

Ю. І. Губський, член-кор. АМН України, Є. Л. Левицький¹,
д.б.н., Г. Г. Горюшко, к.х.н., А. В. Матвієнко, к.м.н.,
Л. П. Бабенко, О. В. Задоріна², к.б.н., О.М. Марченко, к.б.н.

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

Д У " 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

Раніше [1] нами були представлені докази наявності апоптотичного механізму генотоксичної дії представника хлоралканів — тетрахлоретану (ТХМ) — на фракції репресованого (РХ) та транскрипційно активного (ТАХ) хроматину клітин печінки шурів та мишей. У даній роботі наведені результати наших подальших досліджень наявності апоптотичного компонента токсичної дії на цей внутрішньоклітинний молекулярний субстрат іншого представника хлоралканів — 1,2-дихлоретану (1,2-ДХЕ). На відміну від ТХМ, досліджень молекулярних механізмів генотоксичної дії 1,2-ДХЕ проведено набагато менше.

Метою даних експериментів було вивчення механізмів генотоксичної дії 1,2-ДХЕ на рівні структурно-функціональних зрушень фракцій транскрипційно активного та репресованого хроматину клітин печінки.

Матеріали та методи дослідження

Білим шурам (самці та самиці, 3 міс) вводили 1,2-ДХЕ у дозі 1 ЛД₅₀. Терміни інтоксикації дорівнювали: 10 хв, 1, 2, 4, 8 та 24 год.

Зміни у структурі та функції хроматину визначали за допомогою дослідження біохімічних та біофізичних показників фракцій хроматину, що відображають структурно-функціональний стан його компонентів (ДНК, білків гістонових, негістонових та ліпідів), які змінюються за наявності апоптотичного компонента токсичної дії хлоралкану [1]. Використовували

біохімічні показники, що характеризують швидкість та інтенсивність протікання реакцій ПОЛ у ліпідах фракцій хроматину (швидкість накопичення МДА і його похідних та концентрація дієнових кон'югатів) та визначають рівень його структурно-функціональної організації (доля РХ та ТАХ у хроматині та відношення білок/ДНК у фракціях). Перша група показників характеризує інтенсивність протікання реакцій ліпопереокиснення у фракціях хроматину, що є пусковим механізмом генотоксичної дії багатьох вивчених нами сполук та визначають ступінь і спрямованість пошкодження клітинного метаболізму [2-4]. Друга група показників дає можливість одержання інформації щодо загального стану структури та функцій хроматину, оскільки вони (доля фракцій РХ та ТАХ у хроматині та відношення у них білок/ДНК) є найбільш інтегральними і дають можливість проаналізувати саме ранні та суттєві зміни структури і функції цієї надмолекулярної біохімічної субстанції [5]. Обидві групи показників, як було показано нами раніше [1], змінюються за умов наявності апоптозу.

В даній роботі також за допомогою біофізичних методів проводили дослідження структурної організації білкової складової фракцій хроматину та їх ДНК під впливом 1,2-ДХЕ. Зміни білків вивчали за допомогою показників, що характеризують структуру загальних (F₃₃₀ — власна білкова флуоресценція та K_{sv} — константа Штерна-Фольмера) та

гістонових (F_{ФК} — флуоресценція флуорескаміну) білків: триптофанової флуоресценції (F₃₃₀) на довжині хвилі 330 нм, методом гасіння білкової флуоресценції дифузійним гасником — акриламідом, а також з використанням гістон-специфічного зонду — флуорескаміну [2]. Порушення структурної організації одного та двохланцюгової ДНК вивчали за допомогою флуоресцентного зонду (інтеркалятора) — етидію броміду (F_{ЕБ}) [2]. Стан білково-ліпідного контакту у фракціях хроматину вивчали за методом індуктивно-резонансного переносу енергії (ІРПЕ) з білкових молекул (донорів електронів) на флуоресцентний зонд пірен, що є їх акцептором [2].

У даному дослідженні наведені результати морфо-гістологічних досліджень печінки білих шурів, які були піддані дії 1,2-ДХЕ у дозі 1 ЛД₅₀ на терміни інтоксикації 1; 2; 4; 8 та 24 год. Окрему групу склали інтактні тварини, яких декапітували (етерний наркоз) одночасно з дослідними. Був вивчений метаболізм нуклеїнових кислот у паренхімі клітин печінки. Для цього однотипні ділянки печінки висікали, занурювали у 10 % нейтральний формалін, у рідину Карнуа. Готували парафінові та заморожені зрізи, які забарвлювали гематоксисліном та еозином, нуклеїнові кислоти (ДНК та РНК) виявляли за М. Шубичем. Кількість апоптотично уражених клітин визначали за характерними морфологічними ознаками [1]. Препарати фотографували за допомогою мікроскопу "Цитопан".

Інші матеріали та методи досліджень описані у нашій попередній роботі [1].

Результати та їх обговорення

Визначення концентрації проміжних та кінцевих продуктів ПОЛ

У табл. 1 наведені результати визначення швидкості накопичення кінцевих метаболітів реакцій ліпопереокиснення — малонового діальдегіду (МДА) та його похідних у фракціях хроматину клітин печінки шурів за умов інтоксикації 1,2-ДХЕ. Введення тваринам цієї отрути призводить до неоднозначних змін у величині рівня реакцій ПОЛ у фракціях хроматину. Так, у фракції РХ найбільш суттєві зміни спостерігаються у показниках, що характеризують рівень неферментативно-

Таблиця 1

Швидкість накопичення МДА та його похідних у фракціях хроматину клітин печінки щурів (нмоль/мг білка за 2 год) за умов отруєння 1,2-ДХЕ (n=4)

Показники	РХ						ТАХ					
	інтактні тварини (контроль)	строк дослідження після отруєння					інтактні тварини (контроль)	строк дослідження після отруєння				
		10 хв	1 год	2 год	4 год	8 год		10 хв	1 год	2 год	4 год	8 год
НЗП	26948,1	17422,2	26839,6	15679,0	15869,9	21399,0	25777,6	15942,2	22722,1	18837,9	24816,5	17588,1
НЗП, Δ	27659,2	17195,6	21510,7	14973,5*	17583,3	20099,2	26307,1	17015,2	23728,1	20059,6	26970,0	16004,8*
АЗП	3609,7	1553,8*	3188,1	1696,8*	2098,7	2828,1	2716,4	2946,0	3586,7	3230,9	5792,2*	3979,3*
НК	1742,1	855,4*	698,2*	909,2	2869,4*	2391,8*	1817,1	671,2*	1217,2	1537,8	3205,1*	3624,8*

Примітки: 1. * — $p \leq 0,05$ (по відношенню до контролю); 2. Значення НЗП (НАДФН-залежне ПОЛ); НЗП, (його ферментативна складова) та АЗП (аскорбат-залежне ПОЛ) наведені з урахуванням відповідних значень НК (неініційованого контролю).

го ПОЛ — аскорбат-залежного ПОЛ (АЗП) та неініційованого ПОЛ (НК). Так, через 10 хв після введення тваринам отрути спостерігаються зміни АЗП та НК. Вони полягають у достовірному зменшенні величини цих показників у порівнянні з контролем: рівень АЗП зменшується більш ніж вдвічі з 3609,7 до 1553,8 а НК — з 1742,1 до 855,4 нмоль МДА/мг білка за 2 год. Через 2 год після отруєння спостерігається достовірне зменшення ферментативної складової НАДФН-залежного ПОЛ (НЗП) з 27659,2 до 17195,6 нмоль МДА/мг білка за 2 год. Окрім того, через 4 та 8 год після введення отрути різко збільшується рівень неініційованого ПОЛ у цій фракції хроматину. Так, через 4 год його величина досягає 2869,4, а через 8 год — 2391,8 нмоль МДА/мг білка за 2 год. Тобто, приблизно через 4 год після отруєння 1,2-ДХЕ спостерігається максимум активації неініційованого ПОЛ у РХ. Подібна картина спос-

терігається і у фракції транскрипційно активного хроматину. Рівень ферментативного НАДФН-залежного ПОЛ за умов інтоксикації щурів 1,2-ДХЕ зменшується у цій фракції хроматину через 24 год з 26307,1 до 16004,8 нмоль МДА/мг білка за 2 год. Зміни неферментативного ПОЛ за умов інтоксикації є набагато більш суттєвими, ніж ферментативного. Так, через 4 та 8 год після введення тваринам отрути рівень АЗП в ТАХ збільшується з 2716,4 до 5792,2 та 3979,3 нмоль МДА/мг білка за 2 год, відповідно. Дещо інша закономірність спостерігається у випадку неініційованого ПОЛ (НК). Так, рівень неініційованого ПОЛ у ці терміни інтоксикації збільшується з 1817,1 до 3205,1 та 3624,8, відповідно. Але через 10 хв після отруєння тварин він достовірно зменшується з 1817,1 до 671,2 нмоль МДА/мг білка за 2 год. Таким чином, у фракції транскрипційно активного хроматину

спостерігаються більш виразні зміни реакцій неферментативного ПОЛ у порівнянні з РХ, які до того ж, на відміну від фракції репресованого хроматину, через найбільший з вивчених термінів інтоксикації (24 год) не корегуються в організмі. Ці результати узгоджуються із сформульованими нами раніше положеннями про те, що саме фракція транскрипційно активного хроматину є головною мішенню генотоксичної дії вивчених нами отрут, а також біологічно активних речовин, що мають геномозахисну дію [6, 7].

Окрім кінцевих метаболітів реакцій ПОЛ у хроматині визначали також проміжні продукти ПОЛ — дієнові кон'югати в різні терміни отруєння тварин 1,2-ДХЕ. Дані табл.2 свідчать, що характер змін концентрації проміжних продуктів ПОЛ у фракціях хроматину в залежності від тривалості інтоксикації дещо відрізняється від аналогічних процесів, зареєстрованих для МДА та

Таблиця 2

Концентрація дієнових кон'югатів у фракціях РХ і ТАХ клітин печінки щурів (нмоль/мг білка) за умов отруєння 1,2-ДХЕ (n=3-6)

Шар ліпідного екстракту	РХ						ТАХ					
	інтактні тварини (контроль)	строк дослідження після отруєння					інтактні тварини (контроль)	строк дослідження після отруєння				
		10 хв	1 год	2 год	4 год	8 год		10 хв	1 год	2 год	4 год	8 год
Гептановий	7031,9	8483,8	13427,1*	8796,3	869,8*	967,0*	6904,0	9740,4	14460,0*	12856,7*	1052,4	1226,5*
Ізопропанольний	6147,4	7610,0	10381,0*	6751,6	752,2*	696,3*	5334,0	7055,0	9990,4*	8993,0	933,5	928,3*

Примітка: в цій та табл. 3 та 4 * $p \leq 0,05$ по відношенню до контролю.

Показники Fe^{2+} -ініційованої БХЛ фракцій РХ і ТАХ клітин печінки інтактних та отруєних 1,2-ДХЕ щурів (37 °С, n= 4-8)

Термін отруєння, параметри БХЛ		Інтактні щури (контроль)	Інтотоксикація 1,2-ДХЕ	ΔБХЛ (відн. од.)
		РХ		
4 год	I ₁ , ум. од.	23,27±4,80	37,23±3,43*	1,59
	S, імп.	3388,1±1457,0	2400,4±597,1	0,71*
8 год	I ₁ , ум. од.	23,27±4,80	39,20±4,23*	1,68*
	S, імп.	3388,1±1457,0	5295,5±806,0*	1,56
ТАХ				
4 год	I ₂ , ум. од.		62,89±4,48*	1,44
	S, імп.	11847±1401	11377±2183	0,96
8 год	I ₂ , ум. од.	43,76±5,42	65,70±4,45*	1,50
	S, імп.	11847±1401	10681±1220	0,90

його похідних. Так, в фракції РХ у гептановому шарі ліпідного екстракту через 1 год після отруєння спостерігається виражене підвищення рівня ПОЛ з 7031,8 (контроль) до 13427,1 нмоль дієнових кон'югатів/мг білка. Через 4 та 8 год після отруєння тварин 1,2-ДХЕ різко знижується рівень проміжних продуктів ПОЛ. Їх рівень зменшується у ці терміни до 868,8 та 967,0 нмоль дієнових кон'югатів/мг білка, відповідно. В ізопропанольному шарі після отруєння спостерігається аналогічна картина змін концентрації дієнових кон'югатів: підвищується з 6141,4 (контроль) до 10381,0 (1 год) та у наступні терміни знижується до 752,2 та 696,3 нмоль дієнових кон'югатів/мг білка. Цей показник ϵ , на відміну від концентрації кінцевих продуктів ПОЛ у хроматині, більш рухливим, тому що вміст проміжних продуктів швидко змінюється за рахунок їх переходу в інші форми переокислення ліпідів у хроматині. Аналогічна тенденція змін концентрації дієнових кон'югатів під впливом інтоксикації спостерігається і у фракції ТАХ. В цілому зміни для цієї фракції є подібними до таких у фракції РХ, але виражені дещо більше.

Параметри біоломінесценції

Окрім визначення концентрації проміжних та кінцевих продуктів ПОЛ, проводили також біохемілюмінесцентне вивчення вільно-радикальних процесів у ядерному хроматині. Для цього визначали інтенсивність процесу та

площу його світлосуми [1], які відображають стан ПОЛ та стан антиоксидантних систем ядерного хроматину [8].

У табл. 3 наведені показники Fe^{2+} -ініційованої біохемілюмінесценції для РХ (I₁, S) та ТАХ (I₂, S) клітин печінки інтактних щурів (контроль) та таких через 4 та 8 год після отруєння 1,2-ДХЕ. Показані також зміни (Δ , %) показників за умов отруєння у порівнянні з контролем. За умов отруєння 1,2-ДХЕ протягом 4 год значно зростають у порівнянні з контролем показники швидкого та повільного спалаху БХЛ в РХ і ТАХ. Подібні зміни для РХ свідчать про збільшення вмісту вільних ОН*-радикалів, обумовлених розкладом гідроперекисів під впливом індукції Fe^{2+} . На 8 год інтоксикації значення I₁ ще більше зростають. У той же час площа світлосуми на 4 год ураження знижується незначно, але після 8 год отруєння 1,2-ДХЕ цей показник зростає у 1,56 разів, що свідчить про інтенсифікацію реакцій ПОЛ. Для фракції ТАХ на 4 та 8 год інтоксикації зафіксовано зростання показника повільного спалаху I₂, що свідчить про розвиток реакцій ПОЛ у даній системі. Але площа світлосуми при цьому знижується недостовірно.

Таким чином, за результатами дослідження Fe^{2+} -ініційованої біохемілюмінесценції в РХ виявлено значну інтенсифікацію вільно-радикальних процесів на протязі перших 8 год отруєння щурів 1,2-ДХЕ, тоді як у фракції ТАХ у цей термін дос-

товірні зміни вивчених за допомогою БХЛ вільно-радикальних продуктів відсутні.

На наш погляд, виявлені зміни інтенсивності реакцій ПОЛ у фракціях хроматину за умов інтоксикації 1,2-ДХЕ лежать в основі генотоксичної дії цієї сполуки, зокрема, порушень структурно-функціональної організації ядерного геному.

Доля фракцій та відношення білок/ДНК

У табл. 4 наведені результати визначення параметрів, що у найбільш загальному плані характеризують хроматин. Можна бачити, що як і при визначенні інтенсивності реакцій ПОЛ, найбільш чіткі зрушення показників, що характеризують організацію хроматину, фіксуються у ранні терміни інтоксикації: 10 хв, 1 та 2 год. Так, достовірно зростає доля фракції репресованого хроматину та, відповідно, падає транскрипційно активного (з 81,72 % у контролі для РХ до 89,88 %, 90,71 % та 92,11 % та з 19,95 % у контролі для ТАХ до 10,12 %, 9,29 % та 7,89 % через 10 хв, 1 та 2 год після введення отрути, відповідно). Окрім того, у ТАХ зафіксовані достовірні зміни відношення білок/ДНК, що також є інтегральним показником, який характеризує структурну організацію ядерного геному та інтенсивність протікання у ньому метаболічних процесів. Так, через 1 та 2 год після введення отрути цей показник зростає з 2,98 (у контролі) до 5,68 та 5,17, відповідно. Зменшення долі транскрипційно активної фракції у хроматині та зростання

Показники структури хроматину клітин печінки щурів за умов отруєння 1,2-ДХЕ (n=3-6)

Показники	РХ						ТАХ					
	Інтактні тварини (контроль)	строк після отруєння					Інтактні тварини (контроль)	строк після отруєння				
		10 хв	1 год	2 год	4 год	8 год		10 хв	1 год	2 год	4 год	8 год
Доля фракції, %	81,72	89,88*	90,71*	92,11*	83,30	83,47	19,95	10,12*	9,29*	7,89*	16,70	16,53
Білок/ДНК	1,50	1,75	1,44	1,66	1,49	1,59	2,98	5,71*	5,68*	5,17*	2,49	2,64

відношення білок/ДНК свідчать про зменшення генетичної активності геному під впливом 1,2-дихлоретану. [9, 10].

Отже, виявлені зміни інтенсивності протікання реакцій ПОЛ у хроматині певним чином зумовлюють зміни його структурно-функціональної організації. Як було показано нами раніше для тетрахлоретану [1], отруєння цією сполукою через вільнорадикальні механізми викликає цілу низку змін біохімічних та біофізичних параметрів структури та функції хроматину. Подібна картина спостерігається і у даному випадку при

генотоксичному пошкодженні хроматину 1,2-ДХЕ. Причому, як і у випадку ТХМ, зміни структури хроматину є більш вираженими у його транскрипційно активній фракції, яка відповідає за рівень його генетичної активності [11]. У кінцевому випадку, ці модифікації зумовлюють зниження генетичних процесів за умов отруєння.

Біофізичні методи дослідження структурної організації фракцій хроматину

Раніше ми показали [1], що однією з характерних ознак апоптотичного механізму токсичного ура-

ження ядерного хроматину клітин печінки тетрахлорметаном є його конденсація, яка реалізується за рахунок ущільнення зв'язку білок-ДНК, або суперспіралізації подвійного ланцюга ДНК. У табл. 5 наведені значення показників флуоресценції суспензій РХ в залежності від тривалості інтоксикації тварин 1,2-ДХЕ. Дослідження проводили на двох групах тварин — інтактні (контроль) та отруєні (дослід) при термінах інтоксикації 10 хв, 1 год, 2 год, 4 год, 8 год та 24 год. У табл.5 наведені зміни (Δ , %) значення вивчених параметрів в залежності від тривалості інтокси-

Таблиця 5

Значення біофізичних показників фракції РХ з клітин печінки щурів в залежності від часу інтоксикації 1,2-дихлоретаном (n=4; t=20 °C)

Тривалість інтоксикації 1,2-дихлоретаном	Константа Штерна-Фольмера		Інтенсивність флуоресценції флуорескаміну		Інтенсивність білкової флуоресценції		Інтенсивність флуоресценції етидії броміду		Вірогідність ІРПЕ		Відношення I ₃₉₂ /I ₄₇₀ пірену	
	K _{sv} , M ⁻¹	ΔK_{sv} (%)	F _{ФК} , ум. од.	$\Delta F_{ФК}$ (%)	F ₃₃₀	F ₃₃₀ (%)	F _{ЕБ} в.од.	ΔF (%)	W ум. од.	ΔW (%)	η в.о.	$\Delta \eta$ (%)
10 хв контроль дослід	6,07+0,50 6,47+0,70	+6,5	1,0 0,73	-27	1,0 1,17	+17	1,0 -	0 -	0,175 0,222	+26,9	10,1	-28,4
1 год контроль дослід	6,07+0,50 4,9+0,17	-19,0	0,82	-18	0,92	-8	-	-	0,175 0,170	-2,9	15,5 13,1	-15,5
2 год контроль дослід	6,07+0,50 5,6+0,10	-7,7	0,69	-31	0,83	-17	-	-	0,175 0,175	0	15,5 19,3	+24,5
4 год контроль дослід	8,83+0,40 8,11+0,30	-8,2	0,92	-8	0,91	-9	1,05	+5	0,247 0,224	-9,3	-	-
8 год контроль дослід	8,83+0,40 8,35+0,40	-5,4	1,50	+5	1,05	+5	1,03	+3	0,247 0,244	-1,2	-	-
24 год контроль дослід	6,73+0,23 6,13+0,13	-8,9	1,1	+10	0,89	-11	0,98	-2	0,224 0,219	-25,5	+4,9 +4,77	-2,7

кації. Видно, що флуоресцентні показники, які характеризують структуру білків в РХ (K_{SV} , $F_{ФК}$, F_{330}), зазнають змін за умов ураження тварин 1,2-ДХЕ. Ці зміни носять протилежну спрямованість в залежності від терміну інтоксикації: значення показників K_{SV} та F_{330} зростають у порівнянні з контролем на 10 хв, а далі знижуються до 24 год після отруєння аж до негативних значень Δ . Причому, максимум зниження спостерігається у проміжок між 1 год та 2 год від початку введення тваринам отрути. Для показника $F_{ФК}$ (значення якого характеризують структурний стан гістонових білків в хроматині) найменші значення інтенсивності флуоресценції флуорескаміну спостерігаються на протязі 10 хв – 2 год, тоді як через 24 год після введення отрути концентрація позитивно заряджених ϵ - NH_2 -залишків лізину у гістонових білках зростає більше ніж на 10 % у порівнянні з контролем.

Для фракції РХ зміни у структурі

ДНК за умов отруєння 1,2-ДХЕ є незначними: зростання флуоресценції ЕБ при його комплексоутворенні з ланцюгами ДНК складає всього 3 % у порівнянні з контролем. У той же час, у фракції РХ мають місце значні зміни значень параметрів ІРПЕ, W та мікров'язкості (тобто, відношення I_{392}/I_{470}) у спектрі вбудованого у РХ пирену, що характеризують властивості глибинних ділянок молекул ліпідів хроматину в області білково-ліпідного контакту. З табл. 5 витікає, що у початковий період інтоксикації має місце значне зростання вірогідності ІРПЕ (W), тоді як впродовж 24 год спостерігається значне зниження величини цього показника (на 26 %), послаблюється білково-ліпідний контакт у порівнянні з контролем. Реєструється також незначне зниження мікров'язкості у ліпідній фазі РХ.

Таким чином, дослідження показали наявність значних змін у фракції РХ, які стосуються структу-

ри гістонових білків, про що свідчать пертурбації у їх лізинових залишках, значне скорочення їх концентрації у початковий період інтоксикації та зростання на протязі 24 год інтоксикації. Спостерігаються також певні зміни у структурі ДНК, що супроводжуються її спіралізацією, зі зниженням мікров'язкості у ліпідній фазі РХ та послабленням білково-ліпідного контакту.

У табл. 6 наведені значення біофізичних показників фракції ТАХ з клітин печінки шурів в залежності від тривалості інтоксикації 1,2-ДХЕ. На відміну від фракції РХ, у ТАХ має місце зниження на 29 % концентрації ϵ -аміногруп залишків лізину (зменшення $F_{ФК}$), але при цьому спостерігається зростання величини показника K_{SV} , хоча за час з моменту ураження (10 хв) до 8 год значення цього показника було негативним, а значення $F_{ФК}$ у терміни 2-8 год ураження 1,2-ДХЕ були позитивними, що свідчить про значні пертур-

Таблиця 6

Значення біофізичних показників фракції ТАХ з клітин печінки шурів в залежності від часу отруєння 1,2-дихлоретаном (n=4; 20 °C)

Тривалість інтоксикації 1,2-дихлоретаном	Константа Штерна-Фольмера		Інтенсивність флуоресценції флуорескаміну		Інтенсивність білкової флуоресценції		Інтенсивність флуоресценції етидій броміду		Вірогідність ІРПЕ		Відношення I_{392}/I_{470} пірену	
	K_{SV} , M^{-1}	ΔK_{SV} (%)	$F_{ФК}$, ум. од.	$\Delta F_{ФК}$ (%)	F_{330}	F_{330} (%)	$F_{ЕБ}$ в.од.	ΔF (%)	W ум. од.	ΔW (%)	η в.о.	$\Delta \eta$ (%)
10 хв контроль дослід	9,20±0,51 9,1±0,15	-1,8	1 0,98	-2	1,0 1,05	+5	1,0 -	-	0,344 0,346	+5,8	11,5 14,5	+26,1
1 год контроль дослід	9,20±0,51 8,4±1,0	-8,69	0,99	-1	0,94	-6	-	-	0,344 0,329	-4,4	12,2	+6,1
2 год контроль дослід	9,2±0,51 8,7±0,15	-5,43	1,08	+8	1,02	+2	-	-	0,344 0,304	-11,6	10,1	-12,2
4 год контроль дослід	9,63±0,40 9,19±0,41	-4,57	1,22	+22	1,55	+55	0,89	-11	0,473 0,443	-6,3	-	-
8 год контроль дослід	9,63±0,40 9,04±0,21	-6,13	1,20	+20	1,37	+37	0,91	-9	0,473 0,421	-11,0	-	-
24 год контроль дослід	9,1±0,03 9,4±0,34	3,29	0,71	-29	0,98	-2	0,93± 0,03	-7	0,275 0,402	+31,6	4,05 3,60	-11,1

бації у білкових структурах ТАХ, а саме у залишках гістонових білків.

Зниження флуоресценції етидію броміду на 9-11 % впродовж 4-24 год інтоксикації свідчить про зменшення комплексоутворення та вбудовування його між нитками подвійного ланцюга ДНК, а також про обмеження його доступу до ДНК. Дослідження глибинних зон у ТАХ, у яких локалізується при вбудовуванні гідрофобний ліпідний зонд пірен, показало складний характер змін білково-ліпідного контакту: збільшення відстані білок-ліпід на протязі 1-8 год, але цей процес є зворотнім через 10 хв та 24 год. При цьому має місце зростання вірогідності ІРПЕ (білково-ліпідного контакту) на 30 % на 24 год інтоксикації. Так, рухомість у ліпідній фазі зменшується через 10 хв після введення отрути (при цьому зростає відношення I_{392} / I_{470} — показник мікров'язкості), але через 24 год вона зростає на 11 % (показник I_{392} / I_{470} зменшується).

Таким чином, зміни значень показників негістонових білків (ΔK_{SV}) та гістонів (ΔF_{FK}) свідчать про структурну модифікацію у ТАХ під впливом 1,2-ДХЕ, але, на відміну від РХ, через 24 год після введення отрути має місце розпушення структури негістонових білків та зменшення концентрації позитивного заряджених ϵ - NH_2 -груп залишків лізину у молекулах гістонових білків, тому спостерігається зростання позитивного заряду у цій фракції, що може бути перешкодою для комплексоутворення інтеркалятора етидію броміду з ланцюгами ДНК. Також, як і у фракції РХ, у фракції ТАХ спостерігається зниження показника мікров'язкості у ліпідній фазі, але, на відміну від РХ, через 24 год після отруєння 1,2-ДХЕ у фракції ТАХ зростає величина білково-ліпідного контакту на 31,6 %, тоді як у фракції РХ цей показник зменшується на 25,5 %.

Патоморфологічне вивчення пошкоджених 1,2-дихлоретаном клітин печінки щурів

Раніше нами була охарактеризована морфо-гістологічна картина змін метаболізму нуклеїнових кислот у клітинах білих щурів та мишей, отруєних ТХМ у дозі 1 ЛД₅₀ [1]. При цьому було показано, що через 8 год після введення отрути вміст нуклеїнових кислот у паренхімі печінки

не змінювався, спостерігалися поодинокі вогнища апоптотичних клітин: як у інтактних, так і отруєних тварин у вивчені строки спостереження (8 год) виявлялися поодинокі гепатоцити з еозинофільною цитоплазмою та конденсованим хроматином на периферії ядра. У більш віддалені терміни інтоксикації (24 год) частіше виявлялися клітини, у яких рееструвалися крупні грудки хроматину, розташовані перинуклеарно (морфологічні ознаки апоптозу). Деякі гепатоцити округлювалися, відділяючись в окремі клітини, їх ядра піддавалися грудковому розпаду. При збільшенні терміну інтоксикації до 24 год ці морфо-гістологічні зміни зростали та супроводжувалися збільшенням кількості апоптотичних клітин, виникненням вогнищ некрозу. При цьому порушувався метаболізм нуклеїнових кислот, особливо РНК.

При мікроскопічному вивченні через 1-8 год на оглядових препаратах клітин печінки дистрофічних змін, гемодинамічних порушень та ознак запальної реакції не виявлено. У 2 тварин з 5 через 8 год після введення отрути на периферії печінкових дольок у цитоплазмі гепатоцитів виявлялись дрібні вакуолі, зменшувався вміст РНК. Якщо у інтактних тварин продукт гістохімічної реакції на РНК метиленовим синім забарвлюється у голубий колір, то у отруєних тварин він має блідо-голубий колір. Як у інтактних, так у отруєних тварин у паренхімі печінки зрідка виявлялися гепатоцити з ядрами, у яких хроматин групувався у

вигляді крупних гранул на периферії ядра, що є характерною морфологічною ознакою апоптозу (рис. 1). Через 8 год від початку експерименту морфологічна картина паренхіми печінки суттєво не змінювалась у порівнянні з такою у тварин, описаних вище, але у печінці спостерігали вогнища активації клітин ретикуло-ендотеліальної системи. Окрім цього, у пери-портальних просторах збільшувався вміст мононуклеарів. Через 24 год після отруєння архітектоніка органу не змінювалась, при цьому не спостерігали некробіотичних змін у паренхіматозних клітинах, були відсутні циркуляторні порушення.

У цитоплазмі гепатоцитів виявлялися не глибокі, інтенсивно забарвлені у ліловий колір, а дрібні пиловидні зерна, забарвлені дифузно у блідо-ліловий колір. У порівнянні з попереднім періодом спостереження послаблялася реакція на РНК. На більшій площині, переважно у центральних частинах дольок, виявлялися гепатоцити з незначним вмістом РНК. Цитоплазма багатьох гепатоцитів метиленовим синім забарвлювалась у бліді тони. Також частіше зустрічалися поодинокі гепатоцити з еозинофільною цитоплазмою з ядрами, які складаються з кількох глибок, розміщених перинуклеарно (рис. 2). Продовжувала посилюватися продуктивна реакція у міжклітинній тканині печінки. Поряд з активацією ретикуло-ендотеліальної системи та збільшенням вмісту мононуклеарів у перипортальних просторах триад нерідко ви-

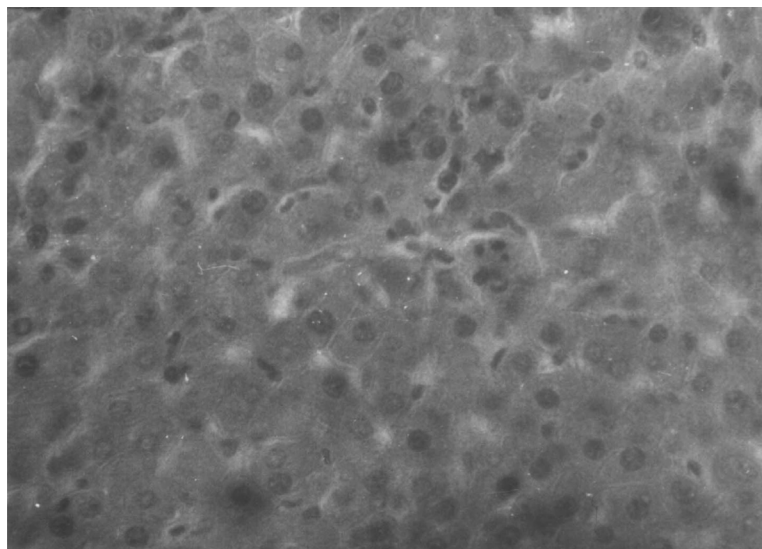


Рис. 1. Поодинокі гепатоцити з конденсованими глибоками хроматину у щурасамиці через 4 год після введення 1,2-ДХЕ у дозі 1ЛД₅₀. x 460

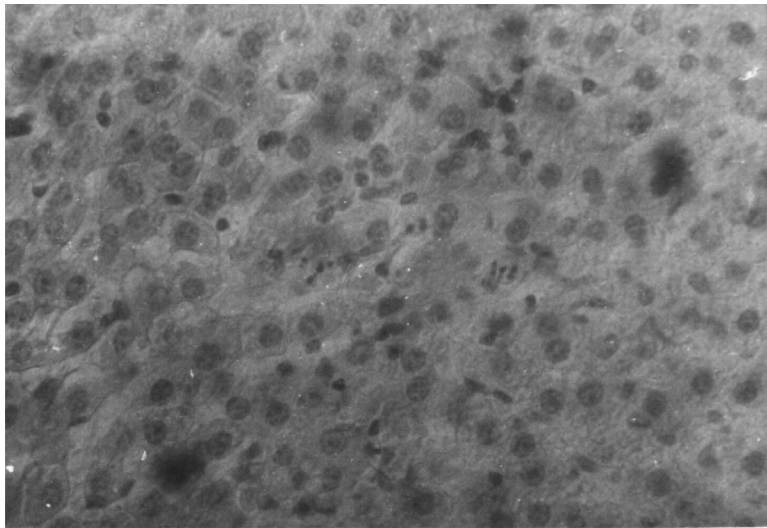


Рис. 2. Збільшення кількості гепатоцитів з конденсованим ядерним хроматином у щура через 24 год після отруєння 1,2-ДХЕ у дозі 1 ЛД₅₀. x 460

являлися невеликі вузлики, які складаються з лимфоїдно-гістогітарних клітин. При цьому збільшувалася кількість апоптотично уражених клітин (рис. 2).

Таким чином, на основі проведених морфо-гістохімічних досліджень встановлено, що 1,2-ДХЕ, введений внутрішньоочеревинно щурам у дозі 1 ЛД₅₀, на протязі перших 24 год не викликає структурних, некробіотичних та застійних явищ у клітинах печінки. Дані гістохімічних досліджень свідчать про наявність осередкових змін метаболізму РНК.

Отже, проведені дослідження генотоксичної дії 1,2-ДХЕ дозволили виявити наявність, як і у випадку ТХМ, апоптозу. Але при цьому його інтенсивність була менша, ніж у випадку ТХМ [1].

ЛИТЕРАТУРА

1. Губський Ю. І., Левицький Є. Л., Горюшко Г. Г. та ін. Механізми токсичної дії (некроз, апоптоз) хлоралканів на фракції ядерного хроматину клітин печінки. I. Тетрахлорметан // Совр. пробл. токсикол. — 2008. — № 2. — С. 8-16.
2. Губський Ю. І., Примак Р. Г., Горюшко А. Г., Левицький Є. Л. Изучение компонентов фракций хроматина печени крыс методами флуоресцентного зондирования // Биополимеры и клетка. — 1994. — Т. 10, № 6. — С. 92-97.
3. Pritchard D. J., Butler W. H. Apoptosis — the mechanism of cell death in dimethylnitrosamine — induced hepatotoxicity // J. Pathol. — 1989. — V. 158. — P. 253-260.
4. Barry M. A., Eastman A. Identification of deoxyribonuclease II as an endonuclease involved in apoptosis // Arch. Biochem. Biophys. — 1993. — V. 300, № 1. — P. 440-450.
5. Hasnall S. C., Roberts R. A. The perturbation of apoptosis and mitosis by drugs and xenobiotics // Pharmacol. Ther. — 1999. — V. 82, № 1. — P. 63-70.
6. Чабанний В. Н., Левицький Є. Л., Губський Ю. І. и др. Генотекторный эффект препаратов на основе экистероидов при отравлении крыс тетрахлорметаном и хлороформом // Укр. биохим. журн. — 1994. — Т. 66, № 5. — С. 67-77.
7. Левицький Є. Л., Губський Ю. І. Свободнорадикальные повреждения ядерного генетического аппарата клетки // Укр. биохим. журн. — 1994. — Т. 66, № 4. — С. 18-30.
8. Сидорик Е. П., Баглей Е. А., Данко М. И. Биохемилюминесценция клеток при опухолевом процессе. — Киев: Наукова думка, 1989. — 220 с.
9. Губський Ю. І., Левицький Є. Л. Перекисно-антиоксидантний механізм регуляції активності хроматину // Журн. АМН України. — 1997. — Т. 3, № 2. — С. 275-281.
10. Губський Ю. І., Левицький Є. Л. Генотоксикологія, метаболізм, болізни, лікарства // Лікування та діагностика. — 2000 — 2001. — № 4-1. — С. 23-29.
11. Левицький Є. Л., Губський Ю. І., Чабанний В. Н. и др. Биохимическая характеристика фракций транскрипционно активного и репрессированного хроматина печени крыс // Биополимеры и клетка. — 1993. — Т. 9, № 6. — С. 13-21.

*Ю. І. Губський, Є. Л. Левицький, А. Г. Горюшко,
А. В. Матвиєнко, Л. П. Бабенко, О. В. Задорина,
А. Н. Марченко*

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

МЕХАНИЗМИ ТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ (НЕКРОЗ, АПОПТОЗ) ХЛОРАЛКАНОВ НА ФРАКЦИИ ЯДЕРНОГО ХРОМАТИНА КЛЕТОК ПЕЧЕНИ. II. ДИХЛОРЕТАН

На основании биохимических, биофизических и морфологических методов установлено наличие апоптотического механизма генотоксического действия представителя хлоралканов — 1,2-дихлорэтана на фракции транскрипционно активного и репрессированного хроматина печени крыс. Это находит свое отражение в наличии у отравленных животных целого ряда морфологических и биохимических признаков, характерных для данного вида генетически запрограммированной гибели клеток: повышенной конденсации ядерного хроматина, которая проявляется в его локализации в виде глыбок на периферии ядерной мембраны гепатоцита, интенсивности реакций липоперекисления во фракциях и изменении их структурных характеристик (доли фракций, отношения белок/ДНК, интенсивности встраивания флуоресцентных зондов в ДНК, белки и липиды). По сравнению с другим представителем хлоралканов — тетрахлорметаном интенсивность генотоксического действия 1,2-дихлорэтана выражена в меньшей степени.

MECHANISMS OF TOXIC ACTION (NECROSIS, APOPTOSIS) OF CHLORALKANES ON THE LIVER CELLS NUCLEAR CHROMATIN. II. DICHLOROETHANE

On the basis of row of biochemical, biophysical and morphological methods the presence of apoptotic mechanism of genotoxic action of representative of chloralkanes — 1,2-dichloroethane — on fractions of transcriptionally active and repressed chromatin of liver of rats is set. It finds the reflection in a presence on condition of poisoning of animals this poison of a number of morphological and biochemical signs, characteristic for this type of the genetically programmed necrocytosis: enhanced condensation of nuclear chromatin, which shows up in his localization as lumps on periphery of nuclear membrane of hepatocytes, intensity of reactions of lipoperoxidation in fractions and the change of their structural descriptions (stakes of fractions, relation of protein/DNA, intensity of building of fluorescent probes in DNA, proteins and lipids). As compared to other before studied representative of chloroalkanes — tetra-chloromethane — intensity of similar genotoxic action of 1, 2-dichloroethane is expressed in less degree.