

Ю. И. Губский, Е. Л. Левицкий, Р. Г. Примак,
А. Г. Горюшко, Л. К. Ленчевская, И. Е. Вистунова, Л. Г. Саченко

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ПОВРЕЖДЕНИЯ ХРОМАТИНА ПЕЧЕНИ ХЛОРОФОСОМ В УСЛОВИЯХ ВВЕДЕНИЯ ВЕРАПАМИЛА И АТРОПИНА

Кратковременная (2 ч) экспозиция крыс в условиях воздействия хлорофоса вызывает изменение структурных и функциональных характеристик фракций транскрипционно активного и репрессированного хроматина печени. Повреждения хроматина обнаружены в его ДНК- и липидной составляющих. В хроматине отравленных животных наблюдается компактизация ДНК в активной фракции и релаксация — в низкоактивной. Изменения структуры липидной матрицы хроматина в процессе интоксикации носят аналогичный характер. Кроме того, отравление хлорофосом приводит к модификации скорости реакций индуцированного НАДФН и аскорбатом липопероокисления. Профилактическое введение верапамила и атропина лишь частично корректирует влияние на структурные и функциональные свойства хроматина печени интоксцированных животных, намного более выраженное в случае атропина. Воздействие атропина на хроматин носит, скорее всего, опосредованный характер, верапамил же непосредственно взаимодействует с ДНК хроматина, особенно в низкоактивной фракции последнего.

Введение. В настоящее время актуальной является проблема защиты ядерного генетического аппарата клетки от повреждающего воздействия неблагоприятных экологических факторов [1, 2]. Значительное место среди последних занимают фосфорорганические соединения (ФОС), типичный представитель которых — пестицидный препарат хлорофос. Основным механизмом токсического действия хлорофоса и других ФОС является блокада ацетилхолинэстеразы, в результате чего происходит накопление ацетилхолина, обуславливающего типичную клиническую картину отравления [3]. К побочным эффектам отравления ФОС можно отнести и повреждения ядерного генома, о чем свидетельствуют немногочисленные работы [3, 4]. Подобные повреждения представляют собой один из примеров отдаленных последствий интоксикации ФОС [3]. Предполагается, что в результате отравления нарушается внутриклеточный метаболизм ионов кальция, что способствует началу токсического процесса [5, 6], включая и его генотоксическую составляющую [7].

Учитывая вышеизложенное, в настоящей работе изучали структурно-функциональные свойства фракций транскрипционно активного (ТАХ) и репрессированного (РХ) хроматина печени крыс при отравлении хлорофосом. Для возможной коррекции молекулярных повреждений хроматина, вызванных хлорофосом, животным вводили атропин, являющийся основным антидотом, используемым в случае отравления этим веществом [3]. При этом исходили из вероятности наличия у этого соединения определенных генопротекторных свойств. В качестве другого потенциального генопротекторного средства использовали блокатор кальциевых каналов верапамил, применяемый для нормализации внутриклеточного обмена кальция [8].

Материалы и методы. В работе использовали крыс — самок линии Вистар 3-месячного возраста (150—200 г). Хлорофос вводили внутримышечно в дозе 260 мг на 1 кг массы тела. Длительность интоксикации составляла 2 ч. Для изучения генопротекторных свойств верапамила и атропина их вводили животным в дозах 1,25 и 5 мг/кг массы тела за 1 ч и 30 мин до начала интоксикации хлорофосом соответственно. Первый препарат вводили внутривентриально, второй — внутримышечно. Животных декапитировали в утренние часы под легким эфирным наркозом. Методы выделения фракций ТАХ и РХ, анализа их структурно-функциональной организации, а также процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) в них описаны ранее [9—11]. Собствен-

© Ю. И. Губский, Е. Л. Левицкий, Р. Г. Примак, А. Г. Горюшко, Л. К. Ленчевская,
И. Е. Вистунова, Л. Г. Саченко, 1993

ную флуоресценцию препаратов фракций хроматина изучали в диапазоне 300—400 нм, регистрируя интенсивность спектральной линии 310 нм. Состоящие липидного компонента в хроматине оценивали с помощью флуоресцентного зонда пирена («Serva», Германия, $5 \cdot 10^{-6}$ М) по степени его эксимеризации — соотношения интенсивности флуоресценции эксимерной (470 нм) и мономерной (392 нм) форм. Флуоресцентные измерения проводили на спектрофлюориметре «Hitachi MPF-4» (Япония) при температуре 20 °С. Спектры поглощения растворов верапамила и фракций РХ и ТАХ в $0,01 \times \text{SSC}$ изучали в области 230—310 нм с помощью спектрофотометра «Shimadzu MPS-5000» (Япония) в кювете с длиной оптического пути 1 см при 20 °С. Результаты эксперимента обрабатывали методами непараметрической статистики [12].

Результаты и обсуждение. Фракции ТАХ и РХ печени интактных крыс характеризуются определенным уровнем спонтанного и индуцированного перекисного окисления входящих в их состав липидов [13]. В условиях постановки данных экспериментов отравление животных хлорофосом приводит к выраженным сдвигам этого уровня (табл. 1). Величины спонтанного ПОЛ, оцениваемого по содержанию дисновых конъюгатов, изменяются в гептановом и изопропанольном слоях липидного экстракта под влиянием интоксикации и введения фармакологических препаратов. Отравление хлорофосом вызывает снижение уровня ПОЛ в гептановом слое в РХ и его увеличение в изопропанольном экстракте в ТАХ. Введение верапамила приводит к снижению содержания продуктов ПОЛ в гептановом и изопропанольном экстрактах в РХ по сравнению с опытом (хлорофос) и контролем соответственно. Во фракции ТАХ наблюдается частичная нормализация величины ПОЛ. Ана-

Таблица 1

Интенсивность реакций ПОЛ во фракциях хроматина печени крыс при интоксикации хлорофосом и введении верапамила и атропина ($n=7-8$)

Показатель ПОЛ	РХ			
	Контроль	Хлорофос	Хлорофос+ +верапамил	Хлорофос+ +атропин
Дисновые конъюгаты (нмоль/мг белка)				
Гептановый слой	57,8	24,7*	17,0*	26,2*
Изопропанольный слой	98,8	112,2	39,6*	8,6**
Накопление малонового диальдегида (нмоль/мг белка за 2 ч)				
НЗП	1620,2	1470,9	1722,4	550,1**
НЗП'	155,2	184,0	85,5	74,3*
АЗП	515,9	550,2	588,9	175,6*
Пенициллированный контроль	313,1	302,1	249,9	189,5

Показатель ПОЛ	ТАХ			
	Контроль	Хлорофос	Хлорофос+ +верапамил	Хлорофос+ +атропин
Дисновые конъюгаты (нмоль/мг белка)				
Гептановый слой	20,8	23,9	28,3	46,7*
Изопропанольный слой	64,8	138,2*	92,1	101,9
Накопление малонового диальдегида (нмоль/мг белка за 2 ч)				
НЗП	545,4	616,7	885,8	277,1*
НЗП'	30,2	12,9*	212,9*	17,9
АЗП	100,1	81,6	214,3*	55,6*
Пенициллированный контроль	30,5	64,6	33,2	0**

Примечание. НЗП — индуцированное НАДФН ПОЛ; НЗП' — его составляющая, зависящая от нагревания; АЗП — индуцированное аскорбатом ПОЛ; значения индуцированного ПОЛ получены путем вычитания из соответствующих величин значений пенициллированного контроля. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ (по сравнению с контролем).

логичная картина обнаружена в случае введения атропина. При этом дополнительно выявлен прооксидантный эффект при введении препарата в гептановом слое ТАХ.

При анализе величин индуцированного НАДФ и аскорбатом ПОЛ (оцениваемых по накоплению малонового диальдегида) во фракциях РХ и ТАХ обнаружено следующее. Введение яда вызывает снижение зависимой от нагревания составляющей НЗП во фракции ТАХ. Следствием введения верапамила является снижение по сравнению с контролем величин НАДФН-ПОЛ в РХ. Во фракции ТАХ наблюдается противоположный эффект. После введения атропина обнаружен ярко выраженный антиоксидантный эффект по отношению к контрольным значениям в обеих фракциях хроматина для всех видов индуцированного ПОЛ.

Таким образом, в результате проведенных исследований отмечены неоднозначные изменения в интенсивности реакций ПОЛ в РХ и ТАХ при отравлении животных хлорофосом, что может быть связано с нарушением структуры липидной матрицы хроматина под влиянием интоксикации. Испытанные фармакологические препараты оказывают различное влияние на модифицированные вследствие интоксикации процессы ПОЛ в хроматине. Введение верапамила стимулирует антиоксидантное действие в случае спонтанного ПОЛ в РХ и нормализующее — в ТАХ. При индукции ПОЛ НАДФН и аскорбатом наблюдается прооксидантный эффект в ТАХ. С введением атропина в большинстве случаев обнаружен ярко выраженный антиоксидантный эффект в обеих фракциях хроматина.

Интоксикация животных хлорофосом вызывает определенные нарушения в структурно-функциональной организации фракций РХ и ТАХ. Предположение об изменении липидной матрицы хроматина под влиянием интоксикации подтверждается данными экспериментов с использованием флуоресцентного зонда пирена (табл. 2). Отравление крыс хлорофосом приводит к возрастанию степени эксимеризации пирена в РХ, что свидетельствует об уменьшении микровязкости липидного компонента, и снижению эксимеризации в ТАХ, что соответствует повышению в нем микровязкости липидного компонента. С введением верапамила происходит дальнейшее «разжижение» липидного матрикса в случаях РХ и нормализация данного показателя в случае введения атропина. В ТАХ оба фармакологических препарата оказывают нормализующее влияние на структурное состояние липидного бислоя. Таким образом, введение атропина по сравнению с верапамилем в целом оказывает более выраженное корригирующее действие на структурную организацию липидного компонента хроматина, что не противоречит результатам экспериментов по определению интенсивности ПОЛ (см. табл. 1).

Организация белкового компонента фракций хроматина не претерпевает сколько-нибудь существенного изменения при интоксикации

Таблица 2

Физико-химические характеристики фракций хроматина печени крыс при интоксикации хлорофосом и введении верапамила и атропина ($n=6$)

Спектральный показатель	Длина волны возбуждения, нм	Отношение величины спектрального показателя к контрольному значению					
		РХ			ТАХ		
		Хлорофос	Хлорофос+верапамил	Хлорофос+атропин	Хлорофос	Хлорофос+верапамил	Хлорофос+атропин
Интенсивность белковой флуоресценции	280	0,97	0,99	1,16	0,96	1,02	0,99
Степень эксимеризации пирена (F_{470}/F_{394})	340	1,18*	1,33*	0,94	0,79*	1,0	0,80

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ (по сравнению с контролем).

хлорофосом, что доказывается данными собственной белковой флуоресценции РХ и ТАХ (см. табл. 2), а также отношением белок/ДНК в этих фракциях (табл. 3). Введение верапамила и атропина также существенно не влияет на данные показатели.

Тем не менее, под действием хлорофоса изменяется функционирование хроматина, что находит свое выражение в модификации эндогенного синтеза ДНК и РНК (см. табл. 3). Во фракции РХ наблюдается падение активности эндогенных РНК-полимеразы I, соответствующее увеличению доли РХ при интоксикации, и ДНК-полимеразы β , что коррелирует со снижением синтеза ДНК в условиях *in vivo* (табл. 4). Введение верапамила лишь незначительно изменяет активность второ-

Таблица 3

Биохимические характеристики фракционированного хроматина печени крыс при интоксикации хлорофосом и введении верапамила и атропина ($n=7-8$)

Показатель	РХ			
	Контроль	Хлорофос	Хлорофос+ +верапамил	Хлорофос+ +атропин
Доля фракции (%)	88,5	91,6*	91,8*	87,7
Отношение белок/ДНК	1,43	1,39	1,46	1,35
Активность эндогенных ферментов (расп/мин на 1 мг ДНК)				
Тотальная ДНК-полимеразная	1189376	881146	1151148	949148
ДНК-полимеразы α	724553	634360	867477	829746
ДНК-полимеразы β	507379	246787*	283671	119486*
Тотальная РНК-полимеразная	111865	97183	174205	298422*
РНК-полимеразы I	40719	28728*	93613*	45614
РНК-полимеразы II	71146	68455	80592	252808*

Показатель	ТАХ			
	Контроль	Хлорофос	Хлорофос+ +верапамил	Хлорофос+ +атропин
Доля фракции (%)	11,5	8,4*	8,2*	13,3
Отношение белок/ДНК	11,51	11,46	12,1	12,1
Активность эндогенных ферментов (расп/мин на 1 мг ДНК)				
Тотальная ДНК-полимеразная	758483	608262	528847	672050
ДНК-полимеразы α	441095	311390	363007	615955
ДНК-полимеразы β	246388	296871	165828	8033**
Тотальная РНК-полимеразная	812780	719700	674820	1401300**
РНК-полимеразы I	497178	511934	330170	770272
РНК-полимеразы II	315602	207776	344650	631028*

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ (по сравнению с контролем).

Таблица 4

Степень ферментативного расщепления (% от контроля) ^3H -ДНК фракций хроматина печени контрольных и интоксигированных хлорофосом крыс ($n=3$)

Условия ферментативной обработки	РХ		ТАХ	
	Контроль	Хлорофос	Контроль	Хлорофос
ДНКазы I				
5 мин, 21 °С	0	34,3*	10,5	0*
15 мин, 37 °С	0	9,9*	37,5	33,9
S1-нуклеаза				
без денатурации	0	0	32,7	6,2*
7 мин, 100 °С	15,2(41779)	37,6*(18846*)	79,7(19795)	18,1*(17852)

Примечание. В скобках даны значения удельной радиоактивности ДНК, на основании которых рассчитывали степень ферментативного расщепления. * $p < 0,05$.

го фермента в сторону контроля, резко повышая активность первого фермента в этой фракции хроматина. Инъекция атропина интоксцированным животным сильно снижает активность репаративной ДНК-полимеразы β , а также повышает активность РНК-полимеразы II в обеих фракциях хроматина. Под влиянием отравления хлорофосом наблюдается достоверное увеличение доли РХ и соответственно снижение ТАХ. Введение верапамила не приводит к изменениям этого показате-

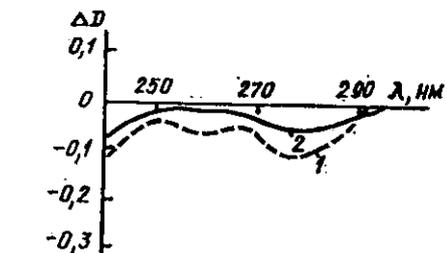
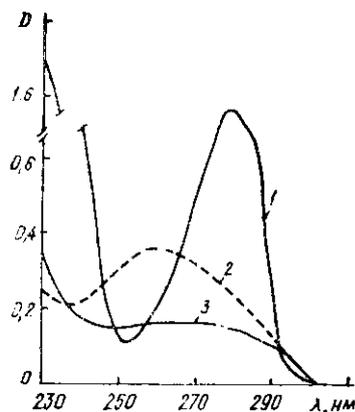


Рис. 2. Дифференциальные спектры поглощения верапамила при взаимодействии с РХ (1) и ТАХ (2)

Рис. 1. Спектры поглощения верапамила (1), РХ (2) и ТАХ (3)

ля, тогда как атропин восстанавливает соотношения РХ и ТАХ до уровня контрольных значений.

Таким образом, введение данных фармакологических препаратов имеет лишь частичное корригирующее влияние на функционирование хроматина в условиях интоксикации хлорофосом.

Отсутствие значительных изменений белкового компонента хроматина при интоксикации хлорофосом в условиях измененного функционирования аппаратов репликации и транскрипции позволяет предположить наличие структурных изменений ДНК-матрицы. Правильность подобного предположения подтверждается результатами экспериментов по определению степени расщепления ДНК РХ и ТАХ печени интактных и интоксцированных животных ДНКазой I и S1-нуклеазой (см. табл. 4).

При отравлении наблюдается заметная компактизация структуры ДНК ТАХ и ее релаксация в РХ. Аналогичные изменения вызывает хлорофос и в структуре липидной составляющей хроматина (см. табл. 2). Наличие подобной связи делает возможным присутствие определенным образом оформленных ДНК-липидных комплексов в составе хроматина, чувствительных к повреждающему воздействию факторов, генерируемых интоксикацией хлорофосом.

Касаясь механизмов частичного корригирующего влияния верапамила и атропина на структурную организацию и функционирование хроматина в условиях хлорофосной интоксикации, необходимо учитывать вероятность как опосредованного влияния этих препаратов на хроматин через различные метаболические пути, так и их непосредственное взаимодействие с хроматином. Принимая во внимание хорошо известный механизм действия атропина как антагониста ацетилхолина [8], трудно ожидать сколько-нибудь ощутимого эффекта в результате его непосредственного взаимодействия с хроматином. Скорее всего, в данном случае ярко выраженный антиоксидантный эффект атропина и другие аспекты его действия на хроматин носят опосредованный характер. Что касается верапамила, то зная о случаях непосредственного взаимодействия этого вещества с биомембранами [14], можно ожидать подобного эффекта и по отношению к хроматину. Для проверки этого предположения было изучено возможное взаимодействие верапамила с фракциями РХ и ТАХ в SSC-буфере спектрофотометрическим методом в области энергетических переходов $\pi-\pi^*$ (230 нм, $\epsilon=13\ 500$)

и $n-\pi^*$ (278 нм, $\epsilon=5300$), обусловленных присутствием ароматических колец, содержащих OSN_3 -заместители в молекуле верапамила (рис. 1, кривая 1). В данной области наблюдаются также полосы поглощения белковых и ДНК-хромофоров хроматина (рис. 1, кривые 2 и 3). Осуществлено спектрофотометрическое титрование верапамином суспензий фракций нативного хроматина (концентрация РХ по белку 0,031 мг/мл, фракции ТАХ — 0,014 мг/мл). Как можно видеть из рис. 2, в области 240—310 нм изменения оптической плотности $\Delta D_\lambda = D_{\lambda^{x+b}} - D_{\lambda^b}$ (где D_{λ^b} и $D_{\lambda^{x+b}}$ — оптическая плотность верапамила и его смеси с хроматином соответственно) наблюдаются в максимумах поглощения верапамила 278 нм и хроматина 260 нм (в случае РХ — кривая 1), что указывает на изменения как в электронной структуре молекулы верапамила, так и в РХ. Для ТАХ (кривая 2) наблюдаемые изменения менее выражены. На рис. 3 приведены зависимости величин оптической плотности от концентрации верапамила на длинах волн, соответствующих максимумам полос поглощения верапамила (230 и 278 нм) и хроматина (260 нм). Из данных рисунка следует, что в условиях эксперимента ($0,01 \times SSC$) при концентрации верапамила выше 10^{-4} моль/л наблюдается отклонение от линейной зависимости

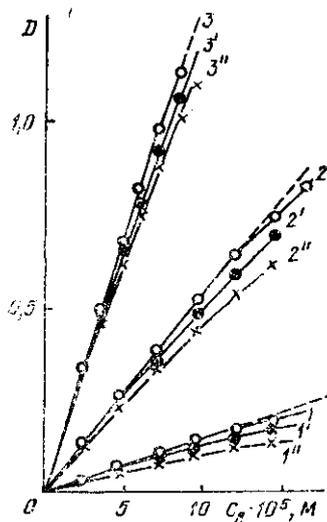


Рис. 3. Зависимость оптической плотности верапамила на длинах волн 260 (1), 278 (2), и 320 нм (3) от его концентрации в растворе $0,01 \times SSC$ без (1—3) и в присутствии фракций ТАХ (1'—3') и РХ (1''—3''). Концентрация хроматина по белку: $C_{ДНК} = 14,0$ мкг/мл; $C_{РХ} = 31,0$ мкг/мл.

ти оптической плотности (кривые 1—3), вероятно, указывающее на процессы самоассоциации верапамила в растворе, изменение состояния молекулы либо структуры раствора. В присутствии РХ и ТАХ отмечается гипохромный эффект (рис. 3, кривые 1'—3' и 1''—3''), свидетельствующий о включении верапамила в межмолекулярное взаимодействие. Наиболее выражен гипохромизм в присутствии фракции РХ. Надо полагать, что данный эффект обусловлен связыванием верапамила с функциональными группами ДНК, так как наибольшие изменения относительной интенсивности полос поглощения имеют место при 260 нм, то есть в максимуме полосы поглощения хроматина, обусловленной преимущественно хромофорами ДНК. Значительно меньшие изменения ΔD_{260} в присутствии фракции ТАХ связаны, по-видимому, с меньшим содержанием ДНК ($C_{ДНК РХ} = 2,5 \cdot 10^{-2}$ мг/мл; $C_{ДНК ТАХ} = 8,4 \cdot 10^{-3}$ мг/мл). По данным спектрофотометрического титрования графическим методом [15] была оценена величина эффективной константы равновесия K_p взаимодействия верапамила с РХ, равная $(1,5 \pm 0,5) \cdot 10^3$ моль/л. Порядок величины K_p может указывать на образование молекулярного комплекса с Н-связью, что в нейтральной среде возможно благодаря участию электронодонорских OSN_3 -групп при двух фенольных кольцах в молекуле верапамила (определено число мест связывания, равное ~ 2). Возможно также и «стекинг»-взаимодействие фенольных колец с делокализованными электронами верапамила и гетероциклических оснований ДНК. Наблюдаемые изменения ΔD_λ верапамила в присутствии ТАХ невелики, находятся в пределах ошибки эксперимента и недостаточны для определения K_p .

Таким образом, результаты проведенной работы показывают, что верапамил помимо возможного опосредованного влияния на хроматин через Са-мембранные механизмы непосредственно взаимодействует с ДНК, ухудшая в целом функционирование ядерного генома в условиях хлорофосной интоксикации. Данный вывод, полученный на основании

биохимических и физико-химических экспериментов, подтверждается определенном доле погибших животных через 2 ч после отравления хлорофосом без и с профилактическим введением фармакологических препаратов. Если при введении только хлорофоса доля гибели составляет 42,0 %, то при совместном введении верапамила и хлорофоса — 50,4 %, а атропина и хлорофоса — 3,9 %. Возможно, что ярко выраженный антиоксидантный эффект в отношении процесса ПОСЛ хроматина при введении атропина в какой-то мере связан со снижением гибели животных в результате хлорофосной интоксикации. Что касается верапамила, то обнаруженное в данном случае усиление генотоксического действия хлорофоса этим фармакологическим препаратом, по всей вероятности, обусловлено сенсбилизацией ДНК хроматина вследствие ее взаимодействия с верапамилом. Аналогичные эффекты, по-видимому, определяют усиление верапамиллом повреждения ДНК опухолевых клеток антибластическими антибиотиками доксорубицином [16] и блеомицином [17]. Для более полного выяснения механизмов влияния изученных в настоящей работе веществ на ядерный хроматин необходимы дальнейшие исследования.

Резюме. Внаслідок короткочасної (2 год) експозиції щурів в умовах впливу хлорофосу відбувається зміна структурових та функціональних характеристик фракцій транскрипційно активного та репресованого хроматину печінки. Пошкодження виявлено у ДНК- та ліпідній складових хроматину. У хроматині отруєних тварин виявлено компактизацію ДНК в активній фракції та релаксацію у низькоактивній. Структурові зміни ліпідної матриці хроматину у процесі інтоксикації мають аналогічну спрямованість. Крім того, отруєння хлорофосом спричиняє модифікацію інтенсивності реакцій спонтанного та індукваного НАДФН та аскорбатом ліпидпероксилення. Профілактичне введення верапамілу та атропіну лише частково коригує вплив на структурові та функціональні властивості хроматину печінки інтоксикованих тварин, який набагато виразніший в разі атропіну. Вплив атропіну на хроматин, скоріш за все, є непрямим, верапаміл же безпосередньо взаємодіє з ДНК хроматину, особливо в низькоактивній фракції останнього.

Summary. Short time exposition of rats (2 h) with chlorophose result in change of structural and functional characteristics of transcriptionally active and repressed liver chromatin fractions. Chromatin damages discovered in its DNA and lipid components. It has been shown DNA compactization in active chromatin fraction and relaxation in repressed one. Lipid component of chromatin was changed analogically during intoxication. As well chlorophose intoxication result in modification of intensity of induced by NADPH and ascorbate chromatin lipid peroxidation. Prophylactic introduction of verapamil and atropin has a partial corrective influence on structural and functional properties of intoxicated liver chromatin. Atropin has more expressed effect in this case. It has been shown direct interaction of verapamil to repressed chromatin fraction.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Кордюм В. А. Проблема выживания: от кратковременного пребывания к постоянному пребыванию в экстремальных условиях // Биополимеры и клетка.— 1992. — 8, № 2.— С. 3—36.
2. Кордюм В. А. Генная терапия возможна, но успеем ли? // Там же.— 1991.— 7, № 2.— С. 25—72.
3. Каган Ю. С. Общая токсикология пестицидов.— Киев: Здоров'я, 1981.— 176 с.
4. Moore R. A., Doebler J. A., Shih T. M. et al. Nuclear chromatin changes in hepatocytes of soman treated rats // Toxicology.— 1984.— 34, N 2.— P. 99—108.
5. Губський Ю. И. Коррекция химического поражения печени.— Киев: Здоров'я, 1989.— 168 с.
6. Литвинова Н. В., Курська Н. М., Губський Ю. І. Біохімічні механізми пошкодження внутрішньоклітинних мембран печінки та міокарда за умов отруєння хлорофосом // Укр. біохім. з'їзд.— К.: Вид-во УСГА, 1992.— Ч. 1.— С. 87.
7. Левицкий Е. Л., Губський Ю. И. Регуляторное влияние ионов кальция и циклических нуклеотидов на синтез ДНК в клетках млекопитающих // Биохимия животных и человека.— 1990.— № 14.— С. 33—44.

8. Машковский М. Д. Лекарственные средства.— М.: Медицина, 1985.— Ч. 1.— 624 с.
9. 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.
10. Губский Ю. И., Левицкий Е. Л., Гольдштейн И. Б. и др. Функциональная активность фракционированного хроматина печени крыс при однократном введении тетрахлорметана // Вопр. мед. химии.— 1989.— 35, № 4.— С. 119—124.
11. Губский Ю. И., Левицкий Е. Л., Примак Р. Г. и др. Конформационные характеристики и характер упаковки эндогенных липидов фракций транскрипционно активного и репрессированного хроматина // Укр. биохим. журн.— 1991.— 63, № 2.— С. 83—89.
12. Ашмарин М. П., Васильев Н. Н., Амбросов В. А. Быстрые методы статистической обработки и планирование эксперимента.— Л.: Изд-во ЛГУ, 1975.— 78 с.
13. Губский Ю. И., Левицкий Е. Л., Гольдштейн И. Б. и др. Перекисное окисление липидов фракций хроматина печени крыс // Докл. АН УССР, сер. Б.— 1989.— № 2.— С. 70—72.
14. Лебедев О. И., Журнов В. В., Зуева Н. А. и др. Структурные эффекты в саркомере кардиомиоцитов при добавлении модуляторов полифосфорнолигандной системы // Физiol. журн.— 1990.— 76, № 10.— С. 1210—1297.
15. Свердлова О. В. Электронные спектры в органической химии.— М.: Химия, 1985.— 248 с.
16. Bellami W. T., Dalton W. S., Kailly J. M. et al. Verapamil reversal of doxorubicin resistance in multi-drug-resistant human myeloma cells and association with drug accumulation and DNA damage // Cancer. Res.— 1988.— 48, N 22.— P. 6303—6308.
17. Weber J., Scheid W., Traut H. Enhancement of bleomycin-induced DNA damage by exposing isolated DNA to high concentrations of the calcium antagonist verapamil // Arzneim. Forsch. Drug Res.— 1989.— 39, N 12.— P. 1550—1554.

УкрНИИ фармакологии и токсикологии МЗ Украины, Киев

Получено 12.01.93

УДК 577.27

**Е. Г. Пхакадзе, Э. М. Кавун, В. А. Чечот,
А. В. Маринец, Ю. Л. Радавский, С. В. Комиссаренко**

АНАЛИЗ АНТИГЕННЫХ СВОЙСТВ RGD-СОДЕРЖАЩЕГО УЧАСТКА ФИЛАМЕНТОЗНОГО ГЕМАГГЛЮТИНИНА BORDETELLA PERTUSSIS, ОТВЕЧАЮЩЕГО ЗА СВЯЗЫВАНИЕ С CR3-ИНТЕГРИНОМ МАКРОФАГОВ

*Локализована антигенная детерминанта в районе 1094—1102 полипептидной цепи филламентозного гемагглютинаина (ФГА) *B. pertussis*, участвующего в адгезии бактериальных клеток на макрофагах. Для определения использованы нативный ФГА синтетический nonapeптид YGGRGDPHQ, его конъюгаты с БСА (полученный глутаральдегидным методом) и с ЧСА (полученный с помощью N-оксисукцинимидил-2-(3-пиридилдитиопронионата) — SPDP). Эпитопспецифические АТ исследовали с помощью иммуноаффинной хроматографии и иммуноферментного анализа. Наличие антигенной детерминанты в RGD-содержащем районе 1094—1102 ФГА указывает на возможность использования пептида, соответствующего данному эпитопу, в качестве компонента синтетической вакцины против коклюша.*

Введение. Для профилактики коклюша в настоящее время применяют два вида вакцин: цельноклеточные (на основе убитых бактериальных клеток *B. pertussis*) и ацеллюлярные субъединичные вакцины [1]. Недостатком их является остаточная АДФ-рибозилтрансферазная активность коклюшного токсина [2], что вызывает множество нежелательных побочных эффектов при вакцинировании детей.

Для разработки полностью безопасных вакцин активно ведутся работы по двум основным направлениям, а именно: создание рекомбинантных аналогов S1-субъединицы коклюшного токсина [3, 4] и выявление пептидов, которые можно использовать при создании синтетических вакцин [5, 6]. Наиболее перспективными для дальнейшего поиска

© Е. Г. Пхакадзе, Э. М. Кавун, В. А. Чечот, А. В. Маринец, Ю. Л. Радавский,
С. В. Комиссаренко, 1993