

## ТЕОРЕТИЧНА І ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА МЕДИЦИНА

УДК 611.08-611.41-611.428-616-018:615.099.091

*О.В. Авилова**Харьковский национальный медицинский университет***АКТИВНОСТЬ О<sup>6</sup>-МЕТИЛГУАНИН-ДНК-МЕТИЛТРАНСФЕРАЗЫ  
В ТКАНИ ТИМУСА И СЕЛЕЗЕНКИ ПОД ВЛИЯНИЕМ КСЕНОБИОТИКОВ**

Быстрое развитие технологий и их реализация во всех сферах жизни людей обуславливают необходимость тщательного изучения влияния различных химических веществ на здоровье человека. Данное исследование посвящено выяснению активности О<sup>6</sup>-метилгуанин-ДНК-метилтрансферазы (MGMT) в тканях тимуса и селезенки под влиянием ксенобиотиков: триглицидилового эфира полиоксипропилентриола (ТЭППТ) и пропиленгликоля (ПГ). В подостром эксперименте были обнаружены изменения селезенки и тимуса зрелых крыс-самцов после введения 1/10 и 1/100 ДЛ<sub>50</sub> ТЭППТ и ПГ. Установлены изменения морфологических данных относительно контроля, свидетельствующие о реактивности селезенки и тимуса в ответ на воздействие ксенобиотика. Показано, что влияние ТЭППТ и ПГ на ткань селезенки и тимуса выражается в подавлении активности MGMT; ингибирующий эффект ТЭППТ более выражен.

**Ключевые слова:** селезенка, тимус, гистология, ксенобиотик, полиэфиры.

**Введение**

Одним из актуальных вопросов иммуноморфологии остается изучение структурной организации центральных и периферических органов иммуногенеза под действием различных экзогенных факторов [1, 2]. При этом иммунная система человека и животных является одной из самых чувствительных систем организма: она быстро реагирует на контакт с повреждающими агентами (химическими веществами) на самых ранних этапах [2, 3]. Ксенобиотики – это условная категория для обозначения чужеродных для живых организмов химических веществ, естественно не входящих в биотический круговорот [1, 4].

Простые полиэфиры широко используются в различных отраслях народного хозяйства (как основа промышленного выпуска пластмасс, пенопластов, полиуретанов, моющих средств, пролонгаторов фармацевтических препаратов, эмульгаторов, антикоррози-

онных препаратов, гидравлических и охлаждающих веществ и т. п.) и контактируют с источниками питьевого водоснабжения населения. Таким образом, понимание последствий их возможного воздействия на организм человека является чрезвычайно важным. При этом морфологические аспекты такого воздействия остаются практически не изученными. Из указанной группы распространены триглицидиловый эфир полиоксипропилентриола (ТЭППТ) и пропиленгликоль (ПГ) [4].

Известно, что одним из процессов, на которые влияют ксенобиотики, является алкилирование. О<sup>6</sup>-метилгуанин-ДНК-метилтрансфераза (MGMT) – ген, который устраняет повреждения ДНК алкилирующими веществами, нивелируя их цитотоксический эффект [5]. Распознающая последовательность протеина сочетается с поврежденной нуклеиновой кислотой (метилированной ДНК) и, не меняя структуры последней,

© О.В. Авилова, 2017

забирає алкільний залишок [6]. Образована в результаті цього інактивована MGMT може вступати в взаємозв'язок з рецепторами к стероїдним гормонам, подавляючи їх функції, тим самим блокуючи передачу сигналів к діленню кліток [7]. Єсть свідчення об інгібуємуєму впливі токсических речесив на активність MGMT [8].

В зв'язі з єтим **цєлюю** нашої роботи явилось изучение активності MGMT в ткани тимуса і селезенки під впливом триглицидового ефіра поліоксипропілентріола і пропіленгліколя.

#### **Матеріал і методи**

Морфофункціональні змієня тимуса і селезенки в умовах впливу ТЭПТ і ПГ визначали в підострому експерименті на 160 половозрілих крєсах-самцєх лінії WAG масою тіла 180–220 г. Все животніє содержались в стандартних умовах виварія Харківського національного медического університета при температурі (22±1,5) °С, влєжності 50–60 %, в комнаті з змієнням світлових режимів «дєнь–ночь» при спобуденні 12-годинного світлового режиму. Крєси находились на стандартному раціоні, свободному доступі к їжі і воді.

Животніє були розділені на рівніє групи в залежності об дозі впливу введєного речесива (1/10 і 1/100 ДЛ<sub>50</sub>) і термінів виводу з експерименту (7-, 15-, 30- і 45-є дєні). В указанніє терміє животніє виводили з експерименту методом цервікальної дислокації. Контролем служили інтактніє крєси.

Після рутинної проводки тимус і селезенку окрашували гематоксилином і єозиним, по ван Гізону, по Фельгену–Россенбеку, ставили PAS-реакцію і реакцію Браше. Іммуногистохімічєское дослідження (ІГХ) проводили постановкою непрямої імунопероксидазної реакції с моноклональними антитєлами (МКА) к MGMT. Реакцію визуалізуєвали с помощью набору UltraVision LP Detection System HRP Polymer & DAB Plus Chromogen (Thermo scientific). Степєнь експресії рецепторів MGMT оцієвали кількєственным методом: реакцію считали отрицательною при степєні експресії в 1 балл, слабоположительною – 2 балла, умерєнно положительною – 3 балла і сильноположительною – 4 балла.

Мікропрепарати изучали на мікроскопі «Olympus BX-41» (Японія) с послєдуєщою оброботою программою «Olympus DP-soft version 3.2», с помощью которой визначали інтенсивність імуногистохіміческих реакцій.

Все процедури нашої дослідження виконані в відповідності з Хельсінської дєкларацією, Європейської конвенцією об захисті позвоночних животнієх, іспользуємуєх для експериментів і в інших научних цєлях (Страсбург, 18.03.86), Директивою Союзу Європейського Союзу об захисті позвоночних животнієх (Страсбург, 24.11.86).

#### **Результати і їх обсудження**

На гистологіческих препаратах строма селезенки крєс контрольного групи представлена вираженою соєдинительнотканною капсулою і трабекулами, содержачими кровеносніє сосуди. Парєнхіма органа представлена крєсною і бєлою пульпою, що відповідає класическому описанню. Крєсна пульпа має в своєму соєставі синусоїдніє капілярї і селезеночніє тяжі, бєла пульпа – многочисленніє лімфатическіє фоллікули.

Після введення ТЭПТ і ПГ селезенка соєхраняє типичну структуру. Бєла пульпа представлена лімфоїдними фоллікулами, іногдє содержачими зародкєшевіє центри, і періартеріальними влєгалищами. Розміри лімфоїдних фоллікулів починає с 7-го дєня поступєнно зменшуються; єта тенденція соєхраняєтьє в тєчєніє всего періоду спобудєній. Зародкєшевіє центри в ранніє періоди спобудєнія визуалізуєються тільки в окремих лімфоїдних фоллікулах. Їх діамєтр визуально менше, чєм в соєответствуючих препаратах контрольных животнієх. Ширина мантийної і маргінальної зон лімфатических фоллікулів також зменшуєтьє по співнєнню с контролем. Виявленніє структурніє змієня в селезенці животнієх указуєвають на гіпоплазію бєлої пульпи, которую можно обьяснить збільчєнням частоти апоптоза і співнєєнням рівня клієточной проліферації в отвєт на вплив несприятного фактора. Центральніє артерії лімфоїдних фоллікулів мають збільчєніє стєнки. Трабекулярна соєдинительнає ткань хорошо розвита.

При изучєнні експресії репаративного єнзіма MGMT виявлено, що паттерном експресії виступають, співсно рекомендаціям

производителя антител, цитоплазма и ядро (рис. 1–4). Нами получена более ярко выраженная ядерная локализация MGMT, хотя в

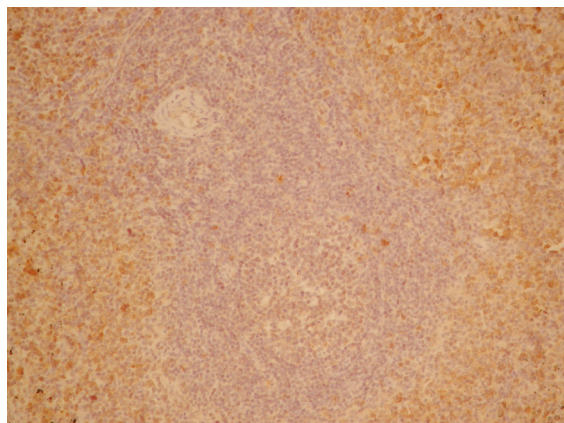


Рис. 1. Преимущественно ядерная локализация энзима в начале эксперимента. ИГХ исследование экспрессии MGMT. Ув.  $\times 200$

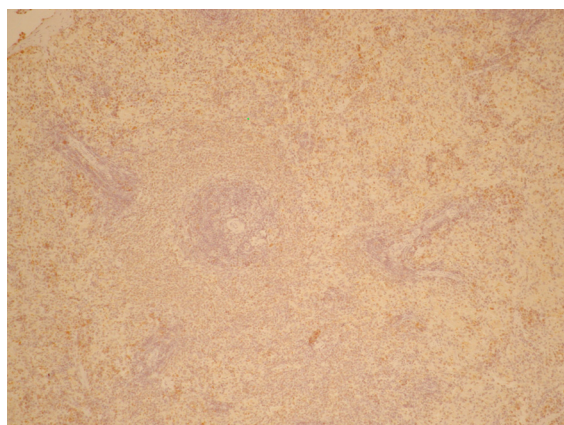


Рис. 2. Снижение активности MGMT в селезенке через 45 дней после начала эксперимента под влиянием ТЭППТ. ИГХ исследование экспрессии MGMT. Ув.  $\times 100$

некоторых случаях имеет место и цитоплазматическая экспрессия репаративного энзима. При оценивании по четырехранговой шкале активность энзима в контрольной группе чаще всего соответствовала умеренно положительной реакции. После введения ТЭППТ и ПГ активность энзима менялась, при этом процесс имел разнонаправленный характер. У животных, выведенных из эксперимента через 7 дней, отмечается повышение активности энзима, после чего она начинает понижаться во всех исследуемых группах, что реализуется в статистически достоверных данных у животных, выведенных из эксперимента через 45 дней (таблица).

При сопоставлении данных ИГХ исследований с гистохимическими препаратами (окраски по Фельгену–Россенбеку, PAS-

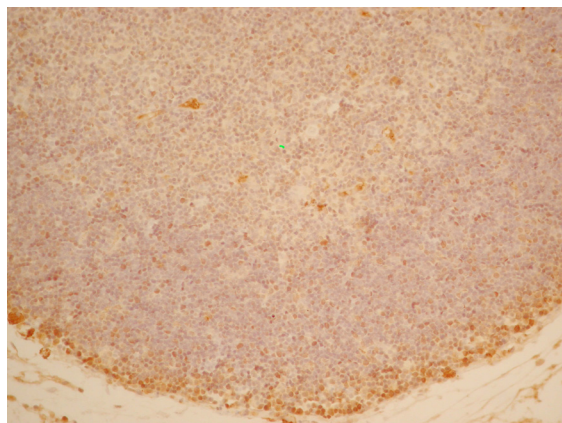


Рис. 3. Наличие рецепторов MGMT преимущественно в кортикальной зоне тимуса. ИГХ исследование экспрессии MGMT. Ув.  $\times 200$



Рис. 4. Снижение активности MGMT в тимусе через 45 дней после начала эксперимента под влиянием ПГ. ИГХ исследование экспрессии MGMT. Ув.  $\times 100$

реакция и реакция Браше) установлена взаимосвязь изменения MGMT-активности прежде всего с изменением белкового обмена. Совокупность этих изменений, по всей видимости, реализуется в развитии гидропической дистрофии и активации апоптоза, что ведет к снижению клеточной плотности у животных по мере увеличения срока проведения эксперимента. При этом более выраженное изменение активности энзима наблюдается при применении ТЭППТ.

Можно предположить, что триглицидный эфир полиоксипропилентриола и пропиленгликоль влияют на обмен MGMT. Считается, что при метилировании MGMT-рго-

*Динамика иммуногистохимической активности MGMT в ткани тимуса и селезенки при использовании ТЭППТ и ПГ, баллы*

Группа		7 дней	15 дней	30 дней	45 дней
<i>Тимус</i>					
Контрольная		3,27±0,08	3,23±0,09	3,25±0,08	3,21±0,09
ТЭППТ	1/100 ДЛ <sub>50</sub>	3,53±0,19	3,21±0,16	2,72±0,18	2,51±0,18*
	1/10 ДЛ <sub>50</sub>	3,41±0,17	3,01±0,23	2,28±0,21	2,16±0,15*
ПГ	1/100 ДЛ <sub>50</sub>	3,47±0,14	2,98±0,18	2,87±0,14	2,76±0,13
	1/10 ДЛ <sub>50</sub>	3,58±0,14	2,89±0,18	2,66±0,19	2,53±0,11*
<i>Селезенка</i>					
Контрольная		3,08±0,07	2,94±0,08	3,06±0,07	3,01±0,06
ТЭППТ	1/100 ДЛ <sub>50</sub>	3,33±0,28	3,01±0,14	2,57±0,23	2,49±0,13*
	1/10 ДЛ <sub>50</sub>	3,21±0,32	2,65±0,21	2,23±0,18	2,12±0,18*
ПГ	1/100 ДЛ <sub>50</sub>	3,37±0,25	2,99±0,23	2,91±0,16	2,84±0,13
	1/10 ДЛ <sub>50</sub>	3,17±0,28	2,74±0,24	2,39±0,21	2,31±0,16*

*Примечание.* \*  $p < 0,05$  по сравнению с показателем контрольной группы.

moter и отсутствии белка клетки, как правило, более чувствительны к повреждениям, вызванным алкилированием, что приводит к апоптозу клеток [9, 10]. Данное обстоятельство подтверждает основную функцию белка MGMT, который переносит алкильный остаток (метил-, этил-, н-пропил- и др.) от O<sup>6</sup>-позиции гуанина ДНК на свой активный 145-й цистеиновый акцепторный сайт, что, соответственно, происходит в ядре поврежденных клеток.

Таким образом, экзогенное поступление ксенобиотиков в организм приводит к их осаждению в ткани органов иммунной системы и метилированию ДНК. За счет повреждения деметилированного энзима не происходит снятия метильных групп с ДНК поврежденной ткани, что сопровождается накоплением алкильных остатков и, как следствие, активацией процессов апоптоза. Следовательно, выявленные изменения в активности MGMT могут быть одним из звеньев в морфогенезе гипопластических процессов органов

иммунной системы в ответ на воздействие неблагоприятного фактора. Индукция 1/10 и 1/100 ДЛ<sub>50</sub> ТЭППТ и ПГ характеризуется сильным воздействием, которое, по-видимому, объясняется дозой с более выраженными последствиями при применении ТЭППТ. При этом как ТЭППТ, так и ПГ оказывает статистически значимое влияние на 45-й день эксперимента.

#### **Вывод**

Влияние триглицидилового эфира полиоксипропилентриола и пропиленгликоля на ткань селезенки и тимуса выражается в подавлении активности O<sup>6</sup>-метилгуанин-ДНК-метилтрансферазы, при этом ингибиторный эффект триглицидилового эфира полиоксипропилентриола выражен в большей степени.

**Перспектива дальнейших исследований** состоит в выявлении последствий изменения активности O<sup>6</sup>-метилгуанин-ДНК-метилтрансферазы в органах иммунной системы.

#### **Список литературы**

1. Grob K. The European system for the control of the safety of food-contact materials needs restructuring: a review and outlook for discussion / K. Grob // Food Additives Contaminants. Part A, Chemistry Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment. – 2017. – Sep. – Vol. 34 (9). – P. 1643–1659.
2. Kreitinger J. M. Environmental immunology: lessons learned from exposure to a select panel of immunotoxicants / J. M. Kreitinger, C. A. Beamer, D. M. Shepherd // J. Immunol. – 2016. – Apr. 15. – Vol. 196 (8). – P. 3217–3225.
3. De Jong W. H. Screening of xenobiotics for direct immunotoxicity in an animal study / W. H. De Jong, H. Van Loveren // Methods. – 2007. – Jan. – Vol. 41 (1). – P. 3–8.
4. Szczepanska N. Recent advances in assessing xenobiotics migrating from packaging material – A review / N. Szczepanska, B. Kudlak, J. Namiesnik // Anal. Chim. Acta. – 2018. – Vol. 1023. – P. 1–21.

5. *Jacinto F. V.* MGMT hypermethylation: a prognostic foe, a predictive friend / F. V. Jacinto, M. Esteller // *DNA Repair (Amst.)*. – 2007. – № 6 (8). – P. 1155–1160.
6. Pattern of expression of genes linked to epigenetic silencing in human breast cancer / K. Munot, S. M. Bell, S. Lane [et al.] // *Human Pathology*. – 2006. – Vol. 37. – P. 989–999.
7. The modified human DNA repair enzyme O<sup>6</sup>-methylguanine-DNA methyltransferase is a negative regulator of estrogen receptor-mediated transcription upon alkylation DNA damage / K. C. Teo, H. K. Oh, R. B. Ali [et al.] // *Mol. Cell. Biol.* – 2001. – № 20. – P. 7105–7114.
8. *Younis L. K.* The prognostic value of E-cadherin expression in breast cancer / L. K. Younis, H. E. Sakka, I. Haque // *Int. J. Health Sci. (Qassim)*. – 2007. – № 1. – P. 43–51.
9. *Ochs K.* Apoptosis induced by DNA damage O<sup>6</sup>-methylguanine is Bcl-2 and caspase-9/3 regulated and Fas/caspase-8 independent / K. Ochs, B. Kaina // *Cancer Research*. – 2000. – Vol. 60. – P. 5815–5824.
10. *Sewald K.* Assessment of immunotoxicity using precision-cut tissue slices / K. Sewald, A. Braun // *Xenobiotica*. – 2013. – Jan. – Vol. 43 (1). – P. 84–97.

**О.В. Авілова**

#### **АКТИВНІСТЬ О<sup>6</sup>-МЕТИЛГУАНІН-ДНК-МЕТИЛТРАНСФЕРАЗИ У ТКАНИНІ ТИМУСА І СЕЛЕЗІНКИ ПІД ВПЛИВОМ КСЕНОБІОТИКІВ**

Швидкий розвиток технологій та їхня реалізація в усіх галузях життя людей зумовлюють необхідність ретельного вивчення впливу різних хімічних речовин на здоров'я людини. Дане дослідження присвячено з'ясуванню активності О<sup>6</sup>-метилгуанін-ДНК-метилтрансферази (MGMT) у тканинах тимуса і селезінки під впливом ксенобіотиків: тригліцидилового ефіру поліоксипропілентріолу (ТЕППТ) і пропіленгліколю (ПГ). У підгострому експерименті були виявлені зміни селезінки і тимуса зрілих щурів-самців після введення 1/10 і 1/100 ДЛ<sub>50</sub> ТЕППТ і ПГ. Встановлено зміни морфологічних даних відносно контролю, що свідчать про реактивність селезінки і тимуса у відповідь на вплив ксенобіотика. Показано, що вплив ТЕППТ і ПГ на тканину селезінки і тимуса виражається у пригніченні активності MGMT; інгібуєчий ефект ТЕППТ більш виражений.

**Ключові слова:** селезінка, тимус, гістологія, ксенобіотик, поліефіри.

**О. V. Avilova**

#### **MGMT ACTIVITY IN THE THYMUS AND SPLEEN TISSUES UNDER THE INFLUENCE OF XENOBIOTICS**

Rapid technology growth and its implementation in all spheres of the people's lives dictates the necessity for thorough study of the influence of different chemicals on human's health. This study was devoted to elucidation of MGMT activity in the thymus and spleen tissues under the influence of xenobiotics: tryglycidyl ether of polyoxohpropylenetriol (TEPPT) and propylene glycol (PG). In subacute experiment were uncovered alterations of the matured male rat's spleen and thymus after the administration of 1/10 and 1/100 LD<sub>50</sub> of TEPPT and PG. The changes of morphologic data are determined in comparison to control data which shows reactivity of the spleen and thymus in response to the induced xenobiotic. The effect of TEPPT and PG on the tissue of the spleen and thymus is expressed in the suppression of MGMT activity also; the inhibitory effect of TEPPT is more pronounced.

**Keywords:** spleen, thymus, histology, xenobiotics, polyethers.

Надійшла 04.07.17

#### **Відомості про автора**

*Авілова Ольга Володимирівна* – аспірант кафедри анатомії людини Харківського національного медичного університету.

Адреса: Україна, 61022, м. Харків, пр. Науки, 4.

Тел.: +38(057)700-36-26.

E-mail: Ukraine.doctor2015@gmail.com.