

Ю. І. Губський, член-кор. АМН України, Є. Л. Левицький, д.б.н.¹, Г. Г. Горюшко, к.х.н., А. В. Матвієнко, к.м.н., Л. П. Бабенко, О.В.Задоріна, к.б.н.²

МЕХАНІЗМИ ТОКСИЧНОЇ ДІЇ (НЕКРОЗ, АПОПТОЗ) ХЛОРАЛКАНІВ НА ФРАКЦІЇ ЯДЕРНОГО ХРОМАТИНУ КЛІТИН ПЕЧІНКИ. І. ТЕТРАХЛОРМЕТАН

Державна установа "Інститут фармакології та токсикології АМН України" м. Київ

¹ Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України, м. Київ

² Національний медичний університет ім. О.О. Богомольця, м. Київ

Молекулярною основою багатьох захворювань, в першу чергу пов'язаних з дією на організм несприятливих факторів оточуючого середовища — шкідливих хімічних речовин та радіації, є пошкодження біологічних мембран та ядерного генетичного апарату клітини, обумовлені дією вільних радикалів [1-6].

Наукова література, присвячена проблемі впливу несприятливих факторів оточуючого середовища на функціонування геному еукаріотів та молекулярну організацію ядерної ДНК, є по суті неосязною. Численні дослідження, що встановили високу чутливість ДНК до радіаційного та хімічного пошкодження, дозволили перейти від початкової уяви про фізичну та метаболічну стабільність цієї макромолекули до концепції нестабільності ядерної ДНК, яка спроможна піддаватися біологічно значущій окислювальній деструкції, особливо за умов дії активних форм кисню або ліпопероксидів [7-10].

Здатність певних хімічних сполук виступати у якості сильних мутагенів (супермутагенів) була встановлена ще в 40-х роках XIX сторіччя при вивченні впливу на клітини дрозофіл формальдегіду та сірчаного або азотистого іпритів, які здатні викликати усі види прямих та зворотних точкових мутацій, а також хромосомні аберації, що цитологічно не відрізняються від таких,

що індуковані рентгеновським випромінюванням. Ефекти вільних радикалів, у тому числі й тих, що утворюються за умов дії тисяч різних ксенобіотиків, викликають декілька типів пошкоджень ДНК з порушенням її первинної структури: окислювальну модифікацію азотистих основ, одно- та двониткові розриви ланцюгів, утворення поперечних зшивок "ДНК-білок" і т.ін. [3, 11]. Разом з тим, ключові біохімічні механізми пошкодження первинної структури ДНК та порушень її реплікативної та транскрипційної функцій, а також послідовність молекулярних подій, що визначають запуск біохімічних та клітинних реакцій, які, в свою чергу, призводять до токсичної (хімічної) загибелі клітини, залишаються недостатньо з'ясованими.

Розуміння важливості розробок у галузі розшифровки механізмів клітинної смерті, індукованої фізичними, хімічними та біологічними чинниками, різними за своєю природою, призвело до становлення нового фундаментального напрямку у теоретичній біології та клінічній медицині — некробіології клітини [12]. До недавнього часу дослідження у цій галузі були сконцентровані в основному на вивченні механізмів радіаційного некрозу та апоптозу, взаємовідношень між апоптотичною прогресією клітини та її пухлинною трансформацією [13, 14]. Разом з тим, велике теоретичне та

практичне значення має значно менше розроблена проблема взаємовідношень між некрозом та апоптозом за умов гострих інтоксикацій високотоксичними ксенобіотиками, що викликають глибокі пошкодження ДНК різного типу з наступною загибеллю клітини, а за умов перевищення рівня надійності основних захисних імунних систем — і смертю організму.

Раніше нами були досліджені деякі біохімічні, молекулярно-біологічні та біофізичні процеси, які мають місце за умов дії на гепатоцити високотоксичних ксенобіотиків, зокрема, хлоралканів та ФОС [4-6, 11], які у значній мірі відповідають сукупності молекулярних та клітинних подій, що становлять суть апоптозу — запрограмованої загибелі клітин, що спостерігається на певних етапах ембріонального розвитку як фізіологічний процес та включаються за умов важких пошкоджень ДНК різного генезу [13-16]. Активізація апоптозу як альтернативного по відношенню до некрозу механізму клітинної загибелі досить детально вивчена у лімфоцитах за умов променевого ураження, при дії пошкоджуючих ДНК протипухлинних хіміотерапевтичних засобів, у периферійних зонах ішемізованої тканини міокарду та головного мозку за умов інфаркту та інсульту. Обговорюється роль апоптозу у патогенезі атеросклерозу, хвороби Альцгеймера, СНІДу [13, 14].

Термін "апоптоз" був введений у наукову літературу у 1972 р. J. Kerr et al. [16] для характеристики процесу, протилежного мітозу, та відображає послідовність подій та реакцій загибелі клітини, що регулюються внутрішньою генетичною програмою, яка запускається позаклітинними фізіологічними та патогенними факторами. Одним з найважливіших механізмів ініціювання програми апоптозу є активація внутрішньоклітинними регуляторними сигналами спеціального гену "клітинного самогубства" p53, який експресує відповідний білок p53 (з молекулярною масою 53 кД), що протидіє реплікації ушкоджених генів за рахунок блокування переходу клітини від фази G1 у S. В основі антимітотичного ефекту білка p53 лежить індукція синтезу продуктів генів p21, p15 та p16, що блокують функцію циклін-залежних кіназ

(cdc-білків) — ферментів, відповідальних за фосфорилування білків, які забезпечують реалізацію мітотичного процесу. Наступний ланцюг біохімічних подій включає в себе активацію комплексу протеолітичних ферментів, найбільше значення з яких приділяється родині цистеїнових протеїназ, що розщеплюють пептидний зв'язок субстрату, який є найближчим до залишку аспарагінової кислоти — так званим каспазам. До числа біохімічних функцій каспаз відносять включення каспаза-активованої ДНК-ази та розщеплення полі(АДФ-рибоза)полімерази — ферменту, що приймає участь у репарації ДНК; активація Ca^{2+} , Mg^{2+} -залежних ДНК-аз, що забезпечують міжнуклеосомне розщеплення ДНК та кислих ендонуклеаз, які довершують процес деградації хроматинового апарату клітини. Значна роль у запуску реакцій апоптозу належить також мітохондріям, тому що вихід з пошкоджених мітохондрій цитохрому с, який взаємодіє з цитозольним білком Araf-1, забезпечує перехід каспази 3 у каталітично активну форму.

За своїм впливом на клітинний поділ ген p53 відносять до антионкогенів, тобто супресорів пухлинного росту, що пригнічують мітотичну активність клітини. Експресія цього гену, що є помірною за нормальних умов, різко посилюється при пошкодженні ДНК, блокуючи наступ мітозу, і це дозволяє називати ген p53 "охоронцем" клітинного геному. З іншого боку, втрата гену p53 внаслідок мутації (наприклад, делеції) призводить до втрати контролю над клітинним циклом та стимулює проліферацію клітин з ушкодженою ДНК — на теперішній час виявлений кореляційний взаємозв'язок між порушенням функції антионкогену p53 та розвитком більше п'ятдесяти видів злоякісних пухлин людини.

Нами вперше було постульовано [17], що складні зміни, які відбуваються у ферментних системах та структурній організації ядерного хроматину за умов ураження гепатотоксичним ксенобіотиком тетрахлоретаном (ТХМ), є у значній мірі відображенням активації програми клітинної загибелі, тобто апоптозу. Іншими словами, можна уявити собі, що при хімічному ураженні печінки, поряд з клітинами, які мають загинути шляхом некрозу, певна

частина гепатоцитів зазнає змін, характерних для апоптозу. Непрямим підтвердженням участі апоптотичного механізму у загибелі популяцій гепатоцитів при цій патології є слабка вираженість запальної реакції при гострому CCl_4 -гепатозі, що взагалі є характерним для апоптозу. Слушною експериментальною моделлю для вивчення процесів некрозу та апоптозу є види гризунів, клітини яких у різній мірі підлягають канцерогенній дії ТХМ. Це, відповідно, щури, для яких ТХМ-індукований канцерогенез не є характерним, та миші, для яких, навпаки, цей гепатотоксин є яскраво вираженим індуктором пухлиноутворення [18, 19].

Метою даної роботи було проаналізувати дані літератури та результати власних досліджень, які стосуються деяких механізмів токсичного ураження клітин печінки під впливом одного з найбільш токсичних представників хлоралканів — тетрахлоретану. У якості експериментальних тварин використовували щурів та мишей. Вибір цієї експериментальної моделі був зумовлений вказаним вище фактом нехарактерності для щурів, на відміну від мишей, канцерогенного впливу тетрахлоретану, що дає підставу вважати наявність у перших менш вираженого, ніж некротичного, апоптотичного механізму загибелі гепатоцитів. У мишей, навпаки, а priori можна очікувати більшу вираженість апоптотичного механізму виведення пошкоджених клітин з популяції внаслідок встановленого факту активації апоптозу за умов канцерогенезу [13-16].

Для реалізації цієї задачі були вибрані декілька методів біохімічного, біофізичного та морфологічного аналізу фракцій транскрипційно активної та репресованої хроматину клітин печінки, що дозволяють виявити характерні для апоптозу ураження ядерного генетичного апарату клітини [20].

Аналіз процесу термоденатурації фракцій хроматину

Одним з характерних проявів апоптозу є процес конденсації хроматину, який досліджують різними методами. Ми використовували метод вивчення термоденатурації ДНК фракцій хроматину з клітин печінки інтактних та отруєних тетрахлоретаном щурів.

У якості експериментальних тварин використовували білих щурів-самців лінії Вістар віком 3 міс (150-170 г). ТХМ вводили внутрішньочеревинно в дозі 1 ЛД₅₀ (175 мл/кг маси тіла тварини). Термін інтоксикації становив 2 та 24 год. Препарати фракцій репресованого (РХ) і транскрипційно активної (ТАХ) хроматину з клітин печінки щурів виділяли модифікованим нами методом [17]. Суть цього методу полягає в активації екзогенним кальцієм Ca^{2+} , Mg^{2+} -залежної ендонуклеази хроматину. При цьому молекулярні фрагменти РХ після центрифугування залишаються у надосадковій рідині, у той час як тісно зв'язаний з ядерним матриксом ТАХ отримують озвучуванням ресуспендованого осаду.

Аналіз процесу термоденатурації фракцій хроматину проводили за [17]. На основі модельних дослідів з виділеними структурними елементами хроматину визначали відповідність теплових переходів та типів ДНК у хроматині. Загальний інтервал зростання гіперхромізму за результатами графічної обробки диференціальних кривих плавлення був розбитий на 6 інтервалів: I — плавлення дестабілізованої ДНК (56-65°C); II — плавлення вільної ДНК (65-70°C); III — плавлення лінкерної ДНК, помірно стабілізованої ДНК-гістоновими взаємодіями (71-75°C); IV — плавлення корової ДНК нуклеосом (76-80°C); V — плавлення ДНК у ділянках інтенсивної ДНК-гістонової взаємодії (81-85°C); VI — плавлення ДНК, стабілізованої структурними негістоновими білками (85-98°C). Складний профіль диференціальної кривої був розбитий на ряд гаусман у вказаних діапазонах. На диференціальній кривій визначали площину піка і, таким чином, оцінювали вклад індивідуального теплового переходу у загальний гіперхромізм. Таким чином визначали долю певних структур у препаратах фракцій хроматину та динаміку їх змін за умов інтоксикації ТХМ.

Різна структурна упаковка РХ та ТАХ [20, 21] буде спричиняти вплив на процес термоденатурації. Структура ДНК у РХ повинна бути більш конденсованою, у той час як ТАХ — більш релаксованою (у зв'язку з більшою інтенсивністю процесу транскрипції). Розбіжності у білко-

вому компоненті та ступені спіралізованості ДНК цих фракцій хроматину [22] також повинні певним чином відбиватися на протіканні процесу термоденатурації.

Явище термоденатурації хроматину засновано на тому, що з підвищенням температури починають денатурувати різні його компоненти, що складають спіралізовану нуклеїново-білкову структуру, відображенням чого є величина гіперхромного ефекту, що фіксується спектрофотометрично. Аналіз кривих термоденатурації дозволяє також встановити внесок різних ДНК-білкових взаємодій у досліджених фракціях ядерного хроматину. Результати аналізу кривих термоденатурації фракцій хроматину, що відрізняються за ступенем транскрипційної активності, наведені у табл. 1.

З наведених результатів є оче-

табілізованої ДНК є, мабуть, одним з важливих факторів, що визначають підвищений рівень транскрипції у ТАХ. У РХ міститься дещо більше вільної ДНК, ніж у ТАХ (II перехід). Це відповідає даним про більш впорядковану нуклеосомну організацію транскрипційно менш активної фракції ядерного хроматину. Структура ДНК ТАХ тісно пов'язана взаємодіями з регуляторними негістоновими білками, що призводить до зниження долі вільної ДНК. Внесок лінкерної ДНК (III перехід) у процес плавлення хроматину є приблизно однаковим для обох фракцій хроматину. Що стосується плавлення тугоплавких компонентів хроматину (переходи IV-VI), то їх сумарний внесок у загальний гіперхромізм складає в РХ 68 %, а у ТАХ — 62 %, тобто, перша фракція є дещо більш тугоплав-

хроматину.

В основі описаних раніше змін функціонального стану та параметрів, що характеризують структурну організацію фракціонованого хроматину клітин печінки щурів, можуть лежати порушення характеру ДНК-білкових взаємодій у структурі хроматину за умов інтоксикації ТХМ. Показниками, що описують подібні взаємодії, є параметри термоденатурації фракцій хроматину. У табл. 2 наведено числові значення цих параметрів, що дозволяють оцінити спектр та локалізацію ДНК-білкових взаємодій у препаратах фракцій хроматину інтактних та інтоксикованих ТХМ щурів.

Отруєння тварин викликає зміни у характері ДНК-білкових контактів у фракції РХ. Зсуви, що спостерігаються, мають залежність у часі. Так, через 2 год після введення тваринам ТХМ збільшується кількість ділянок дестабілізованої ДНК, яка до 24 год знижується вдвічі (інтервал I — "зона передплавлення").

Через 2 год після введення гепатотоксину у РХ також збільшується внесок у загальний гіперхромізм плавлення ДНК у ділянках взаємодії з гістонами (переходи III та V). Через 24 год ці величини знижуються до рівня контрольних значень, але більш ніж у 2 рази збільшується внесок у загальний гіперхромізм ДНК, що стабілізована негістоновими білками (інтервал VI). Таким чином, введення тваринам ТХМ викликає перебудови у структурі ДНК, що характеризуються на початкових етапах як вираженою релаксацією, так і деякою компактизацією, які змінюються у подальшому (24 год) вираженою компактизацією цієї фракції хроматину.

У ТАХ зміни, що спостерігаються під впливом ТХМ, також свідчать про значні порушення ДНК-білкових контактів. При введенні ТХМ прогресивно падає доля дестабілізованих фрагментів ДНК (через 24 год після інтоксикації — у 5 разів у порівнянні з контролем). У результаті цього значно зростає інтегральна температура плавлення через 24 год після введення гепатотоксину. Доля вільних ділянок ДНК (II перехід) зростає через 2 год після введення отрути, а через 24 год повертається до вихідного рівня. Для цієї фракції хроматину є характерним, особливо через 24 год після введен-

Таблиця 1

Параметри термоденатурації фракцій РХ та ТАХ з печінки інтактних щурів (результати типового експерименту) [17]

Фракції хроматину	Інтегральна температура плавлення (°C)	Температурні переходи ДНК (процент від загального гіперхромізму)					
		I	II	III	IV	V	VI
РХ	79,1	—	5	11	28	24	16
ТАХ	78,6	5	3	12	24	28	10

Примітка: I-VI температурні інтервали плавлення (див. вище).

видним, що у наявності є хоча і не дуже значні, розбіжності у процесі термоденатурації аналізованих фракцій ядерного хроматину. Інтегральна температура плавлення є дещо вищою для фракції РХ, що у деякій мірі відображає більш конденсований характер пакування цієї фракції. Однак, величини цього показника є досить близькими для обох фракцій хроматину. Що стосується внеску різних ДНК-білкових взаємодій та плавлення чистої ДНК у сумарний процес термоденатурації, то тут є у наявності суттєві розбіжності між РХ та ТАХ. Це перш за все стосується внеску плавлення дестабілізованої ДНК у загальний гіперхромізм. Якщо в РХ внесок цього типу плавлення у загальний гіперхромізм відсутній, то в ТАХ він складає 5 %, що означає наявність ДНК такого типу у ТАХ та відсутність її у РХ. Наявність дес-

кою, ніж друга. Найбільш суттєві відмінності існують відносно самого тугоплавкого компоненту, пов'язаного з плавленням ДНК, стабілізованої структурними негістоновими білками. Внесок цього компоненту у загальний гіперхромізм складає в РХ 16 %, в той час як у ТАХ — 10 %.

В цілому фракція РХ є більш тугоплавою у порівнянні з ТАХ, що є, вірогідно, однією з причин більшої здатності останньої до транскрипції [20]. Однак, у цілому характер термоденатурації вивчених фракцій хроматину є досить схожим, що може свідчити про те, що пакування структурних компонентів даних фракцій хроматину є близьким за своєю природою і за різний рівень транскрипції можуть бути відповідальними інші фактори, зокрема, неоднакові співвідношення між різними типами та групами білків у вивчених фракціях ядерного

Таблиця 2

Параметри термоденатурації фракцій хроматину клітин печінки інтактних та інтоксикованих ТХМ щурів (у % від загального гіперхромізму, $n=4-6$) [17]

Умови експерименту	Інтегральна температура плавлення, °С	Температурні переходи ДНК					
		I	II	III	IV	V	VI
РХ							
Контроль (інтактні щури)	79,1	4,0	5,0	11,0	28,0	24,0	16,0
ТХМ, 2 год	78,0	7,0*	6,0	15,0*	22,0	40,0*	15,0
ТХМ, 24 год	81,8	3,0	4,0	8,0	21,0	24,0	38,0*
ТАХ							
Контроль	76,8	5,0	3,0	12,0	24,0	28,0	10,0
ТХМ, 2 год	78,5	4,0	6,0*	13,0	23,0	31,0*	17,0*
ТХМ, 24 год	89,0*	1,0*	3,0	4,0*	5,0*	40,0*	35,0*

Примітка: * $p < 0,05$ (у порівнянні з контролем).

ня тваринам ТХМ, збільшення долі плавлення ДНК, стабілізованої гістонами та негістоновими білками (інтервали V та VI). Також значно зменшується внесок у загальний гіперхромізм плавлення ДНК, що є помірно стабілізованою взаємодією з гістонами H1 та H3, а також корової ДНК нуклеосом (переходи III та IV).

У цілому зміни ДНК-білкових контактів, що реєструються за допомогою даного методу, які спостерігаються у результаті інтоксикації ТХМ, є більш вираженими у фракції ТАХ у порівнянні з РХ. Це відповідає змінам функціональної активності цієї фракції хроматину, що спостерігаються під впливом отруєння токсином, які були описані нами раніше [8-11]. У результаті отруєння ТХМ, особливо через 24 год після його введення, відмічається

значна компактизація структури ТАХ, що знаходить своє відображення у достовірному підвищенні інтегральної температури плавлення. У РХ даний показник достовірно не змінюється у порівнянні з контролем та найбільш виражені зміни, які, знов-таки, свідчать про певну компактизацію ДНК під впливом отруєння ТХМ, фіксуються у цій фракції через 2 год після початку інтоксикації. Знайдені нами зміни у ступені компактизації фракцій хроматину клітин печінки щурів під впливом інтоксикації ТХМ, що виражаються у компактизації хроматину, особливо його транскрипційно активної фракції, свідчать про наявність апоптотичного механізму виведення пошкоджених клітин з популяції [13, 14, 23].

Нуклеолітичне зондування

фракцій хроматину та його ендонуклеазна активність

Структурний стан ДНК фракцій хроматину при отруєнні тварин ТХМ оцінювали також за допомогою її чутливості до обмеженого нуклеолітичного розщеплення ДНК-азою I ("Serva", Німеччина), S₁-нуклеазою ("Sigma", США), а також ендогенними нуклеазами хроматину [20]. Ступінь переварювання розраховували за різницею кислоторозчинної радіоактивності між дослідними і контрольними зразками та виражали у процентах.

За умов інтоксикації щурів ТХМ були виявлені певні зміни у ступені чутливості ДНК фракцій хроматину клітин печінки у порівнянні з інтактними (табл. 3). За умов стимуляції переварювання ДНК хроматину ендогенними нук-

Таблиця 3

Нуклеолітичне переварювання (%) ³H-ДНК фракцій хроматину клітин печінки інтактних та отруєних ТХМ (2 год) щурів ($n=6$) [20]

Умови ферментативної обробки	РХ		ТАХ	
	контроль	дослід	контроль	дослід
Ендогенне самопереварювання	78,5	72,4	32,9	16,4*
ДНК-аза I:				
5 хв, 21 °C	16,7	28,1*	20,4	18,2
15 хв, 37 °C	76,4	68,1	80,2	78,4
S ₁ -нуклеаза:				
без денатурації	0	0	10,0	0*
денатурація	23,1	0*	21,5	59,3*

Примітка: Значення питомої радіоактивності ДНК хроматину, на основі яких розраховували ступінь переварювання: РХ контроль — 29682; дослід — 17057; ТАХ контроль — 30912; дослід — 26457 розп./хв на 1 мг ДНК

леазами був виявлений менший ступінь переварювання ДНК ТАХ отруєних тварин у порівнянні з інтактними. При короткостроковій обробці фракцій хроматину ДНК-азою I при кімнатній температурі виявлений більший ступінь розщеплення ДНК РХ за умов інтоксикації у порівнянні з контролем. Обробка інтактного хроматину S_1 -нуклеазою дозволила виявити зниження чутливості ДНК ТАХ за умов інтоксикації. Денатурація хроматину, навпаки, призводить до збільшення кількості одониткових послідовностей, які є доступними для ферменту у ДНК ТАХ печінки отруєних щурів у порівнянні з інтактними. За цих умов в РХ було виявлено зниження кількості таких послідовностей.

Ці дані свідчать про збільшення компактизації структури ДНК фракцій хроматину при отруєнні щурів тетрахлоретаном і є ще одним доказом наявності апоптотичного механізму пошкодження ДНК хроматину (запуск генетичної програми загибелі клітин) за умов отруєння щурів ТХМ [13, 14, 23, 24].

Вище було вказано на те, що даний метод фракціонування хроматину базується на активації Ca^{2+} , Mg^{2+} -залежної ендонуклеази, що

тварин диктувався тією обставиною, що ТХМ спричиняє свій токсичний вплив на клітини печінки цих двох видів тварин за різними механізмами. У мишей він є яскраво вираженим онкотоксином, тоді як у щурів його канцерогенна дія або зовсім відсутня, або виражена у незначній мірі [26]. Тому можна очікувати, що у мишей та щурів вивчені нами біохімічні показники будуть мати різну величину та направленість.

У табл. 4 наведені результати визначення відносної долі (у процентах від контролю, який прийнятий за 100 %) фракції репресованого хроматину у клітинах печінки щурів та мишей через різні терміни часу після отруєння тварин ТХМ. Видно, що отрута справляє різні ефекти на ендонуклеазну активність у клітинах мишей та щурів. З даних таблиці видно, що, по-перше, у мишей у порівнянні зі щурами ендонуклеазна активність активується у більш ранні строки (через 10 хв у щурів, по суті, вона лишається на рівні контролю, в той час як у мишей вона зростає майже на 5 %) і, по-друге, максимальна величина активації, знов-таки, більша у мишей (114,4 %) у порівнянні зі щурами (112,0 %).

Це свідчить про більш виражену

ності свідчать про наявність певних біохімічних реакцій, характерних для генетично запрограмованої загибелі клітини апоптозу. Це, по-перше, наявність підвищеної конденсації хроматину клітин печінки отруєних тварин, що особливо характерно на фоні наявності маскованих одониткових послідовностей, які виявляються під впливом дії ферменту, тропного до цих послідовностей S_1 -нуклеази. Подібний факт був нами встановлений свого часу за умов фізіологічного старіння організму також у клітинах печінки, де підвищена кількість одониткових послідовностей була виявлена у ДНК клітин печінки старих щурів у порівнянні з дорослими, що призводить до її деградації та фрагментації [27-30]. Пізніше для цієї моделі пошкодження ДНК (старіння) було також постульовано наявність апоптотичного механізму знищення пошкоджених клітин [31].

Параметри біоломінесценції

Одним з індукторів апоптозу є вільні радикали [13-16, 26, 32]. Для перевірки можливості одночасного вільно-радикального впливу ТХМ та його метаболітів на фракції ядерного хроматину мишей, де були виявлені найбільш суттєві зміни ендонуклеазної активності, які характерні для перших, найбільш ранніх стадій апоптозу, здійснювали порівняльний аналіз вільно-радикальних процесів у фракціях хроматину з даними активності ендонуклеаз.

З метою оцінки інтенсивності вільно-радикальних процесів у фракціях хроматину мишей під впливом токсичної дії ТХМ оцінювали параметри процесів Fe^{2+} -ініційованої біоломінесценції (БХЛ) [33] хроматину за умов різної тривалості інтоксикації.

Метод БХЛ базується на співвідношенні між інтенсивністю світіння та швидкістю протікання вільно-радикальних реакцій, у яких беруть участь радикальні форми пероксидів ліпідів. Утворені внаслідок ініціації іонами заліза гідроксильні радикали, про наявність яких свідчить інтенсивність швидкого спалаху БХЛ (I_1), мають високу реакційну здатність, зумовлюючи розвиток вільно-радикальних процесів. Інтенсивність повільного спалаху (I_2) спричинена ініціюванням утворення вільних радикалів внаслідок взаємодії Fe^{2+} з киснем. Ступінь

Таблиця 4
Відносна кількість фракції РХ (у процентах від контролю)
у клітинах печінки щурів та мишей через різні терміни після отруєння
ТХМ (n=3-6)

Тривалість інтоксикації	Щури	Миші
10 хв	100,4	104,5*
1 год	109,7*	104,9*
2 год	112,0*	93,4*
4 год	-	114,4*
24 год	92,7*	91,68*

розщеплює фрагменти ДНК РХ, які в результаті отримують в надосадковій рідині у процесі центрифугування. Тобто, за відносною кількістю РХ можна судити про активність цього ферменту. З іншого боку, відомо, що у процесі апоптотичного пошкодження ДНК на його перших етапах приймає участь саме цей фермент і ряд інших ендонуклеаз [25,26]. Тому ми визначали відносну кількість РХ у клітинах печінки щурів та мишей через різні часові інтервали після отруєння тварин ТХМ. Вибір саме цих двох видів

активацію ендонуклеазної активності, що є одним з маркерів апоптозу у клітинах печінки мишей у порівнянні зі щурами. Це й зрозуміло, якщо зважити на той факт, що за умов канцерогенезу (який є набагато більш вираженим знов-таки у мишей), викликаного отруєнням ТХМ, доля клітин, які зазнають пошкоджуючої дії внаслідок апоптозу, значно зростає [13-16].

Таким чином, результати нуклеолітичного зондування фракцій хроматину клітин печінки та визначення його ендонуклеазної актив-

гальмування вільно-радикальних процесів характеризується сумісним антиокислювальним статусом системи — площиною світлосуми S (інтегральною площею під кінетичною кривою БХЛ) за 10 хв з моменту введення до середовища Fe²⁺, що характеризує кількість пероксидних радикалів, які утворюються на один іон доданого Fe²⁺ [33].

У табл. 5 наведено дані дослідження БХЛ суспензій РХ та ТАХ з печінки інтактних та отруєних ТХМ мишей у продовж 10 хв; 2, 4 та 24 год. Як можна бачити, в РХ та ТАХ інтенсивність повільного спалаху у отруєних тварин вірогідно збільшується відносно інтактних (контроль). Також збільшується і площа світлосуми S; у РХ найбільш високі значення I₂ та S мають місце через 2-4 год після отруєння. У ТАХ спостерігаються високі значення S через 24 год після отруєння, тоді як значення показника I₂ за цей період інтоксикації є нижчими у порівнянні з контролем. Таким чином, при отруєнні мишей ТХМ найбільш

активні вільно-радикальні процеси мають місце у РХ у перші години після отруєння, тоді як для ТАХ спостерігається посилення процесів ПОЛ до 24 год після отруєння.

Звертає на себе увагу той факт, що у мишей профіль змін показника I₂ багато в чому співпадає зі змінами ендонуклеазної активності (табл. 4). Максимум першого показника дещо передує максимуму другого, що може свідчити про залежність між процесами вільно-радикального ураження ДНК хроматину, яке може виступати у якості тригерного механізму, який запускає подальший розвиток молекулярних пошкоджень ДНК по типу апоптозу, та іншими показниками, що характеризують процеси його молекулярного ураження (у даному випадку — ендогенна ендонуклеазна активність).

Флуоресцентне зондування фракцій хроматину

Для подальших доказів апоптотичного механізму пошкодження клітин печінки ТХМ на наступному етапі роботи вивчали зміни біофізич-

них властивостей фракцій РХ та ТАХ (флуоресцентне зондування ДНК) клітин печінки в залежності від тривалості отруєння ТХМ. У табл. 6 наведено дані досліджень флуоресцентного зондування фракцій хроматину клітин печінки шурів зондами — етидій бромідом, що вбудовується між нитками подвійного ланцюга ДНК, та пропідій йодидом, що є індикатором наявності апоптозу, зв'язуючись з суперланцюговими ділянками молекули, які є характерними для апоптозу — в залежності від терміну інтоксикації ТХМ.

Як можна бачити, в РХ через 24 год після введення гепатотоксину має місце зниження флуоресценції етидій броміду (F_{ЕБ}) порівняно з контролем, у ТАХ через 4 год після отруєння має місце збільшення цього показника, а через 24 год, як і у РХ, — зменшення. Тобто, зменшення вбудовування етидій броміду в подвійний ланцюг ДНК свідчить про компактизацію структури ДНК хроматину, що є підтвердженням наявності апоптозу. У таблиці наведе-

Таблиця 5

Параметри Fe²⁺-ініційованої БХЛ фракцій РХ і ТАХ клітин печінки мишей за умов інтоксикації ТХМ (n=4-6)

Параметри БХЛ	Групи тварин				
	Інтактні (контроль)	ТХМ, 10 хв	ТХМ, 2 год	ТХМ, 4 год	ТХМ, 24 год
РХ					
Інтенсивність повільного спалаху, I ₂ , (ум. од.)	32,5	42,44*	63,6*	57,18*	26,2
Площа світлосуми за 10 хв, S (імп)	1523,2	1657,8	6570,4*	10215,5*	4876,5*
ТАХ					
Інтенсивність повільного спалаху, I ₂ , (ум. од.)	27,6	36,0*	38,8*	36,1*	18,3*
Площа світлосуми за 10 хв, S (імп)	3062,0	3907,4	3651,8	4187,1*	7087,1*

Таблиця 6

Біофізичні показники фракцій хроматину клітин печінки шурів за умов інтоксикації ТХМ (20 °С; 0,01 М SSC; n=6)

Умови досліджу	F _{ЕБ} , відн. од.	F _{РІ} , відн. од.
РХ		
Інтактні тварини (контроль)	1,0	1,0
ТХМ, 4 год	0,91	1,03
ТХМ, 24 год	0,87*	1,02
ТАХ		
Інтактні тварини (контроль)	1,0	1,0
ТХМ, 4 год	1,28*	1,44*
ТХМ, 24 год	0,78*	1,20*

дені також значення відносної інтенсивності флуоресценції пропідію йодиду — F_{РІ} — індикатора апоптотичного ураження ДНК: при цьому має місце підвищення його вбудовування у фракції хроматину шурів за умов інтоксикації, особливо у ТАХ через 4 та 24 год після отруєння, що, знов-таки, свідчить про наявність апоптотичного механізму ураження клітин печінки шурів за умов отруєння ТХМ, оскільки цей зонд є індикатором кількості суперспіральных ділянок у подвійному ланцюгу ДНК, при вбудовуванні у які інтенсивність його флуорес-

ценції збільшується. Саме підвищення суперспіралізації у вивчені терміни інтоксикації ТХМ (до 24 год), мабуть, є механізмом конденсації хроматину.

Патоморфологічне вивчення пошкоджених ТХМ клітин печінки

Для подальших доказів наявності апоптотичного пошкодження клітин за умов отруєння хлоралканом, у даній роботі проводили патоморфологічне дослідження печінки мишей, отруєних ТХМ у дозі 1 ЛД₅₀. Тварин декапітували під ефірним наркозом через 10 хв, 1, 8 та 24 год від початку експерименту. Окрему групу становили інтактні тварини, яких використовували у якості контролю.

Однотипні ділянки печінки висікали, занурювали у 10 % нейтральний формалін, у рідину Карнуа. Готували парафінові та заморожені зрізи, які забарвлювали гематоксиліном та еозином. Препарати фотографували за допомогою мікроскопу Цитопан.

При мікроскопічному дослідженні у декапітованих через 10 та 60 хв тварин на оглядових препаратах печінки не спостерігали яких-небудь суттєвих змін у порівнянні з контролем. Як у інтактних, так і у дослідних тварин у паренхімі печінки зрідка зустрічали апоптотично змінені гепатоцити, що мають характерні обриси з еозинофільною цитоплазмою з конденсованим хроматином на периферії ядра (рис. 1). Через 8 год після отруєння характерна гістологічна картина у печінці зберігалась. Нуклеїнові кислоти у паренхімі печінки виявляли за методом Шубича: гранули РНК забарвлювалися у голубий, а ДНК — у ліловий колір. У інтактних тварин гранули РНК розподілялися у ядрах рівномірно приблизно по всій їх площині. Деякі ядра були блідніші, ніж звичайні, а зерна ДНК у них менші за розміром. Ядришки, як правило, розподілялися центрально у каріоплазмі, забарвлювалися у голубий, рідше — у синій колір. Брилки РНК розподілялися переважно у перинуклеарній зоні клітини печінки. У цей період отруєння вже можна було спостерігати зсуви у складі нуклеїнових кислот. Вміст Фольген-позитивних гранул у ряді ядер значно зростав, тоді як інші ядра були дуже блідими, вони були збільшені у розмірі, а зерна

хроматину у вигляді тонкої кайми зберігалися тільки навкруги ядерної мембрани, що є характерним для апоптозу. Такі ядра частіше зустрічалися на периферії печінкових дольок. Значно зменшувався вміст брилок РНК у цитоплазмі клітин, іноді замість брилок спостерігали дифузне забарвлення цитоплазми. Окрім того, у порівнянні з попереднім терміном отруєння дещо збільшувався вміст гепатоцитів з еозинофільною цитоплазмою, а конденсований хроматин у вигляді конденсованих круглих брилок розподілявся навкруги ядерної мембрани.

Після 24 год отруєння ТХМ переважно на периферії печінкових дольок була порушена структура печінкових балок. Багато гепато-

цитів піддавалися некробіотичним змінам (рис. 2). Кордони печінкових клітин були відсутні, ядра піддавалися лізису, рідше — пікнозу. Купферівські клітини ще зберігалися, але їх ядра, що були різко набухлі, були гомогенно забарвлені у блідо-рожевий колір. Досить значно скоротилася кількість РНК на периферії печінкових дольок, іноді реакція була негативною, тоді як ближче до центру дольок реакція була значною. Віддалік від некробіотично зміненої печінкової тканини підвищувався вміст гепатоцитів, у яких ядерний хроматин був конденсованим, утворюючи крупні брилки на периферії ядра, що є ознакою апоптозу.

Отримані морфологічні дані на мишах свідчать про те, що за умов

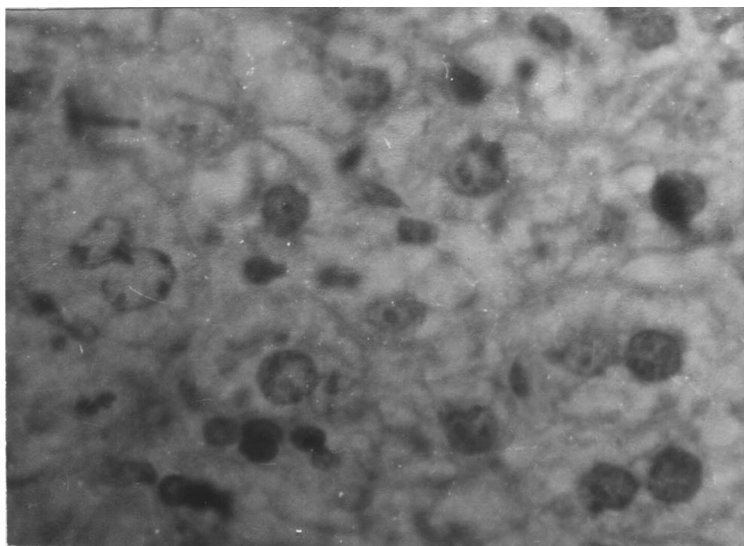


Рис. 1. Апоптоз клітин у печінці білої миші за умов внутрішньоочеревиного введення ТХМ (1 ЛД₅₀, 10 хв). Методика Шубича. X 740

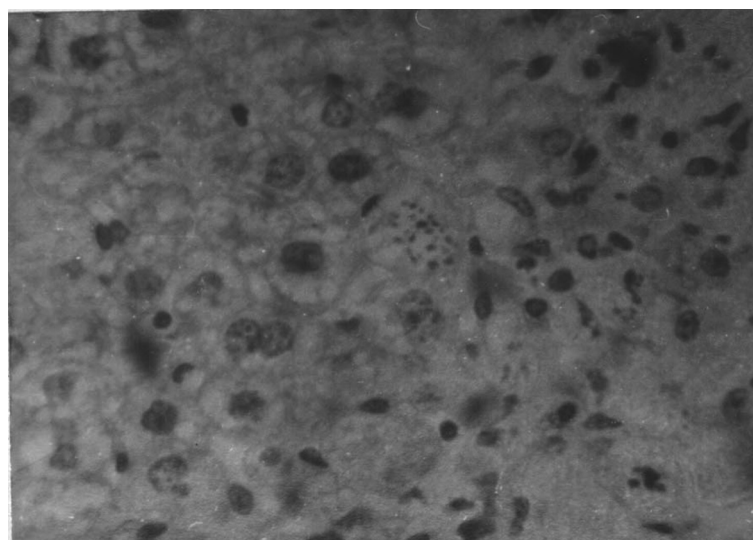


Рис. 2. Збільшення апоптозних клітин у печінці миші через 24 год після введення ТХМ. Методика Шубича. X 740

отруєння ТХМ у печінці виникають та розвиваються чітко виражені різнобічні порушення метаболізму, які визначаються гістохімічними методами.

Відомо, що ТХМ притаманна гепатотропна дія, що призводить до деструктивних змін паренхіми печінки. Поряд з цитотоксичним ефектом, отрута може підвищувати рівень апоптотичного ураження клітин.

Таким чином, на основі проведе-

них досліджень були отримані дані, що свідчать про наявність апоптотичного механізму пошкодження клітин печінки щурів та мишей за умов отруєння ТХМ. Це виявляється у наявності певних ознак цього механізму загибелі клітин: конденсації хроматину, однострочних розривів у ДНК, активації ендонуклеазної активності та інтенсивності вільно-радикальних процесів у хроматині, збільшенні інтенсивності флуоресценції апоптоз- специфічних зондів —

етидію броміду та пропідію йодиду, що свідчить про конденсацію ДНК хроматину, особливо його активної фракції, наявності певних морфологічних ознак, перш за все, конденсації хроматину у вигляді щільних брилок, що розміщуються на периферії ядра [23-26]. Ці результати відповідають даним літератури про наявність апоптотичних уражень хроматину у клітинах печінки у більш пізні терміни отруєння щурів ТХМ [34, 35].

ЛІТЕРАТУРА

1. Губський Ю.І. Вільно-радикальні реакції у ядерному хроматині // Журн. АМН України. — 1995. — Т.1, №2. — С. 216-229.
2. Губський Ю.І., Левицький Е.Л. Механізми перекисного окислення липидів фракцій хроматина печені крыс // Биополимеры и клетка. — 1993. — Т.9, №5. — С. 34-43.
3. Левицький Е.Л., Губський Ю.І. Свободно-радикальные повреждения ядерного генетического аппарата клетки // Укр. биохим. журн. — 1994. — Т.66, №4. — С. 18-30.
4. Губський Ю.І. Коррекция химического поражения печени. — Киев: Здоров'я, 1989. — 168 с.
5. Губський Ю.І., Долго-Сабуров В.Б., Храпак В.В. Химические катастрофы и экология. — Киев: Здоров'я, 1993. — 224 с.
6. Губський Ю.І., Левицький Е.Л. Перекисно-антиоксидантний механізм регуляції активності хроматину // Журн. АМН України. — 1997. — Т.3, №2. — С. 275-281.
7. Виленчик М.М. Нестабильность ДНК и отдаленные последствия воздействия излучений. — М.: Энергоатомиздат, 1987. — 192 с.
8. Губський Ю.І., Левицький Е.Л. Генотоксикологія, метаболізм, болезни, лекарства // Лікування та діагностика. — 2000 — 2001. — №4-1. — С. 23-29.
9. Губський Ю.І., Левицький Е.Л., Волков Г.Л. Жирнокислотный состав фракций хроматина печені крыс в условиях стимуляции перекисного окисления липидов // Укр. биохим. журн. — 1991. — Т.63, №1. — С. 87-91.
10. Губський Ю.І., Левицький Е.Л., Примак Р.Г. Конформационные характеристики и упаковка эндогенных липидов фракций транскрипционно активного и репрессированного хроматина // Там же. — 1991. — Т.63, №2. — С. 83-89.
11. Трахтенберг И.М., Левицький Е.Л. Генетическая токсикология / В кн.: Генетическая медицина (под ред. В.Н. Запорожана). Одесса, 2008. — С. 183-221.
12. Быков В.Л. Цитология и общая гистология (функциональная морфология клеток и тканей человека). — СПб.: СОТИС, 1999. — 520 с.
13. Фильченков А.А., Стойка Р.С. Апоптоз и рак. — Киев: Морион, 1999. — 184 с.
14. Фильченков А.А., Стойка Р.С. Апоптоз (физиологическая гибель клетки). — Киев, 1995. — 24 с.
15. Darzynkiewitch Z., Juan G., Li X. Cytometry in cell necrobiology: analysis of apoptosis and accidental cell death (necrosis) // Cytometry. — 1997. — V.27, N1. — P. 1-20.
16. Kerr J.F.R., Wyllie A.H., Currie A.R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics // Brit. J. Cancer. — 1972. — V.26. — P. 239-257.
17. Генопротекторный эффект препаратов на основе экистероидов при отравлении крыс тетрахлометаном и хлороформом / Чабанний В.Н., Левицький Е.Л., Губський Ю.І. и др. // Укр. биохим. журн. — 1994. — Т.66, №5. — Т. 67-77.
18. Sun F., Hamagawa E., Tsutsui C. Evaluation of oxidative stress during apoptosis and necrosis caused by carbon tetrachloride in rat liver // Biochim. Biophys. Acta. — 2001. — V.1535, N2. — P. 186-191.
19. Columbano A., Endoh T., Denda A. Effects of cell proliferation and cell death (apoptosis and necrosis) on the early stages of rat hepatocarcinogenesis // Carcinogenesis. — 1996. — V.17, N5. — P. 395-400.
20. Биохимическая характеристика фракций транскрипционно активного и репрессированного хроматина печені крыс / Левицький Е.Л., Губський Ю.І., Чабанний В.Н. и др. // Биополимеры и клетка. — 1993. — Т.9, №6. — С. 13-21.
21. Изучение компонентов фракций хроматина печені крыс методами флуоресцентного зондирования / Губський Ю.І., Примак Р.Г., Горюшко А.Г., Левицький Е.Л. // Биополимеры и клетка. — 1994. — Т.10, №6. — С. 92-97.
22. Becker P. Chromatin Protocols (In: Meth. Mol. Biol., V. 119). — Humana Press, 2004. — 546 p.
23. Pritchard D.J., Butler W.H. Apoptosis — the mechanism of cell death in dimethylnitrosamine — induced hepatotoxicity // J. Pathol. — 1989. — V.158. — P. 253-260.
24. Barry M.A., Eastman A. Identification of deoxiribonuclease II as an endonuclease involved in apoptosis // Arch. Biochem. Biophys. — 1993. — V.300, N1. — P. 440-450.
25. Duke R.C., Cherverak R., Cohen J.J. Endogenous endonuclease-induced DNA fragmentation: an early event in cell-mediated cytolysis // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1983. — V.80. — P. 6361-6365.
26. Hasnall S.C., Roberts R.A. The perturbation of apoptosis and mitosis by drugs and xenobiotics // Pharmacol. Ther. — 1999. — V.82, N1. — P. 63-70.
27. Levitsky E.L. Age-dependent changes of DNA replication in rat spleen and kidney // Gerontology. — 1980. — V. 26, №6. — P. 321-326.
28. Litoshenko A.Ya., Levitsky E.L. Replication of total and mitochondrial DNA in rat liver with aging // Experiment. Gerontology. — 1981. — V.16, №3. — P. 213-218.
29. Gerasimova V.V., Levitsky E.L. Growth of replicating DNA chain in adult and old rat spleen // Gerontology. — 1982. — V.28, №4. — P. 217-222.
30. Mozzukina T.G., Chabanny V.N., Levitsky E.L., Litoshenko A.Ya. Age-related changes of supranucleosomal structures and DNA-synthesizing properties of rat liver chromatin // Gerontology. — 1991. — V.37, N4. — P. 181-186.
31. Пальцев М.А. Молекулярная медицина и прогресс фундаментальных наук // Вестн. РАН. — 2002. — Т. 72, №1. — С. 13-21.
32. Кудрявец Ю.І., Фильченков А.А., Абраменко И.В. и др. Динамика апоптотических событий, индуцированных фактором некроза опухолей в лейкозных клетках U-937 // Experiment. Oncology. — 1996. —

- V.18. — P. 353-365.
33. Сидорик Е.П., Баглей Е.А., Данко М.И. Биохемилюминесценция клеток при опухолевом процессе. — Киев: Наукова думка, 1989. — 220 с.
34. Fujikawa D.G., Shimnei S.S., Cai B. Kainic acid-induced seizures produce necrotic, not apoptotic, neurons with internucleosomal DNA cleavage: implication for programmed cell death mechanisms // *Neuroscience*. — 2000. — V.98, N1. — P. 41-53.
35. Theocharis S.E., Margeli A.P., Skaltsas S.D. et al. Induction of metallothionein in the liver of carbon tetrachloride intoxicated rats: an immunohistochemical study // *Toxicology*. — 2001. — V.161, N1-2. — P. 129-138.

*Ю.И. Губский, Е.Л.Левицкий, А.Г.Горюшко,
А.В.Матвиенко, Л.П.Бабенко, О.В.Задорина*

**МЕХАНИЗМЫ ТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ
(НЕКРОЗ, АПОПТОЗ) ХЛОРАЛКАНОВ НА
ЯДЕРНЫЙ ХРОМАТИН КЛЕТОК ПЕЧЕНИ.
I. ТЕТРАХЛОРМЕТАН**

На основании определения ряда биохимических, биофизических и морфологических показателей на экспериментальной модели клеток печени крыс и мышей в условиях интоксикации тетрахлорметаном обнаружено наличие генетически запрограммированной гибели клеток (апоптоза). Об этом свидетельствуют: повышенная конденсация ядерного хроматина, которая проявляется в его локализации в виде глыбок на периферии ядерной мембраны гепатоцита, повышенная температура плавления ДНК фракций транскрипционно активного и репрессированного хроматина и изменение параметров ее термоденатурации, изменение чувствительности ДНК фракций к ферментам нуклеолитического расщепления — ДНК-азе I и S₁-нуклеазе (увеличение количества одонитевых последовательностей в ДНК клеток печени отравленных животных), повышение встраивания в ДНК флуоресцентных зондов, тропных для апоптоза, а также эндонуклеазной активности в хроматине.

*Yu. I. Gubskiy, E.L.Levitsky, G.G.Goriushko,
A.V.Matvienko, L.P.Babenko, O.V.Zadorina*

**MECHANISMS OF TOXIC ACTION (NECROSIS,
APOPTOSIS) OF CHLOROALKANES ON THE
LIVER CELLS NUCLEAR CHROMATIN.
I. TETRACHLOROMETHANE**

On the basis of determination of some biochemical, biophysical and morphological indexes on the experimental model of rats and mice liver cells in the conditions of tetrachloromethane intoxication the presence of the genetically programmed cells death (apoptosis) was found out. It finds the reflection in a presence a number of signs, characteristic for this type of the genetically programmed cells death: enhanced condensation of nuclear chromatin, which shows up in his localization as lumps on periphery of nuclear membrane of hepatocyte, increase of temperature of melting of DNA of transcriptionally active and repressed chromatin fractions and change of parameters its thermodenaturation, the sensitiveness of DNA of fractions to the enzymes of the nucleolitic breaking up — DNA — I and S₁- nucleases (the increase of amount of single-stranded sequences in liver DNA of intoxicated animals), increase building of fluorescent probes in DNA and also endonucleolitic activity in chromatin.