

Вплив 4-гідроксиквіназоліну та 3-амінобензаміду на ступінь ушкодження ДНК в імунокомпетентних клітинах за умов гепатиту, індукованого конканаваліном А

Н.Г. Грушка

Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ; e-mail: grunay@i.ua

Конканавалін А (Кон А) є потужним активатором імунокомпетентних клітин, зокрема Т-лімфоцитів, і здатен індукувати ураження печінки та розвиток гепатиту. Інгібітори полі(АДФ-рибоза)полімерази-1 (ПАРП-1) чинять виражену захисну дію при різних експериментальних моделях запалення. У нашому дослідженні з'ясовано ефективність інгібіторів ПАРП-1 4-гідроксиквіназоліну (4-ГК) та 3-амінобензаміду (3-АБА) у запобіганні пошкодженню ДНК та збереженні життєздатності клітин тимуса та лімфовузлів за умов моделювання імуноопосередкованого гепатиту, індукованого Кон А для визначення їх потенційної цитопротективної дії та здатності знижувати ризик розвитку імунозапального ушкодження. Встановлено, що введення Кон А призводить до значного підвищення інтегрального індексу ушкодження ДНК (ІДК) в імунокомпетентних клітинах порівняно з контрольною групою. Так, у клітинах тимуса ІДК збільшувався з $0,36 \pm 0,03$ до $1,80 \pm 0,24$, у клітинах лімфовузлів – з $0,33 \pm 0,07$ до $1,82 \pm 0,18$. Вірогідно збільшувалася частка клітин з усіма класами пошкодження ДНК від мінімального до найінтенсивнішого, що свідчить про глибоке порушення структурної цілісності геному в імунокомпетентних клітинах. Профілактичне ведення 4-ГК та 3-АБА достовірно знижувало рівень ушкодження ДНК: 4-ГК призводив до зниження ІДК з $1,8 \pm 0,24$ до $0,39 \pm 0,06$, а при дії 3-АБА – $0,83 \pm 0,13$ у клітинах тимуса. Подібне достовірне зменшення ІДК виявлено і в клітинах лімфатичних вузлів. Крім цього при дії 4-ГК та 3-АБА зменшувалася кількість лімфоцитів з тяжкими ушкодженнями (клас 3 та 4) та підвищувалася з інтактною ДНК (клас 0). Застосування 3-АБА призводило до збільшення життєздатності імуноцитів через зменшення їх некротичної загибелі, що свідчить про його виражений цитопротективний ефект. Таким чином, Кон А спричиняє ушкодження ДНК імунокомпетентних клітин як центрального, так і периферичних органів імунної системи. 3-АБА та 4-ГК ефективно зменшують ступінь викликаних ушкоджень, демонструючи потенціал як засіб профілактики імунозапальних ушкоджень.

Ключові слова: полі (АДФ-рибоза) полімераза; імуноопосередковане ушкодження; конканавалін А; лімфоцити; ушкодження ДНК; клітинна загибель.

ВСТУП

Модель імуноопосередкованого гепатиту, індукованого конканаваліном А (Кон А), є загальновизнаною для дослідження механізмів ураження печінки, пов'язаних з активацією імунокомпетентних клітин, зокрема Т-лімфоцитів і макрофагів, що супроводжується секрецією прозапальних цитокінів, таких як фактор некрозу пухлин α (ФНП- α) та інтерферон γ (ІФН- γ), генерацією

активних форм кисню (АФК), сприяючи розвитку оксидативного стресу та фрагментації ДНК у гепатоцитах і лімфоцитах [1, 2]. Крім того, генерація активних форм кисню за участю НАДФН-оксидази у моноцитах і макрофагах розглядається як ключовий механізм формування оксидативного стресу і пошкодження клітин при запаленні [1–3]. Ушкодження імунокомпетентних клітин, зокрема Т-лімфоцитів, у таких

умовах має важливе значення, оскільки навіть помірні порушення цілісності ДНК можуть активувати механізми клітинної загибелі (апоптоз, некроз) та знижувати функціональну активність лімфоцитів, що зрештою призводять до дисбалансу імунної відповіді [4]. Збереження інтегральної цілісності ДНК відіграє вирішальну роль у підтриманні функціонального стану імунної системи, особливо в тимусі та лімфовузлах. Активація імунокомпетентних клітин за умов запалення супроводжується інтенсивним оксидативним стресом, генерацією АФК та порушенням цілісності ДНК, що безпосередньо впливає на ступінь клітинного ураження. Це може запускати коло самопідсилення запалення, у якому генотоксичні зміни й імунна дисфункція сприяють подальшому його посиленню та розвитку імуноопосередкованих порушень.

Однією з головних молекулярних ланок, що зв'язує ушкодження ДНК із запальною відповіддю, є фермент полі(АДФ-рибози) полімераза-1 (ПАРП-1), який відіграє центральну роль у розпізнаванні одноланцюгових розривів ДНК і активації механізмів її репарації. Однак надмірна активація ПАРП-1 при значному ушкодженні ДНК може призводити до запуску загибелі клітин за апоптотичним, некротичним або партанозним типом [5, 6]. Подібний механізм спостерігався в різних патологічних умовах, зокрема при ішемії-реперфузії, нейротоксичності, діабеті, хронічному запаленні та системному стресі, де надмірна активація ПАРП-1 викликає НАД⁺/АТФ-дефіцит і призводить до ПАРП-1-залежної некротичної загибелі клітин [6, 7]. Крім того, ПАРП-1 модулює експресію запальних генів через взаємодію з транскрипційним фактором NF-κB (зокрема субодиницею p65), посилюючи синтез таких прозапальних цитокінів, як ФНП-α та інтерлейкін-6 [8, 9].

Інгібітори ПАРП-1 показали здатність запобігати ушкодженню тканин при різних експериментальних моделях запальних і

аутоімунних захворювань [3, 10]. Так, застосування 3-амінобензаміду (3-АБА) у моделі Кон А-індукованого гепатиту в мишей супроводжується зменшенням запалення, окисного стресу й пошкодження тканин печінки [3]. У зв'язку з цим актуальним є дослідження впливу інгібіторів ПАРП-1 на ступінь ушкодження ДНК за умов Кон А-індукованого гепатиту.

Метою нашого дослідження було оцінити ступінь ушкодження ДНК та шляхи загибелі у клітинах тимуса та лімфатичних вузлів при моделюванні імуноопосередкованого гепатиту за допомогою Кон А, а також визначити вплив інгібіторів полі(АДФ-рибози) полімерази-1 4-гідроксиквіназоліну та 3-амінобензаміду на ці ушкодження.

МЕТОДИКА

Дослідження проводили на 32 статевозрілих самицях мишей аутбредної лінії Альбіно (віком 6–8 тиж і масою 20–22 г), яких утримували за стандартних умов харчового, температурного та світлового режимів віварію Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України. При роботі дотримувалися вимог Європейської конвенції щодо гуманного ставлення до лабораторних тварин (Страсбург, 1986), «Правил виконання робіт з використанням експериментальних тварин», затверджених наказом МОЗ України, законом України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (№ 1759-VI від 15.12.2009) та рекомендацій «Біоетичної експертизи доклінічних та інших наукових досліджень, що виконуються на тваринах» (протокол № 6/25 від 25.06.2025).

Експериментальний імунний гепатит моделювали застосуванням ін'єкції Кон А ("Sigma", США) в дозі 25 мг/кг одноразово у хвостову вену мишей. Тварин було поділено на чотири групи: контрольну і три дослідні. До 1-ї дослідної групи належали тварини, яким вводили лише Кон А, до 2-ї – тварини з профілактичним

введенням 4-гідроксиквіназоліну (4-ГК) перед Кон А, до 3-ї – тварини з профілактичним введенням 3-амінобензаміду (3-АБА) перед Кон А. Тварини контрольні групи замість Кон А отримували фізіологічний розчин у відповідному об'ємі. Інгібітори ПАРП-1 – 3-АБА та 4-ГК вводили внутрішньоочеревинно у дозі (100 мг/кг) за 2 год до Кон А. Через 20 год мишей піддавали ефірному наркозу і вилучали матеріал для подальших досліджень. Клітини тимуса та лімфовузлів виділяли за загальноприйнятою методикою м'якого механічного диспергування органів з наступним відмиванням, центрифугуванням у забуференому фосфатами фізіологічному розчині.

Ступінь ушкодження ДНК клітин тимуса та лімфовузлів визначали методом лужного гель-електрофорезу ізольованих клітин (метод ДНК-комет) [11] з деякими модифікаціями. Електрофорез препаратів (після їх стабілізації протягом 20 хв у лужному електрофоретичному буфері) проводили за допомогою приладу Multiphor II («ЛКВ», Швеція) при напрузі 24 В і силі струму 100 мА протягом 30 хв. Оцінювали ступінь ушкодження ДНК за морфологією ДНК-комет на електрофореграмах, забарвлених флуоресцентним барвником DAPI (4',6-діамідін-2-феніліндол), візуально, використовуючи люмінесцентний мікроскоп «Люам І-1» та відеосистему передачі зображення на комп'ютер за допомогою водно-імерсійного об'єктива (збільшення у 85 разів). Застосовували напівкількісний метод оцінки інтенсивності забарвлення та довжини хвостів комет, на кожному мікропрепараті аналізували не менше ніж 100 окремо розташованих ДНК-комет. Останні поділяли за загальновизнаною класифікацією на 5 класів з відповідним числовим значенням від 0 до 4, залежно від співвідношення ДНК у «голові» та «хвості» комети [12]. Де 0-й клас – інтактні клітини, тобто ДНК неушкоджена, 1-й клас – мінімальні пошкодження, 2-й клас – незначне пошкодження, 3-й клас –

інтенсивне пошкодження ДНК, яке свідчить про суттєвий стрес клітин, 4-й клас – найінтенсивніше пошкодження, що демонструє серйозну деструкцію або масовий розрив. Ступінь порушення цілісності ДНК при цьому визначали як індекс ушкодження ДНК (ІДК), який обчислювали за формулою: $ІДК = (0n_0 + 1n_1 + 2n_2 + 3n_3 + 4n_4) / \Sigma$, де $n_0 - n_4$ – число ДНК-комет кожного типу, Σ – сума підрахованих ДНК-комет. Цей показник відображає частку клітин з фрагментованою ДНК різного ступеня ушкодження (від слабкого до тяжкого) відносно загальної кількості клітин, що аналізували. Такий підхід дає змогу не лише зафіксувати наявність ушкоджень, але й охарактеризувати їх розподіл за ступенем тяжкості, що особливо важливо при аналізі Т-лімфоцитів у тимусі та лімфовузлах, які характеризуються різною стадією диференціювання та чутливістю до ушкоджувальних чинників. Комет-аналіз є широко визнаним методом для оцінки одно- та дволанцюгових розривів ДНК у поодиноких клітинах, зокрема лімфоцитах. Його часто застосовують у дослідженнях для оцінки генотоксичності в експериментальних та клінічних умовах [13].

Відсоток живих та ушкоджених клітин в отриманих суспензіях встановлювали при забарвленні трипановим синім. Шляхи клітинної загибелі вивчали методом прижиттєвого подвійного забарвлення флуоресцентними барвниками нуклеїнових кислот (йодидом пропідіуму і Хехст 33342), як описано раніше [14]. Використовували відеосистему передачі зображення з люмінесцентного мікроскопа «Люам І-1» (водно-імерсійний об'єктив збільшення у 85 разів) на комп'ютер. Визначали відсоток живих, некротичних та апоптотичних клітин при підрахунку не менш як 200 клітин.

Перевірку отриманих результатів на нормальність розподілу проводили за тестом Колмогорова – Смирнова. За нормального розподілу статистичну обробку здійснювали за допомогою однофакторного дисперсійного

аналізу ANOVA з подальшим порівнянням середніх значень між групами тестом Ньюмена-Кейлса із використанням програми GraphPad Prism version 5.00 for Windows (“GraphPad Software”, США). Результати виражали як $M \pm SEM$. $P < 0,05$ вважали статистично вірогідним.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Було виявлено, що за умов введення Кон А в клітинах тимуса та лімфовузлів спостерігається значне пошкодження ДНК, про що свідчить підвищення ІДК (рис. 1). Зокрема, у клітинах тимуса ІДК збільшувався у 5 разів з $0,33 \pm 0,07$ до $1,82 \pm 0,18$ ($P < 0,05$), у клітинах лімфовузлів – у 5,5 раза з $0,36 \pm 0,03$ до $1,8 \pm 0,24$ ($P < 0,05$). Такі зміни говорять про значне та однонаправлене ушкодження в обох імунних органах у відповідь на введення Кон А.

Для більш детальної характеристики пошкодження було проведено аналіз розподілу клітин за класами комет (0–4), що дало змогу оцінити не лише загальну інтенсивність ДНК-ушкодження, а й кількісно виявити частку клітин з тяжкими порушеннями цілісності ДНК. Це дало можливість детальніше виявити зміни у співвідношенні між класами інтактних клітин та клітин, що зазнали значної фрагментації ДНК у відповідь на ушкоджуючий стимул, і, відповідно, об'єктивніше охарактеризувати рівень генотоксичного навантаження в досліджуваних умовах. За умов дії Кон А вірогідно збільшується кількість клітин усіх класів ушкодження ДНК у тимусі: 1-й клас – з $6,88 \pm 2,37$ до $11,51 \pm 1,57$, 2-й – з $5,09 \pm 1,01$ до $21,86 \pm 3,71$ та 3-й – з $3,21 \pm 0,39$ до $24,61 \pm 3,33$, 4-й – з $2,38 \pm 0,68$ до $12,7 \pm 2,96$. Одночасно достовірно знижувалася частка клітин 0-го класу з $82,44 \pm 1,79$ до $29,31 \pm 7,51$. Аналогічні зміни спостерігалися в клітинах лімфатичних вузлів (рис. 2). Це вказує на суттєвий стрес імункомпетентних клітин (ІКК) за умов надмірної імунної активації.

Слід відмітити відмінності у особливостях зміни ступеня ушкодження ДНК ІКК на моделі імуніопосередкованого гепатиту порівняно з імунікомплексним впливом, індукованим бичачим сироватковим альбуміном (БСА) та системної ендотоксемії, спричиненої дією ліпополісахариду (ЛПС), що було нами показано раніше [15, 16]. При цих моделях переважно зростала частка клітин із тяжкими ушкодженнями ДНК без суттєвих змін у клітинах із мінімальним або незначним ушкодженням. Натомість при моделюванні Кон А-гепатиту зміни ДНК мали більш гетерогенні особливості, охоплюючи клітини з різним ступенем пошкодження. Такий ефект свідчить про більш виражене порушення гомеостазу та функціонального стану клітин імунної системи, а також про ширше залучення ІКК

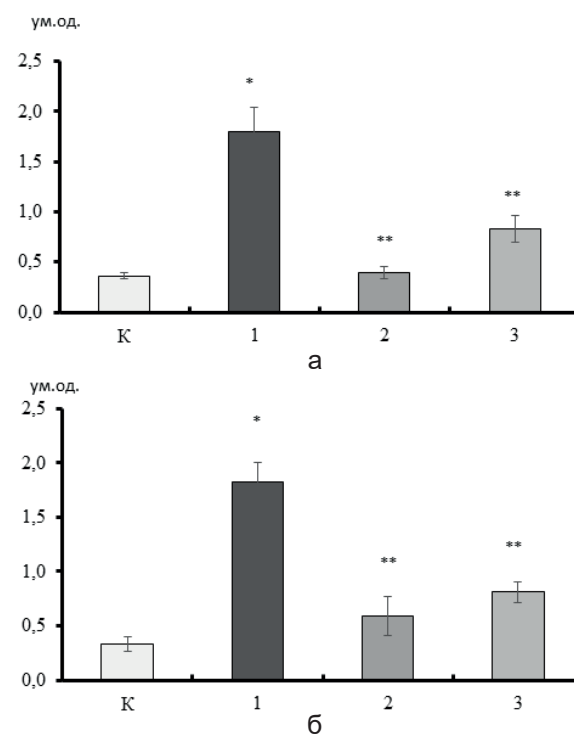


Рис. 1. Індекс ДНК-комет клітин тимуса (а) лімфовузлів (б) за умов введення конканаваліну А (Кон А), блокаторів полі(АДФ-рибоза)полімерази-1 4-гідроксиквіназоліну (4-ГК) та 3-амінобензаміду (3-АБА): К контроль, 1 – Кон А, 2 4-ГК, 3 3-АБА. * $P < 0,05$ порівняно з контролем; ** $P < 0,05$ порівняно зі значеннями при введенні Кон А

до патологічного процесу, зумовленого надмірною активацією імунної відповіді внаслідок дії Кон А. Ймовірно, він зумовлений специфічним механізмом дії Кон А, який спричиняє значну активацію Т-лімфоцитів, через зв'язування з рецепторами CD3 і МНС II, що призводить до надмірного вивільнення прозапальних цитокінів та генерації АФК [2, 17]. Така відповідь імунної системи викликає масоване ураження як зрілих, так і незрілих Т-лімфоцитів у тимусі та периферичних органах, що відрізняється від імунної відповіді, характерної для моделей, індукованих БСА та ЛПС. Оскільки імункомпетентні клітини перебувають на різних стадіях диференціювання та мають неоднакову чутливість до стресових

факторів, таких як АФК та активація каспаз, це може пояснювати ширший спектр ступенів ДНК-ушкоджень, зафіксованих при моделюванні Кон А. Отримані результати свідчать про відмінні механізми розвитку ушкодження, індукованого Кон А, що обґрунтовує необхідність диференційованого підходу до аналізу ДНК-ушкоджень залежно від механізму імунної активації.

Застосування інгібіторів ПАРП-1 за умов дії Кон А сприяло зниженню рівня ушкоджень ДНК у клітинах імунної системи. Зокрема, 4-ГК призводив до зниження ІДК у клітинах тимуса з $1,8 \pm 0,24$ до $0,39 \pm 0,06$ ($P < 0,05$), а при дії 3-АБА до $0,83 \pm 0,13$ ($P < 0,05$). Подібне достовірне зменшення ІДК виявлено і в клітинах лімфатичних вузлів (див. рис. 1). При цьому ефект 4-ГК був більш вираженим, що може свідчити про його вищу специфічність до ПАРП-1 або про наявність додаткових механізмів дії, включаючи антиоксидантний ефект. Крім того, аналіз розподілу клітин за класами ушкодження показав, що введення 4-ГК та 3-АБА достовірно зменшували частку клітин тимуса із тяжкими ДНК ушкодженнями (комети 3-го та 4-го класів), водночас збільшуючи кількість клітин з неушкодженою ДНК (див. рис. 2, а). Також підвищувалася частка клітин з мінімально фрагментованою ДНК, проте виявлене зростання не було достовірним.

Подібні зміни цілісності ДНК спостерігались у клітинах лімфатичних вузлів, де введення 4-ГК та 3-АБА на тлі ушкодження Кон А призводило до зменшення пошкодження ДНК. Показано, що при дії цих блокаторів зменшується кількість клітин з сильним ушкодженням ДНК, тоді як кількість клітин з інтактною або незначно зміненою ДНК достовірно зростала при дії 4-ГК та 3-АБА. Водночас кількість клітин із помірними порушеннями залишалася практично незмінною як у тимусі, так і в лімфатичних вузлах, що вказує на відсутність їхнього впливу на клітини з цим ступенем

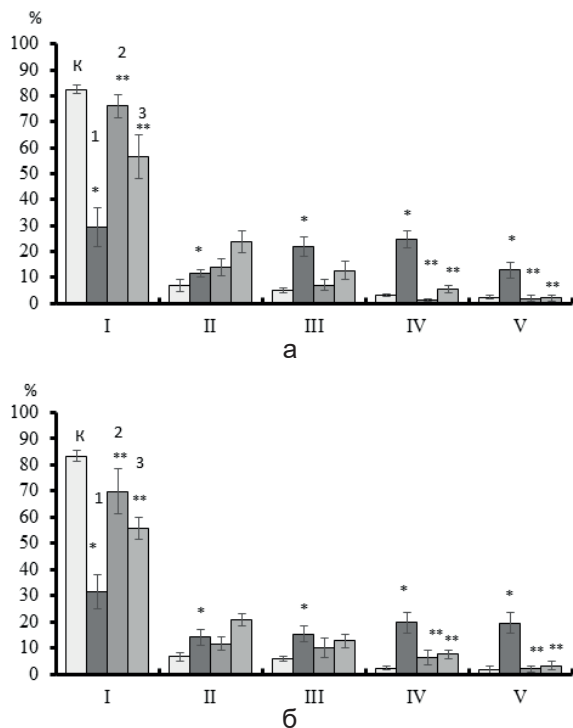


Рис. 2. Зміни кількості ДНК-комет клітин тимуса (а) та клітин лімфовузлів (б) за умов введення конканаваліну А (Кон А), блокаторів ПАРП 4-гідроксиквіназоліну (4-ГК) та 3-амінобензаміду (3-АБА): К контроль, 1 Кон А, 2 4-ГК, 3 3-АБА; I – інтактні клітини, II – мінімальні пошкодження, III – незначне пошкодження ДНК, IV – інтенсивне пошкодження ДНК, V – найбільш інтенсивне пошкодження ДНК. * $P < 0,05$ порівняно з контролем; ** $P < 0,05$ порівняно зі значеннями при введенні Кон А

пошкодження ДНК (див. рис. 2, б). Такий розподіл свідчить про вибірккову дію інгібіторів ПАРП-1, спрямовану переважно на клітини з вираженим ушкодженнями. Ці зміни підтверджують ефективність інгібування ПАРП 1 у зменшенні генотоксичного стресу при системному імуніопосередкованому ушкодженні.

Отримані результати щодо застосування інгібіторів ПАРП-1 із різною специфічністю свідчать про важливу роль цього ферменту у збереженні структурної цілісності генетичного матеріалу за умов помірної активації, тоді як надмірна активація призводить до шкідливих наслідків. Виявлений захисний ефект інгібіторів пов'язаний саме зі зниженням такої надмірної активації ПАРП-1, збереженням вмісту НАД⁺/АТФ та запобіганням розвитку енергетичного колапсу клітини. Фармакологічна модуляція ПАРП-1 є перспективним підходом до обмеження ДНК-пошкоджень та захисту імунікомпетентних клітин за умов системного запального стимулу. Дані літератури підтверджують цей механізм. Так, наприклад, було показано, що інгібування ПАРП-1 знижує вміст γ -H2AX та інших маркерів ушкодження ДНК у клітинах тимуса за умов радіаційного стресу [18]. Це дає додаткове обґрунтування нашим висновкам, хоча в іншій експериментальній моделі. Фрагментація ДНК є ключовою ознакою клітинної загибелі, а надмірна активація ПАРП-1 супроводжується швидким виснаженням енергетичних ресурсів клітини (НАД⁺ та АТФ), що створює умови для некротичної загибелі. Таким чином, інгібування ПАРП-1 може запобігати виснаженню енергетичних ресурсів клітини та зменшувати інтенсивність розвитку некрозу, що підкреслює її потенціальні можливості як терапевтичної мішені для захисту від цитотоксичності [19, 20].

У наших попередніх дослідженнях було показано протективний ефект 4-ГК щодо клітинної загибелі, спричиненою дією Кон А [21]. Наразі увага була зосереджена на

вивченні ефектів іншого інгібітора ПАРП, 3-АБА, на життєздатність клітин тимуса і лімфовузлів за умов імуніопосередкованого гепатиту. Встановлено, що 3-АБА вірогідно зменшував рівень некрозу в клітинах тимуса та лімфатичних вузлів. При цьому рівень апоптозу в ІКК достовірно не змінювався, що важливо для забезпечення фізіологічного вилучення активованих імунних клітин та завершення запального процесу (рис. 3).

Клітинна загибель є ключовою ланкою процесів, що лежать в основі ураження печінки при гепатиті, й може викликати розвиток ускладнень, хронізацію та посилення запального процесу [22]. У разі хронічного перебігу захворювання тривале ушкодження гепатоцитів призводить до вивільнення молекулярних структур (DAMPs), які сприяють додатковому запаленню. Це індукує ланцюгову реакцію посилення запалення та клітинної загибелі, що сприяє

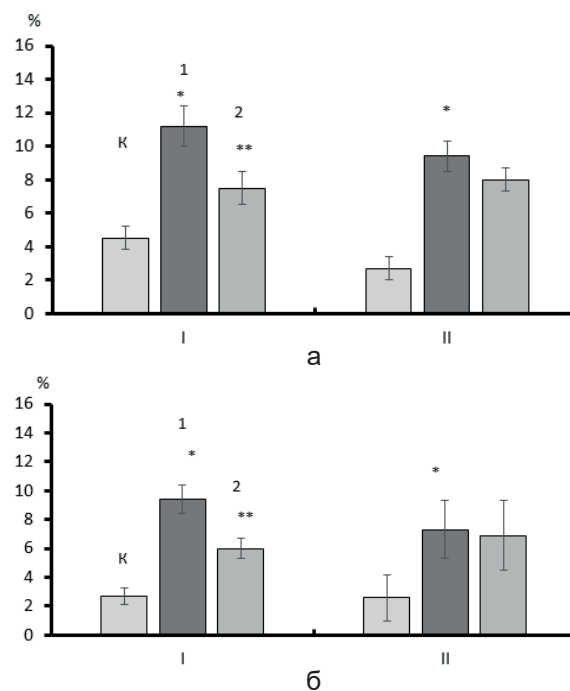


Рис. 3. Вплив введення конканаваліну А (Кон А) та блокатора ПАРП 3-амінобензаміду (3-АБА) на кількість некротичних (I) та апоптотичних (II) клітин тимуса (а) та лімфовузлів (б) мишей; К контроль, 1 Кон А, 2 3-АБА. * $P < 0,05$ порівняно з контролем; ** $P < 0,05$ порівняно зі значеннями при введенні Кон А

прогресуванню захворювань печінки. Інгібування ПАРП-1 широко вивчається як потенційний терапевтичний підхід в експериментальних моделях аутоімунних і запальних захворювань. Так, Віго та співавт. [23] показали, що 3-АБА ефективно зменшував пошкодження нирок на моделі щурів з гострим тубулярним некрозом, спричинених впливом гентаміцину.

Cover і співат. [24] показали, що 3-АБА чинив захисну дію навіть за відсутності активації ПАРП-1. Це свідчить про існування альтернативного механізму його дії, зокрема як антиоксиданта. Такі властивості низки інгібіторів ПАРП, включаючи 3-АБА, ймовірно, відіграють важливу роль у моделях токсичності, індукованої ацетамінофеном. Наприклад, у мишей з відсутністю експресії ПАРП-1 3-АБА зберігав протекторний ефект, що підтверджує його ПАРП-незалежну дію. 3-АБА перешкоджає виснаженню глутатіону, спричиненому реактивним метаболітом ацетамінофену, і дослідники припустили, що він здатний безпосередньо інгібувати його утворення. Таким чином, 3-АБА може реалізовувати свій захисний ефект не лише як інгібітор ПАРП-1, а й як антиоксидант прямої дії.

Активация ПАРП-1 відіграє ключову роль у репарації ушкоджень ДНК, однак її надмірна активність може мати патологічні наслідки, залежно від типу клітин і ступеня ушкодження. Помірна активация ПАРП-1 сприяє відновленню ДНК, тоді як інтенсивна активация при масивних ушкодженнях ДНК призводить до виснаження клітинних енергетичних ресурсів, вивільнення апоптозіндукуючого фактора із мітохондрій і запуску програмованої клітинної загибелі, зокрема партанатосу [6]. Крім того, ПАРП-1 модулює запальні процеси активацією транскрипційного фактора NF-κB, що посилює експресію прозапальних цитокінів, таких як ФНП-α. 3-АБА пригнічує ферментативну активність ПАРП-1, зменшуючи ушкодження ДНК і запальну відповідь, що

робить його перспективними для терапії імуніопосередкованих уражень [3]. У контексті імуніопосередкованого гепатиту, індукованого Кон А, ці виявлені механізми мають вирішальне значення, оскільки система активація імуніопетентних клітин супроводжується оксидативним стресом і фрагментацією ДНК у лімфоцитах.

Результати нашого дослідження показали, що Кон А спричиняє імуніопосередковане ураження з вираженим пошкодженням ДНК у лімфоцитах тимуса та лімфатичних вузлів, що проявляється збільшенням ІДК та підвищенням всіх класів ушкодження (класи 1–4) за шкалою тесту на комети. Інгібітори ПАРП-1, 4-ГК та 3-АБА, достовірно зменшувало ступінь ушкодження ДНК, знижуючи частку клітин із тяжкими ушкодженнями та збільшуючи із мінімальними або відсутніми ушкодженнями. Це свідчить про генотоксичну дію Кон А на імуніопетентні клітини та ключову роль ПАРП-1 у каскаді ушкоджень, пов'язаних з імунною активацією та оксидативним стресом. Інгібітори ПАРП-1 є перспективними для корекції імуніопосередкованих ушкоджень, що відкриває шлях до нових терапевтичних стратегій при аутоімунних гепатитах та обґрунтовує необхідність подальших досліджень їхньої ефективності в клінічних моделях.

ВИСНОВКИ

1. Моделювання імуніопосередкованого гепатиту за допомогою Кон А спричиняє виражену генотоксичність у лімфоцитах тимуса та лімфатичних вузлів, що проявляється підвищенням інтегрального ІДК і розподілом частки клітин за шкалою комет-тесту від незначного до важкого ступеня ушкодження (класи 14).

2. Інгібітори ПАРП-1, 4-ГК і 3-АБА, ефективно зменшують ступінь ушкодження ДНК, знижуючи частку клітин із тяжкими ушкодженнями та сприяючи збереженню

клітин з інтактною ДНК, що свідчить про їхній протективний потенціал у зменшенні генотоксичних ефектів імунної відповіді.

3. Кон А індукуює ушкодження ДНК у лімфоцитах тимуса та лімфатичних вузлів, спричиняючи як некроз, так і апоптоз. 3-АБА знижує рівень некрозу у тимусі та лімфатичних вузлах без значного впливу на апоптоз.

The author of this study confirm that the research and publication of the results were not associated with any conflicts regarding commercial or financial relations, relations with organizations and/or individuals who may have been related to the study, and interrelations of co-authors of the article.

N.G. Grushka

THE EFFECT OF 4-HYDROXYQUINAZOLINE AND 3-AMINOBENZAMIDE ON DNA DAMAGE IN IMMUNOCOMPETENT CELLS DURING CONCAVALIN A-INDUCED HEPATITIS

Bogomolets Institute of Physiology, NAS of Ukraine, Kyiv; e-mail: grunay@i.ua

Concanavalin A (ConA) is a potent activator of immunocompetent cells, particularly T lymphocytes, and is capable of inducing liver damage and hepatitis. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) inhibitors have a pronounced protective effect in various experimental models of inflammation. Our study investigated the efficacy of PARP-1 inhibitors 4-hydroxyquinazoline (4-HQ) and 3-aminobenzamide (3-ABA) in preventing DNA damage and preserving the viability of thymus and lymph node cells under the conditions of modeling immune-mediated hepatitis induced by Con A to determine their potential cytoprotective effect and ability to reduce the risk of developing immunoinflammatory damage. It was found that the administration of Con A leads to a significant increase in the integral DNA damage index (IDI) in immunocompetent cells compared to the control group. Thus, in thymus cells, the IDC increased from 0.36 ± 0.03 to 1.80 ± 0.24 , in lymph node cells from 0.33 ± 0.07 to 1.82 ± 0.18 . The proportion of cells with all classes of DNA damage, ranging from minimal to severe, significantly increased, indicating a profound disruption of the genome's structural integrity in immunocompetent cells. Prophylactic administration of 4-HQ and 3-ABA significantly reduced the levels of DNA damage: 4-HQ led to a decrease in IDI from 1.8 ± 0.24 to 0.39 ± 0.06 , and under the action of 3-ABA to 0.83 ± 0.13 in thymus cells. A similar significant

decrease in IDI was also found in lymph node cells. In addition, under the action of 4-HQ and 3-ABA, the number of lymphocytes with severe damage (class 3 and 4) decreased, and those with intact DNA (class 0) increased. In addition, the use of the 3-ABA inhibitor led to an increase in the viability of immunocytes by reducing necrotic cell death, which indicates its pronounced cytoprotective effect. Thus, the study results show that Con A causes DNA damage in immunocompetent cells of both the central and peripheral immune system organs. 3-ABA and 4-HQ effectively reduce the degree of damage caused, demonstrating potential as therapeutic agents for preventing immunoinflammatory damage.

Key words: poly(ADP-ribose) polymerase; immune-mediated damage; concanavalin A; lymphocytes; DNA damage; cell death.

REFERENCES

1. AboElnazar SY, Ghoneim HE, Ghazy AA, et al. Concanavalin A as a model for induction of murine autoimmune hepatitis: Role of TNF- α and NF- κ B during the acute phase. *Egypt J Immunol.* 2020;27(2):19-30.
2. Liu Y, Hao H, Hou T. Concanavalin A-induced autoimmune hepatitis model in mice: Mechanisms and future outlook. *Open Life Sci.* 2022;17(1):91-101. doi:10.1515/biol-2022-0013
3. Wardi J, Ernst O, Lilja A, Aeed H, Katz S, Ben-Nachum I, et al. 3-Aminobenzamide prevents Concanavalin A-induced acute hepatitis by an anti-inflammatory and anti-oxidative mechanism. *Dig Dis Sci.* 2018;63(12):3382-97. doi:10.1007/s10620-018-5267-1. PMID:30196390.
4. Heymann F, Hamesch K, Weiskirchen R, Streetz KL, Trautwein C. The Concanavalin A model of acute hepatitis in mice. *Lab Anim.* 2015;49(1 Suppl):S23-31. doi:10.1177/0023677215572841.
5. Xu L, Wang H, Zhang Y, Liu Y, Li Y, Yang C, et al. Parthanatos initiated by ROS-induced DNA damage is involved in intestinal epithelial injury during necrotizing enterocolitis. *Cell Death Discov.* 2024;10(1):36. doi:10.1038/s41420-023-01746-w.
6. Meng X, Song W, Deng B, Xing Z, Zhang W. 3-aminobenzamide, one of poly(ADP-ribose)polymerase-1 inhibitors, rescues apoptosis in rat models of spinal cord injury. *Int J Clin Exp Pathol.* 2015 Oct 1;8(10):12207-15. PMID: 26722405.
7. Huang P, Chen G, Jin W, Mao K, Wan H, He Y. Molecular mechanisms of parthanatos and its role in diverse diseases. *Int J Mol Sci.* 2022;23(13):7292. doi:10.3390/ijms23137292. PMID:35806303; PMCID:PMC9266317.
8. Liu T, Zhang L, Joo D, Sun SC. NF- κ B signaling in inflammation. *Sign Transduct Target Ther.* 2017;2:17023. doi:10.1038/sigtrans.2017.23.
9. Zhang Y, Li W, Chen J, Xu D, Wang X, Liu H, et al. PARP1 promotes NF- κ B mediated inflammatory gene transcription by histone poly ADP-ribosylation in LPS-activated macrophages. *Epigenet Chromat.*

- 2024;17(1):50. doi:10.1186/s13072-024-00550-w.
10. Peralta-Leal A, Rodriguez-Vargas JM, Aguilar-Quezada R, et al. PARP inhibitors: new partners in the therapy of cancer and inflammatory diseases. *Free Radic Biol Med*. 2009;47(1):13-26. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2009.04.008.
11. Afanasieva K, Zazhytska M, Sivolob A. Kinetics of comet formation in single-cell gel electrophoresis: loops and fragments. *Electrophoresis*. 2010;31(3):512-19. doi:10.1002/elps.200900421.
12. Collins AR. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Mol Biotechnol*. 2004; 26(3): 249-61.
13. Collins AR. Measuring DNA modifications with the comet assay: a compendium of protocols. *Nat Protoc*. 2023 Mar;18(3):929-89. doi:10.1038/s41596-022-00754-y.
14. Shimizu S, Eguchi Y, Kamiike W, et al. Involvement of ICE family proteases in apoptosis induced by reoxygenation of hypoxic hepatocytes. *Am J Physiol*. 1996 Dec;271(6 Pt 1):C937-43.
15. Grushka NG, Pavlovych SI, Bryzghina TM, Sukhina VS, Makohon NV, Yanchii RI. Genotoxic stress and cell death pathways in the thymus and lymph nodes of mice under immune complex pathology. *Fiziol Zh*. 2015;61(1):28-34. [Ukrainian].
16. Pavlovych SI, Hrushka NG, Kondratska OA, Krasutska NO, Antoniuk VM, Meshko VV, Yanchii RI. Histostructural changes in immunocompetent organs, liver, and lungs during experimental endotoxemia induced by lipopolysaccharide. *Fiziol Zh*. 2024;70(5):66-71. [Ukrainian].
17. Tiegs G, Hentschel J, Wendel A. A T cell-dependent experimental liver injury in mice inducible by concanavalin A. *J Clin Invest*. 1992;90(1):196-203. doi:10.1172/JCI115836.
18. Luo Y, Shen Y, Liu B, et al. Flavonoids from *Rosa roxburghii* Tratt. protect thymus against ionizing radiation-induced injury by suppressing oxidative stress and DNA damage. *Aging (Albany NY)*. 2020;12(11):10661-83. doi:10.18632/aging.103688.
19. Virág L, Szabó C. The therapeutic potential of poly (ADP-ribose) polymerase inhibitors. *Pharmac Rev*. 2002;54(3):375-429. doi:10.1124/pr.54.3.375.
20. Fatokun AA, Dawson VL, Dawson TM. Parthanatos: mitochondrial-linked mechanisms and therapeutic opportunities. *Nat Rev Neurosci*. 2014 Jul;15(7):423-37. doi:10.1038/nrn3721.
21. Bryzghina TM, Sukhina VS, Hrushka NG, Makohon NV. Morphological manifestations of apoptosis in lymph node and thymus cells of mice following concanavalin A administration. *Ach Clin Exp Med*. 2007;16(3):36-41. [Ukrainian].
22. Brenner C, Galluzzi L, Kepp O, Kroemer G. Decoding cell death signals in liver inflammation. *J Hepatol*. 2013 Sep;59(3):583-94. doi: 10.1016/j.jhep.2013.03.033. Epub 2013 Apr 6. PMID: 23567086.
23. Biro A, Vaknine H, Cohen-Armon M, et al. The effect of poly(ADP-ribose) polymerase inhibition on aminoglycoside-induced acute tubular necrosis in rats. *Clin Nephrol*. 2016;85: 226-34.
24. Cover C, Fickert P, Knight TR, et al. Pathophysiological role of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) activation during acetaminophen-induced liver cell necrosis in mice. *Toxicol Sci*. 2005;84:201-8.

*Матеріал надійшов
до редакції 01.07.2025*