

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ  
ЧЕРНІВЕЦЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ  
ІМЕНІ ЮРІЯ ФЕДЬКОВИЧА**

**Навчально-науковий інститут біології, хімії та біоресурсів  
Кафедра біохімії та біотехнології**

**АКТИВНІСТЬ ЕНЗИМІВ ЦИТОХРОМУ P-450 В ПЕЧІНЦІ  
ЩУРІВ ІЗ ТОКСИЧНИМ УРАЖЕННЯМ ПІСЛЯ ЧАСТКОВОЇ  
ГЕПАТЕКТОМІЇ**

**Кваліфікаційна робота**

**Рівень вищої освіти – другий (магістерський)**

Виконала: студентка VI курсу, групи 600-М  
спеціальності 091 біологія  
(освітня програма «біохімія та  
лабораторна діагностика)

**Віталія КУГАЇВСЬКА**

Керівник: д.б.н., професор Галина КОПИЛЬЧУК

*До захисту допущено  
на засіданні кафедри  
протокол № \_\_\_\_\_ від \_\_\_\_\_ 2023 р.  
Зав. кафедрою \_\_\_\_\_ проф. Копильчук Г.П.*

Чернівці–2023

### *Анотація*

Магістерська робота присвячена дослідженню ензиматичних активностей цитохрому р-450 в печінці щурів із токсичним ураженням після часткової гепатектомії. У роботі досліджувати р-гідроксилазну, N-оксигеназну та N-деметилазну активності цитохрому Р-450, вміст цитохрому Р-450 та швидкість інактивації цитохрому Р-450.

Підвищення N-оксигеназної та р-гідроксилазної активностей цитохрому Р-450 з одночасним зростанням його вмісту в мікросомальній фракції печінки інтактних щурів після часткової гепатектомії зареєстровано на початкових етапах регенерації (24 год) та в період активної проліферації клітин (48 год).

Встановлена нами активація ензимів реакцій р-гідроксилювання, N-окислювального деметилювання та N-оксигенації цитохрому Р-450 в печінці щурів із токсичним ураженням після часткової гепатектомії впродовж всього експерименту може бути наслідком посиленої індукції ізоформ цитохрому Р-450, задіяних у біотрансформації даного ксенобіотика, що гальмує регенераційний процес.

Інактивація цитохрому Р-450, зареєстрована нами після ЧГЕ лише в мікросомальній фракції печінки щурів із токсичним ураженням ацетамінофеном на 24 та 48 год, може бути наслідком окислення сульфгідрильних груп у молекулі даного гемопротеїн внаслідок активації прооксидантних процесів на початкових етапах регенерації.

**Ключові слова:** цитохром Р-450, р-гідроксилювання, N-деметилування; N-окислення, ацетамінофен, часткова гепатектомія, регенерація, печінка

### *Annotation*

The master's thesis is devoted to the study of enzymatic activities of cytochrome P-450 in the liver of rats with toxic injury after partial hepatectomy. The work investigates p-hydroxylase, N-oxygenase and N-demethylase activities of cytochrome P-450, the content of cytochrome P-450 and the rate of inactivation of cytochrome P-450.

An increase in the N-oxygenase and p-hydroxylase activities of cytochrome P-450 with a simultaneous increase in its content in the microsomal fraction of the liver of intact rats after partial hepatectomy was registered at the initial stages of regeneration (24 h) and during the period of active cell proliferation (48 h).

The activation of the enzymes of p-hydroxylation, N-oxidative demethylation and N-oxygenation of cytochrome P-450 in the liver of rats with toxic damage after partial hepatectomy throughout the entire experiment may be the result of increased induction of cytochrome P-450 isoforms involved in the biotransformation of this xenobiotic, which inhibits the regeneration process.

The inactivation of cytochrome P-450, registered by us after PH only in the microsomal fraction of the liver of rats with toxic damage by acetaminophen for 24 and 48 h, may be a consequence of the oxidation of sulfhydryl groups in the molecule of this hemoprotein due to the activation of pro-oxidant processes at the initial stages of regeneration.

**Keywords:** cytochrome P-450, p-hydroxylation, N-demethylation; N-oxidation, acetaminophen, partial hepatectomy, regeneration, liver

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

\_\_\_\_\_ **В. І. Кугаївська**  
(підпис)

## ЗМІСТ

|   |    |
|---|----|
| ВСТУП .....   | 5  |
| РОЗДІЛ I. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....   | 7  |
| 1.1. Регенерація як унікальна властивість тканин печінки .....                              | 7  |
| 1.1.1. Біологічна роль та основні моделі вивчення регенерації .....                         | 7  |
| 1.1.2. Основні етапи регенерації печінки після часткової гепатектомії....                   | 11 |
| 1.2. Індукована гепатотоксичністю ацетамінофену регенерація печінки..                       | 18 |
| 1.3. Біологічна роль ензимів системи цитохрому Р-450 у біотрансформації ацетамінофену ..... | 21 |
| РОЗДІЛ II. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.....   | 25 |
| 2.1. Об'єкти та матеріали досліджень .....  | 25 |
| 2.2. Виділення мікросомальної фракції печінки щурів.....                                    | 27 |
| 2.3. Визначення <i>p</i> -гідроксилазної активності цитохрому Р-450 .....                   | 27 |
| 2.4. Визначення <i>N</i> -деметилазної активності цитохрому Р-450 .....                     | 28 |
| 2.5. Визначення <i>N</i> -оксигеназної активності цитохрому Р-450.....                      | 29 |
| 2.6. Визначення вмісту цитохрому Р-450 .....  | 30 |
| 2.7. Визначення швидкості інактивації цитохрому Р-450 .....                                 | 31 |
| 2.8. Статистична обробка результатів.....   | 32 |
| РОЗДІЛ III. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ.....   | 33 |
| ВИСНОВКИ.....   | 42 |
| СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ... <b>Ошибка! Закладка не определена.</b>                        |    |
| ДОДАТКИ..... <b>Ошибка! Закладка не определена.</b>   |    |

## ВСТУП

Фізіологічна важливість печінки демонструється її унікальною здатністю до відновлення анатомічного об'єму і маси, тобто до регенерації, за умов різних пошкоджень [1].

На відміну від інших органів, печінка підтримує постійне співвідношення маси органу до маси тіла для збереження гомеостазу – гепатостат [2]. Регенерація є результатом гіпертрофії та гіперплазії гепатоцитів і припиняється, коли відновлюється гепатостат.

Індукція регенерації печінки шляхом резекції 2/3 маси печінки найпоширеніша експериментальна модель гризунів, яка використовується для вивчення явища регенерації [3]. На сьогодні встановлено, що в основі процесу пострезекційної регенерації печінки та її припинення при відновленні маси лежить складний, взаємопов'язаний і регуляторний комплекс молекулярних, біологічних і біохімічних кооперацій, пусковими механізмами яких є важка портальна гіпертензія, спричинена раптовою втратою значної функціональної печінкової маси та її здатності до нівелювання після збільшення розміру печінки [4].

Часткова гепатектомія печінки виконується при доброякісних і злоякісних пухлинах печінки, абсцесах, травмах, трансплантації печінки. Фактична швидкість мітозу гепатоцитів у здоровій печінці становить 0,0012–0,01%, але вона збільшується до 3% після часткової гепатектомії [5].

Однак, є деякі клінічні ситуації, коли печінка демонструє низьку регенеративну здатність, наприклад, у випадку цирозу печінки та/або ураження медикаментозними ксенобіотиками. Якщо регенерація печінки є недостатньою, це може спричинити печінкову недостатність. Тобто, недостатня активація цитокінів і факторів росту, які стимулюють регенерацію печінки, може спричинити дисфункцію залишкової печінки [6].

Ацетамінофен нині широко використовують як жарознижувальний, протизапальний та знеболювальний засіб, зокрема, в схемі лікування COVID-19 [7]. Однак передозування ацетамінофеном призводить до гострого

ураження печінки, що викликає загибель гепатоцитів і центрілобулярний некроз, а у надто великих дозах призводить до гострої печінкової недостатності. Окрім того, ацетамінофен застосовують як модельний гепатотоксин, метаболізм якого відбувається ізоформами цитохрому Р-450 (СYP450) – СYP1A2, СYP2E1, СYP3A4 у печінці [8].

Останнім часом значне зацікавлення науковців виникло щодо вивчення внутрішньоклітинної біотрансформації ксенобіотиків і ендогенних токсинів [9, 10]. Таким чином дослідження активності ензимів цитохрому Р-450 при передозуванні ацетамінофеном дозволить розширити знання про механізми, що лежать в основі регенерації печінки за моделі її ураження гепатотоксинами та/або гепатектомією.

Враховуючи вищесказане, *метою роботи* стало дослідження активностей ензимів цитохрому Р-450 у печінці щурів за умов токсичного ураження ацетамінофеном та часткової гепатектомії.

Для досягнення мети були поставлені такі *завдання*:

1. Дослідити *p*-гідроксилазну, *N*-оксигеназну та *N*-деметилазну активності цитохрому Р-450 в мікросомальній фракції клітин печінки щурів за даних експериментальних умов.

2. Оцінити вміст цитохрому Р-450 в мікросомальній фракції клітин печінки щурів за даних експериментальних умов

3. Дослідити швидкість інактивації цитохрому Р-450 в мікросомальній фракції клітин печінки щурів за даних експериментальних умов.

## РОЗДІЛ I. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

### 1.1. Регенерація як унікальна властивість тканин печінки

#### 1.1.1. Біологічна роль та основні моделі вивчення регенерації

Печінка – один з найважливіших органів, відповідальних за підтримання гомеостазу, що виконує безліч ключових фізіологічних функцій в організмі ссавців. Вона відповідає за зберігання глюкози у формі глікогену, його розщеплення за потреби і синтезу *de novo* шляхом глюконеогенезу. Окрім того, печінка відіграє важливу роль у ліпідному обміні, синтезуючи холестерол, триацилгліцерол та ліпопротеїни. Синтез і розпад амінокислот також відбуваються значною мірою в печінці. Печінка сприяє перетравленню ліпідів у тонкому кишечнику шляхом продукування жовчі. Іншою важливою функцією печінки є детоксикація від ендогенних продуктів життєдіяльності, екзогенних ксенобіотиків та інфекційних мікроорганізмів. Токсичний аміак перетворюється на сечовину в печінці, а потім виводиться через нирки. Екзогенні токсини та ліки метаболізуються та інактивуються в печінці в основному через активність ферментів, що належать до сімейства цитохрому P-450 (CYP450). Також клітини Купфера захищають організм від мікроорганізмів, що надходять із тонкого кишечника, фагоцитуючи їх, та відіграють важливу роль у видаленні застарілих і пошкоджених еритроцитів. У печінці виробляється та/або зберігається велика кількість гормонів. Багато факторів зсідання крові, зокрема вітамін К та тромбопоетин, гормон, що регулює утворення тромбоцитів у кістковому мозку, синтезуються в печінці, що робить цей орган важливим для забезпечення здатності крові зсідатись. Жиророзчинні вітаміни (A, D, E) депонуються в печінці. Альбумін – основний білок-транспортер у крові, синтезується переважно гепатоцитами [11].

Фізіологічна важливість печінки демонструється її унікальною та важливою здатністю до регенерації за умов різних пошкоджень. Регенеруючи, печінка реагує на пошкодження і таким чином забезпечує відновлення гомеостазу. Регенерація є результатом гіпертрофії та гіперплазії гепатоцитів і припиняється коли відновлюється нормальне співвідношення маси печінки до

маси тіла. Збереження співвідношення маси печінки до маси тіла – гепатостат – має бути постійним протягом життя, і, як відомо, для людини це значення становить приблизно 2% [12].

Після пошкоджень або навіть резекції великої її частини печінка здатна регенерувати та відновити свій початковий розмір. Показано, що після легкого пошкодження, де залишається достатня кількість здорової паренхіми, гепатоцити є основними медіаторами регенерації печінки [13]. З іншого боку, коли гепатоцити не здатні до проліферації, епітеліальні клітини жовчних шляхів після проліферації та диференціації до гепатоцитів відновлюють втрачену паренхіму печінки. Окрім пластичності диференціації/диференціації епітеліальних популяцій, існує також пластичність клітинної функції. Гепатоцити здатні індукувати експресію детоксикуючих цитохромних ферментів у відповідь на підвищену потребу. Вони утримуються в  $G_0$  фазі клітинного циклу, тому, перебуваючи в нормальному стані спокою, здатні швидко реагувати на регенеративні стимули [11, 14].

Існує низка моделей для дослідження регенераційної здатності печінки.

**Хірургічна модель часткової гепатектомії (ЧГЕ)** з резекцією печінки, при якій хірургічним шляхом видаляється частина печінкової маси.

Після проведення ЧГЕ кількість вирізаної печінки визначає активацію проліферативного шляху регенерації. Коли резекція зачіпає 1/3 тканини печінки, гепатоцити швидко реагують, збільшуючи свій об'єм, тим самим ініціюючи гіпертрофію. З іншого боку, якщо резекція зачіпає 2/3 маси печінки, гепатоцити переходять у з  $G_0$  у S-фазу клітинного циклу, проліферують та індукують гіперплазію. Гепатоцити зазвичай знаходяться в стані спокою, але у відповідь на регенераційні стимули здатні знову входити у клітинний цикл для відновлення первісної гепатоцелюлярної кількості печінки. Після ЧГЕ 2/3 печінки регенерація відбувається за рахунок залишкових гепатоцитів без активації клітин-попередників завдяки взаємодії різних молекулярних шляхів. Третій механізм запускається, якщо ЧГЕ вражає 80-90% печінки. Гепатоцитів

у цьому випадку недостатньо для відновлення печінки, тому основну роль відіграє трансдиференціація епітеліальних клітин жовчних шляхів [15].

Індукція регенерації печінки шляхом резекції 2/3 маси печінки є найпоширенішою експериментальною моделлю гризунів, яка використовується для вивчення явища регенерації. Модель часткової гепатектомії на гризунах була вперше запропонована *Higgins and Anderson* [16] у 1931 році та передбачає хірургічне видалення лівої латеральної, лівої медіальної та правої медіальної часток із залишенням правої латеральної та хвостатої часток, що дорівнює зменшенню печінки щура на 2/3 її маси. Після резекції печінкова тканина, що залишилася, проліферує та збільшується в розмірі, щоб відновити початкову масу з п'яти часток протягом 5-7 днів.

Незважаючи на очевидні відмінності в розмірі та анатомії печінки щурів порівняно з печінкою людини, а також на той факт, що метаболізм печінки щурів є швидшим, було показано, що регуляція регенерації печінки у щурів і людей лежить в межах однакових принципів [17]. Така модель залишалася популярною моделлю дослідження [18, 19, 20], оскільки добре переноситься гризунами без будь-якої значної післяопераційної смертності, не пов'язана з будь-яким гістологічним пошкодженням або пошкодженням залишкової тканини печінки, відзначається високим рівнем точності через однаковість анатомії печінки гризуна, для виконання не потребує передової хірургічної техніки.

**Хімічно індукване гепатотоксичне пошкодження або фармакологічні моделі.** Окрім хірургічної моделі ЧГЕ, печінка має здатність до регенерації після хімічної травми. На відміну від моделі ЧГЕ, фармакологічну модель легше виконати з більшою клінічною значущістю, оскільки вона викликає некротичне пошкодження, яке симулює певні захворювання печінки. Ці властивості зробили цю модель прийнятним варіантом для дослідження регенерації печінки. Основним недоліком цієї моделі є погана відтворюваність і стандартизація печінки, на додаток до труднощів передбачити ступінь пошкодження та регенерації печінки, щоб

уникнути істотних відмінностей між експериментами. Зокрема, підвищення концентрації токсину може викликати гостре ураження печінки, тоді як повторне введення токсину може призвести до цирозу печінки. Окрім того, системні та місцеві ефекти токсину залежать від способів введення, доз, виду тварин, включаючи їхній вік і стан харчування [21].

Найбільш широко використовуваними гепатотоксинами в моделях регенерації печінки є чотирихлористий вуглець ( $CCl_4$ ), d-галактозамін, парацетамол (ацетамінофен).

$CCl_4$  – летюча органічна і поширена гепатотоксична сполука. Він викликає гостре ураження печінки після детоксикації ізоформою 2E1 цитохрому P450 (CYP2E1), що призводить до утворення високоактивних і токсичних радикалів: трихлорметилкових ( $CCl_3^{\cdot}$ ) і трихлорметилперокси ( $Cl_3COO^{\cdot}$ ) радикалів. Ці метаболіти викликають окислювальне пошкодження ДНК, білків, ліпідів і вуглеводів у гепатоцитах, зумовлюючи їх некроз. В результаті виникає гостра запальна реакція, індукована в основному поліморфноядерними лейкоцитами та макрофагами для видалення некротичних уламків гепатоцитів. Такий тип ураження є оборотним гострим ураженням печінки з подальшою її регенерацією.

D-галактозамін – сильно гепатотоксична сполукою, яка викликає гостру печінкову недостатність через порушення метаболічної системи в печінці, що призводить до виснаження уридинтрифосфату, який у свою чергу веде до пригнічення синтезу РНК і білка. Крім того, d-галактозамін індукує дегрануляцію мастоцитів кишечника, що пригнічує його захисну функцію та сприяє всмоктуванню більшої кількості ендотоксинів, що призводить до запалення та некрозу клітин печінки. Варто також зауважити, що здатність печінки до регенерації цієї моделі слабша, ніж у моделі  $CCl_4$ .

Парацетамол – відомий жарознижуючий і безпечний засіб. Передозування парацетамолом (ацетамінофеном) має токсичну дію, яка клінічно проявляється гострою печінковою недостатністю. Ця модель активно використовується на гризунах для вивчення механізмів гострого ураження

печінки. Після передозування ацетамінофеном печінка не може здійснювати його біотрансформацію шляхом глюкуронування та сульфатування. Водночас активація системи цитохрому P450 призводить до накопичення *N*-ацетил-*p*-бензохіноніміну, який посилює утворенням вільних радикалів та стимулює клітини Купфера. Процеси, що лежать в основі регенерації печінки цієї токсичної моделі, відносно менш вивчені, ніж інші моделі. Тому необхідно провести додаткові експерименти для вивчення регенерації печінки в контексті передозування ацетамінофену [22].

### 1.1.2. Основні етапи регенерації печінки після часткової гепатектомії

Часткова гепатектомія 2/3 частини печінки викликає порушення гемодинаміки шляхом підвищення портального тиску, що є стимулом до регенерації. Відбувається проліферація гепатоцитів, епітеліальних клітин жовчних шляхів, клітин Іто, клітин Купфера і синусоїдних ендотеліальних клітин. Варто зауважити, що першими проліферують гепатоцити, тоді як епітеліальні клітини жовчних шляхів починають проліферувати лише через 2-3 дні після ЧГЕ. Після ЧГЕ гепатоцити проходять один цикл синтезу ДНК, який необхідний для відновлення 60% маси печінки. На наступних етапах кілька, але не всі гепатоцити продовжують проліферувати для досягнення повного відновлення печінки. Після цього апоптотична активність збільшується з метою корекції надмірної регенеративної відповіді [23].

Результати останніх кількох десятиліть [24, 25] показали, що регенерація печінки є складною мережею, яка регулюється різноманітними цитокінами та факторами росту, що експресуються безпосередньо в місці пошкодження чи мігрують до тканин печінки через кровоносну систему.

Регенеративний процес включає три основні етапи: **фаза праймінгу** (починається відразу після пошкодження печінки, гепатоцити в стані спокою індукуються ранніми регенераційними стимулами та переходять з  $G_0$  на  $G_1$  фазу клітинного циклу), **проліферативна фаза** (характеризується швидким

поділом клітин, активовані гепатоцити під впливом мітогенів діляться і генерують нові клітини печінки, щоб замінити пошкоджені або втрачені), **фаза термінації** (клітини припиняють проліферацію під контролем мітогенів, що дозволяє відновити нормальний баланс клітин у печінці). Початок кожної фази ініціюється певним набором цитокінів або факторів росту, що відіграють ключову роль через клітинні сигнальні шляхи багатьох біологічних ефектів у відповідь на пошкодження органу [26].

**Фаза праймінгу.** Найбільш ранніми стимулами регенерації є зміни портального тиску та підвищення рівня урокіназного активатора плазміногену (uPA). Підвищення артеріального тиску в печінкових синусоїдах зумовлене несумісністю між об'ємом печінки та об'ємом припливної венозної крові, що призводить до турбулентного потоку та механічно стимулює синусоїдні ендотеліальні клітини до виділення великої кількості uPA. uPA сприяє трансформації плазміноген-плазмін, що призводить до активації матриксної металопротеїнази (ММР) і розпаду фібриногену. Плазмін і ММР беруть участь у ремоделюванні позаклітинного матриксу, що призводить до вивільнення факторів росту, таких як фактор росту гепатоцитів (HGF).

Основними медіаторами першої фази регенерації є два прозапальних цитокіни: фактор некрозу пухлини- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) та інтерлейкін-6 (IL-6). Головним чином ці цитокіни секретуються макрофагами печінки під впливом бактеріального ліпополісахариду та компонентів C3a і C5a системи комплементу. IL-6 керує відповіддю гострої фази та ініціює цитозахист і проліферацію гепатоцитів за рахунок зв'язування з рецептором інтерлейкіну-6 (IL-6R), після чого комплекс IL-6/IL-6R ініціює активацію корецепторного глікопротеїну 130 (gp130), який активує Янус-кіназу (JAK)/ перетворювач сигналу та активатор транскрипції (STAT), мітоген-активовані протеїнкінази (МАРК) і сигнальні шляхи PI3K/АКТ. Хоча gp130 присутній на поверхні більшості клітин, IL-6R переважно локалізується на гепатоцитах. Однак існують також розчинні IL-6R, які ініціюють трансигнальний шлях у

клітинах, у яких відсутній IL-6R, і посилюють регенеративну відповідь гепатоцитів [27].

TNF- $\alpha$  виконує дві основні функції: він активує сигнальний шлях NF- $\kappa$ B через пряму взаємодію з TNF-R1 на поверхні клітин Купфера та через непряму індукцію інгібіторної кінази клітин Купфера; він також стимулює c-Jun N-кінцеву кіназу гепатоцитів (JNK). JNK фосфорилує фактор транскрипції c-Jun в ядрі, щоб індукувати транскрипцію циклін-залежної кінази 1, яка активує проліферацію гепатоцитів [28].

Вирішальну роль у регенерації печінки відіграє також білок, що підсилює регенерацію печінки (ALR), що має три ізоформи (15, 21 і 23 кДа) та експресується переважно в печінці, яєчках, нирках і мозку. Кожна ізоформа ALR має різну локалізацію в клітині і, таким чином, відіграє різну роль у регенераційному процесі. Мітохондріальна ізоформа (23 кДа) ALR транслокує білки та ініціює вивільнення MitoNEEt, що призводить до проліферації клітин. Експресія ізоформ 23 кДа та 21 кДа ALR збільшується у випадках патології та зменшує пошкодження печінки, захищає від окислювального стресу та стресу ендоплазматичного ретикулулу шляхом зниження рівня  $Ca^{2+}$ , а також має антиметастатичну дію на гепатоцелюлярну карциному. Цитоплазматична ізоформа (15 кДа) ALR посилює відповідь гепатоцитів на IL-6 шляхом індукції фосфорилування STAT3; вона також має антиметастатичну дію на гепатоцелюлярну карциному шляхом інгібування міграційної та інвазивної здатності клітин. Після ЧГЕ концентрація ALR негайно зростає та активує передачу сигналів MAPK; посилює продукцію IL-6, TNF- $\alpha$  та індукційної синтази оксиду азоту (NOS) клітин Купфера; і пригнічує активність NK-клітин. Окрім того ізоформа ALR (15кДа) захищає гепатоцити шляхом інгібування стимулів апоптозу [29, 30]

**Проліферативна фаза.** Під час другої фази регенерації печінки відбувається перехід від G1 до M фази клітинного циклу, який керується двома групами міогенів. До групи основних міогенів входять HGF, трансформуючий фактор росту (TGF- $\alpha$ ), епідермальний фактор росту (EGF) і

гепаринзв'язуючий EGF (HB-EGF), а також стимуляція синтезу ДНК і проліферації клітин через активацію сигнальних шляхів Ras-МАРК і PI3K/АКТ. До групи допоміжних мітогенів входять жовчні кислоти, фактор росту ендотелію судин (VEGF), норадреналін, інсуліноподібні фактори росту (IGF), естроген і серотонін. Основні мітогени виявляють прямі гепатотрофічні ефекти, тобто здатні викликати збільшення тканин печінки при їх введенні *in vivo* або ж керувати синтезом ДНК у середовищах без сироватки *in vitro*. Варто зауважити, що хоча допоміжні мітогени не є мітогенними в гепатоцитах, вони можуть частково сприяти регенеративному процесу, посилюючи або прискорюючи дію основних мітогенів.

HGF виробляється мезенхімальними клітинами печінки та взаємодіє з рецептором метіоніну (MET), що призводить до фосфорилування сигнального білка PI3K і MAPK з подальшою активацією шляху PI3K/АКТ і регульованою позаклітинним сигналом кінази 1/2. Цей процес призводить до проліферації, міграції та диференціювання клітин печінки та антиапоптозних ефектів. Трансмембранні рецептори рецептора епідермального фактора росту (EGFR) з тирозинкіназною активністю взаємодіють з EGF, TGF $\alpha$ , амфірегуліном (AR), епігеном і HB-EGF, що призводить до активації MAPK, PI3K/АКТ – мішені рапаміцину (mTOR) і STAT у ссавців, що стимулює проліферацію гепатоцитів.

Транскрипційні фактори, пов'язані з ядерним фактором еритроїдного 2 (NRF2), які регулюють широкий спектр генів, включаючи антиоксидантні білки та детоксикаційні ферменти, активуються у відповідь на підвищення рівня активних форм кисню. Експресія цієї молекули збільшується на ранніх стадіях регенерації печінки в результаті пошкодження клітин. Важлива також роль Nrf2 у регуляції прогресування клітинного циклу. Nrf2 є транскрипційним супресором цикліну A2 та регулятором шляху Wee1/Cdc2/Cyclin B1, який контролює початок М-фази клітинного циклу. Nrf2 також регулює проліферацію гепатоцитів шляхом модуляції сигнальної активності Notch1 і сприяє здатності ядерного фактора 4 альфа гепатоцитів

(HNF4 $\alpha$ ) підтримувати новоутворені гепатоцити в диференційованому стані [31].

Жовчні кислоти є основними кінцевими продуктами метаболізму холестеролу і синтезуються виключно в печінці, де вони функціонують як сигнальні молекули, які активують мембранний G-білковий рецептор жовчних кислот 1 (або TGR5) і ядерний фарнезоїдний рецептор X (FXR). Після втрати маси печінки після ЧГЕ концентрація жовчних кислот зростає протягом першої хвилини, що призводить до активації FXR, який у свою чергу призводить до пригнічення синтезу жовчних кислот та індукції гена FOXM1B. FOXM1B є фактором транскрипції, який регулює синтез ДНК і мітоз через активацію циклін-залежної кінази 2 (CDK2), яка необхідна для переходу від G1 до S фази клітинного циклу і активації CDK1 і відповідає за перехід від S до M фази клітинного циклу. Активація FXR також з'являється в ентероцитах і призводить до індукції експресії фактора росту фібробластів (FGF)15/FGF19. Рецептор TGR5, який розташований на поверхнях клітин Купфера, синусоїдних ендотеліальних клітин та епітеліальних клітин жовчних шляхів, призводить до індукції цАМФ і інгібування сигналів ядерного фактора каппа В (NF- $\kappa$ B). В результаті знижений синтез прозапальних цитокінів відбувається в клітинах Купфера і макрофагах кісткового мозку через залежну від протеїнкінази В активацію mTOR. TGR5 захищає печінку від перевантаження жовчними кислотами, збільшуючи його виділення з сечею; він також посилює секрецію HCO $_3^-$  і Cl $^-$  і контролює полярність жовчних кислот, оскільки надмірно гідрофобні молекули можуть пошкодити регенеруючу печінку.

Ліганди Wnt — це глікопротеїни, що виділяються непаренхіматозними клітинами печінки, переважно клітинами Купфера та синусоїдних ендотеліальних клітинами, і є ключовими молекулами регенерації печінки. Ліганди Wnt призводять до інтеграції Axin у цитоплазматичну мембрану через взаємодію з рецептором Frizzled і корецепторами LRP5/6, що призводить до порушення функції комплексу деградації  $\beta$ -катеніну. Отже, ліганди Wnt призводять до накопичення  $\beta$ -катеніну з подальшою його транслокацією до

ядра та взаємодією з членами сімейства факторів транскрипційних Т-клітин, що призводить до транскрипції цільового гена, наприклад, цикліну D1, що призводить до проліферації гепатоцитів. Дослідження [32] зазначається, що ЧГЕ призводить до посилення експресії Wnt протягом перших 12 годин, що призводить до 7-8-кратного збільшення експресії цикліну D1 і до 100-кратного збільшення експресії глутамінсинтетази. Роль підвищеної експресії глутамінсинтетази залишається невідомою, але вважається, що вона сприяє перицентральної детоксикації, оскільки інші 2/3 гепатоцитів відновлюють масу органу.

Передача сигналів Notch є важливим шляхом у ембріональному розвитку, підтримці гомеостазу та регенерації печінки. JAG-1 і DLL-4 є основними лігандами сигналізації Notch, які експресуються в печінці. Основною роллю цього шляху в розвитку печінки є взаємодія JAG1-Notch2, яка призводить до диференціювання гепатобластів до епітеліальних клітин жовчних шляхів і розвитку внутрішньопечінкового жовчного дерева [33].

**Фаза термінації.** Коли досягається необхідне співвідношення маси печінки та маси тіла, клітинна проліферація припиняється завдяки інгібіторним молекулам, які контролюють швидкість і напрямок регенерації печінки. Серед інгібіторів клітинної проліферації IL-1, який синтезується непаренхіматозними клітинами печінки, пригнічує синтез ДНК, індукований HGF, EGF і TGF- $\alpha$ . IL-6 є багатофункціональним і відіграє роль як індуктора регенерації печінки, так і інгібітора; його ефект залежить від часу і дози молекули. IL-6-залежне інгібування проліферації, ймовірно, відбувається шляхом збільшення експресії p21. Сигнальний шлях JAK/STAT інгібується 8 ізоформами SOCS. SOCS1 безпосередньо зв'язує та інгібує JAK, тоді як SOCS3 зв'язується з рецепторами цитокінів, утворює комплекс з JAK та інгібує сигнальний шлях STAT3. SOCS3 є основним супресором сигнального шляху, що активується IL-6; він пригнічує фосфорилування корцептора gp130, JAK і STAT3. SOCS1 негативно регулює проліферацію гепатоцитів, індуковану HGF, через інгібування сигналу c-MET і, ймовірно, регулює рівні

TNF- $\alpha$ , оскільки він взаємодіє з адаптерним білком, що містить домен рецептора інтерлейкіну 1, який керує синтезом поточного медіатора [34].

Деякі члени родини TGF- $\beta$  діють як інгібітори проліферації [35]. Зокрема, TGF- $\beta$ 1 відіграє особливу роль у зв'язуванні з рецепторами типів 1 і 2 та індукції апоптозу клітин для корекції надмірної маси печінки. Поза печінкою TGF- $\beta$ 1 синтезується в тромбоцитах і селезінці. Селезінка може брати участь у фазі термінації, оскільки вона інгібує HGF та експресію його рецептора c-MET. У зв'язку з цим спленектомія призводить до посилення проліферації гепатоцитів у перші 48 год після ЧГЕ. Інші члени родини TGF- $\beta$  беруть участь у фазі завершення регенерації печінки, включаючи інгібітори проліферації активін А-гепатоцитів і кісткові морфогенетичні білки (BMP). BMP9 експресується виключно тканинами печінки. BMP9 регулює різноманітні біологічні функції, такі як метаболізм глюкози та ліпідів, ангіогенез, онкогенез та фіброгенез, і впливає на регенерацію печінки після гострих травм. Окрім негативного впливу на регенерацію печінки, BMP9 також має профіброгенну активність і сприяє розвитку гепатоцелюлярної карциноми [36].

HNF4- $\alpha$  регулює диференціацію гепатоцитів і згідно досліджень [37, 38] сприяє припиненню регенерації печінки. Експресія поточної молекули значно знижувалася під час фази праймінгу та збільшувалася протягом наступних фаз, що необхідно для припинення та відновлення функції гепатоцитів після ЧГЕ. HNF4- $\alpha$  є антагоністом YAP і TGF- $\beta$ /SMAD3; отже, зниження експресії цієї молекули стимулює промітогенні функції та активує фактор росту сполучної тканини. Підвищена експресія HNF4- $\alpha$  під час наступних фаз регенерації запобігає надмірному синтезу сполучної тканини і, отже, фіброзу.

Експериментально доведено, що після ЧГЕ печінка щура повністю відновлює свої розміри та масу на 7-8-й (або на 2 тиждень, за деякими авторами) день після операції. Варто зауважити, що незважаючи на відновлення маси печінки, процес регенерації не завершується. У регенерованій печінці відбувається постійний процес трансформації форми і

розміру гепатоцитів та трансформації судинної мережі, що є основою для зміни просторової архітектури печінкових часточок [39].

## **1.2. Індукована гепатотоксичністю ацетамінофену регенерація печінки**

За останні кілька десятиліть відбувся значний прогрес у біологічному розумінні та клінічному застосуванні регенерації печінки [40, 41]. На відміну від регенерації печінки, яка відбувається після часткової гепатектомії на модельних тваринах, у людей регенерація печінки відбувається частіше після пошкодження внаслідок ішемічного або токсичного ураження.

Токсичне ураження гепатоцитів пов'язане з утворенням потенційно генотоксичних агентів, переважно реактивних електрофілів, таких як продукти перекисного окислення ліпідів і активні форми кисню ( $O^{2-}$ ), що може призвести до пошкодження ДНК і геномних змін. Такі зміни можуть призвести до неопластичної ініціації, клонального росту та утворення гепатоцелюлярної карциноми. Тому регенераційна здатність печінки розглядається як захист печінки під час пошкодження [42].

Дослідження регенерації печінки переважно опиралися на модель ЧГЕ гризунів, запропоновану *Higgins and Anderson* [16]. Проте, дослідження останніх років [43] доводять, що пацієнти з масивним гострим некрозом та атрофією печінки здатні відновити її нормальну функцію протягом певного часу. Тобто, регенерація також важлива і для виживання при гострій печінковій недостатності, яка зазвичай пов'язана з гепатотоксичністю.

Основні відмінності між гепатотоксичністю ксенобіотиків та частковою гепатектомією пов'язані насамперед з анатомією печінки. ЧГЕ передбачає видалення частини печінки хірургічним шляхом, у той час як ксенобіотична гепатотоксичність викликає некроз печінки, що розвивається у кишнях всередині тканини. Таким чином клітинна проліферація у двох випадках проходить різними шляхами. Після часткової гепатектомії процес поділу клітин, який вважається основним під час регенерації печінки, відбувається в

залишкових частках. При пошкодженні, викликаному ксенобіотиками, гепатоцити, які оточують некротичні ділянки, входять у клітинний цикл та діляться [44]. Проліферація гепатоцитів після ЧГЕ є дольковою, розпочинається навколо перипортальних ділянок і поширюється назовні хвилеподібно і переважно при повній відсутності ураження печінки. Ксенобіотична гепатотоксичність в основному супроводжується обширним стерильним запаленням [14]. Відповідно, враховуючи основні відмінності, сигнали регенерації печінки дещо відрізняються при частковій резекції печінки та токсичному ураженні.

Ацетамінофен (*N*-acetyl-*p*-aminophenol (APAP)) є одним із найбільш використовуваних безрецептурних анальгетиків і вважається дуже безпечним у терапевтичних дозах. Однак передозування APAP призводить до гострого ураження печінки, що включає загибель гепатоцитів і центрілобулярний некроз, а у надто великих дозах призводить до гострої печінкової недостатності.

Гепатотоксичність APAP можна розділити на три фази. Під час початкової фази після передозування APAP швидко метаболізується до свого реактивного метаболіту, *N*-ацетил-*p*-бензохіноніміну (NAPQI), який видаляється кон'югацією з глутатіоном (GSH), що призводить до швидкого виснаження клітинних запасів GSH. Надлишок NAPQI утворює клітинні білкові адукти, особливо в мітохондріях, що призводить до мітохондріальної дисфункції та генерації активних форм кисню (АФК). Початкова генерація АФК у мітохондріях посилюється безліччю внутрішньоклітинних сигнальних подій, що призводить до відкриття перехідних пор проникності мітохондрій і вивільнення ендонуклеаз, які викликають пошкодження ДНК. Усі ці події зрештою призводять до гепатоцелюлярного некрозу, особливо в центрілобулярній області. Під час фази прогресування первинне гостре ураження печінки далі прогресує за допомогою позаклітинних механізмів, які поки не зовсім зрозумілі. Некротичні клітини вивільняють молекулярні структури, пов'язані з пошкодженням, такі як високої мобільності білок group

box 1 та фрагменти ДНК, які спричиняють залучення запальних клітин (зокрема, нейтрофілів) і генерацію цитокінів, що зрештою призводить до стерильного запалення. Вивільнення протеолітичних ферментів, таких як кальпаїни, з відмираючих гепатоцитів також може опосередковувати прогресування АРАР-індукованого ураження печінки шляхом пошкодження сусідніх гепатоцитів. Крім того, швидкість поповнення клітинних запасів GSH після початкового виснаження може впливати на ступінь окислювального пошкодження та змінювати перебіг АРАР-індукованого ураження печінки. Фази пошкодження гепатотоксичності АРАР згодом супроводжуються *фазою відновлення*, під час якої починається компенсаторна гепатоцелюлярна проліферація, некротичні гепатоцити замінюються новоутвореними клітинами, що призводить до регенерації та відновлення печінки. У випадках, коли ініціюється потужна відповідь регенерації печінки, пошкодження печінки усувається, і функція печінки відновлюється спонтанно. У випадках, коли регенерація печінки не відбувається, гостре ураження печінки може прогресувати до гострої печінкової недостатності з поліорганною недостатністю та смертю [45].

Результати кількох недавніх досліджень [46] свідчать про те, що регенерація печінки після передозування АРАР включає складну, залежну від часу та дози взаємодію медіаторів, включаючи фактори росту, цитокіни.

Регенерація печінки відбувається за принципами дозо-відповіді, і після індукованого токсикантом ураження печінки регенерує пропорційно до ступеня ураження печінки, але лише до порогової дози. Дози, вищі за порогову, при подальшому їх збільшенні, викликають різке зниження та затримку регенераційного процесу печінки. Таким чином, це призводить до неконтрольованого прогресування ураження печінки, що призводить до невдалого відновлення та смерті.

Дослідження з використанням експериментальних доз АРАР на мишах показали подібні характеристики дози-реакції регенерації печінки після гепатотоксичності АРАР [47]. Помірно токсична доза АРАР (300 мг/кг) у

мишей викликає серйозне пошкодження печінки, проте своєчасну та надійну компенсаторну регенерацію печінки, що в кінцевому підсумку призводить до регресії пошкодження, спонтанного відновлення та виживання. Навпаки, серйозне передозування АРАР (600 мг/кг) у мишей призводить до порівнянного початкового ураження печінки, але непропорційно порушеної та уповільненої регенерації печінки, що призводить до неконтрольованого прогресування ураження, невдалого відновлення та значної смертності. Тобто, механізми, залучені до пошкодження печінки та компенсаторної регенерації, значно відрізняються залежно від дози АРАР [48].

Таким чином, важливо вивчити механізми регенерації печінки після важкого передозування АРАР, що моделює патофізіологію клінічної АРАР-індукованої гострої печінкової недостатності. Варто також зауважити, що окрім дози АРАР, на регенерацію печінки після передозування АРАР можуть впливати також інші фактори, як наприклад харчовий статус, вік і супутні захворювання, що є ключовим у клінічній практиці та потребує детального дослідження на тваринних моделях [49].

### **1.3. Біологічна роль ензимів системи цитохрому Р-450 у біотрансформації ацетамінофену**

Серед різноманітних функцій печінки біотрансформація ліків включає перетворення гідрофобних сполук у водорозчинні метаболіти, які можуть виводитися з жовчю та сечею. Останнім часом посилився неабиякий інтерес щодо внутрішньоклітинної біотрансформації ксенобіотиків та токсичних метаболітів, як одного із ключових факторів у підтриманні нормального метаболізму, який у свою чергу визначає резистентність як клітин, так і організму в цілому до розвитку патологічних станів [50].

Ацетамінофен (парацетамол, *N*-acetyl-*p*-aminophenol (АРАР)) – одним із найбільш широко використовуваних безрецептурних анальгетиків та антипіретиків з групи анілідів, який входить до складу багатьох комбінованих лікарських засобів. АРАР безпечний у терапевтичних дозах, але

передозування може спричинити гостру печінкову недостатність. Окрім того, АРАР часто використовують як модельний токсин для індукції гепатотоксичності в дослідних тварин [51].

Метаболізм АРАР здійснюється переважно в печінці, завдяки високій активності наявних в ній ензимів I та II фаз біотрансформації ксенобіотиків. Дещо менше значення відіграють нирки та кишечник, в основному як органи екскреції.

Перша фаза біотрансформації передбачає активацію препарату за дії монооксигенази цитохрому Р-450, НАДФН-оксидази та кисню, що призводить до утворення метаболітів з полярними властивостями. Реакції другої фази – це кон'югація АРАР з глюкуроновою кислотою і сульфатом, а також метаболітів першої фази з глутатионом, внаслідок чого утворюються нетоксичні сполуки. За фізіологічних умов 50-70% терапевтичної дози препарату піддається кон'югації за дії UDP-глюкуронілтрансфераз (КФ 2.4.1.17). Печінкові сульфотрансферази (КФ 2.8.2.1) зв'язують 25-44% АРАР. І перші, і другі кон'югати стають нетоксичними та екскретуються з організму з сечею. Близько 5-10% вступають в окиснювальні реакції, які каталізуються мікросомальною ензимною системою цитохрому Р-450. Печінкова *N*-ацетилаза каталізує перетворення приблизно 6% АРАР, а ще стільки ж виводиться з організму в незміненому вигляді. В нормі активність глюкуронілтрансфераз і сульфотрансфераз достатньо висока і лише незначна частина ацетамінофену вступає в окиснювальні реакції за дії цитохрому Р-450 [52].

В залежності від дози препарату, визначається який саме шлях біотрансформації буде переважати. За терапевтичних доз переважає кон'югація з сульфатом, при незначному збільшенні дози – глюкуронування, а при передозуванні – гідроксилювання ізоформами цитохрому Р-450 [53].

Цитохром Р-450 – це надродина гемопротеїнів, які здійснюють окисний метаболізм багатьох ендогенних сполук та ксенобіотиків. Цитохром Р-450, локалізований в мембрані гладенького ЕПР гепатоцитів, здатний активувати

молекулярний кисень за участі електронів, донором яких є НАДФН. Належить до підкласу оксигенази, оскільки використовують молекулярний кисень для окиснення субстрату та до підкласу монооксигенази, бо вводять один атом Оксигену в одну молекулу субстрату.

Оксигеназні реакції, що каталізуються цитохромом P-450, досить різноманітні. Одна з найпоширеніших реакцій окислення ксенобіотиків – окисне деалкілювання, що супроводжується окисненням алкільної групи, приєднаної до атомів N, O або S. Другий поширений тип реакцій – гідроксилювання циклічних сполук (ароматичних, межових та гетероциклічних вуглеводів). Ферменти цитохрому P-450 можуть також каталізувати реакції гідроксилювання аліфатичних сполук, N-окислення, окисне дезамінування, реакції відновлення нітросполук. Різноманіття цих реакцій зумовлене тим, що у всіх випадках початковим етапом процесу є вбудовування гідроксильної групи в молекулу субстрату, внаслідок чого відбувається зростання реакційної здатності молекули [54].

Варто зауважити, що активація реакційноздатних груп субстратів супроводжується утворенням реакційноздатних метаболітів, які можуть ковалентно зв'язуватися з апоферментом цитохрому P-450, тим самим інактивуєючи ензим. Інактивації цитохрому P-450 – перехід цитохрому P-450 в неактивну форму цитохром P-420 відбувається внаслідок модифікації SH-груп амінокислот [55]. Неактивна форма цитохрому P-420 нестійка і в присутності кисню швидко втрачає гем, тому утворення цитохрому P-420 є одним із етапів деградації цитохрому P-450 [56].

Отже, регенерація печінки відбувається у відповідь на ураження, що викликає пошкодження, запалення або загибель клітин, та класифікується як хронічна та гостра регенерація. Резекція тканин печінки веде до гострої регенерації з подальшою активацією сигнальних шляхів та, зрештою, призводить до відновлення гепатостату. Регенеративний процес після проведення часткової гепатектомії включає три основні етапи: фаза праймінгу, проліферативна фаза, фаза термінації, що ініціюється певним набором

регенеративних стимулів. Окрім хірургічної моделі регенерації, печінка має здатність до хронічної регенерації після медикаментозного або хімічного ушкодження, зокрема передозуванням ацетамінофену. Модель передозування ацетамінофеном активно використовується на гризунах для вивчення механізмів ураження печінки. Водночас процеси, які лежать в основі регенерації печінки цієї токсичної моделі, відносно менш вивчені, ніж інші моделі. Тому необхідно провести додаткові експерименти для вивчення регенерації печінки в контексті передозування ацетамінофену.

Варто також зауважити, що ацетамінофен відіграє важливу роль у післяопераційній терапії пацієнтів як ефективний знеболюючий та жарознижуючий засіб, сприяючи швидкому відновленню після хірургічних втручань. Проте на сьогодні відкритим залишається питання допустимої дози цього препарату для застосування пацієнтам після операції на печінці, зокрема після резекції її частини [57].

Окрім того, в залежності від дози препарату, визначається який саме шлях біотрансформації ацетамінофену буде переважати. Дослідження [58, 59] показали, що при передозуванні ацетамінофену переважатиме його біотрансформація шляхом гідроксилювання ізоформами цитохрому P-450. Таким чином, дослідження активності цитохрому P-450 при передозуванні ацетамінофеном дозволить розширити знання про механізми, що лежать в основі регенерації печінки за моделі її ураження гепатотоксинами та/або гепатектомією.

## РОЗДІЛ II. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

### 2.1. Об'єкти та матеріали досліджень

Дослідження проводили на білих безпородних щурах віком 4-5 місяців та масою 130-160 г. Під час експерименту тварини утримувались в пластмасових клітках з вільним доступом до води та із попередньо простерилізованою підстилкою. Після проведення хірургічних втручань у клітках перебувала одна особина. Утримання дослідних тварин та всі маніпуляції здійснювали відповідно з положеннями «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та наукових цілей» (Страсбург, 1986), та VII Національного конгресу з біоетики «Загальні етичні принципи експериментів на тваринах» (Київ, 2019).

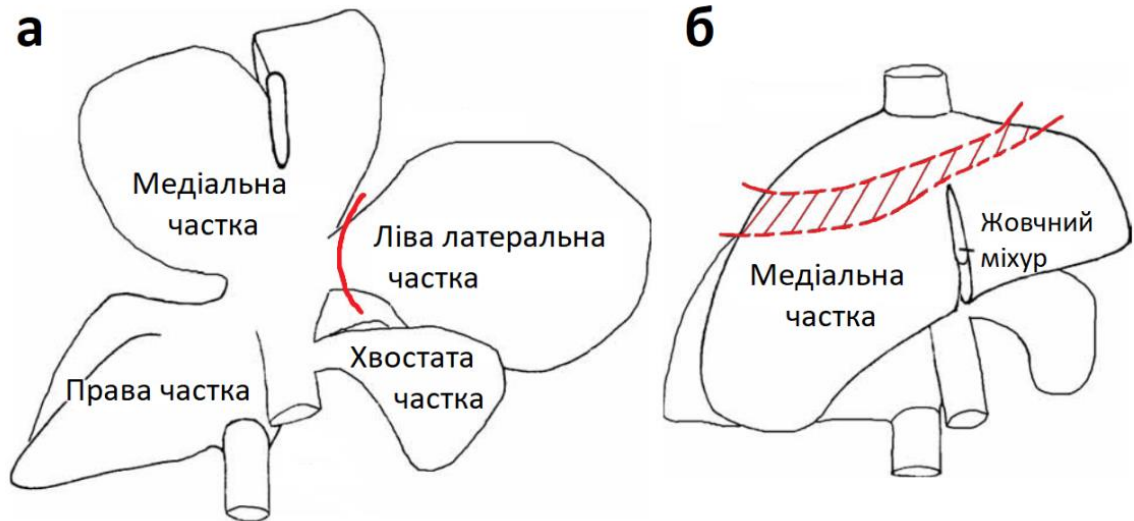
Токсичне ураження печінки проводили шляхом введення *per os* дослідним тваринам ацетамінофену у вигляді суспензії в 2 % розчині крохмального гелю з розрахунку 1250 мг/кг маси тварини 1 раз на день протягом 2 діб [60].

Дослідним щурам проводилась часткова гепатектомія (ЧГЕ), якщо полягала в резекції 2/3 тканини печінки. Часткову гепатектомію проводили методом *Claudia Mitchell & Holger Willenbring* із застосуванням подвійної вузлової операції [61]. Даний метод полягає у почерговому перев'язуванні та резекції часток печінки.

Печінка щура складається з чотирьох основних часток: середньої (38% маси печінки), лівої бічної (30%), правої (22%) і хвостатої (10%). З літератури відомо, що ці частки та їх підрозділи аналогічні сегментам печінки людини [62]. Зокрема, хвостата частка (яка складається з частки Шпігеля та паракавальної частини) відповідає сегментам людини (Sg) I та IX, ліва частка – Sg II, лівий компонент середньої частки – Sg III, правий компонент – Sg III. Sg IV, V та VIII, а права частка – Sg VI і VII.

Таким чином, після першого перев'язування було видалено ліву латеральну частку (приблизно 26% маси печінки), тоді як після другого перев'язування було видалено медіальну частку печінки (приблизно 40% маси

печінки), як показано на рис. 2.1.1. Проведена хірургічна техніка займає 15–20 хвилин і описана вперше на щурах, вона відповідає стандартизації та дає високовідтворювані результати.



**Рис. 2.1.1. Схематичне зображення ділянок, які в подальшому піддавались резекції після першого (а) та другого (б) перев'язування часток печінки**

Для того, щоб нівелювати пошкоджуючий вплив, щурам додатково проводилася лапаротомія черевної порожнини, описана у літературі [63] без подальших інвазивних втручань. Тваринам проводили розріз по середині від мечоподібного відростка до краніального краю таза, часткам печінки обережно торкалися зволженим ватним попередньоостерилізованим тампоном, після чого здійснювали накладання хірургічних швів. Лапаротомію проводили для імітації гострої фази у відповідь на ЧГЕ.

Згідно моделі дослідження тварин поділили на групи:

I група – здорові щури, яким здійснювали часткову гепатектомію (К/ЧГЕ);

II група – щури, яким моделювали ацетамінофен-індуковане ураженням та здійснювали часткову гепатектомію (ТУ/ЧГЕ).

Умертвіння щурів проводили методом цервікальної дислокації під легким ефірним наркозом на 24 год (відповідає фазі праймінгу), 48 год (тобто

в період активної проліферації клітин печінки), 72 год (відповідає фазі термінації) та на 168 (як модель віддаленого періоду регенераційного процесу) години після здійснення резекції.

## 2.2. Виділення мікросомальної фракції печінки щурів

Мікросомальну фракцію клітин печінки отримували методом диференційного центрифугування. Принцип методу ґрунтується на тому, що мікросоми – високозаряджені частинки, які здатні утворювати агрегати при додаванні іонів двовалентних металів, що нейтралізують негативний заряд мікросом.

Всі операції проводили при 0-4°C. Гомогенізацію тканин проводили в 0,25 М розчині сахарози. Фільтрат центрифугували на центрифuzі HERAEUS Biofuge Stratos (США) при 12 000 g протягом 15 хв. До надосадової рідини додавали іони  $\text{Ca}^{2+}$  і  $\text{Mg}^{2+}$  (до 9 об'ємів надосадової рідини додавали 1 об'єм 80 мМ розчину хлориду кальцію та 1 об'єм 160 мМ хлориду магнію у 10 мМ трис-НCl буфері, рН 7,4). Реакційну суміш перемішували на орбітальному шейкері UOSlab SH-5 (Україна) протягом 10 хв з подальшим центрифугуванням при 10 000 g впродовж 15 хв. Отриманий осад мікросомальної фракції двічі промивали 150 мМ буфером трис-НCl, рН 8,0 та ресуспендували [64].

## 2.3. Визначення *p*-гідроксилазної активності цитохрому Р-450

Показником *p*-гідроксилазної активності цитохрому Р-450 вважають швидкість гідроксилювання аніліну. Швидкість гідроксилювання аніліну визначають за кількістю утвореного *p*-амінофенолу, який разом з фенолом, в присутності карбонату натрію ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ), утворює індофенольний комплекс синього кольору. Реакція відбувається на молекулі цитохрому Р-450 в присутності NADPH і кисню.

Реакційне середовище містило: мікросомальну фракцію; 40 мМ трис-НCl буфері, рН 7,4; 16 мМ розчин  $\text{MgCl}_2$ ; 3 мМ NADPH. Реакцію ініціювали додаванням розчину аніліну. Проби інкубували на водяній бані при 37°C

протягом 20 хв при постійному струшуванні. Реакцію зупиняли додаванням 15% розчину трихлороцтової кислоти (ТХО) з наступним центрифугуванням при 3500 g протягом 10 хв. До надосадової рідини додавали 10% розчин карбонату натрію ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) та 2% розчин фенолу, приготовлений в 0,2 N розчині натрій гідроксиду. Проби витримували на водяній бані при 37 °C протягом 30 хв.

Контрольна проба містила дистильовану воду, 10% розчин карбонату натрію та 2% розчин фенолу, приготовлений в 0,2 n розчині натрій гідроксиду без подальшого інкубування.

Екстинцію дослідних проб визначали напроти контролю за допомогою спектрофотометру CARY 60 (США) при довжині хвилі 630 нм та з урахуванням коефіцієнта молярної екстинкції для *p*-амінофенолу, що становить  $13,3 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ .

*p*-гідроксилазну активність виражали в нмоль/(хв×мг протеїну) [65].

#### **2.4. Визначення *N*-деметилазної активності цитохрому P-450**

Швидкість деметилювання диметиланіліну (ДМА), що визначають за кількістю утвореного формальдегіду, вважають одним із показників активності ензимів гідроксилювання системи цитохрому P-450. Реакція проходить на молекулі цитохрому P-450 за наявності NADPH і кисню.

Реакційне середовище містило: мікросомальну фракцію; 40 mM трис-HCl буфері, pH 7,6; 16 mM розчин  $\text{MgCl}_2$ ; 3 mM NADPH. Реакцію ініціювали додаванням розчину ДМА. Проби інкубували на водяній бані при 37 °C протягом 30 хв при інтенсивному струшуванні. Реакцію зупиняли додаванням суміші однакових об'ємів насиченого розчину гідроксиду барію та 25% розчину сульфату цинку. Для осадження протеїнів проби центрифугували при 3500 g протягом 10 хв.

Вміст формальдегіду в надосадовій рідині визначали за допомогою кольорової реакції Наша. До 0,5 мл надосаду додавали 2 мл реактиву Наша (2 моль/л ацетат амонію; 0,05 моль/л льодяна оцтова кислота; 0,02 моль/л

ацетилацетон) та витримували на водяній бані при 37°C протягом 45 хв для утворення забарвлення.

Контрольна проба містила 0,5 мл дистильованої води та 2 мл реактиву Наша без подальшого інкубування.

Екстинцію дослідних проб визначали напроти контролю спектрофотометрично при довжині хвилі 412 нм. Ензиматичну активність обчислювали з урахуванням коефіцієнта молярної екстинкції формальдегіду, що складає  $1,5 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  і виражали в нмоль/(хв×мг протеїну) [65].

## 2.5. Визначення *N*-оксигеназної активності цитохрому Р-450

*N*-оксигеназну активність цитохрому Р-450 визначають за кількістю утвореного *N*-окси-ДМА, який при рН 2,5 легко відновлюється до ДМА і при додаванні  $\text{NaNO}_2$  перетворюється в *p*-нітрозодиметиланілін – кольорову сполуку з максимумом поглинання 420 нм.

Реакційне середовище містило: мікросомальну фракцію; 40 мМ трис-НСІ буфері, рН 7,6; 16 мМ розчин  $\text{MgCl}_2$ ; 3 мМ NADPH. Реакцію ініціювали додаванням розчину ДМА. Проби інкубували на водяній бані при 37°C протягом 30 хв при інтенсивному струшуванні. Реакцію зупиняли додаванням 0,5 мл 0,9 н  $\text{HClO}_4$ . Для осадження протеїнів проби центрифугували при 3500 g протягом 10 хв.

В градуйовані пробірки з притертими пробками вносили по 1 мл надосадової рідини та доводили рН до 9,4 шляхом додавання 1 н розчину NaOH до блідно-рожевого забарвлення при використанні в якості індикатора фенолфталеїн.

Для видалення неокисленого ДМА проби тричі екстрагували гексаном при струшуванні на орбітальному шейкері UOSlab SH-5 (Україна) протягом 2 хв. Після третьої екстракції проби протягом 20 хв залишали відкритими для випаровування гексану, що залишився. Після цього рН середовища доводили до 2,4 додаванням 12 крапель 5% розчину ТХО. У реакційну суміш вносили

0,1 М розчин  $\text{NaNO}_2$  і об'єм проби доводили до 3 мл цитратним буфером (рН 2,4). Для появи забарвлення проби інкубували при  $60^\circ\text{C}$  протягом 5 хв.

У контрольну пробу додавали дистильовану воду; 40 мМ трис-НСІ буфер, рН 7,6; 16 мМ розчин  $\text{MgCl}_2$ ; розчин ДМА; 0,9 н  $\text{HClO}_4$ . Після чого доводили рН до 9,4 як описано вище та вносили 12 крапель 5% розчину ТХО, 0,1 М розчин  $\text{NaNO}_2$  і об'єм проби доводили до 3 мл цитратним буфером (рН 2,4). Для появи забарвлення контрольну пробу інкубували 5 хв при  $60^\circ\text{C}$ .

Екстинцію дослідних проб визначали напроти контролю спектрофотометрично при довжині хвилі 420 нм. Ензиматичну активність обчислювали з урахуванням коефіцієнта молярної екстинкції *p*-нітрозодиметиланіліну, що складає  $8,2 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  і виражали в нмоль/(хв×мг протеїну) [50].

## 2.6. Визначення вмісту цитохрому Р-450

Визначення вмісту цитохрому Р-450 проводили методом *Omura and Sato* [66]. Принцип методу ґрунтується на спектрофотометричному вимірюванні різниці в поглинанні спектрів окисленої і відновленої форм цитохрому Р-450 при довжині хвилі 450 нм.

У дослідну пробу додавали мікросомальну фракцію та 100 мМ трис-НСІ буфер, рН 7,4. В якості контролю використовували 100 мМ трис-НСІ буфер, рН 7,4. Через дослідну та контрольну пробу пропускали монооксид карбону протягом 1 хв для утворення відновленого комплексу цитохрому Р-450-СО. Бівалентний оксид карбону, одержували шляхом додавання концентрованої мурашиної кислоти до концентрованої сірчаної кислоти. Для очищення від залишків кисню, газ пропускали через розчин пірогалолу. У дослідну та контрольну пробу додавали кілька кристалів дитіоніту натрію для відновлення цитохрому Р-450.

Ідентифікацію вмісту цитохрому Р-450 проводили визначенням диференційних спектрів поглинання в кюветі з довжиною оптичного шляху 1 см. Для цитохрому Р-450 максимум поглинання спостерігається при 450 нм, а

мінімум при 490 нм. Розрахунок вмісту цитохрому Р-450 здійснювали за формулою:

$$C = \frac{D_{450} - D_{490}}{M \times L \times W}, \text{ де}$$

$D_{450} - D_{490}$  – різниця між максимумом поглинання при 450 нм і мінімумом при 490 нм;

$M$  – молярна екстинкція (0,091);

$L$  – довжина оптичного шляху в см (1);

$W$  – кількість протеїну в мг.

Вміст цитохрому Р-450 виражали у нмоль/мг протеїну.

## 2.7. Визначення швидкості інактивації цитохрому Р-450

Швидкість перетворення цитохрому Р-450 в неактивну форму (цитохром Р-420) визначали шляхом запису диференціальних спектрів поглинання відновлених гемопропротеїнових карбоксикомплексів при 420 нм і 450 нм на 1, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21 хв проходження реакції.

У дослідну пробу додавали мікросомальну фракцію та 0,1 М калій-фосфатний буфер (рН 7,0) та інкубували 5 хв при 37 °С. В якості контролю використовували 0,1 М калій-фосфатний буфер, рН 7,0. Через дослідну та контрольну пробу пропускали монооксид карбону протягом 1 хв для утворення відновленого комплексу цитохрому Р-450-СО. Бівалентний оксид карбону, одержували шляхом додавання концентрованої мурашиної кислоти до концентрованої сірчаної кислоти. Для очищення від залишків кисню, газ пропускали через розчин пірогалолу. Для відновлення цитохрому Р-450, в дослідну і контрольну пробу додавали кілька кристалів дитіоніту натрію.

Швидкість інактивації цитохрому Р-450 розраховували як різницю оптичного поглинання при 420 нм і 450 нм з урахуванням кількості протеїну в мг у кожній пробі [66].

**Концентрацію протеїну** в дослідних зразках визначали за методом *Lowry et al.* [67].

### **2.8. Статистична обробка результатів**

Статистичну обробку результатів проводили на персональному комп'ютері, використовуючи пакет аналіз табличного редактора «Microsoft Excel 2010». Обробку результатів здійснювали з використанням t-критерію Стьюдента, обчислювали стандартні відхилення, середнє арифметичне та врахували кількість тварин в кожній групі. Достовірними вважалися результати, якщо  $P \leq 0,05$ .

### РОЗДІЛ III. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Регенерація печінки – процес, за допомогою якого пошкоджена печінка може відновлюватися із залишків печінкової тканини, що залишилась. Коли печінка зазнає пошкодження, наприклад хірургічного втручання або хімічного впливу ксенобіотиків, регенерація печінки буде стимулюватися. Однак існує баланс між регенерацією печінки та її пошкодженням. Іншими словами, коли пошкодження знаходиться в межах компенсаторної здатності регенерації печінки, пошкодження стимулює регенерацію печінки. З іншого боку, коли пошкодження перевищує компенсаторну здатність регенерації печінки, регенераційний процес відновлення не проходить або гальмується, що викликає серйозну загрозу виживанню не тільки органу, а й цілого організму [68].

Механізм регенерації печінки є предметом досліджень протягом багатьох років. Останні результати дослідження механізму регенерації печінки вказують, що регенерація печінки у людей і гризунів подібна. Водночас ми все ще не повністю володіємо механізмом регенерації печінки, тому вдосконалення цих знань може спрямувати подальші клінічні дослідження для покращення розуміння процесу регенерації печінки після хірургічної резекції та регенерації, яка виникає при хронічних захворюваннях печінки [25].

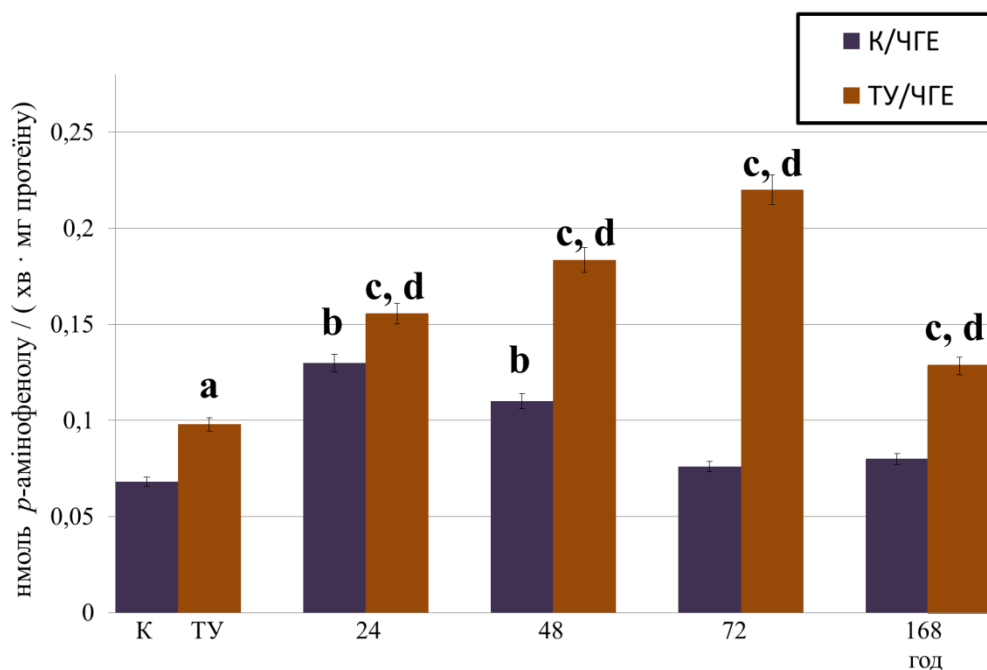
Індукція гострого ураження печінки ацетамінофеном є однією з найбільш часто використовуваних експериментальних моделей гострого ураження печінки щурів. Незважаючи на широке використання ацетамінофену як ефективного анальгетика та антипіретика, у високих понадтерапевтичних дозах препарат здатний викликати розвиток гепатотоксичності [69].

Механізм несприятливої дії ацетамінофену на печінку, як правило, складний і в більшості випадків недостатньо вивчений. Розвиток гепатотоксичності часто є причиною порушення протоколів лікування. Токсичність парацетамолу зумовлена накопиченням у гепатоцитах

високореактивного проміжного метаболіту – *N*-ацетил-*p*-бензохіноніміну (NAPQI) за дії ензимів цитохрому Р-450 [70].

Хоча механізм токсичності ацетамінофену добре відомий, клініко-біохімічні наслідки біотрансформації ксенобіотика не завжди можна оцінити. Окрім того в літературі зустрічаються лише окремі відомості щодо проходження регенерації печінки за одночасного медикаментозного ураження та резекції її частини.

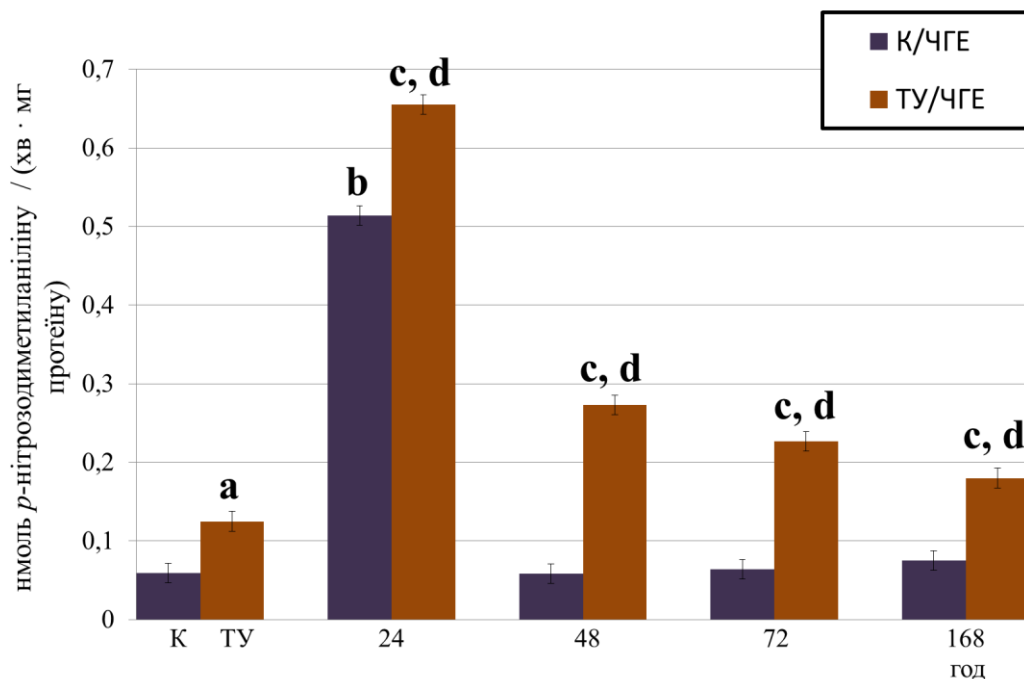
Таким чином виникає клінічний інтерес розуміння перешкод регенерації у відновленні печінки за даних умов. У зв'язку з цим нами проведено дослідження активності системи цитохрому Р-450 в печінці щурів за умов ацетамінофен-індукованого ураження після часткової гепатектомії.



**Рис. 3.1. *p*-гідроксилазна активність цитохрому Р-450 у мікросомальній фракції печінки щурів з ацетамінофен-індукованим ураженням після проведення часткової гепатектомії**

*Примітка(тут і надалі): a – статистично достовірна різниця групи ТУ порівняно з контрольними показниками (К),  $P \leq 0,05$ ; b – статистично достовірна різниця показників групи тварин К/ЧГЕ порівняно з контрольними показниками (К),  $P \leq 0,05$ ; c – статистично достовірна різниця показників групи тварин ТУ/ЧГЕ порівняно з ТУ,  $P \leq 0,05$ ; d – статистично достовірна різниця показників групи тварин ТУ/ЧГЕ порівняно з К/ЧГЕ,  $P \leq 0,05$ .*

Результати проведених досліджень засвідчують зростання *p*-гідроксилазної активності цитохрому Р-450 в мікросомальній фракції печінки щурів групи К/ЧГЕ на 24 та 48 год після проведення ЧГЕ порівняно з контролем (К). Варто зазначити, що найвищі показники зафіксовано на 24 год експерименту, зі зростанням *p*-гідроксилазної активності у 2 рази, у той час як на 48 год у групі К/ЧГЕ активність зростає у 1,6 рази порівняно з показниками контролю (К). Водночас регенераційний процес відновлення печінки за умов ацетамінофен-індукованого ураження в групі ТУ/ЧГЕ характеризується зростанням *p*-гідроксилазної активності цитохрому Р-450 впродовж всього експерименту. Варто відмітити, що найвищі показники зафіксовано в період проліферації та термінації, із зростанням у 1,8 та 2,2 рази відповідно, порівняно зі значеннями групи ТУ (рис. 3.1).



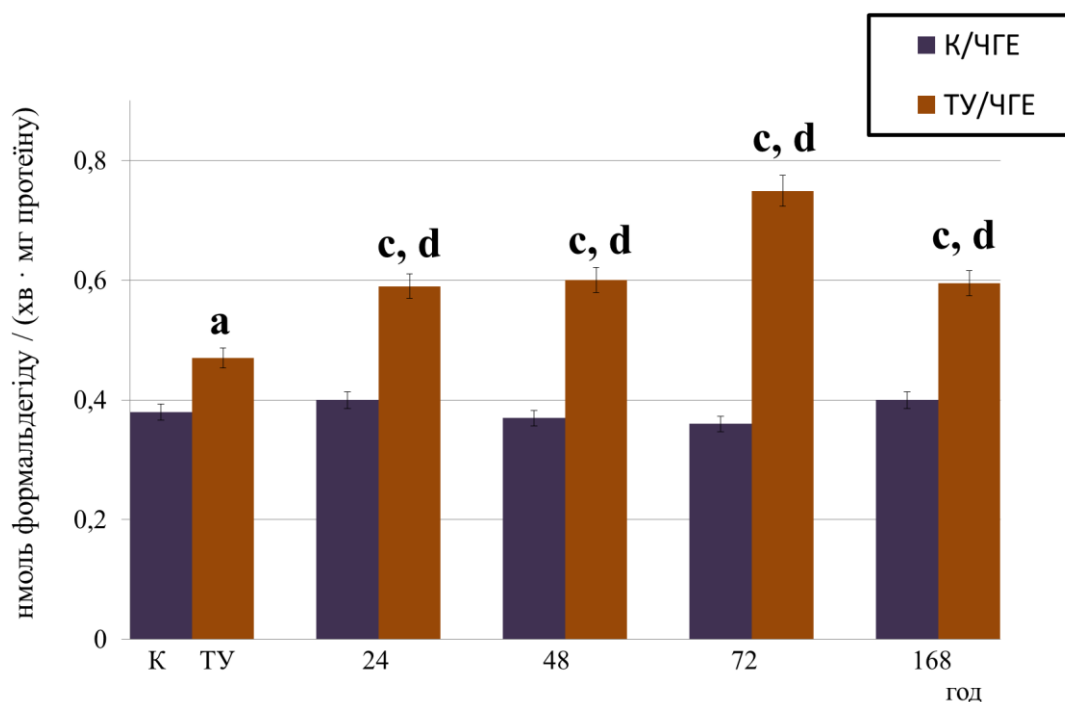
**Рис. 3.2. N-оксигеназна активність цитохрому Р-450 у мікросомальній фракції печінки щурів з ацетамінофен-індукованим ураженням після проведення часткової гепатектомії**

Щодо *N*-оксигеназної активності цитохрому Р-450, то в мікросомальній фракції печінки щурів групи К/ЧГЕ зареєстровано її десятикратне збільшення лише в період праймінгу порівняно зі значеннями контролю (К), тоді як у

щурів групи ТУ/ЧГЕ зростання *N*-оксигеназної активності цитохрому Р-450 спостерігається впродовж всього експериментального періоду з найвищими показниками на 24 годину. Нами відмічено, що на 24 годину *N*-оксигеназна активність у групі ТУ/ЧГЕ зростає у 5,3 рази порівняно зі значеннями групи ТУ, тоді як у період проліферації та термінації зафіксовано збільшення у 2,2 та 1,8 рази відповідно. У віддалений період регенераційного процесу у групі ТУ/ЧГЕ активність зростає у 1,4 рази порівняно зі значеннями групи ТУ (рис. 3.2).

Відомо, що ізоферменти монооксигеназної системи здатні гідроксилювати ацетамінофен з утворенням нетоксичного метаболіту катехолу 3-гідроксиацетамінофену (3-ОН-АРАР) або окислювати до NAPQI, що володіє гепатотоксичними властивостями [71]. Таким чином, встановлене нами багатократне зростання *N*-оксигеназної активності цитохрому Р-450 у мікросомальній фракції печінки щурів групи ТУ/ЧГЕ (рис. 3.2) відповідає за інтенсивне окислення ацетамінофену та вказує на посилене утворення реакційноздатного NAPQI на противагу 3-ОН-АРАР, що утворюється у реакціях ароматичного гідроксилювання та відображається зростанням *p*-гідроксилазною активністю цитохрому Р-450 у мікросомальній фракції печінки щурів групи ТУ/ЧГЕ (рис. 3.1).

Щодо *N*-деметилазної активності цитохрому Р-450 в групі тварин К/ЧГЕ достовірних змін порівняно з показниками контролю впродовж експерименту нами не зареєстровано. Водночас у групі ТУ/ЧГЕ зафіксовано зростання *N*-деметилазної активності цитохрому Р-450 впродовж всього експерименту, з найвищими показниками на 72 годину. Слід відмітити що на 72 годину *N*-деметилазна активність у групі ТУ/ЧГЕ зростає у 1,6 рази порівняно зі значеннями групи ТУ, тоді як у період проліферації, термінації та віддалений період регенераційного процесу зафіксовано зростання у 1,3 рази порівняно зі значеннями групи ТУ (рис. 3.3)



**Рис. 3.3. *N*-деметилазна активність цитохрому Р-450 у мікросомальній фракції печінки щурів з ацетамінофен-індукованим ураженням після проведення часткової гепатектомії**

Варто зауважити, що деметилювання, використаного нами субстрату диметиланіліну є різновидом *N*-деалкілювання ксенобіотиків шляхом окислення [72], що робить певний внесок в утворення NAPQI за рахунок підвищення *N*-деметилазної активності цитохрому Р-450 в мікросомальній фракції печінки щурів групи ТУ/ЧГЕ порівняно з контролем.

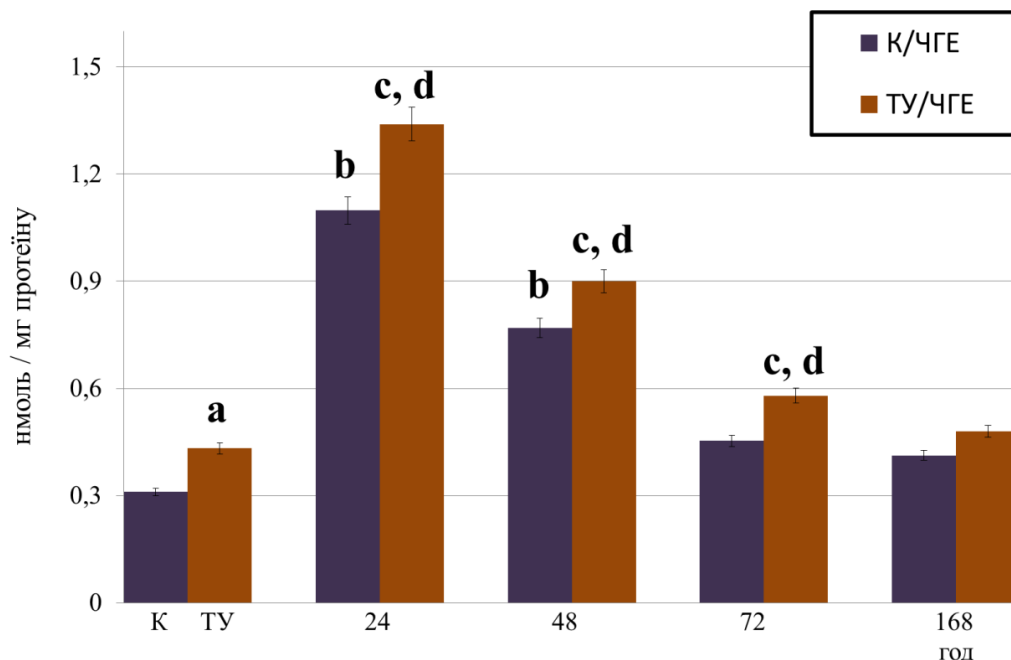
Таким чином, одночасне підвищення не лише *N*-оксигеназної, а і *N*-деметилазної активності цитохрому Р-450 у групі ТУ/ЧГЕ вказує на індукцію метаболізму ксенобіотика саме шляхом окиснення, що у свою чергу веде до посилення генерації NAPQI.

Відомо, що ізоензими цитохрому Р-450 володіють різною специфічністю та регіоселективністю по відношенню до ацетамінофену. На основі експериментальних спостережень доведено, що ізоформа 2E1 в основному продукує NAPQI, тоді як ізоформа 2A6 генерує переважно 3-ОН-АРАР/ NAPQI у співвідношенні 3:1. Окрім того, відомо, що ізоформа 3A4

здатна продукувати два метаболіти практично з однаковою інтенсивністю за нормальних умов [71].

Таким чином, за даних експериментальних умов у групі ТУ/ЧГЕ відбувається функціональний перерозподіл швидкостей реакцій гідроксилювання та окиснення з перевагою окиснювального *N*-деалкілювання і *N*-окиснення, що призводить до надмірного утворення NAPQI. Окрім того, індуктором біосинтезу ізоформ СYP переважно є ксенобіотики, в тому числі ацетамінофен. Тому встановлене нами підвищення *p*-гідроксилазної, *N*-деметилазної та *N*-оксигеназної активностей цитохрому Р-450 у мікросомальній фракції печінки щурів групи ТУ/ЧГЕ ймовірно, пов'язане зі зростанням вмісту цитохрому Р-450, що підтверджується отриманими нами результатами.

Зокрема, результати проведених досліджень засвідчують підвищення вмісту цитохрому Р-450 в щурів групи К/ЧГЕ лише вповдовж 48 год після проведення часткової резекції, зі зростанням у 3,6 та 2,5 рази на 24 та 48 год експерименту відповідно порівняно зі показниками контролю (рис. 3.4).



**Рис. 3.4. Вміст цитохрому Р-450 у мікросомальній фракції печінки щурів з ацетамінофен-індукованим ураженням після проведення часткової гепатектомії**

Водночас, регенераційний процес відновлення тканин даного органу в групі ТУ/ЧГЕ характеризується індукцією цитохрому до фази термінації, що відповідає 72 годині, з найвищими показниками на 24 годину в період праймінгу. Зокрема, на 24 годину експерименту вміст цитохрому у групі ТУ/ЧГЕ зростає у 3,1 рази порівняно зі значеннями групи ТУ, тоді як у період проліферації та термінації зафіксовано зростання у 2 та 1,4 рази відповідно порівняно зі значеннями групи ТУ (рис 3.4).

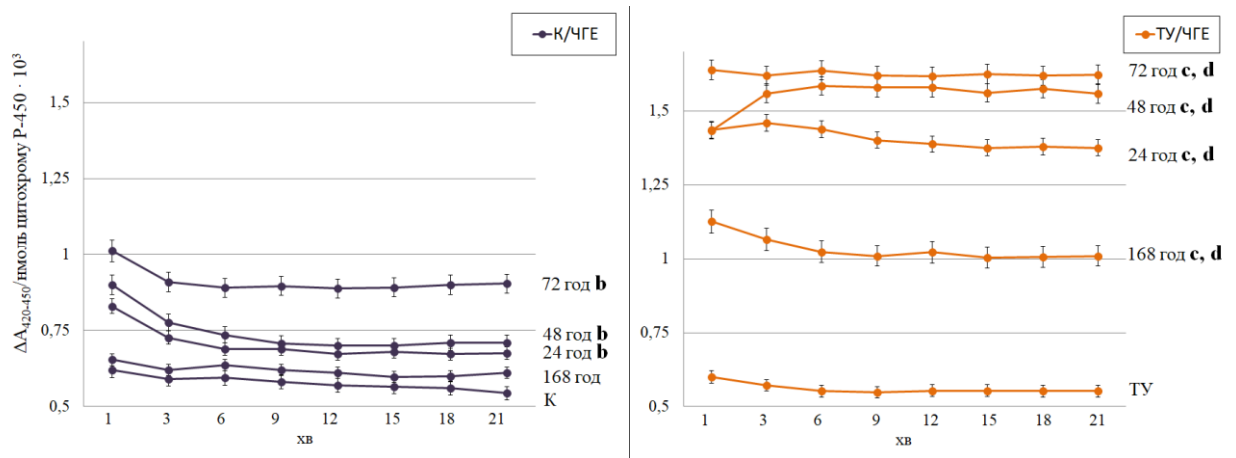
Гепатоцити здатні індукувати експресію детоксикуючих ензимів у відповідь на підвищену потребу. З літератури [73] відомо, що основні зміни в експресії генів реєструються перед першим циклом гепатоцелюлярної проліферації, тобто у перші 48 годин після часткової резекції. Вірогідно, отримані нами результати можуть бути пов'язані зі зміною експресії ізоформ СYP, зокрема тих, що задіяні у метаболізмі ацетамінофену, індукованих початковою стадією проліферації печінки для посилення окислювальних процесів у відповідь організму на стрес та запуску регенераційного каскаду.

Окрім того, у літературі [74] повідомляється про зсув метаболізму ацетамінофену через опосередкований цитохромом Р-450 шлях у пацієнтів після ЧГЕ, що узгоджується з отриманими нами даними.

Тому отримані результати підвищення активностей цитохрому Р-450 та вмісту цитохрому у групі ТУ/ЧГЕ імовірно будуть пов'язані з подвійним ефектом індукції цитохром Р-450 детоксикаційної системи за умов передозування ацетамінофену та зсуву метаболізму ацетамінофену після ЧГЕ, що веде до накопичення NAPQI та відповідно розвитку некрозу, що у свою чергу гальмує регенераційний процес.

Таким чином, відбувається порушення детоксикаційної здатності печінки за умов одночасного розвитку некрозу та запуску регенераційного процесу у групі тварин ТУ/ЧГЕ, що, імовірно, призводить до змін структурної та функціональної конформації цитохрому Р-450 як однієї з основних детоксикаційних систем печінки.

Одним із показників конформаційних змін цитохрому Р-450 може слугувати дослідження швидкості інактивації, тобто утворення його неактивної форми – цитохрому Р-420.



**Рис. 3.5. Швидкість інактивації цитохрому Р-450 у мікросомальній фракції печінки щурів з ацетамінофен-індукованим ураженням після проведення часткової гепатектомії**

За результатами досліджень встановлено, що цитохром Р-450 у мікросомальній фракції печінки тварин групи К/ЧГЕ інактивації не піддається. Тобто переходу в неактивну форму – цитохром Р-420 не відбувається. Водночас, нами зареєстровано утворення Р-420 у період праймінгу (24 год) та активної проліферації гепатоцитів (48 год) у тварин групи ТУ/ЧГЕ. Відстежується тенденція підвищення швидкості інактивації цитохрому Р-450 починаючи з 24 по 48 год експерименту. Варто також зауважити, що починаючи від 72 год експерименту цитохром Р-450 інактивації не піддається, динаміка показників стабілізується до контрольних рівнів (рис. 3.5).

Перехід цитохрому Р-450 в Р-420 відбувається внаслідок модифікації SH-груп амінокислот, що знаходяться в активному центрі, що підтверджується нашими попередніми дослідженнями наукової групи [75]. Неактивна форма Р-420 нестійка і в присутності кисню швидко втрачає гем, тому утворення Р-420 – один із етапів деградації цитохрому Р-450.

Отже, встановлена нами інактивація цитохрому Р-450 у групі ТУ/ЧГЕ, ймовірно, пов'язана з утворенням реакційноздатного інтермедіату NARQI,

який може ковалентно модифікувати амінокислотні залишки апопротеїну, та узгоджується з результатами наших досліджень.

## ВИСНОВКИ

1. Підвищення N-оксигеназної та p-гідроксилазної активностей цитохрому P-450 з одночасним зростанням його вмісту в мікросомальній фракції печінки інтактних щурів після часткової гепатектомії зареєстровано на початкових етапах регенерації (24 год) та в період активної проліферації клітин (48 год).
2. Встановлена нами активація ензимів реакцій p-гідроксилювання, N-окислювального деметилювання та N-оксигенації цитохрому P-450 в печінці щурів із токсичним ураженням після часткової гепатектомії впродовж всього експерименту може бути наслідком посиленої індукції ізоформ цитохрому P-450, задіяних у біотрансформації даного ксенобіотика, що гальмує регенераційний процес.
3. Інактивація цитохрому P-450, зареєстрована нами після ЧГЕ лише в мікросомальній фракції печінки щурів із токсичним ураженням ацетамінофеном на 24 та 48 год, може бути наслідком окислення сульфгідрильних груп у молекулі даного гемопротеїн внаслідок активації прооксидантних процесів на початкових етапах регенерації.