

Архив журнала

Вопросы медицинской химии

ISSN 0042-8809

1992

Том 38 выпуск 3

Внимание! Распознавание текста проведено в автоматическом режиме для облегчения работы поисковых систем. Будьте внимательны при копировании, возможны ошибки и неточности. Используйте сканированный графический вариант.

Archive of journal

Voprosy meditsinskoi khimii

ISSN 0042-8809

1992

Volume 38 issue 3

Attention! OCR has been performed automatically for search engines only. Be careful when copying, errors are possible. Use scanned picture as standard.

<http://pbmc.ibmc.msk.ru>

тельном воздействии этанола. Высокая амплитуда колебаний ФИ свидетельствует о нарушенной способности систем организма поддерживать гомеостаз данных соединений в условиях исследуемой патологии. При этом отмечается корреляция между величиной амплитуды колебаний и длительностью алкогольной интоксикации, что может быть использовано в диагностике тяжести алкоголизма.

ЛИТЕРАТУРА

1. Мацуль В. М. Разработка способа оценки быстрых изменений фосфатидилинозитов биологических мембран с использованием проточной тонкослойной хроматографии: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. — М., 1988.
2. Набиев А., Баширова Н. С. // Мед. журн. Узбекистана. — 1987. — № 9. — С. 61—63.
3. Островский Ю. М., Сотановская В. И., Островский С. Ю. Метаболические предпосылки и последствия потребления алкоголя. — Минск, 1988.
4. Портнов А. А., Пятницкая И. И. Клиника алкоголизма. — М., 1973.
5. Швец В. И., Степанов А. Е., Крылова В. П., Гулак П. В. Миоинозит и фосфоинозитиды. — М., 1987.
6. Aloia R. C., Paxton J., Daviai J. S. // Life Sci. — 1985. — Vol. 36, N 10. — P. 1003—1017.
7. Berridge M. J., Danson R., Downes R. P. et al. // Biochem. J. — 1983. — Vol. 212, N 2. — P. 473—482.
8. Bligh E. C., Dyer W. J. // Canad. J. Biochem. Physiol. — 1959. — Vol. 37. — P. 911—917.
9. Gandhi G. R., Ross D. H. // Experientia (Basel). — 1989. — Vol. 45, N 5. — P. 407—413.
10. Magruder J. D., Waid-Jones M., Reitj R. C. // Molec. Pharmacol. — 1985. — Vol. 27, N 2. — P. 256—262.

Поступила 25.08.90

TIME-COURSE OF RAPID CHANGES IN PHOSPHOINOSITIDE CONTENT IN BLOOD OF PATIENTS WITH CHRONIC ALCOHOLISM

E. A. Kornysheva, V. V. Anikin, A. V. Kargapolov

Medical Institute, Tver

The time-course of rapid changes in blood phosphoinositide content was studied in 48 patients with Stage II chronic alcoholism of and in healthy volunteers. Content of phosphoinositides was estimated within short intervals 30, 60, 120 and 180 sec after the samples were obtained. In the blood of the patients with alcoholism as compared with healthy volunteers the time-course of rapid changes in phosphoinositide content exhibited a higher amplitude and failed to return to the initial level within 3 min. Alterations in content of the phospholipid correlated with duration of alcohol abuse. The data obtained suggest that homeostasis of main biochemical regulators is impaired after alcohol consumption.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1992

УДК 616.36-008.931-02:615.357]-07

Ю. И. Губский, Е. Л. Левицкий, В. А. Жила, А. Я. Литошенко

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ПОВРЕЖДЕНИЯ ФРАКЦИОНИРОВАННОГО ХРОМАТИНА ПЕЧЕНИ ТЕТРАХЛОРМЕТАНОМ

Институт фармакологии и токсикологии Минздрава УССР, Институт геронтологии АМН СССР, Киев

Свободнорадикальное повреждение ядерного хроматина является молекулярной основой модификации структуры и изменения функциональной активности генетического аппарата клетки при различных повреждающих воздействиях, в том

числе при действии на организм ксенобиотиков. Классический мембранотоксический агент тетрахлорметан оказывает повреждающее действие на липидную матрицу гепатоцитов, а также вызывает при отравлении резко выраженные изменения структурно-функционального состояния ядерного хроматина печени [4]. Одним из механизмов повреждения хроматина при отравлении тетрахлорметаном может быть стимуляция процессов перекисного окисления липидов хроматина [5]. При этом фракция транскрипционно активного хроматина в гораздо большей степени подвержена повреждающему действию тетрахлорметана по сравнению с фракцией репрессированного хроматина [6]. Не исключено, что различия в повреждаемости фракций хроматина при отравлении тетрахлорметаном могут быть обусловлены как неодинаковой величиной связывания этого ксенобиотика фракциями хроматина, так и различной степенью свободнорадикального повреждения ДНК этих фракций вследствие количественных и качественных различий в их липидном составе [7]. Проверке этих предположений и посвящена настоящая работа.

Методика. В работе использовали крыс-самок линии Вистар в возрасте 3 мес массой 100—150 г. Тетрахлорметан вводили внутривенно в дозе 2 мл/кг массы тела, что соответствует ЛД₅₀ для данной популяции животных. Животных декапитировали под легким эфирным наркозом. В некоторых экспериментах животным в течение 3 сут вводили по 80 мг/кг массы тела фенobarбитала натрия («Merck», ФРГ) — 3 введения. Фракции хроматина, различающиеся по степени транскрипционной активности, получали по методу [13]. Для исследования величины связывания тетрахлорметана различающихся по транскрипционной активности фракций хроматина животным вводили меченый ¹⁴CCl₄ («Изотоп», СССР, мол. активность 95 ГБк/моль), разведенный немеченым тетрахлорметаном (20 мБк в 2,5 мл CCl₄), в токсической дозе. В опытах по связыванию меченого тетрахлорметана с фракциями хроматина *in vitro* хроматин (40 мкл, 2—5 мг белка/мл) или ДНК тимуса теленка (1,5 мг/мл) инкубировали с ¹⁴CCl₄ (конечная концентрация 0,1 М) в течение 2 ч при 37 °С, после чего наносили на полоски бумаги ватман-3 мм, которые обрабатывали, как описано ранее [10]. Эндогенную ДНК-полимеразную активность фракций хроматина определяли, как описано в [6]. О структурном состоянии ДНК фракций хроматина судили на основании ее чувствительности к ограниченному нуклеолитическому расщеплению ДНКазой I («Serva», ФРГ), S₁-нуклеазой («Sigma», США), а также эндогенными нуклеазами хроматина. ДНК хроматина метили ³H-тимидином («Изотоп», СССР, мол. активность

Таблица 1
Связывание ¹⁴CCl₄ с чистой ДНК и фракциями хроматина

Условия эксперимента	Величина связывания, расп/мин на 1 мг	
	белка	ДНК
In vitro:		
PX	5871	7302
TAX	2875	30 057*
ДНК тимуса теленка	—	0*
In vivo:		
контроль		
PX	23	31
TAX	32	661*
фенobarбитал		
PX	30	51
TAX	27	300*

Примечание. Здесь и в табл. 2—4: PX — репрессированный хроматин; TAX — транскрипционно активный хроматин. Звездочка — $p < 0,01$ по сравнению с PX. Представлены средние данные 3 опытов.

848 ТБк/моль), который вводили внутривенно за 1 ч до декапитации в дозе 235 мБк/кг массы тела. При частичном переваривании ДНК хроматина ДНКазой I инкубацию проводили в среде (1 мл), которая включала: хроматин (0,5 мг ДНК), 225 ед. ДНКазы I, 0,6 М трис-НСl, 0,5 М $MgCl_2$ pH 8,5. Условия инкубации: 5 мин при 21 °C и 15 мин при 37 °C. Условия переваривания ДНК хроматина эндогенными нуклеазами аналогичны приведенным выше для ДНКазы I, за исключением того, что в данном случае в среде инкубации отсутствовала ДНКаза I. Условия инкубации: 45 мин при 37 °C. В случае ферментативной обработки хроматина S_1 -нуклеазой среда инкубации (1 мл) включала: хроматин (0,5 мг ДНК), 500 ед. S_1 -нуклеазы, 5 мМ ацетат цинка, pH 4,6. Условия переваривания: 1 ч для интактного хроматина и 15 мин для денатурированного при 40 °C. Хроматин денатурировали кипячением в течение 7 мин. Контрольные пробы в случае ДНКазы I и S_1 -нуклеазы включали все компоненты, за исключением фермента. В случае эндогенного эндонуклеолитического переваривания хроматина в качестве контроля служили пробы, инкубированные при 0 °C. Через 30 мин инкубации при 2 °C содержимое проб (реакцию останавливали добавлением 0,5 мл 50 % трихлоруксусной кислоты) осаждали на фильтрах «Синпор» («Хемапол», Чехо-Словакия, диаметр пор 0,85 мкм). Степень переваривания рассчитывали по разнице кислотонерастворимой радиоактивности в опытных и контрольных пробах. Статистическую обработку полученных данных проводили путем подсчета достоверности различий между средними арифметическими, используя непараметрический метод Вилкоксона — Манна — Уитни [1]. Поскольку непараметрические критерии не требуют вычисления среднеквадратических отклонений и стандартных ошибок средних, на рисунке и в таблицах эти показатели отсутствуют.

Результаты и обсуждение. Результаты определения величины связывания тетрахлорметана с фракциями хроматина печени приведены в табл. 1. Из полученных данных видно, что при расчете на единицу массы ДНК хроматина обнаруживается значительно более высокое связывание тетрахлорметана с фракцией транскрипционно активного хроматина как при введении ксенобиотика в организм, так и при его действии *in vitro*. Наблюдаемые различия в величинах связывания тетрахлорметана с фракциями транскрипционно активного и репрессированного хроматина могут быть обусловлены несколькими факторами. Прежде всего транскрипционно активный хроматин характеризуется более высоким содержанием липидов на единицу массы ДНК с преобладанием полиненасыщенных жирных кислот, способных связывать как гидрофобные молекулы тетрахлорметана, так и его полярные метаболиты [7]. Кроме того, во фракции транскрипционно активного хроматина значительное количество участков ДНК находится в релаксированном состоянии и обладает, вероятно, большей аффинностью к связыванию ксенобиотика по сравнению с репрессированным хроматином. Отсутствие связывания тетрахлорметана *in vitro* с чистой ДНК подтверждает, очевидно, как роль в его связывании липидов (или белков) хроматина, так и возможное участие компонентов хроматина в его метаболизме с образованием свободных радикалов, взаимодействующих с этими молекулярными структурами. Весьма вероятно, что в действительности эти факторы сочетаются, и последовательность событий представляется следующей: тетрахлорметан связывается с липидным компонентом хроматина, после чего происходит его биотрансформация, а затем метаболиты (в ионной или свободнорадикальной форме) связываются с ДНК. Наличие в мембранах ядер клеток печени системы цитохромов, в том числе

цитохрома Р-450 [8], по-видимому, играет ведущую роль в генерировании не только свободнорадикальных форм метаболитов тетрахлорметана, но и других свободных радикалов и перекисей. Эти химически активные агенты могут повреждать структуру ДНК [22], особенно в составе транскрипционно активного хроматина [16], так как последний ассоциирован с мембранными структурами ядра. О том, что ДНК может являться основной мишенью генотоксического действия тетрахлорметана, свидетельствует корреляция между величиной его связывания с фракциями хроматина и степенью нарушения их структурно-функционального состояния при интоксикации животных этим ксенобиотиком [4, 6].

В связи с тем что цитотоксический эффект тетрахлорметана опосредуется через механизм образования свободных радикалов и перекисей [3], можно предположить, что этот эффект если и не зависит полностью, то в определенной мере может потенцироваться микросомальной цепью транспорта электронов, содержащей цитохром Р-450, который играет ведущую роль в генерировании свободных радикалов в эндоплазматическом ретикулуме гепатоцитов. Для проверки этой возможности были проведены исследования *in vivo* с применением фенobarбитала, являющегося индуктором микросомальных оксигеназ [3]. Из данных табл. 1 видно, что введение фенobarбитала уменьшает величину связывания тетрахлорметана с фракцией транскрипционно активного хроматина по сравнению с неиндуцированными животными. При этом во фракции репрессированного хроматина изменения не обнаруживаются, так как в условиях *in vivo* величина связывания ксенобиотика с этой фракцией весьма незначительна. Аналогичные результаты были получены и при изучении влияния фенobarбитала на величину связывания тетрахлорметана с ДНК и белками ядер клеток печени крыс и мышей [18].

Исходя из того что активности ферментов электронтранспортных цепей в ядрах печени крыс не индуцируются фенobarбиталом [20], можно полагать, что в условиях индукции основная часть введенного в организм тетрахлорметана метаболизируется именно в мембранах эндоплазматического ретикулума гепатоцитов. Образующиеся при этом свободные радикалы в силу своей высокой химической активности по отношению к мембранам эндоплазматического ретикулума и митохондрий [2, 3] не достигают хроматина, о чем свидетельствует уменьшение величины связывания меченого $^{14}CCl_4$ у крыс, которым вводили фенobarбитал.

Это предположение подтверждается и результатами, приведенными в табл. 2, из которой видно, что введение животным фенobarбитала оказывает протекторное действие на соотношение фракций хроматина и величину отношения белок/ДНК во фракции транскрипционно активного хроматина, изменяющихся при интоксикации животных тетрахлорметаном. Аналогичные результаты, свидетельствующие о протекторном эффекте фенobarбитала при тетрахлорметановой интоксикации, были получены и при изучении транскрипционной активности клеток печени [12].

Таким образом, приведенные выше данные и

Таблица 2

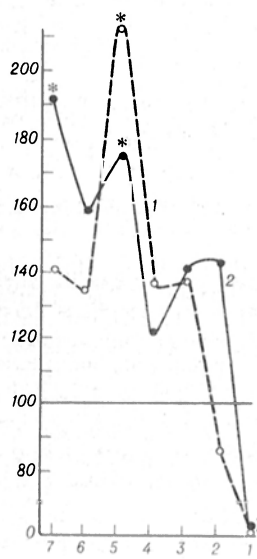
Влияние интоксикации крыс тетрахлорметаном на характеристики фракционированного хроматина печени

Условия эксперимента	Фракция хроматина	
	РХ	ТАХ
Контроль	90,1	9,9
	1,3	10,5
Тетрахлорметан	94,0*	6,0*
	1,4	22,3
Фенобарбитал+тетрахлорметан	89,0	11,0
	1,6	11,3

Примечание. Числитель — доля фракции (в %); знаменатель — отношение белок/ДНК. Звездочка — $p < 0,05$ по сравнению с контролем. Представлены средние данные 6 опытов.

сопоставление их с результатами других исследований позволяют считать, что повреждающее действие тетрахлорметана на ядерный хроматин печени может существенным образом зависеть от интенсивности его метаболизма в гепатоцитах, определяемой активностью монооксигеназ, в частности содержанием цитохрома Р-450. Если биохимические механизмы повреждающего действия тетрахлорметана на мембраны эндоплазматического ретикулума и митохондрий изучены достаточно подробно [2, 3], то механизмы его генотоксического действия нуждаются в более полном анализе.

Свойству тетрахлорметана связываться с хроматином клеток печени соответствуют данные, полученные при определении эндогенной ДНК-полимеразной активности, стимуляция которой была больше выражена во фракции транскрипционно активного хроматина [4, 6]. О большей чувствительности этой фракции к действию ксенобиотика свидетельствуют и результаты, полученные при определении тотальной ДНК-полимеразной активности *in vitro* (см. рисунок). Тетрахлорметан оказывает стимулирующее влияние на активность эндогенных ДНК-полимераз в довольно низких концентрациях. При этом более чувствительной является фракция транскрипционно активного хроматина, в которой 10^{-7} М CCl_4 вызывает



Влияние добавленного *in vitro* тетрахлорметана на эндогенную тотальную ДНК-полимеразную активность фракций хроматина печени крыс.

По оси абсцисс — концентрация тетрахлорметана, 10^{-7} М; по оси ординат — ДНК-полимеразная активность, % от контрольных значений (269 053 расп/мин на 1 мг ДНК для репрессированного хроматина и 185 778 расп/мин на 1 мг ДНК для транскрипционно активного хроматина). Звездочка — $p < 0,05$ по сравнению с контролем. 1 — репрессированный хроматин, 2 — транскрипционно активный хроматин.

повышение ДНК-полимеразной активности почти вдвое. Такой же по величине эффект во фракции репрессированного хроматина вызывает 10^{-5} М тетрахлорметан. Увеличение концентрации тетрахлорметана ведет к угнетению ДНК-полимеразной активности в обеих фракциях хроматина, что, возможно, обусловлено перекисным и свободнорадикальным повреждением белков, в том числе ферментных.

Стимуляция ДНК-полимеразной активности в транскрипционно активном хроматине через 2 ч после интоксикации с увеличением активности репликативной ДНК-полимеразы α [6] может быть связана с несколькими возможностями. Первая из них может быть обусловлена увеличением репликативного синтеза ДНК, а следовательно, и митотической активности в печени отравленных животных. Факты подобного рода описаны в литературе для печени мышей и клеточных культур [15, 17]. Подобное увеличение должно сопровождаться повышением включения 3H -тимидина в ДНК хроматина печени отравленных животных. Однако в наших экспериментах такого повышения обнаружено не было (табл. 3). Следовательно, в данном случае повышенная ДНК-полимеразная активность в хроматине печени отравленных животных не может быть связана с повышением репликативного синтеза ДНК и клеточной пролиферации.

Вторая возможность учитывает участие ДНК-полимеразы α в репарации ДНК [21] и, следовательно, может быть связана с повышением репаративного синтеза ДНК вследствие возможного повреждения при отравлении тетрахлорметаном структуры ДНК хроматина. Однако при этом подобное повышение должно было бы сопровождаться увеличением включения 3H -тимидина в ДНК. Его отсутствие может свидетельствовать о существовании возможных структурно-функциональных ограничений в хроматине печени отравленных животных, не позволяющих проявиться повышенной ДНК полимеразной активности *in vivo*. Эти ограничения, по-видимому, исчезают при анализе ДНК-полимеразной активности *in vitro*. Увеличение репаративного синтеза, катализируемого *in vitro* ДНК-полимеразой, может быть обусловлено увеличением количества молекул фермента, изменением его кинетических характеристик, нарушением структуры матрицы ДНК, при котором увеличивается количество субстратов для ДНК-полимеразы в виде свободных 3-ОН-концов в молекулах ДНК [9]. Не исключено также сочетание этих трех возможностей. Для проверки предположения о нарушении струк-

Таблица 3

Включение 3H -тимидина (в расп/мин на 1 мг ДНК) в ДНК фракций хроматина intactных и отравленных тетрахлорметаном крыс

Условия эксперимента	Фракция хроматина	
	РХ	ТАХ
Контроль	29 682	30 912
Тетрахлорметан	17 057	26 487

Примечание. Представлены средние данные 5 опытов.

Таблица 4

Нуклеолитическое переваривание (в %) ³H-ДНК фракций хроматина печени контрольных и отравленных тетрахлорметаном крыс

Условия ферментативной обработки	РХ		ТАХ	
	кон-троль	тетра-хлор-метан	кон-троль	тетра-хлор-метан
Эндогенное самопереваривание ДНКазой I:	78,5	72,4	32,9	16,4*
15 мин при 37°C	76,4	68,1	80,2	78,4
5 мин при 21 °C	16,7	28,1*	20,4	18,2
S ₁ -нуклеаза:				
без денатурации	0	0	0	0
денатурация	32,1	0*	21,5	59,3*

Примечание. Значения удельной радиоактивности, на основании которых рассчитывали степень переваривания, приведены в табл. 3. Звездочка — $p < 0,05$ по сравнению с контролем. Представлены средние данные 3 опытов.

туры матрицы ДНК при отравлении животных тетрахлорметаном была исследована чувствительность ДНК хроматина печени интактных и отравленных животных к частичному нуклеолитическому перевариванию эндогенными нуклеазами, ДНКазой I и S₁-нуклеазой (табл. 4).

Стимуляция эндогенного нуклеолитического переваривания выявляет повышение в печени крыс, отравленных тетрахлорметаном, устойчивости ДНК к нуклеазной атаке. Эти результаты могут быть интерпретированы следующим образом. Выше было показано, что введение тетрахлорметана вызывает уменьшение доли транскрипционно активной фракции хроматина (см. табл. 2), т. е. определенная часть транскрипционно активного хроматина переходит в конденсированное состояние и при дифференциальном фракционировании выделяется вместе с остальной массой репрессированного хроматина [13]. При этом и в уменьшившейся фракции транскрипционно активного хроматина увеличено число сайтов ДНК, ставших недоступными для эндогенных нуклеаз. Вероятно, эти изменения могут быть обусловлены такими структурными перестройками хроматина, в основе которых лежит экранирование чувствительных к нуклеолиту сайтов ДНК. Механизмом, ответственным за это экранирование, может являться образование ковалентных сшивок ДНК — белок в результате повреждения свободными радикалами молекулы ДНК именно в этих сайтах. Образование разрывов в молекулах ДНК, индуцированное свободными радикалами, а также сшивок ДНК — белок в местах разрывов хорошо документировано [14, 19]. Образующиеся под влиянием свободных радикалов ковалентные сшивки ДНК — ДНК в условиях эндонуклеолиза практически не выявляются.

С другой стороны, под влиянием отравления тетрахлорметаном в структуре репрессированного хроматина повышается число гиперчувствительных сайтов, перевариваемых ДНКазой I. По-видимому, подобный факт обусловлен некоторым разрыхлением наднуклеосомной структуры этой фракции хроматина у отравленных животных, так как известно, что этот фермент переваривает последовательности ДНК в хроматине,

находящиеся в структуре нуклеосом [11]. Эти факты согласуются с полученными нами ранее данными о некоторой релаксации структуры репрессированного хроматина отравленных животных, обнаруженной при анализе кривых плавления хроматина [7]. Одновременно в структуре ДНК репрессированного хроматина отравленных животных исчезают последовательности, чувствительные к S₁-нуклеазе и выявляемые при денатурации хроматина. Этот факт можно объяснить возможным образованием ковалентных сшивок ДНК — белок в местах разрывов ДНК, вызванных ее свободнорадикальным повреждением. Данные результаты согласуются с увеличением зоны плавления хроматина в участках интенсивного ДНК-гистонового взаимодействия на кривых плавления при отравлении тетрахлорметаном [7].

Обнаруженное увеличение доли одонитевой ДНК в структуре транскрипционно активного хроматина отравленных животных можно объяснить гиперпродукцией одонитевых разрывов в ДНК при интоксикации, которые экранированы нековалентными связями ДНК — белок. Подобное предположение подтверждается обнаруженным ранее повышением величины зоны плавления ДНК, стабилизированной структурными негистоновыми белками (в составе которых могут находиться и ДНК-полимеразы) на кривых плавления транскрипционно активного хроматина отравленных животных, в результате чего наблюдается его конденсация по сравнению с интактными животными [7].

Таким образом, обнаруженное при отравлении тетрахлорметаном повышение эндогенной ДНК-полимеразной активности, более выраженное в транскрипционно активной фракции хроматина, можно объяснить, по крайней мере частично, нарушением структуры ДНК хроматина отравленных животных. Однако при этом нельзя исключить и возможность повышенного образования молекул фермента и (или) изменения его кинетических характеристик в результате интоксикации тетрахлорметаном.

Из совокупности описанных данных можно представить следующий механизм генотоксического действия тетрахлорметана. Внедряясь (в силу своей ярко выраженной гидрофобности) в липидную компоненту хроматина, он вызывает гиперпродукцию свободных радикалов, одним из последствий которой является стимуляция процессов перекисного окисления липидов в хроматине. В результате этого происходит свободнорадикальное повреждение молекул ДНК хроматина (в особенности его транскрипционно активной фракции). Возникающие в результате такого повреждения сшивки ДНК — белок способствуют компактизации хроматина. Одновременно образуются одонитевые разрывы ДНК, являющиеся в транскрипционно активном хроматине доступными для эндогенных ДНК-полимераз, что является одной из причин повышения их активности *in vitro*. Представленная схема генотоксического действия тетрахлорметана на ядерный хроматин печени требует дальнейших экспериментальных подтверждений.

1. Ашмарин И. П., Васильев И. Н., Амбросов В. А. Быстрые методы статистической обработки и планирование экспериментов.— Л., 1979.
2. Губский Ю. И. // Укр. биохим. журн.— 1982.— Т. 54, № 1.— С. 46—50.
3. Губский Ю. И. Коррекция химического поражения печени.— Киев, 1989.
4. Губский Ю. И., Левицкий Е. Л., Гольдштейн Н. Б. и др. // Докл. АН УССР, сер. Б.— 1988.— № 3.— С. 72—74.
5. Губский Ю. И., Левицкий Е. Л., Гольдштейн Н. Б. и др. // Там же.— 1989.— № 2.— С. 70—72.
6. Губский Ю. И., Левицкий Е. Л., Гольдштейн Н. Б. и др. // Вопр. мед. химии.— 1989.— № 4.— С. 119—124.
7. Губский Ю. И., Левицкий Е. Л., Чабанный В. Н. и др. // Укр. биохим. журн.— 1990.— Т. 62, № 2.— С. 76—82.
8. Збарский И. Б. Организация клеточного ядра.— М., 1988.
9. Левицкий Е. Л. // Укр. биохим. журн.— 1984.— Т. 56, № 4.— С. 460—472.
10. Левицкий Е. Л. // Там же.— 1986.— Т. 58, № 3.— С. 72—74.
11. Льюин Б. Гены.— М., 1987.— С. 365—367.
12. Радзинский В. О., Губский Ю. И., Смалко П. Я. и др. // Докл. АН УССР, сер. Б.— 1983.— № 4.— С. 75—77.
13. Чихиржина Т. И., Домкина Б. К., Чигарева И. Г. и др. Молекул. биол.— 1976.— Т. 10, № 6.— С. 1303—1310.
14. Birnboim H. C. // Biochem. Cell Biol.— 1988.— Vol. 66, N 15.— P. 374—381.
15. Bruni G. // Carcinogenesis.— 1987.— Vol. 8, N 11.— P. 1645—1650.
16. Chiu S. M., Oleinick N. L., Friedman L. R., Stambrook P. J. // Biochim. biophys. Acta.— 1982.— Vol. 699, N 1.— P. 15—21.
17. Doolittle D. J., Muller G., Seribner H. F. // J. Toxicol. environ. Hlth.— 1987.— Vol. 22, N 1.— P. 63—78.
18. Gomes M., Castro J. A. // Toxicol. appl. Pharmacol.— 1980.— Vol. 56, N 2.— P. 199—206.
19. Hincks J. R., Coulombe R. A. // Environ. molec. Mutagenes.— 1989.— Vol. 13, N 3.— P. 211—217.
20. Matssura T., Ueyama H., Nakayasu H., Ueda K. // Cell Struct. Funct.— 1981.— Vol. 6, N 1.— P. 79—82.
21. Miller M. R., Chinault D. N. // J. biol. Chem.— 1982.— Vol. 257, N 17.— P. 10204—10209.
22. Vaca C. E., Vilhelm J., Harms-Rindahl M. // Mutat. Res.— 1988.— Vol. 195, N 2.— P. 137—150.

Поступила 15.05.90

MOLECULAR MECHANISMS OF TETRACHLOROMETHANE-IMPAIRING EFFECTS ON THE LIVER TISSUE FRACTIONATED CHROMATIN

Yu. I. Gubsky, E. L. Levitsky, V. A. Zhila, A. Ya. Litoshenko

Institute of Pharmacology and Toxicology, Ministry of Public Health of the Ukrainian SSR, Institute of Gerontology, Academy of Medical Sciences of the USSR, Kiev

Impairing effects of tetrachloromethane on genetic apparatus were shown to consist in its high affinity and binding to transcriptionally active fraction of chromatin and subsequent destruction of DNA. As a result of the impairment the density of the chromatin fraction was increased which expressed as elevated stability to hydrolysis by endogenous nucleases. At the same time, content of single-stranded structures enriched with proteins was increased in the DNA of the transcriptionally active fraction of chromatin. Two dissimilar properties were detected in the fraction of impaired chromatin from the poisoned animals: increase of density in the chromatin fraction accompanied by insensitivity to S_1 -nuclease, which was detected after denaturation of chromatin and slight relaxation of apparently supernucleosome structures where content of sites, sensitive to short-term treatment with DNAase I, was increased. The hypothesis of the tetrachloromethane toxic effect on genetic apparatus is considered, according to which lipid moiety of chromatin and activation of lipid peroxidation are of definite importance in effects of the xenobiotic on chromatin.

В. В. Саломатин, А. Г. Лютов, А. Л. Цытович, Т. М. Соболевская, Р. И. Лившиц

ВЛИЯНИЕ α -КИСЛОГО ГЛИКОПРОТЕИНА НА ОБМЕН ОКСИПРОЛИНА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ТЕРМИЧЕСКОЙ ТРАВМЕ

Челябинский медицинский институт, НПО «Иммунопрепарат», Уфа

α -1-Кислый гликопротеин (КГ) является типичным острофазовым белком плазмы. Синтез белка, осуществляемый гепатоцитами, лимфоцитами и моноцитами, многократно возрастает при остром воспалительном процессе, в том числе и вызванном ожоговой травмой [12]. Биологические функции белка остаются во многом неясными. Однако если исходить из его роли как регулятора воспаления, то можно полагать, что при обширных ожогах, когда заметное увеличение концентрации КГ в плазме происходит лишь на 3—4-е сутки после травмы [9, 10], первоначально имеет место дефицит белка, восполнение которого может положительно сказаться на развитии воспалительного процесса. И действительно, ранее в экспериментах на мышах нами было установлено, что введение КГ в первые 2 сут после ожоговой травмы приводит к ускорению заживления ожоговых ран, уменьшению частоты и тяжести раневой инфекции и некоторых других осложнений ожоговой болезни [6].

В настоящей работе с целью выяснения механизма лечебного действия КГ предпринято изучение его влияния на обмен оксипролина как показателя метаболизма соединительнотканной структур. Важность этого вопроса становится понятной, если учесть, что деструктивные и пролиферативные процессы в соединительной ткани во многом определяют течение раневого процесса.

Методика. Опыты проводили на белых беспородных крысах-самцах массой 180—220 г. Ожог IIIБ степени (13 % поверхности тела) наносили на эпилированную поверхность спинки под эфирным раши-наркозом облучением на установке для дозированного ожога с кварцево-галогенными лампами.

Использовали иммунохимически чистый КГ (≈ 99 % основного вещества), который выделяли из балластного осадка α - и β -глобулинов при получении альбумина человеческой плазмы «каприлатным» методом. Стадии отделения и очистки белка включали гель-фильтрацию на сефадексе G-25, сорбцию на ДЭАЭ-целлюлозе и хроматографию на КМ-целлюлозе, как описано ранее [4]. Чистоту препарата определяли иммуноэлектрофорезом в 1 % агаре с применением моноспецифической сыворотки, а концентрацию — в реакции радиальной иммунодиффузии. Белок вводили подкожным животным внутривенно в дозе 75 мг/кг в физиологическом растворе дважды сразу и спустя 14 ч после нанесения ожога. Контрольным животным в те же сроки и в том же объеме (1 мл) вводили физиологический раствор.

У животных с ожогами каждую неделю производили измерение общей и открытой ожоговой поверхности и рассчитывали в процентах эпителизацию и контрактуру ожоговой раны [13]. Через 18 ч, 3, 7 и 21 сут у животных из ретробульбарного венозного сплетения производили забор крови, которую стабилизировали ЭДТА (конечная концентрация 0,1 %). В плазме определяли свободный и пептидно-связанный оксипролин. Перед забором крови у животных собирали суточную мочу, в которой определяли общий (свободный и пептидно-связанный) оксипролин. Определение окси-