

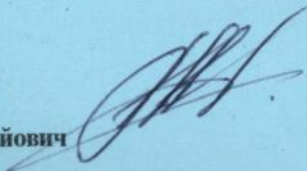
АКАДЕМІЯ МЕДИЧНИХ НАУК УКРАЇНИ

ІНСТИТУТ ФАРМАКОЛОГІЇ ТА ТОКСИКОЛОГІЇ

УДК 615.357.631:577.15+611.657

МАРЧЕНКО

Олександр Миколайович



МЕХАНІЗМИ ПОШКОДЖЕННЯ ЯДЕРНОГО ХРОМАТИНУ
ХЛОРОФОСОМ ТА ЙОГО КОРЕКЦІЯ АНТИОКСИДАНТАМИ
ПРИРОДНОГО ПОХОДЖЕННЯ

14. 03. 06 - токсикологія

АВТОРЕФЕРАТ

*дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук*

Київ - 1997

015.099

ЛННБ України ім.В.Стефаніка



00751788 (-)

Дисертація
Робота виконана у відділі біохімії та токсикології АМН України та на кафедрі біохімії та біотехнології Національного аграрного Університету Кабінету Міністрів України.

Наукові керівники: чл.-кореспондент АМН України,
доктор медичних наук, професор,
Ю. І. Губський - завідувач відділу біохімічної фармакології Інституту фармакології та токсикології АМН України

доктор біологічних наук, професор,
Ю. Д. Холодова - провідний науковий співробітник відділу біохімії коферментів Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук,
В. Н. Коваленко - завідувач відділу загальної токсикології Інституту фармакології та токсикології АМН України

доктор медичних наук,
О.К.Кульчицький - керівник лабораторії регуляції метаболізму Інституту геронтології АМН України

Провідна установа: Інститут медицини праці АМН України, лабораторія промислової токсикології та гігієни праці при використанні хімічних речовин, м. Київ

Захист дисертації відбудеться 1997 року о 15 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.550.01 при Інституті фармакології та токсикології АМН України за адресою: 252057, Київ, вул. Ежена Потье, 14.

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Інституту фармакології та токсикології АМН України.

Автореферат розіслано 1997 року.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради

І.В.Данова

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність проблеми. Результати біологічного моніторингу популяції людини свідчать, що зараз спостерігається не лише збільшення питомої ваги спадкової патології в загальній структурі захворювань населення, але і її імовірне зростання з часом, що пов'язано з постійним погіршенням екологічної ситуації в навколишньому середовищі (Н.П.Бочков, А.Н.Чеботарев и др., 1989; ВОЗ, 1989; А.К.Мирахмедов и др., 1990; С.Б.Серединин, А.Д.Дурнев и др. 1992). У зв'язку з цією обставиною вивчення механізмів генотоксичної дії різноманітних хімічних факторів і розробка засобів фармакологічного захисту ядерного генетичного апарату є однією з найважливіших медичних і соціальних завдань, що стоять перед сучасною наукою.

Одним з основних мутагенних факторів, які зумовлюють цілий ряд генетичних наслідків є хімічні сполуки, що раніше в природі не зустрічалися. За останні роки накопичена велика кількість даних про те, що в основі багатьох захворювань, і, зокрема, обумовлених впливом ксенобіотиків є оксидантний стрес, проявом якого є стимуляція реакцій ліпопереокислення (Ю.И.Губский и соавт., 1992-1994; G.Bellomo, 1991). Встановлено, що ці процеси носять загальнобіологічний характер і, за сучасними уявленнями, є універсальними механізмами пошкодження клітин (Ю.И.Губский, 1993).

До останнього часу об'єктами досліджень механізмів дії ксенобіотиків були, здебільшого, цілі клітини або біомембрани, в яких і констатувалось ініціювання перекисного окислення ліпідів (ПОЛ) в результаті впливу різноманітних факторів, що зумовлюють пошкодження важливих макромолекул, зокрема, компонентів генетичного апарату (Ю.А.Владимиров, А.И.Арчаков, 1972; J. Feher, 1991; R.Carini et al., 1992). При цьому не бралось до уваги, що сам ядерний хроматин містить власні ліпіди, які мають чітко виражений специфічний склад в порівнянні з мембранними ліпідами і швидко реагують його зміною на дію хроматин-пошкоджуючих факторів (Ю.И.Губский, Е.Л.Левицкий и др., 1989; 1991; 1993; 1996). Разом з тим питання, що стосуються наявності власної системи ліпопереокислення в хроматині і її участі у механізмах пошкодження ядерного геному, залишаються до кінця нерозв'язаними і потребують подальших детальних досліджень. Вільнорадикальну природу пошкоджень хроматину доведено в результаті вивчення дії на нього іонізуючої радіації, іонів важких металів (O.Cantoni et al., 1989; M.Frankenber-Schwager et al., 1990; и др.) та хлорорганічних сполук (Ю.И.Губский, Е.Л.Левицкий, 1991-1994). Щодо ефектів інших факторів, зокрема фосфорорганічних сполук (ФОС), то роль реакцій ліпопереокислення у механізмах ушкодження хроматину вивчено набагато гірше. Обгрунтованою є важливість поглибленого вивчення даної наукової проблеми у зв'язку з інтенсивним застосуванням ФОС в різних галузях про-

мисловості та сільського господарства.

В даній роботі досліджуються молекулярні механізми пошкоджень ядерного генетичного апарату хлорофосом (ХФ), одним з представників ФОС, генотоксична дія якого показана на різноманітних біологічних об'єктах: рослинах, дріжджах, мікроорганізмах, клітинах ссавців, в тому числі і людини (фібробласти ембріона, лімфоцити та ін.) (А.И. Куринный, 1975; Ю.В.Бардик, 1988; Т.Н.Присяжнюк, 1991; Н.Н.Недопитанская, 1992).

Найбільш перспективною групою біологічно активних речовин, що мають потенційні генопротекторні властивості на даний час, є сполуки, які здатні попереджати та/або коректувати процеси утворення вільнорадикального кисню і продуктів ПОЛ – антиоксиданти (АО). Проте, до останнього часу практично не були досліджені механізми дії АО на ядерний апарат клітини за умов модифікації процесів ПОЛ у хроматині під впливом на організм ксенобіотиків із класу ФОС.

Особливий інтерес представляють природні АО та їх фармакологічні препарати, які, будучи біологічно активними сполуками, виявляють позитивний вплив на організм людини і тварин.

До таких АО-засобів належать комплекс природного походження БТК-8Л (Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України), що знаходиться на стадії доклінічного дослідження, та препарат "Мумійо-Вітас" (затверджений Фармакологічним комітетом МЗ України 27 квітня 1995 р., реєстраційне посвідчення № 94/7/5).

МЕТА І ЗАДАЧІ ДОСЛІДЖЕНЬ. Мета даної роботи – вивчення молекулярних механізмів генотоксичної дії хлорофосу, одного з представників ФОС, і можливостей захисту ядерного геному сполуками природного походження з антиоксидантною активністю і потенційними генопротекторними властивостями.

Відповідно до поставленої мети передбачалось вирішити такі задачі:

1. Дослідити можливість модифікації процесів ПОЛ у фракціонованому хроматині печінки щурів при отруєнні ХФ.
2. Порівняти зміни показників ПОЛ і параметрів, які характеризують структурово-функціональну організацію хроматину.
3. Вивчити ступінь генотоксичних пошкоджень репресованої (РХ) і транскрипційно активної (ТАХ) фракцій хроматину.
4. З'ясувати, які з основних компонентів хроматину (ДНК, білки, ліпіди) змінюють свою структуру під впливом ХФ.
5. З'ясувати вплив антиоксидантів природного походження БТК-8Л і "Мумійо-Вітас" на структуру і функцію хроматину при гострому отруєнні ХФ.

НАУКОВА НОВИЗНА РОБОТИ. Вперше проведено комплексний

аналіз структурно-функціонального стану фракціонованого ядерного хроматину печінки щурів за умов гострого отруєння ХФ та введення при цьому АО - препаратів.

Встановлено, що внаслідок модифікації ХФ процесів ПОЛ у фракціях ядерного хроматину печінки порушується його структурно-функціональна організація, при цьому фракція ТАХ є більш чутливою до генотоксичної дії ксенобіотику в порівнянні з РХ. Мішенями генотоксичної дії введеного тваринам ХФ є ДНК та гістонові білки хроматину. Встановлено, що генотоксична дія ХФ опосередкована його вільнорадикальними метаболітами, а також, імовірно, радикалами кисню, що утворюються за умов інтоксикації в мембранах ендоплазматичного ретикулуму печінки, які надалі пошкоджують ДНК та гістони хроматину.

Аналіз впливу БТК-8Л, який містить фітостероїди, на структуру і функцію ядерного хроматину за умов гострого отруєння ХФ показав, що його захисна дія обумовлена антиоксидантною активністю, яка реалізується при його взаємодії з гістоновими білками та ліпідами хроматину. Встановлено наявність безпосереднього зв'язування компонентів БТК-8Л (фітостероїдів та ін.) з гістоновими білками хроматину.

За умов гострого отруєння тварин ХФ виявлено, також, захисну щодо ядерного хроматину дію лікарського препарату "Мумійо-Вітас". Ця дія пов'язана з його антиоксидантними властивостями по відношенню до процесів переокислення хроматин-зв'язаних ліпідів. Антиоксидантно-генопротекторний ефект "Мумійо-Вітас" у більшій мірі виражений стосовно фракції ТАХ порівняно з РХ і корегує зі зниженням смертності експериментальних тварин. В реалізації цього ефекту беруть участь, головним чином, фосфатидилхолінові фосfolіпіди та ДНК ядерного хроматину.

ТЕОРЕТИЧНА ЗНАЧИМІСТЬ РОБОТИ. В результаті комплексного дослідження структурно-функціональної організації хроматину при гострому отруєнні тварин ХФ та введенні при цьому антиоксидантів отримано дані, які свідчать про значну роль переокислення хроматин-зв'язаних ліпідів в генотоксичному пошкодженні ядерного геному. Виявлені антиоксидантні і генопротекторні властивості БТК-8Л і "Мумійо-Вітас" є важливою ланкою у розкритті молекулярних механізмів їх фармакологічної активності.

На основі проведених досліджень розроблені принципи фармакологічного захисту і корекції фракцій ядерного генетичного апарату при генотоксичному впливі ФОС, в основі яких лежать виявлені молекулярні механізми дії цього класу сполук.

ПРАКТИЧНА ЦІННІСТЬ РОБОТИ. Розроблені експериментальні моделі та методи фармакологічного захисту і корекції пошкоджень генетичного ядерного апарату при інтоксикації ФОС, які дозволяють вести цілеспрям-

мований скринінг лікарських засобів, а також намітити шляхи використання комплексу біологічно активних сполук на основі рослинної сировини - БТК-8Л (що знаходиться на стадії доклінічного дослідження), уточнити та розширити сферу використання препарату "Мумійо-Вітас".

ОСНОВНІ ПОЛОЖЕННЯ, ЩО ВІНОСЯТЬСЯ НА ЗАХИСТ:

1. Пошкодження ядерного хроматину печінки при гострому отруєнні ХФ супроводжується модифікацією процесів переокислення ліпідів і призводить до порушення його структурно-функціональної організації.

2. Генотоксична дія ХФ більш виражена у фракції ТАХ в порівнянні з РХ, що обумовлено різною молекулярною структурою цих фракцій хроматину, зокрема, складом ліпідів, які першочергово залучаються до процесу вільнорадикального переокислення.

3. Препарати з антиоксидантними властивостями по відношенню до модифікованих процесів перекисного окислення ліпідів у ядерному хроматині виявляють генопротекторну дію. Ця дія реалізується, в першу чергу, внаслідок корекції реакцій переокислення хроматин-зв'язаних ліпідів.

АПРОБАЦІЯ РОБОТИ. Матеріали дисертаційної роботи доповідались і обговорювались на наукових конференціях та семінарах Інституту фармакології та токсикології АМН України у 1994-1996 рр.

ПУБЛІКАЦІЇ. Основні положення дисертації викладені у 5 наукових роботах.

ВПРОВАДЖЕННЯ. Дисертаційна робота є фрагментом планової наукової тематики відділу біохімічної фармакології Інституту фармакології та токсикології АМН України. Результати досліджень використовуються у педагогічній практиці при викладенні курсу біохімії в Національному медичному університеті ім. акад. О.О.Богомольця.

СТРУКТУРА ДИСЕРТАЦІЇ. Робота викладена на 154 сторінках машинопису і складається з вступу, огляду літератури, 3-х розділів експериментальних досліджень, заключення, висновків, переліку літератури (322 джерела, з них 174 - іноземних). Дисертація містить 20 таблиць та 9 рисунків.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Робота була виконана на білих щурах-самцях лінії Вістар 3-х місячного віку масою тіла 150-200 г.

Для вивчення молекулярних механізмів пошкодження ядерного хроматину здійснювали гостре отруєння тварин ХФ з подальшим виділенням фракціонованого хроматину печінки та визначенням біохімічних і фізико-хімічних показників, які характеризують його структурно-функціональну організацію. Основним об'єктом дослідження були фракції ядерного хрома-

тину печінки, оскільки гепатоцити мають високий рівень транскрипційної активності, що дозволяє отримувати фракції з високою різницею в її рівні.

В ряді експериментів дію ХФ на ядерний хроматин вивчали за умов *in vitro* - на моделі ізольованого хроматину. Для більш об'єктивної оцінки взаємодії ХФ та досліджуваних комплексів БАС, які мають потенційні генопротекторні властивості, з компонентами ядерного хроматину використовували модельні системи. Як модель ДНК, що входить до складу хроматину, брали комерційний препарат ДНК тимусу теляти, білків-людський сироватковий альбумін (ЛСА), ліпідної складової-фосфатидилхолінові і сфінгомієлінові ліпосоми.

ХФ вводили внутрішньом'язево з розрахунку 260 мг/кг маси тіла, що відповідає 1 ЛД₅₀. Тривалість інтоксикації складала - при вивченні молекулярних механізмів дії отрути - 10 хв, 2 год, 24 год, при вивченні впливу препаратів з потенційними генопротекторними властивостями - 24 год, тому що було встановлено, що саме через цей строк найбільш виражено проявляються порушення структури і функції ядерного хроматину печінки отруєних тварин (Ю.І.Губський, Є.Л.Левицький, 1995).

Комплекс природного походження БТК-8Л вводили тваринам внутрішньоочередивно в дозі 0,4 мг/кг маси тіла. БТК-8Л, який отримано з рослини *Serratula coronata* L. в Інституті біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України під керівництвом проф. Ю. Д. Холодової, знаходиться на стадії доклінічного дослідження. Він містить у своєму складі 8% екдистерону, міnorні фітоекдистероїди—моно- та диацетоніди екдистерону, α - екдизон, поліподин В, інтегристерон А, моноацетонид ангастерону С, птеростерон, а також інші ліпіди.

Препарат "Мумійо-Вітас" вводили тваринам внутрішньоочередивно одноразово одночасно з ХФ в дозі 80 мг/кг маси тіла (з лікувальною метою) і трикратно - за 36, 24, 0,5 год до введення отрути, загальна доза 240 мг/кг (з профілактичною метою).

Тварин декапітували вранці під легким ефірним наркозом, вилучали печінку і виділяли з неї фракції транскрипційно активного і репресованого ядерного хроматину, використовуючи метод Г.І.Чихиржиної та співавторів (1976).

Про інтенсивність процесів ПОЛ у фракціях хроматину індукованих НАДФН (НАДФН-залежне ПОЛ, НЗП) і аскорбатом (аскорбат-залежне ПОЛ, АЗП) судили на основі швидкості накопичення одного з кінцевих продуктів переокислення—малонового діальдегіду (МДА) і його похідних (Ю.А.Владимиров, А.И.Арчаков, 1972), спонтанного - по вмісту проміжних продуктів ліпопереокислення - дієнових кон'югатів (ДК) (Б.А.Костюк, Б.М.Потапович, 1984). Функціональну активність фракцій хроматину

оцінювали за активністю ендогенних ДНК - та РНК-полімераз (O.Fichot et al., 1979; Д.А.Костюченко и др., 1982), а також за їх реплікативною та транскрипційною активністю за умов *in vivo*. Оцінювали також швидкість синтезу білків, що входять до складу РХ і ТАХ. ^3H -тимидин (848 ТБк/моль) вводили внутрішньоочеревинно за 1 год до декапітації в дозі 236 МБк/кг маси тіла. ^{14}C -оротат (900 МБк/ммоль) і ^{14}C -лейцин (1,9 ТБк/моль) вводили внутрішньоочеревинно за 30 хв до декапітації в дозі 1,0 та 1,3 МБк/кг маси тіла, з подальшим визначенням радіоактивності фракцій (Ю.И.Губский и др., 1989). Результати виражали в розпад/хв на 1 мг ДНК або білка.

Структурні зміни в хроматині вивчали за допомогою флюоресцентних зондів пірену та 1-аніліно-нафталін-8-сульфонату (1,8 АНС) (Ю.А.Владимиров, Г.Е.Добрецов, 1980; 1989). Структурний стан ДНК у фракціях хроматину оцінювали по зв'язуванню з етидид бромідом (J.J.Lawrence., 1974) негістонових білків – за допомогою явища гасіння власної флюоресценції акриламідом (Дж.Лакович, 1982); гістонових білків – за ступенем встроювання флюорескаміну (T.Bode, 1979).

Статистичну обробку отриманих даних проводили за непараметричним методом Вілкоксона-Манна-Уїтні (И.П.Ашмарин и др., 1975).

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

1. Вивчення молекулярних механізмів генотоксичної дії хлорофосу. Фракції ТАХ і РХ печінки інтактних тварин характеризуються певним рівнем величини інтенсивності реакцій перекисного окислення ліпідів, які входять до їх складу (Ю.И.Губский, Е.Л.Левицкий, 1989). Гостре отруєння тварин ХФ приводить до вираженої модифікації інтенсивності процесів перекислення (пероксидації) хроматин-зв'язаних ліпідів. Першочергово зміни ПОЛ виявляються у фракції ТАХ (рис. 1). Так, у ній вже через 10 хв після введення отрути спостерігається зростання інтенсивності як індукованого НЗП, так і спонтанного (вміст ДК збільшується як у гептановому шарі ліпідного екстракту, куди переважно екстрагуються нейтральні ліпіди, так і у ізопропанольному – фосфоліпіди, відповідно). Модифікація ПОЛ в ТАХ приводить до змін активності в ній ферментів синтезу ДНК – ДНК-полімераз. Спостерігається зменшення активності ДНК-полімерази α та ДНК-полімерази β , що, відповідно, призводить до зменшення тотальної ДНК-полімеразної активності (рис. 2).

Зі збільшенням часу після отруєння ступінь модифікації ПОЛ у хроматині зростає: тепер вже зміни виявляються і в РХ. Так, через 2 год після введення ХФ інтенсивність реакцій НЗП і АЗП різко підвищена в цій фракції порівняно з контролем (рис. 3), що, відповідно, приводить до змін

Рис. 1. Зрушення показників реакцій спонтанного та індукowanego перекисного окислення ліпідів у фракціях ТАХ печінки щурів через 10 хв після введення хлорофосу.

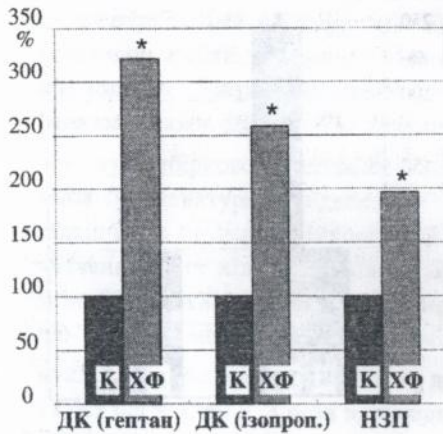


Рис. 2. Зрушення показників ендогенної ДНК-полімеразної активності фракції ТАХ печінки щурів через 10 хв після введення хлорофосу.

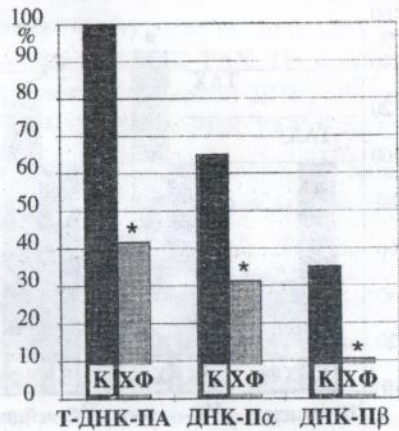


Рис. 3. Зрушення показників реакцій індукowanego перекисного окислення ліпідів у фракції РХ печінки щурів через 2 год після введення хлорофосу.

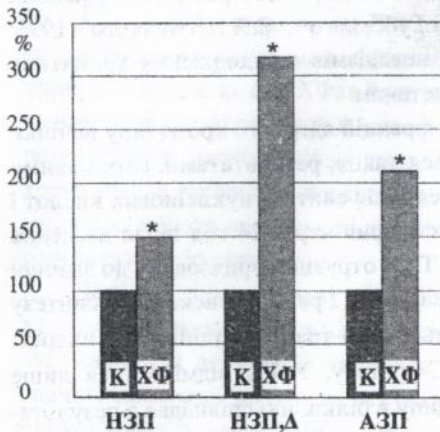
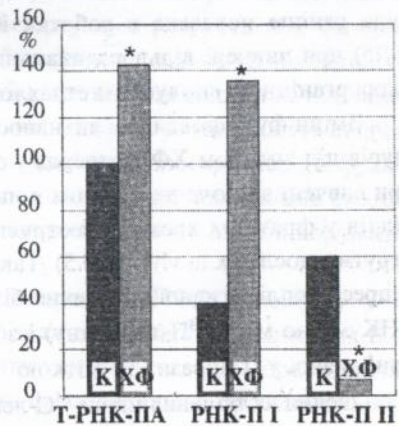


Рис. 4. Зрушення показників ендогенної РНК-полімеразної активності фракції РХ печінки щурів через 2 год після введення хлорофосу.



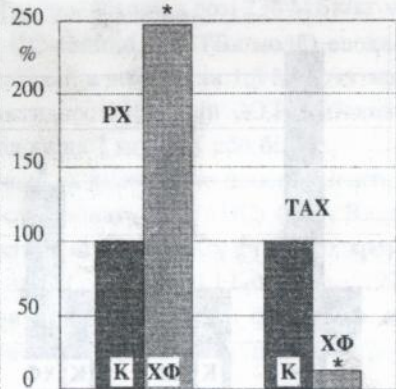
* $P < 0,05$ по відношенню до контролю на мал. 1-9.

Всі дані на рис. 1-9 представлені у відсотках відносно контролю (К).

Рис. 5. Зрушення включення попередників синтезу нуклеїнових кислот у фракції ядерного хроматину печінки щурів через 24 год після введення хлорофосу.



Рис. 6. Нуклеотичне розщеплення ³H-ДНК фракцій ядерного хроматину печінки щурів S₁-нуклеазою через 24 год після введення хлорофосу.



активності ферментів синтезу РНК – РНК-полімераз (рис. 4). Спостерігається збільшення активності РНК-полімерази I та зменшення активності РНК-полімерази II. В результаті таких різнонаправлених змін сумарна РНК-полімеразна активність в деякій мірі збільшується.

Аналогічний взаємозв'язок активації процесів ПОЛ у фракціях ядерного хроматину зі змінами активності ДНК- і РНК-полімераз у цих фракціях була раніше показана в роботах Ю.І.Губського, Є.Л.Левицького (1993; 1995) при вивченні вільнорадикальних механізмів пошкодження хроматину хлорорганічною сполукою тетрахлорметаном.

Зміни функціональної активності фракцій ядерного хроматину печінки щурів під впливом ХФ підтверджуються також результатами, отриманими при вивченні включення мічених попередників синтезу нуклеїнових кислот і білків у фракціях хроматину отруєних тварин через 24 год після введення отрути в досліді *in vivo* (рис.5). Так у ТАХ отруєння призводить до значної репресії реплікативної (зниження більш ніж у 2 рази інтенсивності синтезу ДНК згідно мітки ³H-тимидину) і збільшенню транскрипційної активності приблизно у 1,5 рази, за міткою ¹⁴C-оротату. У РХ відмічається лише збільшення включення мітки ¹⁴C-лейцину в білки, що співпадає з результатами досліджень *in vitro*. Це свідчить про більш значні біохімічні порушення у ТАХ.

В основі перекисної модифікації функцій ядерного хроматину, викликаной гострим отруєнням тварин ХФ, може лежати порушення структури

його компонентів: ДНК, білків, ліпідів.

Особливий інтерес у даному випадку викликає пошкодження ДНК, яка є носієм генетичної інформації. Результати нуклеазного зондування хроматину ендо- і екзогенними ДНК-азами показали, що через 24 год після введення отрути ДНК обох фракцій відрізняються чутливістю до розщеплення порівняно з ДНК контролю. Менш чутливою є ДНК ТАХ. Це може бути обумовлено суперспіралізацією нуклеосомної (лінкерної) ДНК, або утворенням зшивок ДНК-білок. Результати розщеплення ДНК ТАХ S_1 -нуклеазою, яка вибірково перетравлює одониткові ділянки показали, що, якщо за умов без денатурації підвищення спіралізації може давати свій внесок у підвищення ступеню стійкості ДНК ТАХ, то за умов денатурації (рис. 6) має значення лише кількість зшивок ДНК-білок. Проте в компактизації структури ДНК ТАХ при отруєнні ХФ приймають участь обидва ці фактори, про що свідчить менша величина відмінностей в стійкості до розщеплення S_1 -нуклеазою між контрольними та дослідними зразками за умов денатурації та без неї у 4, 4 і 5, 3 рази відповідно, хоча внесок у цей процес збільшення суперспіралізації є менш значним, ніж утворення зшивок ДНК-білок. При цьому слід відмітити, що зшивки ДНК-білок піддаються лише частковій репарації, оскільки цей процес вимагає одночасного видалення ділянок ДНК і білку з подальшою їх заміною на знову синтезовані. Що стосується фракції РХ – навпаки: інтоксикація тварин ХФ супроводжується релаксацією структури ДНК, значну роль у цьому відіграє послаблення ДНК-білкових контактів. Структурна компактизація ДНК у складі ТАХ і релаксація у складі РХ за умов отруєння тварин ХФ підтверджується результатами флюоресцентного зондування цих фракцій бромістим етидієм. Висловлюється припущення, що не сам ХФ, а його активні метаболіти викликають пошкодження ядерного хроматину клітин-мішеней *in vivo*, про що можуть свідчити результати експериментів, в яких ХФ додавали безпосередньо до фракцій хроматину, а також дані досліджень взаємодії отрути з модельними системами, які вказують на незначні або різнонаправлені зміни *in vitro* порівняно з результатами *in vivo*.

Доказом значної ролі модифікації процесів ПОЛ хроматину у механізмах генотоксичної дії ХФ є результати досліджень комплексних БАС, які дозволили виявити їх антиоксидантну активність, що призводить до значної протекції порушень структурно-функціональної організації хроматину, і в першу чергу ДНК.

2. Вплив фітостероїдного комплексу природного походження БТК-8Л на структуру і функції хроматину при гострому отруєнні хлорофосом. Результати досліджень впливу комплексу БТК-8Л на ядерний хроматин печінки при його профілактичному введенні показали, що він в значній мірі

протидії модифікації спонтанного й індукованого ПОЛ в обох фракціях хроматину (рис.7). В ТАХ, крім цього, введення БТК-8Л супроводжується вірогідним зниженням величини АЗП відносно контролю. Подібний ефект досліджуваного комплексу можна розглядати як основу для віднесення його до переліку засобів, які мають антиоксидантну активність по відношенню до процесів переокислення хроматин-зв'язаних ліпідів, і вказує на наявність у БТК-8Л потенційних генопротекторних властивостей. Підтвердженням цього є дані, отримані при вивченні включення мічених попередників синтезу нуклеїнових кислот в ДНК (рис.8), які свідчать про те, що БТК-8Л виявляє значну захисну дію відносно процесів реплікації і транскрипції у ТАХ, активність яких змінюється в отруєних ХФ тварин.

Профілактичне введення препарату БТК-8Л у значній мірі запобігає порушенню відсоткового співвідношення між фракціями хроматину та відношення у них білок/ДНК, що є важливими показниками характеристики ядерного хроматину, і дозволяють судити про його структурово-функціональний стан.

Отруєння тварин ХФ має наслідком відхилення величини співвідношення оптичної густини D_{230}/D_{260} від контролю (тенденція підвищення у випадку РХ та вірогідне зниження - для ТАХ), що може бути зумовлено як порушеннями у білкових структурах хроматину в результаті змін відношення білок/ДНК, так і утворенням продуктів ПОЛ, у випадку РХ. Введення БТК-8Л попереджає зміну даного показника.

Профілактичне введення комплексу БТК-8Л запобігає, зумовленим внаслідок отруєння, порушенням мікрів'язкості в обох фракціях хроматину, а також величини заряду поверхні ліпідової компоненти в них. Дослідження індуктивно-резонансного переносу енергії показало, що інтоксикація супроводжується зміною структури хроматину за рахунок активації внутрішньомолекулярної динаміки білків. Введення препарату БТК-8Л значною мірою нормалізує зазначений показник.

Вивчене зв'язування БТК-8Л з фракціями хроматину, проведене методом мікрокалориметрії, показало наявність при цьому екзотермічного ефекту, що можливо, або при утворенні молекулярних комплексів з водневим зв'язком, або при електростатичній чи Ван-дер-ваальсовій взаємодії. Тепловий ефект реакцій БТК-8Л з фракцією ТАХ протікає швидше і з більшим тепловим ефектом, ніж з РХ, що може свідчити про участь ліпідів у взаємодії з препаратом, оскільки їх вміст у цій фракції є вищим порівняно з РХ. Це, ймовірно, й обумовлює більш високий антиоксидантний ефект у фракціях ТАХ.

Результати флюоресцентного зондування ДНК у складі фракцій хроматину етидид бромідом при профілактичному введенні БТК-8Л отруєним

Рис. 7. Зрушення показників реакцій спонтанного та індукованого перекисного окислення ліпідів у фракціях ядерного хроматину за умов гострого отруєння хлорофосом та при профілактичному введенні БТК-8Л (24 год).

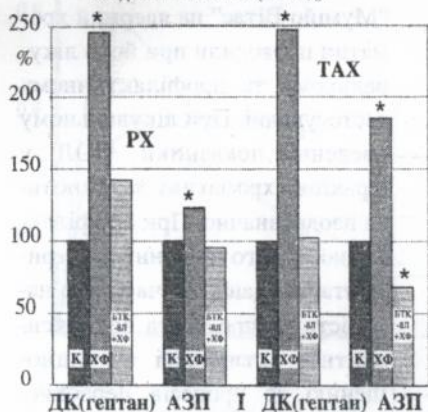
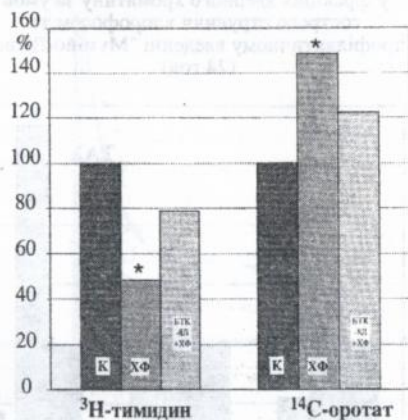


Рис. 8. Зрушення включення попередників синтезу нуклеїнових кислот у фракцію TAX печінки щурів при гострому отруєнні хлорофосом та профілактичному введенні БТК-8Л (24 год).



ХФ тваринам показали, що ці показники практично не відрізняються від контрольних. При цьому слід відмітити, що саме структура ДНК зазнає істотних змін під впливом ХФ. Однак, проведені дослідження за умов безпосереднього додавання БТК-8Л до фракцій ядерного хроматину контрольних тварин показали, що інтенсивність флюоресценції етидій броміду залишається незмінною. Це свідчить про те, що захисна дія препарату БТК-8Л основана не на прямій взаємодії з ДНК, а відбувається опосередковано у результаті взаємодії з іншими компонентами хроматину.

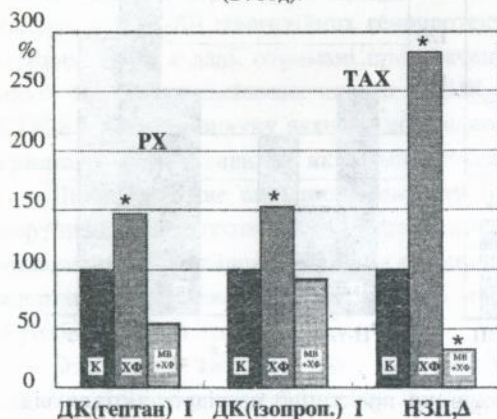
Флюоресцентним зондуванням основних класів білків фракцій хроматину за умов введення тваринам БТК-8Л та додавання його до РХ і ТАХ *in vitro* виявлено, що він призводить до розгортання (розпушування) структури гістонових білків в обох фракціях. Негістові ж білки, при безпосередньому додаванні БТК-8Л до фракцій хроматину не змінюють свого структурного упакування, хоча введення цього комплексу у значній мірі запобігає зміні показника гасіння їх триптофанової флюоресценції акриламідом у ТАХ та РХ отруєних тварин.

Наявність у препараті БТК-8Л генопротекторних властивостей корегує зі зниженням смертності експериментальних тварин більш, ніж на 30%.

Таким чином, проведені дослідження дозволили виявити у препараті БТК-8Л генопротекторні властивості, в основі яких лежать, в першу чергу, його антиоксидантна активність щодо процесів перекисного окислення хроматин-зв'язаних ліпідів, а також взаємодія з гістоновими білками і ліпідами хроматину.

3. Антиоксидантно-генопротекторний механізм дії препарату "Мумійо-Вітас" за умов пошкодження ядерного хроматину хлорофосом.

Рис. 9. Зрушення показників спонтанного та індукованого перекисного окислення ліпідів у фракціях ядерного хроматину за умов гострого отруєння хлорофосом та профілактичному введенні "Мумійо-Вітас" (24 год).

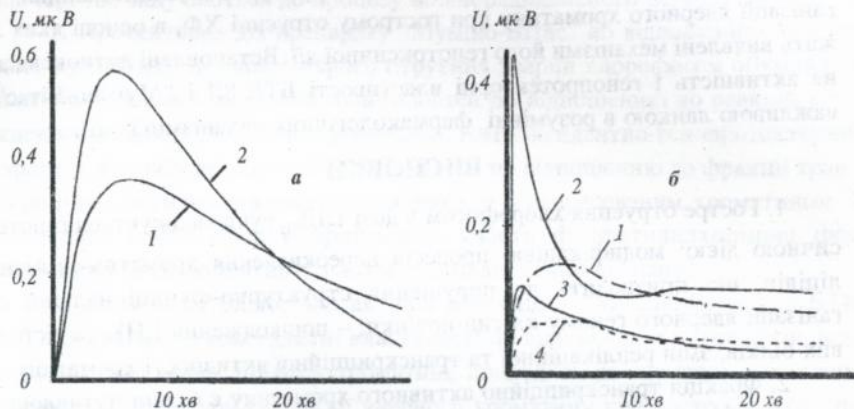


антиоксидантно-генопротекторного механізму дії препарату "Мумійо-Вітас" на ядерний хроматин проводили при його лікувальному та профілактичному застосуванні. При лікувальному введенні показники ПОЛ у фракціях хроматину змінюються неоднозначно. При профілактичному його введенні експериментальні дані свідчать про наявність у препарату антиоксидантної активності по відношенню до процесів переокислення хроматин-зв'язаних ліпідів (рис. 9). Відмічено зниження ряду показників ПОЛ

нижче контрольних, особливо це проявляється у ТАХ. При цьому слід відмітити, що вільнорадикальне пошкодження саме цієї фракції є визначальною ланкою генотоксичної дії ХФ. Це дозволяє зробити висновок, що профілактичне введення "Мумійо-Вітас" у даному випадку переважає у порівнянні з лікувальним. Захисний, по відношенню до ядерного геному, ефект, досліджуваного препарату, при профілактичному способі введення корегує зі зниженням смертності у два рази (при лікувальному - не відбувається зниження даного показника). Той факт, що генопротекторна дія препарату пов'язана з його антиоксидантною активністю, підтверджується результатами досліджень антирадикальної активності за допомогою стабільного радикалу дифенілпікрилгідразина (ДФПГ).

При гострому отруєнні тварин ХФ зростає частка активної фракції хроматину, що може бути пов'язано як з токсичним стресом, так і з включенням генів "антиоксидантного" захисту. При обох способах введення "Мумійо-Вітас" цей показник ще більше зростає. Проте, при профілактичному його введенні підвищення частки ТАХ супроводжується депротейнізацією (зниженням відношення білок / ДНК), що свідчить про більш ефективне "відкриття" додаткових ділянок на ДНК-матриці для синтезу m-RНК. При дії препарату не виявлено структурних змін білків хроматину, як гістонових (флюоресценція флюорескаміна), так і негістонових (константа гасіння акриламідом). Це дає право зробити припущення про участь

Рис. 10. Тепловий ефект взаємодії між препаратом "Мумійо-Вітас" та фракціями ядерного хроматину (а) та модельними системами (б): 1а - РХ, 2а - ТАХ; 1б - ліпосоми із фосфатидилхоліну, 2б - із сфінгомієліну; 3б - БСА; 4б - ДНК тимусу.



ліпідів (зниження ПОЛ) і ДНК хроматину (підвищення частки ТАХ у сумарному хроматині) у реалізації його генопротекторної дії.

Методом мікрокалориметрії була встановлена наявність екзотермічного ефекту при взаємодії "Мумійо-Вітас" з хроматином, що свідчить про утворення електростатичних, Ван-дер-ваальських чи водневих зв'язків. Максимум тепловиділення припадає на 4-ту хвилину після змішування компонентів. Звертає на себе увагу більша величина цього ефекту для фракції ТАХ порівняно з РХ, що співпадає з результатами антиоксидантної дії досліджуваного препарату у цій фракції. Для ідентифікації молекулярних сайтів впливу препарату "Мумійо-Вітас" була вивчена його взаємодія з модельними системами – компонентами хроматину (рис. 10) : ліпосомами із фосфатидилхоліну і сфінгомієліну (крива 1 та 2, відповідно), БСА (крива 3), а також ДНК тимусу теляти (крива 4). Встановлено, що реакція "Мумійо-Вітас" з БСА і сфінгомієліном протікає дуже швидко – пік тепловиділення - 0,5 хв з моменту змішування, тоді як при взаємодії з фосфатидилхоліном і ДНК він припадає на 4-ту хв, що співпадає з максимумом тепловиділення для обох фракцій хроматину. Це може бути доказом переважної участі останніх в комплексоутворенні з "Мумійо-Вітас" у хроматині. Внесок білкового компоненту, а також сфінгомієлінових ліпідів у процес цієї взаємодії виражений, імовірно, у меншій мірі.

Результати досліджень дозволили встановити антиоксидантно-генопротекторний механізм дії "Мумійо-Вітас". Він обумовлений наявністю у його складі потенційних антиоксидантів (вітамінів, фітостероїдів, амінокислот та ін.).

Таким чином, на основі проведених досліджень розроблені принципи фармакологічного захисту і корекції структурно-функціональної організації ядерного хроматину при гострому отруєнні ХФ, в основі яких лежать виявлені механізми його генотоксичної дії. Встановлені антиоксидантна активність і генопротекторні властивості БТК-8Л і “Мумійо-Вітас” є важливою ланкою в розумінні фармакологічних механізмів їх дії.

ВИСНОВКИ

1. Гостре отруєння хлорофосом у дозі $1LD_{50}$ супроводжується генотоксичною дією: модифікацією процесів переокислення хроматин-зв'язаних ліпідів, що призводить до порушення структурно-функціональної організації ядерного геному клітин печінки, – пошкодження ДНК та гістонових білків, змін реплікаційної та транскрипційної активності хроматину.

2. Фракція транскрипційно активного хроматину є більш чутливою до генотоксичної дії хлорофосу порівняно з репресованим хроматином, що обумовлено більшою кількістю ліпідів у першій фракції.

3. Протилежна спрямованість змін під впливом хлорофосу ряду показників, які характеризують структуру хроматину *in vivo* та *in vitro*, а також те, що зміна реакцій перекисного окислення ліпідів, що входять до його складу, під впливом отрути передує у часі порушенню структурно-функціональної організації ядерного геному, дозволяє стверджувати, що введений тваринам хлорофос біотрансформується з утворенням ряду метаболітів, які, в свою чергу, є пусковим механізмом вільнорадикального пошкодження ядерного хроматину печінки.

4. Біологічно активні сполуки, які мають антиоксидантну активність стосовно процесів перекисного окислення хроматин-зв'язаних ліпідів, у значній мірі знижують рівень пошкоджень ядерного геному клітин печінки, які виникають при гострому отруєнні хлорофосом, що є доказом їх вільнорадикальної природи у механізмі дії даної отрути.

5. Фітостероїдний комплекс природного походження БТК-8Л (знаходиться на стадії доклінічного дослідження) при профілактичному введенні отруєним хлорофосом тваринам у значній мірі попереджає розвиток модифікації процесів перекисного окислення ліпідів хроматину. Наявність антиоксидантних властивостей БТК-8Л сприяє підвищенню рівня антиоксидантного захисту ядерного геному.

6. Генопротекторний ефект БТК-8Л реалізується за рахунок безпосередньої взаємодії з гістоновими білками і ліпідами ядерного хроматину та обумовлений антиоксидантними властивостями цієї сполуки по відношенню до процесів перекисного окислення хроматин-зв'язаних ліпідів. Захисна

дія БТК-8Л по відношенню до ядерного геному більш виражена в активній фракції внаслідок, імовірно, більш високого вмісту в ньому ліпідів, які першочергово залучаються до процесу вільнорадикального переокислення.

7. Протекторна дія препарату "Мумію-Вітас" по відношенню до ядерного хроматину за умов гострого отруєння тварин хлорофосом обумовлена наявністю антиоксидантних властивостей по відношенню до реакцій перекисного окислення ліпідів хроматину. Антиоксидантно-генопротекторний ефект препарату виражений в більшій мірі по відношенню до фракції транскрипційно активного хроматину порівняно з репресованим хроматином. У реалізації цього ефекту приймають участь фосфатидилхолінові фосфоліпіди і ДНК хроматину, з яким взаємодіє даний препарат.

8. Досліджені біологічно активні речовини - "Мумію-Вітас" та БТК-8Л, які мають антиоксидантні властивості по відношенню до процесів перекисного окислення ліпідів у хроматині, приводять до значного зменшення порушень структури і функції ядерного хроматину при гострому отруєнні хлорофосом, що є доказом першочергової ролі модифікації процесів перекисного окислення ліпідів у механізмі генотоксичної дії фосфороорганічних сполук.

ПЕРЕЛІК РОБІТ, ЩО ОПУБЛІКОВАНІ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Свободнорадикальные механизмы повреждения биоструктур при химической патологии и принципы фармакологической коррекции / Соавторы: Левицкий Е. Л., Литвинова Н. В. и др. // Материалы к 60-летию Института фармакологии и токсикологии АМН Украины. История, итоги и перспективы научных исследований. - К., 1994. - С. 31-38.

2. Принципи фармакологічного захисту ядерного геному /Співавтори: Левицький Є. Л., Примак Р. Г. та ін. // Ліки. - 1994. - № 4. - С. 15-19.

3. Молекулярные механизмы генотоксического действия хлорофоса. Исследования in vivo и in vitro / Соавторы: Левицкий Е. Л., Губский Ю. И. и др. // Биополимеры и клетка. - 1996. - Т. 12, №3. - С. 77-90.

4. Защитное по отношению к хроматину действие биологически активного комплекса БТК-8Л в условиях интоксикации тетрахлорметаном и хлорофосом / Соавторы: Левицкий Е. Л., Губский Ю. И. и др. // Укр. биохим. журн. - 1996. - Т. 68, №5. - С. 97-105.

5. Антиоксидантно-генопротекторный механизм действия препарата "Мумие-Витас" / Соавторы: Левицкий Е.Л., Губский Ю.И. и др. // Биополимеры и клетка. - 1997. - Т. 13, № 1. - С. 63-69.

Марченко О.М. Механізми пошкодження ядерного хроматину хлорофосом та його корекція антиоксидантами природного походження. - Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук по спеціальності 14.03.06 - токсикологія. Інститут фармакології та токсикології АМН України, Київ, 1997.

Вивчено молекулярні механізми генотоксичної дії хлорофосу, доказана їх вільнорадикальна природа. Розроблені умови та експериментальні моделі фармакологічної корекції генотоксичних пошкоджень при отруєнні тварин хлорофосом антиоксидантами - біологічно активними сполуками природного походження: БТК-8Л і "Мумійо-Вітас".

Взяті разом, ці дані означають, що генотоксичний компонент при отруєнні хлорофосом займає визначене місце у токсичному процесі та обумовлений вільно-радикальними механізмами модифікації ПОЛ у хроматині, визначальним доказом цього є генопротекторна дія вивчених антиоксидантів.

Ключові слова: ядерний хроматин, генотоксична дія, генопротекторний ефект, біологічно активні речовини, хлорофос, антиоксиданти, БТК-8Л, "Мумійо-Вітас".

Marchenko A.N. Mechanisms of nuclear chromatin damage by chlorophose and its correction by antioxidants of natural origin. - Manuscript.

Dissertation for Degree of Candidate of Biological Sciences on speciality 14.03.06 - Toxicology. Institute of Pharmacology and Toxicology of AMS of Ukraine, Kiev, 1997.

The molecular mechanisms of genotoxic action of chlorophose have been studied, the free-radical nature of them has been proved. The condition and experimental models of pharmacological correction of genotoxic damage by antioxidants - biologically active compounds of natural origin: BTK-8L and "Mumiyo-Vitas" in chlorophose poisoning of the animals have been developed.

These data taken as a whole mean that genotoxic component in chlorophose poisoning takes the significant place in toxic process and is caused by free-radical mechanisms of peroxidation of lipids (POL) modification in chromatin. The decisive evidence of that is the genoprotective effect of studied antioxidants.

Key words: nuclear chromatin, genotoxic action, genoprotective effect, biologically active compounds, chlorophose, BTK-8L, "Mumiyo-Vitas".

Марченко А.Н. Механизмы повреждения ядерного хроматина хлорофосом и его коррекция антиоксидантами природного происхождения. - Рукопись.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 14.03.06 - токсикология. Институт фармакологии и токсикологии АМН Украины, Киев, 1997.

Изучены молекулярные механизмы генотоксического действия хлорофоса, доказана их свободнорадикальная природа. Разработаны условия и

экспериментальные модели фармакологической коррекции генотоксических повреждений при отравлении животных хлорофосом антиоксидантами - биологически активными соединениями природного происхождения: БТК-8Л и "Мумие-Витас".

Взятые совместно, эти данные означают, что генотоксический компонент при отравлении хлорофосом занимает значительное место в токсическом процессе и обусловлен свободно-радикальными механизмами модификации ПОЛ в хроматине, решающим доказательством чему является генопротекторное действие изученных антиоксидантов.

Ключевые слова: ядерный хроматин, генотоксичное действие, генопротекторный эффект, биологически активные соединения, хлорофос, БТК-8Л, "Мумие-Витас".

Підп. до друку 29.09.97. Формат 60x84 1/16. Папір офісний

Умов. друк. арк. 0.7. Тираж 110 прим. Замовлення. №105

м. Київ, Видавничий центр НАУ

252041, м. Київ, вул. Героїв оборони, 15

AB 38.702