($O_2^{\cdot-}$) як первинної активної форми кисню та оксиду азоту (NO^{\cdot}) в умовах тіоацетамід-індукованої гепатотоксичності.

Дослідження проводили на мишах лінії C57BL/6J вагою 25–30 г та віком 2,5–3,0 місяці, які перебували на стандартному раціоні віварію. Утримання тварин і маніпуляції з ними проводили згідно з положеннями статті 26 Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» від 21.02.2006 р. № 3447-IV, «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та наукових цілей», «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», затверджених 20.09.2001 р. І Українським національним конгресом із біоетики, та з урахуванням положень, викладених у NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (Guide ..., 2011).

Гостре ураження печінки викликали шляхом одноразової інтраперитонеальної ін'єкції розчину тіоацетаміду (ТАА) в дозі 500 мг/кг маси тіла. Групу дослідного контролю склали тварини, яким інтраперитонеально вводили відповідний об'єм фізіологічного розчину, окрема група мишей отримувала додатково 3000 міжнародних одиниць (МО) вітаміну А (фармакологічна доза) інтрагастрально *per os* у формі олійного розчину ретиніл ацетату через 12-годинні інтервали після ін'єкції ТАА чи фізіологічного розчину. Через 48 годин після введення тіоацетаміду тварин зважували та під легким ефірним наркозом проводили забір крові через нижню порожнисту вену та вилучали печінку. Печінку швидко зважували та використовували для отримання субклітинних фракцій методом диференційного центрифугування, яке проводили після попередньої перфузії підігрітим до +38 °C фізіологічним розчином.

Гомогенізацію печінки та всі процедури під час виділення проводили за температури +4 °C із використанням розчинів, охолоджених до вказаної температури. Мітохондріальну фракцію клітин печінки отримували методом, описаним (Kitagawa and Sugimoto, 1980). Мікросомну фракцію отримували методом (Schenkman and Cinti, 1978). Супернатант, отриманий після виділення мікросомної фракції, відбирали та використовували у подальших дослідженнях як постмікросомну (цитозольну) фракцію. Для встановлення ступеня забруднення виділених субклітинних фракцій домішками мембран інших фракцій визначали Na^+/K^+ -АТФазну активність (як специфічного маркера плазматичних мембран), сукцинатдегідрогеназну активність (як специфічного маркера внутрішньої мембрани мітохондрій) та глюкозо-6-фосфатазну активність (як специфічного маркера мембрани ЕПС). У дослідженнях використовували субклітинні фракції, рівень забруднення яких мембранами інших органел не перевищував 10%. Рівень NAD(P)H-залежного утворення супероксидних аніон радикалів субклітинними фракціями печінки реєстрували у тесті з нітросинім тетразолієм (Kostenko and Tsebrzhins'kii, 2000) та виражали у нмоль/хв/мг білка. Визначення рівня NADPH-залежного генерування та рівня оксиду азоту визначали модифікованим методом (Hwang et al., 1994) шляхом реєстрації вмісту нітриг-аніона (NO^{2-}), утвореного в NO-синтазній реакції, та виражали у нмоль/хв/мг білка та нмоль/г відповідно.

Вміст білка визначали методом Лоупі (Waterborg and Matthews, 1994).

Статистичний аналіз отриманих даних проводили з використанням загальноприйнятих методів варіаційної статистики. Усі дані представлені як середнє (M) \pm стандартне відхилення (m). t -Критерій Стюдента застосовували для аналізу різниці даних між групами. Різниця з величиною $P < 0,05$ вважалась достовірною.

Результати та їх обговорення

Результати проведених досліджень показали, що розвиток гострої гепатотоксичності супроводжується посиленням продукування супероксидного аніон радикала, при цьому основними продуцентами цієї активної форми кисню виявляються елементи постмітохондріальної фракції клітин печінки. Встановлений факт виявився несподіваним з огляду на провідну роль мітохондрій як основних продуцентів $O_2^{\cdot-}$ у клітині (Poyton et al., 2009). У нашому експерименті мітохондріальна фракція володіла найвищою питомою $O_2^{\cdot-}$ -продукувальною активністю в печінці лише тварин контрольної групи, при цьому величина продукування супероксиду перебувала у межах 5 нмоль/хв/мг, у той час як для мікосомної та цитозольної фракцій ця величина не перевищувала 3 нмоль/хв/мг та 0,5 нмоль/хв/мг відповідно (рис. 1).

Уведення тваринам тіоацетаміду через 48 годин не викликало змін у продукуванні $O_2^{\cdot-}$ мітохондріальною фракцією (див. рис. 1 а), проте супроводжувалось зростанням величини генерування супероксиду в мікосомній та цитозольній фракціях (див. рис. 1 б, в). Зокрема величина NADPH-залежного утворення супероксиду мікосомною фракцією зростала удвічі, перевищуючи величину продукування цієї АФК мітохондріями печінки на 20%. При цьому рівень утворення $O_2^{\cdot-}$ цитозольною фракцією після введення тіоацетаміду на порядок перевищував вихідні величини (див. рис. 1 в). Фактично в умовах тіоацетамід-індукованої гепатотоксичності цитоплазматичні структури виступають основними продуцентами супероксидного аніон радикала.

Посилене продукування $O_2^{\cdot-}$ цими структурами можна пояснити, враховуючи особливості метаболізму тіоацетаміду. У разі потрапляння даного гепатотоксину в організм ссавців він виявляється субстратом для компонентів клітинної системи детоксикації, передусім мембранозв'язаних мікосомних монооксигеназ і цитозольних оксидоредуктаз, які забезпечують його біоактивацію до активних метаболітів – токсичного сульфоксиду (TASO) та діоксиду (TASO₂) (Chilakapati et al., 2005; Hajovsky et al., 2012). Ці активні інтермедіати за прооксидантним вільнорадикальним механізмом викликають утворення адуктів білків, ліпідів, нуклеїнових кислот (Stankova et al., 2010), ініціюють процеси пероксидного окислення ліпідів, зменшення рівня глутатіону та білкових тіолових груп (Wang et al., 2000). Очевидно, що в умовах посиленого оксидативного стресу, індукованого метаболітами тіоацетаміду, та навантаження на клітинну детоксикаційну систему мікосомні монооксигенази та цитозольні оксидоредуктази виступають додатковими джерелами активних форм кисню. Це передусім стосується активації за вказаних умов

супероксидпродукувальної ізоформи 2E1 цитохрому P₄₅₀ (Wang et al., 2000) та зростання частки оксидазної форми ксантиноксидази, здатної каталізувати одноелектронне відновлення кисню (Shmarakov and Marchenko, 2008).

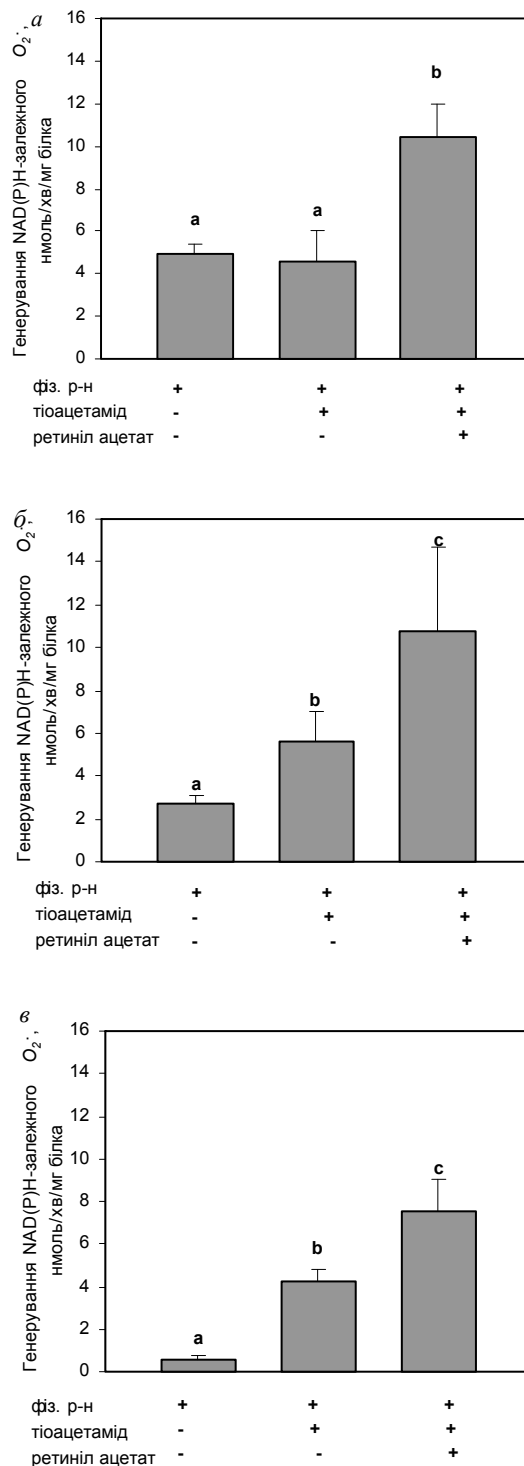


Рис. 1. Інтенсивність NAD(P)H-залежного генерування супероксидного аніон радикала мітохондріальною (а), мікосомною (б) та цитозольною (в) фракціями клітин печінки мишей: величини, позначені різними буквеними індексами (а, б, в), статистично достовірно відрізняються, $P < 0,05$; усі величини наведені як середнє \pm 1 стандартне відхилення, $n = 6$ для кожної групи

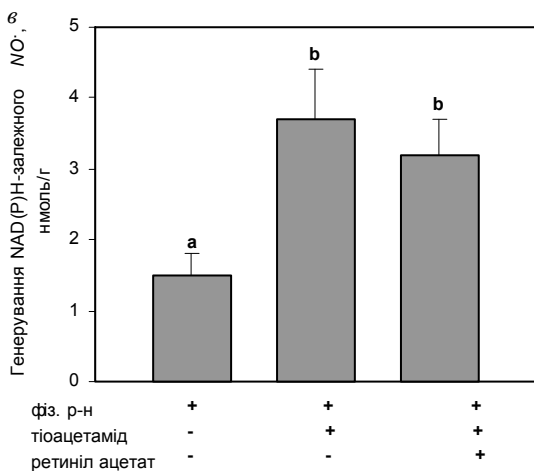
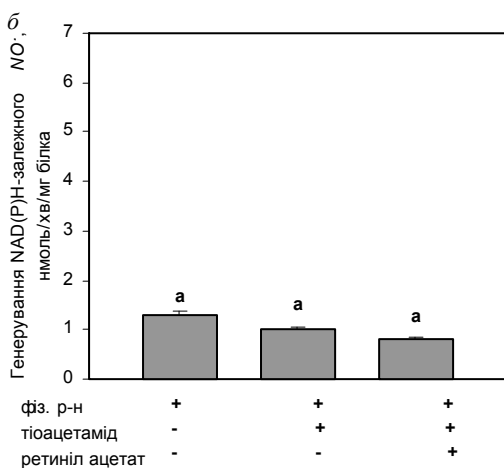
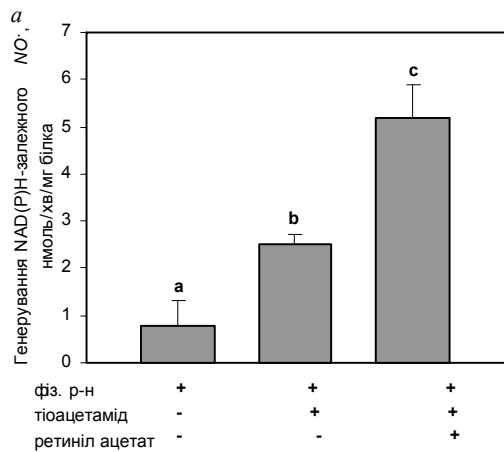


Рис. 2. Інтенсивність NADPH-залежного утворення нітрит іону цитозольною (а) та мітохондріальною (б) фракціями та рівень нітрит іону (в) в печінці мишей: величини, позначені різними індексами (а, б, с), статистично достовірно відрізняються, $P < 0,05$; усі величини представлені як середнє ± 1 стандартне відхилення, $n = 6$ для кожної групи

Застосування фармакологічних доз вітаміну А з коригуючою метою не лише не знижувало показники продукування $O_2\cdot^-$, а і посилювало його утворення в усіх без винятку досліджених субклітинних фракціях. Зокрема, показники інтенсивності генерування супероксиду виявлялись вищими удвічі при введенні 3 000 МО вітаміну А

після ін'єкції тіоацетаміду порівняно з тваринами, які не отримували ретиніл ацетату (див. рис. 1).

Не менш важливим елементом редоксзалежного сигнального шляху виступає оксид азоту ($NO\cdot$). При розвитку гепатотоксичності, індукованої введенням тіоацетаміду, спостерігається зростання інтенсивності утворення цієї активної форми азоту цитозольною фракцією зі зростанням рівня оксиду азоту в печінці (рис. 2 а, в) та незмінність показника інтенсивності генерування $NO\cdot$ у мітохондріальній фракції (рис. 2 б). Встановлені результати виявляються цілком логічними з огляду на цитозольну локалізацію $NO\cdot$ -продукувальних ферментів, насамперед індукційної ізоформи NO -синтази та ксантиноксидази (He et al., 2010; Cantu-Medellin and Kelley, 2013a). Водночас посилена продукція оксиду азоту при зростаючому продукуванні супероксиду виявляється потенційно небезпечною для клітин з огляду на можливе утворення надзвичайно цитотоксичного пероксинітриду ($ONOO\cdot$) (Novitskiy et al., 2006; Muriel, 2009). Введення 3000 МО вітаміну А супроводжувалось посиленням продукування оксиду азоту в цитозольній, але не в мітохондріальній, фракції.

Посилення продукування активних форм кисню та азоту виявляється одним із первинних елементів розвитку тіоацетамідіндукованої гепатотоксичності. Основна частка утворення супероксидного аніон радикала припадає на редоксзалежні оксидазні системи, локалізовані в основному в ендоплазматичному ретикулумі та цитозолі, при цьому внесок мітохондрій у продукування $O_2\cdot^-$ виявляється мінімальним (див. рис. 1). Генерування супероксидного аніон радикала при введенні тіоацетаміду відбувається одночасно з його біоактивацією мікосомними монооксигеназами та цитозольними оксидазами, що служить сигналом для активації гепатопротекторних механізмів. Одним з елементів сигнальних каскадів, активованих у відповідь на некрогенне ураження печінки, виступає оксид азоту, інтенсивне утворення якого спостерігається при введенні тіоацетаміду (див. рис. 2).

Уведення тваринам після ін'єкції тіоацетаміду фармакологічних доз вітаміну А викликало посилення генерування досліджуваних активних форм кисню та азоту. Фактично надходження ретиніл ацетату в організм за хімічно-індукованої гепатотоксичності виступало тригерним фактором у генеруванні супероксидного аніон радикала в усіх без винятку досліджених фракціях. Виявлене надпродукування $O_2\cdot^-$ супроводжувалось посиленням утворення $NO\cdot$, що безперечно має негативний характер, з огляду на можливість утворення цитотоксичного пероксинітриду.

Висновки

Розвиток гострої гепатотоксичності, індукованої введенням тіоацетаміду, супроводжується зростанням інтенсивності продукування супероксидного аніон радикала та оксиду азоту мікосомною та цитозольною фракціями клітин печінки. Уведення фармакологічних доз вітаміну А (3000 МО) не викликає гепатопротекторного ефекту, але посилює продукування активних форм кисню та азоту в печінці за гострої гепатотоксичності.

Бібліографічні посилання

- Cantu-Medellin, N., Kelley, E.E., 2013a. Xanthine oxidoreductase-catalyzed reactive species generation: A process in critical need of reevaluation. *Redox Biol.* 1(1), 353–358.
- Cantu-Medellin, N., Kelley, E.E., 2013b. Xanthine oxidoreductase-catalyzed reduction of nitrite to nitric oxide: Insights regarding where, when and how. *Nitric Oxide* 34, 19–26.
- Chilakapati, J., Shankar, K., Korrapati, M.C., Hill, R.A., Mehendale, H.M., 2005. Saturation toxicokinetics of thioacetamide: Role in initiation of liver injury. *Drug Metab. Dispos.* 33(12), 1877–1885.
- D'Alessandro, A., Rinalducci, S., Zolla, L., 2011. Redox proteomics and drug development. *J. Proteomics* 74(12), 2575–2595.
- Guide for the care and use of laboratory animals: Eighth edition, 2011. The National Academies Press, Washington, DC.
- Hajovsky, H., Hu, G., Koen, Y., Sarma, D., Cui, W., Moore, D.S., 2012. Metabolism and toxicity of thioacetamide and thioacetamide S-oxide in rat hepatocytes. *Chem. Res. Toxicol.* 25(9), 1955–1963.
- He, S., Rehman, H., Wright, G.L., Zhong, Z., 2010. Inhibition of inducible nitric oxide synthase prevents mitochondrial damage and improves survival of steatotic partial liver grafts. *Transplantation* 89(3), 291–298.
- Hwang, S.M., Lopez, C.A., Heck, D.E., Gardner, C.R., Laskin, D.L., Laskin, J.D., 1994. Osteopontin inhibits induction of nitric oxide synthase gene expression by inflammatory mediators in mouse kidney epithelial cells. *J. Biol. Chem.* 269(1), 711–715.
- Jaeschke, H., Gores, G.J., Cederbaum, A.I., Hinson, J.A., Pessayre, D., Lemasters, J.J., 2002. Mechanisms of hepatotoxicity. *Toxicol. Sci.* 65(2), 166–176.
- Kitagawa, Y., Sugimoto, E., 1980. Estimation of the *in vivo* translational activity of rat liver mitochondria without use of an antibiotic. *J. Biochem.* 88(3), 689–693.
- Kostenko, V.O., Tsebrzhins'kii, O.I., 2000. [Production of superoxide anion radical and nitric oxide in renal tissues sutured with different surgical suture material]. *Fiziol. Zh.* 46(5), 56–62. (in Ukrainian).
- Leach, J.K., Van Tuyle, G., Lin, P.S., Schmidt-Ullrich, R., Mikkelsen, R.B., 2001. Ionizing radiation-induced, mitochondria-dependent generation of reactive oxygen/nitrogen. *Cancer Res.* 61(10), 3894–3901.
- Muriel, P., 2009. Role of free radicals in liver diseases. *Hepatology* 3(4), 526–536.
- Novitskiy, G., Potter, J.J., Wang, L., Mezey, E., 2006. Influences of reactive oxygen species and nitric oxide on hepatic fibrogenesis. *Liver Int.* 26(10), 1248–1257.
- Powers, S.K., Talbert, E.E., Adhichetty, P.J., 2011. Reactive oxygen and nitrogen species as intracellular signals in skeletal muscle. *J. Physiol.* 589(9), 2129–2138.
- Poyton, R.O., Ball, K.A., Castello, P.R., 2009. Mitochondrial generation of free radicals and hypoxic signaling. *Trends Endocrinol. Metab.* 20(7), 332–340.
- Robert, A.M., Robert, L., 2013. Xanthine oxidoreductase, free radicals and cardiovascular disease. A critical review. *Pathol. Oncol. Res.* 20(1), 1–10.
- Schenkman, J.B., Cinti, D.L., 1978. Preparation of microsomes with calcium. *Methods Enzymol.* 52, 83–89.
- Shirakami, Y., Lee, S.A., Clugston, R.D., Blaner, W.S., 2012. Hepatic metabolism of retinoids and disease associations. *Biochim. Biophys. Acta* 1821(1), 124–136.
- Shmarakov, I.O., Marchenko, M.M., 2008. [Xanthine oxidase activity in the rat liver tissue in the process of oncogenesis]. *Ukr. Biokhim. Zh.* 80(6), 86–91 (in Ukrainian).
- Stankova, P., Kucera, O., Lotkova, H., Rousar, T., Endlicher, R., Cervinkova, Z., 2010. The toxic effect of thioacetamide on rat liver *in vitro*. *Toxicol. In Vitro* 24(8), 2097–2103.
- Uchi, J.O., Ryu, S.Y., Jhun, B.S., Hurst, S., Sheu, S.S., 2013. Mitochondrial ion channels/transporters as sensors and regulators of cellular redox signaling. *Antioxid. Redox Signal.* doi:10.1089/ars.2013.5681
- Urtasun, R., Conde de la Rosa, L., Nieto, N., 2008. Oxidative and nitrosative stress and fibrogenic response. *Clin. Liver Dis.* 12(4), 769–790.
- Wang, T., Shankar, K., Ronis, M.J., Mehendale, H.M., 2000. Potentiation of thioacetamide liver injury in diabetic rats is due to induced CYP2E1. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 294(2), 473–479.
- Waterborg, J.H., Matthews, H.R., 1994. The Lowry method for protein quantitation. *Methods Mol. Biol.* 32, 1–4.
- Zhu, H., Jia, Z., Misra, H., Li, Y.R., 2012. Oxidative stress and redox signaling mechanisms of alcoholic liver disease: Updated experimental and clinical evidence. *J. Dig. Dis.* 13(3), 133–142.

Надійшла до редколегії 21.02.2014