

Молекулярные механизмы генотоксического действия хлорофоса. Исследования *in vivo* и *in vitro*

Е. Л. Левицкий, Ю. И. Губский, Р. Г. Примак*,
А. Г. Горюшко, А. Н. Марченко

Институт фармакологии и токсикологии АМН Украины
252057 Киев, ул. Эжена Потье, 14

В результате исследований, проведенных в условиях влияния фосфорорганического пестицида хлорофоса на хроматин клеток печени крыс *in vivo* (введение животным) и *in vitro* (добавление к фракциям хроматина), выяснены некоторые молекулярные механизмы генотоксического действия этого яда. Противоположная направленность изменений под влиянием хлорофоса ряда показателей, характеризующих структуру хроматина *in vivo* и *in vitro*, позволяет утверждать, что введенный животным яд, скорее всего, модифицируется до ряда свободнорадикальных метаболитов, которые, в свою очередь, являются пусковым механизмом свободнорадикального повреждения хроматина вследствие изменения интенсивности перекисления входящих в его состав липидов. Перекисное повреждение хроматина выражается прежде всего в изменении структуры его ДНК и гистоновых белков, что влечет за собой искажение точности реализации генетической информации. В транскрипционно активном хроматине при этом снижается репликативная и растет транскрипционная активность, следствием чего является увеличение скорости включения метки в белки репрессированной фракции. В модификацию функциональной активности хроматина, вызванную генотоксическим действием хлорофоса, вносят свой вклад как изменение его матричных свойств, так и нарушение ферментативного аппарата репликации и транскрипции.

Введение. В загрязнении окружающей среды фосфорорганическими соединениями (ФОС) принадлежит весьма значительное место, что обусловлено широким применением этих веществ в промышленности, сельском хозяйстве и быту. Ранее нами было показано повреждающее действие ФОС на фракции репрессированного (РХ) и транскрипционно активного (ТАХ) хроматина печени крыс в условиях *in vivo* (при отравлении животных) [1—3]. Генотоксическое действие ФОС проявлялось в модификации свободнорадикальных реакций перекисления хроматинсвязанных липидов (ПОЛ) и изменении структурно-функциональной организации РХ и ТАХ.

Однако при этом остался невыясненным ряд важных вопросов. Прежде всего, для доказательства свободнорадикальной природы повреждений хроматина под влиянием ФОС необходимы сведения о соотношении во времени изменений ПОЛ и параметров, характеризующих структурно-функциональную организацию хроматина. Необходимо также выяснить, различается ли степень генотоксических повреждений РХ и ТАХ, учитывая различную структурно-функциональную организацию этих фракций [4] и различное

*Correspondence address.

содержание в них липидов [5], являющихся субстратом ПОЛ [6]. Необходимо также ответить на вопрос, какие из основных компонентов хроматина (ДНК, белки, липиды) изменяют свою структурную организацию при действии на хроматин ФОС. И, наконец, обусловлено ли генотоксическое действие ФОС опосредованным или непосредственным влиянием на ядерный геном?

Целью настоящей работы и явилось исследование этих вопросов на примере генотоксического действия одного из представителей ФОС — хлорофоса (ХФ).

Материалы и методы. В работе использовали крыс-самцов линии Вистар трехмесячного возраста (150—200 г), содержащихся в стандартных условиях вивария.

В опытах *in vivo* ХФ вводили внутримышечно в дозе 260 мг/кг массы тела животного, что соответствует 1 ЛД₅₀ для данной популяции животных [3]. Анализ проводили через 10 мин, 2 и 24 ч после введения яда.

Фракции РХ и ТАХ из интактных и интоксцированных животных выделяли по методу [7] с некоторыми модификациями, как описано в [4]. Функциональную активность хроматина оценивали по его репликативной и транскрипционной активности в условиях *in vivo*. Оценивали также скорость синтеза белков, входящих в состав РХ и ТАХ. ¹⁴С-оротат (900 МБк/ммоль, «Reanal», Венгрия) и ¹⁴С-лейцин (1,9 ТБк/моль, «Изотоп», СССР) вводили внутривентриально за 30 мин до декапитации в дозе 1,0 и 1,3 МБк/кг массы тела соответственно. ³Н-тимидин (848 ТБк/моль, «Изотоп», СССР) вводили внутривентриально за 1 ч до декапитации в дозе 236 МБк/кг массы тела. Радиоактивность определяли по методу [5]. Результаты выражали в расп/мин на 1 мг ДНК или белка хроматина.

Остальные модели и методы исследования фракций хроматина при действии ХФ *in vivo* описаны ранее [1—6, 8]. В исследованиях *in vitro* ХФ добавляли непосредственно к РХ и ТАХ (концентрация по белку 2,28 мг/мл) до конечных концентраций 10⁻⁵ и 10⁻⁷ М и инкубировали в течение 1 ч при 37 °С. Для определения вклада отдельных компонентов хроматина (ДНК, белки, липиды) в процесс взаимодействия с ядом использовали модельные системы, содержащие коммерческие препараты ДНК (1 мг/мл), ЧСА (3 мг/мл) («Serva», Германия) и липосомы из лецитина (10 мг/мл). Условия взаимодействия этих систем с ХФ *in vitro* аналогичны таковым для РХ и ТАХ.

Для изучения воздействия ХФ на состояние ПОЛ в липосомах из лецитина в условиях *in vitro* липосомы с индексом окисленности липида 0,315 и те же липосомы при добавлении ХФ в концентрации 10⁻⁷ и 10⁻⁵ М выдерживали при 37 °С, отбирая через 10 мин и 24 ч аликвоты растворов для измерения спектров поглощения в области 200—250 нм.

Полученные экспериментальные данные обрабатывали методами непараметрической статистики [9].

Результаты и обсуждение. Ядерный хроматин клеток млекопитающих содержит небольшое количество липидов, отличающихся по составу от липидов мембран [10]. Состав хроматинсвязанных липидов изменяется под действием повреждающих факторов [11, 12]. Подобные изменения сопровождаются модификацией интенсивности липоперекисления хроматинсвязанных липидов [13]. Ранее была показана специфика реакций спонтанного и индуцированного ПОЛ в РХ и ТАХ по сравнению с аналогичными реакциями в биомембранах [14], что в ряде случаев вызывало свободнорадикальное повреждение хроматина [13].

В условиях интоксикации животных ХФ также наблюдается модификация интенсивности реакций НАДФН- и аскорбат-индуцированного (оцениваемого по скорости накопления одного из конечных продуктов перекисле-

ния — малонового диальдегида и его производных, табл. 1) и спонтанного (оцениваемого по концентрации промежуточных продуктов липоперекисления — диеновых конъюгатов, табл. 2) ПОЛ. Первоначально изменения ПОЛ обнаруживаются во фракции ТАХ: через 10 мин после введения яда в этой фракции наблюдается рост интенсивности реакций индуцированного НАДФН ПОЛ, а также спонтанного ПОЛ (концентрации диеновых конъюгатов в гептановом и изопропанольном слоях липидного экстракта, куда экстрагируются нейтральные липиды и фосфолипиды соответственно). С увеличением времени интоксикации степень модификации ПОЛ в хромати-

Таблица 1

Скорость накопления малонового диальдегида и его производных во фракциях хроматина печени интактных и интоксцированных хлорофосом крыс (нмоль/мг белка за 2 ч, n=6—9)

Тип: реакций ПОЛ	Длительность интоксикации	РХ		ТАХ	
		Контроль	Опыт	Контроль	Опыт
НЗП	10 мин	2246,3	2826,0	514,1	1009,2*
	2 ч	1355,2	2025,7*	322,6	252,7
	24 ч	1338,5	2463,9*	716,0	773,9
НЗП, Δ	10 мин	178,2	192,3	35,5	17,0
	2 ч	456,9	1449,9*	52,5	27,9
	24 ч	96,3	1247,1*	121,6	156,7
АЗП	10 мин	763,9	961,0	226,5	264,5
	2 ч	452,0	952,8*	61,7	50,4
	24 ч	958,2	840,5	989,9	259,7*
Неинициированный контроль	10 мин	809,4	781,0	142,2	164,6
	2 ч	178,6	287,7	36,2	30,7
	24 ч	86,5	883,0*	64,5	146,0

П р и м е ч а н и е. Значения НЗП, НЗП, Δ и АЗП приведены с учетом вычитания соответствующих значений неинициированного контроля из суммарной величины данного показателя; НЗП — НАДФН-зависимое ПОЛ; НЗП, Δ — его составляющая, зависящая от нагревания; АЗП — аскорбат-зависимое ПОЛ; *p < 0,05 (по сравнению с контролем).

Таблица 2

Содержание диеновых конъюгатов во фракциях хроматина печени интактных и интоксцированных хлорофосом крыс (нмоль/мг белка, n=4—6)

Локализация в липидном экстракте	Длительность интоксикации	РХ		ТАХ	
		Контроль	Опыт	Контроль	Опыт
Гептановый слой	10 мин	81,1	150,3	7,4	23,8*
	2 ч	53,9	0*	37,9	8,1*
	24 ч	8,6	0	31,0	22,2
Изопропанольный слой	10 мин	181,9	244,6	149,3	386,3*
	2 ч	330,6	266,5	540,9	475,7
	24 ч	237,0	165,6	308,0	354,6

П р и м е ч а н и е. См. табл. 1.

не возрастает: теперь уже изменения обнаруживаются и в РХ. Через 2 ч после введения животным яда интенсивность спонтанного ПОЛ снижается как в ТАХ, так и в РХ (за счет переокисления нейтральных липидов хроматина, см. табл. 2). Интенсивность реакций НАДФН-индуцированного и неиницированного ПОЛ резко повышена по сравнению с контролем в РХ через 2 и 24 ч после введения ХФ, а аскорбат-индуцированного ПОЛ — снижена через 24 ч в ТАХ (см. табл. 1). При этом степень изменения индуцированного под влиянием ХФ ПОЛ в эти сроки интоксикации намного более выражена в РХ по сравнению с ТАХ. Таким образом, отравление экспериментальных животных ХФ приводит к выраженной модификации реакций спонтанного и индуцированного ПОЛ во фракциях РХ и ТАХ печени крыс, изменения в этом случае обнаруживаются раньше в активной фракции хроматина. Однако с течением времени интоксикации степень выраженности изменений ПОЛ нарастает быстрее в низкоактивной фракции, причем пик этих изменений находится в пределах 2 ч после введения животным яда. Несорответствие в ряде случаев между направленностью изменений спонтанного и индуцированного ПОЛ в хроматине под влиянием ХФ (см. табл. 1 и 2) может быть обусловлено возможными резкими сдвигами в жирнокислотном составе входящих в состав фракций хроматина липидов под влиянием интоксикации ХФ, что было показано нами ранее на

Таблица 3
Включение меченых предшественников синтеза нуклеиновых кислот (расп/мин на 1 мг ДНК) и белков (расп/мин на 1 мг белка) во фракциях хроматина печени интактных и интоксцированных в течение 24 ч крыс (n=4—13)

Условия эксперимента	Контроль		Хлорофос	
	РХ	ТАХ	РХ	ТАХ
³ H-тимидин	454	5283	414	2553*
¹⁴ C-оротат	1717	35599	1489	52907*
¹⁴ C-лейцин	487	1788	620*	1717

Примечание. См. табл. 1.

Таблица 4
Эндогенная ДНК-полимеразная активность фракций хроматина печени крыс при отравлении хлорофосом (расп/мин на 1 мг ДНК, n=6—9)

Тип ферментативной активности	Длительность интоксикации	РХ		ТАХ	
		Контроль	Опыт	Контроль	Опыт
Тотальная ДНК-полимеразная активность	10 мин	482573	513434	404078	168163*
	2 ч	166469	173406	168744	128201
	24 ч	1393522	1346254	823416	315683*
Активность ДНК-полимеразы α	10 мин	268850	356031	263904	125826*
	2 ч	109298	111294	148685	123468
	24 ч	897013	671151	609872	235257*
Активность ДНК-полимеразы β	10 мин	213723	154403	140174	42336*
	2 ч	57170	62045	40059	4733*
	24 ч	513721	675103	216308	80426*

Примечание. См. табл. 1.

примере интоксикации тетрахлорметаном и Е-гиповитаминоза [12]. Перекисная модификация структурно-функциональной организации фракций хроматина проявляется в резком изменении его функциональной активности через 24 ч после введения животным ХФ (табл. 3). Под влиянием яда более чем в 2 раза снижается интенсивность синтеза ДНК и приблизительно в 1,5 раза возрастает величина транскрипционной активности в ТАХ, что сопровождается увеличением в 1,3 раза уровня включения ^{14}C -лейцина в белки РХ. Подобные нарушения функциональной активности фракций хроматина под влиянием интоксикации животных ХФ хорошо коррелируют с изменениями активности ферментов синтеза ДНК и РНК в хроматине — ДНК- и РНК-полимераз (табл. 4 и 5). Через 10 мин и 24 ч после введения яда экспериментальным животным в ТАХ снижается тотальная ДНК-полимеразная активность вследствие уменьшения активности репликативной ДНК-полимеразы α и репаративной ДНК-полимеразы β . Увеличение транскрипционной активности ТАХ через 24 ч после введения ХФ (см. табл. 3) обусловлено ростом активности РНК-полимеразы I, ответственной за синтез рибосомной РНК в хроматине (см. табл. 5). В РХ через 2 ч после введения животным яда обнаружены разнонаправленные изменения активности эндогенных РНК-полимераз: увеличение — для РНК-полимеразы I и снижение — для РНК-полимеразы II, в результате чего суммарная РНК-полимеразная активность этой фракции остается неизменной во все исследованные сроки после введения животным яда (см. табл. 5). Степень транскрипционной активности РХ в условиях интоксикации животных также остается неизменной (см. табл. 3).

В основе перекисной модификации функций хроматина, вызванной интоксикацией животных ХФ, могут лежать нарушения структуры основных его компонентов: ДНК, белков и липидов. Под влиянием интоксикации через 24 ч после введения животным яда увеличивается доля ТАХ и соответственно снижается — РХ (табл. 6), что является одной из предпосылок увеличения транскрипционной активности ТАХ (см. табл. 3) наряду с возрастанием активности эндогенных РНК-полимераз (см. табл. 5). Во фракциях РХ через 24 ч после введения животным ХФ снижается отноше-

Таблица 5
Эндогенная РНК-полимеразная активность фракций хроматина печени крыс при отравлении хлорофосом (расп/мин на 1 мг ДНК, n=6—9)

Тип ферментативной активности	Длительность интоксикации	РХ		ТАХ	
		Контроль	Опыт	Контроль	Опыт
Тотальная РНК-полимеразная активность	10 мин	77403	94827	342002	248945
	2 ч	67399	58671	845348	526475
	24 ч	257414	287573	1060473	1266565*
Активность фракции, обогащенной РНК-полимеразой I	10 мин	42927	37751	164991	125527
	2 ч	26936	91336*	641535	312728
	24 ч	74617	75318	418425	724515*
Активность фракции, обогащенной РНК-полимеразой II	10 мин	34476	57076	159011	123418
	2 ч	40463	4705*	204013	213747
	24 ч	182797	211755	642048	542020

Примечание. См. табл. 1.

ние белок/ДНК (см. табл. 6). Не исключено, что подобное снижение может быть вызвано уменьшением количества РНК-полимеразы II, активность которой в этот период интоксикации почти в 10 раз меньше по сравнению с контролем (см. табл. 5). Подобные общие нарушения структуры РХ и ТАХ могут быть вызваны изменением структуры их отдельных компонентов.

В табл. 7 приведены результаты нуклеазного зондирования фракций хроматина эндо- и экзогенными ДНКазами через 24 ч после введения яда экспериментальным животным. ДНК обеих фракций хроматина отравленных животных отличается по чувствительности к расщеплению как эндо-, так и экзогенными нуклеазами по сравнению с ДНК контрольных. Так, в условиях интоксикации животных ДНК ТАХ расщепляется эндогенными ДНКазами хроматина в 1,5 раза менее интенсивно по сравнению с контролем. Менее чувствительной оказывается ДНК ТАХ печени интоксцированных животных по сравнению с контрольными и в условиях переваривания экзогенными ДНКазами. Так, кратковременное переваривание ДНКазой I (5 мин) при комнатной температуре расщепляет 10,5 % ДНК печени контрольных крыс и не приводит к появлению кислоторастворимой

Таблица 6

Соотношение между фракциями и отношение белок/ДНК в хроматине печени интактных и интоксцированных хлорофосом крыс (n=6-9)

Показатель	Длительность интоксикации	РХ		ТАХ	
		Контроль	Опыт	Контроль	Опыт
Соотношение между фракциями, %	10 мин	81,0	84,9	19,0	15,1
	2 ч	87,9	84,3*	12,1	15,7*
	24 ч	87,7	85,8	12,3	14,2
Белок/ДНК	10 мин	1,5	1,4	5,7	4,2
	2 ч	1,4	1,5	10,6	9,8
	24 ч	1,3	1,2*	7,6	9,0

Примечание. См. табл. 1.

Таблица 7

Нуклеолитическое расщепление (%) ³H-ДНК фракций хроматина печени интактных и интоксцированных хлорофосом крыс (n=6)

Условия ферментативной обработки	РХ		ТАХ	
	Контроль	Опыт	Контроль	Опыт
ДНКаза I:				
5 мин, 21 °С	0	9,9*	10,5	0*
15 мин, 37 °С	10,0	34,3*	37,5	33,9
S₁-Нуклеаза				
без денатурации	0	0	32,7	6,2*
денатурация	15,2	37,6*	79,7	18,1*
Эндонуклеолитическое самопереваривание				
	20,4	27,9	26,9	18,3*

Примечание. Исходные значения радиоактивности ³H-ДНК приведены в табл. 3. Значения расщепления ³H-ДНК экзогенными ферментами приведены с учетом эндогенного самопереваривания хроматина. Далее см. примечание к табл. 1

радиоактивности у интоксцированных. В условиях более жесткого переваривания ДНКазой I (15 мин, 37 °С) степень переваривания ДНК ТАХ увеличивается и не отличается у контрольных и отравленных животных. Сравнивая эти результаты, можно сделать вывод о том, что в данном случае подобная «компактизация» структуры ДНК ТАХ в условиях интоксикации ХФ не имеет жестких структурных ограничений и, вероятно, обусловлена либо незначительной суперспирализацией нуклеосомной (линкерной) ДНК, либо образованием шивок ДНК — белок. Подобное предположение подтверждается результатами расщепления ДНК ТАХ S_1 -нуклеазой, избирательно переваривающей однонитчатые участки ДНК. В условиях интоксикации ХФ количество этих участков снижается по сравнению с контролем как в нативной, так и в денатурированной ДНК. Если в первом случае фактор повышенной спирализации может вносить свой вклад в повышение степени устойчивости ДНК ТАХ интоксцированных животных к ферменту, то в условиях денатурации, приводящей к исчезновению вторичной структуры, имеет значение только количество шивок ДНК — белок. Тем не менее, в компактизации структуры ДНК ТАХ в условиях интоксикации, по-видимому, участвуют оба эти фактора, о чем свидетельствует меньшая величина различий в устойчивости к расщеплению S_1 -нуклеазой между контрольными и опытными образцами в условиях денатурации и без нее (в 4,4 и 5,3 раза соответственно), хотя вклад в этот процесс увеличения суперспирализации оказывается незначительным.

Что касается фракции РХ, то, наоборот, интоксикация животных ХФ приводит к релаксации структуры ДНК этой фракции (см. табл. 7). Причем здесь, во-первых, различия между контрольными и опытными животными не столь очевидны, как в случае ТАХ, и, во-вторых, они обусловлены, по всей вероятности, ослаблением ДНК-белковых контактов при интоксикации ХФ (поскольку различия в чувствительности к S_1 -нуклеазе проявляются только в условиях денатурации). При действии ХФ на организм в РХ увеличивается количество как двуспиральной ДНК (свободной от связи с белками), так и потенциально односпиральных участков (проявляющихся в условиях денатурации), которые в интактном хроматине недоступны действию фермента ввиду структурных ограничений, обусловленных увеличением степени спирализации.

Структурная компактизация ДНК в составе ТАХ и релаксация в составе РХ в условиях отравления животных ХФ подтверждается результатами флюоресцентного зондирования этих фракций бромистым этидием (табл. 8). Так, константа связывания зонда с РХ отравленных животных выше по сравнению с интактными в 1,4 раза с одновременным уменьшением числа мест связывания (в 1,3 раза). Это свидетельствует о релаксации структурной упаковки ДНК, сопровождающейся образованием более прочных по сравнению с контролем комплексов, по-видимому, в результате увеличения степени электрического взаимодействия катиона бромистого этидия с отрицательно заряженными фосфатными группами ДНК. В ТАХ интоксикация ХФ не приводит к достоверным изменениям константы и числа мест связывания с бромистым этидием. Вероятно, структурная компактизация ДНК ТАХ в условиях интоксикации животных ХФ не сказывается на степени встраивания зонда, так как ДНК в составе ТАХ менее доступна взаимодействию с бромистым этидием (см. табл. 8) ввиду более интенсивных относительно РХ ДНК-белковых контактов [4].

Таким образом, результаты проведенных исследований свидетельствуют о том, что при интоксикации животных ХФ вызывает значительные нарушения структурной организации ДНК в составе обеих фракций хроматина. В целом эти нарушения проявляются в структурной релаксации ДНК в ТАХ и ее компактизации — в РХ, что может быть вызвано изменением

Таблица 8
Физико-химические характеристики фракций хроматина интактных и интоксцированных хлорофосом крыс (n=3—11)

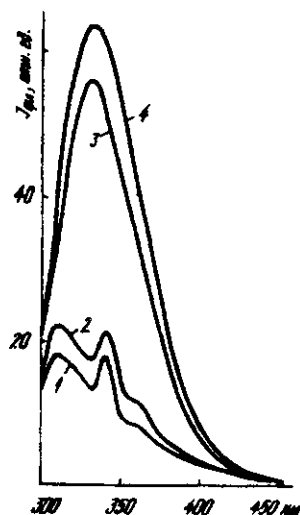
Показатель	РХ		ТАХ	
	Контроль	Хлорофос	Контроль	Хлорофос
Константа связывания с бромистым этидием, моль ⁻¹ ·л	$1,36 \cdot 10^5$	$1,89 \cdot 10^{5*}$	$1,77 \cdot 10^5$	$1,73 \cdot 10^5$
Число мест связывания с бромистым этидием, моль/мг	$7,3 \cdot 10^6$	$1,0 \cdot 10^{6*}$	$2,65 \cdot 10^6$	$3,1 \cdot 10^6$
Константа Штерна—Фольмера, М ⁻¹	7,3	8,4*	9,3	11,0*
Степень встраивания флюорескамина, усл. ед.	55	94*	25	30*

Примечание. См. табл. 1.

степени спирализации и количества ДНК-белковых контактов. При этом генотоксическое действие ХФ проявляется в большей мере на ДНК ТАХ по сравнению с РХ, что находит свое отражение в изменении функциональной активности ТАХ, прежде всего, процессов репликации и транскрипции (см. табл. 3—5).

Что касается белкового компонента хроматина, то в условиях интоксикации животных ХФ наблюдается некоторое «разрыхление» структуры белков РХ и ТАХ, о чем свидетельствуют данные собственной белковой флюоресценции (рисунок). Подтверждением этих данных являются результаты флюоресцентного зондирования отдельных групп белков хроматина — гистонов и негистоновых белков в условиях отравления животных ХФ (см. табл. 8). Результаты флюоресцентного зондирования гистоновых белков флюорескамином показывают, что интоксикация ХФ приводит к возрастанию степени встраивания зонда в гистоны РХ и ТАХ в 1,7 и 1,2 раза соответственно. Из этого следует, что структура гистоновых белков под влиянием ХФ претерпевает такие изменения, в результате которых количество доступных для флюорескамина положительно заряженных ε-аминогрупп лизиновых остатков возрастает.

Относительно негистоновых белков, то приведенные в табл. 8 константы



Интенсивность собственной белковой флюоресценции препаратов фракций хроматина печени интактных и интоксцированных в течение 2 ч крыс: 1, 2 — РХ; 3, 4 — ТАХ; 1, 3 — контроль; 2, 4 — опыт

тушения акриламидом, рассчитанные из графиков Штерна — Фольмера, свидетельствуют о том, что интоксикация животных ХФ приводит к некоторому возрастанию данного показателя в обеих фракциях хроматина, т. е. к разрыхлению структуры этих белков, обеспечивающему большую доступность молекул тушителя флюоресцентным центрам.

Липиды хроматина, являющиеся одним из основных его компонентов [4, 10, 11] и участвующие в формировании структуры нуклеопротеидного комплекса [15], первыми отвечают изменением реакций перекисного окисления на интоксикацию ХФ (см. табл. 1, 2). Тем не менее, структура липидного бислоя при этом изменяется незначительно. Так, при введении ХФ в условиях *in vivo* эксимеризация пирена во фракциях хроматина составляла: в РХ 36 и 28 усл. ед. (контроль и опыт соответственно), в ТАХ — 40 и 50. Не исключено, что основные структурные перестройки ХФ вызывает в условиях *in vivo* в липидах биомембран клеток-мишеней, где, возможно, происходит его превращение с образованием активных метаболитов, которые в дальнейшем приводят к повреждению ядерного хроматина, как было показано нами ранее на примере тетрахлорметана [16].

Подтверждением предположения о том, что не сам хлорофос, а его активные метаболиты вызывают повреждения ядерного хроматина клеток-мишеней в условиях *in vivo*, являются результаты экспериментов, в которых ХФ добавляли непосредственно к фракциям РХ и ТАХ. Они свидетельствуют о разнонаправленности изменений *in vivo* и *in vitro* под влиянием яда ряда физико-химических показателей, характеризующих структуру хроматина.

В табл. 9 приведены физико-химические характеристики фракций хроматина, отражающие модификации состояния различных его компонентов при добавлении ХФ *in vitro*. Как можно видеть, ДНК хроматина не претерпевает существенных изменений под воздействием ХФ, поскольку степень встраивания бромистого этидия в ТАХ не изменяется, а в РХ наблюдается лишь некоторая тенденция к ее снижению. Тем не менее, в условиях *in vivo* (см. табл. 8) аналогичные показатели под влиянием ХФ заметно изменяются.

Таблица 9
Влияние экзогенного хлорофоса на физико-химические характеристики фракции изолированного хроматина ($n=5$)

Показатель	РХ			ТАХ		
	Контроль	Хлорофос, 10^{-7} М	Хлорофос, 10^{-5} М	Контроль	Хлорофос, 10^{-7} М	Хлорофос, 10^{-5} М
Степень встраивания бромистого этидия, усл. ед.	116	109	103	49	47	47
Интенсивность собственной белковой флюоресценции, усл. ед.	27	22	23	119	137	129
Константа Штерна — Фольмера, М ⁻¹	4,6	4,6	5,2	5,1	5,7	5,2
Вероятность переноса энергии с белковых флюорофоров на пирен	0,11	0,09	0,11	0,24	0,24	0,21
Доля белков, участвующих в ИРПЭ, %	25	30	30	31	33	36
Степень встраивания флюорескамина, усл. ед.	105	15*	15*	81	7*	6,5*
Интенсивность полосы эксимеров пирена, усл. ед.	68	73	78	68	48	48

Общая структура белкового компонента хроматина, оцениваемая по интенсивности собственной белковой флюоресценции, под влиянием экзогенного ХФ так же, как и в условиях *in vivo* (см. рисунок), нарушается незначительно. Однако, если *in vivo* наблюдалось небольшое возгорание флюоресценции в обеих фракциях хроматина печени интоксцированных животных по сравнению с интактными, то *in vitro* подобное возгорание регистрируется только в ТАХ, в то время как в РХ, наоборот, этот показатель снижается.

Состояние негистоновых белков при воздействии ХФ на хроматин *in vitro* также практически не изменяется, поскольку различия в константах Штерна — Фольмера (при тушении собственной флюоресценции акриламидом), характеризующих подвижность этих белков, находятся в пределах ошибки эксперимента как в РХ, так и в ТАХ. При этом вероятность переноса энергии с белка на пирен, а также доля белков, участвующих в этом процессе, тоже остаются без изменения в обеих фракциях хроматина, свидетельствуя о том, что расстояние между белковыми хромофорами и местами локализации молекул пирена, так же как и состав белков, остаются неизменными. Однако в условиях *in vivo* константа тушения акриламидом под влиянием интоксикации ХФ достоверно изменялась в обеих фракциях хроматина (см. табл. 8).

Наиболее существенные изменения в условиях *in vitro* претерпевают гистоновые белки: степень встраивания флюорескамина уменьшается для РХ в 4,8 раза, для ТАХ — в 11,5 раза при инкубации с ХФ (10^{-7} М), причем дальнейшее увеличение его концентрации уже не сказывается на встраивании зонда. Интересно отметить, что если несколько изменить условия эксперимента и образцы фракций хроматина сначала проинкубировать с флюорескамином, а затем добавлять к ним ХФ, то наблюдается несколько иная картина по сравнению с вышеописанной, где первичной была обработка ХФ. В этом случае интенсивность флюоресценции флюорескамина уменьшается по сравнению с контрольными значениями (см. табл. 9) в РХ всего на 1,9 и 3,8 %, а в ТАХ — на 5,6 и 8,4 % при добавлении ХФ до концентрации 10^{-7} и 10^{-5} М соответственно. Из этого следует, что места связывания в гистоновых белках хроматина заняты флюорескамином и становятся практически недоступными для ХФ. Последнее обстоятельство доказывает принципиальную возможность защиты гистоновых белков хроматина от высокотоксичного воздействия ХФ. Если сравнить данные результаты с опытами *in vivo* (см. табл. 8), то можно видеть, что различия в показателях, характеризующих структурное состояние гистоновых белков под влиянием ХФ в этих двух сериях экспериментов, носят прямо противоположный характер.

Липидная составляющая фракций хроматина при добавлении ХФ *in vitro*, так же как и в опытах *in vivo* (см. табл. 8), претерпевает незначительные изменения, носящие разнонаправленный характер: в РХ наблюдается тенденция к возрастанию интенсивности полосы эксимеров пирена, а в ТАХ — к ее снижению. Это происходит вследствие того, что ХФ вызывает незначительное снижение микровязкости липидов в РХ и некоторое ее увеличение — в ТАХ. Изменения этих же показателей при действии ХФ *in vivo* имеют противоположную направленность. В условиях действия ХФ на хроматин *in vivo* в нем изменяется в значительной степени интенсивность процессов ПОЛ (см. табл. 1 и 2). Протекание процессов ПОЛ в модельных системах под действием экзогенного ХФ, в отличие от влияния последнего на эти процессы в хроматине в условиях *in vitro*, нарушается незначительно. В табл. 10 приведены значения оптической плотности спиртовых растворов лецитина, приготовленных из липосом в отсутствие ХФ и после 24 ч инкубации с ХФ. Из приведенных данных следует, что ХФ *in vitro*

Таблица 10
Величины оптических плотностей D_{212} и D_{233} растворов лецитина в спирте, а также индексы окисленности I до и после инкубации в среде с хлорофосом ($n=5$)

Условия эксперимента	Спектральные параметры		
	D_{212}	D_{233}	$I = D_{233} / D_{212}$
Липосомы, 10 мин	1,05	0,33	0,315
Липосомы + 10^{-7} М хлорофос, 24 ч	0,81	0,28	0,346
Липосомы + 10^{-5} М хлорофос, 24 ч	0,81	0,41	0,505*
Липосомы, 24+ ч (контроль)	0,955	0,34	0,373

Примечание. См. табл. 1.

Таблица 11
Влияние экзогенного хлорофоса на физико-химические характеристики модельных систем ($n=5$)

Модельная система	Показатель	Концентрация хлорофоса, М		
		0	10^{-7}	10^{-5}
ДНК	Константа связывания с бромистым этидием, $г^{-1} \cdot л$	32С4	28 ± 3	$68 \pm 10^*$
	Число мест связывания с бромистым этидием, моль/мг	6	5	9
ЧСА	Константа Штерна—Фольмера, $М^{-1}$	5,5	8,4	7,5
Липосомы	Интенсивность полосы эксимеров пирена, усл. ед.	81	67	67

Примечание. См. табл. 1.

вызывает разнонаправленные изменения ПОЛ в липосомах: в концентрации 10^{-7} М он ингибирует процесс ПОЛ, при этом индекс окисленности (I) ниже, чем для липосом в отсутствие ХФ через 24 ч инкубации. В то же время для липосом, инкубированных в среде ХФ при концентрации 10^{-5} М, имеет место значительное повышение величины I , свидетельствующее о накоплении продуктов ПОЛ. Таким образом, из проведенных исследований следует, что ХФ, в отличие от влияния на процессы ПОЛ хроматина в условиях *in vivo*, в модельных системах в зависимости от концентрации вызывает неоднозначные изменения этих реакций. Индукция ПОЛ наблюдается только в условиях высоких концентраций экзогенного ХФ, которые вряд ли присутствуют в клетках-мишенях.

Для объективной оценки полученных нами результатов по взаимодействию ХФ с компонентами хроматина в составе его фракций дополнительно были проведены эксперименты по взаимодействию яда с модельными системами *in vitro*. В качестве модели ДНК, входящей в состав фракций хроматина, был взят коммерческий препарат ДНК тимуса телят, белков — ЧСА, а липидной составляющей — фосфатидилхолиновые липосомы. Результаты влияния экзогенного ХФ на физико-химические характеристики модельных систем приведены в табл. 11. Как можно видеть, в случае коммерческого препарата ДНК ХФ при малых концентрациях не влияет заметно на значения кажущихся констант ассоциации и числа мест связывания с бромистым этидием и лишь при концентрации яда 10^{-5} М рассматриваемые показатели возрастают. Это подтверждает данные о том, что в

отличие от условий *in vivo* в условиях *in vitro* ДНК не является мишенью для действия ХФ.

Воздействие ХФ на ЧСА сопровождается незначительным увеличением значений констант Штерна — Фольмера тушения акриламидом, т. е. и в модельных системах белки (так же как гистоновые белки в составе фракций хроматина) не подвержены действию этого яда.

В липосомах под действием ХФ наблюдается некоторое уменьшение интенсивности полосы эксимеров пирена, аналогично подобному эффекту в ТАХ. По-видимому, структура липидного бислоя в РХ и ТАХ под влиянием как эндо-, так и экзогенного ХФ не претерпевает значительных перестроек, хотя вызываемые метаболитами ХФ *in vivo* изменения интенсивности реакций спонтанного и индуцированного перекисления хроматинсвязанных липидов являются одним из первичных звеньев в сложной цепи молекулярных событий, определяющих генотоксический эффект ХФ *in vivo*. Подобный вывод вытекает из данных о том, что модификация реакций ПОЛ в хроматине под влиянием введенного животным ХФ предшествует по времени нарушению его структурно-функциональной организации.

Таким образом, результаты проведенных исследований позволили обнаружить некоторые молекулярные механизмы генотоксического действия ХФ. Введенный экспериментальным животным яд метаболизируется, по всей вероятности, по аналогии с тетрахлорметаном [16] в мембранах эндоплазматического ретикулаума клеток печени. Как следствие, возникают свободнорадикальные метаболиты самого ХФ и, возможно, кислорода, вызывающие дальнейшее развитие свободнорадикальной патологии, модифицируя реакции спонтанного и индуцированного перекисления хроматинсвязанных липидов. Происходящее при этом перекисное повреждение хроматина реализуется, кроме того, за счет прямого связывания свободнорадикальных метаболитов ХФ с гистоновыми белками хроматина. В результате этого изменяется структура нуклеопротеидного комплекса, что находит свое отражение в структурной релаксации ДНК в РХ и ее компактизации — в ТАХ. Вызываемое структурными пертурбациями нуклеопротеидного комплекса свободнорадикальное искажение функциональной активности ТАХ неоднозначно, оно характеризуется снижением репликативной и увеличением транскрипционной активности, что влечет за собой интенсификацию синтеза белков РХ. Не исключено, что в подобную модификацию функциональной активности хроматина вносят свой вклад как изменения его матричных свойств, так и структурные нарушения ферментативного аппарата репликации и транскрипции.

Итак, проведенные исследования позволили ответить на вопросы, сформулированные в начале работы:

1. Изменения реакций ПОЛ в хроматине под влиянием введенного экспериментальным животным ХФ предшествуют по времени нарушению структурно-функциональной организации ядерного генома, что наряду с полученными ранее данными о непосредственном влиянии этих реакций на такую организацию [17] является доказательством свободнорадикальной природы генотоксического действия данного яда.

2. Фракция ТАХ в большей степени подвержена генотоксическому действию ХФ по сравнению с РХ.

3. Мишенями генотоксического действия введенного животным ХФ являются ДНК и гистоновые белки хроматина.

4. Генотоксическое действие, вероятно, опосредуется его свободнорадикальными метаболитами, а также свободными радикалами кислорода, образующимися в условиях интоксикации в мембранах эндоплазматического ретикулаума печени.

С. Л. Левицкий, Ю. И. Губский, Р. Г. Прима, Г. Г. Горюшко, О. М. Марченко

Молекулярні механізми генотоксичної дії хлорофосу. Дослідження *in vivo* та *in vitro*

Резюме

У результаті досліджень, здійснених в умовах впливу фосфорорганічного пестициду хлорофосу на хроматин клітин печінки щурів *in vivo* (введення тваринам) та *in vitro* (додавання до фракцій хроматину), виявлено деякі молекулярні механізми генотоксичної дії цієї отрути. Протилежна направленість змін під впливом хлорофосу ряду показників, що характеризують структуру хроматину *in vivo* та *in vitro*, дозволяє стверджувати, що введена тваринам отрута, скоріш за все, модифікується до ряду вільнорадикальних метаболітів, які, у свою чергу, є пусковим механізмом вільнорадикального пошкодження хроматину внаслідок зміни інтенсивності перекислення ліпідів, що входять до його складу. Перекисне пошкодження хроматину виражається, перш за все, у структурових змінах його ДНК та гістонових білків, що робить недостовірною реалізацію генетичної інформації. У транскрипційно активному хроматині при цьому знижується реплікативна та підвищується транскрипційна активність, що призводить до збільшення швидкості включення мітки у білки репресованої фракції. У модифікацію функціональної активності хроматину, яка зумовлена генотоксичною дією хлорофосу, роблять свій внесок як зміни його матричних властивостей, так і порушення ферментативного апарату реплікації та транскрипції.

E. L. Levitsky, Yu. I. Gubskiy, R. G. Primak, A. G. Goryushko, A. N. Marchenko

The molecular mechanisms of genotoxic action of chlorophose. The *in vivo* and *in vitro* investigations

Summary

The *in vivo* (injections into rats) and *in vitro* (addition to the rat liver chromatin fractions) researches of genotoxic action of phosphororganic pesticide chlorophose permitted to reveal some molecular mechanisms of this one. The opposite direction of the changes of some parameters which are characterize the chromatin structure *in vivo* and *in vitro* permit to confirm that the poison which is injected to animals probably is modified to a number of the free radical products, they are in them turn the starting mechanism of the free radical chromatin damage in result in the change of chromatin-bound lipids peroxidation. The developing in result of this the peroxidating chromatin damage is expressed first of all as its DNA and histones structure changes which involves the distortion of the genetic information realization. In this conditions the replicative activity is decreased and the transcriptional one is increased in the transcriptionally active chromatin which involves the increased label incorporation in the proteins of the repressed chromatin fraction. The change of the chromatin functional activity under the chlorophose genotoxic influence is depended on as the modification of the chromatin template features as the change of the replication and transcriptional enzymic apparatus.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Губський Ю. І., Левицький Є. Л., Прима Р. Г. Біохімічні механізми пошкодження ядерного хроматину хлорофосом // Укр. біохім. з'їзд. Тез. доп.— Київ: Вид-во УСГА, 1992.—С. 31.
2. Губський Ю. І., Левицький Є. Л., Прима Р. Г. и др. Изменение структуры и реакций липоперекисления хроматина печени под влиянием 0,0-диметил-0-2,2-дихлорвинилфосфата // Укр. биохим. журн.—1992.—64, №.—С. 89—91.
3. Губский Ю. И., Левицкий Е. Л., Прима Р. Г. и др. Молекулярные механизмы повреждения хроматина печени хлорофосом в условиях введения веропамила и атропина // Биополимеры и клетка.—1993.—9, № 4.—С. 32—39.
4. Левицкий Е. Л., Губский Ю. И., Чабанный В. Н. и др. Биохимическая характеристика фракций транскрипционно активного и репрессированного хроматина печени крыс // Там же.—С. 13—21.
5. Губский Ю. И., Левицкий Е. Л., Гольдштейн Н. Б. и др. Функциональная активность фракционированного хроматина печени крыс при однократном введении тетрахлометана // Вопр. мед. химии.—1989.—35, № 4.—С. 119—124.
6. Губский Ю. И., Левицкий Е. Л., Гольдштейн Н. Б. и др. Перекисное окисление липидов фракций хроматина печени крыс // Докл. АН УССР. Сер. Б.—1989.—№ 2.—С. 70—72.
7. Чихиржина Г. И., Домкина Л. К., Чигарева Н. Г. и др. Солюбилизация хроматина Ca^{2+} , Mg^{2+} -зависимым фактором. Активность труднорастворимого хроматина // Молекуляр. биология.—1976.—10, № 6.—С. 1303—1310.
8. Прима Р. Г., Горюшко А. Г., Левицкий Е. Л. и др. Изучение конформационных характеристик транскрипционно активного и репрессированного хроматина с помощью

- флюоресцентных зондов // Биополимеры и клетка.—1994.—10, № 1.—С. 41—46.
9. Ашмарин И. П., Васильев Н. Н., Амбросов В. А. Быстрые методы статистической обработки и планирование экспериментов.—Л.: Изд-во ЛГУ, 1975.—78 с.
 10. Казначеев Ю. С., Кулагина Т. П., Маркевич Л. И. и др. О метаболизме липидов тимуса и печени крыс // Молекуляр. биология.—1984.—18, № 3.—С. 607—612.
 11. Казначеев Ю. С., Коломийцева И. К., Кулагина Т. П. и др. Обновление хроматинсвязанных и мембранных липидов печени и тимуса γ -облученных крыс // Биохимия.—1984.—49, № 2.—С. 2008—2011.
 12. Губский Ю. И., Левицкий Е. Л., Волков Г. Л. Жирнокислотный состав фракций хроматина печени крыс в условиях стимуляции перекисного окисления липидов // Укр. биохим. журн.—1991.—63, № 1.—С. 87—91.
 13. Губский Ю. И., Левицкий Е. Л., Примак Р. Г. и др. Изменение структурного состояния фракционированного хроматина печени при активации перекисного окисления липидов // Биополимеры и клетка.—1991.—7, № 3.—С. 89—94.
 14. Губский Ю. И., Левицкий Е. Л. Механизмы перекисного окисления липидов фракций хроматина печени крыс // Укр. биохим. журн.—1993.—65, № 5.—С. 112—115.
 15. Губский Ю. И., Левицкий Е. Л., Примак Р. Г. и др. Конформационные характеристики и упаковка эндогенных липидов фракций транскрипционно активного и репрессированного хроматина // Там же.—1991.—63, № 2.—С. 83—89.
 16. Губский Ю. И., Левицкий Е. Л., Жила В. А. и др. Молекулярные механизмы повреждения фракционированного хроматина печени тетрахлорметаном // Вопр. мед. химии.—1992.—38.—С. 54—58.
 17. Губский Ю. И., Левицкий Е. Л., Гольдштейн Н. Б. и др. Перекисное окисление липидов и эндогенная ДНК-полимеразная активность фракций изолированного хроматина печени крыс // Бюл. эксперим. биологии и медицины.—1989.—57, № 3.—С. 296—298.