

М. Ю. Оболенская, А. Ф. Ванин, П. И. Мордвинцев, К. Дэкер

ОКИСЬ АЗОТА В РЕГЕНЕРИРУЮЩЕЙ ПЕЧЕНИ КРЫС

Содержание окиси азота в регенерирующей печени крыс определяли по интенсивности сигнала электронного парамагнитного резонанса (ЭПР), вызванного мононитрозильным комплексом железа с диэтилтиокарбаматом (ДЭТК). В качестве «ловушки» для продуцируемой эндогенно окиси азота служили преобразованные *in vivo* комплексы внутриклеточного негемового железа с введенным ДЭТК. Установлено, что изменения содержания окиси азота коррелируют с периодичностью регенерационного процесса. Первое повышение в содержании окиси азота наблюдается через час после частичной гепатэктомии (ЧГЭ), совпадая по времени с первичными ответами реакции печени на повреждение. Второй, более выраженный подъем, отмечается через 6 ч после ЧГЭ, когда гепатоциты входят в клеточный цикл, и определяется преимущественно паренхимными клетками. Последующий спад совпадает с максимумом ДНК-синтетической активности. Постепенное повышение содержания окиси азота наблюдается в течение периода охватывающего конец первого и начало второго клеточных циклов гепатоцитов, а также переход непаренхимных клеток от состояния покоя к делению.

Введение Частичная синхронизация процессов, наблюдаемая в регенерирующей печени крыс, делает ее удобной моделью для изучения роли предполагаемых участников этого процесса. К числу последних относится окись азота, простейший внутри- и межклеточный медиатор, обладающий высокой реактивностью. Ее участие в процессе регенерации представляется весьма вероятным, поскольку ЧГЭ провоцирует функционирование многих соединений, являющихся либо регуляторами синтеза окиси азота, либо мишенями для нее. К ним относятся некротический фактор опухолей (ФНО- α), индуктор синтеза окиси азота в гепатоцитах и Купферовских клетках [1, 2], синтез которого повышается после ЧГЭ [3]; рибонуклеотидредуктаза, лимитирующей фермент синтеза ДНК, ингибируемый окисью азота [4]; активируемая окисью азота гуанилатциклаза [5]; ранние ответные реакции на повреждение, такие как приток форменных элементов крови к месту повреждения, адгезия тромбоцитов и т. д. (см. обзор [6]).

Содержание окиси азота в образцах печени определяли с помощью метода ЭПР по интенсивности сигнала, создаваемого мононитрозильным комплексом железа с ДЭТК (МНКЖ — ДЭТК). В качестве «ловушки» для окиси азота использовали преобразованные *in vivo* комплексы из эндогенного железа и привнесенного ДЭТК [7]. Изменения в содержании окиси азота коррелируют с периодичностью регенерационного процесса [8] и, в частности, ДНК-синтетическая активность наблюдается на фоне низкого содержания окиси азота, не отличающегося от ее содержания в интактной печени.

Материалы и методы. Подготовка образцов печени. В опытах использовали самок крыс линии ВИСТАР (150—170 г), находящихся на полном рационе и голодавших в течение 24 ч до экстирпации печени. 2/3 печени удаляли согласно [9], экстирпацию печени проводили с 8 до 10 ч утра в указанные ниже сроки в течение 37 ч с момента операции. За 30 мин до экстирпации печени животным вводили внутривентриально 4 %-й раствор ДЭТК в 0,9 %-м NaCl из расчета 0,1 мл на 100 г массы. Образцы печени брали вблизи и вдали от места повреждения. Измельченную ткань помещали в трубочки (\varnothing 4,9 мм, длина 40 мм), замораживали в жидком азоте и хранили в нем до ЭПР-

© М. Ю. ОБОЛЕНСКАЯ, А. Ф. ВАНИН, П. И. МОРДВИНЦЕВ, К. ДЭКЕР, 1995

спектроскопии. Источник происхождения окиси азота контролировали с помощью конкурентного ингибитора ферментативного окисления *L*-аргинина, N^9 -мононитро-*L*-аргинина (МНА) (см. обзор [6]), который вводили дважды до забоя животных за 60 и 45 мин в расчете 1,0 мл 1 %-го МНА в 0,9 %-м NaCl на 100 г массы тела.

ЭПР-спектроскопия. Спектры ЭПР снимали на радиоспектротометре ЭПР Varian E9 при частоте 9300 Гц, мощности 10 мВт и колебаниях амплитуды 0,1—0,5 мТ. Количественное содержание МНКЖ — ДЭТК в образцах оценивали двойной интеграцией, используя в качестве стандарта стабильный нитроксильный радикал 2,2',6,6'-тетраметилпиперидол-1-оксил.

Контроль эффективности «ловушки». Образцы печени после ЭПР-спектроскопии обрабатывали в течение 30 мин газообразной окисью азота под давлением 200 мм рт. ст. Окись азота (99,8 %) (МЭССЕР Грисхайм, Райнфельд, Германия) очищали вакуумной перегонкой при 0,01 мм рт. ст.

Выделение гепатоцитов и непаренхимных клеток. «Грубое» фракционирование клеток печени на паренхимные и непаренхимные осуществляли дифференциальным центрифугированием после перфузии печени *in situ* 0,05 %-м раствором коллагеназы [10]. Количество клеток и их витальность определяли в гемоцитометре с 0,2 %-м трипановым синим. Аликвоты клеточных суспензий замораживали для ЭПР-спектроскопии.

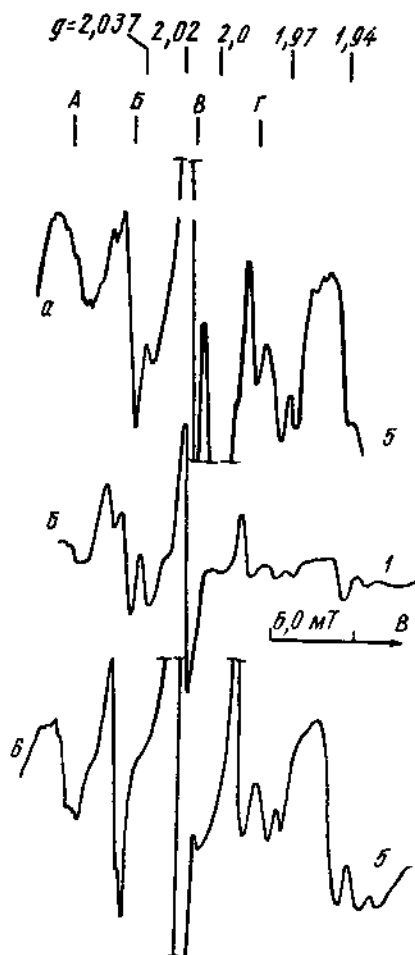


Рис. 1. ЭПР-спектры образцов регенерирующей печени крыс через 12 (а, в) и 6 ч (б) после ЧГЭ без предварительного введения МНА (а, б) и после введения МНА (б)

Результаты и обсуждение. ЭПР-спектры образцов печени крыс после введения ДЭТК. Типичный спектр ЭПР образцов печени, в которых происходит синтез окиси азота, представлен на рис. 1, а, б. В них различаются сигналы от: МНКЖ — ДЭТК с величинами $g_{\perp} = 2,035$, $g_{\parallel} = 2,012$ и триплетом сверхтонкой структуры при g_{\perp} ; комплексов Cu^{2+} — ДЭТК с четырехкомпонентной сверхтонкой структурой (А, Б, В, Г); свободных радикалов, $g = 2,0$; комплексов Mo^{5+} с $g = 1,97$ и восстановленных железосерных белков, $g = 1,94$ [11]. Вторая компонента комплексов Cu^{2+} — ДЭТК (Б) налагается на сигнал МНКЖ — ДЭТК и частично маскирует его. Интенсивность сигнала МНКЖ — ДЭТК определяли по его третьей компоненте сверхтонкой структуры при g , на которую не налагаются никакие линии ЭПР-спектра образцов печени. На рис. 1, в, представлен ЭПР-спектр образцов регенерирующей печени крыс, которым, кроме ДЭТК, вводили МНА. Отсутствие сигнала МНКЖ — ДЭТК по сравнению с выраженным сигналом у аналогичных животных, которым не вводили МНА (рис. 1, а, б), подтверждает то, что определяемая окись азота образуется в результате ферментативного окисления *L*-аргинина.

Контроль эффективности «ловушки» дал положительные результаты. После обработки образцов печени газообразной окисью азота интенсивность ЭПР-сигналов от МНКЖ — ДЭТК возросла примерно в 20 раз (данные не приведены). Это свидетельствует о том, что предобразованных комплексов Fe^{2+} — ДЭТК достаточно для захвата образующейся окиси азота.

Образование окиси азота и периодичность в процессе восстановления печени. Хотя истинные мишени действия окиси азота и регуляторы ее синтеза в динамике регенерационного процесса пока неизвестны, общее представление о роли этого соединения можно составить путем сравнения динамики изменений ее содержания с периодичностью процесса в целом. Наиболее изученная

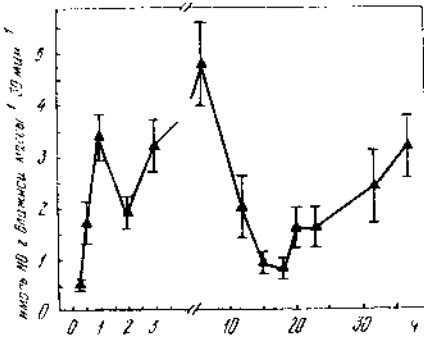


Рис. 2. Содержание окиси азота в образцах печени в разные сроки после ЧГЭ

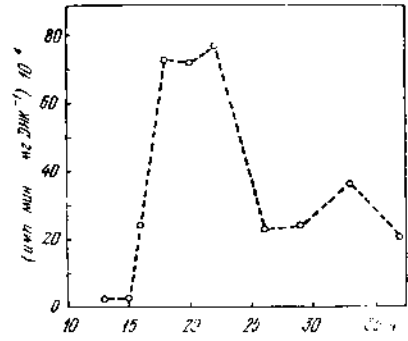


Рис. 3. Интенсивность синтеза ДНК в регенерирующей печени крыс [21]

временная характеристика процесса связана с периодами наиболее синхронизированного первого клеточного цикла гепатоцитов, продолжающегося около 30 ч с момента ЧГЭ [12]. Купферовские и эндотелиальные клетки синусоидов вступают в клеточный цикл друг за другом и после гепатоцитов [13].

Период от ЧГЭ до начала S-фазы гепатоцитов выделяется как предсинтетический (около 12—14 ч). Его, в свою очередь, ориентировочно подразделяют на три фазы — «проверка ситуации» с реакциями раннего ответа на травму (0,5—1 ч после ЧГЭ), метаболическая переориентировка клеток с приобретением ими готовности к пролиферации (~1—4 ч после ЧГЭ) и фаза, сходная с G_1 (~4 ~12 ~14 ч после ЧГЭ) [8, 14, 15]. Первый подъем в повышении синтеза окиси азота отмечается через час после ЧГЭ (рис. 2), совпадая по времени с первой стадией пререпликативного периода. Некоторые из наблюдаемых изменений в это время можно рассматривать в качестве потенциальных регуляторов или мишеней действия окиси азота. Среди них появление транскрипционных факторов, связывающихся с «В-сайтами» [16]; оксистресс, вызванный травмой, и ответная реакция на него, где окись азота может выступать как агент, нейтрализующий восстановление производных кислорода [6]; повышение и понижение экспрессии генов, кодирующих соответственно ФНО- α и тканеспецифический цитохром P450j [3, 8], а также вся цепь событий в области повреждения — хемотаксис клеток крови, тромбообразование и последующая тромборезистентность, которые регулируются окисью азота, продуцируемой в том числе и тромбоцитами [6], и т. д.

Следующее, более выраженное повышение уровня образования окиси азота совпадает по времени с переходом гепатоцитов из фазы метаболической переориентировки в G_1 -подобный период. «Грубое» фракционирование печени на паренхимные и непаренхимные клетки показало, что основным продуцентом окиси азота являются гепатоциты. После преинкубации с ДЭТК *in vivo* (30 мин) и процесса выделения клеток (~40—45 мин) определяется до 1,6 нмоль окиси азота на $1,3 \times$

$\times 10^8$ гепатоцитов (количество клеток, примерно соответствующее 1 г ткани) [17], т. е. величины, сходные с полученными на ткани методом ЭПР.

Как было показано ранее, этому событию предшествует в регенерирующей печени повышенное образование ФНО- α [3], который является сильным индуктором независимой от ионов Ca^{2+} NO-синтазы в гепатоцитах [1]. Весьма вероятно, что этот фермент и ответствен за возрастание образования окиси азота на этом этапе.

Среди возможных последствий образования окиси азота в это время можно выделить регуляцию кровотока и регуляцию гуанилатциклазы. Печень в этом периоде имеет плотную структуру и интенсивный темно-красный цвет, которые впоследствии сменяются «воздушной» структурой и желтовато-розовым цветом. Содержание гуанозинмонофосфата, продукта гуанилатциклазной активности, повышено [18], что потенциально стимулирует синтез РНК, способствуя вхождению клеток в клеточный цикл [19]. Недавние исследования на макрофагоподобных клетках показали, что окись азота обеспечивает прохождение клетками некой критической точки в течение G_1 -периода [20]. Существует ли она в регенерирующей печени, остается неясным.

Содержание определяемой окиси азота снижается к концу G_1 -фазы у гепатоцитов, достигает минимальных значений, когда синтез ДНК становится выраженным (рис. 3) [21], и коррелирует с наименьшим содержанием гуанозинмонофосфата [18]. Эти результаты соответствуют известным ранее данным по ингибирующему действию окиси азота на синтез ДНК [22], которое частично объясняется взаимодействием окиси азота с железом, необходимым для полноценного функционирования рибонуклеотидредуктазы [4] и $p34^{cdc2}$ [23], регуляторов G_1 -перехода в эукариотических клетках.

Последнее в исследуемый период повышение синтеза окиси азота приходится на конец первого, начало второго клеточных циклов гепатоцитов и на переход непаренхимных клеток печени к пролиферации [13]. Оно совпадает с возросшей чувствительностью печени к действию нитрозосоединений [24], со снижением в ткани гема [24] и комплексно связанного негемового железа, связь которого с лигандами ослабляется [25], с возросшим содержанием гуанозинмонофосфата [18]. Какое место эти события занимают в цепи явлений, ведущих к завершению цикла, в настоящее время еще не выяснено. На других клетках показано, что поддержание определенного уровня окиси азота представляется важным. Его превышение задерживают макрофагоподобные клетки в G_2 -фазе [20].

Изменения синтеза окиси азота в регенерирующей печени характерны для восстановительного процесса. Их последовательность сохраняется и при 24-ч голоде, предшествующем экстирпации печени, хотя абсолютное значение показателей меньше, а также при «квази» регенерации, вызванной введением сублетальных доз циклогексимида [26].

Анализируя полученные данные, нужно учитывать, что абсолютные значения содержания окиси азота в тканях, определяемые методом ЭПР, могут быть занижены в силу разных причин, которые подробно разбирались в работе [2]. Однако, несмотря на это, такой подход дает возможность оценить синтез окиси азота по основному продукту реакции, а не по ее естественным производным и впервые прямым методом показать периодичность изменений ее содержания *in vivo*.

М. Ю. Оболенська, О. Ф. Ванін, П. І. Мордвинцев, К. Декер

ОКИС АЗОТУ У РЕГЕНЕРУЮЧІЙ ПЕЧІНЦІ ЩУРІВ

Резюме

Вміст окису азоту у регенеруючій печінці щурів визначали по інтенсивності сигналу електронного парамагнітного резонансу (ЕПР), викликаного мононітрозильним комплексом заліза з діетилтіокарбаматом (ДЕТК). «Пасткою» для продукованого енди-

генно окису азоту слугували передуворені *in vivo* комплекси внутрішньоклітинного негемового заліза з введенням ДЕТК. Встановлено, що зміни вмісту окису азоту корелюють з періодичністю регенераційного процесу. Перше підвищення рівня вмісту окису азоту спостерігається через годину після часткової гепатектомії (ЧГЕ), збігаючись у часі з первинними відповідями реакції печінки на пошкодження. Друге, більш виразне підвищення, відмічається через 6 год після ЧГЕ, коли гепатоцити вступають до клітинного циклу, і визначається переважно паренхімними клітинами. Наступний спад відповідає максимуму ДНК-синтетичної активності. Поступове зростання вмісту окису азоту спостерігається протягом періоду, що охоплює кінець першого та початок другого клітинного циклу гепатоцитів, а також перехід непаренхімних клітин від стану спокою до ділення.

M. Yu. Obolenskaya, A. F. Vanin, P. I. Mordvintsev, K. Decker

NITRIC OXIDE PRODUCTION BY THE REGENERATING RAT LIVER

Summary

Nitric oxide (NO) production in the regenerating liver was estimated from the intensity of the electron paramagnetic resonance signal of the mononitrosyl complexes of iron and diethylthiocarbamate (DETC). Preformed complexes of intracellular non-heme Fe^{2+} and added DETC served as a trap for endogeneously produced NO. The data revealed dynamic changes of NO production temporally connected with the time periodicity of the liver regeneration. The first increase of NO production occurred ca. 1 h after partial hepatectomy (PHE) coinciding with the rapid response of the liver to injury. The second more pronounced production of NO was observed about 6 h after PHE, when the hepatocytes entered the first cell cycle, and originated mainly from them. The following minimum of NO synthesis coincided with the maximal rate of DNA synthesis. The third gradual rise of NO production was seen at the end of the investigated period, covering G_2+M phases and the transit from the first to the second cell cycle of the hepatocytes and the entrance of nonparenchymal cells into the proliferation.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. *Curran R. D., Biliar T. R., Stuehr D. J. et al.* Multiple cytokines are required to induce hepatocyte nitric oxide production and inhibit total protein synthesis // *Ann. Surg.*—1990.—212.—P. 462—469.
2. *Gaillard T., Mulsch A., Busse R. et al.* Regulation of nitric oxide production by stimulated rat Kupffer cells // *Pathobiol.*—1991.—59.—P. 280—283.
3. *Obolenskaya M. Yu., Bernauer H., Decker K.* Do Kupffer cells take part in triggering liver regeneration? // *Cells of the hepatic sinusoid* / Eds. D. L. Knook, E. Wisse.—Leiden, 1993.—Vol. 4.—P. 76—78.
4. *Lepoivre M., Chenais B., Yapo A. et al.* Alterations of ribonucleotide reductase activity following induction of the nitrite-generating pathway in adenocarcinoma cells // *J. Biol. Chem.*—1990.—265.—P. 14143—14149.
5. *Rappoport R. M., Murad F.* Agonist induced endothelium-dependent relaxation in rat thoracic aorta may be mediated through cyclic GMP // *Circ. Res.*—1983.—52.—P. 352—357.
6. *Moncada S., Palmer R. M. J., Higgs E. A.* Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology // *Pharmacol. Rev.*—1991.—43.—P. 109—142.
7. *Vanin A. F., Mordvintsev P. I., Kleschev A. L.* Appearance of nitrogen oxide in animal tissues *in vivo* // *Stud. Biophys.*—1984.—102.—P. 135—142.
8. *Оболеская М. Ю., Прима В. И., Герасимова В. В., Платонов О. М.* Частичное ограничение экспрессии генома — компонент перестройки его работы в регенерирующей печени млекопитающих // *Биополимеры и клетка.*—1989.—5.—P. 79—88.
9. *Higgins G. M., Anderson R. M.* Experimental pathology of the liver. 1. Restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal // *Arch. Pathol.*—1931.—12.—P. 186—202.
10. *Kawada N., Klein H., Decker K.* Eicosanoid-mediated contractility of hepatic stellate cells // *Biochem. J.*—1992.—285.—P. 367—371.
11. *Kubrina L. N., Caldwell W. S., Mordvintsev P. I. et al.* // *Biochim. et biophys. acta.*—1990.—P. 233—237.
12. *Tsanev R.* Cell cycle and liver function // *Results and problems in cell differentiation.*—Berlin : Springer, 1975.—Vol. 7.—P. 197—248.
13. *Widman J. J., Fahimi H. D.* Proliferation of mononuclear phagocytes (Kupffer cells) and endothelial cells in regenerating rat liver // *Americ. J. Pathol.*—1975.—80, N 2.—P. 349—360.
14. *Яковлев А. Ю.* Динамическое резервирование гепатоцитов — механизм, обеспечивающий специфические функции в регенерирующей печени // *Цитология.*—1979.—21.—С. 1243—1252.

15. Fausto N., Mead J. E. Regulation of liver growth: protooncogenes and transforming growth factors // *Lab. Investing.*—1989.—60.—P. 4—13.
16. Tewari M., Dobrzanski P., Mohn K. I., et al. Rapid induction in regenerating liver of RL/IF-1 (an I κ B that inhibits NF- κ B RelB-p50, and c-Rel-p50) and PHF, a novel κ B site-binding complex // *Mol. and Cell. Biol.*—1992.—12.—P. 2898—2908.
17. Hoffman F., Decker K. Comparative metabolic studies on liver sinusoidal cells and different types of macrophages // *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*—1979.—360.—P. 905—912.
18. Goridis C., Zwiller J., Reutter W. Guanylate cyclase activity and cyclic nucleotide concentrations during liver regeneration after experimental injury // *Biochem. J.*—1977.—164.—P. 33—39.
19. Weinstein Y., Chambers D. N., Bourne H. R., Melmon K. L. Cyclic GMP stimulates lymphocyte nucleic acid synthesis // *Nature.*—1974.—251.—P. 352—353.
20. Takagi K., Isobe Y., Yasukawa K. et al. Nitric oxide blocks the cell cycle of mouse macrophage-like cells in the early G2+M phase // *FEBS Lett.*—1994.—340.—P. 159—162.
21. Оболенская М. Ю. Возрастные особенности синтеза ДНК в регенерирующей печени белых крыс // *Цитология.*—1976.—29.—С. 857—861.
22. Lepointre M., Boudbid H., Petit J. F. Antiproliferative activity of interferon combined with lipopolysaccharide on murine adenocarcinoma: dependence on an L-arginine metabolism with production of nitrite and citrulline // *Cancer Res.*—1989.—49.—P. 1970—1976.
23. Pines J., Hunter T. p34cdc2: the S and M kinase // *New Biol.*—1990.—2(5)—P. 389—401.
24. Briggs R. G., Derubertis F. R. Increased responsiveness of the hepatic guanylate cyclase guanosine 3'5'-monophosphate system to nitroso guanidine following partial hepatectomy // *Biochim. et biophys. acta.*—1990.—628.—P. 425—437.
25. Оболенська М. Ю., Герасимова В. В. Роль комплексно зв'язаного заліза в поділі клітини // *Укр. біохім. журн.*—1972.—5.—С. 577—579.
26. Вания А. Ф., Митрохин Ю. Н., Мордвинцев П. И., Годоров И. Н. Появление оксида азота в печени крыс при разных колебаниях биосинтеза белка и ДНК, вызванных циклогексимидом в сублетальной дозе. // *Докл. АН СССР.*—1990.—315.—С. 1267—1270.

Ин-т молекуляр. биологии и генетики
НАН Украины, Киев

Получено 9.06.94