

## ВЛИЯНИЕ ФЕНОБАРБИТАЛА И ПОЛИХЛОРБИФЕНИЛОВ НА АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ, СОПРЯЖЕННЫХ С РЕГУЛЯЦИЕЙ АПОПТОЗА, МИТОТИЧЕСКИЙ РЕЖИМ И ФРАГМЕНТАЦИЮ ДНК КЛЕТОК ПЕЧЕНИ КРЫС

*Институт стоматологии АМН Украины*

В последние десятилетия в окружающей среде существенно возросло содержание индукторов биосинтеза цитохрома P450, проявляющих генотоксическую активность, увеличивающих риск дестабилизации генома и появления хромосомных aberrаций [1]. У ряда соединений такого рода была установлена канцерогенно-промоторная активность. К промоторам канцерогенеза относятся полихлорированные ароматические углеводороды, а также некоторые бициклические барбитураты (фенобарбитал и др.) [1; 2]. Как было установлено, данные соединения ингибируют апоптоз клеток и во многих случаях проявляют митогенную активность [1; 3; 4]. Известно, что полихлорированные ароматические углеводороды и, в меньшей степени, фенобарбитал являются лигандами Ah-рецепторов (aromatic hydrocarbon). Через их посредство осуществляется индукция биосинтеза соответствующих изоформ цитохрома P450. Комплекс Ah-рецептор — лиганд частично фосфорилируется протеинкиназой C (ПКС), приобретая митогенную активность [3]. С другой стороны, нами было выявлено, что данные соединения ингибируют ксантиноксидазу и синтазу оксида азота [4–6] — основ-

ные продуценты супероксидных радикалов и NO соответственно. В результате снижается активация протеинкиназы 1, регулирующей апоптогенный сигнал (ASK 1 — apoptosis signal-regulating kinase 1). Активация ASK 1 сводится к диссоциации фермента от тиоредоксина вследствие модификации реактивных тиоловых групп супероксидным радикалом и NO [7; 8].

Выдвигались предположения также о негативном воздействии этих соединений на митотический режим (МР) клеток, наиболее серьезными нарушениями которого являются патологические формы митозов — неправильное распределение хромосом и образование ядер с несбалансированным кариотипом [9].

Тем не менее, действие данных соединений на митотический режим клеток, активность поли-(АДФ-рибоза)-полимеразы (ПАРП, фермент репарации фрагментированной ДНК, расщепляющейся каспазами в ходе апоптоза клеток), протеинкиназы ASK 1 (индуцирует апоптогенный MAP-киназный каскад реакций, приводящий к активации p53 и AP-1), ПКС (группа серин/треониновых протеинкиназ, активирующих клеточное деление) и фрагментацию ДНК практически не изучено. Изучению этих во-

просов посвящена настоящая работа.

### Материалы и методы исследования

**Цитоморфологические исследования.** В экспериментах использовали крыс-самцов линии Вистар (5 мес, масса —  $200 \pm 20$  г), которых разделили на 4 группы по 5 животных. Крысы первой группы были интактными. Крысам второй группы в течение пяти суток вводили фенобарбитал дозой 5 мг/кг (водный раствор); животным третьей группы в течение двух суток вводили ДДЕ (основной метаболит ДДТ) дозой 10 мг/кг (раствор в персиковом масле). Животным четвертой группы — одновременно вводили фенобарбитал и ДДЕ (теми же дозами и в тех же условиях). Пероральные введения производили с интервалом в 24 ч. Через 24 ч после последнего введения крыс под эфирным наркозом декапитировали и изолировали у них печень. Кусочки печени фиксировали по Карнуа, парафинировали и готовили срезы толщиной 6 мкм. На срезах, окрашенных железным гематоксилином [10], изучали МР гепатоцитов. Исследование МР включало оценку следующих цитологических параметров: уровня митотической активности (МИ — ми-

тотический индекс, количество митозов на 1000 клеток), количества клеток, находящихся на различных стадиях митоза (%); относительного количества всех патологических митозов (ПМ) в % от общего количества делящихся клеток; относительного количества разновидностей ПМ (в % от их общего количества); величины метафазно-профазного индекса (МПИ — отношения количества метафаз к количеству профаз). Метафазный индекс (МИ) определяли путем подсчета всех находящихся в поле зрения микроскопа гепатоцитов, делящихся митозом при увеличении 90×10. Патологические митозы характеризовали в соответствии с морфологической классификацией [9], основу которой составляют нарушения физиологических и биохимических процессов, обеспечивающих нормальное протекание митоза. По данной классификации выделяют три типа митотической патологии: повреждение хромосом, нарушения митотического аппарата клетки и нарушения цитотомии.

**Биохимические исследования.** Изучали действие промоторов канцерогенеза — ДДТ и фенобарбитала на активность ПАРП, протеинкиназы ASK 1, ПКС и фрагментацию ДНК.

Влияние ДДТ на активность ПАРП, протеинкиназы ASK 1, ПКС и фрагментацию ДНК *in vivo* изучали на 10 однопометных самках крыс линии Вистар массой тела (100±20) г в возрасте 3 мес. Крыс разделили на две группы (по 5 животных), первой из которых (контрольная) ежедневно в течение 3 дней с интервалом в 24 ч внутрибрюшинно вводили по 0,2 мл персикового масла, а второй (опытная) — раствор ДДТ в персиковом масле из расчета 20 мг/кг массы тела по той же схеме. Через 120 мин после последней инъекции крыс декапитировали, изолировали печень, которую

гомогенизировали согласно требованиям соответствующих методик исследования.

Для изучения влияния фенобарбитала на активность ПАРП, протеинкиназы ASK 1, ПКС и фрагментацию ДНК использовали по 10 однопометных крыс-самок линии Вистар в возрасте 5 мес, массой (200±30) г. Животные первой группы (10) были контрольными и получали перорально по 0,2 мл дистиллированной воды. Животные второй группы (10) получали перорально суспензию фенобарбитала в дистиллированной воде из расчета 20 мг на 1 кг массы тела. Введение производили ежедневно в течение 30 дней с интервалом в 24 ч. Через 2 ч после последней инъекции крыс декапитировали и немедленно изолировали печень, которую гомогенизировали согласно требованиям соответствующих методик исследования.

Активность ПАРП определяли методом, основанным на электрофоретическом отделении поли-АДФ-рибозилированных белков с последующим определением количества поли-АДФ-рибозы в их составе [11].

Активность ASK 1 определяли по описанной ранее методике [12]. Гомогенат готовили на 0,02 М трис-НС1-буфере (рН 7,5), содержащем 150 мМ NaCl, 5 мМ ЭДТА и 1 мМ NH<sub>4</sub>VO<sub>3</sub>, центрифугировали 15 мин при 20 000 g и супернатант в количестве 0,1 мл вносили в реакционную систему, содержащую 2,7 мл инкубационной среды (0,02 М трис-НС1-буфер (рН 7,5), содержащий 20 мМ MgCl<sub>2</sub> и 0,3 мМ АТФ) и 0,2 мл раствора экзогенного субстрата — основного пептида миелина крупного рогатого скота, присоединенного к агарозе через спейсер-аспартат. Пробы инкубировали 30 мин при 37 °С, субстрат осаждали и определяли количество фосфатных групп в нем. Активность ASK 1 вы-

ражали в единицах, соответствующих количеству фосфатных групп, присоединенных к субстрату в течение 1 мин на 1 мг белка.

Активность ПКС определяли по методике [13], основанной на изменении направления движения в агарозном геле (движется к положительно заряженному электроду, вследствие приобретения кислых свойств после фосфорилирования) щелочным пептидным субстратом нейрогранином после фосфорилирования ПКС в нашей модификации, состоящей в том, что в опытах использовали 2%-й агарозный гель, приготовленный на 1 М трис-НС1 буфере.

Фрагментацию ДНК оценивали спектрофотометрическим методом [14]. Статистическую обработку результатов исследований проводили в соответствии с t-критерием Стьюдента.

#### Результаты исследования и их обсуждение

**Биохимические данные.** В печени крыс, получавших ДДТ, активность ПАРП была достоверно повышена (рис. 1, а). При этом уровень фрагментированной ДНК достоверно не изменялся (рис. 1, б). Активность ПКС была достоверно повышена (рис. 2, а), чему соответствовало снижение активности протеинкиназы ASK 1 (рис. 2, б).

Аналогичная картина — повышение активности ПАРП, ПКС и снижение активности ASK 1 — наблюдалась в печени животных, получавших фенобарбитал (см. рис. 1 и 2). Уровень фрагментированной ДНК в данном случае также достоверно не изменялся см. (рис. 1, б).

Активация ПКС свидетельствует об индукции клеточного деления. В данном случае активацию фермента можно объяснить, во-первых, взаимодействием агентов с Ah-рецепторами (субстрат ПКС), а,

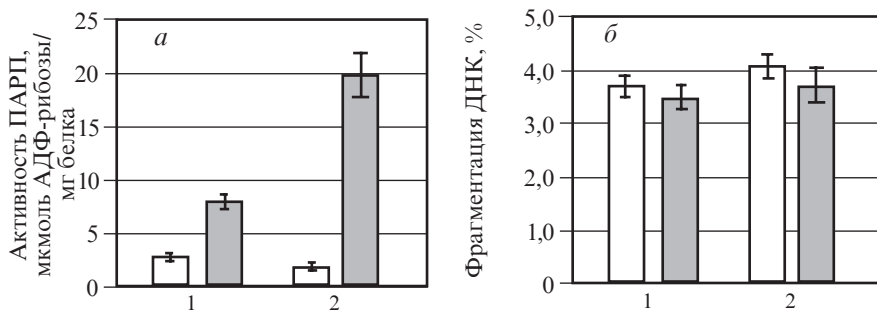


Рис. 1. Влияние ДДТ и фенобарбитала на активность ПАРП (а) и фрагментацию ДНК (б) в печени крыс.

Примечание. Для рис. 1 и 2: белые столбики — контроль, серые: 1 — ДДТ; 2 — фенобарбитал

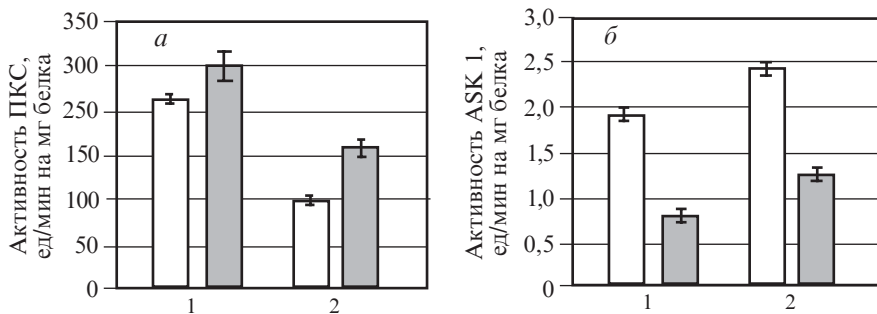


Рис. 2. Влияние ДДТ и фенобарбитала на активность ПКК (а) и ASK 1 (б) в печени крыс

во-вторых, — снижением образования непосредственного ингибитора ПКК оксида азота, так как ДДТ и фенобарбитал ингибируют синтазу NO. Тем не менее, индукция деления клеток, сопровождающаяся сокращением фазы S или G2 клеточного цикла, приводит к различным повреждениям и разрывам ДНК, репарируемым ПАРП, что объясняет активацию этого фермента в

печени крыс, получавших ДДТ и фенобарбитал. Несмотря на то, что повреждения ДНК репарируются, сокращение фазы G2 клеточного цикла приводит к различного рода нарушениям процессов сигнальной трансдукции, ответственных за подготовку к нормальному митотическому делению, в результате чего во много раз возрастает вероятность протекания митоза в па-

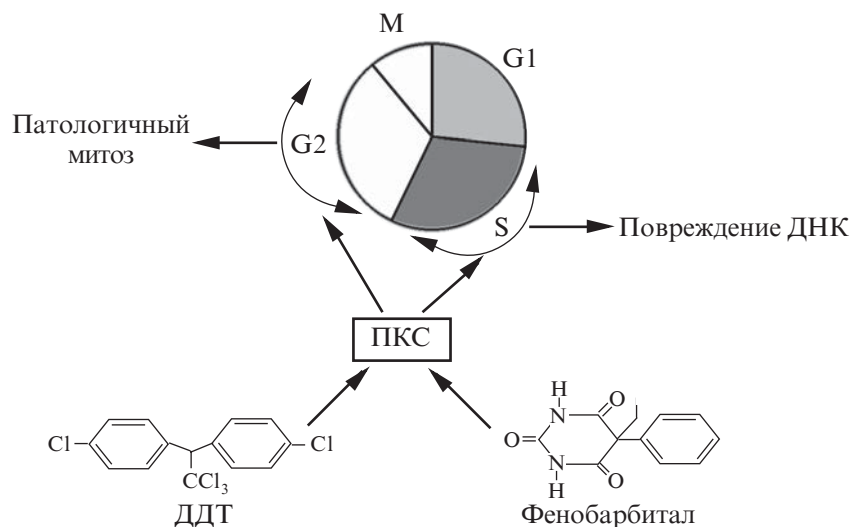


Рис. 3. Влияние ДДТ и фенобарбиталзависимой активации ПКК на клеточный цикл сокращение фазы цикла

тологической форме. В результате возникают различного рода нарушения МР клеток. Действие ДДТ и фенобарбиталзависимой активации ПКС на клеточный цикл отражено на схеме (рис. 3).

Ингибирование протеинкиназы ASK 1 скорее всего связано с ДДТ- и фенобарбиталзависимым подавлением образования активных форм кислорода и оксида азота, необходимых для активации ее путем диссоциации от тиоредоксина. Ингибирование активности данного фермента свидетельствует о торможении активности апоптогенного MAP-киназного каскада реакций, приводящих к активации главного апоптогенного белка p53 и AP-1.

#### Морфологические данные.

Из табл. 1 видно, что у крыс 2-й группы (введение фенобарбитала) МИ увеличился почти в 2 раза по сравнению с интактными крысами. Различные формы патологических митозов (ПМ) наблюдались у 35 % всех пролиферирующих клеток. Наблюдались также изменения количества клеток, находившихся в разных фазах деления. В результате метафазно-профазный индекс увеличился на 10 %. Только 10 % всех ПМ характеризовались повреждением хромосом, все остальные клетки были с нарушениями митотического аппарата. Из них 37 % составили клетки с колхициноподобным митозом (К-митоз) (табл. 2).

В 3-й группе крыс (введение ДДЕ) сдвиги МР гепатоцитов в целом напоминали таковые во 2-й группе животных, но выражены они были ярче. Так, МИ увеличился на 66 %, а величина МПИ — на 57 % относительно такового интактной группы крыс. Доля ПМ выросла до 43 % от общего количества пролиферирующих клеток. Количество клеток с повреждением митотического аппарата составило 93 %, из них клеток с К-митозом

Изменения митотического режима гепатоцитов крыс в контрольной и опытных группах

Группы крыс	МИ, %	Соотношение фаз митоза, %				Индекс метафаза/профаза	Число патологических митозов, %
		профаза	метафаза	анафаза	телофаза		
Интактные	0,44±0,06	25,6	35,7	16,8	21,9	1,43	1,6
Фенобарбитал	0,86±0,10 P<0,01	31,6	50,0	10,0	8,3	1,57	35,0
ДДЕ	0,73±0,08 P<0,01	22,2	50,0	16,6	11,1	2,25	43,0
Фенобарбитал + ДДЕ	1,18±0,11 P<0,001	21,2	53,1	12,8	13,0	2,47	45,0

Таблица 2

Формы и частота патологических митозов в гепатоцитах крыс, %

Формы патологических митозов	Группы крыс			
	1-я	2-я	3-я	4-я
<b>Патологические митозы с повреждением хромосом:</b>				
— отставание хромосом в метафазе	1,6	0	0	23,0
— мосты	0	3,3	2,85	2,3
— отставание хромосом в анафазе	0	0	0	2,3
— микроядра	0	0	0	3,0
Итого:	1,6	3,3	2,85	30,6
<b>Патологические митозы с повреждением митотического аппарата:</b>				
— К-митоз (комковатая метафаза и рассеивание гиперспирализованных хромосом)	0	11,6	28,5	6,6
— асимметричный митоз	0	1,6	0	3,3
— полая метафаза	0	3,3	2,85	2,2
— трехгрупповая метафаза	0	1,6	2,85	1,1
— моноцентрический митоз	0	0	0	1,1
— многополюсный митоз	0	0	2,85	0
— кольцевая метафаза	0	8,3	0	0
— рассеивание хромосом	0	5,0	2,85	0
Итого:	1,6	31,4	39,9	14,3

зом — 71 % от общего количества ПМ. Доля клеток с повреждением хромосом составила 7 %. У крыс 2-й и 3-й групп К-митоз оказался самой частой разновидностью атипических митозов. Эта форма патологии митоза существует в нескольких вариантах, но суть их сводится к задержке или блокаде деления в метафазе, возникающих вследствие дезорганизации структур митотического аппарата. В случаях, когда течение К-митоза приводит к рассеиванию хромосом исходом такого деления может быть образование тет-

раплоидных клеток и микроядер, не отрицается возможность появления и анеуплоидных клеток [15–17].

У крыс 4-й группы (сочетанное введение фенобарбитала и ДДЕ) изменения МР были максимально выраженными; МИ увеличился в 2,7 раза по сравнению с интактными животными. При этом 45 % всех пролиферирующих клеток имели различные формы патологии митоза. Заметно расширился и спектр ее разновидностей (9 форм против 6 в 3-й группе крыс). В результате роста количества метафаз

МПИ составил 173 % от уровня контроля. И, наконец, в отличие от 2-й и 3-й групп крыс, подавляющее количество атипических митозов (78 %) были с повреждением хромосом, из них 51 % приходился на долю клеток с отставанием хромосом в метафазе (рис. 4).

Согласно существующим представлениям, данная форма патологии митоза обусловлена повреждением кинетохора хромосомы, показано также, что исходом такого митотического деления является образование микроядер и анеуплоидных клеток [16; 18].



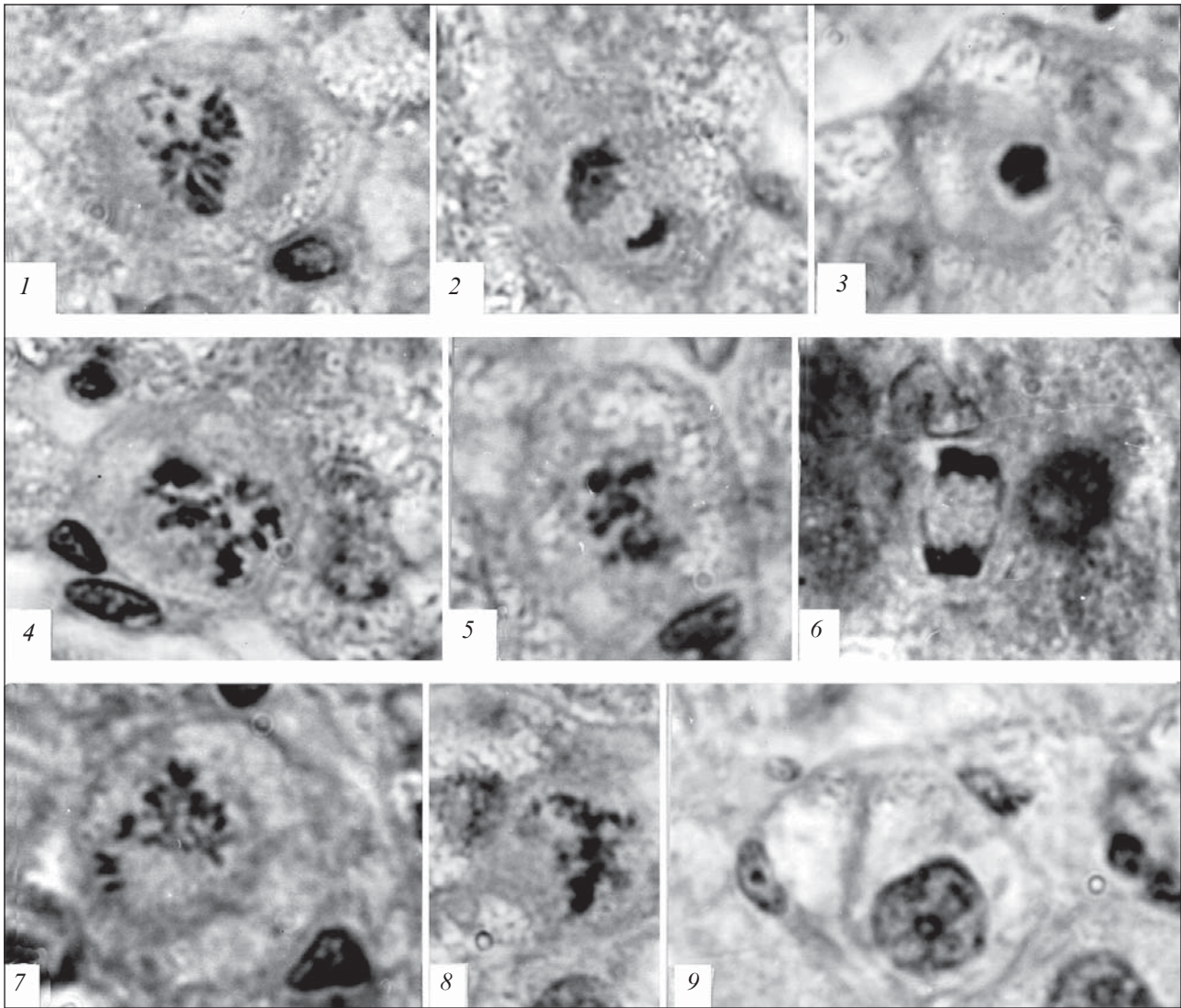


Рис. 4. Патологические митозы в гепатоцитах крыс: 1 и 7 — отставание хромосом в метафазе; 2 — асимметричный митоз; 3 — К-митоз, комковатая метафаза; 4 — К-митоз, рассеивание гиперспирализованных хромосом; 5 и 8 — трехгрупповая метафаза; 6 — хроматидный мост; 9 — дистрофические изменения гепатоцитов. Окраска железным гематоксилином. Ув. 90×10

### Выводы

Морфологические исследования показали, что нарушения МР, возникающие под влиянием фенобарбитала и ДДЕ — основного метаболита ДДТ, имеют черты сходства по большинству цитологических показателей. Это стимуляция пролиферации клеток, искажение нормальных соотношений фаз митоза, увеличение количества ПМ, преимущественное повреждение митотического аппарата делящейся клетки, но не хромосом. И, наконец, доминирующей формой патологии был К-митоз. На

наш взгляд, К-митоз не является основной причиной анеуплоидии клеток, к тому же некоторые его варианты, как например комковатая метафаза (см. 3 рис. 4), завершаются гибелью и элиминацией клетки [17]. Более того, в литературе встречаются ссылки на то, что большинство вариантов К-митоза являются «летальными» митозами [18].

При сочетанном введении фенобарбитала и ДДЕ наблюдается потенцирование негативных эффектов каждого из них на клеточный цикл и течение митоза. Наиболее существенными признаками нару-

шения МР гепатоцитов при этом были максимальное увеличение количества и спектра разновидностей аномально делящихся клеток, а также преобладание среди них митозов с повреждением хромосом. Комплекс перечисленных признаков представляет наибольшую опасность для стабильности генома клетки. И, наконец, в условиях торможения механизма апоптоза, обусловленного ингибированием протеинкиназы ASK 1, что показано в наших исследованиях, вероятность нарушения генетического «гомеостаза» существенно возрастает.

В целом результаты представленного исследования подтверждают ранее выдвинутое положение [2] о возрастании риска нарушений МР и канцерогенеза для лекарственных веществ, метаболизируемых при участии оксигеназ в регионах с загрязнением экотоксикантами — индукторами цитохромов P450.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Кобляков В. А. Индукторы суперсемейства цитохрома P450 как промоторы канцерогенеза // Биохимия. — 1998. — 63, № 8. — С. 1043-1059.
2. Voskresensky O. N., Voskresenskaya E. B. Problem of farmacovigilance: the significance of xenobiotics structure-activity relationships // Фармакол. вісник. — 1997. — № 5. — С. 36-42.
3. Различные пути передачи митогенного и индуцирующего сигналов индукторами цитохрома P450 / Е. Л. Гужаева, Н. М. Осташкина, В. Ф. Кондаленко, В. А. Кобляков // Биохимия. — 1999. — Vol. 64. — С. 1105-1109.
4. Sumbayev V. V. The in vitro effects of corticosteroids, DDT and 4,9-dichlorodibenzodioxin on rat liver xanthine oxidase activity. The interactions between xanthine oxidase and cytochrome P450 in rat liver in vivo // Biochemistry (M). — 2000. — Vol. 65, N 8. — P. 972-975.
5. Сумбаев В. В., Ясинская И. М. Влияние ДДТ на активность синтазы оксида азота в печени, легких и головном мозге крыс // Современные проблемы токсикологии. — 2000. — Т. 3, N 3. — С. 3-7.
6. Сумбаев В. В. Значение коррекции активности ксантиноксидазы и синтазы оксида азота в регуляции клеточного деления и апоптоза // Растительные адаптогены / Под ред. А. П. Левицкого и О. Н. Воскресенского. — Одесса: Астропринт, 2000. — С. 22-28.
7. Finkel T. Redox-dependent signal transduction // FEBS Lett. — 2000. — Vol. 476. — P. 52-54.
8. Mammalian thioredoxin is a direct inhibitor of apoptosis signal-regulating kinase (ASK) 1 / M. Saitoh, H. Nishitoh, M. Fujii et al. // EMBO J. — 1998. — Vol. 17. — P. 2596-2606.
9. Алов И. А. Морфологические и прикладные аспекты патологии митоза // Архив патологии. — 1975. — № 12. — С. 3.
10. Меркулов Р. А. Курс патогистологической техники. — Л., 1969. — 423 с.
11. Sumbayev V. V., Yasinskaya I. M., Rozanov A. Y. New effective method for poly-(ADP-ribose)-polymerase (PARP) activity detection // Biochem. Soc. Trans. — 2000. — 28, N 5. — P. 335.
12. Сумбаев В. В. Активность протеинкиназы 1, регулирующей апоптогенный сигнал, поли-(АДФ-рибоза)-полимеразы и межнуклеосомная фрагментация ДНК в печени крыс в условиях оксидативного стресса, вызванного хлоридом кобальта // Бюл. эксперим. биол. мед. — 2001. — Т. 131, N 2. — С. 148-149.
13. Uchida N., Okamura S., Kuwano S. Protein kinase C activity in human gastric carcinoma // Oncol. Rep. — 2000. — Vol. 7. — P. 793-796.
14. Galitovsky V. E., Gogvadze V. G. Inhibitors of mitochondrial energy production prevent DNA internucleosomal fragmentation in thymocytes // Biochemistry (M). — 1998. — Vol. 63. — P. 1374-1378.
15. Алов И. А. Цитофизиология и патология митоза. — М.: Медицина, 1972. — 264 с.
16. Платонова Р. Н., Сахаров В. В., Ольховенко В. П. Мутационные последствия колхицина // Генетика. — 1968. — Т. 4, № 10. — С. 5.
17. Казанцева И. А. Патология митоза в опухолях человека. — Новосибирск: Наука, 1981. — 144 с.
18. Модяев В. П., Зобнина М. Н., Дикович М. Ф. Содержание ДНК ядер и митотический режим клеток в диагностике лучевого патоморфоза опухолей // Архив патологии. — 1991. — № 8. — С. 14-16.

УДК 577.152.173.16

И. Н. Моисеев, О. Н. Воскресенский, В. В. Сумбаев, С. Д. Сердюк, А. П. Левицкий, Е. К. Ткаченко

**ВЛИЯНИЕ ФЕНОБАРБИТАЛА И ПОЛИХЛОРБИФЕНИЛОВ НА АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ, СОПРЯЖЕННЫХ С РЕГУЛЯЦИЕЙ АПОПТОЗА, МИТОТИЧЕСКИЙ РЕЖИМ И ФРАГМЕНТАЦИЮ ДНК КЛЕТОК ПЕЧЕНИ КРЫС**

Изучено действие фенобарбитала и промоторов канцерогенеза — ДДТ и ДДЕ — на активность ферментов, регулирующих апоптогенный сигнал, митотический режим (МР) и фрагментацию ДНК клеток печени крыс. Установлено достоверное повышение активности ПАРП и ПКС, а также существенное снижение активности протеинкиназы ASK 1 под влиянием ДДТ и фенобарбитала в печени крыс. Уровень фрагментированной ДНК при этом существенно не изменялся. Цитоморфологические исследования выявили аналогичные нарушения митотического режима клеток под влиянием фенобарбитала и ДДЕ — основного метаболита ДДТ, выразившиеся в стимуляции пролиферации клеток, искажении нормальных соотношений фаз митоза, росте числа патологических митозов и повреждениях митотического аппарата делящейся клетки, но не хромосом.

**Ключевые слова:** ДДТ, ДДЕ, фенобарбитал, ферменты апоптоза, митотический режим, геном клетки.

UDC 577.152.173.16

I. N. Moiseev, O. N. Voskresensky, V. V. Sumbayev, S. D. Serdyuk, A. P. Levitsky, E. K. Tkatchenko

**PHENOBARBITAL AND POLYCHLORBIPHENYLES EFFECT ON ACTIVITY OF ENZYMES ATTENDED WITH APOPTOSIS REGULATION, MITOTIC REGIME AND FRAGMENTATION OF DNA OF RATS HEPATOCYTES**

The effect of phenobarbital and cancerogenesis promoters DDT and DDE on activity of enzymes, which are regulating apoptogenic signal, mitotic regime and fragmentation of DNA of rats hepatocytes was studied. Authentic increasing of poly-(ADP-ribose)-polymerase and protein kinase C activities and decreasing of apoptosis signal-regulating kinase under the effect of DDT and phenobarbital in rats liver were observed. The level of fragmentation of DNA had no essential changes. Cytomorphological studies revealed analogous violations of mitotic regime of cells under effect of phenobarbital and DDE (the principal DDT metabolite), which were expressed in stimulation of cell proliferation, distortion of normal alignments of mitotic phases, increasing of number of pathologic mitoses and alterations of mitotic apparatus of dividing cell, except of chromosomes.

**Key words:** DDT, DDE, phenobarbital, apoptosis enzymes, mitotic regime, genome.