

Київський національний університет імені Тараса Шевченка
Міністерство освіти та науки України
Київський національний університет імені Тараса Шевченка
Міністерство освіти та науки України

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

АНДРІЙЧУК ТЕТЯНА РОСТИСЛАВІВНА

УДК 577.+612.438.014.481+612.438.014.46

ДИСЕРТАЦІЯ

**БІОХІМІЧНІ МЕХАНІЗМИ РЕАЛІЗАЦІЇ РАДІАЦІЙНО–ІНДУКОВАНОГО
АПОПТОЗУ**

03.00.04- біохімія

Подається на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело
_____ Андрійчук Т.Р.

Науковий консультант Остапченко Людмила Іванівна, доктор біологічних наук, професор

Київ – 2017

АНОТАЦІЯ

Андрійчук Т.Р. Біохімічні механізми реалізації радіаційно–індукованого апоптозу. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.04 – біохімія. – Київський національний університет імені Тараса Шевченка МОН України. – Київський національний університет імені Тараса Шевченка МОН України, Київ, 2017.

Дисертація присвячена дослідженню біохімічних механізмів реалізації програмованої клітинної загибелі, окресленої як апоптоз, в лімфоцитах тимусу та селезінки щурів за дії іонізуючої радіації в дозах 1,0 Гр і 7,78 Гр через 30 хв і 3 год після впливу. Вивчено ядерно-опосередкований, мітохондріальний та рецептор-залежний шляхи реалізації радіаційно–індукованого апоптозу.

Дія іонізуючої радіації, як безпосередньо через пошкодження структури нуклеопротейдних комплексів, так і за рахунок дисбалансу між експресією ряду анти- та проапоптотичних генів, призводить до активації ядерно-опосередкованого шляху клітинної загибелі.

Дослідження рівня одно-і дволанцюгових розривів ядерної ДНК в лімфоцитах тимусу та селезінки щурів продемонстрували значне підвищення показників, спричинене як безпосереднім впливом радіаційного чинника, так і за рахунок адитивного ефекту активних кисневих метаболітів (АКМ). Пошкодження ДНК ініціюють скоординовану відповідь з залученням системи сенсорних, трансдюсерних і ефекторних білків, які детектують пошкодження ДНК і при недостатній активності репараційних систем, уможливають запуск програмованої клітинної загибелі– апоптозу, активуючи NF-κB–опосередкований (дволанцюгові розриви ДНК) та p53 – залежний (одноланцюгові розриви ДНК) шляхи. Оцінку репараційних можливостей проводили, визначаючи активність полі(ADP-рибозо)полімерази (ПАРП). Нами встановлено різнонаправлені зміни активності ферменту у

лімфоцитах тимусу і селезінки щурів, що узгоджуються з теорією ранніх маркерів апоптозу та уможливають ескалацію Ca^{2+} , Mg^{2+} -залежного ендонуклеолізу за радіаційного впливу.

Реалізація ядерного шляху апоптозу безпосередньо пов'язана зі змінами в регуляції генної експресії завдяки функціонуванню ряду активованих радіаційним чинником редокс- респонсивних транскрипційних факторів – NF- κ B, p53, AP-1, під контролем яких знаходяться про-апоптотичні гени. Виявлені зміни вмісту наведених транскрипційних факторів вірогідно спричиняють сенсibiliзацію клітини до радіаційно-індукованого апоптозу за рахунок їх взаємної активації з подальшою стимуляцією експресії відповідних генів.

Відповідно до сучасних уявлень, провідну роль в радіаційно-індукованій програмованій загибелі відіграє DISC- апоптотична платформа, пов'язана з особливостями функціонування зовнішнього рецептор-опосередкованого шляху апоптозу. Відомо, що одним із найважливіших представників рецепторів смерті родини TNF, пов'язаних з радіаційно-індукованим апоптозом, є Fas-рецептори. Нами встановлено дозозалежні зміни рівня Fas в імунокомпетентних клітинах лімфоїдних органів після дії іонізуючої радіації.

Продемонстровано радіаційно-індуковані зміни в мітохондріальному компартменті, а саме порушення у роботі електронно-транспортного ланцюга, оціненого за МТТ-тестом, та вивільнення з міжмембранного простору мітохондрій проапоптотичного чинника AIF, який конвергує сигналінг мітохондріальної і ядерної ланки апоптозу. Залучення білків родини Bcl-2 до реалізації мітохондріального шляху апоптозу оцінювали за вмістом проапоптотичного члена родини – білка Вах. Встановлене підвищення рівня проапоптотичного білка Вах за обох доз випромінення в лімфоцитах тимусу і селезінки щурів може свідчити про його безпосередню участь як у процесах

пермебіалізації зовнішньої мембрани мітохондрій, так і в контролі та інтеграції різних шляхів індукції та реалізації апоптозу.

Встановлені особливості функціонування основних класів цистеїнових протеїназ свідчать про значний і специфічний внесок системи протеолізу у реалізацію радіаційно-індукованого апоптозу як за рахунок уможливлення проведення апоптотичного сигналу до відповідних клітинних компартментів, так і на рівні виконання ними ефекторної функції, що визначає основні морфологічні та біохімічні прояви апоптозу.

Нашими експериментальними дослідженнями показано зміну ферментативної активності основних класів цистеїнових протеїназ– ініціаторних каспаз (-8, -9) і виконавчих каспаз (-3, -6), каспази-2, калпаїнів та лізосомального катепсину В на початкових етапах розвитку радіаційно-обумовленої клітинної загибелі. Це вказує на комплексний характер індукції радіаційного апоптозу у лімфоцитах тимусу та селезінки щурів, зокрема на участь рецептор-залежного, мітохондріального та лізосомально-опосередкованого сигнальних каскадів.

Отримані нами дані свідчать про інтенсифікацію вільно-радикальних процесів за радіаційно-індукованого апоптозу у лімфоцитах тимусу і селезінки щурів за рахунок дисбалансу про– антиоксидантної системи.

Редокс-регуляція компонентів ядерного, рецептор-залежного, мітохондріального та лізосомально-опосередкованого сигнальних каскадів визначає їх залучення у радіаційно-індукований апоптоз, постулюючи оксидативний стрес як медіатор апоптозу.

Методом протокової цитометрії виявлено стадії перебігу апоптозу у лімфоцитах тимусу і селезінки щурів за дії променевого чинника в дозах 1,0 та 7,78 Гр (через 30 хв і 3 год після опромінення) та на фоні введення інозину. Наведені дані корелюють з багаторівневими ланками програми реалізації радіаційно-індукованого апоптозу імунокомпетентних клітин лімфоїдних органів.

Підсумовуючи представлені нами результати щодо впливу інозину на певні стадії перебігу радіаційно-індукованого апоптозу лімфоцитів тимусу і селезінки щурів, відмічаємо його нормалізуючий ефект на пластичний і енергетичний обмін та на відновлення про-антиоксидантного балансу. Виявлена можливість надходження інозину в імунокомпетентні клітини лімфоїдних органів з залученням пуринергічних A2a рецепторів та подальша активація MAP-кіназних каскадів– регуляторів стану клітинного метаболізму сприяла обґрунтуванню молекулярних механізмів цитопротекторних і антизапальних функцій інозину. Таким чином, інозин сприяє активації системної регуляції репараційних можливостей опроміненого організму в цілому.

Ключові слова: шляхи перебігу радіаційно-індукованого апоптозу; лімфоцити тимусу і селезінки щурів; оксидативний стрес; інозин.

SUMMARY

Andriichuk T.R. The biochemical mechanisms of the radiation-induced apoptosis. – Qualification scientific work on the rights of manuscripts.

The thesis for doctor of biological sciences degree in major 03.00.04 – biochemistry. – Taras Shevchenko National University of Kyiv, Ministry of Education and Science of Ukraine. – Taras Shevchenko National University of Kyiv, Ministry of Education and Science of Ukraine, Kyiv, 2017.

The thesis deals with the study of biochemical mechanisms of programmed cellular death, known as apoptosis, in rat thymus and spleen lymphocytes upon treatment with 1.0 Gy and 7.78 Gy ionizing radiation in 30 min and 3 hrs after exposure. Nuclear-mediated, mitochondrial and receptor-dependent pathways of apoptosis implementation were studied.

Action of ionizing radiation, both through direct damage of nucleoprotein complexes and violation of expression pattern of anti- and proapoptotic genes, leads to the activation of nuclear-mediated pathway of cellular death.

The research revealed significant increase in the level of single- and double-stranded nuclear DNA brakes in rat thymus and spleen lymphocytes. It was caused both by direct action of radiation agent, and by additive effect of reactive oxygen species (ROS). DNA damage initiates coordinated response with the involvement of sensory, transducing and effector proteins that detect DNA defects and (upon low activity of reparation systems) favor initiation of programmed cellular death, apoptosis, through activation of NF- κ B-mediated (double-stranded DNA brakes) and p53-dependent (single-stranded DNA brakes) pathways. Reparation capacity of cells was assessed on the basis of poly(ADP-ribose)polymerase (PARP) activity. Differently directed changes of enzymatic activity in rat thymus and spleen lymphocytes were established; such changes are in accordance with the theory of early apoptotic markers, and they favor escalation of Ca^{2+} , Mg^{2+} -dependent endonucleolysis upon radiation treatment.

Realization of apoptotic nuclear pathway is directly linked with changes in gene expression regulation due to activity of various radiation-induced redox-responsive transcription factors, such as NF- κ B, p53, and AP-1, which control proapoptotic genes. Revealed changes in the level of mentioned transcription factors probably could cause cellular sensibilization to apoptosis through their mutual activation with the following stimulation of corresponding genes' expression.

According to current concepts, leading role in radiation-induced programmed cell death has DISC – apoptotic platform associated with operating features of external receptor-mediated apoptotic pathway. Fas-receptors are known to be one of the most important representatives of receptors from TNF family linked with radiation-induced apoptosis. Dose-dependent changes of Fas level in immune competent cells of lymphoid organs after radiation exposure were also established.

Radiation-induced changes in mitochondrial compartment were also demonstrated: disturbance of electron-transport chain, as assessed with MTT-test, and release of apoptotic protein AIF, which converges signaling of mitochondrial and nuclear pathways, from mitochondrial intermembrane space into cytosol. Implication of Bcl-2 proteins in realization of mitochondrial pathway of apoptosis was estimated from the level of Bax protein, which is a pro-apoptotic member of Bcl-2 family. Observed upregulation of pro-apoptotic Bax protein under both treatment doses in rat thymus and spleen lymphocytes suggests its direct implication both in permeabilization of external mitochondrial membrane, and in control and integration of different pathways of apoptosis induction and realization.

Established functional features of main classes of cysteine proteinases suggest significant and specific contribution of proteolytic system to realization of radiation-induced apoptosis. It involves transduction of apoptotic signal to appropriate cellular compartments, and implementation of their effector function, which determines main morphological and biochemical manifestations of apoptosis.

Performed experimental study showed changes in enzymatic activity of main classes of cysteine proteinases, initiator caspases (-8, -9) and executive caspases (-3, -6), caspase-2, calpains and lysosomal cathepsin B, at the beginning stages of radiation-induced cellular death. Our results suggest complex mechanisms of radiation-induced apoptosis induction in rat thymus and spleen lymphocytes, in particular, implication of receptor-dependent, mitochondrial and lysosomal-mediated signaling cascades.

The research revealed intensification of free-radical processes upon action of X-rays on rat thymus and spleen lymphocytes, which was caused by violation of pro-/antioxidant balance in the cells.

Redox-regulation of various components of nuclear, mitochondrial and receptor-dependent signaling pathways predetermines their involvement in radiation-induced apoptosis, thus suggesting that oxidative stress is an apoptotic mediator.

Flow cytometry analysis revealed the apoptotic stages in rat thymus and spleen lymphocytes upon treatment with 1.0 Gy and 7.78 Gy (in 30 min and 3 hrs after exposure), and administration of inosine. The data listed in the thesis correlate with multilevel program of implementation of radiation-induced apoptosis in immune competent cells of lymphoid organs.

Given all the results on inosine effects on specific stages of radiation-induced apoptosis in rat thymus and spleen lymphocytes, we can point out its modifying impact on various elements of regulatory network of cellular response to radiation factor. Normalizing effect of inosine on plastic and energetic metabolism, as well as its ability to restore redox balance in rat thymus and spleen lymphocytes upon radiation treatment was established.

Possibility of inosine influx into immune competent cells of lymphoid organs with implication of purinergic A_{2A} receptors and following activation of MAP-kinase cascades, regulators of cellular metabolism, provided basis to justify molecular mechanisms of cytoprotective and anti-inflammatory effects of inosine. Thus, inosine promotes activation of comprehensive regulation of reparation systems in irradiated organism as a whole.

Keywords: radiation-induced apoptosis pathways; rat spleen and thymus lymphocytes; oxidative stress; inosine.

Список публікацій здобувача

1. Кучеренко МЄ, редактор. Радіаційно-індукована структурно-метаболична модифікація ентероцитів та лімфоїдних клітин Київ: Фітосоціоцентр; 2006. Цудзевич БО, **Андрійчук ТР**, Ракша НГ. Дослідження обміну пуринів в імунокомпетентних клітинах щурів за променевого ураження та при введенні рибоксину; с.148-201.
2. Пархомець ЮП, **Андрійчук ТР**, Харсун ВА, Цудзевич БО. Етапи деградації хроматину тимоцитів щурів, загиблих шляхом апоптозу. Вісник Київського університету. 1998;27:9-11.
3. **Андрійчук ТР**, Цудзевич БО, Кучеренко МЄ, Білокінь ЮМ, Кудіна НГ. Вплив низьких доз іонізуючої радіації на стан про- та антиоксидантних систем тимоцитів щурів. Доповіді НАН України. 2002;5:179-182.
4. Цудзевич БО, **Андрійчук ТР**, Кудіна НГ. Вплив іонізуючої радіації та інгібіторів енергетики мітохондрій на міжнуклеосомну фрагментацію ДНК у тимоцитах щурів. Вісник КНУ імені Тараса Шевченка. Сер.: Біологія. 2002;37:91-3
5. **Андрійчук ТР**, Кудіна НГ, Цудзевич БО. Вплив рентгенівського опромінення на метаболізм пуринів у лімфоцитах щурів. Вісник КНУ імені Тараса Шевченка. Сер.: Біологія. 2003;39:19-20.
6. **Андрійчук ТР**, Драган ЛП, Ракша НГ. Радіаційно -індуковані порушення ДНК у тимоцитах щурів. Вісник КНУ імені Тараса Шевченка. Сер.: Біологія. 2004;43:55-6.
7. **Andriychuk T**, Dragan L, Raksha N. Oxidant-dependent proteolysis in radiation-induced lymphoid cell death. *Annales Universitatis Mariae Curie-Sklodowska, Lublin-Polonia. Sectio DDD: Pharmacia.* 2004;XVII(2):353-5.
8. **Андрійчук ТР**, Драган ЛП, Полякова ВВ, Ракша НГ, Цудзевич БО. Активність полі(АДФ-рибозо)-полімерази і рівень одно- та дволанцюгових

розривів ДНК в спленоцитах щурів за дії рентгенівського опромінення. Вісник проблем біології і медицини. 2007;3:28-31.

9. **Андрійчук ТР**, Ракша НГ, Лугова СЛ, Драган ЛП, Цудзевич БО. Вплив рибоксину на виживання та метаболічну активність лімфоцитів тимуса за променевого ураження. Медична хімія. 2008;2:41-5.

10. Polyakova V, Dragan L, Raksha N, **Andriychuk T**. Influence of riboxine on radiation-induced proteolysis in rat splenocytes. Annales Universitatis Mariae Curie-Sklodowska, Lublin-Polonia. 2008;XXI(1) 47(Sectio DDD):261-3.

11. Драган ЛП, Ракша НГ, **Андрійчук ТР**. Вплив іонізуючої радіації та рибоксину на стан системи полі-АДФ-рибозилування лімфоцитів селезінки щурів. Медична хімія. 2009;11(3):124-6.

12. **Андрійчук Т**, Ракша Н, Драган Л, Лугова С. Залучення ферментів родини каспаз у радіаційно-індукований апоптоз лімфоцитів щурів. Вісник КНУ імені Тараса Шевченка. Сер.: Проблеми регуляції фізіологічних функцій. 2010;13:48-52.

13. **Андрійчук ТР**. Редокс-чутливі ланки радіаційно-індукованого апоптозу. Вісник КНУ імені Тараса Шевченка. Сер.: Біологія. 2014;2:58-62.

14. Дмитренко НП, **Андрійчук ТР**, Кишко ТО, Юркина ВВ, Цудзевич БА. Определение повреждений ДНК в непролиферирующих клетках животных. Укр. биохим. журнал. 1997;69(1):69-71.

15. Цудзевич БО, Пархомиць ЮП, **Андрійчук ТР**, Юркина ВВ. Вплив іонізуючої радіації на деградацію хроматину тимоцитів щурів. Укр. біохім. журнал. 1998;70(4):105-10.

16. Гаділія ОП, **Андрійчук ТР**, Меркулов СП, Остапченко ЛІ, Кучеренко МЄ. Вплив препаратів "Аммівіт" та "Церулоплазмін" на вміст продуктів пероксидного окислення ліпідів та показники антиоксидантної системи за дії радіації. Укр. біохім. журнал. 2002;74(1):97-100.

17. **Андрійчук ТР**, Кудіна НГ, Цудзевич БО. Активність ферментів пуринового обміну в тимоцитах щурів за променевого ураження та введення їм рибоксину. Укр. біохім. журнал. 2003;75(2):109-12.
18. Ракша НГ, **Андрійчук ТР**, Кучеренко МЄ. Участь ксантиноксидазної системи в розвитку оксидативного стресу за дії променевого чинника. Біополімери і клітина. 2006;22(2)132-5.
19. **Андрійчук ТР**, Ракша НГ, Цудзевич БО, Остапченко ЛІ. Участь протеолітичних ферментів у радіаційно-індукованому апоптозі лімфоцитів тимуса щурів. Укр. біохім. журнал. 2009;3:102-7.
20. Полякова ВВ, Ракша НГ, Драган ЛП, **Андрійчук ТР**. Вплив рибоксину на процеси пероксидного окислення ліпідів та активність антиоксидантних ензимів в тимоцитах щурів в умовах променевого ураження. Укр. біохім. журн. 2010;82(4):48-52.
21. Dragan L, **Andriychuk T**, Ostapchenko L. Structural biochemical assessment of the status of the nuclear apparatus of the rat spleen lymphoid cells under radiation treatment. *Annales Universitatis Mariae Curie-Sklodovska, Lublin-Polonia*. 2010; XXIII(2)(30)(Sectio DDD):199-202.
22. Драган ЛП, Ракша НГ, **Андрійчук ТР**. Радиационно-индуцированные изменения состояния системы АДФ-рибозилирования лимфоцитов тимуса крыс и их модификация рибоксином. Сборник статей по материалам науч. конф. с международным участием Нейрогуморальные механизмы регуляции висцеральных органов и систем в норме и при патологии; 2009 окт. 22-23; Томск. Томск: СибГМУ;2009:118-120.
23. **Андрійчук ТР**, Ракша НГ, Луговая СЛ, Мандрык СЯ, Остапченко ЛІ. Влияние ионизирующей радиации на индукцию и реализацию программированной клеточной гибели. Сборник статей по материалам Международ. конф. Биологические эффекты малых доз ионизирующей радиации и радиоактивное загрязнение среды; 2014 март 17-21; Сыктывкар.

Сыктывкар: Редакционно-издательский отдел Коми НЦ УрО РАН; 2014:11-14.(ISBN 978-5-89606-510-4©).

24. Андрійчук Т.Р. Радиационно-индуцированный апоптоз клеток иммунокомпетентных органов / Цудзевич Б.А., Пархомец Ю.П., Андрійчук Т.Р., Юркина В.В., Кучеренко Н.Е. // III съезд по радиационным исследованиям, 14-17 окт. 1997 г.: тез.докл. Т.1. – М., 1997. – С. 136-137.

25. Андрійчук Т.Р. Деградація ДНК імунікомпетентних клітин за променевого ураження / Цудзевич Б.О., Пархомець Ю.П., Андрійчук Т.Р., Юркіна В.В. // VII Укр. біохімічний з'їзд: 1997 р.: тези доп., ч.3. – К., 1997. – С.134-135.

26. Андрійчук Т.Р. Закономірності деградації структури ДНК за променевого ураження / Пархомець Ю.П., Андрійчук Т.Р., Юркіна В.В., Цудзевич Б.О. // II з'їзд Укр. біофізичного товариства, 29 черв. – 3 лип. 1998 р.: тези доп. – Х., 1998. – С.231.

27. Андрійчук Т.Р. Участие системы ксантинооксидаза/ ксантиндегидрогеназа в радиационно–индуцированном апоптозе клеток иммунокомпетентных органов / Т.Р. Андрійчук, Н. Г. Кудина, Б. А. Цудзевич // IV съезд по радиационным исследованиям, 20-24 нояб. 2001 г.: тез. докл.– Т.1. – М., 2001. – С. 343.

28. Андрійчук Т.Р. Активність ферментів обміну пуринів за рентгенівського опромінення та на фоні інозину / Н. Г. Кудина, Андрійчук Т.Р., Л. П. Сорокіна, Б. О. Цудзевич // VIII Укр. біохімічний з'їзд, 1-3 жовтн. 2002 р.,- Ч.,: матер. – Укр. біохім. журн. – 2002. – Т.74, № 4 б (дод. 2). – С.226.

29. Андрійчук Т.Р. Рівень деградації хроматину тимоцитів щурів за умов ініціації апоптозу / Т.Р. Андрійчук, Н. Г. Кудина, Б. А. Цудзевич, В. В. Полякова // III з'їзд Укр. біофізичного товариства, 2002 р.: збірник тез. – Л., 2002. – С.13.

30. Андрійчук Т.Р. Ферменти метаболізму пуринів за променевого ураження організму / Ракша Н.Г., Андрійчук Т.Р. // Психофізіологічні та вісцеральні функції в нормі і патології: Всеукраїнська наук. конф., 3-4 жовт. 2002 р.: тези доп. – К., 2002. – С.13.
31. Андрійчук Т.Р. Влияние ионизирующей радиации и инозина на состояние ферментных систем обмена пуринов / Цудзевич Б.А, Кудина Н.Г., Сорокина Л.П., Андрійчук Т.Р. // III Международный симпозиум «Механизмы действия сверхмалых доз», 3-6 декаб. 2002 г.: тез. докл. – М., 2002. – С.144.
32. Andriychuk T.R. The influence of ionizing radiation upon the state of chromatin of the cells from immunocompetent rat's organs / Andriychuk T.R., Kudina N.G., Dragan L.P., Tszudzevich V.A. // III з'їзд з радіаційних досліджень (радіобіологія і радіоекологія), 21-25 трав. 2003 р.: тези доп. – К., 2003. – С.18.
33. Андрійчук Т.Р. Оцінка впливу іонізуючої радіації на окиснювальну модифікацію білків / Н.Г. Кудіна, Т.Р. Андрійчук, Сорокіна Л.П. // Актуальные вопросы современного естествознания: Всеукраинская конф. молод. ученых, 11-13 апр. 2003 г.: тезисы . – С., 2003. – С.50.
34. Андрійчук Т.Р. Радиационно–индуцированные изменения активности ферментов пуринового обмена на фоне рибоксина /Т.Р. Андрійчук, Н. Г. Ракша, Л. П. Драган // Медико–биологические проблемы противолучевой и противохимической защиты: Российская науч. конф., 2004 г.: сборник тез. – Санкт-Петербург, 2004. – С. 48.
35. Andriychuk T.R. Role of poly(ADP)ribosylation in radiation–induced apoptosis of immunocompetent cells / Andriychuk T.R., L. P. Dragan, N. G. Raksha, M.E. Kucherenko // 5th Parnas Conference “Molecular mechanism of cellular signaling”, April 27-29, 2005, Jalta. - Укр. біохім. журн.(спеціальний випуск). – 2005. – Т. 77, № 2. – С. 93.

36. Андрійчук Т.Р. Участь цистеїнових протеїназ в апоптозі спленоцитів за променевого ураження / Андрійчук Т.Р., Л. П. Драган, Н. Г. Ракша, Б.О.Цудзевич // Радіобіологічні ефекти: ризики, мінімізація, прогноз: Міжнарод. конф., 22-24 берез. 2005 р.: матер.конф. – К., 2005. – С. 14.
37. Андрійчук Т.Р. Участие лизосомальных факторов в реализации программированной клеточной гибели (апоптозе) / Андрійчук Т.Р., Ракша Н.Г., Драган Л.П. // Современные проблемы науки и образования: Международ. междисциплинар. конф., 30 апр. – 9 мая 2005 г.: матер. конф. – Х., 2005. – С. 70.
38. Andriychuk T.R. Caspases-mediated regulation of poly(ADP-ribose)polymerase activity during radiation-induced apoptosis / T.R. Andriychuk, N. G. Raksha, L. P. Dragan, V. A. Tszudzevich // IX Укр. біохімічний з'їзд, 24-27 жовтн. 2006 р. – Х.: матер. – Укр. біохім. журн. – 2006. – Т. 1. – С. 95.
39. Андрійчук Т.Р. Радіаційно-індуковані порушення ДНК у спленоцитах щурів та їх модифікація рибоксином / В. В. Полякова, Л.П. Драган, Андрійчук Т.Р., Н. Г. Ракша / IX Укр. біохімічний з'їзд, 24-27 жовтн. 2006 р. – Х.: матер. – Укр. біохім. журн. – 2006. – Т. 2. – С. 218.
40. Андрійчук Т.Р. Влияние ионизирующей радиации и инозина на состояние системы поли-АДФ-рибозилирования лимфоцитов тимуса / Т.Р. Андрійчук, Н. Г. Ракша, Л. П. Драган, Б. О. Цудзевич // V съезд по радиационным исследованиям (радиобиология, радиоэкология, радиационная безопасность), 10-14 апр. 2006 г.: тез. докл. – М., 2006. – С.19.
41. Andriychuk T.R. Radiation-induced apoptosis: relationship between main executioners / Andriychuk T.R. N. G. Raksha, V.V. Polyakova, L. P. Dragan, V. A. Tszudzevich // The 35th Annual Meeting of the European Radiation Research Society and The 4th Annual Meeting of the Ukrainian Society for Radiation Biology, 22-25 Aug. 2006: abstracts. – К., 2006. – P. 65.
42. Андрійчук Т.Р. Вплив препарату рибоксину на життєздатність клітин селезінки за дії променевого чинника / Андрійчук Т.Р., Ракша Н.Г. // IV з'їзд

Українського біофізичного товариства: 19 -21 груд. 2006 р.: збірник тез. – Д., 2006. – С.105-106.

43. Андрійчук Т.Р. Оцінка структурного стану ядерних нуклеїнових кислот лімфоцитів селезінки щурів за дії іонізуючої радіації та на фоні введення рибоксину / Л. П. Драган, В. В. Полякова, С. Л. Луговая, Л. П. Бучацький, Андрійчук Т.Р. // IV з'їзд Українського біофізичного товариства: 19 -21 груд. 2006 р.–2006 р.: збірник тез. – Д., 2006. – С. 46-47.

44. Андрійчук Т.Р. Модифікуючий вплив препарату рибоксину на функціонування лімфоїдних клітин за опромінення / Андрійчук Т.Р., Ракша Н.Г., Драган Л.П., Цудзевич Б.О. // Віддалені наслідки впливу іонізуючого випромінювання: Міжнарод. науково-практ. конф., 23-25 трав. 2007 р.: тези доп. - К., 2007 - С. 5-6.

45. Andriychuk T. Signal transduction factors in apoptosis induced by ionizing radiation / T. Andriychuk, N. Raksha, L. Dragan // II З'їзд Укр. товариства клітинної біології, 23-26 жовтн. 2007 р.: збірник тез. – К., 2007. – С. 271.

46. Андрійчук Т.Р. Радиационно-индуцированные изменения активности катепсина В в спленоцитах / Полякова В.В., Драган Л.П., Ракша Н.Г., Андрійчук Т.Р. // Медико- биологические проблемы токсикологии и радиологии: Росс. науч. конф., Санкт-Петербург, 2008 г.: матер. – Вестник Росс. Военно-Мед. академии. – 2008. – Приложение 1. –№3 (23). – С.137.

47. Андрійчук Т.Р. Кальпаин-зависимый протеолиз при радиационно-индуцированной клеточной гибели / Андрійчук Т.Р., Ракша Н.Г., Луговая С.В. // Окружающая среда и здоровье человека: Второй Санкт-Петербургский международный экологический форум; Санкт-Петербург, 2008 г.: матер. – Вестник Росс. Военно-Мед. академии. – 2008. – Приложение 2.-Часть 1. - №3 (23). – С. 231.

48. Andriychuk T. Role of cytoplasmic and nuclear signaling in apoptotic death of lymphocytes under x-irradiation / T. Andriychuk, N. Raksha, S. Andreychenko, A.

Клепко // 36th annual meeting of the European Radiation research Society, 2008.: abstracts. – Paris, 2008. – V.43, № 5. – P.146.

49. Андрійчук Т.Р. Інтенсивність процесів ПОЛ за дії іонізуючої радіації та можливі шляхи їх корекції / Драган Л.П., Андрійчук Т.Р., Полякова В.В., Ракша Н.Г. // Психофізіологічні та вісцеральні функції в нормі і патології: IV Міжнарод. наук. конф., 8-10 жовт. 2008 р.: тези доп. – К., 2008. – С. 74-75.

50. Андрійчук Т.Р. Особливості функціонування системи антиоксидантного захисту за дії променевого чинника / Ракша Н.Г., Андрійчук Т.Р., Полякова В.В., Драган Л.П., Лугова С.Л. // Біофізичні механізми функціонування живих систем: IV Міжнарод. наук. конф., 16-18 жовт. 2008 р.: тези доп. – Л., 2008. – С.6.

51. Andriychuk T. Influence of inosine on oxidative homeostasis of immunocompetent cells under exposure to low dose ionizing radiation / T. Andriychuk, N. Raksha, S. Andreychenko, A. Klepko // 7 International Meeting on the Effects of Low Doses of Radiation in Biological System: New perspectives on human exposure, 27-29 Nov. 2008: abstracts.– Lisbon, 2008. – P.150.

52. Andriychuk T. Role of proteolytic enzymes in rat's lymphocytes apoptosis under x-ray exposure / T. Andriichuk, N. Raksha, L. Ostapchenko // 34th FEBS Congress Life's Molecular Interaction, 4-9 Jul. 2009: abstracts. – Prague, 2009. – P. 186.

53. Andriychuk T. Regulation of the intrinsic apoptosis pathway under X-ray irradiation / N. Raksha, S. Lugovaya, T. Andriichuk // VII Parnas Conference on Biochemistry and Molecular Biology, 3-7 Oct 2009.– Yalta. – Укр. біохім. журнал (спец. випуск). – 2009. – Т.81, № 4. – С. 115.

54. Андрійчук Т. Р. Окисний стресс як медіатор радіаційно-індукованого апоптозу / Т. Р. Андрійчук, Н. Г. Ракша, Л. П. Драган, В. В. Полякова, С. Л. Луговая, Б. О. Цудзевич // X Укр. біохімічний з'їзд, 13-17 верес. 2010 р. – Одеса: матер. – Укр. біохім. журн. – 2010. – Т.82, №4 (дод. 1). – С.152-153.

55. Андрийчук Т.Р. Активация каскада протеолитических ферментов в условиях радиационно–индуцированного апоптоза / Т. Р. Андрийчук, Н. Г. Ракша, Б. О. Цудзевич // VI съезд по радиационным исследованиям (радиобиология, радиоэкология, радиационная безопасность), 25– 28 окт. 2010 г.: сборник тез. – М., 2010. – С. 13.
56. Андрійчук Т.Р. Механізми активації ксантинооксидази за апоптозу, індукованого дією променевого чинника / Ракша Н.Г., Лугова С.Л., Андрийчук Т.Р. // Психофізіологічні та вісцеральні функції в нормі і патології: V Міжнарод. наук. конф., 6-8 жовтн. 2010 р.: тези доп. – К., 2010. – С. 168.
57. Andriychuk T. R. Metabolic role of free radical reactions under radiation–induced apoptosis / N. G. Raksha, T. R. Andriychuk, L. I. Ostapchenko // VIII Parnas Conference, 27-31 august 2011: abstracts. – Warsaw, 2011. – P. 48.
58. Andriichuk T. Lysosomal –dependent apoptosis of lymphocytes under irradiation conditions / Andriichuk Tetiana, Raksha Natalia, Ostapchenko Liudmila, Lugovaya Svitlana // International symposium on cell biology jointly with 3rd Ukrainian Congress for cell biology, 16-20 may 2012.: abstracts. – Yalta, 2012. – P. 109.
59. Андрійчук Т. Участь проапоптотичних факторів у радіаційно–індукованому апоптозі / Імедадзе А., Ракша Н., Лугова С., Андрійчук Т. // Молодь і поступ біології: VII Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів, 3-6 квітня 2012 р.: зб. тез – Л, 2012. – С.48.
60. Андрійчук Т.Р. Стан системи протеолізу та шляхи корекції за радіаційно–індукованого апоптозу / Андрійчук Т.Р., Ракша Н.Г. // Конференція «Адаптационные стратегии живых систем», 11-16 июня 2012, Новый Свет, АР Крым, Украина . – С. 212.
61. Андрийчук Т.Р. Модифицирующее влияние препарата рибоксина на редокс–чувствительные звенья радиационно–индуцированного апоптоза / Т.Р. Андрійчук, Н. Г. Ракша, С. Я. Мандрык, С. Л. Луговая, Б. О. Цудзевич //

Российская конференция «Острые проблемы разработки противолучевых средств: консерватизм или модернизация», 13-14 ноября 2012 г.: сборник тезисов. – М., 2012. – С. 29.

62. Андрійчук Т.Р. Радіаційно–індукований апоптоз як шлях загибелі імунотетентних клітин лімфоїдних органів / Т.Р. Андрійчук, Л. І. Остапченко // X Международная Крымская конференция «Космос и биосфера», 23-28 сентября 2013г.: сборник тез. – К., 2013. – С. 103.

63. Andriichuk T. R. The study of poly (ADP–ribose)polymerase(PARP) function as a molecular regulator during radiation – induced apoptosis / Andriichuk Teiana R.Lugova Svitlana L., Mandryk Sergii Ya., Ostapchenko Liudmila I. // IX Jakub K. Parnas Conference “Proteins from Birth to Death”, Sept 29-Oct 2, 2013.: abstracts. – Jerusalem, 2013. – P. 55.

64. Андрійчук Т. Р. Біохімічні шляхи реалізації радіаційно–індукованого апоптозу / Т. Р. Андрійчук, Н. Г. Ракша, Л. І. Остапченко // XI Укр. біохімічний конгрес, 6-10 жовтн. 2014 р. – К., матер. – The Ukrainian Biochemical Journal- 2014. – Vol.86, №5 (Suppl.) – P.124-125.

65. Андрійчук Т. Р. Некоторые аспекты реализации радиационно–индуцированного апоптоза / Т. Р. Андрійчук, Н. Г. Ракша, Л. И. Остапченко, Б. О. Цудзевич // VII Съезд по радиационным исследованиям (радиобиология, радиоэкология, радиационная безопасность), 21-24 октября 2014 г.: сборник тезисов. – М., 2014. – С. 17.

66. Андрійчук Т.Р. Залучення рецептор-опосередкованого шляху у проведення апоптогенного сигналу за дії іонізуючої радіації / Андрійчук Т.Р., Лугова С.Л., Ракша Н.Г. // Психофізіологічні та вісцеральні функції в нормі і патології: VII Міжнарод. наук. конф., 7-9 жовт. 2014 р.: тези доп. – К., 2014. – С. 22.

67. Andriychuk T. Some aspects of radiation–Induced apoptosis / T. Andriychuk, L. Ostapchenko // Third International Conference on Radiation and Application in

Various fields of research, 8-12 June 2015: abstracts. – Budva, Montenegro, 2015. – P. 443.

68. Andriychuk T. ATP– dependent steps of radiation–induced apoptosis / T. Andriychuk, N. Raksha, S. Lugova, L. Ostapchenko // Fourth International Conference on Radiation and Application in Various fields of research, 23-27 May 2016: abstracts. – Nis, Serbia, 2016. – P. 354.

69. Andriychuk T. Implication of the transcription factor NF–KB in pro–/antioxidant system function under radiation injury / T. Andriychuk, N. Raksha, S. Lugova, L. Ostapchenko // International Symposium on Cell Biology jointly with 5th Ukrainian Congress for Cell Biology, 2-6 Oct. 2016: abstracts. – Odessa, 2016. – P. 29.

70. Andriychuk T. The role of xanthine oxidase system in rat's lymphocytes apoptosis under X–ray exposure / T. Andriychuk, N. Raksha, S. Lugova, L. Ostapchenko // Fifth International Conference on Radiation and Applications in Various Fields of Research, 12-16 June 2017: abstracts. – Budva, Montenegro, 2017. – P. 13.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ	25
ВСТУП.....	26
РОЗДІЛ 1 БІОХІМІЧНІ МЕХАНІЗМИ АПОПТОЗУ	35
1.1 Молекулярні шляхи реалізації апоптозу.....	36
1.2 Модифікуючі ефекти інозину на перебіг радіаційно– індукованого апоптозу	46
РОЗДІЛ 2 МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	50
2.1 Дизайн експерименту.....	50
2.2 Метод виділення лімфоцитів тимусу і селезінки щурів та визначення їх життєздатності	51
2.3 Визначення рівня одно- та дволанцюгових розривів ядерної ДНК.....	51
2.4 Визначення рівня полідезоксирибонуклеотидів (ПДН).....	51
2.5 Електрофорез ДНК в агарозному гелі	52
2.6 Метод визначення активності полі(ADP-рибозо)полімерази	53
2.7 Визначення вмісту НАД ⁺	53
2.8 Визначення вмісту транскрипційного фактору NF-κB.....	54
2.9 Отримання цитоплазматичної та ядерної фракції лімфоцитів тимусу та селезінки щурів.....	54
2.10 Визначення вмісту транскрипційного фактору p53.....	55
2.11 Електрофоретичний аналіз білків.....	55
2.12 Імуноблот-аналіз.....	56
2.13 Визначення активності цистеїнових протеїназ родини каспаз: каспази -2, каспази –3, каспази -6, каспази -8, каспази -9.....	57
2.14 Оцінка ступеня функціональної активності мітохондрій з використанням МТТ	57

2.15	Визначення активності катепсину В	58
2.16	Визначення активності калпаїнів.....	58
2.17	Визначення протеасомної активності	59
2.18	Визначення концентрації білка	60
2.19	Визначення вмісту ТБК-активних продуктів	60
2.20	Визначення швидкості генерування супероксидних аніон- радикалів	61
2.21	Визначення супероксиддисмутазної активності	61
2.22	Визначення каталазної активності	62
2.23	Визначення ксантиноксидазної активності	63
2.24	Дослідження ступеня окисної модифікації білків	63
2.25	Визначення стадій клітинної загибелі методом протокової цитометрії	64
2.26	Визначення вмісту АТФ	64
2.27	Дослідження катаболізму пуринів	65
2.28	Визначення активності ферментів пуринового обміну.....	66
2.28.1	Визначення активності аденозиндезамінази, 5'-нуклеотидази, АМФ-дезамінази, аденілаткінази	66
2.28.2	Визначення активності пурипнуклеозидфосфорилази	68
2.29	Статистичний аналіз результатів досліджень	68

РОЗДІЛ 3. ЯДЕРНО-ОПОСЕРЕДКОВАНИЙ ШЛЯХ РЕАЛІЗАЦІЇ РАДІАЦІЙНО-ІНДУКОВАНОГО АПОПТОЗУ.....

3.1	Дослідження структурного стану ДНК у лімфоцитах тимусу і селезінки щурів за дії іонізуючої радіації та на фоні введення інозину	71
3.1.1	Дослідження рівня одно- та дволанцюгових розривів ДНК у лімфоцитах тимусу і селезінки щурів за дії іонізуючої радіації	72

та на фоні введення інозину	
3.1.2 Дослідження рівня полідезоксирибонуклеотидів (ПДН) за дії іонізуючої радіації та на фоні введення інозину.....	76
3.1.3 Активність полі(ADP-рибозо)полімерази (ПАРП) та вміст НАД ⁺ за дії іонізуючої радіації та на фоні введення інозину	83
3.2 Оцінка рівня транскрипційних факторів та активності каспази-2 у лімфоцитах тимусу і селезінки щурів за дії іонізуючої радіації	90
3.2.1 Рівень транскрипційного фактору NF-κB у лімфоцитах тимусу і селезінки щурів за дії іонізуючої радіації	90
3.2.2 Рівень транскрипційного фактора p53 у лімфоцитах тимусу і селезінки щурів за дії іонізуючої радіації.....	95
3.2.3 Рівень транскрипційного фактора AP-1 у лімфоцитах тимусу і селезінки щурів за дії іонізуючої радіації	100
3.2.4 Активність каспази-2 у лімфоцитах тимусу і селезінки щурів за дії іонізуючої радіації	105
РОЗДІЛ 4. РЕЦЕПТОР-ОПОСЕРЕДКОВАНИЙ ШЛЯХ РЕАЛІЗАЦІЇ РАДІАЦІЙНО-ІНДУКОВАНОГО АПОПТОЗУ.....	111
4.1 Рівень Fas-рецептора та активність каспази-8 у лімфоцитах тимусу і селезінки щурів за дії іонізуючої радіації	112
РОЗДІЛ 5. МІТОХОНДРІАЛЬНО-ОПОСЕРЕДКОВАНИЙ ШЛЯХ РЕАЛІЗАЦІЇ РАДІАЦІЙНО –ІНДУКОВАНОГО АПОПТОЗУ	120
5.1 Оцінка ступеня функціональної активності мітохондрій у лімфоцитах тимусу і селезінки щурів за дії іонізуючої радіації та на фоні введення інозину	122
5.2 Вміст білка Вах – члена родини Bcl-2 у лімфоцитах тимусу і селезінки щурів за дії іонізуючої радіації	125
5.3 Активність каспази-9 та рівень AIF у лімфоцитах тимусу і селезінки щурів за дії іонізуючої радіації	130

РОЗДІЛ 6. ЗАЛУЧЕННЯ КАСПАЗО-НЕЗАЛЕЖНИХ ПРОТЕОЛІТИЧ-	139
НИХ КАСКАДІВ У РАДІАЦІЙНО-ІНДУКОВАНИЙ АПОПТОЗ	
6.1 Активність лізосомальної протеїнази катепсину В у лімфоцитах	139
тимусу і селезінки щурів за дії іонізуючої радіації та на фоні	
введення інозину	
6.2 Активність Ca^{2+} -залежних протеїназ калпаїнів у лімфоцитах	145
тимусу і селезінки щурів за дії за дії іонізуючої радіації та на	
фоні введення інозину	
6.3 Протеасомна активність в лімфоцитах тимусу і селезінки щурів	153
за дії іонізуючої радіації та на фоні введення інозину.....	
РОЗДІЛ 7. ОКСИДАТИВНИЙ СТРЕС ЯК МАРКЕР ІНІЦІАЦІЇ І	
РЕАЛІЗАЦІЇ РАДІАЦІЙНО-ІНДУКОВАНОГО АПОПТОЗУ.....	160
7.1 Вміст продуктів перекисного окиснення ліпідів у лімфоцитах	162
тимусу і селезінки щурів за дії іонізуючої радіації та на фоні	
введення інозину	
7.2 Рівень генерування супероксидних аніон-радикалів у	167
лімфоцитах тимусу і селезінки щурів за дії іонізуючої радіації	
та на фоні введення інозину	
7.3 Ксантинооксидазна активність у лімфоцитах тимусу і селезінки	172
щурів за дії іонізуючої радіації та на фоні введення інозину	
7.4 Супероксиддисмутазна активність у лімфоцитах тимусу і	181
селезінки щурів за дії іонізуючої радіації та на фоні введення	
інозину	
7.5 Каталазна активність у лімфоцитах тимусу і селезінки щурів за	187
дії іонізуючої радіації та на фоні введення інозину	
7.6 Окисна модифікація білків у лімфоцитах тимусу і селезінки	192
щурів за дії іонізуючої радіації	

РОЗДІЛ 8. АКТИВНІСТЬ ЕФЕКТОРНИХ КАСПАЗ ТА ВИЗНАЧЕННЯ СТАДІЙ ПЕРЕБІГУ РАДІАЦІЙНО-ІНДУКОВАНОГО АПОПТОЗУ.....	198
8.1 Дослідження активності каспази – 3 у лімфоцитах тимусу і селезінки щурів за дії іонізуючої радіації	199
8.2 Дослідження активності каспази – 6 у лімфоцитах тимусу і селезінки щурів за дії іонізуючої радіації	203
8.3 Визначення стадій перебігу радіаційно-індукованого апоптозу у лімфоцитах тимусу і селезінки щурів методом протокової цитометрії	206
РОЗДІЛ 9. ОЦІНКА РІВНЯ АТФ ТА ФУНКЦІОНУВАННЯ СИСТЕМИ ОБМІНУ ПУРИНІВ ЗА РАДІАЦІЙНО-ІНДУКОВАНОГО АПОПТОЗУ	215
9.1 Вміст АТФ у тимусі і селезінці щурів за дії іонізуючої радіації та на фоні введення інозину	216
9.2 Катаболізм пуринів у лімфоцитах тимусу і селезінки щурів за дії іонізуючої радіації	218
9.3 Активність ферментів метаболізму пуринів у лімфоцитах тимусу та селезінки щурів за дії іонізуючої радіації та на фоні введення інозину	225
АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ	243
ВИСНОВКИ	253
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	255
ДОДАТОК 1.....	300
ДОДАТОК 2.....	312

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

АД – АМФ-дезаміназа

АДА – аденозиндезаміназа

АК – аденілаткіназа

АКМ– активні кисневі метаболіти

МДА – малоновий діальдегід

МФД– міжнуклеосомна фрагментація ДНК

ПАРП – полі(ADP-рибозо)полімераза

ПЛМ-пермебіалізації лізосомальної мембрани

ПОЛ – перекисне окислення ліпідів

5'-Н – нуклеотидаза

AIF – апоптоз-індукуючий фактор

AP-1 (Activator Protein) – активаторний білок 1– транскрипційний фактор

BAX (BCL2 associated X, apoptosis regulator) – білок родини Bcl-2

Bcl-2 (B-cell lymphoma 2) – білки родини Bcl-2 – регулятори апоптозу

DISC (Death-Inducing Signaling Complex)– сигнальний комплекс, індукуючий смерть

DR (Death Receptor)– рецептори смерті

MAP- кінази (MAP kinase - Mitogen-Activated Protein kinase) – мітоген-активовані протеїнкінази

NF-κB (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) – транскрипційний фактор

p53 – білок p53 – транскрипційний фактор

ВСТУП

Актуальність теми. Апоптоз – генетично детермінований енергоємний процес, що відіграє визначальну роль у підтриманні фізіологічних процесів, необхідних для нормальної життєдіяльності клітин, водночас є основним механізмом, який забезпечує селективне видалення пошкоджених, злоякісно-трансформованих чи інфікованих клітин [1, 2]. З'ясування молекулярно-біохімічних механізмів перебігу апоптотичного процесу є нагальною проблемою сьогодення, оскільки порушення шляхів контролю ключових етапів апоптозу, пов'язане з його надмірною активацією або інгібуванням, призводить до патологічних змін [3, 4] на рівні окремих органів і систем та, відповідно, є основою для розвитку ряду захворювань (онкологічних, аутоімунних, нейродегенеративних та ін.).

Дія іонізуючої радіації на клітини радіочутливих органів системи імунітету (тимус, селезінка) спричиняє ряд порушень як на надмолекулярному, субклітинному, так і молекулярному рівнях, що є підґрунтям біохімічних та морфологічних змін, які послідовно реалізуються шляхами, означеними як радіаційно-індукований апоптоз [5, 6]. Дослідження біохімічних шляхів апоптозу у відповідь на вплив променевого чинника має певну складність, оскільки проявляється його мультисистемна дія. Водночас на особливу увагу заслуговує можливість використання моделі радіаційно-індукованого апоптозу як інструменту для обґрунтування теоретичних засад специфіки перебігу етапів апоптозу з метою формування парадигми програмованої клітинної загибелі. Виявлення радіаційних ефектів та дослідження регуляторної мережі інтегральної відповіді функціональних систем імунокомпетентних клітин лімфоїдних органів на дію стрес-чинника визначається як актуальна проблема сучасної біохімії, молекулярної біології та медицини. Існуючі розрізнені дані та поодинокі концептуальні

дослідження не дають чіткої деталізації зазначеної танатогенної програми [7, 8]. Тому вивчення та експериментальне обґрунтування питань, пов'язаних з реалізацією радіаційно-індукованого апоптозу за умови дисбалансу функціонування регуляторних каскадів ядерного, рецептор-опосередкованого та мітохондріального шляхів клітинної загибелі, надасть змогу виявити причинно-наслідкові зв'язки біохімічних механізмів індукованого радіацією порушення функціонування імунокомпетентних клітин лімфоїдних органів.

Не менш актуальною на сьогодні вважається проблема модифікації радіочутливості та пошук ефективних засобів радіомодулюючої дії [9, 10, 11], спрямованих на запобігання та зменшення молекулярно-біохімічних змін клітин імунної системи, комітованих на загибель шляхом апоптозу, та порушень в організмі опромінених тварин в цілому. Дані щодо біохімічних механізмів радіаційно-індукованого апоптозу стали підґрунтям для розробки методів корекції та запобігання порушень структурно-функціональних властивостей лімфоїдних клітин та сприяли дослідженню впливу інозину як засобу, що викликає підвищення загальної резистентності організму шляхом модифікації певних ланок перебігу радіаційно-індукованого апоптозу.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота виконана відповідно до плану наукових досліджень Київського національного університету імені Тараса Шевченка і є фрагментом таких наукових тем ННЦ "Інститут біології та медицини": "Розробка наукових основ пошуку біологічно активних сполук радіозахисної дії" (№ д/р 0101U002291, 1998– 2005 рр.) в рамках комплексної наукової програми "Здоров'я людини"; "Визначення біохімічних, генетичних, імунологічних та цитологічних маркерів розвитку патологічних станів з метою розробки засобів направленої корекції і профілактики (№ д/р 0106U005750, 2006-2010 рр.); "Механізми реалізації адаптаційно-компенсаторних реакцій організму за умов розвитку різних патологій" (№ д/р 0111U004648, 2011-2015 рр.) та "Механізми регуляції метаболічних процесів

в організмі за умов розвитку патологічних станів" (№ д/р 0116U002527, 2016-2018 рр.).

Мета і задачі дослідження. Метою роботи було з'ясування біохімічних шляхів перебігу процесів, які характеризують радіаційно-індукований апоптоз у лімфоцитах тимусу і селезінки щурів.

Для досягнення мети було поставлено такі задачі:

1. Виявити особливості ядерного, рецептор-опосередкованого та мітохондріального шляхів радіаційно-індукованого апоптозу у лімфоцитах тимусу і селезінки щурів та визначити стадії перебігу апоптозу за дії променевого чинника. Окреслити взаємозв'язки та виявити групу ключових параметрів, які характеризують основні біохімічні шляхи реалізації радіаційно-індукованого апоптозу, з застосуванням кореляційного аналізу.
2. Встановити ступінь залучення системи каспазо-незалежного протеолізу у радіаційно-індукований апоптоз лімфоцитів тимусу і селезінки щурів.
3. Визначити роль оксидативного стресу за радіаційно-індукованого апоптозу лімфоцитів тимусу і селезінки щурів.
4. Визначити активність ефекторних каспаз за радіаційно-індукованого апоптозу лімфоцитів тимусу і селезінки щурів.
5. Оцінити енергетичний стан лімфоцитів тимусу і селезінки щурів та функціонування системи обміну пуринів за радіаційно-індукованого апоптозу.
6. З'ясувати вплив препарату інозину на перебіг радіаційно-індукованого апоптозу лімфоцитів тимусу і селезінки щурів.

Об'єкт дослідження – біохімічні механізми програмованої клітинної загибелі шляхом апоптозу за умов дії іонізуючої радіації.

Предмет дослідження – ядерний, рецептор-опосередкований та мітохондріальний шляхи клітинної загибелі, редокс-залежна сигнальна

система, енергетичний стан клітин та обмін пуринів за умов дії іонізуючої радіації та на фоні введення інозину.

Методи дослідження. У роботі використано спектрофото(флуо)риметричне визначення активності ряду протеїназ, рівня метаболітів та активності ферментів про-антиоксидантної систем, концентрації білка, рівня одно- та дволанцюгових розривів ДНК, вмісту НАД⁺, МТТ-тест; радіоізотопний метод (визначення активності ферментів обміну пуринів та включення С¹⁴-аденозину у фонд пуринів; визначення активності полі(ADP-рибозо)полімерази, метод тонкошарової хроматографії (розділення метаболітів пуринового обміну), метод електронного парамагнітного резонансу (визначення швидкості генерування супероксидних аніон-радикалів), хемілюмінесцентний (визначення вмісту АТФ); імуноферментний метод (рівень NF-κB, p53), протокова цитометрія (стадії перебігу апоптозу), вестерн-блот аналіз (рівень AIF, Fas, AP-1, Bax), електрофоретичне визначення рівня фрагментованої ДНК та статистичний аналіз.

Наукова новизна одержаних результатів. Уперше проведено комплексні молекулярно-біохімічні дослідження, на основі яких розширено існуючі уявлення про механізми програмованої загибелі клітин та запропоновано концепцію біохімічних шляхів реалізації радіаційно-індукованого апоптозу і можливостей його модифікації.

В результаті проведених досліджень отримано нові дані про особливості та взаємозв'язок ядерного, рецептор-опосередкованого та мітохондріального шляхів радіаційно-індукованого апоптозу у лімфоцитах тимусу і селезінки щурів та визначено ступінь чутливості стадій перебігу апоптозу до дії променевого чинника.

Вперше виявлено значущість залучення як каспазо-опосередкованого, так і каспазо-незалежного протеолізу у перебіг радіаційно-індукованого апоптозу. Отримано нові дані щодо активації редокс-чутливих ланок

вищенаведених шляхів реалізації радіаційно-індукованого апоптозу за умови порушення окисно-антиоксидантної рівноваги, характерні прояви якої лежать в основі теорії "оксидативний стрес як медіатор апоптозу".

За перебігу шляхів реалізації радіаційно-індукованого апоптозу виявлено порушення енергетичної рівноваги в імунокомпетентних клітинах тимусу і селезінки щурів, що корелює зі зниженням вмісту АТФ на фоні активації катаболічної ланки пуринового обміну.

На підставі отриманих результатів підтверджено модифікуючий радіопротекторний вплив інозину, основу якого складає підвищення загальної резистентності організму, та вперше виокремлено певні ланки біохімічних шляхів регуляторної мережі відповіді клітин за дії радіаційного чинника.

Практичне значення одержаних результатів. Отримані результати дисертаційної роботи сприяють формуванню цілісної структурної молекулярно-біохімічної схеми реалізації радіаційно-індукованого апоптозу. Проведені експериментальні дослідження дають підстави виявити особливості механізмів сигналювання, відповідальних за залучення основних шляхів перебігу апоптотичного процесу за дії променевого чинника на імунокомпетентні клітини тимусу і селезінки щурів.

Отримані експериментальні дані щодо модифікуючого впливу інозину на структурно-функціональні порушення функціонування клітин лімфоїдних органів за дії іонізуючої радіації дають можливість застосовувати його як засіб направленої корекції з радіомодулюючими властивостями.

Матеріали дисертаційної роботи використовуються в учбовому процесі кафедри біохімії Навчально-наукового центру "Інститут біології та медицини" Київського національного університету імені Тараса Шевченка: лекційний курс "Біохімічні основи імунітету", "Молекулярні механізми біосинтезу білка" та лабораторні заняття з курсу "Імунохімія". Можливе

використання отриманих результатів дисертації для спецкурсів та лабораторних занять з біологічних та медичних спеціальностей.

Особистий внесок здобувача. Дисертаційна робота є завершеним дослідженням, виконаним автором відповідно до вищезазначених наукових програм ННЦ "Інститут біології та медицини". Дисертантом самостійно обґрунтовано мету та завдання роботи, розроблено методологію експериментальних досліджень, проведено пошук і аналіз даних літератури, що дало змогу висвітлити власні ідеї автора, покладені в основу дисертаційної роботи. Автор зробив основний особистий внесок у дисертаційну роботу на всіх етапах її практичного виконання, обговорення та узагальнення результатів дослідження, формулювання висновків та написання статей і тез доповідей.

Науковий консультант доктор біологічних наук, професор Остапченко Л.І. брала безпосередню участь у визначенні напрямку досліджень, обговоренні отриманих результатів і висновків.

Протоково-цитометричний аналіз проведено спільно з д.б.н., проф. Андрейченком С.В., зав. лабораторією радіаційної біохімії ДУ "Національний науковий центр радіаційної медицини Національної академії медичних наук України", кореляційний аналіз виконано спільно з к.б.н. Вакалом С.Є. Результати дисертаційної роботи знайшли відображення у наукових публікаціях, матеріали яких значною мірою належать автору. Здобувач вдячний за допомогу у проведенні досліджень колегам, співучасть яких у виконанні роботи відмічена у спільних публікаціях.

Апробація результатів дисертації. Основні наукові положення, висновки та практичні рекомендації дисертаційної роботи були представлені на національних та міжнародних науково-практичних форумах: VII, VIII, IX, X Українських біохімічних з'їздах (Київ, Україна, 1997; Чернівці, Україна, 2002; Харків, Україна 2006; Одеса, Україна, 2010) та XI Українському біохімічному конгресі (Київ, Україна, 2014); III и IV сьездах по

радиационным исследованиям (Москва, Россия, 1997; 1998); III Международном симпозиуме "Механизмы действия сверхмалых доз" (Москва, Россия, 2002); Российской научной конференции "Медико-биологические проблемы противолучевой и противохимической защиты" (Санкт-Петербург, Россия, 2004); V,VI,VII съездах по радиационным исследованиям (радиобиология, радиоэкология, радиационная безопасность) (Москва, Россия, 2006; 2010; 2014); III з'їзді з радіаційних досліджень (радіобіологія і радіоекологія) (Київ, Україна, 2003); The 35th Annual Meeting of the European Radiation Research Society and The 4th Annual Meeting of the Ukrainian Society for Radiation Biology (Kyiv, Ukraine, 2006); 5th Parnas Conference "Molecular mechanism of cellular signaling" (Kyiv, Ukraine, 2005); VII Parnas Conference on Biochemistry and Molecular Biology (Yalta, Crimea, Ukraine, 2009); VIII Parnas Conference im. Jakuba Karola Parnasa, (Warsaw, Poland, 2011); IX Jakub K.Parnas Conference "Proteins from Birth to Death" (Jerusalem, Israel, 2013); II, III, IV з'їзді Українського біофізичного товариства (Харків, Україна, 1998; Львів, Україна, 2002; Донецьк, Україна, 2006); II з'їзді Українського товариства клітинної біології, (Київ, Україна, 2007); International symposium on cell biology jointly with 3rd Ukrainian Congress for cell biology (Yalta, Ukraine, 2012); International Symposium on Cell Biology jointly with 5th Ukrainian Congress for Cell Biology (Odesa, Ukraine, 2016); Всеукраїнській науковій конференції "Психофізіологічні та вісцеральні функції в нормі та патології" (Київ, Україна, 2002); IV, V, VII Міжнародній науковій конференції "Психологічні та вісцеральні функції в нормі і патології" (Київ, 2008, 2010, 2014); Міжнародній науково-практичній конференції "Віддалені наслідки впливу іонізуючого випромінювання" (Київ, 2007); Российской научной конференции "Медико-биологические проблемы токсикологии и радиологии" (Санкт-Петербург, Россия, 2008); 36th Annual Meeting of the European Radiation research Society (Paris, France, 2008); 7 International Meeting on the Effects of Low Doses of Radiation in Biological

System: New perspectives on human exposure (Lisbon, Portugal, 2008); 34th FEBS Congress "Life's Molecular Interaction" (Prahue, Czech Republic, 2009); конференції "Адаптаційні стратегії живих систем" (Новий Свет, Крим, Україна, 2012); Російської конференції "Острії проблеми розробки протилучевих засад: консерватизм или модернізація" (Москва, Росія, 2012); X Міжнародної Кримської конференції "Космос и біосфера" (Коктебель, Крим, Україна, 2013); Third, Fourth, Fifth International Conference on Radiation and Application in Various fields of research (Budva, Montenegro, 2015, 2017; Nis, Serbia, 2016).

Публікації. За результатами дослідження опубліковано 68 наукових праць: 1 монографія, 12 статей у фахових виданнях, затверджених МОН України, та міжнародних періодичних виданнях, 8 статей у виданнях, включених до міжнародної наукометричної бази SCOPUS; 47 матеріалів і тез доповідей на наукових конференціях, форумах та з'їздах.

Структура та обсяг дисертації. Дисертаційна робота складається зі вступу, огляду літератури, розділу з описом матеріалів і методів дослідження, розділів власних досліджень, аналізу та узагальнення результатів, висновків та списку використаних літературних джерел, який містить 451 найменування. Загальний обсяг дисертації становить 311 сторінок, містить 3 таблиці та 80 рисунків.

Висновок біоетичної експертизи. Згідно з висновком комісії з питань біоетики ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка (протоколу № 3 від 25 вересня 2017 р.) експериментальні дослідження не суперечать загально прийнятим біоетичним нормам з дотриманням відповідних міжнародних положень стосовно проведення експериментальних робіт та клінічних досліджень. Дослідження виконано відповідно до вимог Хельсінської декларації (Всесвітня медична асамблея, 1964), Міжнародних принципів Європейської

конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей (Страсбург, 1986), Декларації принципів толерантності (28 сесія ЮНЕСКО, 1995), Універсальної декларації по біоетиці та правах людини (ООН, 1997), норм Конвенції про захист прав людини у зв'язку з впровадженням нових біомедичних технологій, прийнятою у 1997 році у м. Ов'єдо (Іспанія) та відповідно до Закону України № 3447 ІV “Про захист тварин від жорстокого поводження” [12, 13].

РОЗДІЛ 1 БІОХІМІЧНІ МЕХАНІЗМИ АПОПТОЗУ

Розвиток і цілісність багатоклітинної біологічної системи залежить від складного взаємозв'язку між клітинами, що формують організм. Підтримання клітинного гомеостазу відбувається за рахунок динамічної рівноваги між проліферацією і відмиранням клітин. Отже, на основі аналізу морфологічних та біохімічних показників було встановлено, що чисельність популяції клітин пов'язана з двома протилежно направленими процесами – мітотичним поділом та загибеллю. На сьогодні виділяють ряд програм загибелі клітин згідно з Classification of cell death [14]: 1) апоптоз – високоенергоємний процес програмованої загибелі клітин, який залучає специфічні протеолітичні каскади, не спричиняє запалення з урахуванням утворення везикульованих апоптотичних тілець та є шляхом з чітко організованим сигналінгом; 2) аутофагія – консервативний високо регульований процес, пов'язаний з утворенням специфічних двомембранних вакуоль, які можуть містити клітинні органели та частину цитоплазми, що доставляються до лізосом для подальших деградаційних процесів, відсутня конденсація хроматину; 3) некроз і онкозис, основними характеристиками яких є виснаження енергетичних ресурсів клітини, незначна конденсація хроматину, набрякання цитоплазми та клітинних органел, розрив зовнішньої мембрани з подальшим виходом вмісту клітини у міжклітинний простір, що спричиняє процес запалення; за останніми даними вважається також програмованою клітинною загибеллю [15]; 4) мітотична катастрофа, яка пов'язана з процесом дерегуляції мітозу шляхом його блокування, що призводить до накопичення мультіядерних клітин; 5) партанатос – каспазо-незалежний шлях, індукований ПАРП-1 та опосередкований АІФ; 6) аноікіс-загибель при відсутності доступу до субстратів чи позаклітинного матриксу, але з морфологічними ознаками апоптозу.

Апоптотичні події мають широкий спектр біологічного значення, оскільки залучені до розвитку, диференціації, проліферації/гомеостазу, регуляції і функціонування ряду систем організму, а також вибраковці дефектних, а отже небезпечних клітин. Шляхом апоптозу відбувається формування та функціонування імунної системи, розвиток нервової системи, ембріогенез.

До морфологічних ознак апоптозу [16] можна віднести зменшення розмірів клітини (пікноз), ущільнення зовнішньої і внутрішньоклітинних мембран за умови збереження їх цілісності; втрату мікроворсинок і нормальної складчатості зовнішньої мембрани завдяки процесам вип'ячування (blebbing) чи утворення пухирців (budding), що призводить до порушення міжклітинних контактів; також зменшення розмірів, ущільнення та фрагментації ядра (каріорексис). На заключній стадії апоптозу відбувається фрагментація клітини на вкриті замкненою плазматичною мембраною компактні везикули – апоптичні тільця, які фагоцитуються макрофагами і таким чином елімінуються, що забезпечує відсутність індукції запальної реакції. Наведені вище морфологічні зміни виявляються внаслідок характерних біохімічних і молекулярних подій, що відбуваються у апоптотичній клітині.

1.1 Молекулярні шляхи реалізації апоптозу

На сьогодні не знайдено високоспецифічної системи сигналювання з апоптозу, тому що в активній загибелі клітини беруть участь внутрішньоклітинні регуляторні каскади, що відіграють ключову роль і при інших фізіологічних процесах. Сигнали, що призводять до розвитку апоптозу, відрізняються варіабельністю залучення різних трансдукційних факторів залежно від природи клітин, стадії їх розвитку та апоптогенного стимулу. Апоптогенні чинники умовно поділяють на фізіологічні (цитокіни і

гормони росту) та нефізіологічні (УФ – випромінювання, іонізуюча радіація, цислатин та інші). Проте їх дію, в основному, можна умовно поділити на три фази, а саме: фаза рецепції сигналу та початкові етапи його передачі (фактично ініціація процесу); фаза передачі сигналу до клітинного ядра з подальшою активацією летальних генів, синтезом апоптозоспецифічних білків та активації протеолітичних каскадів, що є ключовою подією в розвитку апоптозу, оскільки призводить до необоротних наслідків, та третя фаза – реалізації загибелі клітин, основним маркером якої є активація ендонуклеаз і фрагментація ДНК [17,18].

Відповідно до сучасних уявлень виділяють три основні шляхи запуску апоптозу: рецептор-опосередкований, мітохондріальний та шлях, пов'язаний зі стресом ендоплазматичного ретикулума; проте ряд дослідників виокремлюють апоптотичні зміни у ядрі та у лізосомах як окремі ланки реалізації програмованої клітинної загибелі [19]. Означені шляхи задіяні у реалізації радіаційно-індукованого апоптозу [20].

Рецептор-опосередкований (зовнішній) шлях активації апоптозу характерний переважно для клітин імунної системи і пов'язаний з передачею сигналу з залученням рецепторів смерті DR (Death Receptor). Родина DR є частиною суперродини рецепторів фактора некрозу пухлин (TNF). Після активації рецепторів їхніми лігандами (наприклад, FasL–Fas) відбувається трансдукція апоптотичного сигналу з першої активаційної платформи – DISC (Death-Inducing Signaling Complex), що призводить до активації каспази-8 – представника родини цистеїнових протеїназ (див. далі), яка відіграє основну роль в рецептор-опосередкованому апоптотичному сигналінгу та подальшому послідовному каскаду апоптотичних подій, пов'язаних з активацією ефекторних каспаз -3, -6, -7 [21].

Наступний механізм активації апоптозу реалізується за умов дефіциту ростових факторів, за дії хемотерапевтичних агентів (цитостатиків), іонізуючої радіації, стрес-молекул (активних кисневих метаболітів та NO),

який після відкриття означили як пасивний апоптоз, або "апоптоз по умовчужанню" – внутрішній шлях апоптозу. Основним компонентом цього шляху є мітохондрії, функції яких, а саме робота дихального ланцюга та процеси окисного фосфорилування, порушуються за активації апоптогенних чинників. Так, за радіаційно-індукованого апоптозу у тимоцитах спостерігається порушення у роботі комплексу II і III дихального ланцюга мітохондрій [22]. В результаті дії апоптогенних факторів відмічається падіння трансмембранного потенціалу, порушення проникності мембран мітохондрій з подальшим виходом з міжмембранного простору у цитозоль проапоптотичних чинників: цитохрому *c*, AIF, ендонуклеази G, Smac/Diablo, Omi/HtrA2. Цитохром *c* разом з цитоплазматичним фактором Araf-1 (Apoptosis protease activating factor) в присутності прокаспаз-9 (представника родини цистеїнових протеїназ) і АТФ (dАТФ) утворює другу активаційну платформу, названу апоптосомою (Apoptosome) [23]. Саме функціонування цього комплексу сприяє активації каспази-9 та подальшій активації ефекторних каспаз.

Процес перміабілізації мітохондріальної мембрани перебуває під контролем численних білків родини Bcl-2 (B-cell lymphoma 2), серед яких є інгібітори і промотори апоптозу. Проапоптотичні члени родини – в основному мультидоменні білки, до складу яких входять гомологічні послідовності BH1-BH3: Bax, Bak, Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1 та інші. Група BH3-only protein – білків, що містять лише BH3 домени (Bad, Bid, Bik, Bim, Bmf, PUMA, Noxa), виконує ряд посередницьких функцій, контролюючи роботу інших членів родини Bcl-2 та опосередковуючи реалізацію мітохондріальної ланки апоптозу [24,25].

Крім описаних ознак внутрішнього шляху, на сьогодні постулюються зміни у структурі мітохондрій, а саме їх розщеплення або фрагментація (fission) та злиття (fusion); цикл розщеплення/злиття отримав назву

мітохондріальної динаміки. Дослідження останніх років [26,27] виявили активних учасників цих процесів: а) у розщеплення органел залучені ГТФази Drp1, які в комплексі з рядом інших білків фактично утворюють перетяжки обох мітохондріальних мембран; б) злиття мітохондрій проходить під контролем ГТФази OPA1. Виявлені зміни організації мітохондрій визначаються як структурні маркери апоптотичної клітинної загибелі та пов'язані з процесами, опосередкованими АКМ та Ca^{2+} -сигналінгом.

Виокремлення ядерної ланки апоптотичної загибелі є принциповим моментом для виявлення біохімічних механізмів реалізації радіаційно-індукованого апоптозу. Морфологічні зміни стану хроматину [28], які спостерігаються візуально у вигляді скупчень на периферії ядра, корелюють у часі з раннім етапом апоптозу, пов'язаним з крупноблочною деградацією ДНК (HMW DNA) – утворення фрагментів, що мають довжину 50-300 тис. п.н. Вважають [29], що такий тип фрагментації ДНК здійснюється за участі топоізомерази II, яка локалізується у місцях приєднання хроматину до ядерного матриксу та є Mg^{2+} -залежним ферментом. Ще одним ферментом, який викликає утворення фрагментів ДНК довжиною понад 50 тис. п.н., є ендонуклеаза G, а також білок AIF, які, після вивільнення з міжмембранного простору мітохондрій, потрапляють у ядро, де спричиняють крупноблочну деградацію ДНК. Порушення петельної організації ДНК та ділянок її з'єднання з ядерним матриксом (ПАРП, топоізомераза II) опосередковує зміни у функціонуванні білків ядерного матриксу: ядерні ламіни A і B, білки ядерного матриксу NuMa (nuclear mitotic apparatus protein) та Acinus, що відповідає за конденсацію хроматину. За дії апоптогенних чинників відмічається розщеплення цих білків ефекторними каспазами, що, в свою чергу, активізує процес деградації ДНК [30].

Радіаційно-індукований апоптоз реалізується через активацію міжнуклеосомної фрагментації ДНК (МФД), в результаті якої відбувається утворення фрагментів, що мають довжину, кратну розмірам нуклеосом або

олігонуклеосом (LMW DNA). Саме ці фрагменти, починаючи з 180-190 п.н., спостерігаються при електрофорезі в агарозному гелі у вигляді "драбини", що протягом ряду років вважалась основним маркером апоптозу. Процес МФД активується з залученням ряду ендонуклеаз [31], серед яких основне місце відводиться каспазо-активованій ДНКазі CAD, яка формує комплекс з інгібітором/шапероном ICAD. За активації апоптозу було показано, що каспаза -3 розщеплює ICAD за двома специфічними сайтами та сприяє вивільненню активної ендонуклеази CAD. Ефекторна каспаза -7 також може гідролізувати ICAD, але з меншою ефективністю, ніж каспаза-3. Після дисоціації комплексу CAD/ICAD нуклеаза CAD зазнає конформаційних змін і утворює гомо/олігомери, що є ензиматично-активними формами CAD, які реалізують МФД.

Водночас на сьогодні постулюється залучення у процес МФД хроматин-зв'язаної Ca^{2+} , Mg^{2+} -залежної ендонуклеази DNAS1L3, для якої відзначається кооперативність взаємодії з CAD. Механізм активації цього ферменту за дії апоптотичних чинників опосередковується підвищенням внутрішньоклітинної концентрації Ca^{2+} , а, відповідно, деградація ДНК DNAS1L3 з утворенням розривів ланцюга активує фермент ПАРП-полі(ADP-рибозо)полімераза, серед численних функцій якої є залучення у процеси модифікації білків шляхом полі(ADP)рибозилування, репарація ДНК. Отже, полі(ADP)рибозилування ендонуклеази DNAS1L3 інгібує її активність, а протеолітичне розщеплення ПАРП ефекторною каспазою-3 запобігає подальшому рибозилуванню ферменту та активує процес ендонуклеолізу ДНК з утворенням МФД, що є більш пізньою стадією апоптозу [32].

Необхідно відмітити, що пошкодження ДНК ініціюють скоординовану відповідь з залученням системи сенсорних, трансдьюсерних і ефекторних білків, які детектують пошкодження ДНК і залежно від їх типу спрямовують долю клітини. За нечисленних контрольованих ефектів

можливо активувати стрес-респонсивну відповідь, направлену на виживання клітини за рахунок арешту клітинного циклу та репарації ДНК. Якщо активність репараційних систем недостатня і пошкодження ДНК зберігаються, то в клітинах запускається програма апоптозу, налаштована на елімінацію пошкоджених клітин [33,34].

Зазначимо, що за умови значних ушкоджень ДНК білки NF-κB, p53 та AP-1 сприяють індукції апоптозу. Як транскрипційні фактори ці білки стимулюють експресію проапоптотичних генів, активуючи всі наведені шляхи апоптотичної загибелі. Водночас, особливо для білка p53, є характерним механізм ініціації апоптозу не пов'язаний з його транскрипційною активністю. Відповідно до сучасних уявлень p53 безпосередньо активує мітохондріальний шлях апоптозу, зв'язуючись з білками родини Bcl-2, також регулює сигнальні шляхи перебігу численних метаболічних процесів у трансформованих клітинах [35].

При апоптозі запускається каскад протеолітичних реакцій, в результаті яких відбувається розщеплення ряду білків клітини, що призводить до деструктивних подій на різних рівнях її організації та спричиняє клітинну загибель. Серед протеолітичних ферментів найважливішу роль у апоптозі відіграють цистеїнові протеїнази, до яких належать каспази, Ca^{2+} -залежні протеїнази – калпаїни та катепсин В.

Отже, ключовими і безпосередніми виконавцями програми клітинної загибелі за механізмом апоптозу є каспази [36] – родина еволюційно консервативних цистеїнових протеїназ, які специфічно активуються в апоптотичних клітинах і каталізують гідроліз широкого спектру білків-мішеней після залишку аспарагінової кислоти. Специфічність розщеплення забезпечується природою трьох або більше амінокислот, які знаходяться у пептидному ланцюгу безпосередньо перед аспарагіною кислотою. Субстратами каспаз є структурні компоненти цитоскелету- фодрин і гелсолін, ядерні ламіни А і В, білки ядерного матриксу NuMa та Acinus,

білки метаболізму та репарації ДНК (ПАРП), білки, задіяні в регуляції клітинного циклу, трансдукції сигналів, експресії генів та ін. Активація каспазного каскаду не тільки унеможливорює виконання клітиною своїх функцій та підтримання гомеостазу, а й полегшує руйнування та упакування клітинних структур в придатні для фагоцитозу апоптотичні тільця – кінцевий етап апоптозу.

Окрім виконання традиційних функцій розщеплення клітинних субстратів під час реалізації клітинної загибелі каспази також залучені до ряду неапоптотичних процесів, зокрема відіграють важливу роль в ініціації імунної відповіді, задіяні в процесах проліферації та диференціюванні ряду клітин [37,38].

Залежно від будови, функцій, механізмів регуляції виділяють декілька класифікацій каспаз [4]. Так, каспази можна поділити на ферменти, що забезпечують процесинг і активацію цитокінів, зокрема інтерлейкінів ІЛ-1 β , ІЛ-18 (каспази-1, -4, -5) та ферменти, що обумовлюють реалізацію апоптотичної загибелі (каспази-2, -3, -6, -7, -8, -9, -10). В свою чергу останні, відповідно до довжини їх N-термінального продомена, поділяються на ініціаторні або каспази першого ешелону (каспази-2, -8, -9, -10) та ефекторні (виконавчі) або каспази другого ешелону (каспази-3, -6, -7). Згідно з даними літератури [39], каспаза-2 виконує функції як ініціаторної, так і ефекторної каспази.

Різні шляхи реалізації апоптотичного сигналу залучають у взаємодію різні каспази, проте виконавчі функції при розщепленні білків, локалізованих в ядрі, цитозолі, та білків цитоскелету, належать каспазам-3, -6, -7. Мембрано-опосередкований механізм запуску апоптозу передбачає активацію каспази-8. Асоціація декількох молекул цієї прокаспази призводить до переходу проферменту в активний стан з подальшим залученням протеолітичного каскаду активації каспаз. Каспаза-8 активує

шляхом обмеженого протеолізу ряд ефекторних каспаз, зокрема превалюючу у клітині ефекторну каспазу-3.

Слід відмітити, що мітохондріальний шлях радіаційно-індукованого апоптозу передбачає активацію каспази-3, і в цьому випадку у протеолітичний каскад залучається ініціаторна каспаза-9. Вихід з мітохондрій цитохрому *c* сприяє перетворенню прокаспази-9 у активну форму за участі білка Араф. Молекули прокаспази-9 залишаються з'єднаними з Араф. До утвореного комплексу приєднуються молекули прокаспази-3 і формується апоптосома – протеолітичний комплекс, який включає молекули цитохрому *c*, Араф, каспази-9 та прокаспази-3. Внаслідок активації каспази-9 відбувається протеолітичний процесинг прокаспаз-3,-7 з утворенням їх активної форми [40].

Необхідно зазначити унікальну роль каспази-2 у реалізації процесів апоптотичної загибелі. Структурно цей фермент можна віднести до класу ініціаторних каспаз, оскільки вона містить довгий продомен, подібний до продомену каспази-9. Функційно каспаза-2 належить до ефекторних каспаз, оскільки специфіка організації активного центру є гомологічною до каспаз-3,-7. Локалізація каспази-2 у ядрі опосередковується наявністю NLS у продоміні та сприяє імпорту-залежному транспорту ферменту [41]. Саме цей процес колокалізації ферменту у ядерному компартменті клітини пояснює його роль у відповіді клітини на генотоксичний стрес, залучення у регуляцію клітинного циклу та навіть у пухлинну супресію. Активація каспази-2 після потрапляння у ядро відбувається у комплексі PIDDosome, що сприяє швидкому процесингу проферменту за дії генотоксичних чинників, а саме іонізуючої радіації [42]. Генний нокаут *каспази-2* призводить до зниження рівня апоптотичної відповіді на дію ДНК-пошкоджувальних агентів. Щодо залучення каспази-2 у реалізацію мітохондріально-опосередкованого апоптозу, то на сьогодні є дані про участь ферменту у перміабілізації зовнішньої мітохондріальної мембрани, що активує поодаль-

ший вихід з міжмембранного простору у цитозоль проапоптотичних чинників – цитохрому *c*, ендонуклеази G, Smac/Diablo, Omi/Htr A2. Вважається, що зазначений шлях індукції апоптозу не вимагає виявлення протеолітичної активності каспази-2 [43].

Оскільки каспази, окрім розщеплення білків під час реалізації програми клітинної загибелі, задіяні у процесах, пов'язаних з функціонуванням клітин за фізіологічних умов, наприклад під час лімпопоезу, у клітинах передбачений ряд механізмів, спрямованих на регуляцію активності даних ферментів на різних рівнях – починаючи від синтезу та активації молекул проферментів та закінчуючи дією інгібіторів на вже активовані каспази [19]. Родина IAP (інгібіторів апоптозу) у ссавців налічує вісім білків. Представники родини відрізняються за кількістю доменів та за субстратною специфічністю [44], а саме XIAP, c-IAP-1, c-IAP-2 зв'язуються та інактивують ефекторні каспази-3,-7, але не діють на каспази-6, -8 за умов *in vitro*. XIAP також сприяє інгібуванню каспази-9 шляхом блокування цитохром *c*- індукованої активації прокаспази-9.

Ефективним інгібітором каспаз є також представник родини серпінів – CrmA (cytokine response modifier A), який, ковалентно зв'язуючись із активним центром каспази, блокує подальшу взаємодію ферменту із субстратом. Поряд з ендогенними інгібіторами, що діють на молекули вже активованих каспаз, у клітинах існує ряд механізмів, спрямованих на попередження активації прокаспаз [45].

Численні літературні дані свідчать, що при дії променевого чинника першими активуються ініціаторні каспази, які мають довший продомен, ніж ефекторні. Припускають декілька механізмів активації каспаз: аутоактивація, трансактивація або активація за допомогою інших протеолітичних ферментів [46].

Складна біохімічна мережа відповіді на апоптогенний сигнал за дії променевого фактора долучає до роботи окрім каспаз лізосомальні

катепсини, цитоплазматичні калпаїни та високоорганізовану систему протеасомної деградації білків, які взаєморегулюють власну активацію та визначають етапи та шляхи реалізації радіаційно-індукованого апоптозу [47,48]. Наукові здобутки останнього десятиріччя дають можливість стверджувати про існування виокремленої лізосомально-опосередкованої ланки апоптозу. Дія проапоптотичних чинників активує пермебілізацію лізосомальної мембрани (ПЛМ), що призводить до часткового виходу літичних ферментів, серед яких головну роль ініціаторних протеїназ лізосомального шляху апоптозу відіграють катепсини [49].

Оскільки енергозабезпечення функціонування клітин і їх загибелі є принциповим моментом метаболізму, то виявлення АТФ- залежних шляхів перебігу апоптозу за дії радіаційного фактора та спричинений ним дисбаланс активності ключових ферментів обміну пуринів є маркерним для реалізації радіаційно-індукованого апоптозу [50,51,52].

Ступінь залучення радіаційно-опосередкованого оксидативного стресу у реалізацію апоптозу можливо визначати за виявленням дії активних кисневих метаболітів (АКМ) на метаболічному рівні (участь в регуляції функцій білків), за здатністю до ушкоджуючого ефекту (здатність викликати окислювальну деструкцію білків, ліпідів, нуклеїнових кислот) та виконання сигнальної функції, що спричиняє запуск програмованої клітинної загибелі. Забезпечення про-антиоксидантного балансу багаторівневою системою антиоксидантного захисту (ферментні системи– СОД, каталаза, глутатіон-залежна система) та її виснаження за променевого впливу спричиняє підвищення рівня АФК у клітині, запускаючи сигналювання за активації певних кіназних і каспазних каскадів, редокс- чутливих транскрипційних факторів та регулюючи спеціалізовані модулі реакцій, що визначають перебіг радіаційно-індукованого апоптозу [53,54].

1.2 Модифікуючі ефекти інозину на перебіг радіаційно–індукованого апоптозу

Пошуку засобів направленої корекції і модифікації радіаційного впливу присвячено ряд комплексних досліджень [51,52,53,54,55], в результаті яких виявлено групу протипроменевих препаратів, основною властивістю яких є здатність підвищувати загальну резистентність організму. За їх впливу спостерігається стимуляція системної регуляції репаративних можливостей організму з залученням, насамперед, імунної системи. До цих речовин належить рибонуклеозид гіпоксантину – інозин, який регулює перебіг енергетичних та синтетичних реакцій у клітинах, спричиняючи, зокрема, активуючу дію на біосинтез нуклеотидів та коферментів, і є природним субстратним стимулятором анаболічної ланки метаболізму.

Враховуючи участь АТФ у стимуляції ферментних систем репарації та суттєве значення рівня ендogenous макроерга для нормалізації біохімічних процесів після дії променевого чинника, були проведені дослідження, які виявили, що введення інозину, як метаболіту пуринового обміну, супроводжується зростанням рівня АТФ за дії променевого фактора [56]. Роль АТФ як модулятора оксидативного стресу відзначається у роботі [57], де автори підкреслюють значення блокування виснаження пулу АТФ для підтримки резистентності клітин до радіаційно–індукованого апоптозу.

Варто відмітити, що згідно з результатами, представленими у сучасній науковій літературі, виявлено здатність інозину регламентувати ступінь променевого ураження організму за опромінення тварин у широкому діапазоні доз. Так, за умови рентгенівського опромінення мишей в дозі 7,5 Гр профілактичне введення інозину сприяло виживанню близько 32% тварин порівняно з 6% за дії променевого чинника у контролі [58]. Роботами

китайських вчених [59] продемонстровано захисні ефекти інозину за опромінення мишей летальною дозою 12 Гр.

Комплекс робіт Легези В. і співав. [51,60,61] засвідчує актуальність дослідження радіопротекторної ролі інозину, оскільки виявлено, що його введення перед опроміненням тварин в дозі 4,0 Гр сприяє більш ранньому відновленню загальної кількості ядровмісних клітин у кістковому мозку та послаблює ушкоджуючу дію іонізуючої радіації на генетичний апарат цих клітин, а саме через добу кількість клітин, що містила хромосомні аберації, була приблизно на 15% нижчою, ніж у тварин, опромінених в дозі 4,0 Гр.

Регуляція перебігу клітинних процесів за дії інозину може визначатись його здатністю модифікувати рівень ендогенного цАМФ, який, як відомо, відіграє значну роль у забезпеченні резистентності організму до впливу іонізуючої радіації [56] та, згідно з сучасними уявленнями, бере участь у реалізації механізмів дії багатьох імуномодулюючих агентів і радіопротекторів.

Багаторічні дослідження Гудкова С.В. [62,63,64] сприяли виявленню генопротекторної ролі пуринового рибонуклеозиду інозину за рахунок зменшення генерації АКМ та стимуляції процесів пострадіаційного відновлення.

Встановлено антиоксидантні властивості інозину за оцінкою вмісту вмістом МДА [60], який був на 30% нижчим за радіаційного впливу у крові мишей, що отримували препарат, порівняно з контрольними тваринами. Водночас сечова кислота (продукт деградації інозину) виявляє виражені антиоксидантні властивості, уможливлуючи компенсаторний ефект за рахунок взаємодії з АКМ [65].

Інозин є природним метаболітом пуринового обміну в організмі людини та тварин. Включення рибозного залишку інозину (за метаболічними шляхами) у реакції гліколізу сприяє збереженню фонду АТФ у клітинах, підданих стресовим впливам. Згідно з Ракшою Н.Г. [66]: "Метаболічні

перетворення пуринів тісно пов'язані з рівнем НАД⁺, оскільки останній бере безпосередню участь у регуляції процесів синтезу, взаємоперетворення та деградації аденілових нуклеотидів і нуклеозидів. Тому обумовлене радіацією значне зниження вмісту НАД⁺ супроводжується зменшенням концентрації АТФ, що витрачається під час ресинтезу НАД⁺ та індукцією катаболічної ланки обміну пуринів". Введення інозину, з одного боку, постачає складові (ФРПФ, АТФ), необхідні для протікання реакцій утворення коферменту, і, разом з тим, здійснюючи інгібуючий вплив на активність ПАРП, попереджує виснаження фонду НАД⁺ і АТФ у клітинах [67]. Водночас пуриновий фрагмент інозину бере участь у відновленні нуклеотидного фонду за рахунок включення до складу аденілових чи гуанілових нуклеотидів, що сприяє його радіопротекторній функції за умови залучення в процеси репарації ДНК [32].

Надходження інозину у клітини відбувається за участі специфічних рівноважних (equilibrative) нуклеозидних транспортерів, які здійснюють прямий і зворотний транспорт за градієнтом концентрації.

Ще один тип транспортерів - родина білків SLC28 - називаються концентруючими (concentrative) нуклеозидним транспортерами, які здійснюють активний переніс нуклеозидів в клітину, використовуючи градієнт іонів натрію [68].

Нещодавно було встановлено, що інозин може зв'язуватись з певними рецепторами на поверхні клітин, які виявились А2а та А3 (можливо А1) рецепторами аденозину, оскільки власних для цього метаболіту не виявлено [69]. Варто відзначити, що родина аденозинових рецепторів є системою рецепторів GPCR (G-protein-coupled receptors), які співпрацюють з G-білками. Принциповим моментом є те, що функціонування лімфоцитів в основному регулюється А2а рецепторами аденозину, активація яких сприяє виконанню інозином протизапальних цитопротекторних функцій за умови підвищення його внутрішньоклітинної концентрації [70]. На цьому шляху

відмічається активація MAP-кіназних каскадів – регуляторів стану клітинного метаболізму, а саме протеїнкінази ERK1/2 та p38, які можуть чинити регуляторний вплив, залучаючи ядерно-опосередковані етапи (ПАРП, AP-1, NF-κB) та стабілізуючи енергетичний баланс клітин [19, 22].

Підсумовуючи вищевикладене, можна зазначити, що використання інозину з метою корекції радіаційного впливу та дослідження механізмів його цитопротекторної дії на радіаційно - чутливі ланки апоптозу лімфоцитів тимусу і селезінки щурів має вагоме практичне значення.

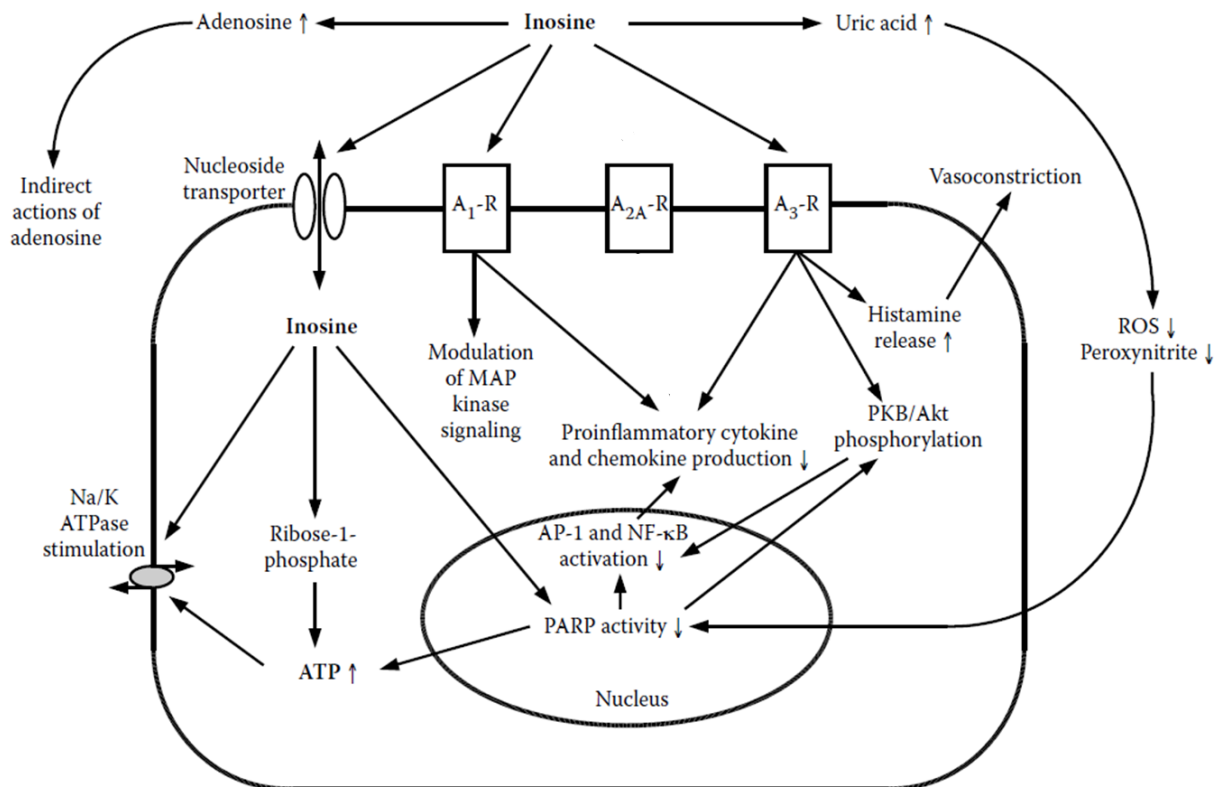


Рис.1. Модель потенційної дії інозину на клітини [71]

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Експериментальні дослідження проводили на тваринах розводки віварію Київського національного університету імені Тараса Шевченка, які утримувались за стандартних умов. Досліди проведені з дотриманням принципів біоетики, законодавчих норм та вимог згідно з положенням «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та наукових цілей» (Страсбург, 1986) і «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», ухвалених Першим Національним конгресом з біоетики (Київ, 2001). Висновок комісії з питань біоетики Навчально-наукового центру "Інститут біології та медицини" Київського національного університету імені Тараса Шевченка протокол №3 від 25 вересня 2017.

2.1 Дизайн експерименту

Досліди проводили на білих нелінійних білих щурах-самцях масою 150-170 г. Препарат інозин у вигляді 2% розчину вводили за 15 хв до опромінення внутрішньочеревинно з розрахунку 150 мг препарату на 1 кг маси тварини. Опромінення щурів здійснювали на рентгенівській установці РУМ-17 в дозах 1,0 Гр та 7,78 Гр за умов: фільтри 1 мм Al та 0,5 мм Si та шкірно-фокусна відстань 50 см, напруга 200 кВ, сила струму 5 мА для 1,0 Гр і 10 мА для 7,78 Гр, потужність дози у повітрі 0,17 Гр/хв та 0,34 Гр/хв відповідно. Тварин декапітували через 30 хвилин і 3 години після опромінення та видаляли тимус і селезінку.

2.2 Метод виділення лімфоцитів тимусу і селезінки щурів та визначення їх життєздатності

Лімфоцити тимусу виділяли згідно з методом, описаним у [72]. Після ретельної дезінтеграції тимусу (розчин Хенкса з 0,01М трис-НСІ, рН 7,4) з подальшими центрифугуваннями при 200g протягом 5 хв отримували популяцію лімфоцитів тимусу щурів. Виділення лімфоцитів селезінки щурів проводили згідно з методом [72] за умови використання градієнта щільності Ficoll-Paque (густина – 1,077г/см³). Кількість лімфоцитів тимусу і селезінки щурів підраховували з використанням гемоцитометра (камери Горяєва) та вітального барвника трипанового синього (0,1%). Життєздатність клітин в контролі становила не менше 98%.

2.3 Визначення рівня одно- та дволанцюгових розривів ядерної ДНК лімфоцитів тимусу та селезінки щурів [73]

В основі методу покладено оцінку ступеня ушкодження ДНК за умов лужного лізису (при рН 8,3 реєструються дволанцюгові розриви ДНК – слабколужний лізис, при рН 12,4 реєструються одноланцюгові розриви – лужний лізис). Детекцію рівня розривів ДНК проводили з використанням флуоресцентного зонду – 3',5'-діамінобензойної кислоти (ДАВА). Інтенсивність флуоресценції визначали на спектрофлуориметрі Shimadzu RF-150 (Shimadzu, Japan) при довжині хвилі збудження 405 нм та емісії – 520 нм. Ступінь ушкодження ДНК виражали у відсотках, як співвідношення кількості ДНК в супернатанті до її сумарної кількості в осаді і супернатанті.

2.4 Визначення рівня полідезоксирибонуклеотидів (ПДН) лімфоцитів тимусу та селезінки щурів

Ступінь фрагментації ДНК за рівнем накопиченням ПДН проводили згідно з методом [74].

Визначали в клітинній суспензії (1×10^7 клітин) рівень флуоресценції екстрагованих ПДН відносно недеградованого хроматину шляхом спектрофлуориметричного аналізу з використанням DABA. Інтенсивність флуоресценції проб визначали на спектрофлуориметрі Shimadzu RF-150 (Shimadzu, Japan) при довжині хвилі збудження 405 нм та емісії – 520 нм.

Відсоток полідезоксирибонуклеотидів (ПДН) від загального вмісту ДНК у пробі розраховували за формулою:

$$\frac{F_c}{F_c + F_o} \times 100\% , \text{ де}$$

F_c – інтенсивність флуоресценції у супернатанті

F_o – інтенсивність флуоресценції в осаді.

2.5 Електрофорез ДНК в агарозному гелі

Виділення ядерної ДНК з клітинної суспензії лімфоцитів тимусу і селезінки щурів проводили згідно з [66]. До $1,5 \cdot 10^7$ клітин додавали 0,4 мл охолодженого лізуючого буферу, що містив 10 мМ трис-НСІ рН 8,0, 10 мМ ЕДТА, 0,5 % тритон Х-100. Лізис проводили на холоді впродовж 10 хв. Після центрифугування проб при 12 000 об/хв 20 хв (центрифуга лабораторна ПЕ-6926) до супернатанту додавали два об'єми етилового спирту та 1/10 об'єму 3 М ацетату калію для осадження ДНК та витримували на холоді (-20°C) протягом 1 год. Отриманий осад обробляли протеїназою К та залишали на 12 год при 37°C . Після чого до супернатанту знову додавали два об'єми етилового спирту та 1/10 об'єму 3 М ацетату калію і осаджували ДНК при -

20°C впродовж ночі. Осад відокремлювали центрифугуванням та розчиняли у буфері TE (10 мМ трис-НСl, 1мМ ЕДТА, рН 7,6).

Електрофорез ДНК проводили в 1,7 % агарозному гелі за напруги поля 2 мВ/см впродовж 4 год (20° С). Гелі фарбували розчином броміду етидію (1 мкг/мл) у трис-боратному буфері, рН 8,3. Отримані електрофореграми фотографували через червоний фільтр на плівку Мікрат-300 в ультрафіолетових променях.

2.6 Метод визначення активності полі-(АДФ-рибозо)-полімерази

Визначення активності полі-(АДФ-рибозо)-полімерази проводили згідно з рекомендаціями [75], клітинний лізат лімфоцитів отримували шляхом ресуспендування клітин у буфері, що містив 0,02 М трис-НСl, 0,005М MgSO₄, рН 7,2, 0,008% дигітонін; як субстрат проведеної ферментативної реакції використовували 0,001 М 8-¹⁴С-NAD⁺. Вимірювання радіоактивності проб виконували на сцинтиляційному лічильнику Delta-300 (Tracor Analytic, USA).

2.7 Визначення вмісту НАД⁺ у тимусі та селезінці щурів

Вміст НАД⁺ у тканинних екстрактах тимусу і селезінки щурів визначали згідно з методом, описаним у [76].

Вміст НАД⁺ оцінювали спектрофотометричним методом при довжині хвилі 340 нм на спектрофотометрі СФ-46 (ЛОМО, Росія). У спектрофотометричну кювету вносили: 1 мл 0,05 М пірофосфатного буферу, рН 8,8 з 0,02 М семикарбазидом, 1 мл нейтралізованого тканинного екстракту, 0,3 мл 95% етилового спирту та визначали оптичну густину дослідної проби (ΔE_1) проти контрольної. Потім до контрольної та досліджуваної проб додавали фермент алкогольдегідрогеназу (вихідна активність 25 од/мг) та реєстрували значення

оптичної густини ΔE_2 через кожну хвилину до тих пір, поки її величина буде сталою.

Вміст НАД⁺ розраховували згідно з формулою:

$$K \text{ (нмоль НАД}^+/\text{г тканини)} = \frac{A \times V \times \Delta E \times 1000}{6,22 \times B \times V_1}, \text{ де}$$

A – кінцевий об'єм реакційної суміші у кюветі, мл;

V – загальний об'єм безбілкового екстракту тканин, мл;

$\Delta E = \Delta E_2 - \Delta E_1$;

1000 – коефіцієнт перерахунку;

6,22 – коефіцієнт молярного поглинання піридинових нуклеотидів;

V_1 – об'єм безбілкового екстракту тканин, внесеного у пробу, мл;

B – наважка тканини, г.

2.8 Визначення вмісту транскрипційного фактора NF- κ B лімфоцитів тимусу та селезінки щурів

Вміст білка NF- κ B оцінювали з використанням набору для імуноферментного аналізу "Colorimetric enzyme immunoassay for NF- κ B" (Oxford Biomedical Research, USA). Визначення оптичної густини проводили на спектрофотометрі (мікропланшетному рідері) Synergy HT (BioTek, USA) з програмним забезпеченням Gen5 при довжині хвилі 450 нм.

2.9 Отримання цитоплазматичної та ядерної фракції лімфоцитів тимусу та селезінки щурів

Розподіл фракцій (цитоплазматичну і ядерну фракції лімфоцитів) проводили з використанням набору Nuclear extraction kit (Chemicon International, USA&Canada) та згідно з рекомендаціями [77].

2.10 Визначення вмісту транскрипційного фактора p53 лімфоцитів тимусу та селезінки щурів

Вміст білка p53 визначали з використанням імуноферментного аналізу, застосовуючи набір "p53 pan ELISA" (Roshe Applied Science, Germany), згідно з рекомендаціями фірми-виробника.

Визначення оптичної густини проводили на спектрофотометрії (мікропланшетному рідері) Synergy HT (BioTek, USA) з програмним забезпеченням Gen5 при довжині хвилі 450/690 нм.

2.11 Електрофоретичний аналіз білків

Електрофорез отриманих зразків проводили у градієнті концентрації ПААГ (7-22 %) в денатуруючих умовах за [78].

Гель для розділення містив 100 мМ трис-НСІ рН 8,7, відповідний відсоток суміші акриламід/метилен-біс-акриламід в пропорції 30:1, а також 0,1 % додецилсульфату натрію. Концентруючий гель містив 100 мМ трис-НСІ рН 6,8; 5 % суміші акриламід/метилен-біс-акриламід в пропорції 30:14 0,1% натрію додецилсульфату. Гелі полімеризували додаванням 1 мкл/мл ТЕМЕД і 10 мкл/мл 1% свіжоприготованого розчину персульфату амонію. До досліджуваних зразків додавали 1/4 об'єму буферного розчину для зразків (500 мМ Трис НСІ рН 6,8; 2% натрію додецилсульфату; 5% 2-меркаптоетанолу; 0,1% бромфенолового синього). Після прогрівання зразки наносили на гель. Електрофоретичне розділення проводили в трис-гліциновому буферному розчині при градієнті напруги 5-20 В/см. Після закінчення електрофорезу (визначали по маркерному барвнику) гель фарбували в 0,25 %-му розчині кумасі G-250 (7 % оцтової кислоти, 15 % етиловий спирт) та відмивали в розчині 7 % оцтової кислоти і 15 % етиловому спирті до зникнення фону.

2.12 Імуноблот-аналіз

Імуноблот-аналіз досліджуваних лізатів лімфоцитів тимусу і селезінки щурів проводили згідно з рекомендаціями "Amersham™ ECL™ Prime Western blotting detection reagents and analysis system " з модифікаціями. Препаративний електрофорез за денатуруючих умов виконували як описано в підрозділі 2.11. Після препаративного електрофорезу гель відмивали у буфері PBS та здійснювали електроперенесення білків з поліакриламідного гелю на нітроцелюлозну мембрану. Електропереніс проводили за умов: 30 V, 12-14 год з використанням джерела постійного струму ПЕФ-3. Вільні сайти сорбції на нітроцелюлозній мембрані блокували 5% обезжиреним молоком в буфері PBS-T. Полі- і моноклональні антитіла проти певних білків вносили у відповідному розведенні у PBS-T-молоко, інкубували з нітроцелюлозними мембранами протягом 1-2 год. Після цього нітроцелюлозні мембрани відмивали та інкубували з вторинними анти-кролячими (anti-rabbit) чи анти-мишачими (anti-mouse) антитілами (Sigma Aldrich, USA), кон'югованими з пероксидазою хрому. Мембрану інкубували впродовж 1-2 хв в ECL регенті і експонували на рентгенівську плівку. Кількісну обробку результатів імуноблот-аналізу здійснювали з використанням комп'ютерної програми TotalLab v1.10.

В роботі було використано полі- та моноклональні антитіла проти досліджуваних білків: anti- Вах, anti- FAS, anti- AIF, anti- AP-1 фірми Sigma Aldrich, USA. З метою контролю нанесення білка нітроцелюлозні мембрани інкубували з поліклональними антитілами проти β -актину (Sigma Aldrich, USA).

2.13 Визначення активності цистеїнових протеїназ родини каспаз: каспази-2, каспази-3, каспази-6, каспази-8, каспази-9

Оцінку активності каспаз проводили з використанням *ApoTarget*TM Caspase Colorimetric Protease Assay Sampler Kit (BioSource, USA) згідно з рекомендаціями фірми-виробника. Як субстрати для визначення протеїназної активності використовували синтетичні пептиди, кон'юговані з хромофором пара-нітроанілідом (п-НА, *pNA*):VDVAD-*pNA* (Caspase-2), DEVD-*pNA* (Caspase-3), VEID-*pNA* (Caspase-6), IETD-*pNA* (Caspase-8), LEHD-*pNA* (Caspase-9).

Визначення оптичної густини проводили на спектрофотометрі (мікропланшетному рідері) Opsys MR (Termo Labsystems, USA) з програмним забезпеченням Dynex Revelation Quieklink при довжині хвилі 405 нм.

Ферментативну активність виражали в нмолях п-нітроаніліду, відщепленого від відповідного субстрату за хвилину інкубації при 37°C.

2.14 Оцінка ступеня функціональної активності мітохондрій з використанням МТТ

Функціональну спроможність мітохондрій оцінювали за активністю електрон-транспортного ланцюга по швидкості відновлення 3-[4, 5-диметилтіазалон-2-іл]-2,5-дифеніл тетразолій бромід (МТТ) згідно з технічним протоколом фірми-виробника "Sigma". В основу методу покладено здатність мітохондріальних дегідрогеназ дихального ланцюга перетворювати МТТ на забарвлений продукт– формазан [79].

Визначення оптичної густини проб проводили на спектрофотометрі (мікропланшетному рідері) μ QuantTM (BioTek, USA) з програмним забезпеченням Gen5 при довжині хвилі 570 нм.

2.15 Визначення активності катепсину В

Активність катепсину В визначали згідно з рекомендаціями [80, 81] та власними модифікаціями. Як хромогенний субстрат для визначення ферментативної активності катепсину В використовували α -бензоїл-D,L-аргінін-p-нітроанлід (БАПНА).

Клітинний лізат отримували за використання буферу, що містив 0,02М трис-НСl, 0,005 М MgSO₄, рН 7,2, та 0,05 мл 0,008% дигітоніну з подальшою інкубацією проб при 4⁰С впродовж 20 хв. Потім до проб додавали 0,001 М ЕДТА та поміщали на 10 хв у водяну баню (37⁰С). По закінченні преінкубації у пробірки послідовно додавали 0,2 М натрій-фосфатний буфер, рН 6,0 та 0,1 мл 0,065 М розчину БАПНА. Після інкубації на водяній бані впродовж 60 хв реакцію зупиняли додаванням ТХУ. Оптичну густину проб вимірювали на спектрофотометрі СФ-46 (ЛОМО, Росія) при довжині хвилі 390 нм. Ферментативну активність виражали в нмолях p-нітроанліду (p-НА), відщепленого від БАПНА за 1 хв інкубації при 37⁰С.

2.16 Визначення активності калпаїнів

Активність Ca²⁺-залежних протеїназ родини калпаїнів визначали згідно з [82] та власними модифікаціями.

Як флуорогенний субстрат використовували N-сукциніл-лей-тир7-амідо-4-метилкумарин (Sigma Aldrich, USA). Активність визначали у лізатах лімфоцитів, одержаних шляхом ресуспендування клітин у середовищі виділення, яке містило 0,008% дигітонін. Інкубаційне середовище для визначення активності ферментів об'ємом 0,5 мл містило 60 мМ імідазольний буфер, рН 7,4, 2 мМ ДТТ, 2 мМ CaCl₂ та клітинний лізат. Реакцію ініціювали додаванням до проб, попередньо витриманих 1 хв при

30°C, флуорогенного субстрату кальпаїнів - N-сукциніл-лей-тир-7-амідо-4-метилкумарину. Після 15-хвилинної інкубації проб на водяній бані при 30°C реакцію зупиняли, додаючи 5 % трихлороцтову кислоту. Для розрахунку ферментативної активності використовували калібрувальну криву, побудовану з використанням аміно-метилкумарину.

Інтенсивність флуоресценції проб визначали на спектрофлуориметрі Shimadzu RF-1500 (Shimadzu, Japan) при довжині хвилі збудження 490 нм та емісії – 525 нм.

Ферментативну активність виражали в пмолях АМС (7-amido-4-methylcoumarin), відщепленого від флуорогенного субстрату за 1 хв інкубації при 30°C на $1 \cdot 10^7$ клітин.

2.17 Визначення протеасомної активності

Оцінку протеасомної активності проводили з використанням Proteasome Activity Fluorometric Assay Kit (BioVision, USA) згідно з рекомендаціями фірми-виробника. Як субстрат для визначення хімотрипсин-подібної протеїназної активності використовували синтетичний пептид, кон'югований з флуорохромом АМС (7-amido-4-methylcoumarin), Succ-LLVY-АМС. Як інгібітор використовували MG-132.

Визначення інтенсивності флуорисценції проб проводили на спектрофлуориметрі (мікропланшетному рідері) μ QuantTM (BioTek, USA) з програмним забезпеченням Gen5 при довжині хвилі збудження 350 нм та емісії – 440 нм.

Ферментативну активність виражали в пмолях АМС (7 –amido-4-methylcoumarin), відщепленого від флуорогенного субстрату за 1 хв інкубації при 37°C.

2.18 Визначення концентрації білка

Концентрацію білка визначали за методом Bradford M.M. [83], який базується на здатності білків зв'язуватися з кумасі діамантовим синім G-250. Для визначення концентрації білка до проби додавали 30% розчин NaOH, дистильовану воду та робочий розчин реактиву Бредфорд. Для приготування робочого розчину змішували стоковий розчин реактив, 95% етанол та 88% ортофосфорну кислоту за співвідношення 2:1:2 та доводили водою до об'єму 100 мл. Стоковий розчин містив 10 мл 95% етанолу, 20 мл 88% ортофосфорної кислоти та 35 мг кумасі діамантового синього. Інтенсивність забарвлення, яке утворювалось через 2-5 хв, вимірювали на спектрофотометрі СФ-46 (ЛОМО, Росія) при довжині хвилі 595 нм проти контролю, який замість проби містив дистильовану воду. Концентрацію білка у досліджуваному зразку визначали за калібрувальним графіком і виражали у мг/мл.

2.19 Визначення вмісту ТБК-активних продуктів

Рівень накопичення вторинних продуктів ПОЛ визначали за методом [84] з певними модифікаціями. Метод базується на взаємодії малонового діальдегіду з 2-тіобарбітуровою кислотою (ТБК) з утворенням комплексу (хромофору), визначення інтенсивності забарвлення якого проводили на спектрофотометрі СФ-46 (ЛОМО, Росія) при довжині хвилі 532 нм. Вміст ТБК-активних продуктів виражали в нмоль на 10^7 лімфоцитів та розраховували на основі значення коефіцієнту молярної екстинкції комплексу $\epsilon = 156 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

2.20 Визначення швидкості генерування супероксидних аніон-радикалів

Дослідження проводили відповідно з методом [85]. Визначення швидкості генерування супероксидних аніон-радикалів проводили за окисненням спінового уловлювача гідроксиламіну-2,2,6,6-тетраметил-4-оксипіперидину до відповідного стабільного нітроксильного радикалу, який реєстрували методом електронного парамагнітного резонансу (ЕПР) при 20°C у спеціальних кварцових кюветах товщиною 0,5 мм без парамагнетиків. Інкубаційна суміш містила $2 \cdot 10^{-3}$ М гідроксиламіну, $2 \cdot 10^{-4}$ М НАДФ·Н у 0,05 М фосфатному буфері, рН 7,4 з $5 \cdot 10^{-4}$ М диетилентриамінпентаоцтової кислоти. Реакція накопичення нітроксильних радикалів проходить лінійно протягом 5 хв. Через певні інтервали часу (40 сек) проводили послідовну реєстрацію спектрів ЕПР. Після реєстрації спектрів ЕПР та відповідних математичних розрахунків визначали швидкість генерування супероксидних аніон-радикалів, яку виражали нмоль за хв. на 10^7 кл.

2.21 Визначення супероксиддисмутазної активності

Активність супероксиддисмутази у клітинах визначали за Чеварі С. і співав [86]. Метод ґрунтується на здатності СОД конкурувати з нітросинім тетразолієм (НСТ) за супероксидні аніон-радикали, що утворюються в результаті аеробної взаємодії НАДН та феназинметасульфату (ФМС). В результаті даної реакції НСТ відновлюється з утворенням гідразинтетразолію. За присутності СОД відсоток відновлення НСТ знижується. Значення оптичної густини вимірювали на спектрофотометрі СФ-46 (ЛОМО, Росія) при довжині хвилі 540 нм.

За одиницю активності СОД приймали кількість ферменту, необхідного для 50% інгібування НСТ. Розрахунок ферментативної активності проводили за формулою:

$$\left(100 \frac{E_D \times 100}{E_K}\right) / 50 = \text{ум.од.}, \text{ де}$$

E_D та E_K – середнє значення приросту екстинції за одну хвилину, відповідно, у дослідних і контрольних пробах

2.22 Визначення каталазної активності

Принцип методу заснований на здатності H_2O_2 утворювати з солями молібдену стійкий забарвлений у жовтий колір комплекс [87]. Наявність ферменту каталази знижує вміст H_2O_2 , каталізуючи його розщеплення.

У пробірки послідовно вносили клітинний лізат та додавали 2 мл 0,03 % H_2O_2 . У холосту пробу додавали 0,1 мл дистильованої води. Ретельно перемішавши, проби інкубували на водяній бані при 30°C впродовж 10 хв, періодично струшуючи. Після зупинки реакції внесенням 1 мл 4 % молібдату амонію проби центрифугували 1000 г, 7-10 хв. Інтенсивність забарвлення вимірювали на спектрофотометрі СФ-46 (ЛОМО, Росія) при $\lambda = 410$ нм проти контрольної проби, у яку замість пероксиду водню додавали 2 мл H_2O .

Каталазну активність розраховували за формулою:

$$A = \frac{(E_{\text{хол.}} - E_{\text{досл.}})}{t_{\text{хв.}} \times K \times a_{\text{мг білка}}}, \text{ де}$$

A – каталазна активність, $E_{\text{хол.}}$ і $E_{\text{досл.}}$ - екстинція холостої та дослідної проб, a – кількість мг загального білка у пробі, t – час інкубації (10 хв.), K – коефіцієнт мілімолярної екстинції перекису водню, що дорівнює $22,2 \times 10^3 \text{ мМ}^{-1} \times \text{см}^{-1}$. Активність виражали у мкмоль H_2O_2 за хв на 10^7 клітин.

2.23 Визначення ксантиноксидазної активності

Активність ксантиноксидази та ксантиндегідрогенази визначали за методом [88].

Для визначення сумарної активності ксантиноксидази та ксантиндегідрогенази до осаду (1×10^8) лімфоцитів додавали реакційну суміш, яка містила 20 мМ калій-фосфатний буфер, рН 7,8 та 0,75 мМ НАД⁺. Реакцію запускали додаванням 0,25 мМ ксантину. Інкубацію проводили протягом 120 хв при 37°C. Після чого реакцію зупиняли 5% хлорною кислотою. Активність ферментів визначали у надосадовій рідині після центрифугування проб при 200g за накопиченням сечової кислоти.

Для визначення ксантиноксидазної активності використовували аналогічний підхід, окрім того що у реакційній суміші був відсутній НАД⁺. Екстинкцію проб вимірювали на спектрофотометрі Jenway 6305 (Bibby Scientific, United Kingdom) при довжині хвилі 295 нм. Розрахунок здійснювали, використовуючи калібрувальний графік по сечовій кислоті.

2.24 Дослідження ступеня окисної модифікації білків

Визначення ступеня окисної модифікації білків проводили згідно з методом [89].

До суспензії лімфоцитів, що містила 1×10^7 клітин, додавали 10% трихлороцтову кислоту з подальшим центрифугуванням проб. До осаду денатурованих білків вносили 0,2% 2,4-динітрофенілгідразин (2,4-ДНФГ) у 2 н НСІ, а у контрольні проби – рівний об'єм 2 н НСІ. У результаті окиснювальної модифікації білків утворюються кетонні групи, здатні реагувати з 2,4-ДНФГ. Інкубацію здійснювали при кімнатній температурі впродовж 60 хв, періодично струшуючи проби. Після центрифугування осад тричі промивали розчином 95% етанолу та етилового ефіру оцтової кислоти (1 : 1) і

підсушували у термостаті при 50°C до повного випаровування рідини. Отриманий таким чином осад розчиняли у 5 М сечовині та витримували на киплячій водяній бані до повного розчинення. Оптичну густину утворених динітрофенілгідразонів реєстрували на спектрофотометрі Jenway 6305 (Bibby Scientific, United Kingdom) при довжині хвилі 370 нм. Ступінь окиснювальної модифікації білків розраховували, використовуючи коефіцієнт молярної екстинкції, який становить $2,1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$.

2.25 Визначення стадій клітинної загибелі методом протокової цитометрії

Протоковоцитометричний аналіз лімфоцитів тимусу і селезінки щурів з метою оцінки клітинної загибелі проводили згідно з [90,91]. Екстерналізацію фосфатидилсерину оцінювали за його зв'язуванням із анексином V, міченим ФІТЦ (Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit I, BD Bioscience, USA). Клітини (1×10^5) інкубували з анексином-V та суправітальним барвником пропідієм йодидом в темряві впродовж 15 хв при 25°C, після чого аналізували на лазерному проточному цитофлуориметрі PAS («Partec», Germany) при вихідній напрузі лазера 200 мВ та довжині хвилі 488 нм. Одержані результати обробляли за допомогою програми FlowMax («Partec», Germany)

2.26 Визначення вмісту АТФ

Для визначення використовували 1 г замороженої у рідкому азоті тканини, яку розтирали у фарфоровій ступці з 0,6 М хлорною кислотою з розрахунку 1:4 для тимусу та 1:2 для селезінки. Проби залишали на 20-30 хв при 4°C для більш повної екстракції нуклеотиду. Білки відділяли шляхом

центрифугування при 1000g впродовж 15 хв. Надосадову рідину нейтралізували 30% розчином КОН до рН 6,0.

Визначення вмісту АТФ проводили на медичному хемілюмінометрі ХЛМ-1 Ц-01 з використанням “1243-102 АТР Monitoring Kit” (LKB-Wallac, Turku, Finland) згідно з рекомбінаціями фірми-виробника.

Вміст АТФ розраховували згідно з формулою :

$$X \text{ (мкмоль АТФ / г тканини)} = \frac{S - B}{i \times D} \times A, \text{ де}$$

S – рівень хемілюмінесцентного сигналу дослідної проби;

B – рівень хемілюмінесцентного сигналу комплексу люциферин-люцифераза;

i – рівень хемілюмінесцентного сигналу при внесенні АТФ–стандарту;

A – мкмоль АТФ у АТФ–стандарті;

D – наважка тканини, г

2.27 Дослідження катаболізму пуринів

Дослідження катаболізму пуринів проводили відповідно до методу, описаного у роботі [92].

У лунку планшета вносили 2×10^7 клітин і після хвилинної преінкубації при 37°C додавали 0,01 мкМ C^{14} -аденозин (питома радіоактивність 43 мКи/ммоль). По закінченні інкубації (45 хв, 37°C) клітини осаджували центрифугуванням та двічі відмивали в охолодженому середовищі виділення. Отриманий осад ресуспендували у 6% $HClO_4$ і для більш повної екстракції нуклеотидів залишали на 2 год при 4°C. Перхлоратні екстракти після відділення денатурованих білків нейтралізували 30% Na_2CO_3 . Через дві години проби знову центрифугували при 200g 7 хв, надосадову рідину розділяли на частини, які змішували з сумішшю свідків, що містила 5 г/мл кожного. Після чого на хроматографічний папір FN-16 наносили 80 мкл

досліджуваних розчинів і проводили висхідну хроматографію. Розділення пуринових основ (аденіну, гіпоксантину), нуклеозидів (інозину, аденозину) та нуклеотидів (АТФ, АДФ, АМФ) здійснювали при кімнатній температурі впродовж 5 год відповідно в 0,05% розчині NH_4OH та 75% етиловому спирті. Хроматографічний папір для нанесення аденілових нуклеотидів попередньо обробляли насиченим розчином $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ з 0,1 мМ ЕДТА. ІМФ від інших нуклеотидів відділяли, використовуючи систему розчинників н-бутонол : н-пропанол : ацетон : 80% мурашина кислота : 30% трихлороцтова кислота (2,6 : 1,3 : 2,3 : 1,6 : 1) та 0,1 мМ ЕДТА. По закінченні хроматографії папір висушували, ділянки паперу, видимі в ультрафіолетовому світлі, вирізали, поміщали у флакони з сцинтиляційною рідиною ЖС-1 та вимірювали радіоактивність проб на лічильнику Delta-300.

2.28 Визначення активності ферментів пуринового обміну

2.28.1. Визначення активності аденозіндезамінази, 5'-нуклеотидази, АМФ-дезамінази, аденілаткінази

Визначення активності аденозіндезамінази, 5'-нуклеотидази, АМФ-дезамінази та аденілаткінази проводили відповідно до методу, описаного у роботі [93].

У пробірки з інкубаційним середовищем вносили клітинний лізат, який отримували шляхом ресуспендування лімфоцитів у лізуючому буфері, що містив 20 мМ трис- HCl , 5 мМ MgSO_4 , 1 мМ дитіоєритритол, рН 7,4. Після хвилинної преінкубації реакцію запускали 0,25 мМ 8- ^{14}C -аденозином (питома активність 10 мКи/ммоль) у випадку визначення активності аденозіндезамінази і 0,5 мМ 8- ^{14}C -АМФ (питома активність 10 мКи/ммоль) для визначення ферментативної активності 5'-нуклеотидази, АМФ-дезамінази та аденілаткінази. Проби інкубували при 30°C, реакцію

зупиняли шляхом їх занурення у киплячу водяну баню на 3 хв. Після центрифугування при 200g 5-7 хв відбирали аліквоту надосадової рідини і змішували з рівним об'ємом суміші свідків (5 мг/мл кожний), яка містила аденозин та інозин для визначення активності аденозиндезамінази, АМФ та аденозин – для 5'-нуклеотидази, АМФ та ІМФ – для АМФ-дезамінази і АМФ, АДФ, АТФ – для аденілаткінази. 25 мкл отриманого розчину наносили на хроматографічний папір FN-16 і здійснювали висхідну хроматографію у 0,05% розчині NH_4OH впродовж 4 годин при дослідженні аденозиндезаміназної, 5'-нуклеотидазної активності і у системі розчинників н-бутанол: н-пропанол: ацетон: 80% мурашина кислота: 30% трихлороцтова кислота (2,6:1,3:2,3:1,6:1) та 0,1 мМ ЕДТА протягом 9 годин для визначення активності АМФ-дезамінази та аденілаткінази. По закінченні хроматографії папір висушували, вирізали ділянки паперу, видимі при ультрафіолетовому освітленні, поміщали їх у флакони з сцинтиляційною рідиною ЖС-1 та проводили вимірювання радіоактивності проб на лічильнику Delta-300 (Tracor Analytic, USA).

Ферментативну активність аденозиндезамінази оцінювали за радіоактивністю плями інозину, 5'-нуклеотидази – плями аденозину, АМФ-дезамінази – плями ІМФ, аденілаткінази – плям АДФ та АТФ.

Час інкубації та вміст білка у пробі підбирали з таким розрахунком, щоб визначення ферментативної активності проводити за умови початкової швидкості реакції. Активність ферментів виражали у нмоль за хв на мг білка.

Інкубаційне середовище для визначення аденозиндезаміназної активності містило 50 мМ трис- HCl , рН 7,5, для 5'-нуклеотидазної – 3 мМ MgSO_4 , 50 мМ трис- HCl , рН 7,5, для АМФ-дезаміназної – 5 мМ АТФ, 5 мМ ЕДТА, 125 мМ KCl , 50 мМ трис- HCl , рН 7,0, для аденілаткіназної – 5 мМ АТФ, 10 мМ MgSO_4 , 50 мМ трис- HCl , рН 7,0.

2.28.2 Визначення активності пурипнуклеозидфосфорилази

Визначення активності пурипнуклеозидфосфорилази проводили згідно з методами [94,95] у нашій модифікації.

До пробірок, що містили 0,1 М натрій-фосфатний буфер, рН 7,4, 0,1 М трис-НСІ, рН 7,4 та 0,3 мкмоль інозину після хвилинної преінкубації вносили лізат лімфоцитів з подальшою інкубацією проб при 37⁰С. Реакцію зупиняли додаванням 5% трихлороцтової кислоти, після чого проби центрифугували при 1000g впродовж 10 хв. Відбирали аліквоту надосадової рідини, змішували з рівним об'ємом 1% орцинового реактиву. Пробірки закривали зворотними холодильниками і поміщали у киплячу водяну баню на 40 хв. Фотоколориметричне визначення пентоз проводили у надосадовій рідині на фотоколориметрі КФК-2 (Росія) при 670 нм; виміри здійснювали проти еталонної проби, яка містила 1% орциновий реактив та дистильовану воду.

Час інкубації та вміст білка у пробі підбирали з таким розрахунком, щоб визначення ферментативної активності проводилось за умови початкової швидкості реакції.

2.29 Статистичний аналіз результатів досліджень

Для кожної групи розраховували середнє значення (М) та стандартне відхилення (SD) або стандартну похибку середнього (m). Тип розподілу даних та наявність викидів у групах перевіряли за допомогою критерію Шапіро-Уїлка та шляхом візуального аналізу відповідних гістограм. Дані вважались розподіленими нормально за $p > 0,05$ відповідно до критерію Шапіро-Уїлка. У тих випадках, коли вибірккові дані мали тип розподілу відмінний від нормального, дані або візуалізували за допомогою діаграм типу «box with whiskers» і використовували непараметричні тести та критерії, або ж

проводили трансформацію даних для нормалізації розподілу і користувались параметричними методами.

Порівняння середніх значень груп проводили шляхом однофакторного дисперсійного аналізу. У випадку однорідності дисперсій (тест Левіна) проводився апостеріорний тест за Г'юкі; коли дисперсії не були однорідними застосовували однофакторний дисперсійний аналіз за Уелчем та апостеріорний тест за Геймс-Хоуеллом. При порівнянні середніх значень груп із типом розподілу відмінним від нормального користувались U-тестом Манна-Уїтні. Нульову гіпотезу про рівність середніх значень груп відкидали при $p < 0,05$.

Оцінку сили взаємозв'язку між окремими показниками визначали за допомогою коефіцієнту лінійної кореляції Пірсона (r). Кореляцію вважали сильною при $|r| > 0,5$; помірною – при $|r|$ від 0,3 до 0,5; слабкою – при $|r|$ від 0,1 до 0,3 [96]. У тих випадках, коли аналізувались порядкові дані, використовували коефіцієнт рангової кореляції Спірмена (r_s).

Порівняльний аналіз окремих змінних було проведено методом головних компонент (факторний аналіз із вагою факторів $> 0,7$). Критерії стандартизації даних при цьому базувались на середніх значеннях та стандартних відхиленнях для кожної групи відповідно до Leinio S. та Lehtonen K. (2005). Розподіл дослідних груп на споріднені кластери здійснювали методом k -середніх за допомогою спеціального плагіну Prima XL для MS Excel 2007. Всі обрахунки результатів дослідження та візуалізації проводили за допомогою програм IBM[®] SPSS Statistics 22, GraphPad Prism 5 та Microsoft Excel 2007.

РОЗДІЛ 3

ЯДЕРНО-ОПОСЕРЕДКОВАНИЙ ШЛЯХ РЕАЛІЗАЦІЇ РАДІАЦІЙНО-ІНДУКОВАНОГО АПОПТОЗУ

При перебігу молекулярних процесів за радіаційно-індукованого апоптозу особливого значення набувають структурні зміни на молекулярному і надмолекулярному рівнях в генетичному апараті клітин – хроматині вцілому та його складової - молекулі ДНК, які, виникаючи за безпосереднього впливу променевого чинника та опосередковуючись змінами у біомембранах, складають одну з фундаментальних основ радіаційно - біохімічних ефектів. На етапі активації клітинних сигнальних процесів за ядерно-опосередкованого апоптозу долучається система полі-(ADP)рибозилування, процеси протеолітичної деградації (родина цистеїнових протеїназ) та регуляція респонсивних до дії променевого чинника генів.

До системної відповіді на ушкодження ДНК за дії іонізуючої радіації долучаються ряд білків, як-то сенсори одно-дволанцюгових ушкоджень – MDC1 (mediator of DNA damage checkpoint protein 1), 53BP1 (p53-binding protein 1), MRN (Mre11-Rad50-NBS1), 9-1-1 комплекс (Rad9-Rad1-Hus1), які в свою чергу активують систему трансдьюсерних білків, основними з яких є представники родини фосфоінозитид-3-подібних протеїнкіназ (PI3-like kinases) – ДНК- залежна протеїнкіназа (DNA-PK); ATM - кіназа (атаксія-телеангіоектазія мутована) та ATR - кіназа (ATM/ –Rad 3-related kinase). За даними літератури активація ATM запускає специфічну клітинну відповідь через систему ефекторів, що призводить як до модуляції активності білків, так і до змін в регуляції генної експресії завдяки функціонуванню ряду активованих радіаційним чинником та редокс- респонсивних транскрипційних факторів NF-κB, p53, AP-1 [97,98,99].

3.1. Дослідження структурного стану ДНК у лімфоцитах тимусу і селезінки щурів за дії іонізуючої радіації та на фоні введення інозину

Пряма дія іонізуючого випромінювання на структуру молекули ДНК, а також непряма, яка опосередкована дією продуктів вільнорадикальних реакцій, що індукуються радіацією, викликають ушкодження нуклеопротейнових комплексів ядра. Це насамперед поодинокі пошкодження, до яких належать одноланцюгові розриви, модифікації азотистих основ та "лужно-лабільні" ділянки, в їх утворенні превалюють механізми непрямой дії радіації, і вони швидко та ефективно репаруються (50% впродовж 10 - 45 хв); локальні множинні пошкодження – дволанцюгові розриви, негомологічна репарація 50% яких відбувається до 4 год післярадіаційного часу [29]. Слід відмітити, що радіаційно-індуковані активні кисневі метаболіти (АКМ) чинять вплив на молекулу ДНК з утворенням зшивок ДНК-білок, міжланцюгових зшивок ДНК-ДНК та накопиченням ділянок ДНК, які містять окисно-модифіковані азотисті основи. [100]. Перераховані пошкодження ДНК уможливають ініціацію скоординованої відповіді з залученням системи сенсорних, трансдьюсерних і ефекторних білків, які детектують пошкодження ДНК і залежно від їх типу спрямовують долю клітини [101]. За нечисленних контрольованих ефектів можливо активувати стрес-респонсивну відповідь, направлену на виживання клітини за рахунок арешту клітинного циклу та репарації ДНК. При зниженні репараційного потенціалу відбувається накопичення ушкодженої ДНК, що спричиняє запуск програми апоптозу, яка реалізується численними шляхами [6].

3.1.1. Дослідження рівня одно- та дволанцюгових розривів ДНК за дії іонізуючої радіації та на фоні введення інозину

На початковому етапі важливо було дослідити насамперед рівень одно- та дволанцюгових розривів ДНК в умовах нашого експерименту. Необхідно відмітити, що дані дослідження були проведені вперше згідно з методикою, яка була розроблена у співавторстві з Дмитренком М.П. та ін. [73]. Згідно з отриманими результатами рівень одноланцюгових розривів (рис.3.1) ядерної ДНК в лімфоцитах тимусу щурів після опромінення тварин в дозі 1,0 Гр зростав в 1,9 раза та вдвічі через 30 хв і 3 год після впливу, відповідно. За умов дії рентгенівського випромінювання в дозі 7,78 Гр ми відмітили залежне від часу після променевого впливу - 30 хв і 3 год, відповідно, підвищення виходу одноланцюгових розривів ДНК у 2,5 раза та в чотири рази порівняно з контролем.

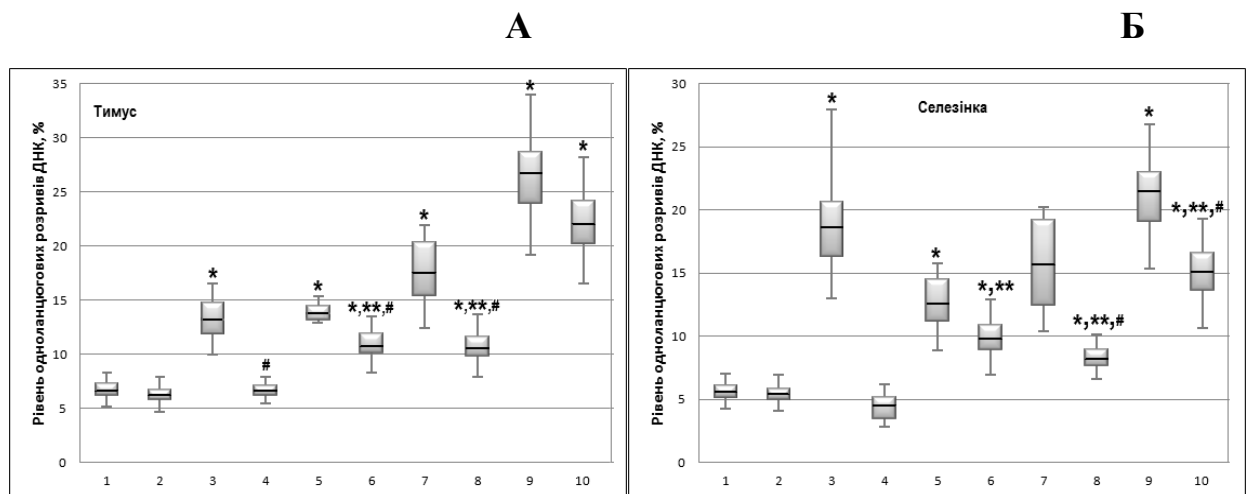


Рис.3.1. Рівень одноланцюгових розривів ДНК у лімфоцитах тимусу (А) та селезінки (Б) щурів за дії іонізуючої радіації та на фоні введення інозину ($M \pm SD$, $n = 5$): 1 – контроль; 2 – контроль + інозин; 3 – через 30 хв після опромінення у дозі 1,0 Гр; 4 – через 30 хв після опромінення у дозі 1,0 Гр + інозин; 5 – через 3 год після опромінення у дозі 1,0 Гр; 6 – через 3 год після опромінення у дозі 1,0 Гр + інозин; 7 – через 30 хв після опромінення у дозі 7,78 Гр; 8 – через 30 хв після опромінення у дозі 7,78 Гр + інозин; 9 – через 3 год після опромінення у дозі 7,78 Гр; 10 – через 3 год після опромінення у дозі 7,78 Гр + інозин. Примітка (також до рисунків 3.2;3.7;3.8;3.9;3.10;6.1;6.2;9.1;9.2):* – достовірно відносно контролю; ** – достовірно відносно контролю на фоні введення інозину; # –достовірно відносно відповідних опромінених груп (на рівні значущості $p < 0,05$)

Дія іонізуючої радіації значно впливає і на ядерний апарат лімфоцитів селезінки щурів, означений нами за виходом розривів ДНК. Так, опромінення щурів в дозі 1,0 Гр спричиняє підвищення виходу одноланцюгових розривів в 3,2 та 2,2 раза, відповідно через 30 хв та 3 год після дії променевого чинника. За дії рентгенівського випромінення в дозі 7,78 Гр нами відмічено зростання (у 2,8 раза) рівня одноланцюгових розривів через 30 хв та у 3,8 раза через 3 год після впливу. Деяко різноспрямований характер накопичення ушкоджень ДНК у імунокомпетентних клітинах лімфоїдних органів за дії променевого чинника може свідчити про їх певну специфічну радіочутливість до низьких і летальних доз випромінення.

Представлені дані корелюють з роботами Белецкого И.П. [102] та Газиева А.И. [29], де за широкого діапазону опромінення *in vivo* відмічається значне підвищення рівня розривів ДНК.

Наступний етап нашої роботи був присвячений виявленню рівня подвійних розривів ланцюгів молекули ядерної ДНК (дволанцюгових розривів) за умов нашої експериментальної моделі. Подвійні розриви утворюються як при випадковому просторовому збігу одноланцюгових розривів в протилежних ланцюгах ДНК (ймовірність якого зростає зі збільшенням накопиченої дози рентгенівське випромінення), так і внаслідок одномоментного пошкодження обох ланцюгів ДНК при виділенні в даному мікрооб'ємі клітини великої кількості енергії. Виділення енергії відбувається не абсолютно рівномірно, а дискретними порціями різної величини, що регламентує можливість накопичення нерепарованих розривів ланцюгів молекули ДНК [103]. Оскільки одноланцюгові розриви репаруються набагато ефективніше, ніж дволанцюгові, тяжкість ураження клітини зі збільшенням частки останніх значно зростає [104].

Згідно з результатами, представленими на рис. 3.2, рівень дволанцюгових розривів ДНК в лімфоцитах тимусу і селезінки щурів підвищується дозозалежним чином за обох часових інтервалів.

Рівень дволанцюгових розривів у лімфоцитах тимусу щурів достовірно зростає (порівняно з контролем) в 2,3 рази через 30 хв та втричі через 3 год після опромінення в дозі 1,0 Гр. За опромінення в дозі 7,78 Гр – через 30 хв та 3 год після впливу - вихід дволанцюгових розривів ДНК підвищувався в 5,8 рази та 6 разів, відповідно.

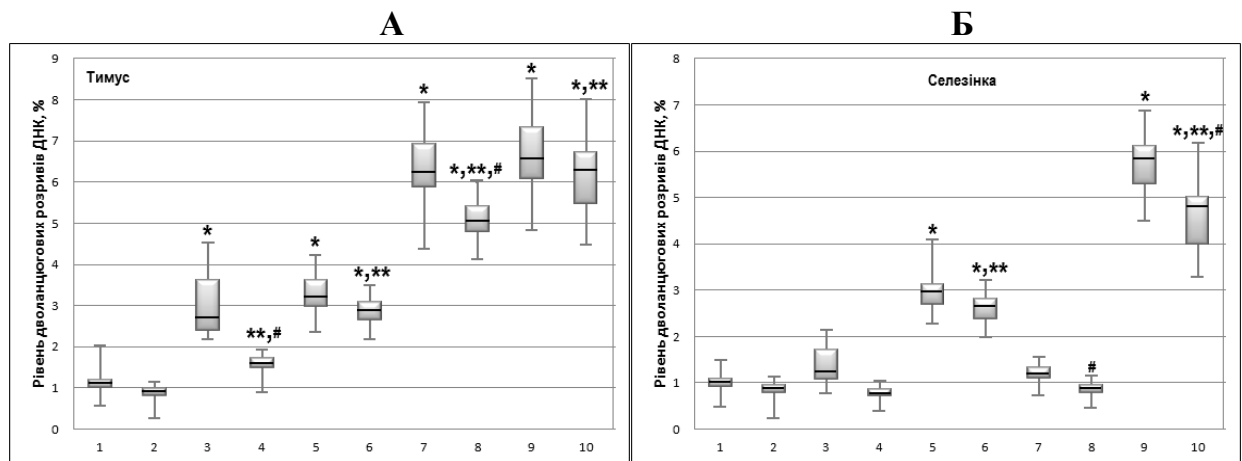


Рис.3.2. Рівень дволанцюгових розривів ДНК у лімфоцитах тимусу (А) та селезінки (Б) щурів за дії іонізуючої радіації та на фоні введення інозину ($M \pm SD$, $n = 5$): 1 – контроль; 2 – контроль + інозин; 3 – через 30 хв після опромінення у дозі 1,0 Гр; 4 – через 30 хв після опромінення у дозі 1,0 Гр + інозин; 5 – через 3 год після опромінення у дозі 1,0 Гр; 6 – через 3 год після опромінення у дозі 1,0 Гр + інозин; 7 – через 30 хв після опромінення у дозі 7,78 Гр; 8 – через 30 хв після опромінення у дозі 7,78 Гр + інозин; 9 – через 3 год після опромінення у дозі 7,78 Гр; 10 – через 3 год після опромінення у дозі 7,78 Гр + інозин

У лімфоцитах селезінки щурів рівень дволанцюгових розривів ДНК за дози випромінення 1,0 Гр підвищувався таким чином: в 1,2 рази через 30 хв та в 2,9 рази через 3 год після дії променевого чинника. Доза рентгенівського випроміння 7,78 Гр (через 3 год після дії) спричиняла більш вагомий вплив, значно пошкоджуючи молекулу ДНК: відмічено підвищення рівня дволанцюгових розривів ДНК у 5,7 рази порівняно з контрольними значеннями. Отримані дані узгоджуються з результатами, представленими у циклі робіт Zhivotovsky V. et al. [101,105], який розглядає радіаційно-

індукований апоптоз як складову програми загибелі клітин, задіяну за умови ушкодження молекули ДНК.

При впливі рентгенівського випромінювання на клітинні макромолекули (ДНК) спостерігається його непряма дія за рахунок активізації радіолізу води та запуску процесу накопичення реакційно-активних продуктів, серед яких на особливу увагу заслуговують ті АКМ, що виникають у безпосередній близькості від молекули та викликають значні порушення у її функціонуванні [106]. Отже, виявлені нами пошкодження молекули ДНК, особливо одноланцюгові розриви, знаходяться в прямій залежності від рівня окисного стресу, спричиненого радіаційним чинником, який опосередковано підвищує ефекти непрямой дії іонізуючої радіації. До ключової ланки окисно-відновного гомеостазу за дії променевого чинника, на думку Бурлакової Е.Б., також належить пероксидація ліпідів ядерних мембран [107], продукти якої утворюють ДНК-аддукти МДА з дезоксинуклеозидами, що призводить до порушення функціонування ядерної ДНК, особливо за низьких доз радіації.

За умови введення тваринам за 15 хв до опромінення інозину нами відмічено модифікуючий ефект препарату на досліджувані показники порівняно з відповідними результатами при дії рентгенівського випромінювання. Можливим поясненням цього процесу є стимулювання інозином анаболічної ланки за умови відновлення пулу АТФ до певного рівня, необхідного для повноцінного функціонування репараційної мережі, що сприяє відновленню ДНК.

Слід відзначити той факт, що деградація ДНК завдяки активації процесу нуклеолізу, визначальна роль в якому відводиться Ca^{2+} , Mg^{2+} -залежним ендонуклеазам (DNAS1L3) та каспазо-активованій ДНКазі CAD (DFF40), підсилюється залученням ядерного протеолізу [31,32]. Розщеплення протеїназами топоізомерази II, ядерних ламін тощо є необхідною передумовою для утворення високомолекулярних фрагментів ДНК (50-300

т.п.н.). Водночас накопичення одноланцюгових розривів у молекулі ДНК активує дію протеїназ, специфічних до гістону H1, а нерепаровані дволанцюгові розриви ДНК активують радіаційно-індуковане p53-залежне переміщення ізотипу гістону H1 – H1.2 до мітохондрій з подальшим вивільненням цитохрому *c* та запуском мітохондріальної ланки апоптозу [108]. Дволанцюгові розриви ДНК слугують сенсорами активації NF- κ B – опосередкованого шляху за радіаційно-індукованого апоптозу, що корелюють з результатами, отриманими в параметрах нашого експерименту (підрозділ 3.2.1). До системи ефекторів, які за радіаційно-опосередкованого накопичення дволанцюгових розривів ДНК фосфорилуються протеїнкіназами ATM, ATR, належить також гістон H2AX, який регламентує роботу ДНК-репараційного комплексу [109,110].

Отже, ушкодження ДНК призводять до скоординованої активації шляхів трансдукції сигналів, які залучені у реалізацію апоптотичної загибелі клітин за дії променевого чинника. Необхідно відмітити, що нерепаровані одно- дволанцюгові розриви молекули ДНК сприяють накопиченню білка p53 та виявленню його численних активностей, серед яких, з одного боку, є активація репараційної здатності білка p53 за рахунок його власної екзонуклеазної активності та взаємодії з білками репараційного комплексу, з іншого – запуск апоптозу шляхом його транскрипційних функцій [111].

3.1.2. Дослідження рівня полідезоксирибонуклеотидів (ПДН) за дії іонізуючої радіації та на фоні введення інозину

Однією з характерних ознак радіаційно-індукованого апоптозу лімфоїдних клітин є розпад ядерного матеріалу, який відбувається внаслідок ферментативного розщеплення геномної ДНК і супроводжується акумуляцією у клітинах низькомолекулярної солерозчинної фракції

дезоксинуклеопротейнів, не зв'язаної з основною масою ДНК [112]. Це перша незворотна подія під час розвитку радіаційно-індукованої загибелі.

З метою оцінки структурного стану ядерного матеріалу у лімфоцитах тимусу та селезінки щурів, опроміненних в дозах 1,0 Гр та 7,78 Гр, нами було досліджено вміст продуктів деградації хроматину – полідезоксирибонуклеотидів (ПДН), що за даними [113] починають достовірно зростати через 2 год після опромінення. Найбільш інтенсивний вихід ПДН корелює у часі з вираженими морфологічними змінами в ядрі опроміненних лімфоцитів тимусу і селезінки [114,115].

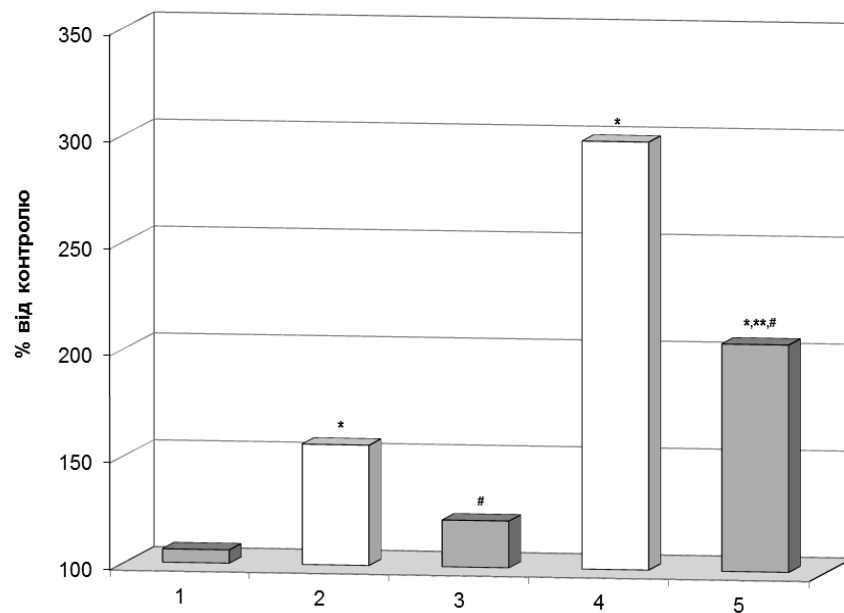


Рис. 3.3. Відносний вміст полідезоксирибонуклеотидів у лімфоцитах тимусу щурів за дії іонізуючої радіації та на фоні введення інозину: 1 – контроль + інозин; 2 – опромінення в дозі 1,0 Гр; 3 – опромінення в дозі 1,0 Гр + інозин; 4 – опромінення в дозі 7,78 Гр; 5 – опромінення в дозі 7,78 Гр + інозин
* – достовірно відносно контролю, ** – достовірно відносно контролю на фоні введення інозину, # – достовірно відносно відповідних опромінених груп, $p < 0,05$; за 100% прийнято рівень ПДН у контролі

Згідно з одержаними результатами, за дії на щурів променевого чинника в досліджуваних дозах спостерігається статистично вірогідне та залежне від дози іонізуючої радіації зростання вмісту ПДН у клітинах тимусу та селезінки. Як видно з рис. 3.3 через 3 год після загального опромінення піддослідних тварин в дозі 1,0 Гр відбувається збільшення у 1,57 раза кількості ПДН у лімфоцитах тимусу. Підвищення дози радіації до 7,78 Гр призводить до подальшого накопичення у клітинах полідезоксирибонуклеотидів, рівень яких зростає втричі порівняно з контролем (рис.3.3).

У лімфоїдних клітинах селезінки має місце збільшення відносного вмісту ПДН у 1,85 раза у відповідь на дію променевого чинника в дозі 1,0 Гр та зростання у 2,4 раза за опромінення у летальній дозі (рис. 3.4).

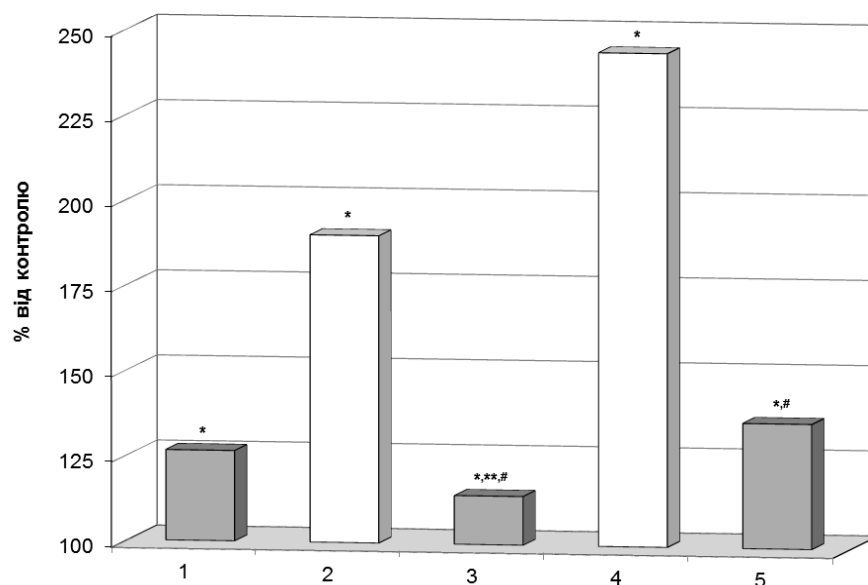


Рис.3.4. Відносний вміст полідезоксирибонуклеотидів у лімфоцитах селезінки щурів за дії іонізуючої радіації та на фоні введення інозину: 1 – контроль + інозин; 2 – опромінення в дозі 1,0 Гр; 3 – опромінення в дозі 1,0 Гр + інозин; 4 – опромінення в дозі 7,78 Гр; 5 – опромінення в дозі 7,78 Гр + інозин

* – достовірно відносно контролю, ** – достовірно відносно контролю на фоні введення інозину, # – достовірно відносно відповідних опромінених груп, $p < 0,05$; за 100% прийнято рівень ПДН у контролі

Нами показано, що при введенні щурам за 15 хв до опромінення інозину спостерігається нормалізуючий ефект препарату на досліджувані

показники. Значне зниження рівня ПДН відмічено у лімфоцитах тимусу щурів, опромінених на фоні введення інозину – показники вірогідно знижуються у 1,3 та у 1,45 рази порівняно з кількістю ПДН у лімфоцитах тимусу за радіаційного впливу відповідно в дозах 1,0 Гр та 7,78 Гр.

У лімфоцитах селезінки також спостерігається зниження рівня полідезоксирибонуклеотидів в 1,7 рази порівняно зі спленоцитами тварин, що зазнали дії радіації в дозі 1,0 Гр та у 1,8 рази за опромінення в дозі 7,78 Гр. Ці дані корелюють з результатами досліджень [53], де було продемонстровано зменшення кількості хромосомних аберацій у клітинах мишей, опромінених на фоні введення препарату. Оскільки відповідно до роботи [116], вміст ПДН у органі визначається не ступенем деградації ядерного матеріалу у клітинних популяціях, а кількістю лімфоцитів, що перебувають на стадії загибелі, вплив інозину можна пояснити за рахунок його нормалізуючої дії на клітинні обмінні процеси і, як наслідок, на рівень виживання клітин.

Отже, через 3 год за дії на тварин іонізуючої радіації в дозах 1,0 та 7,78 Гр спостерігається накопичення у лімфоїдних клітинах обох органів ПДН, що, згідно з сучасними уявленнями, свідчить про активізацію процесів деградації ядерного матеріалу та перехід до незворотної стадії апоптозу.

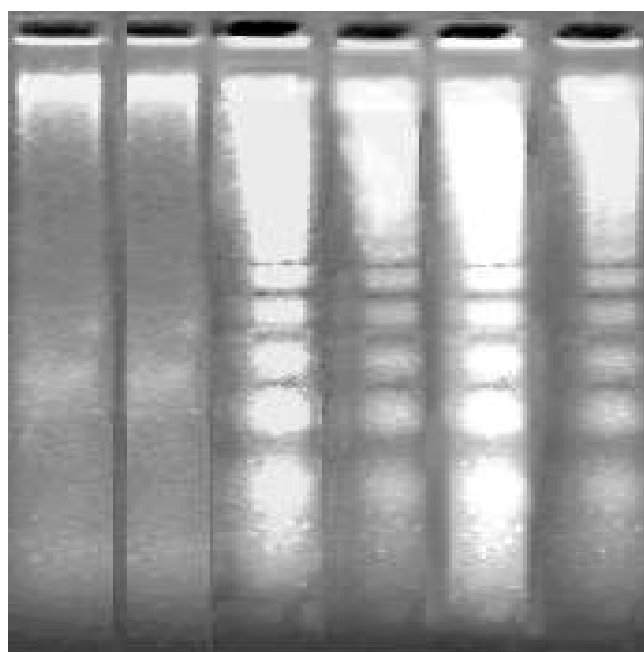
Враховуючи той факт, що специфічним біохімічним маркером радіаційно-індукованої апоптотичної загибелі лімфоцитів є впорядкована міжнуклеосомна фрагментація хроматину, на наступному етапі роботи ми проводили електрофоретичне розділення фрагментів ДНК, виділеної зі спленоцитів та тимоцитів опромінених тварин. За даними літератури [117,118], такий тип деградації хроматину супроводжується появою фрагментів, кратних розмірам нуклеосом (180-200 п.н.- LMW DNA), що характеризуються значно більшою ніж високомолекулярна ДНК рухливістю і під час електрофору в агарозному гелі розташовуються у вигляді

своєрідної "драбини". Процес міжнуклеосомної фрагментації хроматину активується з залученням ряду ендонуклеаз, серед яких основне місце відводиться каспазо-активованій ДНКазі CAD (DFF40), інгібітором якої є ICAD. В експериментах *in vivo* на культурі клітин людини і *in vitro* з рекомбінантним комплексом CAD/ICAD було показано, що проапоптотична активація каспази -3 призводить до протеолізу ICAD за двома специфічним сайтами і вивільненню активної ендонуклеази CAD. Каспаза -7 також може розщеплювати ICAD, але з меншою ефективністю, ніж каспаза-3. Після дисоціації комплексу CAD/ICAD нуклеаза CAD зазнає конформаційних змін і утворює гомоолігомери, що є ензиматично-активними формами CAD [31].

Згідно з результатами досліджень, представлених на рис.3.5–3.6, через 3 год після дії на щурів променевого чинника в дозах 1,0 Гр та 7,78 Гр у лімфоцитах тимусу та селезінки спостерігається поява чіткої картини фрагментації хроматину. Як видно з наведених електрофореграм, за дії на тварин рентгенівського випромінювання в дозі 1,0 Гр високомолекулярні фрагменти ДНК залишаються біля лінії старту, в той час як нуклеосомні ділянки, розподіляючись в агарозному гелі відповідно до їх розміру, формують характерну "драбину". При підвищенні дози іонізуючої радіації до 7,78 Гр кількість зосереджених біля лунки нанесення фрагментів ДНК знижується, а вміст фрагментів, кратних 200 п.н., зростає порівняно з результатами за опромінення тварин в дозі 1,0 Гр. Слід зазначити, що в цілому ні розміри ділянок ДНК, ні співвідношення між окремими фрагментами різної довжини суттєво не залежать від дози радіації [119].

В умовах нашого експерименту застосування інозину не викликає міжнуклеосомної деградації ядерного матеріалу при його введенні інтактним тваринам. За дії на щурів рентгенівського випромінювання на фоні попереднього введення препарату на електрофореграмах спостерігали появу дискретних зон, проте інтенсивність змін була менш виражена порівняно з відповідними результатами при опроміненні в дозах 1,0 Гр та 7,78 Гр. З

огляду на те, що глибина деструкції хроматину визначається кількістю ДНК, яка зазнала деградації, отримані дані щодо ефекту інозину на міжнуклеосомну фрагментацію узгоджуються з показаним нами зниженням вмісту ПДН у клітинах тварин, що зазнали опромінення на фоні введення інозиту, та свідчать на користь покращення метаболічного стану лімфоцитів при застосуванні препарату.



1 2 3 4 5 6

Рис. 3.5. Електрофореграма хроматину лімфоцитів тимусу щурів: 1-контроль; 2- контроль на фоні введення інозину; 3-опромінення в дозі 1,0 Гр; 4-опромінення в дозі 1,0 Гр на фоні введення інозину; 5-опромінення в дозі 7,78 Гр; 6-опромінення в дозі 7,78 Гр на фоні введення інозину

Модифікуючий ефект інозину на вищенаведені показники можна пояснити також з позиції можливості залучення цього метаболіту обміну пуринів до анаболічних реакцій ресинтезу АТФ, з подальшим його використанням для функціонування компонентів репараційної системи (лігази, ряду протеїнкіназ, тощо). Слід відзначити, що від підтримання вмісту АТФ у клітині на певному рівні залежить власне перебіг апоптотичної загибелі в цілому. Таким чином, одержані нами дані по накопиченню у лімфоцитах

полідезоксирибонуклеотидів та результати електрофоретичного розділення хроматину свідчать, що через три години після дії на тварин іонізуючої радіації в дозах 1,0 Гр та 7,78 Гр у лімфоїдних клітинах тимусу і селезінки спостерігаються значні деструктивні зміни, пов'язані з пошкодженням структурної організації хроматину, що супроводжується посиленням деградації ядерного матеріалу і, згідно з сучасними даними, класифікується як прояв апоптотичної загибелі клітини [18,120].

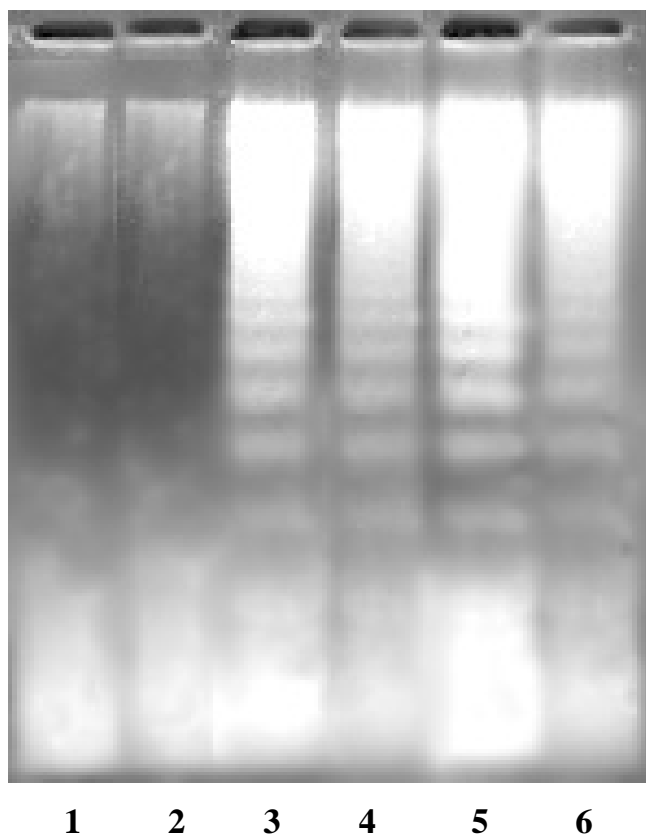


Рис. 3.6. Електрофореграма хроматину лімфоцитів селезінки щурів: 1-контроль; 2- контроль на фоні введення інозину; 3-опромінення в дозі 1,0 Гр; 4-опромінення в дозі 1,0 Гр на фоні введення інозину; 5-опромінення в дозі 7,78 Гр; 6-опромінення в дозі 7,78 Гр на фоні введення інозину

3.1.3 Активність полі(ADP-рибозо)полімерази (ПАРП) і вміст НАД⁺ за дії іонізуючого випромінювання та на фоні введення інозину

Численні літературні джерела [121,122,123,124,125] постулюють участь полі(ADP-рибозо)полімерази в ключових процесах, пов'язаних з функціонуванням клітини в цілому, а саме в ремоделюванні хроматину, репарації розривів ДНК, регуляції експресії генів, інтеграції клітинних сигнальних шляхів, так і у реалізації програм загибелі клітин, що дало підґрунття для визначення активності фермента в лімфоцитах тимусу і селезінки щурів за умов нашої експериментальної моделі.

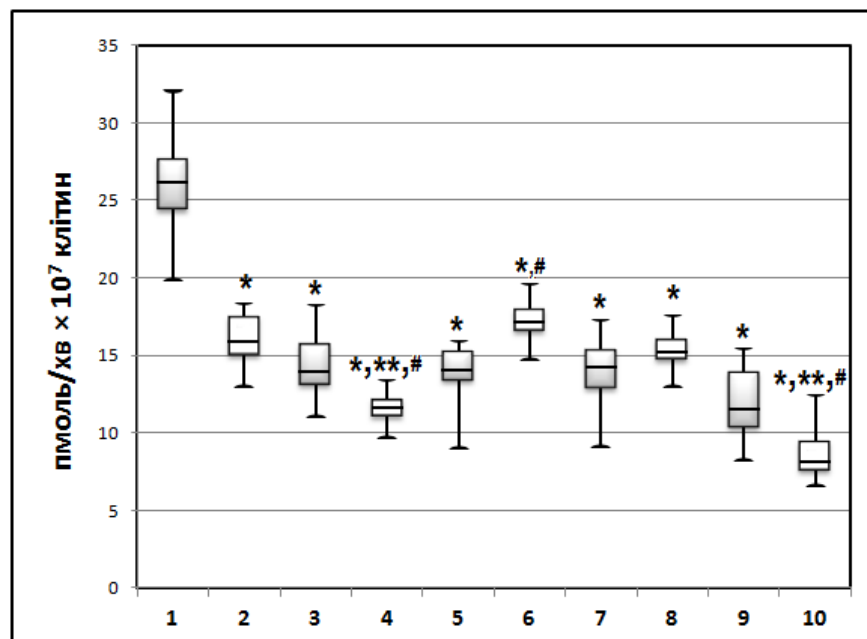


Рис.3.7. Активність полі(ADP-рибозо)полімерази у лімфоцитах тимусу щурів за дії іонізуючої радіації та на фоні введення інозину ($M \pm SD$, $n = 5$): 1 – контроль; 2 – контроль + інозин; 3 – через 30 хв після опромінення у дозі 1,0 Гр; 4 – через 30 хв після опромінення у дозі 1,0 Гр + інозин; 5 – через 3 год після опромінення у дозі 1,0 Гр; 6 – через 3 год після опромінення у дозі 1,0 Гр + інозин; 7 – через 30 хв після опромінення у дозі 7,78 Гр; 8 – через 30 хв після опромінення у дозі 7,78 Гр + інозин; 9 – через 3 год після опромінення у дозі 7,78 Гр; 10 – через 3 год після опромінення у дозі 7,78 Гр + інозин

Згідно з одержаними даними, за дії іонізуючої радіації спостерігаються різнонаправлені зміни активності полі(ADP-рибозо)полімерази у лімфоїдних клітинах тимусу та селезінки (рис.3.7- 3.8). Так, за опромінення в дозі 1,0 Гр через 30 хв і 3 год після впливу встановлено пригнічення (у 1,8 раза). ферментативної активності ПАРП у лімфоцитах тимусу щурів. Дія променевого чинника в дозі 7,78 Гр призводить до зниження активності ферменту - в 2,3 раза через 3 год після впливу. При опроміненні за умови введення інозину відмічалась нормалізація активності ферменту на фоні опромінених груп (рис. 3.7).

За даними літератури на ранніх етапах після генотоксичного впливу відбувається аутомодифікація ПАРП за рахунок опосередкованого протеїназами (каспазами, калпаїнами, катепсинами) розщеплення ферменту з подальшою його інактивацією [126]. Наведені нами результати узгоджуються з висунутою Oliver F.G.et al [127] теорією ранніх маркерів апоптозу, створеною з залученням даних ряду дослідників по вивченню радіаційно-індукованого апоптозу лімфоцитів щурів [128,129]. Автор постулює пріоритетність протеолітичного каспазо-3,-7-опосередкованого розщеплення ПАРП, що уможлиблює ескалацію Ca^{2+} , Mg^{2+} -залежного ендонуклеолізу (за нашими результатами, починаючи з 3 год після опромінення в обох дозах накопичуються полідезоксирибонуклеотиди), порівняно з гіперактивацією ферменту (як частини репараційного комплексу) на фоні накопичення нерепарованих розривів ДНК. Вважають, що деградована ПАРП полегшує доступ ендонуклеаз до хроматину, сприяючи активації Ca^{2+} , Mg^{2+} -залежних ендонуклеаз (DNAS1L3) [32], активність яких опосередковується підвищенням внутрішньоклітинної концентрації Ca^{2+} , що призводить до ескалації деградації ДНК. За нормальних умов молекули DNAS1L3 після надходження до ядра полі(ADP)рибозилуються. Така посттранляційна модифікація призводить до інактивації ендонуклеази. Протеолітична деградація ПАРП за дії променевого чинника запобігає подальшому

полі(ADP)-рибозилуванню DNAS1L3, завдяки чому частина синтезованих de novo молекул ендонуклеази не модифікуються і залишаються активними.

Згідно з результатами, представленими на рис.3.8, у лімфоцитах селезінки зміни активності ПАРП за опромінення в дозі 1,0 Гр відрізняються від показників, отриманих при дослідженні лімфоцитів тимусу щурів: через 30 хв і 3 год після впливу активність ПАРП зростає в 1,7 та 1,07 рази, відповідно. Представлені дані корелюють зі значним підвищенням рівня одноланцюгових розривів ДНК в лімфоцитах селезінки щурів за опромінення в дозі 1,0 Гр. Водночас дія променевого чинника в дозі 7,78 Гр призводить до пригнічення ферментативної активності в 1,7 раза за обох часових інтервалів.

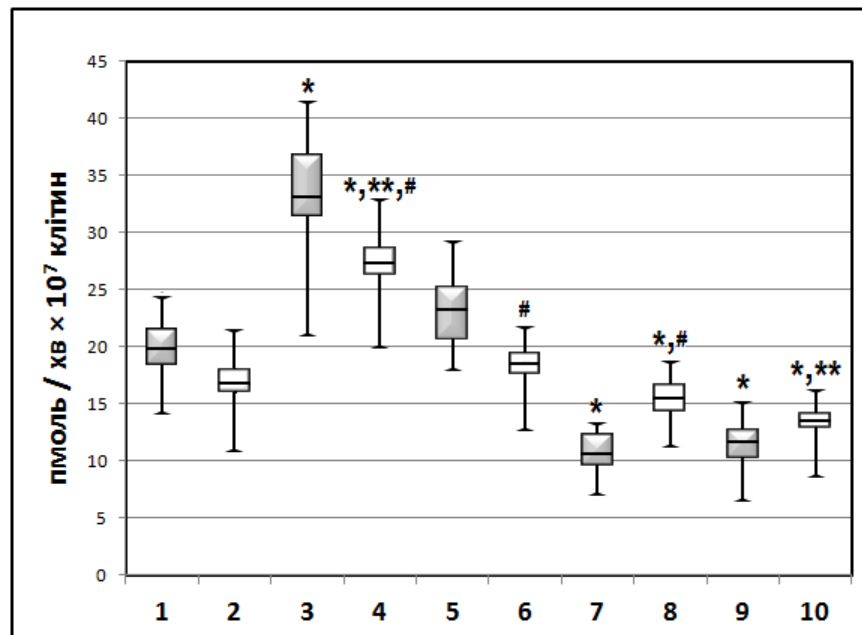


Рис.3.8. Активність полі(ADP-рибозо)полімерази у лімфоцитах селезінки щурів за дії іонізуючої радіації та на фоні введення інозину ($M \pm SD$, $n = 5$): 1 – контроль; 2 – контроль + інозин; 3 – через 30 хв після опромінення у дозі 1,0 Гр; 4 – через 30 хв після опромінення у дозі 1,0 Гр + інозин; 5 – через 3 год після опромінення у дозі 1,0 Гр; 6 – через 3 год після опромінення у дозі 1,0 Гр + інозин; 7 – через 30 хв після опромінення у дозі 7,78 Гр; 8 – через 30 хв після опромінення у дозі 7,78 Гр + інозин; 9 – через 3 год після опромінення у дозі 7,78 Гр; 10– через 3 год після опромінення у дозі 7,78 Гр + інозин

На фоні введення інозину було відмічено модифікуючий вплив на активність ферменту порівняно з результатами за опромінення у досліджуваних дозах (1,0 Гр та 7,78 Гр). За даними, отриманими Virag et. al. [67,130], спостерігався модулюючий вплив пуринів на активність ПАРП за оксидативного стресу.

На думку Hasko G. et al [71], модулюючий вплив інозину за умови зниження активності ПАРП спричиняє опосередковану взаємодією ПАРП з транскрипційними факторами AP-1 та NF-κB та інактивацію експресії AP-1- та NF-κB-респонсивних генів, які кодують прозапальні цитокіни та хемокіни. В такий спосіб виявляються антизапальні ефекти досліджуваного препарату.

Таким чином, отримані нами результати щодо різнонаправлених змін активності ферменту полі(ADP)полімерази у лімфоцитах тимусу і селезінки щурів за дії іонізуючої радіації у дозах 1,0 Гр та 7,78 Гр узгоджуються з продемонстрованим підвищенням рівня одно- і дволанцюгових розривів ДНК, що на фоні активації протеолітичного каскаду цистеїнових протеїназ призводить до зменшення ефективності роботи системи ексцизійної репарації ДНК [131,132].

Оскільки субстратом для ADP-рибозилування слугує нікотинамід-аденіндинуклеотид, доцільно було вивчити вміст НАД⁺ за дії іонізуючої радіації у досліджуваних дозах (1,0 Гр та 7,78 Гр) через 30 хв і 3 год після впливу.

Результати проведених досліджень представлено на рис. 3.9-3.10. Аналізуючи отримані дані, можна відмітити, що у тимусі щурів через 30 хв після дії іонізуючого випромінювання в дозах 1,0 та 7,78 Гр спостерігається зниження рівня НАД⁺ в 1,5 та 1,4 раза, відповідно порівняно з контролем. Через 3 год після рентгенівського опромінення в дозі 1,0 Гр вміст НАД⁺ у тимусі щурів залишається у межах контрольного значення, в той час як при підвищенні дози опромінення вміст НАД⁺ знижується в 1,3 раза порівняно з контролем.

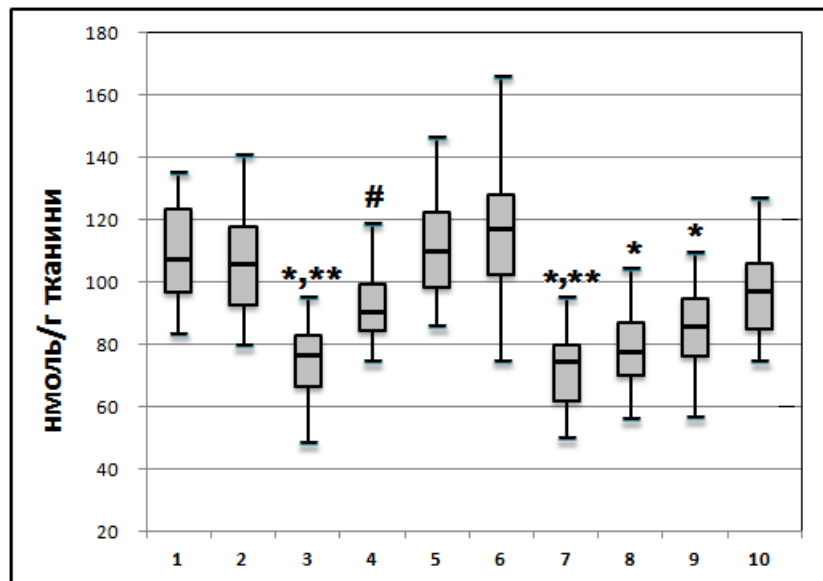


Рис.3.9. Вміст НАД⁺ у лімфоцитах тимусу щурів у лімфоцитах тимусу щурів за дії іонізуючої радіації та на фоні введення інозину (M ± SD, n = 5): 1 – контроль; 2 – контроль + інозин; 3 – через 30 хв після опромінення у дозі 1,0 Гр; 4 – через 30 хв після опромінення у дозі 1,0 Гр + інозин; 5 – через 3 год після опромінення у дозі 1,0 Гр; 6 – через 3 год після опромінення у дозі 1,0 Гр + інозин; 7 – через 30 хв після опромінення у дозі 7,78 Гр; 8 – через 30 хв після опромінення у дозі 7,78 Гр + інозин; 9 – через 3 год після опромінення у дозі 7,78 Гр; 10 – через 3 год після опромінення у дозі 7,78 Гр + інозин

Такі зміни пояснюються за рахунок активації ферменту ADP-рибозилциклази, який, утилізуючи НАД⁺, активує процес синтезу циклоADP-рибози – потенційного вторинного месенджера та проапоптичної молекули [123,133].

У селезінці щурів відмічено зниження вмісту НАД⁺ в 1,6 раза через 30 хв після дії іонізуючої радіації в дозі 1,0 Гр (рис.3.10). Через 3 год після дії променевого чинника в дозах 1,0 Гр і 7,78 Гр спостерігається зниження вмісту НАД⁺ в 1,36 та в 1,7 раза, відповідно, що можна пояснити залученням інших представників родини ПАРП [125]. Варто зауважити, що останнім часом увага вчених зосередилась на дослідженні ролі НАД⁺ як координатора регуляторних мереж відповіді клітин на стресові чинники, що дало змогу висунути гіпотезу "Світ НАД" [134,135], враховуючи унікальні властивості молекули.

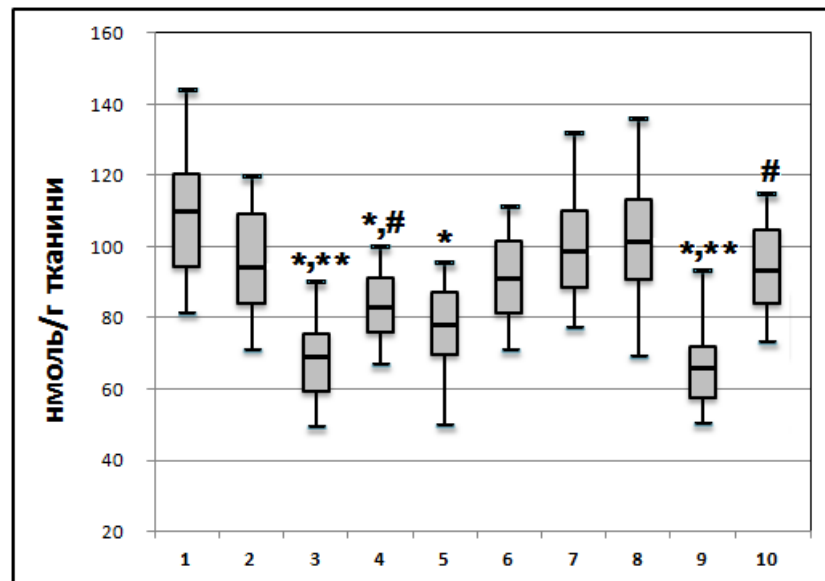


Рис.3.10. Вміст НАД⁺ у лімфоцитах селезінки щурів за дії іонізуючої радіації та на фоні введення інозину (M ± SD, n = 5): 1 – контроль; 2 – контроль + інозин; 3 – через 30 хв після опромінення у дозі 1,0 Гр; 4 – через 30 хв після опромінення у дозі 1,0 Гр + інозин; 5 – через 3 год після опромінення у дозі 1,0 Гр; 6 – через 3 год після опромінення у дозі 1,0 Гр + інозин; 7 – через 30 хв після опромінення у дозі 7,78 Гр; 8 – через 30 хв після опромінення у дозі 7,78 Гр + інозин; 9 – через 3 год після опромінення у дозі 7,78 Гр; 10 – через 3 год після опромінення у дозі 7,78 Гр + інозин

Отже, залученням полі(ADP)рибозилування ядерних білків до процесів репарації ДНК можна пояснити істотне зниження рівня внутрішньоклітинного НАД⁺ у лімфоцитах тимусу та селезінки щурів. Зниження рівня НАД⁺ у клітинах призводить до зниження активності НАД⁺-залежних деацетилаз (SIRT1, SIRT2)- ферментів, які специфічно каталізують деацетилювання гістонів, що пригнічує транскрипцію та знижує виживання організму в цілому [136,137].

Згідно з отриманими нами результатами, при введенні тваринам за 15 хв до опромінення інозину спостерігається нормалізуючий ефект препарату на вміст НАД⁺ в обох органах порівняно з відповідними показниками при дії рентгенівського опромінення. Механізм дії інозину можна пояснити із урахуванням тісного зв'язку обміну пуринових нуклеотидів з метаболізмом

НАД⁺. Таким чином, метаболіти пуринового обміну, до яких належить інозин, відіграють визначальну роль у підтриманні внутрішньоклітинної концентрації НАД⁺. Отже, наведені результати сприяють висвітленню ролі процесу полі(ADP)рибозилування як маркерного за генотоксичного стресу. Необхідно зазначити, що активації ПАРП сприяють її пострасляційні модифікації. По-перше, це аутомодифікація шляхом ауто(ADP)рибозилування, що сприяє ПАРП-залежній активації репараційного потенціалу клітини [138]. До регуляторних модифікацій також належить ацетилювання, особливий інтерес викликає активація цього процесу з залученням р300/CBP-ацетилаз. Комплекс ПАРП–р300/CBP взаємодіє з двохсубодиничним ядерним транскрипційним фактором NF-κB, що сприяє активації його транскрипційної активності [139]. І в решті-решт процеси убіквітинування за рахунок E3-лігази Induna можуть призвести до протеасомної деградації ПАРильованих білків, наприклад оксидативно-модифікованих гістонів [140, 141].

Досліджені нами радіаційно-індуковані зміни в активації полі(ADP-рибозо)полімерази можуть бути пов'язані також з активацією системи Ca²⁺-залежних цистеїнових протеїназ – калпаїнів, субстратом яких виступає ПАРП [142]. Зниження активності калпаїнів (розділ 6) у лімфоцитах селезінки за обох доз опромінення корелює з динамікою зміни активності ПАРП в умовах нашого експерименту. Останнім часом одержано переконливі докази про залучення ПАРП до каспазо-незалежного, опосередкованого AIF, процесу, який отримав назву Parthanatos [143,144]. Взаємозв'язок між ПАРП, AIF та калпаїнами висвітлено у відповідних розділах роботи. Водночас виявлені зміни активності ферменту ПАРП в лімфоцитах тимусу і селезінки щурів в параметрах нашого експерименту можуть опосередковувати процеси, пов'язані з контролем субклітинної локалізації і функціонування головних стрес-респонсивних транскрипційних факторів p53, NF-κB за рахунок так званої ПАРП-сигналосоми [145].

Таким чином, наступний етап наших досліджень присвячено оцінці внеску ряду транскрипційних факторів та каспази-2 у реалізацію генотоксичного стресу за дії рентгенівського опромінення.

3.2 Оцінка рівня транскрипційних факторів та активності каспази-2 у лімфоцитах тимусу і селезінки щурів за дії іонізуючої радіації

Радіаційно- опосередковані ушкодження молекули ДНК, як вже зазначалось, ініціюють скоординовану відповідь клітин з залученням системи сенсорних, трансдьюсерних і ефекторних білків, які детектують пошкодження ДНК і, при недостатній активності репараційних систем, уможливають запуск програмованої клітинної загибелі шляхом апоптозу [146]. До чинників, активація яких сприяє реалізації програми радіаційно-індукованого апоптозу, можна віднести транскрипційні фактори NF-кВ, р53, AP-1 та каспазу-2, яка належить до цистеїнових протеїназ родини каспаз та виконує ініціаторні/ефекторні функції в системі ядерно- та мітохондріально-опосередкованого апоптозу.

3.2.1 Рівень транскрипційного фактору NF-кВ у лімфоцитах тимусу і селезінки щурів за дії іонізуючої радіації

NF-кВ - загальна назва для членів родини гомо- і гетеродимерних транскрипційних факторів (білки родини Rel). У лімфоцитах найчастіше виявляють гетеродимер р50/р65 Rel, причому нестимульовані клітини в цитоплазмі містять NF-кВ-димер в неактивному стані за умови утворення комплексу з інгібіторним білком ІкВ [147]. За дії генотоксичних чинників транскрипційна активація NF-кВ наближена до класичного шляху[148] і приводить до такого перебігу подій: по-перше, деградації ІкВ в цитоплазмі з залученням системи протеасоми та подальшої транслокації вивільненого NF-

кВ-димеру до ядра; по-друге, відбувається зв'язування активованого NF-кВ з відповідними регуляторними ділянками ДНК та стимуляція транскрипції відповідних генів-мішеней. Необхідно відмітити, що до них належать як проапоптотичні – *FasL (CD95L)*, *Fas (CD95)*, *p53 c-Мус*, *Bcl-xS* так і антиапоптотичні гени – *XIAP*, *Bcl-2*, *c-FLI*[149,150]. Дія іонізуючої радіації спричиняє активацію серин/треонінової протеїнкінази – ІкВ кінази (ІКК), яка функціонує у вигляді тримерного комплексу (ІКК α , ІКК β , ІКК γ =NEMO) та фосфорилує ІкВ за двома залишками Ser (в основному 32 і 36), що стимулює його убіквітинування та подальшу деградацію в системі протеасоми. Дисоціація ІкВ від комплексу NF-кВ-ІкВ активує ядерну транслокацію димеру p50/p65, при цьому фаза трансактивації білка визначає силу і тривалість відповіді на стрес за умов додаткової регуляції на рівні пострансляційних модифікацій, що включає фосфорилування (ATM, MSK1, PKA, редокс-залежні MAP-кінази JNK та p38), ацетилювання (CBP/p300) та глутатіонілювання в субодиницях NF-кВ, ІкВ, ІКК та каспазо-опосередковану деградацію NEMO [151,152,153,154].

У запропонованій схемі індукованої іонізуючою радіацією активації NF-кВ зазначено, що саме фосфорилування NEMO кіназою ATM в ядрі за умови попереднього сумоїлування та подальшого його моно-убіквітинування призводить до експорту з ядра комплексу NEMO – ATM, активації ІКК та подальшого проведення активаційного сигналу [155, 156].

У зв'язку з цим в умовах нашого експерименту важливим було оцінити вміст активованої форми (ядерна фракція) транскрипційного фактору NF-кВ. Згідно з одержаними результатами (табл. 1), у лімфоцитах тимусу спостерігається достовірно підвищення вмісту NF-кВ (p50/p65) у ядерній фракції як через 30 хв, так і через 3 год після опромінення: за дози 7,78 Гр в 1,5 та 1,25 раза, відповідно, за дози 1,0 Гр в 1,15 та 1,2 раза, відповідно.

Таким чином, отримані нами дані для лімфоцитів тимусу свідчать про радіаційно-опосередковану стимуляцію транслокації NF-κB до ядра за умови накопичення дволанцюгових розривів ДНК, рівень яких значно зростає за обох доз опромінення та за обох часових інтервалів. Наведені результати доповнили нечисленні відомості, представлені в ряді робіт, де відмічено залежну від дози опромінення тканино-специфічну активацію NF-κB [157,158], що промотує процеси апоптозу. Наші результати доповнили і розширили інформаційну базу, яка лягла в основу теорії радіаційно-опосередкованої NF-κB-залежної індукції апоптозу, що змінила усталені погляди про класичний RIP-опосередкований TNF-α- сигналінг за активації NF-κB, що приводить до проліферації і виживання клітин [153].

Таблиця 3.1

Вміст NF-κB в ядерній фракції лімфоцитів тимусу та селезінки щурів за впливу іонізуючої радіації (пг/мкг білка) ($M \pm m$; n=5)

Групи тварин		Лімфоцити тимусу	Лімфоцити селезінки
Контроль		32,66± 0,44	32,45±0,48
30 хв п/о	1,0 Гр	37,61±0,61*	37,55±0,29*
	7,78 Гр	42,19± 0,32*	40,05±0,43*
3 год п/о	1,0 Гр	39,64±0,39*	42,40±0,59*
	7,78 Гр	40,36±0,57*	37,81±0,47*

* – достовірно відносно контролю, $p < 0,05$

Дослідженнями вмісту NF-κB (p50/p65) у ядерній фракції спленоцитів щурів встановлено, що за дози 1,0 Гр відбувається його підвищення в 1,16 та 1,31 раза через 30 хв і 3 год після опромінення, відповідно (табл. 1). За дози

7,78 Гр вміст NF-кВ у ядерній фракції підвищується в 1,23 раза через 30 хв та в 1,16 раза через 3 год після опромінення.

За умови дії радіаційного чинника для лімфоцитів тимусу та селезінки щурів спостерігається кореляція отриманих даних з пострадіаційними структурними змінами ядерної ДНК, а саме накопичення розривів у її молекулі.

На сьогодні регуляція процесів, пов'язаних зі специфікою структури і функцій NF-кВ, його інгібіторів та ІКК-комплексу набуває особливої актуальності у зв'язку з пошуком засобів підсилення променевої терапії пухлин. На моделі клітин лінії раку молочної залози та нокаутних по $PARP^{-/-}$ та $p65^{-/-}$ MEF клітинах [159] за дії променевого чинника дістала підтвердження гіпотеза Hassa P. [160] про участь молекули ПАРП -1 у процесі коактивації NF-кВ шляхом безпосередньої білок-білкової взаємодії з обома субодиницями (p50/p65) фактора та з ацетилазою CBP/p300, що регулює транскрипційну активність NF-кВ та може використовуватись в протипухлинній терапії.

Посттрансляційна регуляція білків шляхом фосфорилування є характерною для радіаційно-опосередкованої активації транскрипційного фактору NF-кВ. Так, ERK-залежне фосфорилування рибосомальною S6 кіназою (RSK1, або кіназа pp90rsk) субодиниці p65 по Ser-536 фактично є ІКК-незалежним (не опосередкованим протеасомною деградацією ІкВ за активації NF-кВ). Отже RSK1 формує комплекс з p65 і індукує фосфорилування останнього. Це зменшує спорідненість p65 до ІкВа, що приводить до стійкої акумуляції вільного p65/p50 гетеродимеру у ядрі і транскрипційної активації фактору NF-кВ [148,161]. Можливо саме цей процес пояснює отримані нами результати, представлені у розділі 6, по радіаційно-опосередкованому зниженню протеасомної активності на фоні підвищення вмісту ядерної фракції NF-кВ у лімфоцитах тимусу і селезінки щурів в параметрах нашого експерименту.

Відповідно до сучасних поглядів за дії променевого чинника спостерігається дисбаланс окисного метаболізму, при якому надлишкова генерація АКМ на фоні вичерпання резервів антиоксидантного захисту впливає на функціональний стан редокс-чутливих систем внутрішньоклітинної регуляції метаболізму. Так, процес експресії генів і власне функціонування транскрипційного апарату знаходиться під контролем клітинного редокс-балансу [162]. До редокс-чутливих транскрипційних факторів належать білки NF-κB, p53, AP-1 та інші. Оскільки взаємодія цих факторів з компонентами транскрипційного апарату та рядом регуляторних білків може визначати подальшу долю клітини, ми співставили отримані нами дані по впливу іонізуючого випромінювання на зазначені вище фактори та загальний редокс-статус лімфоцитів тимусу і селезінки щурів.

Активация фактору NF-κB спостерігається за умови певного рівня АКМ, що сприяє збалансованій транскрипційній активації ряду респонсивних генів, дія яких направлена на модуляцію захисних реакцій організму за дії стресорного чинника. Ці процеси опосередковуються накопиченням окисленого низькомолекулярного редокс-залежного білка тіоредоксину (дисульфідредуктаза-Trx), що відмічається також для активації транскрипційного фактору AP-1 з залученням MAP-кінази ASK-1 [163]. В регуляції АКМ-опосередкованої активації фактору NF-κB беруть участь протеїнкінази, які входять до MAP-кіназних каскадів, а саме JNK і p38 [164].

Зазначимо, що, згідно з даними літератури [165] високо-інтенсивний окисний стрес чинить безпосередній вплив на ДНК-зв'язуючі властивості ядерного NF-κB, регулюючи його транскрипційну активність. Так, встановлено, що p50 у складі NF-κB-димеру містить у своєму ДНК-зв'язуючому домені високочутливий до дії АКМ залишок цистеїну – Cys-62, який при активації має знаходитись у ядрі у відновленому стані (на відміну від окисленого стану в цитоплазмі), оскільки бере безпосередню участь у формуванні міжмолекулярних дисульфідних зв'язків (білок-ДНК). До

підтримання відновленого статусу Cys-62 залучаються тіоредоксин (Trx) та білковий фактор Ref-1/APE1 [166].

В той же час дія променевого чинника опосередковує транскрипцію NF-κB-респонсивних генів, що кодують компоненти як прооксидантної, так і антиоксидантної ланки. До генів-мішеней належать гени антиоксидантних ферментів - Cu^{2+} - Zn^{2+} -СОД та Mn^{2+} -СОД (СОД2), каталази, тіоредоксину та прооксидантного ферменту ксантинооксидази. На сьогодні вважається, що, починаючи з певного високого порогового рівня АКМ мобілізація захисних систем організму значно слабшає, в той же час значно зростає стимуляція проапоптотичних реакцій [167]. Прикладом розгортання подій за таким планом є опосередкована NF-κB транскрипція проапоптотичного *Fas L*. NF-κB також може індукувати TNF-α, який через систему адаптера FADD сприятиме активації проапоптотичної каспази-8 [168].

Таким чином, на підставі отриманих нами даних, а також результатів, які свідчать про різнонаправленість змін активності основних ферментів про- та антиоксидантної системи (ксантинооксидази, супероксиддисмутази, каталази) у лімфоцитах тимусу і селезінки щурів за дії променевого чинника (розділ 7), можна стверджувати про залучення транскрипційного фактора NF-κB у регуляцію рівня АКМ, які, в свою чергу, контролюють молекулярні механізми NF-κB-залежних трансдукційних шляхів, що реалізуються у радіаційно-індуковану програмовану клітинну загибель [169].

3.2.2 Рівень транскрипційного фактора p53 у лімфоцитах тимусу і селезінки щурів за дії іонізуючої радіації

Білок p53 – продукт гена-супресора пухлин *p53* має низький вміст у клітині за відсутності стресових сигналів, що є результатом строго збалансованих процесів його синтезу та деградації. Під дією генотоксичних

чинників спостерігається активація p53, яка полягає в набутті білком здатності зв'язуватись з ДНК та активувати транскрипцію генів, що містять p53-респонсивну послідовність.

Встановлено, що у відповідь на дію променевого чинника спостерігається АТМ-залежна активація (шляхом фосфорилування) [170] та стабілізація p53. Це є основним маркером модуляції клітинного транскриптомуну за накопичення високого рівня одно- дволанцюгових розривів ДНК. До родини p53 респонсивних генів [171] належать гени, які активують різні шляхи апоптозу: мітохондріально-опосередкований – індукція апоптозу – *PUMA*, *NOXA*, *BAX*, *APAF1*, репресія апоптозу – *Bcl-2*; індукція рецептор-опосередкованого шляху – *Fas*; *FasL*. Знайдено також ряд інших p53-залежних генів, залучених у різні види апоптозу – *PIDD* (p53-індукований білок з доменами смерті), *Scotin* (p53-індуцибельний проапоптотичний білок, який бере участь у ЕПР-залежному апоптозі) [172].

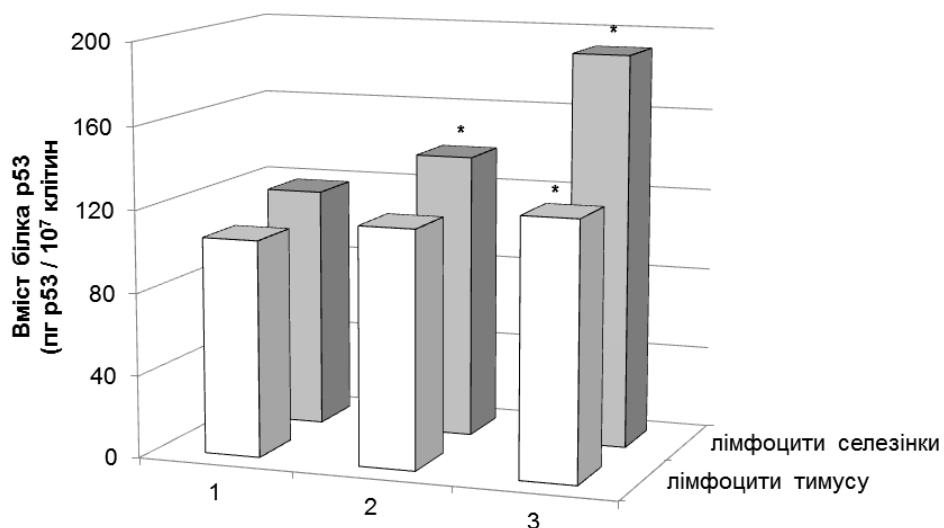


Рис. 3.11. Вміст білка p53 в лімфоцитах тимусу та селезінки щурів за дії іонізуючої радіації в дозі 1,0 Гр: 1 – контроль; 2 – через 30 хв після опромінення; 3 – через 3 год після опромінення
* – достовірно відносно контролю, $p < 0,05$

Беручи до уваги виявлені в умовах нашого експерименту порушення структурної цілісності генетичного апарата, актуально дослідити вміст транскрипційного фактора – білка p53 та можливих шляхів активації p53-опосередкованої ланки радіаційно-індукованого апоптозу. Встановлено, що за дії променевого чинника у дозі 1,0 Гр у лімфоцитах тимусу вміст p53 достовірно підвищується в 1,18 раза порівняно з контролем через 3 год після опромінення. Щодо рівня p53 у лімфоцитах селезінки за опромінення в дозі 1,0 Гр нами відмічається його зростання у 1,17 разів та 1,63 раза через 30 хв та 3 год після радіаційного впливу (рис.3.11) Наведені дані узгоджуються з радіаційно-опосередкованим накопиченням одно-та дволанцюгових розривів ДНК за умов нашого експериментального підходу та свідчать на користь того факту, що у лімфоїдних клітинах, на відміну від інших, де превалюють процеси арешту клітинного циклу і репарації ДНК, стабілізація p53 призводить до активізації апоптотичної загибелі [173].

За даними літератури [174], основним механізмом, який забезпечує підтримання певного сталого рівня p53, є його взаємодія з білком Mdm2, який після зв'язування унеможливорює просторову взаємодію p53 з відповідними генами-мішенями, а, отже, блокує транскрипційну активність p53. Роль Mdm2 як регуляторної молекули пов'язана також з його E3-лігазною активністю: Mdm2 каталізує приєднання убіквітину до p53 з подальшим розщепленням його у 26S-протеосомах. Загальноприйнято, що вміст Mdm2 і p53 регулюється за механізмом негативного зворотного зв'язку, коли стабілізація та активація p53 індукує p53-залежний синтез білка Mdm2, а зростання кількості Mdm2, в свою чергу, сприяє посиленню убіквітинування та, відповідно, протеолізу p53.

Проте останні дані літератури стверджують, що АТМ- залежне фосфорильовання Mdm2 за генотоксичного стресу призводить, з одного боку, до Mdm2-опосередкованого підсилення транскрипції гена *p53* [175] та

підвищення вмісту p53, з іншого– уможлиблює аутоубіквітинування Mdm2 та його подальшу, опосередковану протеасомою, деградацію.

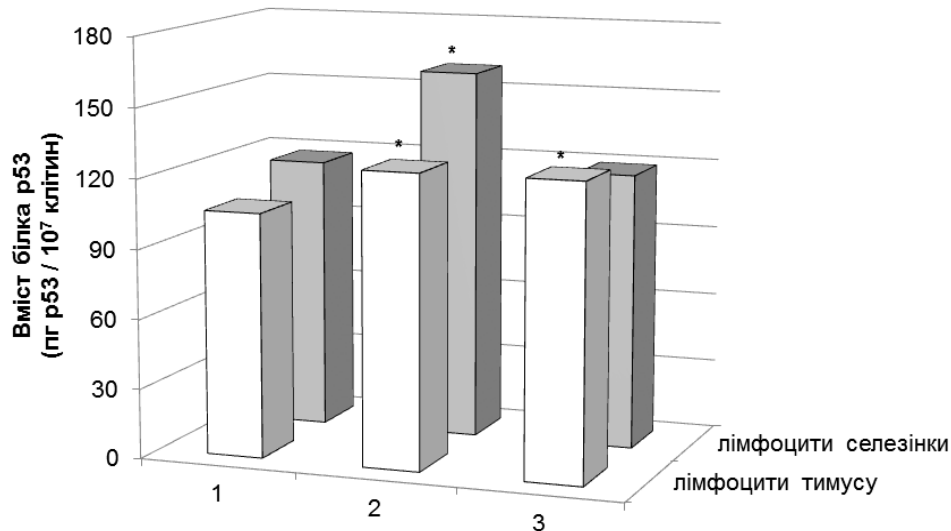


Рис.3.12. Вміст білка p53 в лімфоцитах тимусу та селезінки щурів за дії іонізуючої радіації в дозі 7,78 Гр: 1 – контроль; 2 – 30 хв після опромінення; 3 – 3 год після опромінення; * – достовірно відносно контролю, $p < 0,05$

Таким чином, вважаємо, що виявлене нами радіаційно-індуковане зниження протеасомної активності (розділ 6) спричиняє стабілізацію p53 з подальшою активацією апоптотичної загибелі лімфоцитів тимусу і селезінки щурів в параметрах нашого експерименту. Проведені дослідження впливу іонізуючої радіації в дозі 7,78 Гр на рівень p53 в лімфоцитах тимусу щурів засвідчили його підвищення в 1,19 і 1,20 раза через 30 хв і 3 год, відповідно (рис. 3.12). Водночас в лімфоцитах селезінки достовірне підвищення p53 (у 1,35 раза) відмічається лише через 30 хв після радіаційного впливу. Наведені дані узгоджуються з результатами по зростанню вмісту p53 у лімфоцитах крові за радіаційного впливу, представленими [176], на основі яких автори стверджують, що іонізуюча радіація виступає проапоптотичним фактором за дії на клітини системи імунітету. Отримані нами дані можливо інтерпретувати з урахуванням ряду механізмів, крім вище описаних, завдяки яким

відбувається регуляція на різних рівнях вмісту p53 за генотоксичного стресу, спричиненого дією іонізуючої радіації. Зниження інтенсивності трансляції p53 відбувається за Mdm2-опосередкованої протеасомної деградації білка L26 великої субодиниці рибосоми, що, в свою чергу, унеможливорює пришвидшення синтезу білка p53 [177]. Зменшення рівня p53 шляхом протеолізу може відбуватись і за убіквітин-незалежним механізмом за участі калпаїнів. За припущеннями [178], це є визначальним в умовах перебігу процесів загибелі клітин за дії різноманітних чинників, та підтверджується отриманими нами даними щодо впливу іонізуючого опромінення на калпаїн-залежну ланку протеолізу.

Індукція різних шляхів радіаційно-опосередкованого апоптозу відбувається з залученням ряду продуктів транскрипції p53-респонсивних генів. Встановлені нами зміни Fas-опосередкованого рецепторного, Araf1-залежного мітохондріального шляху проведення апоптотичного сигналу виявляються цілком закономірними з огляду на p53-залежну активацію відповідних генів.

Необхідно відмітити, що цитоплазматичний білок p53 шляхом транслокації до мітохондрій запускає пряму індукцію апоптозу (на рівні поетапної взаємодії з певними членами родини білків Bcl-2), що вважається більш швидкою реакцією клітин на масивні ушкодження. В роботі [179] зазначається, що за опромінення в дозі 5,0 Гр транслокація p53 до мітохондрій і активація каспази-3 в радіочутливих органах відбувається впродовж 30 хв після дії променевого чинника. Встановлені нами більш виражені показники рівня p53 у лімфоцитах селезінки щурів свідчать про підвищення ролі мітохондріальної ланки апоптозу, що дає змогу віднести ці клітини до клітин II типу за активаційних подій Fas- опосередкованого рецепторного шляху.

Як вже зазначалось, p53 належить до редокс-залежних транскрипційних факторів та активує транскрипцію генів прооксидантної

(*PIG3*, *FDXR*) і антиоксидантної систем. До останніх належать ферменти СОД2, каталаза, білки родини сестринів (*SESN1*, *SESN2*), які регулюють функціонування антиоксидантів пероксиредоксинів [180]. Дослідженнями [181] показано, що значний стресорний вплив індукується як проапоптотичними, так і прооксидантними p53-залежними генами. З огляду на отримані нами дані (розділ 7) слід відмітити, що зростання рівня АКМ та послаблення функціонування антиоксидантної системи призводить до стимулювання реакцій клітин, спрямованих на апоптоз, який в умовах нашого експерименту реалізується p53-залежним чином.

Аналіз літературних першоджерел [182,183,184] виявляє цікаві закономірності взаємовідносин p53 і NF-κB, оскільки присутність в клітині одночасно обох активованих форм цих факторів може відігравати провідну роль у регуляції апоптозу. На сьогодні співіснують дві гіпотези. Згідно з першою— активаційні події і реалізація функцій обох транскрипційних факторів відбувається паралельно. Друга гіпотеза стверджує про NF-κB індуковану активацію p53 (*p53* є NF-κB-респонсивним геном), що призводить до транскрипції генів проапоптотичних білків родини Bcl-2, водночас відмічає p53-залежну активацію NF-κB (*NF-κB* є p53 -респонсивним геном), яка сенсibiliзує клітини до апоптозу, підвищуючи експресію генів *FAS*; *FasL*; *TNF* [185].

3.2.3 Рівень транскрипційного фактора AP-1 у лімфоцитах тимусу і селезінки щурів за дії іонізуючої радіації

До родини стрес-респонсивних (індуцибельних) транскрипційних факторів належить білок AP-1 (activator protein-1), який, виступаючи як мішень MAP-кіназного каскаду, бере участь у регуляції експресії ряду генів, відповідальних як за індукцію апоптозу (*p53*, *FasL*) , так і за проліферативні процеси. AP-1— це комплекс білків родини Jun (*c-Jun*, *v-Jun*, *Jun B*, *Jun D*) та

Fos-родини (c-Fos, v-Fos, Fos B, Fra-1, Fra-2), що є продуктами генів ранньої відповіді ("early genes"), які називають третинними месенджерами дії різноманітних чинників. Класичною формою AP-1 є димер субодиничного складу c-Jun/c-Fos та коактиватор ATF-2. Відомо, що транскрипційні активатори Jun/Fos регулюються на транскрипційному та пост-трансляційному рівні, до останнього належить фосфорилування, опосередковане системою MAP-кіназ. За умови трансдукції сигналу представник родини MAP-кіназ дифундує до ядра і промотує ініціацію транскрипції гена *Fos*. Транскрипційний фактор Jun конститутивно присутній в цитоплазмі. Активація MAP-кінази JNK (c-Jun N-terminal protein kinase) зумовлює активацію протоонкогена Jun шляхом його фосфорилування з подальшою транслокацією до ядра. Продукти протоонкогенів Jun і Fos об'єднуються у ядрі, внаслідок чого утворюється фактор транскрипції AP-1, що є головним наслідком передавання сигналу по каскаду MAP-кіназ [186].

Нечисленні літературні джерела [187,188] свідчать про залучення ряду транскрипційних факторів до радіаційно-індукованого апоптозу за умови клінічно-ревалентних доз (0,25-2,0 Гр), що і дало підстави для дослідження вмісту фактора AP-1 за умов проведення нашого експерименту. Результати проведених досліджень наведено на рис. 3.13, 3.14.

Нами встановлено, що за впливу іонізуючої радіації в дозі 1,0 Гр спостерігається значне зростання рівня транскрипційного фактора AP-1 в лімфоцитах тимусу щурів порівняно з контролем, а саме в 2,6 через 30 хв та 3,7 раза через 3 год після опромінення. Водночас за опромінення в дозі 7,78 Гр спостерігається менш виражене підвищення рівня досліджуваного фактора– в 1,65 та 2,1 раза через 30 хв та 3 год після опромінення, відповідно (рис. 3.13).

Для лімфоцитів селезінки щурів нами показано, що дія рентгенівського опромінення в дозі 1,0 Гр сприяє підвищенню рівня транскрипційного

фактора AP-1 в 3,4 раза через 30 хв після опромінення та майже в 6 разів через 3 год після опромінення.

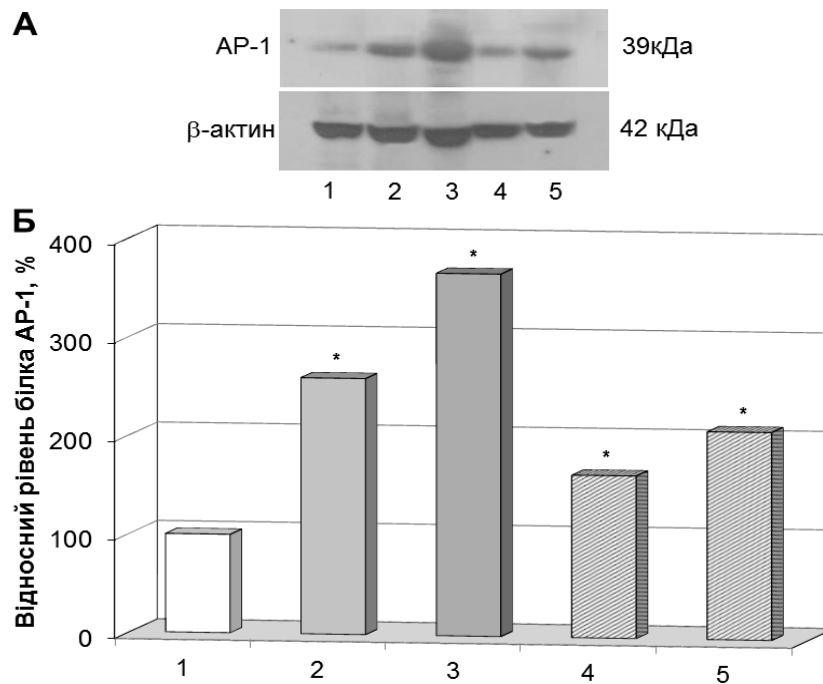


Рис.3.13. Відносний рівень транскрипційного фактору AP-1 в лімфоцитах тимусу щурів за дії іонізуючої радіації: А – блотограма; Б – гістограма імуноблот-аналізу; 1 – контроль; 2 – 1,0 Гр (30 хв після опромінення); 3 – 1,0 Гр (3 год після опромінення); 4 – 7,78 Гр (30 хв після опромінення); 5 – 7,78 Гр (3 год після опромінення); * – достовірно відносно контролю, $p < 0,05$

Проте порівняно з відповідними показниками для лімфоцитів тимусу щурів за опромінення в дозі 7,78 Гр нами спостерігалось більш виражене підвищення вмісту AP-1, а саме в 5,2 і 4,8 раза через 30 хв і 3 год після опромінення, відповідно (рис. 3.14). Наведені результати можна трактувати з ряду позицій, які пов'язують, наприклад, залучення стрес-індукованої MAPKKK протеїнкінази ASK1 (apoptosis signal-regulating kinase-1), що опосередковує сигналінг і активацію Jnk/p38 каскаду з подальшою активацією AP-1, та відповідних протеїнофосфатаз у регуляції активності MAP-кіназ [189].

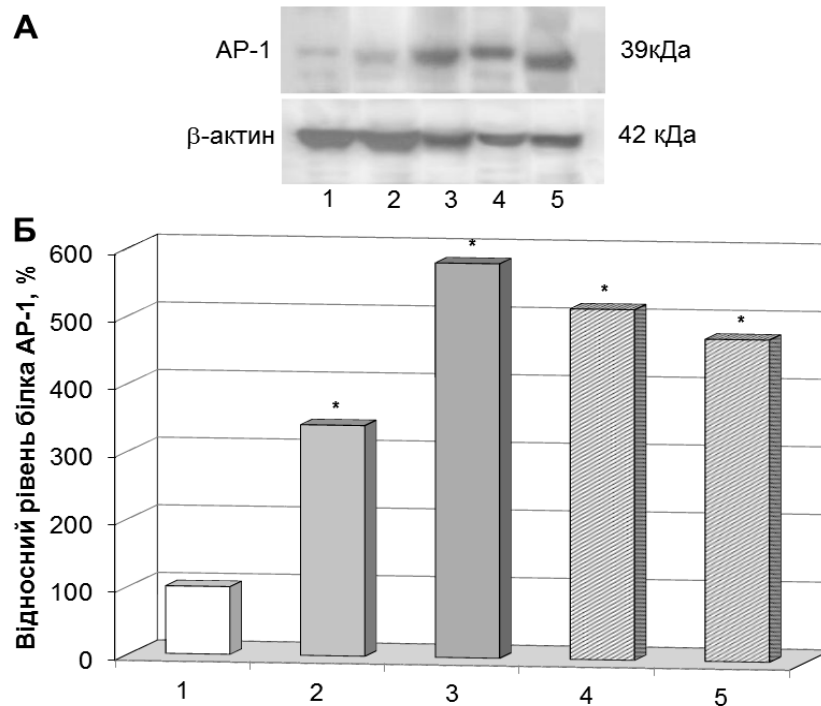


Рис. 3.14. Відносний рівень AP-1 в лімфоцитах селезінки щурів за дії іонізуючої радіації: А – блотограма; Б – гістограма імуноблот-аналізу; 1 – контроль; 2 – 1,0 Гр (30 хв після опромінення); 3 – 1,0 Гр (3 год після опромінення); 4 – 7,78 Гр (30 хв після опромінення); 5 – 7,78 Гр (3 год після опромінення); * – достовірно відносно контролю, $p < 0,05$

Шляхи деградації AP-1 (с-Fos, с-Jun) опосередковуються системою калпаїнів [190], значна активація яких відмічена в лімфоцитах тимусу щурів після опромінення в дозі 7,78 Гр за обох часових інтервалів (розділ 6), що і може пояснити зниження вмісту AP-1 в популяції лімфоцитів тимусу за цих же умов проведення експерименту.

Згідно з останніми даними [191,192] деградація с-Fos у складі AP-1 може відбуватись убіквітин-залежним 26S протеасомо-опо-середкований шляхом, зосередженим у цитоплазмі, в той час як в ядрі відмічається 20S протеасомо- опосередкований убіквітин-незалежний процес деградації AP-1. За нашими даними, наведеними в розділі 6, протеасомна активність в лімфоцитах селезінки щурів значно знижена за дії променевого чинника в дозі 7,78 Гр порівняно з контрольними значеннями. Можливо завдяки цьому

можна пояснити отримані нами результати по рівню AP-1 в лімфоцитах селезінки щурів за опромінення в дозі 7,78 Гр.

Наведені на рис.3.13-3.14 результати, що свідчать про значне підвищення рівня AP-1 в лімфоцитах селезінки і тимусу щурів, також корелюють з рівнем деградації ДНК (наведено в цьому розділі) як процесу коіндукції експресії *c-Jun* та накопичення продуктів міжнуклеосомної деградації хроматину. При поясненні встановлених нами ефектів впливу радіаційного чинника не можна виключати роль редокс-статусу самого транскрипційного фактора AP-1 та його активаторів-представників родини MAP-кіназ. Найбільш повно досліджений механізм активації MAP-кіназ, опосередкований редокс-залежною регуляцією MAPKKK ASK1, яка відбувається під контролем тіоредоксину [193]. У відновленій формі тіоредоксин інгібує ASK1, а при зростанні рівня АКМ спостерігається окиснення SH-груп тіоредоксину, що приводить до дисоціації його з комплексу з подальшою активацією ASK1. Вагається, що за наведених умов асоційований тіоредоксин діє як редокс-сенсор комплексу ASK1-Trx. Каскадний механізм приводить до активації MAP-кіназ наступного рівня, а саме кінази JNK, яка водночас може активуватись за безпосереднього впливу АКМ через зворотну інактивацію при утворенні димерного комплексу з редокс-чутливою глутатіон-S-трансферазою [194]. АКМ-залежна активація JNK призводить до зміни стабільності p53 та активації каспази-3 шляхом їх посттрансляційної модифікації, що свідчить про безпосереднє залучення цього процесу у перебіг апоптозу. Редокс-статус самого транскрипційного фактора AP-1 регулюється, подібно до NF-κB, тіоредоксинредуктазою, тіоредоксином [195] та білковим фактором Ref-1. За сучасними уявленнями [196] постулюється синергічна взаємодія між AP-1 та NF-κB на відміну від реципрокної взаємодії між AP-1 і p53.

Вважають [167], що починаючи з певного порогового рівня АКМ, спостерігається послаблення мобілізації захисних систем клітини,

опосередкованих транскрипційною активністю з урахуванням редокс-чутливих факторів, проте підвищується стимуляція реакцій, які реалізуються апоптотичною загибеллю клітин, наприклад, за радіаційного стресорного чинника, а саме дії іонізуючої радіації у дозі 7,78 Гр.

Таким чином, на підставі отриманих даних, а також результатів по оцінці ролі оксидативного стресу як маркера ініціації та реалізації програмованої клітинної загибелі, наведених у розділі 7, можна стверджувати про залучення фактора AP-1 у процесі радіаційно-індукованого апоптозу, опосередкованого АКМ. Дія іонізуючої радіації у дозі 1,0 Гр стимулює накопичення АКМ, які, нівелюючись системою антиоксидантного захисту, призводять до активації трансдуктивних шляхів, опосередкованих MAP-кіназною активацією. Водночас за дії променевого чинника у дозі 7,78 Гр спостерігається зростання рівня АКМ на фоні часткового виснаження системи антиоксидантного захисту, що, поряд з виходом з клітин відновленого глутатіону GSH, сприяє більш вираженому комітуванню лімфоцитів тимусу і селезінки щурів на шлях апоптозу.

3.2.4 Активність каспази-2 у лімфоцитах тимусу і селезінки щурів за дії іонізуючої радіації

Каспаза- 2 є представником родини цистеїнових протеїназ, функції якої, клітинна локалізація та навіть структура є предметом нечисленних досліджень [39,197]. Крім виконання класичної функції розщеплення білкових субстратів (α II-спектрин, білок комплексу Гольджі golgin- 160, РКСД та аутопроцесинг Bid, ПАРП, ICAD) [43], каспаза-2 залучена до процесу модифікації хроматину, а також відмічена її роль у регуляції функціонування мітохондрій за генотоксичних стимулів. На сьогодні постулюється, що одним із механізмів, який пов'язує генотоксичний вплив іонізуючої радіації на рівні ушкодження ДНК та реалізацію апоптотичної

загибелі клітин, є активація каспази-2 у складі білкового комплексу PIDDосоми: адапторний білок RAIDD, PIDD та каспаза- 2. У зв'язку з вищевикладеним ми вважали актуальним провести дослідження активності каспази-2 за дії іонізуючої радіації в параметрах нашого експерименту.

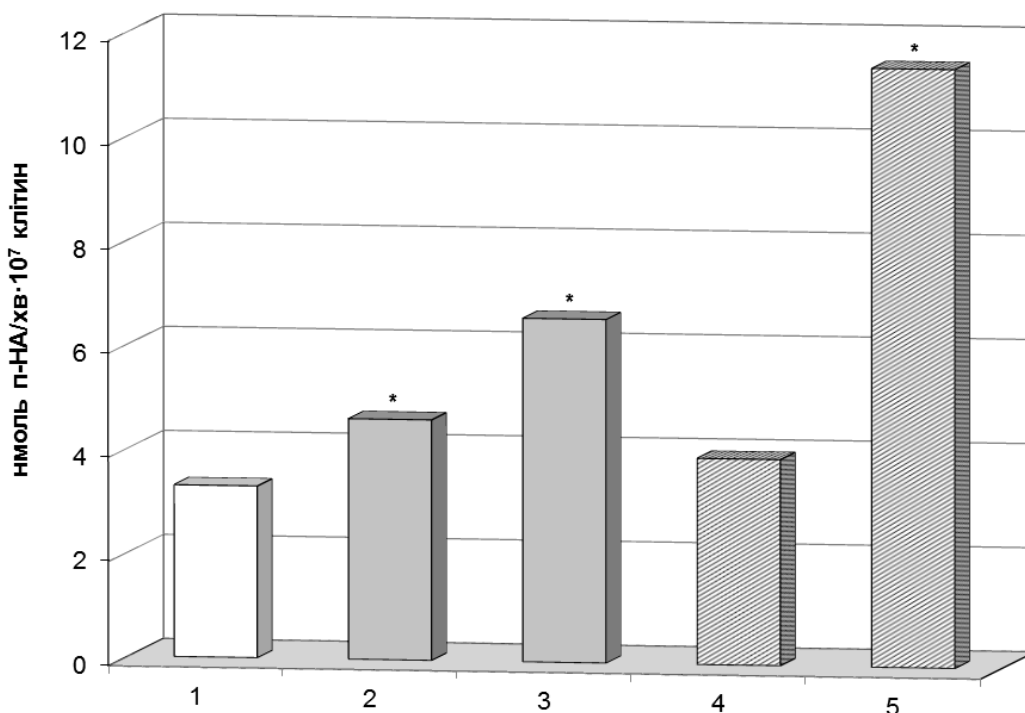


Рис.3.15. Активність каспази-2 у лімфоцитах тимусу щурів за дії іонізуючої радіації: 1 – контроль; 2 – 1,0 Гр через 30 хв після опромінення; 3 – 1,0 Гр через 3 год після опромінення; 4 – 7,78 Гр через 30 хв після опромінення; 5 – 7,78 Гр через 3 год після опромінення
* – достовірно відносно контролю, $p < 0,05$

У ході проведених експериментальних досліджень встановлено значні зміни активності каспази-2 за впливу радіаційного чинника, причому їх спрямованість є відмінною у лімфоцитах тимусу і селезінки щурів. Показано, що в лімфоцитах тимусу щурів дія іонізуючої радіації приводить до активації каспази-2. Так, через 30 хв після опромінення в дозі 1,0 Гр активність досліджуваного ферменту зростає в 1,4 раза, а через 3 год після опромінення - в 2,1 раза (рис. 3.15). Водночас значний приріст активності

каспази-2 у лімфоцитах тимусу спостерігається через 3 год після опромінення в дозі 7,78 Гр – підвищення складає 3,5 раза порівняно з контрольними показниками.

Представлені дані корелюють з результатами, наведеними в розділі 5, про підвищення в лімфоцитах тимусу щурів активності ініціаторної каспази-9, яка маркує мітохондріально-залежний шлях апоптозу, та свідчать на користь теорії редислокації каспази-2 у ядерний та мітохондріальний компартмент [198].

Субстратом каспази-2 є білок Bid (представник родини Bcl-2), що містить лише ВНЗ домени, протеолітичне розщеплення якого до tBid і стабілізація у комплексі з певними білками родини Bcl-2 активує процес утворення неспецифічних мітохондріальних мембранних пор та запуск мітохондріально-опосередкованої ланки апоптозу з активацією ініціаторної каспази-9.

Згідно з даними літератури [39] існують дві форми каспази-2, які експресуються з урахуванням двох сплайсованих форм мРНК: каспаза-2L і каспаза-2S. Перша з них спрямована на індукцію клітинної загибелі, друга – на процеси виживання. Ряд клітин збагачені обома формами ферменту, проте для лімфоцитів тимусу є характерною лише каспаза- 2L, що може пояснити отримані нами результатами по активації проапоптотичної функції цього ферменту в лімфоїдних клітинах тимусу щурів.

Оцінюючи рівень каспази-2 у лімфоцитах селезінки контрольних щурів, ми встановили, що активність ферменту має вищі значення порівняно з відповідними показниками у лімфоцитах тимусу. Через 30 хв після дії радіації відзначається незначне підвищення активності каспази-2 за обох доз опромінення. Так, за опромінення в дозі 1,0 Гр досліджуваний показник зростає в 1,2 раза. Через 3 год після дії променевого чинника спостерігається зниження активності ферменту майже вдвічі та в 1,4 раза за опромінення в дозі 1,0 та 7,78 Гр, відповідно (рис.3.16).

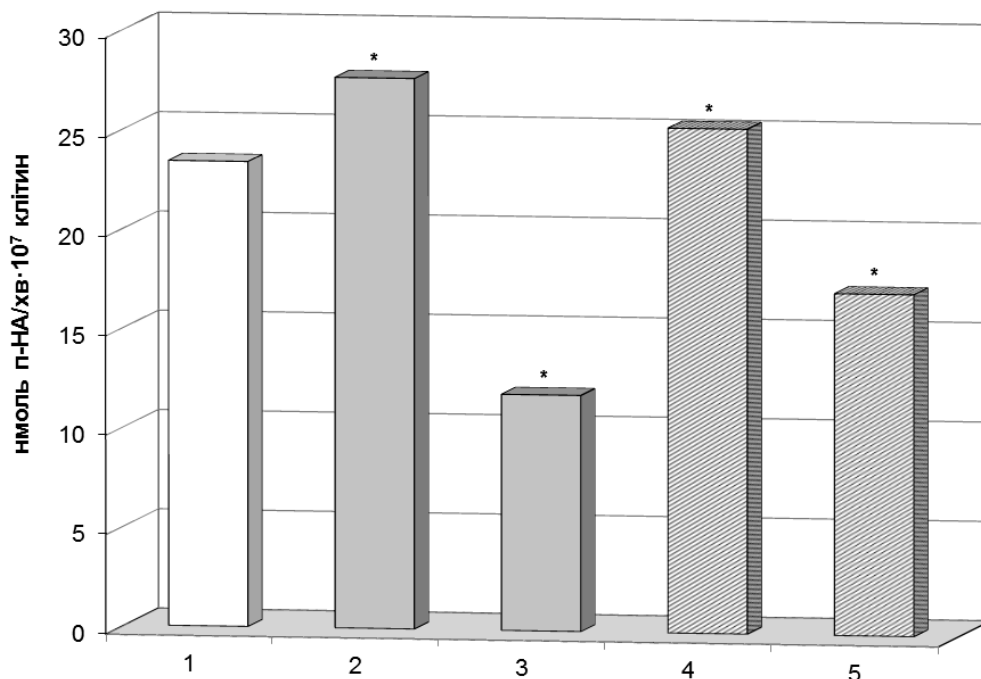


Рис. 3.16. Активність каспази-2 у лімфоцитах селезінки щурів за дії іонізуючої радіації: 1 – контроль; 2 – 1,0 Гр (30 хв після опромінення); 3 – 1,0 Гр (3 год після опромінення); 4 – 7,78 Гр (30 хв після опромінення); 5 – 7,78 Гр (3 год після опромінення)
* – достовірно відносно контролю, $p < 0,05$

Порівнюючи наведені результати з даними по оцінці активності каспази-9 в лімфоцитах селезінки щурів (розділ 5) за радіаційно-індукованого апоптозу, можна відмітити їх чітку дозо- і часову кореляцію. Це дозволяє дійти висновку про каспазу-2 як ефektorну каспазу, що може сприяти модуляції ролі мітохондріальної ланки апоптозу у даній популяції лімфоцитів.

Підтвердженням цього висновку слугують дані щодо першочергової активації каспази-2 ще до проапоптотичної дисрегуляції мітохондрій. За даними літератури [199] на різних моделях апоптозу, індукованого оксидативним стресом, показано можливість безпосереднього залучення каспази-2 у мітохондріальну ланку апоптозу за рахунок наявності в мітохондріях певної сплайс-форми ферменту.

Згідно з концепцією, запропонованою Tinel A. et al [200], аутопротеоліз білка PIDD (p53 induced protein with death domain) за опромінення ряду клітинних ліній в дозі 0,1 Гр призводить до накопичення фрагмента PIDD-CC з молекулярною масою 51 кДа який, з залученням RIP1/NEMO опосередкованого NF-κB-сигналіngu, сприяє підвищенню репараційного потенціалу клітини. Водночас опромінення в дозі 10 Гр супроводжується надвисоким рівнем ушкодження ДНК та призводить до значного зростання рівня фрагменту PIDD-CC з молекулярною масою 37 кДа, який є структурною одиницею PIDDосоми. Саме цей процес запускає шлях апоптозу, опосередкований каспазою-2.

Таким чином, як резюме представленого розділу, зазначимо, що ядерно-опосередкований шлях відіграє провідну роль у протіканні радіаційно-індукованого апоптозу в цілому. Встановлено перебіг маркерних апоптотичних процесів, як-то накопичення з різною інтенсивністю нерепарованих одно- дволанцюгових розривів ДНК, деградації ДНК з утворенням фрагментів 180-200 п.н., які виявлені в лімфоцитах тимусу і селезінки щурів за дії іонізуючої радіації в дозі 1,0 Гр та 7,78 Гр за обох часових інтервалів. Виявлено зміни активності полі(ADP-рибозо)полімерази: на ранніх етапах у лімфоцитах тимусу активність ПАРП помітно пригнічується, а в лімфоцитах селезінки щурів вона значно підвищується тільки через 30 хв після опромінення за дози 1,0 Гр. Поряд з цим в певні строки після опромінення знижується вміст НАД⁺.

Вперше проведено порівняльну оцінку рівня редокс-чутливих транскрипційних факторів NF-κB, p53 та AP-1 у двох популяціях лімфоцитів за опромінення в дозі 1,0 Гр та 7,78 Гр через 30 хв та через 3 год після дії радіаційного чинника та виявлено їх дозозалежність та залежність від часу після опромінення. Необхідно зазначити, що, на нашу думку, продукти генів *NF-κB*, *p53*, *AP-1* є ключовими регуляторними компонентами біохімічних каскадів, які опосередковують перебіг радіаційно-індукованого апоптозу,

контролюючи цілісність геному. Встановлено зміну рівня каспази-2 в лімфоцитах селезінки і тимусу щурів за обох досліджуваних доз випромінення. Різноманітність представлених даних за низької та летальної доз опромінення може бути пояснена залученням специфічних регуляторних мереж, опосередкованих експресією як безпосередньо ранніх генів *c-Fos/c-Jun*, так і редокс-чутливими транскрипційними факторами AP-1, p53 і NF-κB.

Радіаційно-індуковані зміни перебігу ядерно-опосередкованого апоптозу, згідно з вищеперерахованими показниками, беззаперечно свідчать про більш виражений генотоксичний вплив випромінення в дозі 7,78 Гр порівняно з опроміненням в дозі 1,0 Гр та підсилюються більш активним залученням оксидативного стресу. На думку Кудряшова Ю.Б. [201], за опромінення в дозі 1,0 Гр спостерігається більш виражена мобілізація компенсаторних механізмів, а саме ДНК-репараційних систем, що дає можливе пояснення тому, що дана доза лежить в діапазоні низьких доз, для яких характерне горизонтальне "плече" експоненціальної кривої залежності дози-ефект для щурів на 30-й день після рентгенівського опромінення. Для дози 7,78 Гр спостерігається чітка експоненціальна залежність виживаності від дози. Саме ця доза визначається як напівлетальна ($D_{50/30}$) – 50% загибель щурів на 30-й день після радіаційного впливу.

За дії на тварин іонізуючої радіації на фоні попереднього введення інозиту спостерігається нормалізуючий вплив препарату на досліджувані показники порівняно з відповідними результатами при опроміненні в дозах 1,0 та 7,78 Гр. Включення рибозного залишку інозину у реакції синтезу пуринів та їх в подальшому нуклеозидтрифосфатів безпосередньо активує ДНК-репараційні процеси у опромінених клітинах, регламентуючи активацію ПАРП. Згідно з отриманими даними шляхом введення рибоксину можливо регулювати пул НАД⁺ і відповідно АТФ у клітинах, які зазнали дії опромінення, відновлюючи таким чином їх енергетичний потенціал.

РОЗДІЛ 4

РЕЦЕПТОР-ОПОСЕРЕДКОВАНИЙ ШЛЯХ РЕАЛІЗАЦІЇ РАДІАЦІЙНО-ІНДУКОВАНОГО АПОПТОЗУ

Відповідно до сучасних уявлень провідну роль в радіаційно-індукованій програмованій загибелі відіграє DISC, який визнають як першу апоптотичну активаційну платформу, пов'язану з особливостями функціонування зовнішнього рецептор-опосередкованого шляху апоптозу. Одним із найбільш охарактеризованих представників рецепторів смерті (DR) родини TNF є Fas-рецептори [202,203]. Вважається [204], що більшість TNF-лігандів існують у вигляді гомотримерів, які здатні стабілізувати олігомери відповідних рецепторів. Зв'язування гомотримеру FasL з позаклітинними ділянками трьох молекул Fas-рецептора призводить до кластеризації внутрішньоклітинних доменів. Далі Fas рекрутує цитозольний адапторний білок – FADD (Fas-associate death domain), зв'язування відбувається шляхом білок-білкових гомотипових взаємодій внутрішньо-клітинного DD домену (домену смерті) Fas і С-кінцевого DD домену FADD. Окрім DD домену у N-кінцевому регіоні FADD локалізований DED домен, який і забезпечує взаємодію з DED доменом прокаспази-8,-10 та рекрутує їх у DISC. Агрегація Fas-рецепторів після зв'язування з відповідним лігандом сприяє тісному просторовому зближенню внутрішньоклітинних DD доменів рецептора і, як наслідок, формуванню високоафінних сайтів зв'язування з DD доменом FADD [19]. Каспаза-8 – основна ініціаторна каспаза під час Fas- і TNFR1-опосередкованої клітинної загибелі. У клітинах фермент представлений двома ізоформами – каспазою-8/a і каспазою-8/b, що синтезуються у вигляді неактивних попередників [205]. Рекрутування молекул прокаспази-8 у DISC приводить до підвищення локальної концентрації ферменту, коректній взаємній орієнтації і, в кінцевому результаті, до активації шляхом аутопротеолізу.

Активация опосредкованных Fas- рецепторами сигнальных каскадов под действием ионизирующей радиации приводит до индукции агрегации рецепторов та утворення сигнальних комплексів. Так реалізується каскадний механізм відповіді клітин на етапі рецептор-опосередкованого шляху радіаційно-індукованого апоптозу [6].

Отже, наступним завданням було дослідити рівень Fas та активність ініціаторної каспази-8 у лімфоцитах тимусу і селезінки щурів через 30 хв і 3 год після дії рентгенівського опромінення в дозі 1,0 та 7,78 Гр.

4.1 Рівень Fas-рецептора та активність каспази-8 у лімфоцитах тимусу і селезінки щурів за дії іонізуючої радіації

Численними дослідженнями [206,207,208] останніх років, направленими на вивчення шляхів реалізації радіаційно-індукованих ефектів, встановлено залучення опосередкованого поверхневими рецепторами шляху рецепції та проведення апоптогенного сигналу. Так, автори робіт [209,210] показали, що опромінення ультрафіолетовими чи γ - променями викликає дозозалежну агрегацію Fas -рецепторів лімфоцитів та активізацію пов'язаних з даними рецепторами сигнальних каскадів.

У ході проведених експериментальних досліджень нами встановлено, що рентгенівське опромінення щурів в дозах 1,0 та 7,78 Гр (рис.4.1 і 4.2) приводить до різнонаправлених змін рівня Fas в лімфоцитах тимусу та селезінки щурів. В лімфоцитах тимусу щурів спостерігається підвищення рівня Fas майже до 130% за опромінення в дозі 1,0 Гр через 30 хв після радіаційного впливу на фоні загальної тенденції до зниження порівняно з контролем за інших експериментальних умов. Поряд з цим відмічається значне підвищення рівня Fas в 3,5 та 2,8 раза в лімфоцитах селезінки щурів за опромінення в дозі 7,78 Гр через 30 хв і 3 год після дії рентгенівського опромінення, відповідно. Отримані дані узгоджуються з результатами [211], які відмічають тенденцію до залежного від часу зниження рівня *fas* мРНК в тимусі та

відповідно підвищення цього показника в селезінці за опромінення в дозі 5,0 Гр.

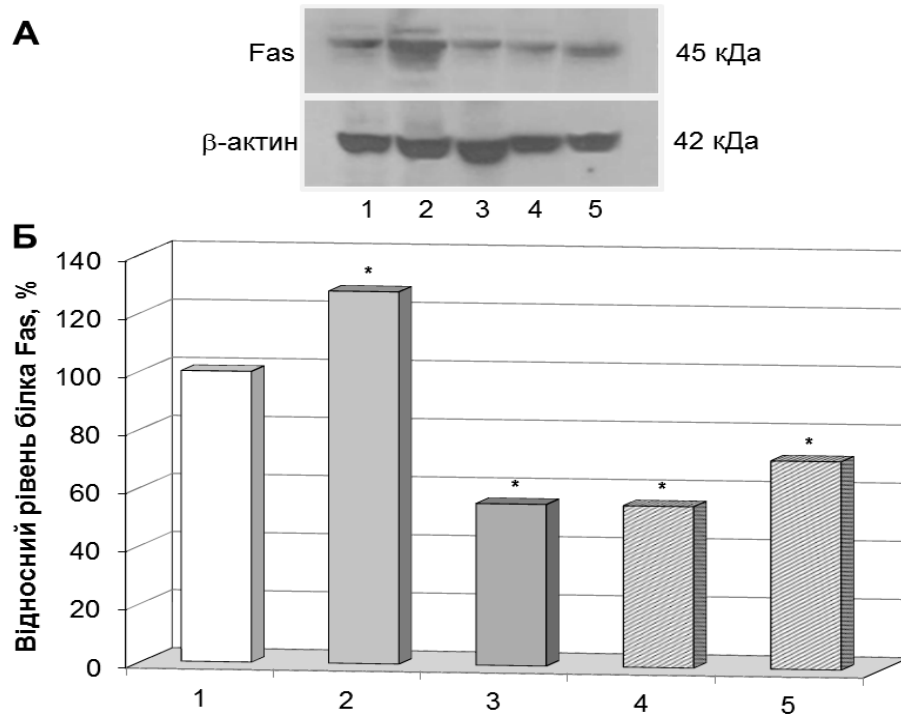


Рис. 4.1. Відносний рівень Fas у лімфоцитах тимусу щурів за дії іонізуючої радіації: А – блотограма; Б – гістограма імуноблот-аналізу; 1 – контроль; 2 – 1,0 Гр (30 хв після опромінення); 3 – 1,0 Гр (3 год після опромінення); 4 – 7,78 Гр (30 хв після опромінення); 5 – 7,78 Гр (3 год після опромінення); * – достовірно відносно контролю, $p < 0,05$

Відповідно до сучасних уявлень [212], активація експресії *fas* залежить від залучення ядерного транскрипційного фактора p53 (p53-респонсивний ген). Відмічене нами підвищення рівня Fas в лімфоцитах селезінки щурів корелює з достовірним підвищенням рівня p53 в досліджуваних клітинах, що свідчить про участь даного транскрипційного фактора у певних етапах біосинтезу Fas. Наведені результати досліджень можна інтерпретувати з точки зору регуляторних механізмів рецептор-опосередкованого шляху апоптотичної загибелі. Насамперед, це процеси убіквітинування. Саме акти-

вацією процесу моноубіквітинування можна пояснити сортинг Fas та стабілізацію мембранно-асоційованих форм Fas-рецепторів [213].

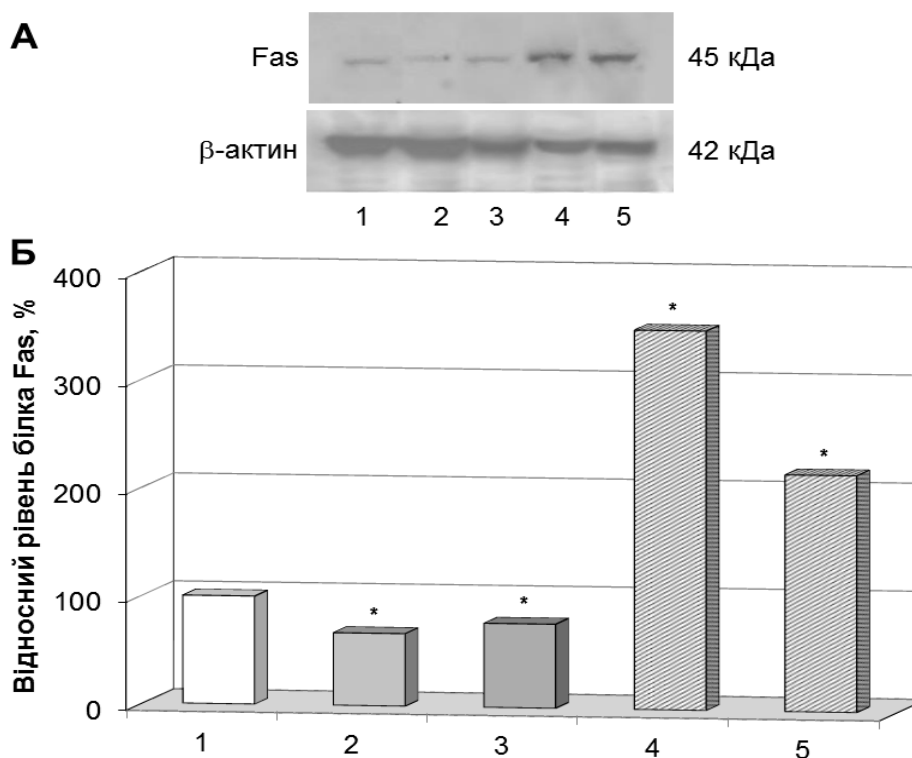


Рис.4.2. Відносний рівень Fas в лімфоцитах селезінки щурів за дії іонізуючої радіації: А – блотограма; Б – гістограма імуноблот-аналізу; 1 – контроль; 2 – 1,0 Гр (30 хв після опромінення); 3 – 1,0 Гр (3 год після опромінення); 4 – 7,78 Гр (30 хв після опромінення); 5 – 7,78 Гр (3 год після опромінення); * – достовірно відносно контролю, $p < 0,05$

Для клітин II типу (див. далі), до яких належать спленоцити, принциповим регуляторним механізмом є (полі)убіквітин-залежна деградація білків родини Vcl-2, що беруть участь у ампліфікації апоптотичного сигналіngu через зовнішній Fas-опосередкований регуляторний механізм [214].

Одним з шляхів активації Fas- залежної ланки апоптозу є залучення вторинного месенджера цераміду, який утворюється в результаті гідролізу сфінгомієліну за участі сфінгомієліназ (специфічних форм фосфоліпази С), або синтезується de novo за активації синтази. Сфінгомієлінази існують у двох формах за рН оптимумом їх дії - відповідно кисла (A-SMase) і ней-

тральна (N-SMase) форма ферменту. Дія проапоптотичних чинників активує обидві форми сфінгомелінази, за рахунок чого значно підвищується внутрішньоклітинний рівень цераміду [215].

Активаційний вплив церамід чинить на перебіг апоптозу з залученням всіх досліджуваних в нашій роботі шляхів, конвергенція яких призводить до активації ефекторних каспаз [216]. Оскільки індукований церамідом апоптоз супроводжується вивільненням в цитоплазму цитохрому *c*, то припускають, що утворення цераміду при Fas- залежному апоптозі залучає ампліфікаційне підсилення за рахунок мітохондріального шляху апоптозу, а саме проапоптотичної Вах- опосередкованої ланки [217].

До основних регуляторних моментів Fas-залежного апоптозу за дії іонізуючої радіації треба віднести підсилення MAP-кіназного (JNK) сигналювання. [207]. Оксидативний стрес та накопичення АКМ є визнаними чинниками, які підсилюють Fas-залежну ланку рецептор-опосередкованого апоптозу [218,219].

Наступний етап нашої роботи - дослідження внеску основної ініціаторної каспази залежного від рецепторів сигнального шляху – каспази-8, як компоненту апоптотичної активаційної платформи (DISC) в індукцію апоптозу лімфоцитів тимусу та селезінки щурів у відповідь на дію променевого чинника.

Відповідно до результатів, представлених на рис.4.3, загальне опромінення тварин в дозі 1,0 Гр призводить до значних змін активності ініціаторної каспази-8. Так, через 30 хв після дії рентгенів-ського випромінювання у лімфоїдних клітинах тимусу спостерігається зростання активності каспази-8 у 1,5 раза, що може вказувати на залучення опосередкованого рецепторами шляху активації апоптогенного каскаду. Показане нами зростання активності ферменту у ранні строки після опромінення можна пояснити належністю лімфоцитів тимусу до клітин I типу, характерною особливістю яких є високий ступінь утворення DISC у

відповідь на олігомеризацію поверхневих рецепторів та клатрин-залежна інтерналізація DISC-рецептосоми з подальшим рекрутуванням і активацією молекул прокаспаз-8 [220].

Слід зазначити, що для клітин I типу кількість молекул активованої каспази-8 є достатньою як для незалежної від мітохондрій безпосередньої активації ряду ефекторних каспаз, так і для часткової додаткової активізації мітохондріального шляху реалізації апоптозу, можливо за рахунок цераміду.

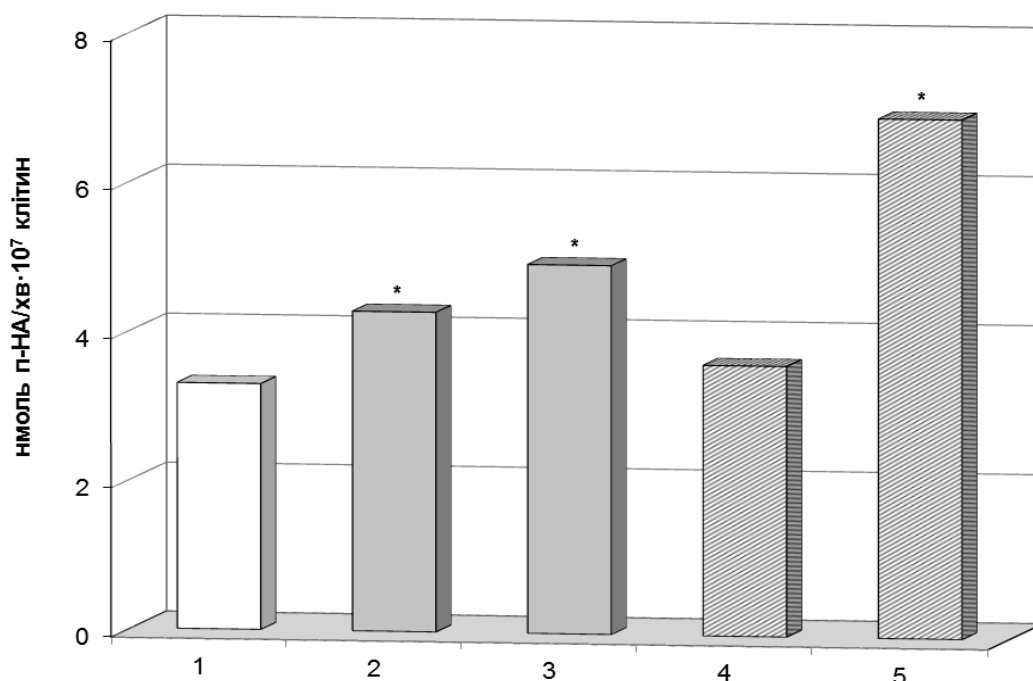


Рис.4.3 Активність каспази-8 у лімфоцитах тимусу щурів за дії іонізуючої радіації: 1 – контроль; 2 – 1,0 Гр (30 хв після опромінення); 3 – 1,0 Гр (3 год після опромінення); 4 – 7,78 Гр (30 хв після опромінення); 5 – 7,78 Гр через 3 год після опромінення;
* – достовірно відносно контролю, $p < 0,05$

На третю годину після дії на щурів рентгенівського випромінювання в дозах 1,0 та 7,78 Гр спостерігається подальше зростання активності досліджуваного ферменту в лімфоцитах тимусу відповідно у 1,57 та майже 1,9 раза (рис. 4.3). Для клітин II типу (В-клітини) утворення DISC відбувається повільніше та є більш редукованим. Fas не колокалізуються в ліпідних

рафтах та не досить ефективно інтерналізуються, активація ефекторних каспаз, відбувається після залучення мітохондріального шляху. Зв'язок між рецептор-опосередкованим апоптогенним сигнальним каскадом та мітохондріями здійснюється за допомогою проапоптотичного білка Bid, гідроліз якого каспазою-8 обумовлює транслокацію С-кінцевого фрагменту tBid, що містить ВНЗ-домен, до мітохондрій та індукцію за участі білків Вах і Вак мітохондріальної пори та вивільнення з міжмембранного простору мітохондрій проапоптотичних чинників з подальшим утворенням апоптосомі і активацією ефекторних каспаз. Процес може бути заблокованим гіперекспресією антиапоптотичних білків - Bcl-2 та Bcl-xL [19].

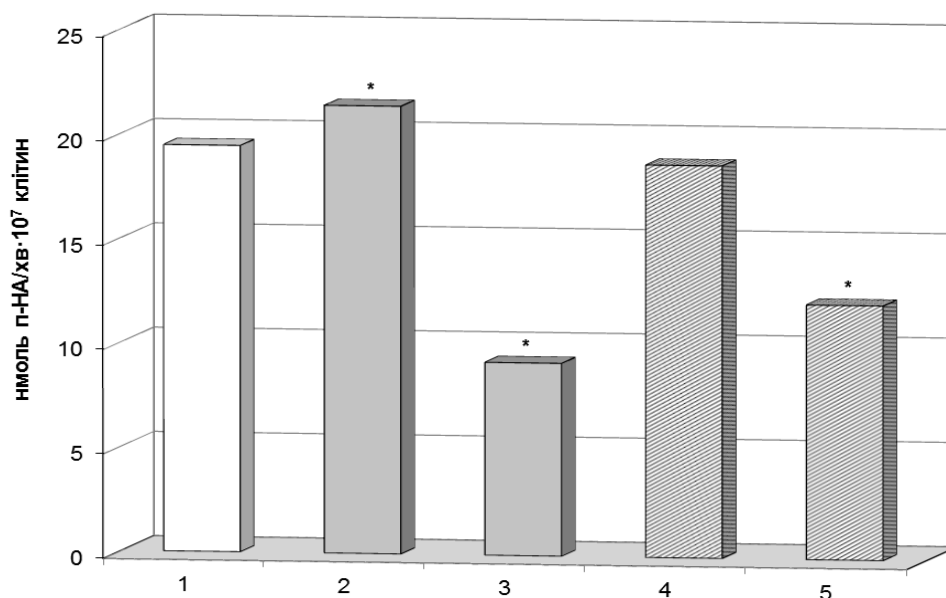


Рис.4.4. Активність каспази-8 у лімфоцитах селезінки щурів за дії іонізуючої радіації: 1 – контроль; 2 – 1,0 Гр (30 хв після опромінення); 3 – 1,0 Гр (3 год після опромінення); 4 – 7,78 Гр (30 хв після опромінення); 5 – 7,78 Гр (3 год після опромінення); * – достовірно відносно контролю, $p < 0,05$

Результати визначення активності ініціаторної каспази- 8 у лімфоцитах селезінки відрізняються від даних, одержаних для лімфоцитів тимусу. Виявлені відмінності частково можна пояснити різним ступенем

диференціювання, різною метаболічною активністю обох типів досліджуваних клітин. Так, популяція лімфоцитів тимусу представлена переважно "незрілими" кортикальними тимоцитами (до 90-95%), в той час як серед лімфоцитів селезінки лише близько 15-20% клітин є "незрілими". Згідно з одержаними даними (рис. 4.4), через 30 хв після дії на щурів променевого чинника в дозі 1,0 Гр у лімфоїдних клітинах селезінки спостерігається зростання активності каспази-8 лише в 1,15 раза, в той час як на третю годину після опромінення активність ферменту знижувалась удвічі за дози 1,0 Гр та в 1,6 раза за дози 7,78 Гр порівняно з контролем.

Аналізуючи дещо різну спрямованість значень рівня Fas та активності каспази-8 у обох досліджуваних типах клітин, потрібно враховувати, що лімфоцити тимусу і селезінки різняться репертуаром поверхневих рецепторів, і це може впливати на динаміку залучення рецептор-опосередкованого шляху проведення апоптогенного сигналу.

Лімфоцити тимусу, залежно від стадії розвитку, експресують, окрім TCR, ряд інших рецепторів, серед яких є і рецептори, що належать до суперродини TNF рецепторів – Fas, TNFR1, DR3, DR5. Типовою ознакою даних рецепторів є наявність у цитоплазматичному регіоні молекули еволюційно консервативного мотиву – домену смерті DD (близько 60-80 амінокислотних залишків), який через взаємодію з відповідними адаптерами забезпечує трансдукцію позаклітинних сигналів до каспаз-8, -10 [221].

Для лімфоцитів селезінки характерний дещо нижчий рівень експресії Fas- рецепторів, виключення становить популяція "незрілих" клітин, що локалізуються у зародкових центрах селезінки. Особливістю функціонування Fas- рецепторів у В-клітинах є можливість їх регуляції за допомогою інших поверхневих рецепторів, що обумовлює рецептор-специфічне варіювання чутливості клітин до Fas-індукованого апоптозу, що пов'язують з явищем "Fas-резистентності" [222,223]. Значне зниження активності каспази-8 у лімфоцитах селезінки через три години після опромінення частково можна

пояснити саме з позицій явища Fas-резистентності, оскільки його індукція та розвиток спостерігаються не відразу, а впродовж декількох годин, під час яких відбувається активація синтезу антиапоптичних білків родини Bcl-2, зокрема Bcl-X_L, та синтез конкуруючих з каспазою-8 за сайти зв'язування з адаптером FADD молекул cFLIP. Необхідно зазначити, що cFLIP виступає як молекулярна пастка для каспази-8, оскільки ця молекула, специфічно зв'язуючись з DISC, інгібує активацію каспази-8 на різних рівнях її процесингу [224]. До регуляторних механізмів, активація яких відбувається при дії іонізуючої радіації, належать процеси фосфорилування. Саме ці пострансляційні модифікації каспази-8 є основними чинниками, які детермінують шляхи реалізації активації відповідних рецепторів смерті. Зниження активності ферменту відмічається при його фосфорилуванні MAP-кіназами, тирозиновими кіназами родини Src [225]. Регуляція активності каспази-8 відбувається також шляхом нітрозилування. Зокрема, дія рентгєнівського опромінення індукує процеси NO-сигналіngu [226], що призводить до інгібування активності каспази-8. В той же час поліубіквітинування каспази-8 з подальшою агрегацією з полі-Ub- зв'язуючим білком p62 приводить до утворення високомолекулярних структур, що сприяє стабілізації активних форм каспази-8. Таким чином, рецептор-опосередкований шлях індукції апоптозу є беззаперечно важливим етапом перебігу програмованої клітинної загибелі імунотетентних клітин лімфоїдних органів за дії променевого чинника.

Узагальнюючи представлені результати, можна відзначити активацію рецептор-опосередкованого зовнішнього шляху за радіаційно-індукованого апоптозу. Отримані дані свідчать про різнонаправлений характер змін рівня білка Fas [227] та основної ініціаторної каспази залежного від рецепторів сигнального шляху – каспази-8 у лімфоцитах селезінки та тимусу щурів через 30 хв і 3 год за досліджуваних доз променевого чинника [228].

РОЗДІЛ 5

МІТОХОНДРІАЛЬНО-ОПОСЕРЕДКОВАНИЙ ШЛЯХ РЕАЛІЗАЦІЇ РАДІАЦІЙНО – ІНДУКОВАНОГО АПОПТОЗУ

На сьогодні накопичено переконливий експериментальний матеріал щодо центральної ролі мітохондрій у процесі інтеграції та підсилення зовнішнього (рецептор-залежного) шляху апоптозу та безпосереднє їх залучення у реалізацію внутрішнього апоптотичного шляху за дії іонізуючого випромінення, опосередкованого проявами оксидативного стресу [229, 230].

В основі радіаційно-опосередкованого порушення функціонування мітохондрій покладено такі їх властивості [231,232,19]:

- 1) мітохондрії залучені у реалізацію апоптотичної загибелі шляхом регуляції проявів оксидативного стресу, оскільки вони є основним джерелом внутрішньоклітинних АКМ водночас і мішенню дії активних кисневих метаболітів;
- 2) мітохондрії є ключовими регуляторами і учасниками внутрішнього шляху індукції апоптозу.

Порушення у роботі дихального ланцюга мітохондрій за дії апоптогенних чинників призводить до накопичення надмірної кількості АКМ, роз'єднання процесів дихання та фосфорилування, супроводжується набуханням мітохондрій та зниженням електрохімічного потенціалу $\Delta \psi$ мітохондріальної мембрани, що проявляється до конденсації хроматину та фрагментації ядра. Перераховані процеси пов'язують зі скачком проникності РТ (permeability transition) мітохондріальної мембрани, що є ознакою відкриття неселективних пор МРТР (mitochondrial permeability transition pore) у мембрані мітохондрій з подальшим вивільненням у цитоплазму про-апоптотичних чинників [233]. Одним із можливих шляхів перебігу вище-

зазначеного процесу є порушення осмотичного балансу між матриксом і міжмембранним простором мітохондрій з подальшим проникненням води у матрикс для відновлення осмотичного тиску, що, в свою чергу, призводить до набухання матриксу і розриву зовнішньої мембрани мітохондрій з подальшим виходом білків міжмембранного простору. Наведені порушення функціонування мітохондрій відбуваються за дії чинників різної етіології та виявляються у активації проявів окисного стресу, зниженні вмісту АТФ, підвищенні концентрації Ca^{2+} , що є особливо характерним для радіаційного впливу [234]. Іншим механізмом пороутворення є стабілізація після отримання апототичного сигналу специфічних каналів індукції апоптозу (mitochondrial apoptosis induced channel, МАС) за участі проапоптотичних членів родини Bcl-2– гомо/гетеродимерів Bax/Bak. Ці іонні канали зовнішньої мембрани мітохондрій вважаються мультиелектропровідними. Таким чином, зміна цілісності зовнішньої мембрани мітохондрій (ОММ– Outer Mitochondrial Membrane), спричинена процесом її перміабілізації (MOMP– Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization) за наведеними механізмами, призводить до витоку з міжмембранного простору у цитозоль проапоптотичних білкових факторів: цитохром *c*, AIF, ендонуклеаза G, Smac/Diablo, Omi/HtrA2, які є індукторами певних етапів реалізації апоптотичної програми [235].

З огляду на наведені дані цей розділ присвячено вивченню специфічних механізмів перебігу мітохондріально- опосередкованої ланки у лімфоцитах тимусу і селезінки щурів за дії рентгенівського опромінення та на фоні введення інозину.

5.1 Оцінка ступеня функціональної активності мітохондрій у лімфоцитах тимусу і селезінки щурів за дії іонізуючої радіації та на фоні введення інозину

Ступінь залучення мітохондріальної ланки реалізації радіаційно-індукованого апоптозу проводили за допомогою МТТ-тесту, принцип якого ґрунтується на здатності мітохондріальних дегідрогеназ відновлювати МТТ-тетразолієву сіль до забарвленого у фіолетовий колір нерозчинного продукту. Оскільки одним з ферментів, що бере участь у відновленні МТТ, є мітохондріальна НАДН-залежна сукцинатдегідрогеназа, даний тест дозволяє опосередковано зробити висновок про активність електронтранспортного ланцюга мітохондрій: чим вищою буде активність останнього, тим інтенсивніше протікатиме реакція відновлення МТТ і тим, відповідно, вищою буде метаболічна активність клітин [236].

З огляду на результати, наведені у розділі 7, де відмічено більш виражені зміни прояву оксидативного стресу через три години після опромінення в дозах 1,0 та 7,78 Гр, оцінку ступеня активності мітохондрій проводили за цього часового інтервалу.

Згідно з одержаними результатами (рис.5.1), через три години після рентгенівського опромінення щурів в дозах 1,0 та 7,78 Гр спостерігається зниження ступеня відновлення МТТ в лімфоцитах тимусу щурів, що може свідчити про порушення функціонування мітохондрій та узгоджується з існуючими уявленнями про високу чутливість даних органел і, зокрема, комплексів дихального ланцюга до дії пошкоджуючих чинників [237,238]. Так, за опромінення в дозі 1,0 Гр спостерігається зниження ступеня відновлення МТТ у 1,75 раза. При підвищенні дози опромінення до 7,78 Гр ступінь відновлення МТТ, а, отже, і загальна активність електронтранспортного ланцюга мітохондрій залишалася у 1,63 раза нижчою за контрольний показник.

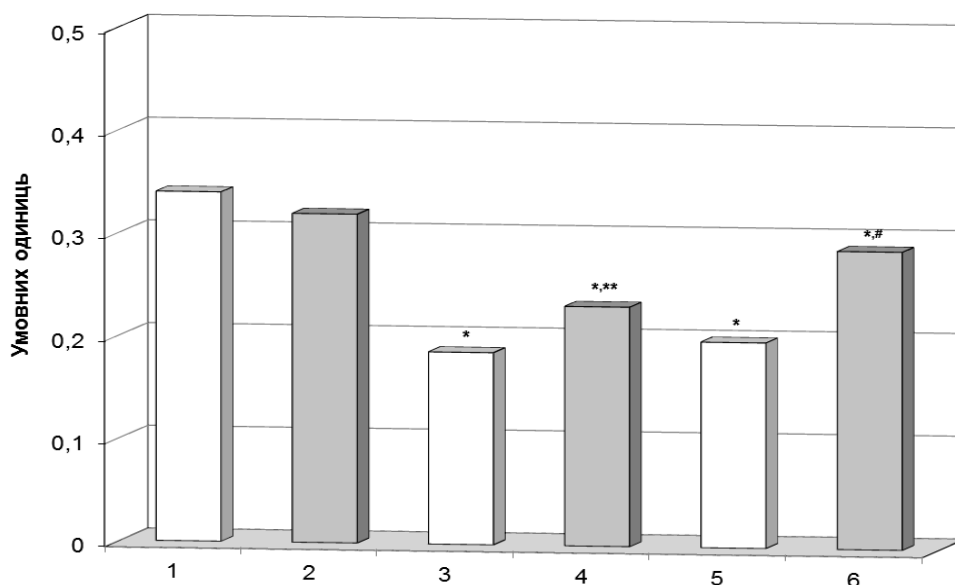


Рис. 5.1. Ступінь відновлення МТТ у лімфоцитах тимусу щурів за дії іонізуючої радіації та на фоні введення інозину: 1 – контроль; 2 – контроль +інозин; 3 – опромінення в дозі 1,0 Гр; 4 - опромінення в дозі 1,0 Гр+інозин; 5 – опромінення в дозі 7,78 Гр; 6 – опромінення в дозі 7,78 Гр +інозин

* – достовірно відносно контролю

** – достовірно відносно контролю на фоні введення інозину

– достовірно відносно відповідних опромінених груп,

$p < 0,05$

Для лімфоцитів селезінки щурів (рис. 5.2) нами відмічається подібна тенденція зміни ступеня відновлення МТТ: має місце зниження ступеня відновлення МТТ в 1,3 раза за опромінення в дозі 1,0 Гр з подальшим зниженням показника в 1,6 раза за опромінення до 7,78 Гр.

З метою модифікації променевих ефектів ми використовували препарат інозин, профілактичне введення якого, згідно з даними літератури, обумовлює захист тварин за дії іонізуючої радіації в широкому діапазоні доз як гострого, так і хронічного опромінення [239], але на відміну від класичних радіопротекторів не супроводжується розвитком побічних ефектів. Нами показано, що введення інозину за 15 хв до дії променевого фактора приводить до підвищення активності дихального ланцюга мітохондрій у 1,25

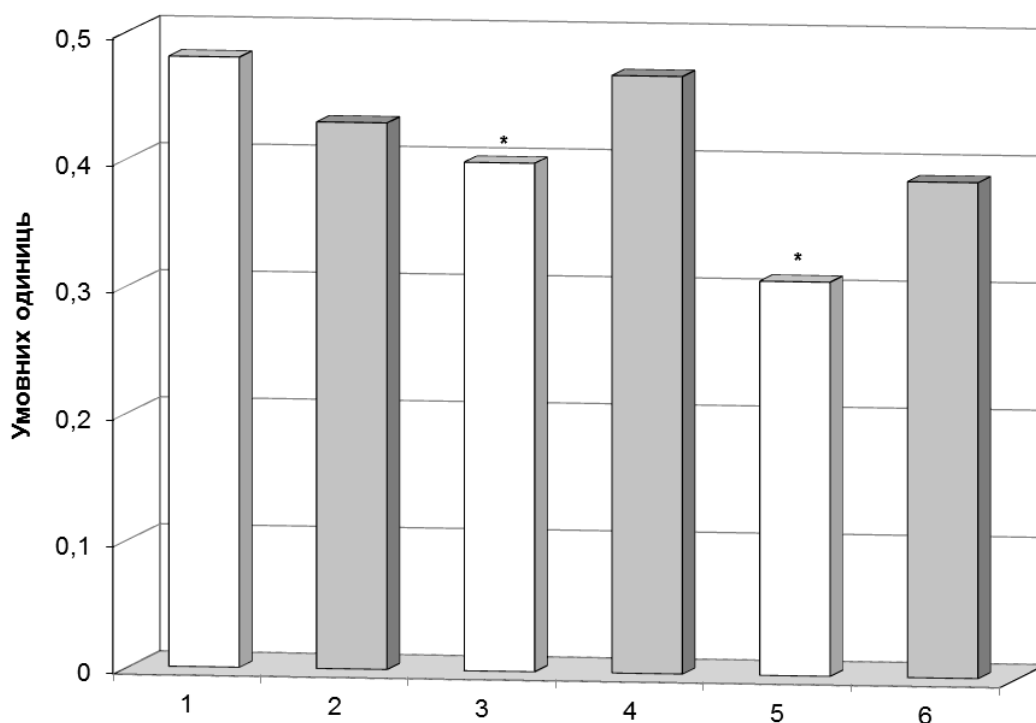


Рис. 5.2. Ступінь відновлення МТТ у лімфоцитах селезінки щурів за дії іонізуючої радіації та на фоні введення інозину: 1 – контроль; 2 – контроль +інозин; 3 – опромінення в дозі 1,0 Гр; 4 - опромінення в дозі 1,0 Гр+інозин; 5 – опромінення в дозі 7,78 Гр; 6 – опромінення в дозі 7,78 Гр +інозин

* – достовірно відносно контролю

** – достовірно відносно контролю на фоні введення інозину

– достовірно відносно відповідних опромінених груп,
 $p < 0,05$

та 1,17 раза у лімфоцитах тимусу та селезінки щурів, відповідно за опромінення в дозі 1,0 Гр та у 1,45 та 1,25 раза у лімфоцитах тимусу та селезінки щурів, відповідно за дії радіації в дозі 7,78 Гр порівняно з результатами за дії лише променевого чинника (рис.5.1-5.2). Одержані дані можна пояснити з позицій описаної в літературі здатності препарату підвищувати активність ряду окисно-відновних ферментів дихального ланцюга, зокрема сукцинатдегідрогенази [240], що в комплексі з його нормалізуючим впливом на вміст як окисненої, так і відновленої форм нікотинамідних коферментів може сприяти нормалізації роботи електронтранспортного ланцюга порівня-

но з результатами за опромінення. Окрім того, автори роботи [241] на основі аналізу даних гістохімічних та електронно-мікроскопічних досліджень показали, що застосування інозину сприяє нормалізації ультраструктури мітохондрій, ушкоджених у результаті розвитку оксидативного стресу. Беручи до уваги тісний взаємозв'язок структурного стану органел та їх функціональної активності, можна припустити, що стабілізація архітектоники радіаційно-ушкоджених мітохондріальних мембран за введення інозину в кінцевому результаті сприяє покращенню енергетичного стану клітини та метаболічного статусу в цілому.

До реалізації апоптотичних стимулів призводить утворення пор, що не пов'язані зі зміною стану матриксу за дії чинників різної природи. До цього процесу залучені білки родини Bcl-2, які беруть безпосередню участь як у процесах пермебілізації зовнішньої мембрани мітохондрій, так і в цілому контролюють та інтегрують різні шляхи індукції апоптозу.

5.2 Вміст білка Вах – члена родини Bcl-2 у лімфоцитах тимусу і селезінки щурів за дії іонізуючої радіації

Численні дослідження [242,243,244] гомологів Bcl-2 засвідчили, що представники цієї родини містять консервативні амінокислотні послідовності (мотиви), які отримали назву Bcl-2 гомологічні домени (homology domains) BH 1-4. Така доменна структура відповідає як за функціонування цих білків у клітині, так і за білок-білкові взаємодії між членами родини. BH1, BH2 і BH4 домени необхідні для репресії активації процесу загибелі антиапоптотичними молекулами, фактично сприяючи реалізації їх антиапоптогенної дії. BH3 домен відповідає за активацію апоптозу молекулами-активаторами клітинної загибелі. Більшість членів родини Bcl-2 містять гідрофобний С-кінцевий трансмембранний домен (ТМ), що забезпечує зв'язування з різними внутрішньоклітинними мембранами.

Членами родини Bcl-2 є антиапоптотичні білки Bcl-2, Bcl-X_l, Bcl-w, Mcl-1, Bfl-1/A1 та інші, які містять всі чотири домени BH1-4. Проапоптотичні молекули родини Bcl-2 поділяються на два класи. Перший клас – мультидоменні (BH1, BH2, BH3) білки підродини Вах, до складу якої входять власне Вах, Вак і Вок. Другий клас – білки, що містять лише BH3 домени, саме ті домени, які є і необхідними і водночас достатніми для виявлення апоптотичної функції за рахунок зв'язування з іншими білками родини Bcl-2. Класичні представники – Bad, Bid, Bik / Blk, Bim, Bmf, Hrk, Noxa, PUMA та неklasичні – Bnip3, Nix, Spike, MULE та інші. Білок-білкові взаємодії серед членів родини Bcl-2 є важливими для виконання ними специфічних функцій [245]. Гетеро-монодимерні комплекси Вах та Вак формують мембранні мітохондріальні пори, через які апоптогенні молекули потрапляють у цитозоль та активують ефекторну фазу апоптозу. Білки, що містять тільки BH3-домени, регулюють функціонування складної системи димерних комплексів у складі про- антиапоптотичних білків, сенсibiliзуючи специфічне пороутворення.

Таким чином, на основі вищевикладеного можна припустити, що рівні структурної організації та ступінь взаємодій білків родини Bcl-2 є можливими маркерами перебігу радіаційно-індукованого апоптозу.

Для дослідження механізмів мітохондріального шляху реалізації апоптозу, індукованого іонізуючою радіацією, нами було визначено вміст проапоптотичного білка Вах, який регулює проникність мембрани мітохондрій з подальшим вивільненням мітохондріальних чинників та є залученим в активацію морфологічних змін мітохондрій, а саме процеси їх фрагментації та злиття, а також вивільнення цитохрому *c* з запуском відповідних програм апоптозу [246,247].

Результати імуноблот-аналізу з визначення рівня проапоптотичного члена родини Bcl-2 продемонстрували дозозалежне підвищення рівня білка Вах в лімфоцитах тимусу щурів (рис.5.3) за дії променевого чинника.

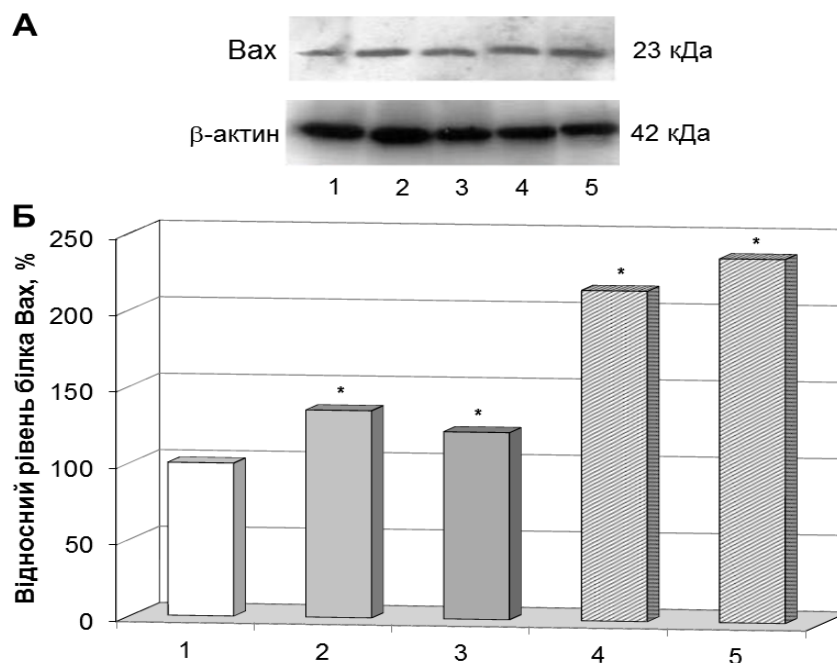


Рис.5.3. Відносний рівень Вах у лімфоцитах тимусу щурів за дії іонізуючої радіації: А – блотограма; Б – гістограма імуноблот-аналізу; 1 – контроль; 2 – 1,0 Гр (30 хв після опромінення); 3 – 1,0 Гр (3 год після опромінення); 4 – 7,78 Гр (30 хв після опромінення); 5 – 7,78 Гр (3 год після опромінення);

* – достовірно відносно контролю, $p < 0,05$

Так, через 30 хв після опромінення в дозі 1,0 Гр рівень Вах у лімфоцитах тимусу щурів збільшується в 1,4 раза, досягаючи підвищення майже в 2,4 раза за опромінення в дозі 7,78 Гр порівняно з контрольними показниками (рис.5.3). Отримані нами результати узгоджуються з роботами Bouvard V. et al [211], Chorna I. et al [248], які відмічають значну експресію генів *Bax* та накопичення білка Вах за дії іонізуючого випромінення. Через 3 год після випромінення в дозі 1,0 Гр відмічається незначне підвищення вмісту Вах, що узгоджується з отриманими нами даними по функціонуванню Ca^{2+} -залежних протеїназ - калпаїнів, субстратом яких є Вах [249]. Водночас через 3 год після опромінення в дозі 7,78 Гр встановлено найбільш виражене підвищення вмісту Вах – в 2,4 раза порівняно з контролем.

У результаті проведеного імуноблот-аналізу з визначення проапоптозного білка Вах в лімфоцитах селезінки щурів було продемонстровано

підвищення його рівня за дії іонізуючої радіації в обох дозах за обох часових інтервалів.

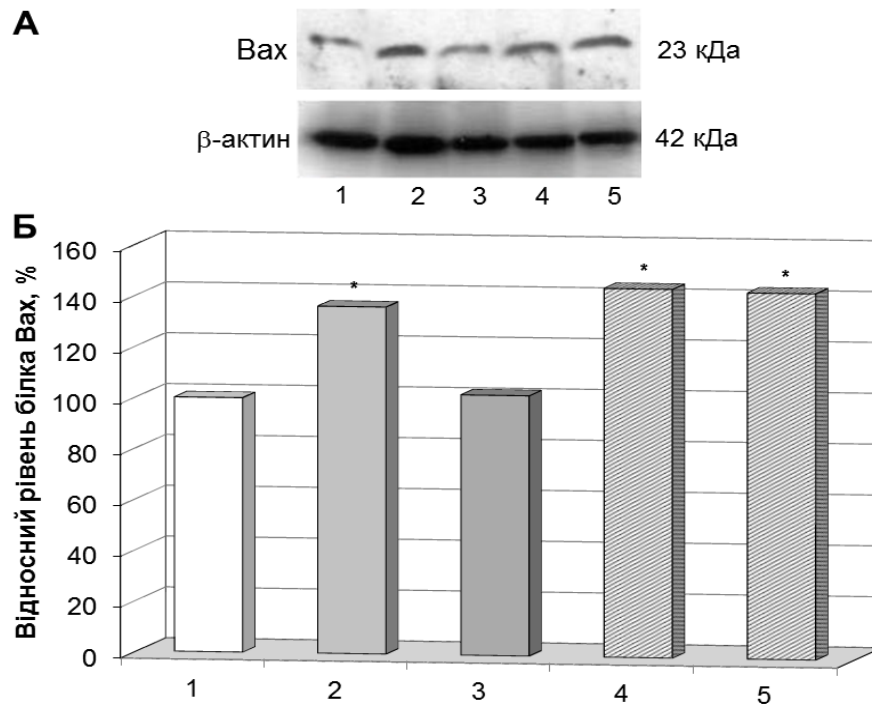


Рис.5.4. Відносний рівень Вах в лімфоцитах селезінки щурів за дії іонізуючої радіації: А – блотограма; Б – гістограма імуноблот-аналізу; 1 – контроль; 2 – 1,0 Гр (30 хв після опромінення); 3 – 1,0 Гр (3 год після опромінення); 4 – 7,78 Гр (30 хв після опромінення); 5 – 7,78 Гр (3 год після опромінення); * – достовірно відносно контролю, $p < 0,05$

Через 30 хв після опромінення в дозі 1,0 Гр відмічено збільшення вмісту Вах в 1,4 раза. Вплив іонізуючої радіації в дозі 7,78 Гр спричиняє підвищення рівня Вах: через 30 хв і 3 год після дії показники складають 145% та 143% порівняно з контролем, відповідно (рис.5.4). Для інтерпретації отриманих результатів необхідно відзначити можливість впливу іонізуючого опромінення на процеси активаційних конформаційних перебудов білка Вах. Вах є зазвичай мономерним розчинним білком, який транслокується до мітохондрій в результаті апоптотичних сигналів. Певну роль у активації Вах відіграють білки зовнішньої мембрани мітохондрій: VDAC– потенціалза-

лежний аніонний канал, що функціонує як мітохондріальний порин, транслоказа білків зовнішньої мембрани мітохондрій (ТОМ) та кардіоліпін, який виконує подібні функції [250]. Радіаційно-індуковані зміни рН цитоплазми клітини можуть сприяти зміні іонізації амінокислотних залишків на С- і N-кінцях молекули білка Вах, таким чином порушуючи [251] міжмолекулярні взаємодії активаційних комплексів. Транслокація Вах може регулюватись кількома білками– партнерами. Білки 14-3-3 ζ і Ku70 запобігають активації Вах шляхом його ізоляції у цитоплазмі [252], що змінюється за умови фосфорилування першого і ацетилювання другого білка – партнера, відповідно. Наступні етапи вбудовування Вах в мітохондріальну мембрану можуть відбуватись під контролем tBid – продукту ензиматичного розщеплення Від каспазами-8,-2 та катепсином В [253], активацію яких в відмічено параметрах нашого експериментального дослідження.

Універсальний процес активації Вах відбувається за рахунок білків, що містять лише ВНЗ домени: білки PUMA і Noxa, гени яких є р53-респонсивними, виступають сенсорами апоптотичного шляху, пов'язаного з ушкодженнями ДНК (особливо за дії радіаційного чинника) [254].

Різноманіття активаційного сигналіngu на рівні експресії генів *bach* свідчать про центральну роль цієї молекули як активатора апоптозу. Варто відмітити, що *bach* належить до перших доведених р53- респонсивних генів за радіаційно- індукованого апоптозу [255], що дає можливість узгодити одержані нами дані по рівню білка Вах зі змінами вмісту білка р53 (розділ 3) в параметрах нашого експерименту. В той же час підвищення рівня Вах на фоні незначних змін вмісту р53 в лімфоцитах тимусу щурів можна пояснити активацією радіаційно- індуцибельного *Erg1* гена, продукт якого поряд з *p53* бере безпосередню участь в експресії *Bach* [256].

Таким чином, згідно з результатами проведених досліджень можна зробити висновок, що як в лімфоцитах тимусу, так і селезінки щурів за дози 7,78 Гр відмічається більш виражене підвищення рівня проапоптотичного

білка Вах, що можна інтерпретувати як виявлення значно вищого ступеня комітування цих клітин на шлях апоптозу, порівняно з лімфоцитами тимусу і селезінки, отриманими після тотального опромінення щурів в дозі 1,0 Гр.

5.3 Активність каспази-9 та вміст АІФ у лімфоцитах тимусу і селезінки щурів за дії іонізуючої радіації

Відомо, що посилення неселективної проникності мітохондріальної мембрани супроводжується вивільненням з мітохондрій у цитозоль ряду проапоптотичних факторів, як зазначалось - цитохрому *c*, АІФ (apoptosis inducing factor; апоптоз-індукуючого фактору), ендонуклеази *G* та комплексів білків Smac/Diablo і серинової протеїнази Omi/HtrA2, які блокують родину інгібіторів каспаз IAP. Необхідно наголосити, що всі фактори виконують специфічні проапоптотичні функції, механізми яких ще не повністю з'ясовані. Так, серинова протеїназа Omi/HtrA2, крім виконання спільної з Smac/Diablo функції антагоніста IAP [257], може індукувати, як представник родини протеїназ, специфічний–каспазо-незалежний шлях апоптозу [258].

Вихід цитохрому *c* в цитозоль сприяє утворенню високомолекулярного багатокомпонентного сигнального комплексу - апоптосоми, до складу якої окрім цитохрому *c* входять Araf-1, прокаспаза-9 та АТР (dАТР). Роль апоптосоми зводиться до активації прокаспази-9 та подальшої активації ефекторних каспаз-3,-7 [38], які, реалізуючи протеолітичні функції за каскадними циклами ампліфікації, спричиняють програмовану загибель клітини.

Отже, метою наступного етапу нашої роботи було дослідити активність головної ініціаторної каспази мітохондріально-опосередкованого шляху апоптозу– каспази-9 за дії променевого чинника в лімфоцитах тимусу і селезінки щурів.

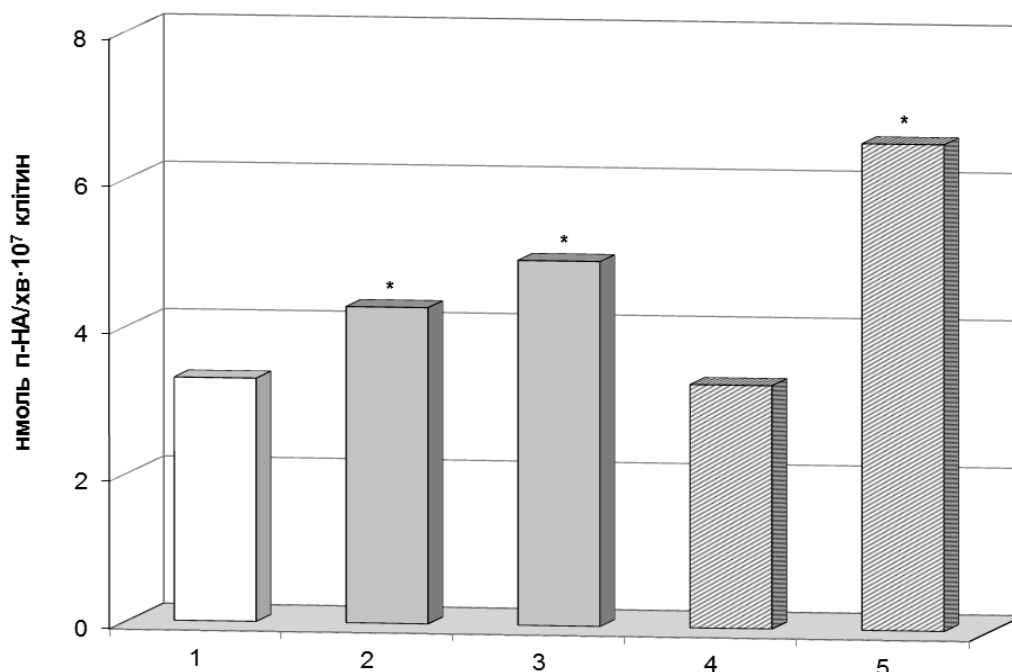


Рис. 5.5. Активність каспази-9 у лімфоцитах тимусу щурів за дії іонізуючої радіації: 1 – контроль; 2 – 1,0 Гр (30 хв після опромінення); 3 – 1,0 Гр (3 год після опромінення); 4 – 7,78 Гр (30 хв після опромінення); 5 – 7,78 Гр (3 год після опромінення); * – достовірно відносно контролю, $p < 0,05$

При дослідженні активності каспази-9 в лімфоцитах тимусу щурів нами відмічено дозозалежне зростання показників через 3 год після опромінення: максимальне підвищення в 1,5 раза та вдвічі порівняно з контрольними величинами за опромінення в дозі 1,0 та 7,78 Гр, відповідно (рис.5.5). Виявлені нами зміни активності каспази-9 корелюють з даними, представленими на рис.5.3 по оцінці рівня проапоптотичного білка Вах в лімфоцитах тимусу щурів, де відмічено максимальне його підвищення в 2,4 раза порівняно з контролем за опромінення в дозі 7,78 Гр. Водночас через 30 хв після опромінення в дозі 7,78 Гр активність каспази-9 лишалась в межах контрольних величин.

Оцінка активності каспази-9 в лімфоцитах селезінки (рис.5.6) засвідчила, що ці показники є значно вищими порівняно з аналогічними для лімфоцитів тимусу щурів. Наведені дані є ще одним доказом можливості

розподілу цих клітин на тип I (тимоцити) та тип II (спленоцити). За даними [259] клітини I-го, і II-го типів, до яких належать відповідно лімфоцити тимусу і селезінки, характеризуються подібною кінетикою зниження трансмембранного потенціалу ($\Delta\Psi_m$) мітохондрій та вивільненням у цитоплазму проапоптичних чинників. Різниця полягає в рівні експресії генів антиапоптичних білків родини Bcl-2 для реалізації Fas/CD95-опосередкованої клітинної загибелі. Так, надмірна експресія Bcl-2 або Bcl-xl у клітинах II типу блокує активацію каспаз-8 і -3, а, отже, і розвиток апоптозу. В той час як аналогічний, і навіть вищий, рівень експресії антиапоптичних білків у клітинах I типу недостатній для попередження утворення активно-ваних форм каспази-8. Отже, клітини I типу уможливають безпосередній шлях активації каспази-3 ініціаторною каспазою-8 за рецептор-опосередкованого апоптозу. Для клітин II типу є необхідною ампліфікаційна петля підсилення сигналу від Fas-рецептора через опосередкований каспазою-8 продукт обмеженого протеолізу Bid- tBid та запуск механізмів мітохондріального етапу апоптозу [260].

Згідно з даними, наведеними на рис. 5.6, зміни активності каспази-9 у лімфоцитах селезінки щурів мають коливальний характер. Вплив іонізуючого опромінення в дозі 1,0 Гр (30 хв після дії) спричиняє активацію каспази-9 в 1,4 раза порівняно з контролем, що узгоджується з даними щодо вмісту білка Вах (підвищення в 1,3 раза порівняно з неопроміненим контролем). Через 3 год після опромінення в дозі 1,0 Гр спостерігається достовірне зниження активності ферменту в 1,5 раза порівняно з контрольними величинами. Дія іонізуючої радіації у дозі 7,78 Гр сприяє активації каспази-9 в 1,2 раза та зниженню активності ферменту в 1,2 раза через 30 хв і 3 год після впливу променевого чинника, відповідно.

Одержані результати по визначенню активності каспази-9 в лімфоцитах селезінки щурів корелюють з наведеними в розділі 8 даними по радіаційно-

опосередкованій зміні активності ефекторної каспази-3, яка є субстратом ініціаторної каспази-9.

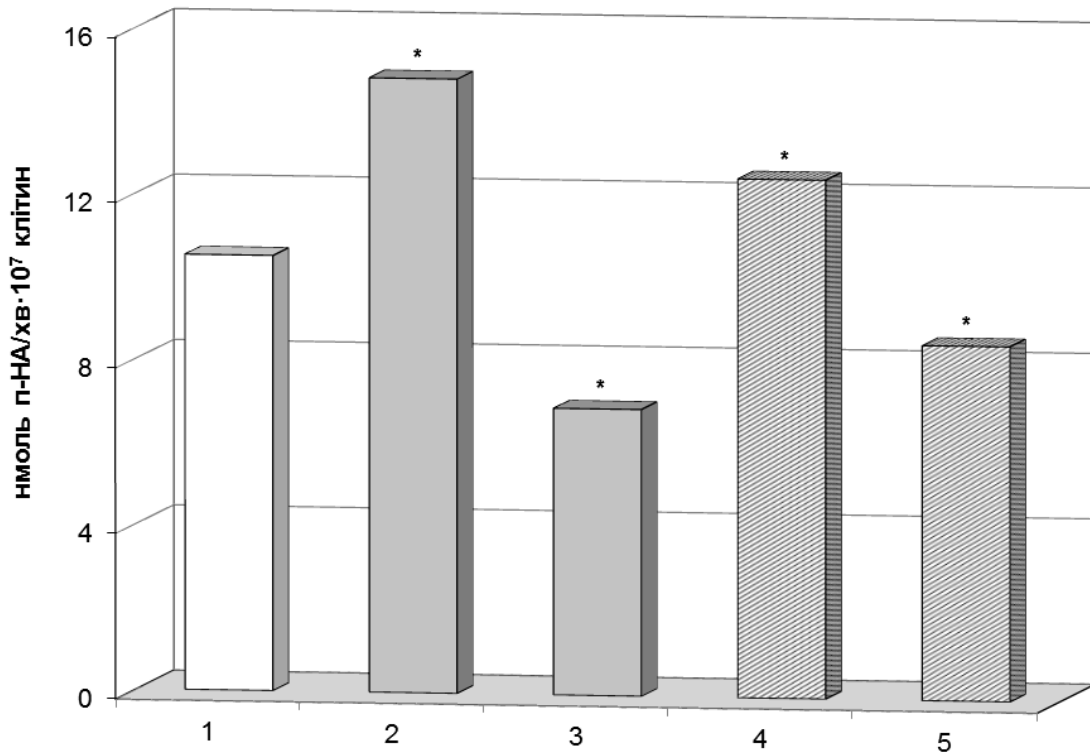


Рис. 5.6. Активність каспази-9 у лімфоцитах селезінки щурів за дії іонізуючої радіації: 1 – контроль; 2 – 1,0 Гр (30 хв після опромінення); 3 – 1,0 Гр (3 год після опромінення); 4 – 7,78 Гр (30 хв після опромінення); 5 – 7,78 Гр (3 год після опромінення); * – достовірно відносно контролю, $p < 0,05$

Щодо можливих пояснень статистично вірогідних змін активності каспази-9 в параметрах нашого експерименту, то, насамперед, це уможлиблюється за рахунок посттрансляційних модифікацій. Фосфорилування каспази-9 кіназою Erk [261] – представником родини MAP-кіназ, за залишками треоніну-125 призводить до інактивації ферменту. Дефосфорилування протеїнфосфатазою PP1 α є проапоптотичним кроком у посттрансляційній регуляції ферменту [262].

Взаємодія каспази-9 з убіквітин-лігазою XIAP на фоні встановленого нами інгібування активності протеасоми за радіаційно-індукованого апоптозу (розділ 6) призводить до накопичення убіквітинильованої каспази-9 в

цитозолі, що слугує додатковим проапоптотичним сигналом. Як вже зазначалось, антиапоптотичний ефект IAPs може бути нівельований за участі специфічних IAP-зв'язуючих регуляторних білків, зокрема Smac/Diablo, Omi/HtrA2. Після індукції апоптозу вони вивільнюються із міжмембранного простору мітохондрій у цитозоль, де через N-термінальний консервативний мотив AVPS зв'язуються із (X)IAPs. Показано, що за гіперекспресії Smac/Diablo чи Omi/HtrA2 значно зростає чутливість клітин до радіаційно-індукованого апоптозу [263].

В модельних експериментах з використанням інтактних мітохондрій показано, що спричинене окисним стресом підвищення мітохондріального пулу H_2O_2 призводить до формування внутрішньомолекулярних дисульфідних зв'язків в молекулі прокаспазини -9, що активує її аутопроцесинг. Автори припускають, що комплекс апоптосоми слугує для ампліфікації, а не для ініціації каспазного каскаду [264].

У мітохондріях знайдено р53-респосивний білок р66, головною функцією якого є промоція апоптозу за рахунок підвищення генерування мітохондріями АКМ (H_2O_2) [265]. Подальший витік цього АКМ поза мітохондрії на фоні виснаження АО систем захисту спричиняє значний приріст H_2O_2 у цитоплазмі та може бути визнаним кандидатом на головний маркер окисного стресу за мітохондріально-опосередкованого апоптозу. Накопичення подібним чином значної кількості неутилізованого пероксиду водню у цитозолі лімфоїдних клітин можливо є тригером перебігу апоптотичних процесів за радіаційно-опосередкованого окисного стресу, що лягло в основу гіпотези "ефект пероксиду водню" (" H_2O_2 effect") Ogawa Y. [266].

Наступним завданням наших досліджень було виявлення можливих наслідків активації мітохондріальної ланки апоптозу за каспазо-незалежним типом, що реалізується за участі AIF. AIF– флавопротеїн, який в нормі бере участь у функціонуванні дихального ланцюга мітохондрій та підтриманні

редокс-потенціалу за рахунок своєї редуктазної активності [267]. Після надходження апоптотичних сигналів AIF вивільняється з мітохондрій у цитозоль, потім надходить до ядра, де активує процеси конденсації хроматину і деградації ДНК. Фактично AIF – перший з відритих проапоптотичних ефекторів, який спричиняє ядерно-опосередковані події каспазо-незалежним чином. AIF синтезується у вигляді молекули-попередника, що містить на N-кінці сигнали мітохондріальної локалізації. Молекула, що надходить до ядра, tAIF, утворюється в результаті обмеженого протеолізу калпаїнами та характеризується високим позитивним зарядом, який сприяє взаємодії з молекулою ДНК. AIF-опосередкований шлях апоптозу, який отримав назву Parthanatos, відбувається за спричиненої генотоксичними чинниками активації ферменту ПАРП [268]. Утворені за каталізу ПАРП полімери ADP-рибози надходять до мітохондрій, де взаємодіють з AIF на етапі виходу молекули з міжмембранного простору мітохондрій. Після надходження до ядра AIF [269] опосередковує швидку конденсацію хроматину та крупно-масштабну фрагментацію (50 тис.п.н.) ДНК. Пояснення цьому феномену було надано в 2016 р. групою Wang Y. et al [270], які ідентифікували MIF (Macrophage migration inhibitory factor–фактор пригнічення міграції макрофагів) як ПАРП-1-залежну AIF- асоційовану нуклеазу PAAN (PARP-1–dependent AIF-associated nuclease). Автори довели кооперативну взаємодію MIF і AIF з подальшою транслокацією нуклеази до ядра та запуску деградації ядерного матеріалу. Інгібітором AIF виступає білок теплового шоку Hsp70 [271], який затримує у цитозолі активований AIF.

Отже, згідно з результатами наших досліджень з використанням імуноблот- аналізу було продемонстровано дозозалежне зниження вмісту AIF в лімфоцитах тимусу щурів через 30 хв та 3 год після опромінення в обох дозах (рис. 5.7).

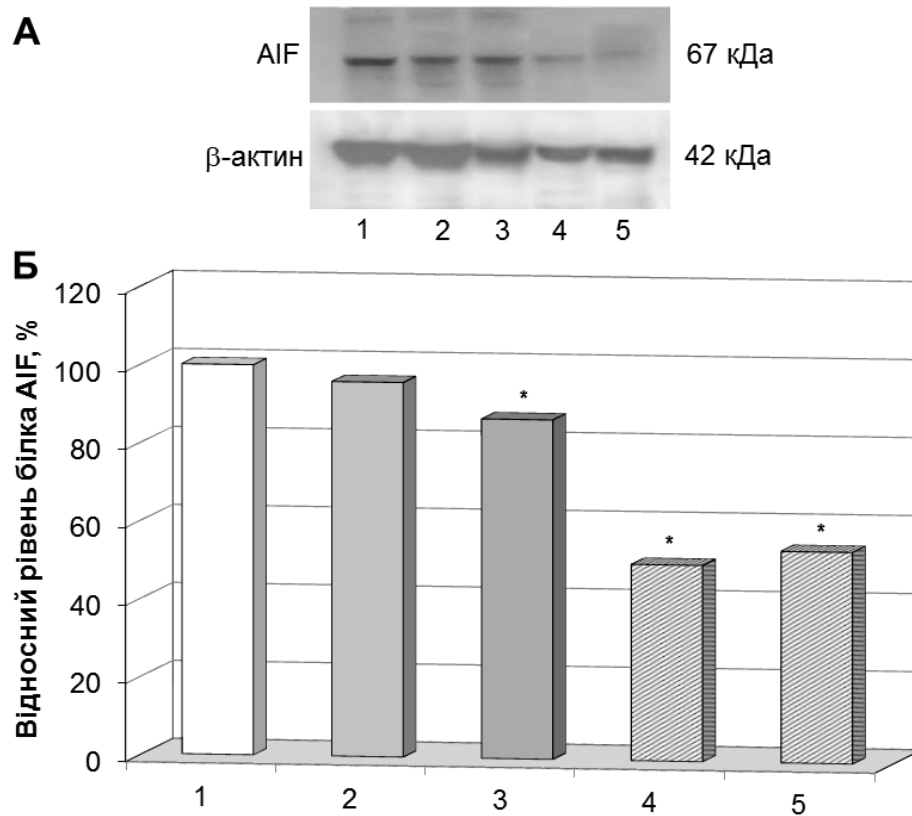


Рис.5.7. Відносний рівень АІФ у лімфоцитах тимусу щурів за дії іонізуючої радіації: А – блотограма; Б – гістограма імуноблот-аналізу; 1 – контроль; 2 – 1,0 Гр (30 хв після опромінення); 3 – 1,0 Гр (3 год після опромінення); 4 – 7,78 Гр (30 хв після опромінення); 5 – 7,78 Гр (3 год після опромінення);

* – достовірно відносно контролю, $p < 0,05$

Так, достовірне зниження відносного рівня АІФ порівняно з контрольними показниками відмічено через 3 год після опромінення в дозі 1,0 Гр; за опромінення в летальній дозі відносний рівень білка складав лише 50 та 54% від контролю через 30 хв та 3 год, відповідно (рис. 5.7), що корелює зі встановленим нами підвищенням активності кальцій-залежних цистеїнових протеїназ - калпаїнів, субстратом яких є АІФ (розділ 5). Отже за дії променевого чинника можлива транслокація активованої обмеженим протеолізом форми АІФ в комплексі з МІФ до ядра, що спричиняє крупномасштабну фрагментацію ДНК.

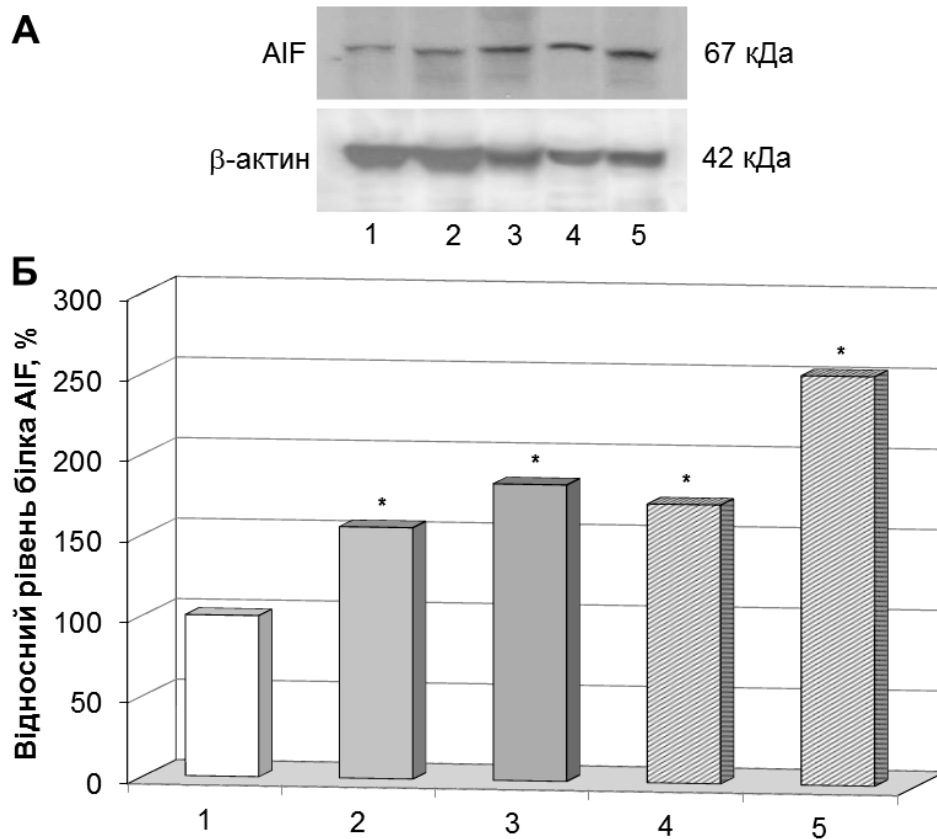


Рис. 5.8. Відносний рівень AIF у лімфоцитах селезінки щурів за дії іонізуючої радіації: А – блотограма; Б – гістограма імуноблот-аналізу; 1 – контроль; 2 – 1,0 Гр (30 хв після опромінення); 3 – 1,0 Гр (3 год після опромінення); 4 – 7,78 Гр (30 хв після опромінення); 5 – 7,78 Гр (3 год після опромінення);
* – достовірно відносно контролю, $p < 0,05$

В лімфоцитах селезінки щурів (рис.5.8) спостерігається достовірне підвищення рівня AIF за опромінення в дозі 1,0 Гр: на 56 і 84% порівняно з контролем через 30 хв та 3 год, відповідно. Дія променевого чинника в дозі 7,78 Гр спричиняє зростання досліджуваного показника на 73 та 154% порівняно з контролем, відповідно, через 30 хв та 3 год після впливу. Встановлене підвищення відносного рівня AIF можливо пояснити більш вираженою інтенсивністю окисного стресу в лімфоцитах селезінки щурів, що активізує структурні і функціональні порушення мітохондрій, та дозозалежним зниженням активності калпаїнів (розділ 5), яке корелює у часі з

підвищенням вмісту AIF. Отже, AIF-опосередкований генотоксичний вплив іонізуючого випромінювання в решті-решт призводить до виснаження репараційного потенціалу клітини, який супроводжується зміною активності ДНК-залежної полі(ADP-рибоза)полімерази в параметрах нашого експерименту.

Виявлені нами зміни показників функціональної активності мітохондрій, на нашу думку, були спричинені Вах- опосередкованою стимуляцією утворення МРТР у мембрані мітохондрій за дії рентгенівського опромінення в дозі 1,0 та 7,78 Гр за обох часових інтервалів та призвели до активації ініціаторної каспази-9 і AIF-залежного нуклеозізу, що є основними складовими мітохондріально-опосередкованої ланки радіаційно-індукованого апоптозу. Більш виражена проапоптотична направленість виявлених змін за дози 7,78 Гр може бути пояснена за рахунок дисбалансу проантиоксидантної рівноваги на рівні мітохондрій, оскільки органели є продуцентами АКМ та водночас чутливими мішенями до їх дії. Введення інозину до опромінення тварин в обох досліджуваних дозах нормалізує функційну активність мітохондрій за рахунок впливу на ферменти дихального ланцюга, структурний стан органели, що покращує енергетичний стан опромінених клітин.

РОЗДІЛ 6

ЗАЛУЧЕННЯ КАСПАЗО-НЕЗАЛЕЖНИХ ПРОТЕОЛІТИЧНИХ КАСКАДІВ У РАДІАЦІЙНО-ІНДУКОВАНИЙ АПОПТОЗ

Апоптотичний шлях загибелі прискіпливо контролюється змінами в експресії білків, білок-білковими взаємодіями, рядом пострасляційних модифікацій білків, як-то фосфорилювання та протеоліз. Протеолітичні ферменти відіграють важливу роль у життєдіяльності клітини, вони активно залучені у метаболічних процесах, беруть участь у складному енергоємному багатоступінчастому процесі апоптозу, де протеїназам належить провідна роль [272,273]. Реалізація клітинної загибелі протікає за активації цілого ряду протеїназ, які не лише виконують функцію месенджерних молекул, забезпечуючи проведення апоптотичного сигналу до відповідних клітинних компартментів, а й виступають безпосередніми ефекторами даного процесу, визначаючи основні морфологічні та біохімічні прояви апоптозу [274].

За умов дії стресових чинників спостерігається дисрегуляція лізосомальних катепсинів, Ca^{2+} -залежних цистеїнових протеїназ калпаїнів; гранзимів та убіквітин-опосередкованого шляху деградації білків.

З'ясування механізмів активації ендогенних протеїназ, відмінних від каспаз, у лімфоїдних клітинах тимусу і селезінки щурів за променевого ураження представляє значний фундаментальний інтерес та сприяє пошуку засобів регулювання процесу клітинної загибелі.

6.1 Активність лізосомальної протеїнази катепсину В у лімфоцитах тимусу і селезінки щурів за дії іонізуючої радіації та на фоні введення інозину

Відповідно до сучасних уявлень, викликаний іонізуючої радіацією розпад білків у тканинах обумовлений активацією ряду протеолітичних

каскадів для запуску яких уможлиблюється редислокація їх компонентів у різні субклітинні компартменти [275]. Насамперед, цей процес релокалізації виникає внаслідок пошкодження внутрішньоклітинних мембран у опромінених клітинах, наприклад активація каскаду каспази-9 за рахунок ушкодження мітохондріальної мембрани та лізосомальна дестабілізація, причиною якої є пермебілізація лізосомальної мембрани (ПЛМ) з подальшим виходом лізосомальних ферментів у цитозоль та їх активізації [276].

Лізосомальні цистеїнові протеїнази, активовані за дії іонізуючої радіації, окрім виконання традиційних функцій неселективної деградації білків в середині лізосом, стимулюють каскад внутрішньоклітинних деградаційних подій за умови їх часткового вивільнення у цитозоль [277].

На основі ряду досліджень з використанням різних моделей апоптозу була запропонована гіпотеза, що пермеабілізація лізосомальної мембрани і частковий вихід протеолітичних ферментів (катепсини В, С, L, D та інші) у цитозоль є більш раннім етапом на фоні пізніх ефекторних стадій клітинної загибелі шляхом апоптозу [49]. Хоча на сьогодні ця гіпотеза набула змін, оскільки уможлиблюється ампліфікація активаційних сигналів з урахуванням більш пізніх етапів ПЛМ, опосередкованих функціонуванням ланки апоптосо-залежної активації каспазного каскаду [278]. Слід зазначити, що для виконання протеолітичних функцій катепсини потребують кислих значень рН [279], характерних для лізосом. Дія променевого чинника дезінтегрує метаболічні процеси, що призводить до закислення цитозолу [280] і, відповідно, активації катепсинів, редислокованих з лізосомом. Вважають, що за умови радіаційно-обумовленої ПЛМ тільки катепсин В найбільш адекватно та в найкоротший термін активується в цитозолі [281,282].

Отже, дія променевого чинника, лізосомотропні детергенти, накопичення АКМ, стимуляція кислої сфінгомієлінази (A-SMase), активація рецептор-залежного шляху клітинної загибелі можуть стати тригерами пермеа-

білізації лізосомальної мембрани, що спричиняє вивільнення катепсинів з лізосом у цитозоль. Промоторами ПЛМ також слугують проапоптотичні члени родини Bcl-2, білок p53, каспази-8, -2, самі катепсини, калпаїни, ряд протеїнказ [283].

Враховуючи наведене вище, наступним завданням було дослідити активність катепсину В у лімфоїдних клітинах тимусу та селезінки щурів за дії променевого чинника та на фоні введення інозину.

Отримані дані показали, що при опроміненні у дозах 1,0 Гр і 7,78 Гр відмічається підвищення активності катепсину В у лімфоїдних клітинах тимусу і селезінки щурів (рис. 6.1, 6.2).

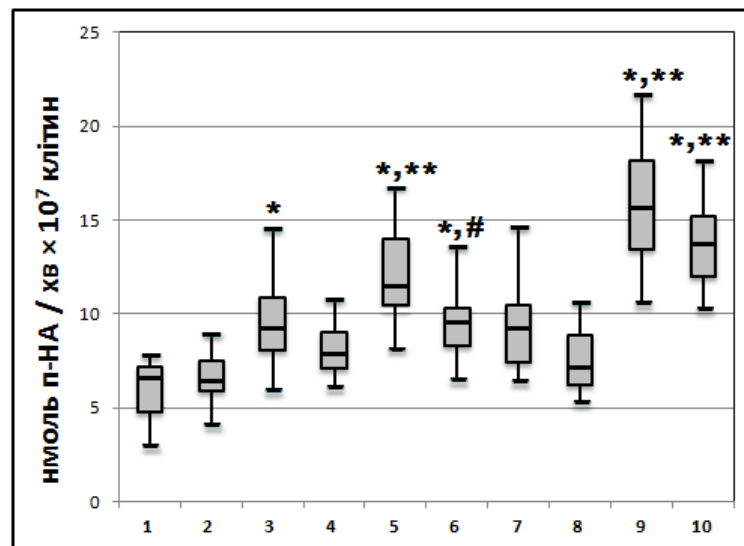


Рис.6.1. Активність катепсину В у лімфоцитах тимусу щурів за дії іонізуючої радіації та на фоні введення інозину ($M \pm SD$, $n = 5$): 1 – контроль; 2 – контроль +інозин; 3 – через 30 хв після опромінення у дозі 1,0 Гр; 4 – через 30 хв після опромінення у дозі 1,0 Гр + інозин; 5 – через 3 год після опромінення у дозі 1,0 Гр; 6 – через 3 год після опромінення у дозі 1,0 Гр + інозин; 7 – через 30 хв після опромінення у дозі 7,78 Гр; 8 – через 30 хв після опромінення у дозі 7,78 Гр + інозин; 9 – через 3 год після опромінення у дозі 7,78 Гр; 10 – через 3 год після опромінення у дозі 7,78 Гр + інозин

Згідно з представленими результатами активація катепсину В у лімфоцитах тимусу щурів (рис. 6.1) підвищується дозозалежним чином через 30 хв і 3 год після дії променевого фактора. Необхідно відмітити, що за умов

опромінення тварин на фоні введення інозину відмічається пригнічення активності ферменту порівняно з активністю ферменту у опроміненних лімфоцитах тимусу щурів.

На наступному етапі досліджували активність катепсину В у лімфоцитах селезінки. Відповідно до наших результатів дія іонізуючого випромінювання викликає дещо різноспрямовані зміни активності ферменту (рис.6.2). Водночас введення інозину за 15 хв до опромінення сприяє нормалізації активності катепсину В у лімфоцитах селезінки щурів.

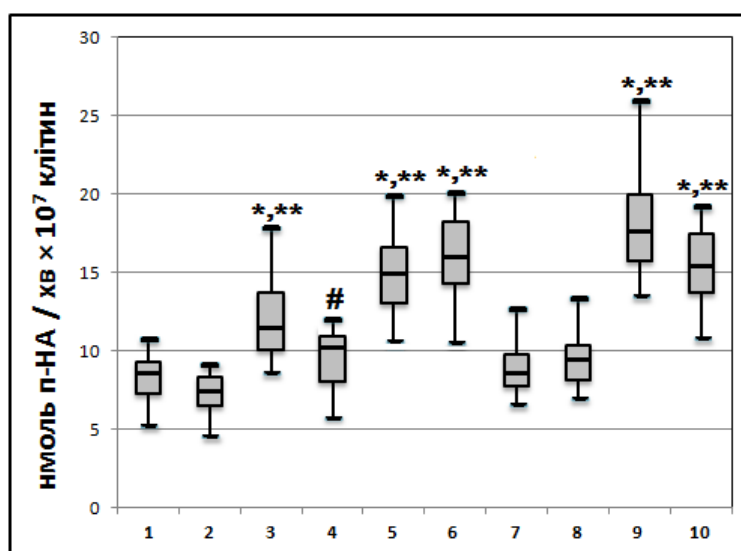


Рис.6.2. Активність катепсину В у лімфоцитах селезінки щурів за дії іонізуючої радіації та на фоні введення інозину ($M \pm SD$, $n = 5$): 1 – контроль; 2 – контроль + інозин; 3 – через 30 хв після опромінення у дозі 1,0 Гр; 4 – через 30 хв після опромінення у дозі 1,0 Гр + інозин; 5 – через 3 год після опромінення у дозі 1,0 Гр; 6 – через 3 год після опромінення у дозі 1,0 Гр + інозин; 7 – через 30 хв після опромінення у дозі 7,78 Гр; 8 – через 30 хв після опромінення у дозі 7,78 Гр + інозин; 9 – через 3 год після опромінення у дозі 7,78 Гр; 10 – через 3 год після опромінення у дозі 7,78 Гр + інозин

Представлені дані щодо активності катепсину В корегують з рівнем активності калпаїнів у лімфоцитах тимусу і селезінки щурів за дії іонізуючої радіації в дозах 1,0 і 7,78 Гр (наведено далі). Згідно з літературними

джерелами [284,285] саме ко-локалізація активованого μ -калпаїна в мембрані лізосом ще до вивільнення катепсинів є тригером процесу ПЛМ. Розщеплення цитозольним катепсином В проапоптотичного білка Bid з утворенням tBid та опосередкована катепсинами деградація антиапоптотичних членів родини Bcl-2 в комплексі уможливають олігомеризацію проапоптотичних мультидоменних Bax/Bak з подальшою перміабілізацією мітохондріальної мембрани та вивільненням проапоптотичних факторів, серед яких – AIF. Саме ця концепція може стати підґрунтям для пояснення виявленої нами кореляції змін активності калпаїнів у лімфоцитах селезінки щурів та рівня AIF за опромінення в дозі 1,0 та 7,78 Гр. Водночас безпосереднє розщеплення XIAP (інгібіторів каспаз) активованими катепсинами свідчить про їх залучення у каспазо-залежний апоптоз на етапі після залучення мітохондрій [286,287].

Пермебілізація лізосомальної мембрани виявлена за p53-індукованого транскрипційно-незалежного апоптозу. Показано локалізацію в лізосомальній мембрані фосфорильованої форми білка p53 в комплексі з лізосомо-асоційованим білком LAPF, що сприяє безпосередній активізації ПЛМ. А власне розщеплення основного білка лізосомальних мембран LAPF калпаїнами [288] вважається головним індуктором ПЛМ для ряду патологічних станів. Через транскрипційну регуляцію синтезу білків Puma і Noxa (BH3-only protein) p53 регулює залучення мітохондріальної ланки апоптозу в ПЛМ-асоційовану Bax активацію. На рівні дестабілізації лізосомальних мембран виявилась і проапоптотична функція ендogenous цераміду за дії іонізуючої радіації та інших стресових чинників [217].

До регуляторів функціонування катепсинів належать їх ендogenous інгібітори – родина цистатинів, основна роль яких полягає у захисті клітин від надмірно активованих ендogenous протеїназ, вивільнених з лізосом [289]. Інгібує активність катепсину В і серпін 2А (інгібітор серинових протеїназ), який також є блокатором ПЛМ-опосередкованої клітинної загибелі [290].

З отриманих результатів можна зробити висновок, що радіаційно-індукований апоптоз обумовлює посилення літичних процесів, до яких залучені лізосомальні протеїнази. Показаний нами модулюючий ефект інозину можна пов'язати з описаною у літературі [291,292] здатністю препарату інгібувати процеси ПОЛ (один із механізмів, що обумовлює ПЛМ) та здійснювати активуючий вплив на функціонування ендогенної анти-оксидантної системи організму.

Отже, дослідження участі лізосомального фактора у радіаційно-індукованій програмованій загибелі, а саме механізмів і сигнальних шляхів, що опосередковують лізосомальну деструкцію та деградацію апоптичних субстратів лізосомальних протеїназ, є на сьогодні досить актуальними у зв'язку з виокремленням лізосомально-опосередкованого шляху реалізації програмованої клітинної загибелі.

На особливу увагу заслуговує вивчення активації лізосомальної деструкції за участі АКМ, що передусє порушенням у функціонуванні мітохондрій, оскільки, на нашу думку, саме вона може бути реалізована за радіаційно-індукованого апоптозу. Так, підвищення вмісту АКМ, яке відбувається за дії променевого чинника [293], може індукувати лізосомальну пермеабілізацію опосередковано через активацію фосфоліпази A_2 за умови підвищення внутрішньоклітинної концентрації Ca^{2+} , що призводить до дестабілізації лізосомних і мітохондріальних мембран за рахунок деградації мембранних фосфоліпідів.

Отримані нами результати можливо трактувати з огляду на висунуту в 2016 р. Ogawa Y. [143] гіпотезу про ефект пероксиду водню ("H₂O₂ effect") як провідний в реалізації радіаційно-індукованого апоптозу. На думку автора за радіаційного стресу накопичення у цитоплазмі клітини значних концентрацій H₂O₂ за умови виснаження пулу пероксидаз сприяє проникненню пероксиду водню до лізосом, де він у реакції Фентона з редокс-чутливим залізом (Fe²⁺) утворює гіперактивний гідроксил-радикал (OH[•]), який активує процеси

модифікації ліпідів та білків лізосом і вважається основною причиною ПЛІМ. Редислокація OH^- з лізосом до цитозолу активує другу хвилю вільно радикальних процесів у опромінених клітинах. Ця гіпотеза стала частиною загальної теорії, яка стверджує, що саме окисний стрес є основним медіатором апоптозу.

6.2 Активність Ca^{2+} -залежних протеїназ калпаїнів у лімфоцитах тимусу і селезінки щурів за дії іонізуючої радіації та на фоні введення інозину

Калпаїни – нейтральні Ca^{2+} -залежні протеїнази, які локалізовані переважно в цитозолі і є необхідними для нормального перебігу багатьох фізіологічних процесів, пов'язаних з перебудовою цитоскелету, регуляцією фаз клітинного циклу, диференціюванням клітин, трансдукцією сигналів та ін. [294]. Разом з тим, гіперекспресія чи неконтрольована активація цих ферментів розглядається як одна з основних причин, що обумовлюють розвиток ряду патологій, зокрема нейродегенеративних захворювань, злоякісних перероджень, діабету [295, 296].

Виділяють дві ізоформи ферменту – μ - і m - калпаїни, що різняться за чутливістю до іонів Ca^{2+} , необхідних для їх активації: μ - і m - калпаїни потребують для своєї активації наявності іонів Ca^{2+} відповідно в мікро- та мілімолярній концентрації [297].

Серед субстратів калпаїнів виділяють групу білків, протеоліз яких є однією з причин розвитку характерних для апоптотичної загибелі морфологічних ознак. Аналіз літературних джерел [298, 299, 300] показав, що порушення полімеризації актинових філаментів, обумовлене розщепленням калпаїнами спектрину, а також деградація білків, що забезпечують зв'язування актинових волокон з плазматичною мембраною, в кінцевому результаті призводить до блебінгу останньої і розпаду клітини на

апоптотичні тільця. Більш того, показано [301], що у лімфоцитах, подібно до еритроцитів, спектрин (як безпосередньо, так і опосередковано) бере участь у підтриманні асиметрії ліпідного бішару мембран, а його деградація полегшує транслокацію фосфоліпідів на зовнішню поверхню плазматичної мембрани і є важливою складовою апоптозу. Саме за рахунок активації системи Ca^{2+} -залежного протеолізу можна трактувати отримані нами дані по протоково-цитофлуориметричному аналізу впливу іонізуючої радіації на лімфоцити тимусу і селезінки щурів (розділ 8), оскільки вивчали екстерналізацію фосфатидилсерину, поява якого назовні клітини є ранньою ознакою, що забезпечує швидке розпізнавання макрофагами апоптичних клітин.

Окрім структурних білків цитоскелету, субстратами калпаїнів є ядерні ламіни А і В та ряд функціональних білків, задіяних у репарації ДНК, зокрема, каталітична субодиниця ферменту ДНК-залежної протеїнкінази, ПАРП, ДНК-лігаза III, фактор репарації ДНК Rad 51, транскрипційні фактори p53 та AP1 (c-Fos/c-Jun) [302]. Результатом їх протеолізу є зниження ефективності роботи систем репарації та збереження певного рівня нерепарованих одно- і дволанцюгових розривів ДНК. Подібна ситуація ускладнює проходження клітиною відповідних точок контролю (check-points) стабільності генетичного матеріалу, унеможлиблює її подальше просування по клітинному циклу і остаточно визначає спрямованість клітини на шлях апоптичної загибелі.

Субстратом калпаїнів виступає флавопротеїн AIF [303,304], який в нормі бере участь у функціонуванні дихального ланцюга мітохондрій, а за дії апоптотичних сигналів транслокується до ядра, де активує процеси конденсації хроматину і деградації ДНК. До субстратів калпаїнів також належать представники родини Bcl-2, а саме білок Bid та проапоптотичний білок Bax, зміни вмісту якого, наведені у роботі, можуть залежати від ступеня активації Ca^{2+} -залежних цистеїнових протеїназ [305,306].

Незважаючи на те, що активація калпаїнів відбувається за різних форм клітинної загибелі [307,308], даних щодо внеску залежного від калпаїнів протеолізу у розвиток радіаційно-індукованого апоптозу на сьогодні недостатньо. Тому для з'ясування участі Ca^{2+} -залежних цистеїнових протеїназ

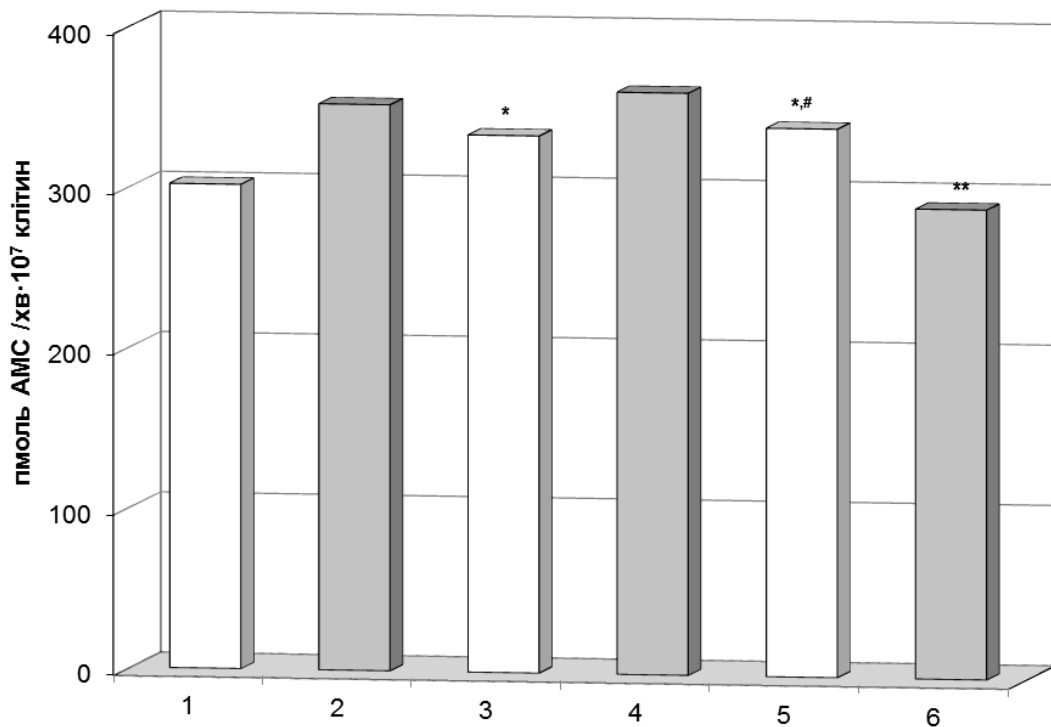


Рис. 6.3. Активність калпаїнів у лімфоцитах тимусу щурів через 30 хв за дії іонізуючої радіації та на фоні введення інозину: 1 – контроль; 2 – контроль + інозин; 3 – опромінення в дозі 1,0 Гр; 4 – опромінення в дозі 1,0 Гр + інозин; 5 – опромінення в дозі 7,78 Гр; 6 – опромінення в дозі 7,78 Гр + інозин;
 * – достовірно відносно контролю,
 ** – достовірно відносно контролю на фоні введення інозину,
 # – достовірно відносно відповідних опромінених груп,
 $p < 0,05$

у процесах клітинної загибелі ми досліджували активність вказаних ферментів у лімфоцитах тимусу і селезінки щурів за дії іонізуючої радіації та на фоні введення інозину. Отримані дані показали, що при рентгенівському опроміненні щурів у дозах 1,0 Гр та 7,78 Гр спостерігаються різнонаправлені зміни активності калпаїнів у лімфоїдних клітинах тимусу і селезінки щурів

(рис. 6.3 – 6.6). Згідно з результатами, представленими на рис.6.3, 6.4 за опромінення щурів в дозі 1,0 Гр має місце наростаюча з часом активація калпаїнів в лімфоцитах тимусу щурів.

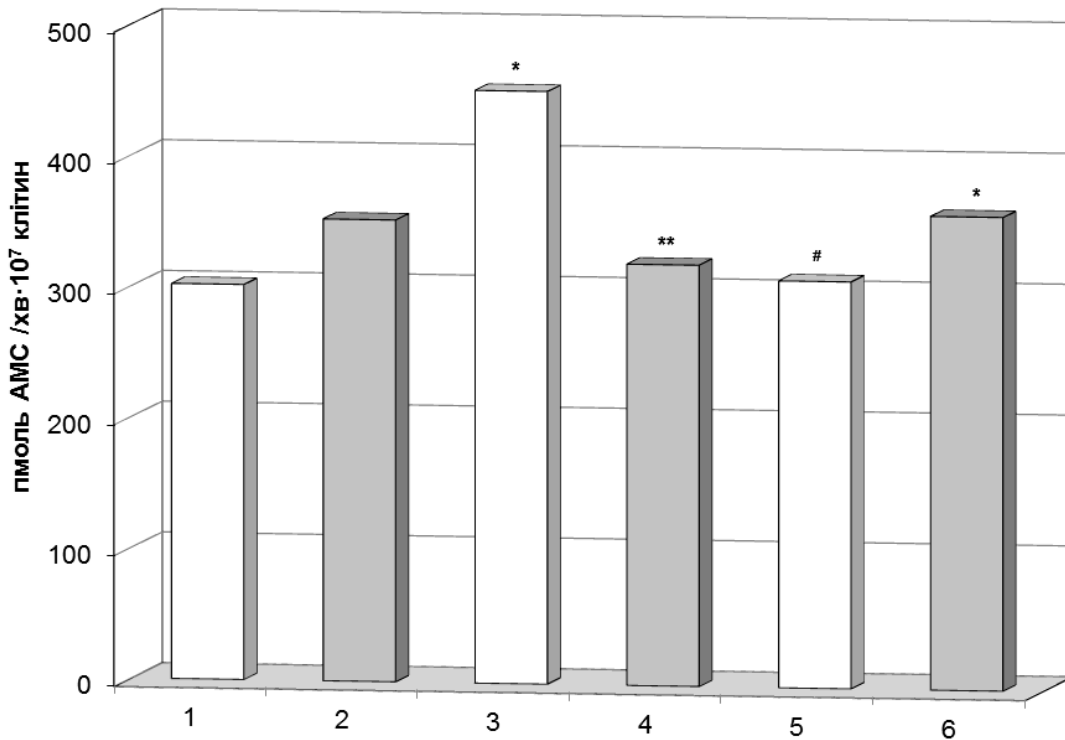


Рис. 6.4. Активність калпаїнів у лімфоцитах тимусу щурів через 3 год за дії іонізуючої радіації та на фоні введення інозину: 1 – контроль; 2 – контроль + інозин; 3 – опромінення в дозі 1,0 Гр; 4 – опромінення в дозі 1,0 Гр + інозин; 5 – опромінення в дозі 7,78 Гр; 6 – опромінення в дозі 7,78 Гр + інозин;
 * – достовірно відносно контролю,
 ** – достовірно відносно контролю на фоні введення інозину,
 # – достовірно відносно відповідних опромінених груп,
 $p < 0,05$

Так, через 30 хв після дії променевого чинника спостерігається незначне (в 1,1 раза) зростання активності калпаїнів (рис.6.3), в той час як на 3 годину після опромінення активність досліджуваного ферменту зростала вже в 1,5 раза порівняно з контролем (рис.6.4). За дози 7,78 Гр зберігається тенденція до підвищення активності калпаїнів за обох часових інтервалів. Зростання активності ферменту через три години після опромінення в дозі

1,0 Гр може бути обумовлено залученням каскадного механізму його активації, коли m-калпаїн, який для активації потребує значних концентрацій Ca^{2+} , зазнає обмеженого протеолізу за участі активованого за мікромольних концентрацій Ca^{2+} μ -калпаїну. З огляду на той факт, що активація калпаїнів відбувається лише за певних концентрацій Ca^{2+} , зростання як і зниження активності ферментів в умовах нашого експерименту може бути наслідком радіаційно-індукованого порушення перерозподілу Ca^{2+} [309] між внутрішньоклітинними депо та підвищення локальної концентрації вільного катіону до рівня, необхідного для ініціації неактивних попередників калпаїнів. Подальше розщеплення калпаїнами $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ антипортера [310] в плазматичній мембрані (в нормі викачує надлишковий Ca^{2+}) призводить до стійкого підвищення рівня катіону та незворотної дерегуляції його обміну за рахунок вищенаведеного позитивного зворотного зв'язку. Масивна активація калпаїнів робить значний внесок у вивільнення катепсинів В і L з лізосом до цитозолу за індукованої ПЛМ, що знайшло відображення у "calpain-cathepsin" гіпотезі Yamashita T., яка узгоджує роботу протеолітичних каскадів [311].

Ще одним механізмом, що регулює прояв ферментативної активності калпаїнів, є їх взаємодія з внутрішньоклітинним інгібітором кальпастатином [312]. З літератури відомо, що кальпастатин належить до субстратів цистеїнових протеїназ родини каспаз. Відповідно до даних, наведених в роботах [313,314] активація каспаз є ранньою подією за різних типів клітинної загибелі, зокрема, радіаційно-індукованого апоптозу. Тому можна припустити, що встановлені нами зміни активності калпаїнів частково є результатом виходу досліджуваних ферментів з під контролю інгібітора внаслідок розщеплення кальпастатину каспазами та навіть активованими молекулами кальпаїнів (як підвищення співвідношення кальпаїни /кальпастатини) [296]. При введенні інозину до рентгенівського опромінення активність калпаїнів у лімфоцитах тимусу щурів нормалізується, особливо

цей ефект відзначається за дози 1,0 Гр (3 год після опромінення). Активація Ca^{2+} -залежних протеїназ у перші години після опромінення тварин спостерігається у клітинах крові [315]. Squier МК [316] описана активація Ca^{2+} -залежних протеїназ при апоптозі тимоцитів, індукованих низькими дозами γ -радіації і дексаметазоном.

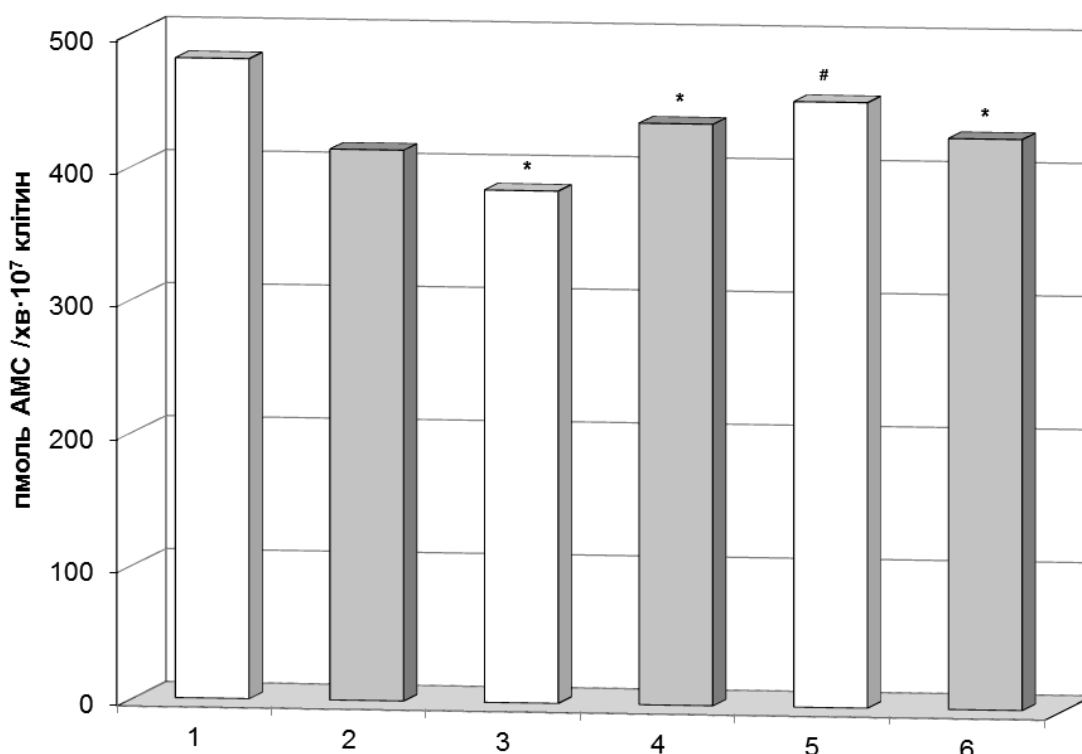


Рис. 6.5. Активність калпаїнів у лімфоцитах селезінки щурів через 30 хв за дії іонізуючої радіації та на фоні введення інозину: 1 – контроль; 2 – контроль + інозин; 3 – опромінення в дозі 1,0 Гр; 4 – опромінення в дозі 1,0 Гр + інозин; 5 – опромінення в дозі 7,78 Гр; 6 – опромінення в дозі 7,78 Гр + інозин;
 * – достовірно відносно контролю,
 ** – достовірно відносно контролю на фоні введення інозину,
 # – достовірно відносно відповідних опромінених груп,
 $p < 0,05$

Аналізуючи зміну активності калпаїнів в лімфоцитах селезінки щурів за дії променевого чинника, встановили залежне від часу після опромінення зниження досліджуваних показників (рис.6.5-6.6). За опромінення у дозі

1,0 Гр активність ферменту знижувалась на 20% і 40% , відповідно через 30 хв і 3 год після дії чинника; за опромінення у дозі 7,78 Гр нами відмічено, що рівень активності калпаїнів складав 94 і 38 % порівняно з контролем через 30 хв і 3 год, відповідно. Можливо трактувати отримані дані за рахунок посилення взаємодії ферменту з кальпастатином.

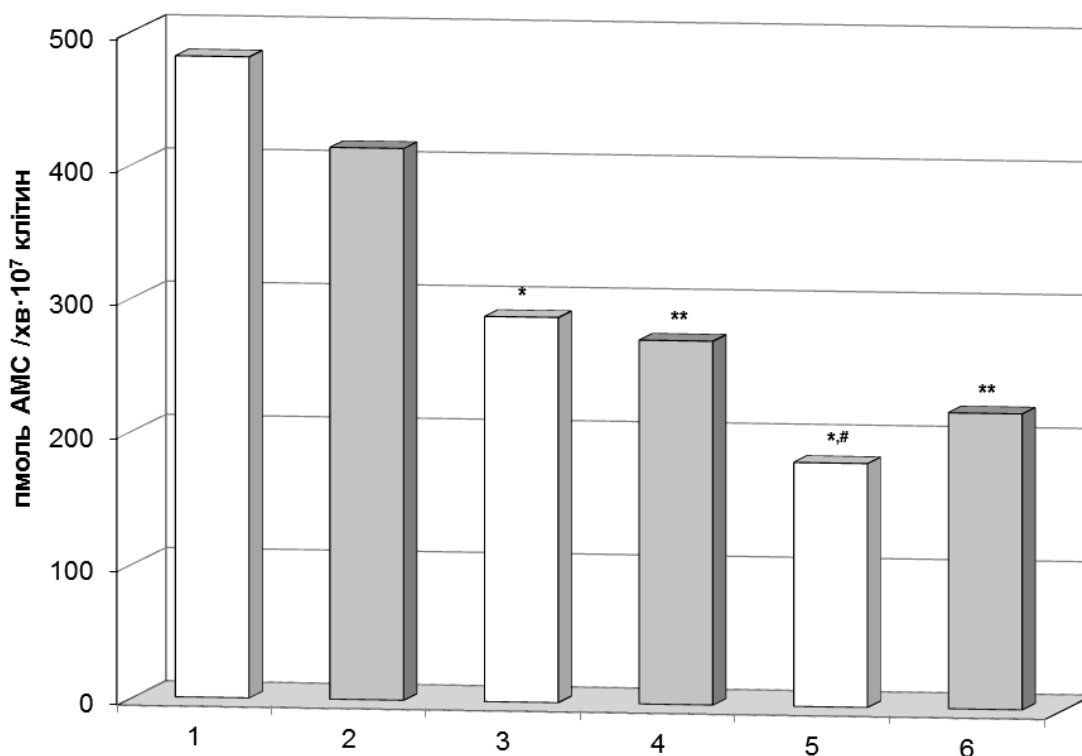


Рис. 6.6. Активність калпаїнів у лімфоцитах селезінки щурів через 3 год за дії іонізуючої радіації та на фоні введення інозину: 1 – контроль; 2 – контроль + інозин; 3 – опромінення в дозі 1,0 Гр; 4 – опромінення в дозі 1,0 Гр + інозин; 5 – опромінення в дозі 7,78 Гр; 6 – опромінення в дозі 7,78 Гр + інозин;
* – достовірно відносно контролю,
** – достовірно відносно контролю на фоні введення інозину,
– достовірно відносно відповідних опромінених груп,
 $p < 0,05$

Функціонування калпаїнів перебуває під редокс-контролем. Активуєчись при зростанні рівня активних кисневих метаболітів, калпаїни і самі опосередковують утворення останніх. Так, калпаїни є одними з чинників, які обумовлюють трансформацію ксантиндегідрогеназної форми в

оксидазну, функціонування якої супроводжується генеруванням супероксидних аніон-радикалів, що призводить до радіаційно - індукованого порушення про-антиоксидантного балансу в лімфоцитах тимусу і селезінки щурів (розділ 6) [317].

Модифікуючий вплив інозину на функціонування Ca^{2+} -залежних цистеїнових протеїназ калпаїнів в лімфоцитах тимусу і селезінки щурів можна розглядати як результат сукупної дії ряду факторів, спрямованих на регуляцію проведення апоптогенного сигналу до відповідних клітинних мішеней.

Отримані нами дані по активації катепсину В та калпаїнів в умовах нашого експерименту можна порівняти з результатами Кожемякіна Л.А. [318] по вивченню ендогенної протеолітичної активності у тимоцитах щурів при дії загального рентгенівського випромінювання в дозі 4,0 Гр. В цій роботі було продемонстровано зростання протеолітичної активності у тимоцитах через 3-6 год після дії променевого чинника. Такі зміни активності ендогенних протеїназ пояснюються автором завдяки механізмам регуляції активності цих ферментів, а саме взаємодії їх з інгібіторами. Ця взаємодія здійснюється за допомогою реакцій тіол-дисульфідного обміну між тіоловою групою молекули інгібітору і дисульфідним зв'язком у молекулі ферменту. Спричинений променевим чинником окисний стрес активізує окиснення SH-груп інгібітора, що призводить до його інактивації і порушення рівноваги у системі протеїназа – інгібітор з подальшою гіперактивацією внутрішньоклітинних протеолітичних каскадів. Саме така ескаляція протеїназної активності веде до порушення внутрішньоклітинного метаболізму білків за радіаційно-індукованого апоптозу.

6.3. Протеасомна активність в лімфоцитах тимусу і селезінки щурів за дії іонізуючої радіації та на фоні введення інозину

Система протеасом у клітині виконує програмований процесинг різноманітних регуляторних білків-субстратів, за рахунок чого відіграє ключову роль у процесах регуляції транскрипції, руху по клітинному циклу та апоптозу [319]. Протеасома - це великий мультиферментний комплекс, у ссавців має константу седиментації 26S [320]. Складається з серцевинного каталітичного комплексу 20S, фланкованого з двох сторін регуляторними субодинамиціями 19S. Серцевина (20S комплекс) є каталітичним центром з вираженими трьома основними видами протеолітичної активності, а саме – трипсиноподібною, хімотрипсиноподібною та активністю, подібною каспазам. У складі протеасоми також функціонують дві 19S кепуючі регуляторні частини, які АТФ-залежним чином відповідають за розпізнавання (моно)поліубіквітинільованих білків-субстратів та розгортання третинної структури білка до входження у протеасому. Регуляцію з залученням протеасоми процесів, які опосередковують проходження рецептор- та мітохондріально-залежного, ядерно-опосередкованого шляху апоптозу, виконують родини убіквітинлігаз та деубіквітиназ [321], серед субстратів перших є інгібітори каспаз – XIAP, cIAP1/2, інгібітор p53 – MDM2, інгібіторний білок IκBα – регулятор функціонування транскрипційного фактора NF-κB, інгібітор каспази-8 – FLIP, регулятор білка родини Bcl-2 – MCL1, білків MYC, JUN.

У зв'язку з наведеним ми вважали за необхідне дослідити рівень протеасомної протеолітичної активності за дії іонізуючої радіації в дозі 1,0 та 7,78 Гр за двох часових інтервалів.

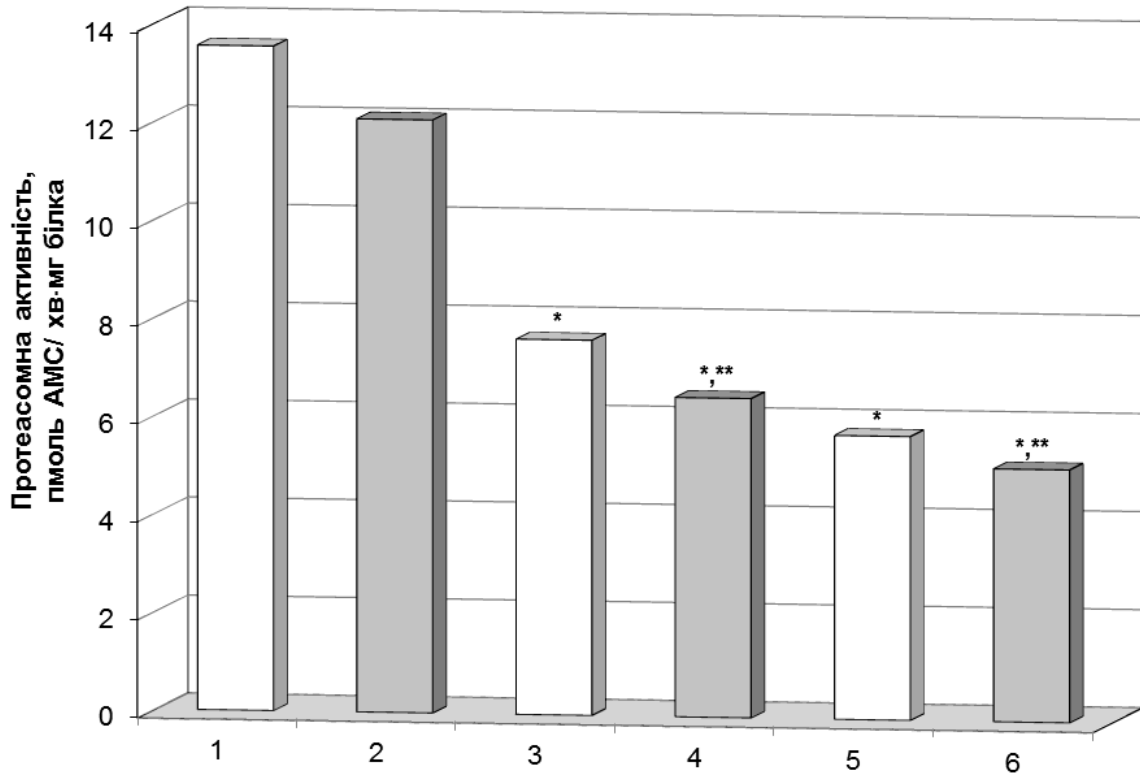


Рис.6.7. Протеасомна активність у лімфоцитах тимусу щурів через 30 хв за дії іонізуючої радіації та на фоні введення інозину: 1 – контроль; 2 – контроль + інозин; 3 – опромінення в дозі 1,0 Гр; 4 - опромінення в дозі 1,0 Гр + інозин; 5 – опромінення в дозі 7,78 Гр; 6 – опромінення в дозі 7,78 Гр + інозин;

* – достовірно відносно контролю

** – достовірно відносно контролю на фоні введення інозину

$p < 0,05$

Нами встановлено, що протеасомна активність у лімфоцитах тимусу щурів через 30 хв після дії іонізуючої радіації знижується за обох досліджуваних доз, а саме в 1,8 раза за опромінення в дозі 1,0 Гр та в 2,34 раза за опромінення в дозі 7,78 Гр (рис.6.7). Через 3 год після дії променевого чинника тенденція до зниження протеасомної активності в лімфоцитах тимусу зберігається і відповідно, складає 1,6 раза за опромінення в дозі 1,0 Гр та 2,1 раза за опромінення в дозі 7,78 Гр (рис. 6.7, 6.8). Необхідно відмітити, що подібна тенденція відмічена в роботах Rayonk F., McBride WH. [322, 323], які виявили дозозалежне зниження 26S протеасомної активності на моделі клітин ECV за опромінення у малих і летальних дозах. Авторами

підкреслюється, що вже через (15) 30 хв після дії променевого чинника відзначається інгібування протеасомної активності, яке зберігається до 24 год після опромінення.

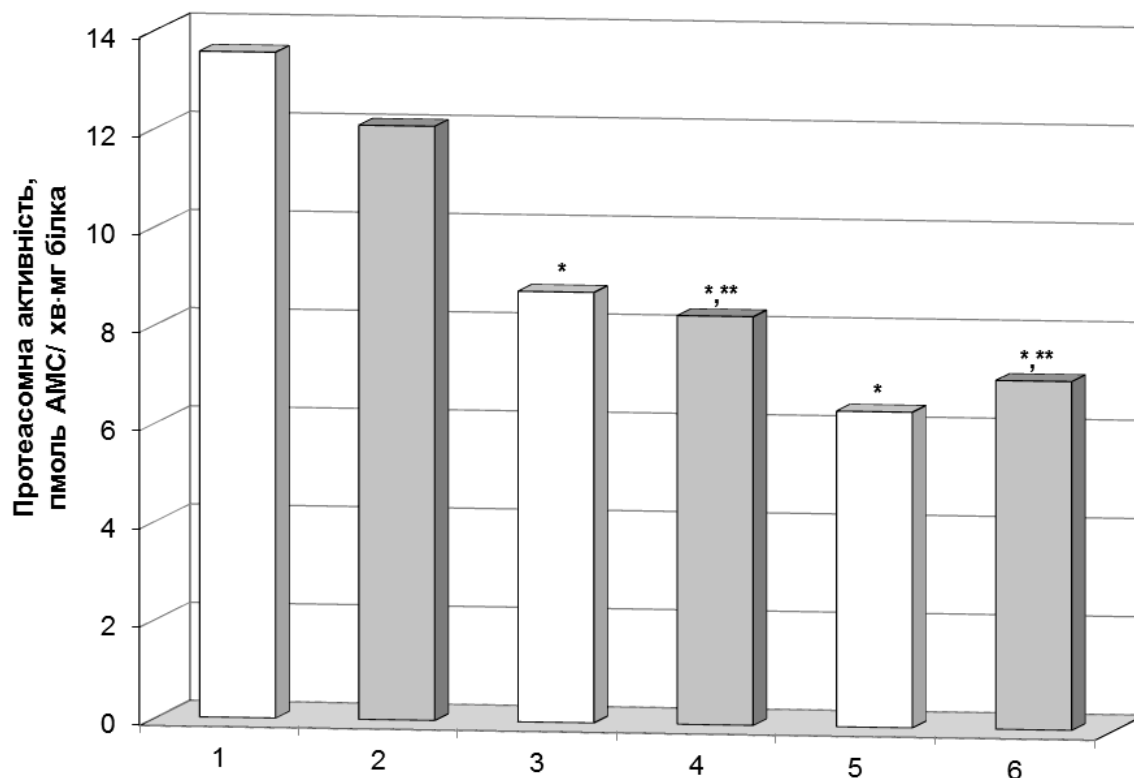


Рис.6.8 Протеасомна активність у лімфоцитах тимусу щурів через 3 год за дії іонізуючої радіації та на фоні введення інозину: 1 – контроль; 2 – контроль + інозин; 3 – опромінення в дозі 1,0 Гр; 4 - опромінення в дозі 1,0 Гр + інозин; 5 – опромінення в дозі 7,78 Гр; 6 – опромінення в дозі 7,78 Гр + інозин;
* – достовірно відносно контролю
** – достовірно відносно контролю на фоні введення інозину
 $p < 0,05$

За даними Vugmeyster Y. et al [324] на моделі клітинної лінії тимоцитів щурів показано підвищення рівня протеолітичної активності, що уможлиблюється протеолітичним процесом деубіквітинуючого ферменту NAUSP каспазою-3. Проте згідно з [325] індукція апоптозу дексаметазоном спричиняє зниження протеасомної активності тимоцитів щурів.

Встановлено, що в лімфоцитах селезінки щурів рівень протеасомної активності в контролі є дещо вищим (в 1,4 раза), ніж в лімфоцитах тимусу

можливо з урахуванням імунопротеасомної функції у представленні процесованого антигенного пептиду у комплексі з молекулою МНС I [326].

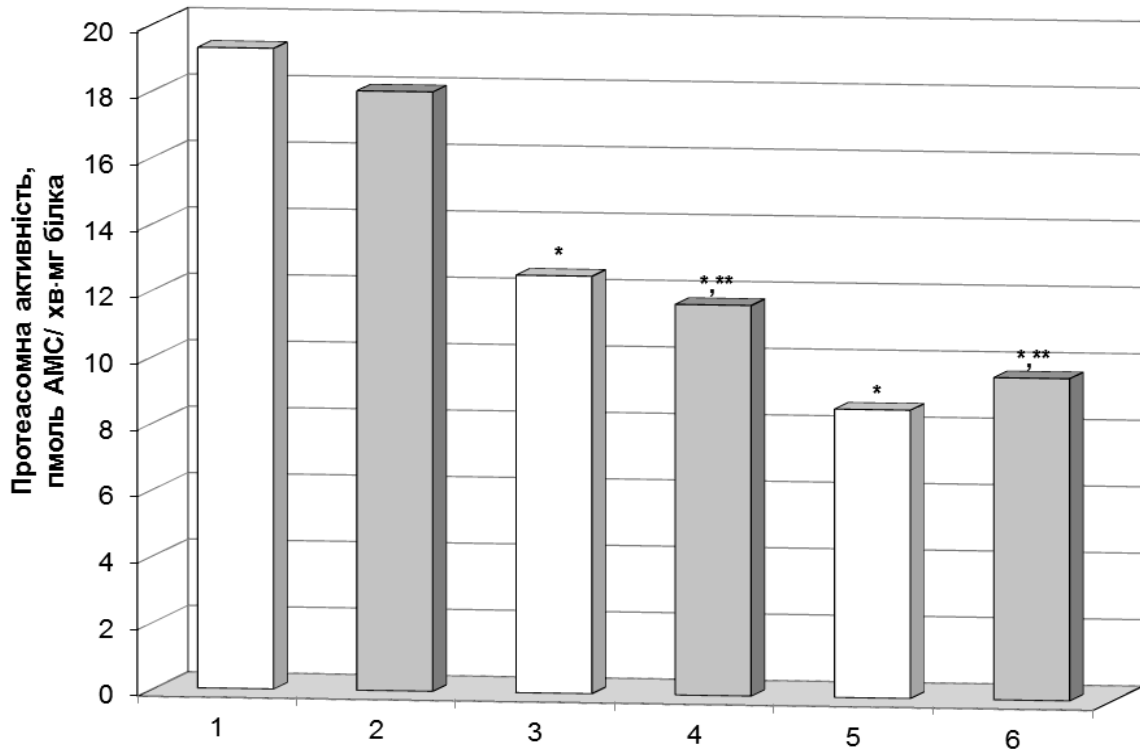


Рис.6.9. Протеасомна активність у лімфоцитах селезінки щурів через 30 хв за дії іонізуючої радіації та на фоні введення інозину: 1 – контроль; 2 – контроль + інозин; 3 – опромінення в дозі 1,0 Гр; 4 - опромінення в дозі 1,0 Гр + інозин; 5 – опромінення в дозі 7,78 Гр; 6 – опромінення в дозі 7,78 Гр + інозин;
* – достовірно відносно контролю
** – достовірно відносно контролю на фоні введення інозину
 $p < 0,05$

Дослідження впливу променевого чинника на популяцію лімфоцитів селезінки показало тенденцію до зниження протеасомної активності дозо- та часозалежним чином (рис.6.9, 6.10). Так, через 30 хв після опромінення (рис.6.9) відмічається зниження протеасомної активності в 1,5 та 2,2 раза за дози 1,0 та 7,78 Гр, відповідно. На більш віддаленому терміні (через 3 год) нами відмічено інгібування активності протеасоми відповідно в 1,3 та 1,78 раза за опромінення в дозах 1,0 та 7,78 Гр (рис.6.10).

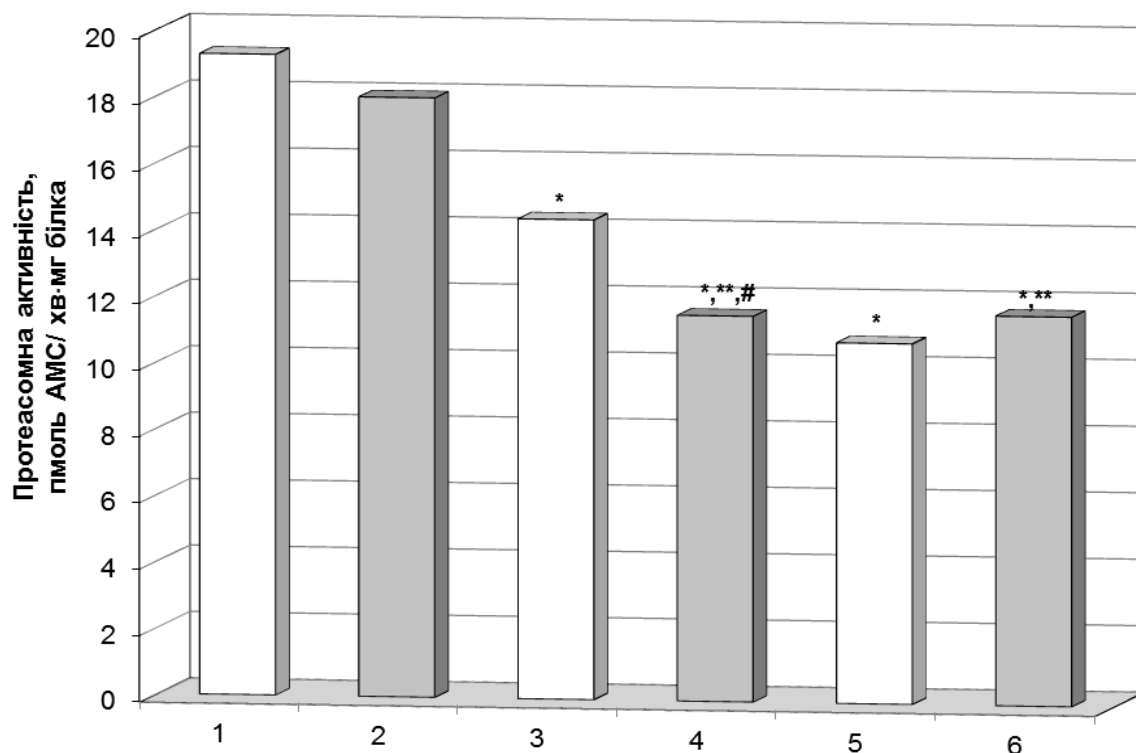


Рис.6.10. Протеасомна активність у лімфоцитах селезінки щурів через 3 год за дії іонізуючої радіації та на фоні введення інозину: 1 – контроль; 2 – контроль+інозин; 3 – опромінення в дозі 1,0 Гр; 4 - опромінення в дозі 1,0 Гр +інозин; 5 – опромінення в дозі 7,78 Гр; 6 – опромінення в дозі 7,78 Гр+ інозин;
 * – достовірно відносно контролю
 ** – достовірно відносно контролю на фоні введення інозину
 $p < 0,05$

Важливо відмітити, що виявлене нами зниження протеасомної активності у популяціях лімфоцитів селезінки і тимусу щурів за тотального рентгенівського опромінення може бути причиною дисрегуляції численних шляхів реалізації радіаційно-індукованого апоптозу. Так, XIAP блокує роботу каспази-3, в тому числі і за рахунок його E3-лігазної активності, що унеможливорюється за інгібування активності протеасом [327]. До регуляторних механізмів функціонування протеасоми належить фосфорилування, полі(ADP)рибозилування, зниження рівня якого (розділ 3) може призвести до значного зменшення ферментативної активності. На

думку Pervan M. [328] трактуванням даних по механізмам процесів, які відбуваються в опромінених клітинах, незважаючи на високий рівень убіквітинованих білків та зниження швидкості деградаційного протеасом-опосередкованого процесу, є зниження активності АТФ-опосередкованої 19S субодиниці протеасоми.

Вплив інозину на систему протеасоми за дії радіаційного чинника (часткове підвищення активності) можливо пояснити за рахунок відновлення певного рівня АТФ. Регуляторні механізми функціонування протеасом опосередковуються за умови їх власного протеолізу [329].

Залученням активованої каспази-3 у деградацію як регуляторної, так і каталітичної субодиниць протеасоми [330], також уможливлення лізосомально-опосередкованої деградації протеасоми [331], може бути підставою для інтерпретації отриманих нами результатів досліджень, представлених у розділах 3 і 6.

Можливий механізм регуляції протеасомної активності за впливу іонізуючої радіації полягає у стані редокс-балансу, порушення якого відмічено за умов радіаційно-опосередкованого оксидативного стресу. Згідно з роботами [332,333], вірогідне підвищення АКМ та активних метаболітів азоту призводить до зниження активності протеасоми, що є ще одним доказом для доведення гіпотези про визначальну роль окисно-відновлювального гомеостазу на рівні регуляторної мережі відповіді клітин на дію радіаційного чинника.

Як висновок розділу можна відмітити, що показана нашими експериментальними дослідженнями зміна ферментативної активності основних класів цистеїнових некаспазних протеїназ: калпаїнів, лізосомальних катепсинів та протеасомної системи на початкових етапах розвитку радіаційно-обумовленої клітинної загибелі (опромінення в дозі 1,0 та 7,78 Гр) вказує на комплексний характер індукції апоптозу у лімфоцитах

тимусу та селезінки щурів, зокрема, на участь рецептор-залежного, мітохондріального та лізосомально-опосередкованого сигнальних каскадів.

Визначально, що на основі отриманих результатів можна стверджувати, що регуляція процесів протеолітичної активності в рамках нашої експериментальної моделі є залежною від редокс-стану клітини (розділ 7). Висунута Ogawa Y. гіпотеза "H₂O₂ effect" дає можливість, з одного боку, інтерпретувати наші дані, з іншого— сприяє пошуку засобів модуляції радіаційно-індукованих порушень за умов опосередкованого оксидативним стресом апоптозу.

РОЗДІЛ 7

ОКСИДАТИВНИЙ СТРЕС ЯК МАРКЕР ІНІЦІАЦІЇ І РЕАЛІЗАЦІЇ РАДІАЦІЙНО-ІНДУКОВАНОГО АПОПТОЗУ

Процеси біологічного окиснення за вільнорадикальним механізмом є невід'ємною частиною метаболічних перетворень у клітинах живих організмів. В результаті окисних процесів відбувається утворення нестійких продуктів— активних кисневих метаболітів (АКМ) O_2^\bullet , H_2O_2 , OH^\bullet , HO_2^\bullet та інші, які мають досить короткий час напівжиття та високу реакційну здатність.

За фізіологічних умов спостерігається метаболічна генерація на незначному рівні АКМ, активних метаболітів азоту (NO, пероксинітриту), які виконують сигнальну функцію, спрямовану на регуляторні процеси імунної системи, кровотворної та ендокринної систем [335].

До клітинних продуцентів АКМ (метаболічні учасники процесу) належать НАДФН-оксидаза (NOX), цитохром p450, ксантинооксидаза та ліпоксигеназа і циклооксигеназа, NO-синтаза та електронно-транспортний ланцюг мітохондрій. На особливу роль заслуговують процеси, пов'язані з функціонуванням системи мітохондріально-опосередкованого окисного фосфорилування з залученням транспорту електронів по дихальному ланцюгу. Нестійкі АКМ, що виникають у ході цього універсального процесу, через можливий «витік» з системи транспорту електронів, можуть відігравати роль ініціаторів процесу неферментативного пероксидного окислення (ПО), особливо при прискоренні окислювального фосфорилування [336;337]. Водночас мітохондрії є високоспецифічною мішенню для деструкційного впливу АКМ.

Вільнорадикальний гомеостаз клітин і тканин забезпечується узгодженням між системами генерації АКМ, з одного боку, та системами їх

елімінації, з іншого, а також залежить від певної буферної ємності прооксидантних та антиоксидантних систем [338].

Одним із патогенетичних наслідків радіаційного ураження організму є оксидативний стрес, який розвивається у відповідь на порушення збалансованого функціонування прооксидантної й антиоксидантної систем. За дії іонізуючої радіації різко зростає генерація активних кисневих метаболітів, здатних ушкоджувати важливі біологічні структури, на клітинному рівні ними є плазматичні мембрани, мембрани мітохондрій, ядра та лізосом, ядерний та мітохондріальний геном, порушення функціонування ЕПР; на молекулярному рівні ушкоджень зазнають білки, ліпіди, нуклеїнові кислоти, глікозаміноглікани [339].

Узагальнення сучасних теорій про залучення АКМ та системи вільнорадикального окислення в цілому на активацію та перебіг радіаційно-індукованого апоптозу привело до створення так званої киснево-перекисної концепції апоптозу [340]. Складність та специфіка визначення ролі оксидативного стресу в параметрах вищенаведеної концепції пов'язана з уможливленням комплексної оцінки формуванням структурних ушкоджень і модифікації шляхів сигналювання в регуляторних мережах відповіді клітини за неметаболічного утворення радіаційно-індукованих радикалів кисню вздовж треків іонізації на ранніх етапах дії радіаційного чинника, так і подальшого метаболічного накопичення АКМ. Нашими дослідженнями різних ланок радіаційно-індукованого апоптозу та можливістю залучення оксидативного стресу у шляхи його реалізації (розділи 3,4,5,6,8,9) доповнюється загальна теорія, що пов'язує внутрішньоклітинний оксидативний стрес і апоптоз.

Даний розділ присвячено вивченню інтенсивності вільнорадикальних процесів та систем антиоксидантного захисту в лімфоцитах тимусу і селезінки щурів за дії рентгенівського опромінення та на фоні введення інозину.

7.1 Вміст продуктів перекисного окиснення ліпідів у лімфоцитах тимусу і селезінки щурів за дії іонізуючої радіації та на фоні введення інозину

Найбільш ефективно вільнорадикальні реакції окиснення розвиваються в ліпідвмісних структурах, насамперед у біологічних мембранах, зокрема, при впливі іонізуючої радіації. Цитотоксична дія активних кисневих метаболітів проявляється в інтенсифікації процесів ПОЛ у біологічних мембранах, ушкодженні мембранозв'язаних білків, інактивації мембранних ферментів та регуляторних білків [341, 342, 343, 344, 345].

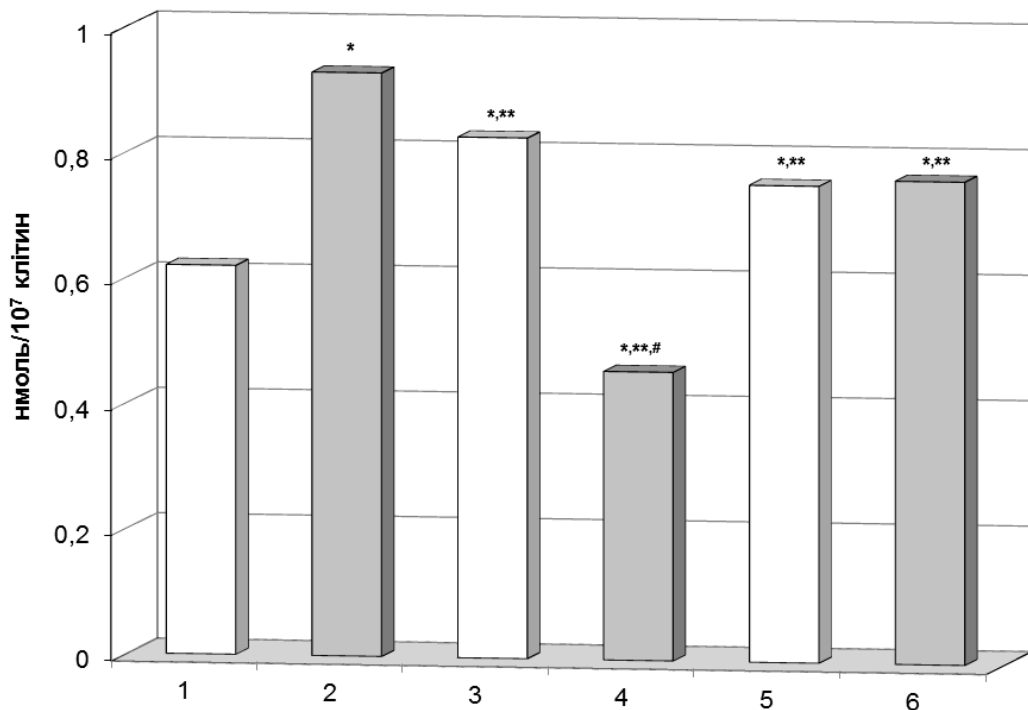


Рис. 7.1. Вміст ТБК-активних продуктів у лімфоцитах тимусу щурів через 30 хв за дії іонізуючої радіації та на фоні введення інозину: 1 – контроль; 2 – контроль+інозин; 3 – опромінення в дозі 1,0 Гр; 4 – опромінення в дозі 1,0 Гр +інозин; 5 – опромінення в дозі 7,78 Гр; 6 – опромінення в дозі 7,78 Гр+інозин
* – достовірно відносно контролю,
** – достовірно відносно контролю на фоні введення інозину,
– достовірно відносно відповідних опромінених груп,
 $p < 0,05$

Саме ступінь ПОЛ вважається інтегральним показником за опосередкованого іонізуючою радіацією ушкодженні клітин на фоні дисбалансу окисно-антиоксидантної рівноваги [346, 347].

Про радіаційно-обумовлене порушення ліпідного складу мембран може свідчити накопичення продуктів перекисного окислення ліпідів, зокрема малонового діальдегіду (МДА) та його похідних, визначення яких проводять з використанням тіобарбітурової кислоти (ТБК). Згідно з нашими експериментальними дослідженнями, у лімфоцитах тимусу щурів через 30 хв після опромінення тварин в дозах 1,0 Гр та 7,78 Гр вміст ТБК-активних продуктів зростав в 1,4 та 1,2 раза, відповідно (рис. 7.1).

Необхідно відмітити, що введення інозину до опромінення тварин в обох досліджуваних дозах справляє нормалізуючий ефект за рахунок зниження кількості продуктів пероксидації ліпідів майже вдвічі за дози 1,0 Гр та зберігаючи таку ж тенденцію за опромінення в дозі 7,78 Гр (рис. 7.1). На більш пізньому терміні, (через 3 год після рентгенівського опромінення) встановлено зростання рівня ТБК-активних продуктів у лімфоцитах тимусу в 1,2 та 1,6 раза за опромінення в дозах 1,0 та 7,78 Гр, відповідно.

Нормалізуючий ефект інозину відмічається за обох доз опромінення, але за дози 7,78 Гр на фоні найбільш вираженої інтенсифікації пероксидації в лімфоцитах тимусу щурів показник рівня ТБК-активних продуктів знижується в 1,7 разів (рис.7.2).

Згідно з даними літератури [348, 349] показано, що після загального γ -опромінення щурів в дозі 8,0 Гр має місце накопичення ТБК-активних продуктів в різних органах щурів, але найбільші зміни було виявлено в радіочутливих органах – тимусі, селезінці та кістковому мозку. Автори припускають, що ТБК-активні продукти, які утворюються в тканинах, виходять у плазму і можуть спричиняти вторинну хвилю активації пероксидації.

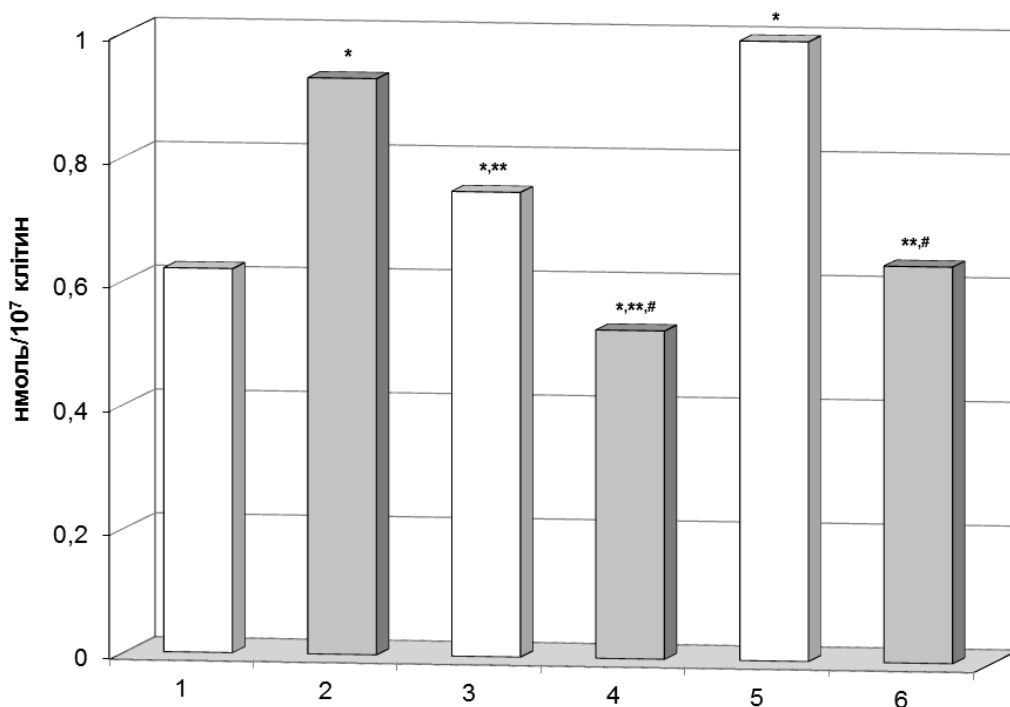


Рис. 7.2 Вміст ТБК-активних продуктів у лімфоцитах тимусу щурів через 3 год за дії іонізуючої радіації та на фоні введення інозину: 1 – контроль; 2 – контроль+ інозин; 3 – опромінення в дозі 1,0 Гр; 4 – опромінення в дозі 1,0 Гр + інозин; 5 – опромінення в дозі 7,78 Гр; 6 – опромінення в дозі 7,78 Гр + інозин
 * – достовірно відносно контролю,
 ** – достовірно відносно контролю на фоні введення інозину,
 # – достовірно відносно відповідних опромінених груп,
 $p < 0,05$

Дослідження рівня ТБК-активних продуктів у лімфоцитах селезінки щурів через 30 хв (рис. 7.3) після рентгенівського опромінення показало достовірне підвищення і тенденцію до нього за опромінення в дозах 1,0 та 7,78 Гр, відповідно. Водночас через 3 год після дії променевого чинника вміст ТБК-активних продуктів у лімфоцитах селезінки щурів незначно підвищувався - в 1,2 раза порівняно з контролем лише за дози опромінення 1,0 Гр. Показане нами зниження вмісту ТБК-активних продуктів порівняно з контрольною величиною на третю годину після опромінення може бути обумовлено зменшенням кількості реакційно-здатних радикалів внаслідок залучення як ферментативної, так і неферментативної ланок

антиоксидантної системи захисту, чи може бути результатом подальшого перетворення МДА, з одного боку, на малонову кислоту, з іншого,- на шифові основи внаслідок його взаємодії з ϵ -аміногрупами білків [350,351].

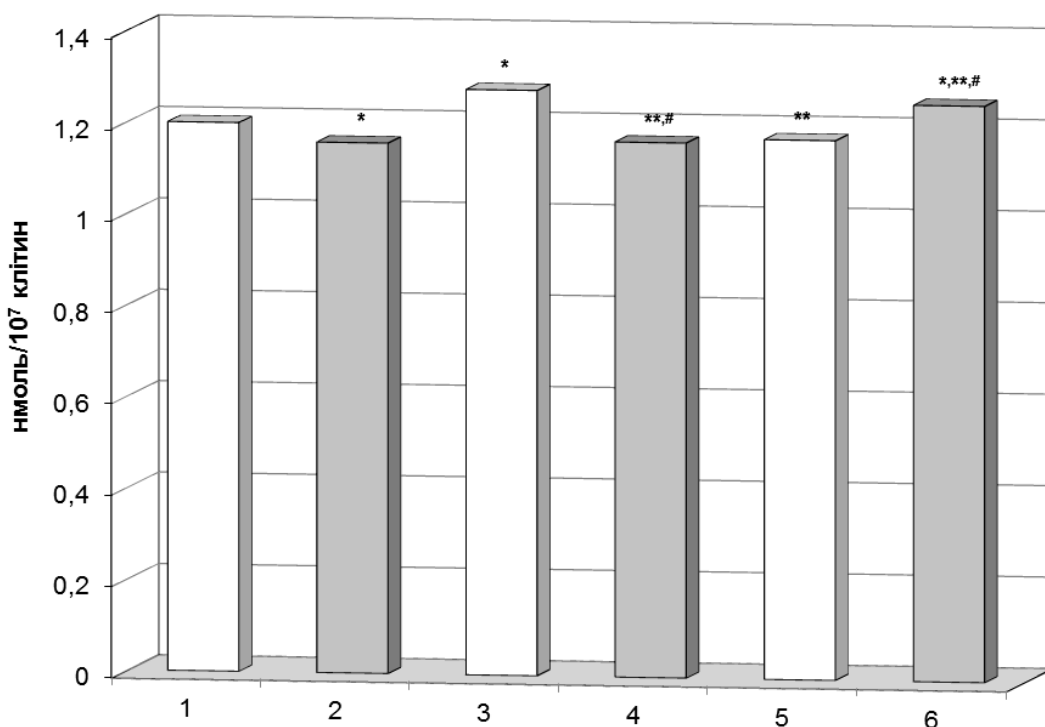


Рис. 7.3. Вміст ТБК-активних продуктів у лімфоцитах селезінки щурів через 30 хв за дії іонізуючої радіації та на фоні введення інозину: 1 – контроль; 2 – контроль+інозин; 3 – опромінення в дозі 1,0 Гр; 4 – опромінення в дозі 1,0 Гр +інозин; 5 – опромінення в дозі 7,78 Гр; 6 – опромінення в дозі 7,78 Гр+інозин
* – достовірно відносно контролю,
** – достовірно відносно контролю на фоні введення інозину,
– достовірно відносно відповідних опромінених груп,
 $p < 0,05$

Останні дестабілізують мембрани та сприяють деструкції клітин. МДА може модифікувати ліпіди мембран, порушуючи їх плинність, та дезінтегрувати мембранно-асоційовані процеси в цілому. В реакції МДА з молекулою ДНК утворюються ДНК- аддукти, в першу чергу мутагенний M1G [352].

Отримані нами дані корелюють з результатами, які вказують, що за дії рентгенівського опромінення в невисоких дозах 0,5-1,0 Гр в імунокомпетентних клітинах селезінки та тимусу щурів має місце виражена

активація пероксидного окиснення ліпідів. Автори відмітили [353]. збільшення вмісту ТБК-активних продуктів в два рази через добу після опромінення в дозі 0,5 Гр; при збільшенні дози до 1,0 Гр рівень ТБК-активних продуктів в лімфоцитах селезінки збільшується з першої по шосту добу, а в тимоцитах – з першої по третю добу з максимальним значенням на третю добу. Активація пероксидного окиснення ліпідів в лімфоцитах селезінки та тимусу вказує, на думку авторів, на порушення антиоксидантної системи цих клітин.

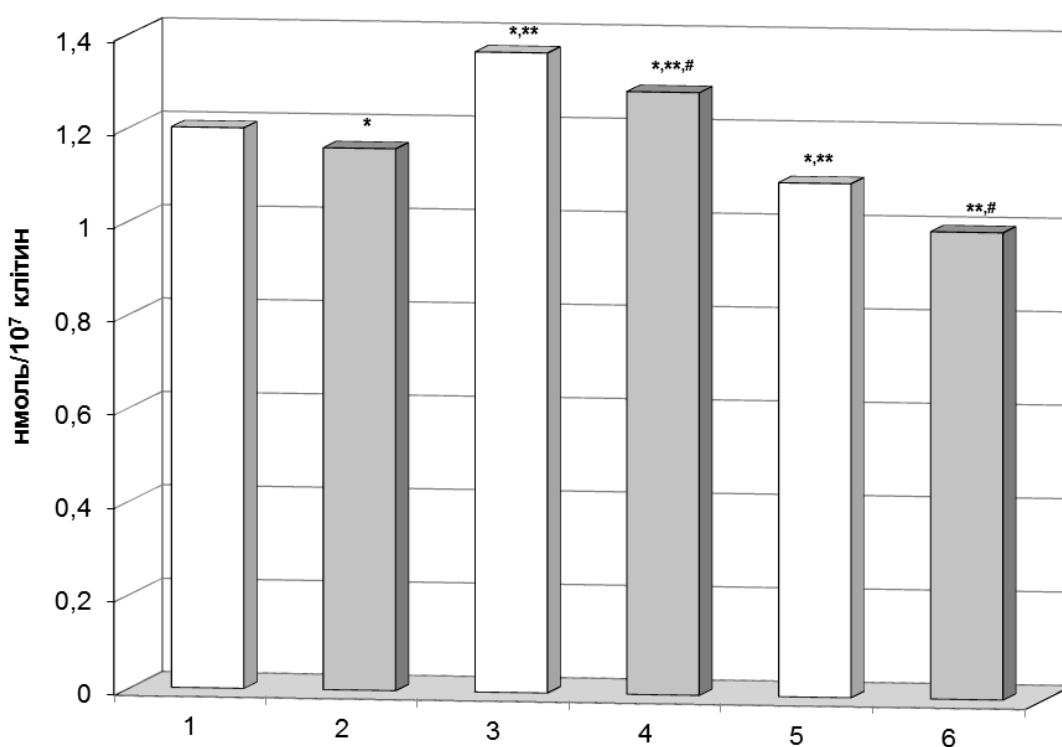


Рис. 7.4. Вміст ТБК-активних продуктів у лімфоцитах селезінки щурів через 3 год за дії іонізуючої радіації та на фоні введення інозину: 1 – контроль; 2 – контроль+інозин; 3 – опромінення в дозі 1,0 Гр; 4 – опромінення в дозі 1,0 Гр +інозин; 5 – опромінення в дозі 7,78 Гр; 6 – опромінення в дозі 7,78 Гр+інозин
* – достовірно відносно контролю,
** – достовірно відносно контролю на фоні введення інозину,
– достовірно відносно відповідних опромінених груп,
 $p < 0,05$

Аналізуючи наведені дані щодо впливу інозину на вміст вторинних продуктів ПОЛ, зокрема малонового діальдегіду, в лімфоцитах тимусу і селезінки щурів, які зазнали променевого ураження, можна зробити висновок, що введення препарату до опромінення в основному сприяє зниженню кількості продуктів перекисного окислення ліпідів певних опромінених груп, хоча залишає її незначно збільшеною порівняно з контролем.

7.2 Рівень генерування супероксидних аніон–радикалів у лімфоцитах тимусу і селезінки щурів за дії іонізуючої радіації та на фоні введення інозину

Численні класи АКМ об'єднує їх висока реакційна здатність та надзвичайна нестабільність, що наводить на думку про їх локальну дію. У літературі останніх років значна увага приділяється дослідженню ролі активних кисневих метаболітів в ініціації та розвитку радіаційно-індукованого апоптозу у лімфоїдних клітинах. На сьогодні у роботах ряду вчених [354,355] показано, що один з механізмів реалізації пошкоджуючого ефекту іонізуючої радіації полягає у посиленому утворенні у водних і ліпідних фазах клітини вільних радикалів, здатних стимулювати процеси вільнорадикального окислення. Присутність кисню у внутрішньоклітинному середовищі сприяє збільшенню виходу АКМ і, відповідно, підсиленню радіаційного ефекту.

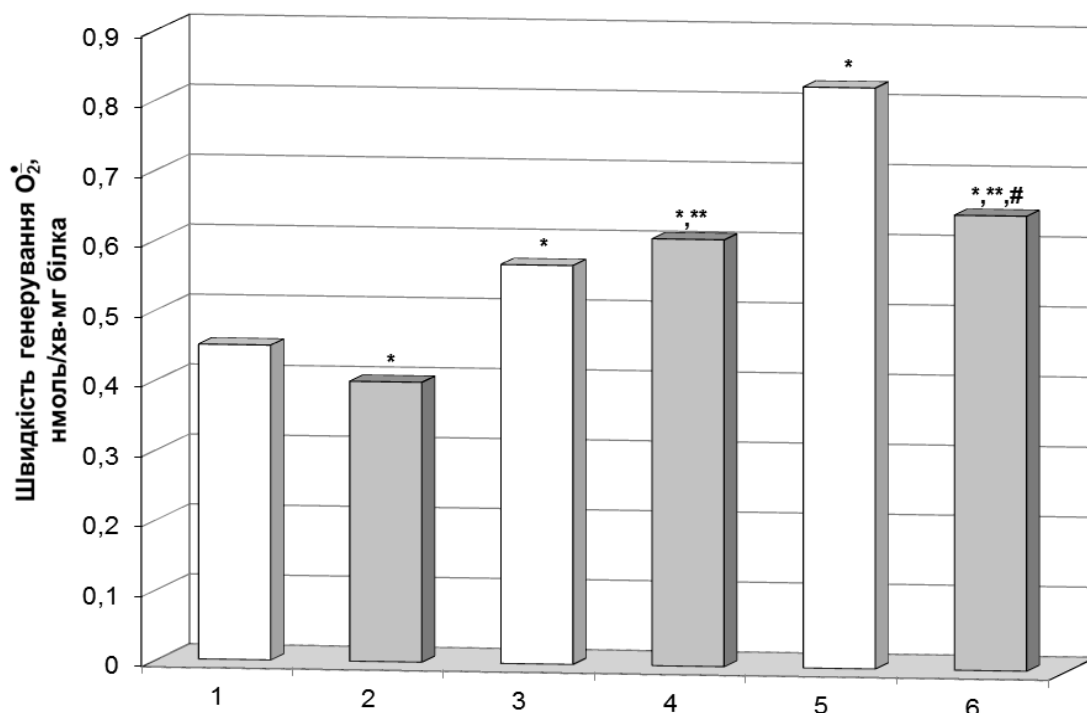


Рис.7.5 Швидкість генерування супероксидних радикалів у лімфоцитах тимусу щурів через 30 хв за дії іонізуючої радіації та на фоні введення інозину: 1 – контроль; 2 – контроль + інозин; 3 – опромінення в дозі 1,0 Гр; 4 – опромінення в дозі 1,0 Гр + інозин; 5 – опромінення в дозі 7,78 Гр; 6 – опромінення в дозі 7,78 Гр+ інозин
 * – достовірно відносно контролю,
 ** – достовірно відносно контролю на фоні введення інозину,
 # – достовірно відносно відповідних опромінених груп,
 $p < 0,05$

Оскільки первинним АКМ майже у всіх оксирадикалгенеруючих системах виступає продукт одноелектронного відновлення кисню – супероксидний аніон-радикал, ми проводили дослідження його рівня у лімфоїдних клітинах тимусу і селезінки щурів за променевого ураження. Згідно з даними літератури [356] $O_2^{\bullet -}$ має невисокі відновні і окисні властивості, проте є досить стабільним, дифундує на досить значні відстані та може проникати через цитоплазматичну і внутрішньоклітинні мембрани.

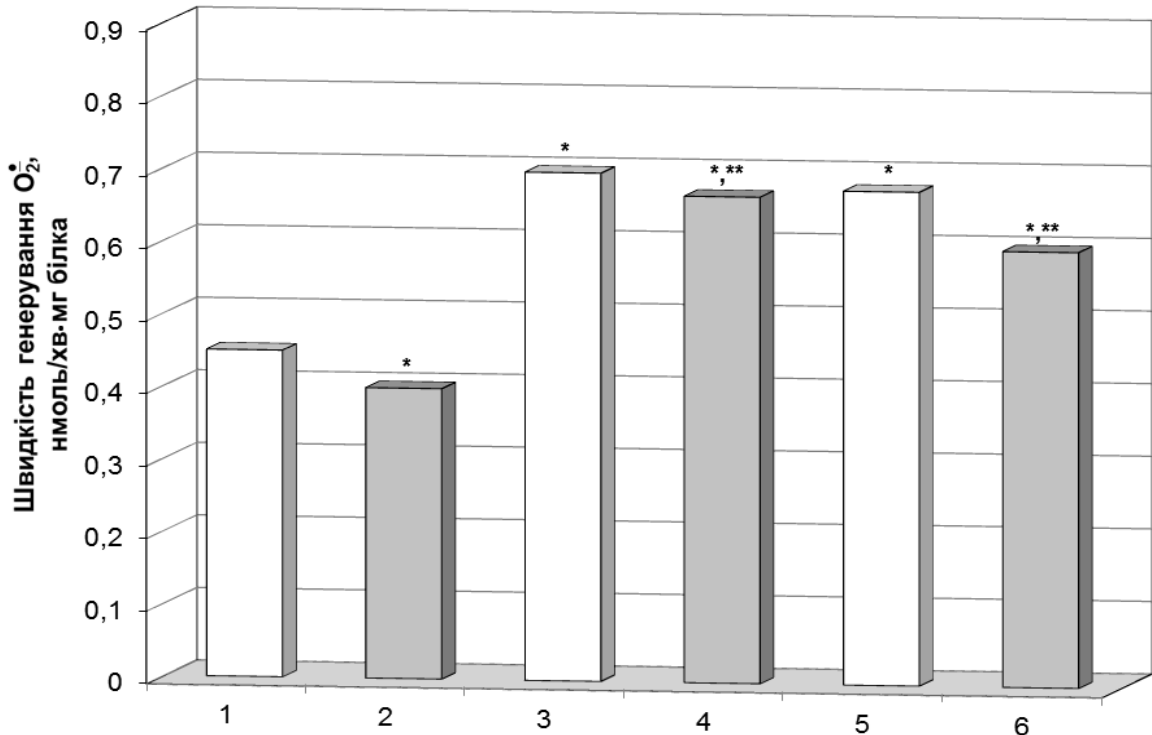


Рис.7.6 Швидкість генерування супероксидних радикалів у лімфоцитах тимусу щурів через 3 год за дії іонізуючої радіації та на фоні введення інозину: 1 – контроль; 2 – контроль+інозин; 3 – опромінення в дозі 1,0 Гр; 4 – опромінення в дозі 1,0 Гр +інозин; 5 – опромінення в дозі 7,78 Гр; 6 – опромінення в дозі 7,78 Гр+інозин
 * – достовірно відносно контролю,
 ** – достовірно відносно контролю на фоні введення інозину,
 # – достовірно відносно відповідних опромінених груп,
 $p < 0,05$

Згідно з даними, представленими на рис.7.5-7.6, при дії на тварин іонізуючої радіації в дозах 1,0 Гр та 7,78 Гр спостерігається посилення генерування супероксидних аніон-радикалів у лімфоцитах тимусу. Так, через 3 год після загального опромінення щурів в дозі 1,0 Гр рівень генерування $O_2^{\bullet-}$ зростав на 24% порівняно з контрольним значенням. При підвищенні дози опромінення до 7,78 Гр відбувається подальше зростання швидкості генерування супероксидних радикалів у 1,8 раза. У лімфоїдних клітинах селезінки (рис.7.7-7.8) також має місце зростання рівня генерування $O_2^{\bullet-}$ у 1,3 раза за дії на щурів променевого чинника в дозі 1,0 Гр, в той час як за умови радіаційного впливу у летальній дозі статистично вірогідних змін

внутрішньоклітинного вмісту супероксиду виявлено не було – швидкість генерування O_2^{\bullet} залишалася у межах контрольних значень.

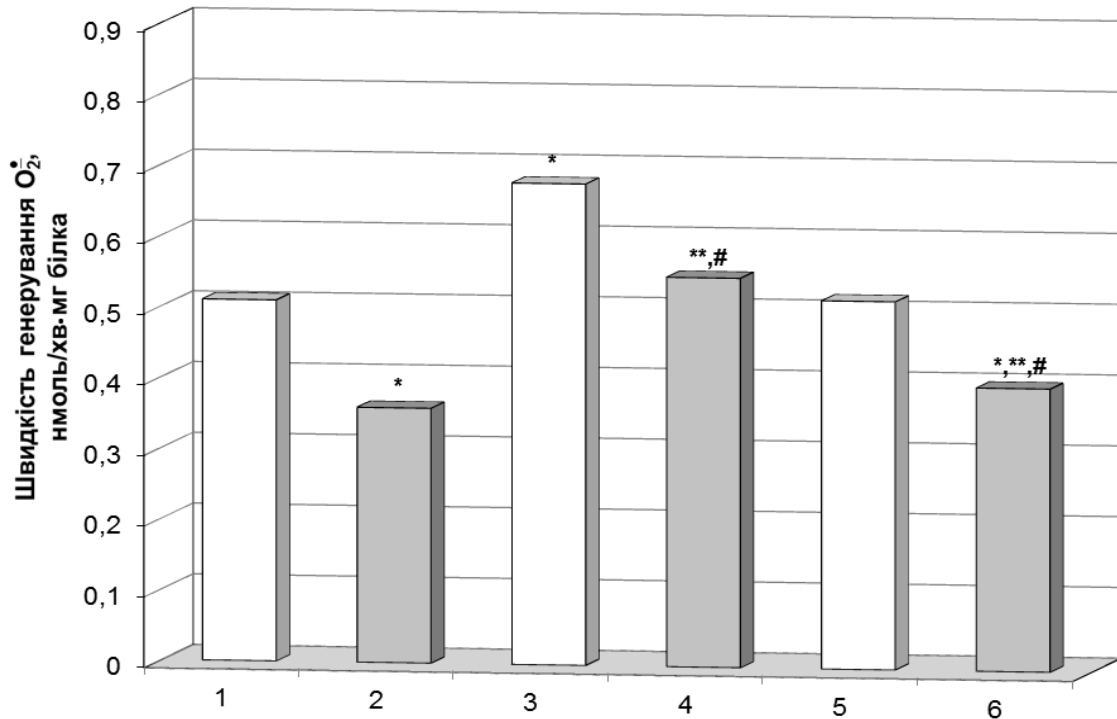


Рис.7.7. Швидкість генерування супероксидних радикалів у лімфоцитах селезінки щурів через 30 хв за дії іонізуючої радіації та на фоні введення інозину: 1 – контроль; 2 – контроль+інозин; 3 – опромінення в дозі 1,0 Гр; 4 – опромінення в дозі 1,0 Гр +інозин; 5 – опромінення в дозі 7,78 Гр; 6 – опромінення в дозі 7,78 Гр+інозин
* – достовірно відносно контролю,
** – достовірно відносно контролю на фоні введення інозину,
– достовірно відносно відповідних опромінених груп,
 $p < 0,05$

Підвищення рівня O_2^{\bullet} може свідчити про радіаційно-обумовлену дискоординацію клітинного метаболізму внаслідок порушення функціонування систем продукування та утилізації вільних радикалів. З огляду на те, що одним з можливих джерел утворення АКМ, зокрема O_2^{\bullet} , у тканинах організму є електронтранспортний ланцюг мітохондрій, відмічене в умовах нашого експерименту зростання рівня супероксидного аніон-радикалу може бути пов'язано з радіаційним ураженням функцій

мітохондріальної цитохром-с-оксидази, що при одночасній активації ферменту сукцинатдегідрогенази супроводжується посиленням генерування O_2^{\bullet} [357]. А оскільки мітохондрії є органелами, чутливими до дії АКМ, така метаболічна ситуація, з одного боку, призводить до пригнічення реакцій синтезу АТФ і, як наслідок, до виснаження у клітинах фонду макроергу, а з іншого- сприяє порушенню структурної цілісності мітохондріальної мембрани, дислокації у цитоплазму апоптогенних чинників та надходженню до клітини вільних радикалів [358].

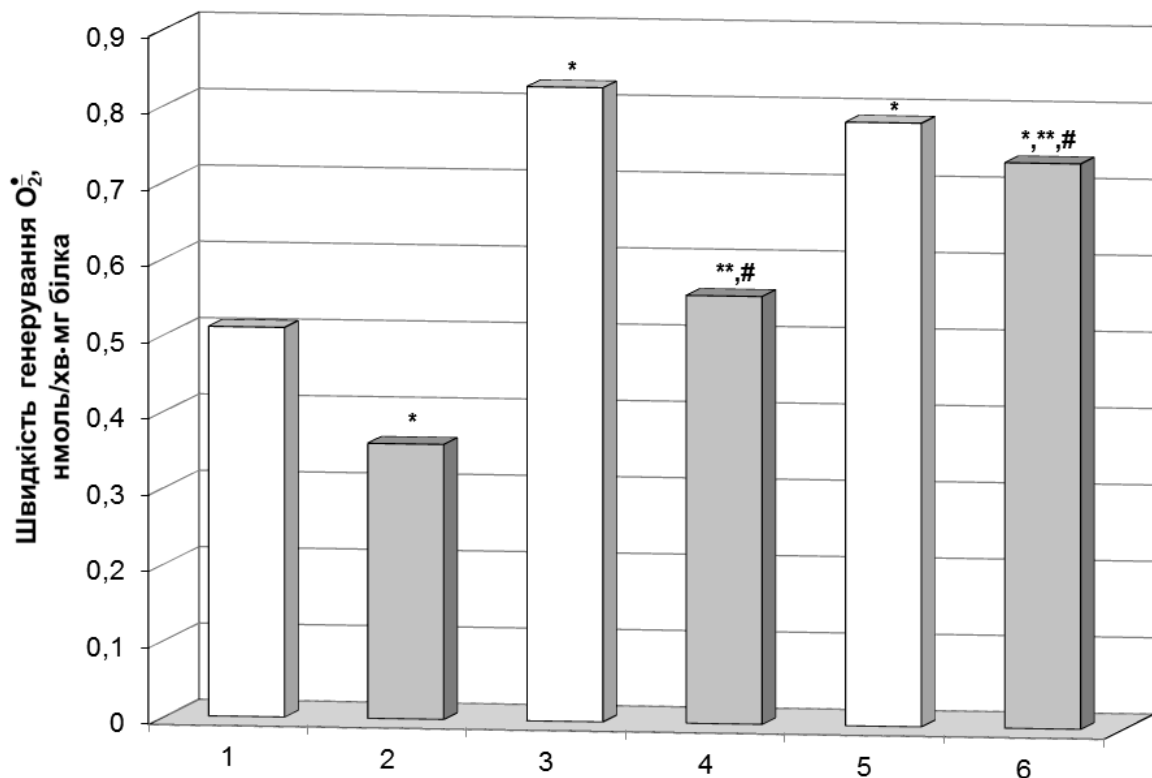


Рис.7.8. Швидкість генерування супероксидних радикалів у лімфоцитах селезінки шурів через 3 год за дії іонізуючої радіації та на фоні введення інозину: 1 – контроль; 2 – контроль+інозин; 3 – опромінення в дозі 1,0 Гр; 4 – опромінення в дозі 1,0 Гр +інозин; 5 – опромінення в дозі 7,78 Гр; 6 – опромінення в дозі 7,78 Гр+інозин
 * – достовірно відносно контролю,
 ** – достовірно відносно контролю на фоні введення інозину,
 # – достовірно відносно відповідних опромінених груп,
 $p < 0,05$

Вагома роль у зростанні клітинної продукції O_2^{\bullet} належить стимуляції ксантиноксидазної реакції. З іншого боку, оскільки початкові етапи пероксидації ліпідів супроводжуються інтенсивним продукуванням АКМ, в тому числі і O_2^{\bullet} , показане нами зростання рівня останнього у лімфоїдних клітинах радіочутливих органів може бути обумовлено активізацією реакцій ПОЛ, що узгоджується з результатами роботи [359].

Згідно з літературними даними, супероксидний аніон-радикал є потенційним джерелом більш реакційноздатних форм АКМ– синглетного кисню та гідроксильного радикалу, які утворюються внаслідок, відповідно, або спонтанної дисмутації аніон-радикалів, або їх залучення до реакції Хабера-Вайса.

У зв'язку з цим логічно припустити, що надмірна акумуляція у клітинах O_2^{\bullet} створює передумови для подальшої ініціації вільнорадикальних ланцюгових процесів. Водночас, оскільки супероксидний аніон-радикал належить до досить стабільних сполук, здатних дифундувати від місця утворення по аніонних каналах клітинних мембран, виникає загроза його проникнення до ядра та ураження структурної цілісності хроматину.

Отже, за дії рентгенівського випромінювання у лімфоїдних клітинах досліджуваних органів спостерігається зростання швидкості генерування супероксидних радикалів, що, враховуючи широкий спектр дії O_2^{\bullet} , обумовлює формування патобіохімічних механізмів посилення та реалізації радіаційних уражень критичних клітинних структур.

7.3. Ксантиноксидазна активність у лімфоцитах тимусу і селезінки щурів за дії іонізуючої радіації та на фоні введення інозину

Відомо, що значний внесок у функціонування прооксидантної ланки окислювального гомеостазу робить ферментна система ксантиноксидази,

хоча даних відносно її участі у механізмі реалізації пошкоджуючого ефекту іонізуючої радіації недостатньо. Загальновідомим прооксидантним представником цієї системи є ксантиноксидаза – один із ключових ферментів термінальної стадії катаболізму пуринів у ссавців.

На сьогодні відомо, що в клітинах фермент, залежно від умов функціонування, представлений двома відмінними формами – дегідрогеназною (КсД), для якої кінцевим акцептором електронів виступає НАД⁺ і оксидазною (КсО), коли функцію акцептора виконує молекулярний кисень [360,361]. Згідно з сучасними даними, за дії іонізуючого випромінювання дегідрогеназна форма КсО через ряд проміжних станів трансформується в оксидазну [362]. Характерною особливістю О-форми КсО є її здатність до одноелектронного відновлення кисню з утворенням супероксидного аніон-радикалу. Надлишок $O_2^{\bullet -}$ як безпосередньо, так і через утворення високореакційноздатного радикалу OH^{\bullet} та синглетного кисню сприяє ініціації ланцюгових вільнорадикальних реакцій у клітинах.

Враховуючи роль КсО у продукуванні вільних радикалів на наступному етапі досліджень ми оцінювали внесок даної ферментної системи у розвиток радіаційно-індукованої загибелі лімфоїдних клітин радіочутливих органів щурів. Оскільки, згідно з попередніми результатами і даними літератури, узгодження ряду метаболічних шляхів, в які залучені пурини, є більш пізньою подією за радіаційного-індукованого апоптозу, ми зосередили свою увагу на дослідженнях через 3 год після опромінення.

Через 3 год після опромінення тварин в досліджуваних дозах (1,0 та 7,78 Гр) спостерігається активація оксидазної форми ферменту (рис. 7.9). Нами показано статистично вірогідне зростання ксантиноксидазної активності у тимоцитах щурів у 2,3 раза за дії іонізуючої радіації в дозі 1,0 Гр. Відповідно до результатів, представлених на рис. 6.3, підвищення дози опромінення призводить до подальшої активації КсО і за дози 7,78 Гр активність ферменту зростала втричі. Одержані дані узгоджуються з

дослідженнями Антушевича А.Е. та співавт., які встановили підвищення активності КсО у лімфоцитах тимусу щурів у 3,5 раза за опромінення в дозі 7,5 Гр [363].

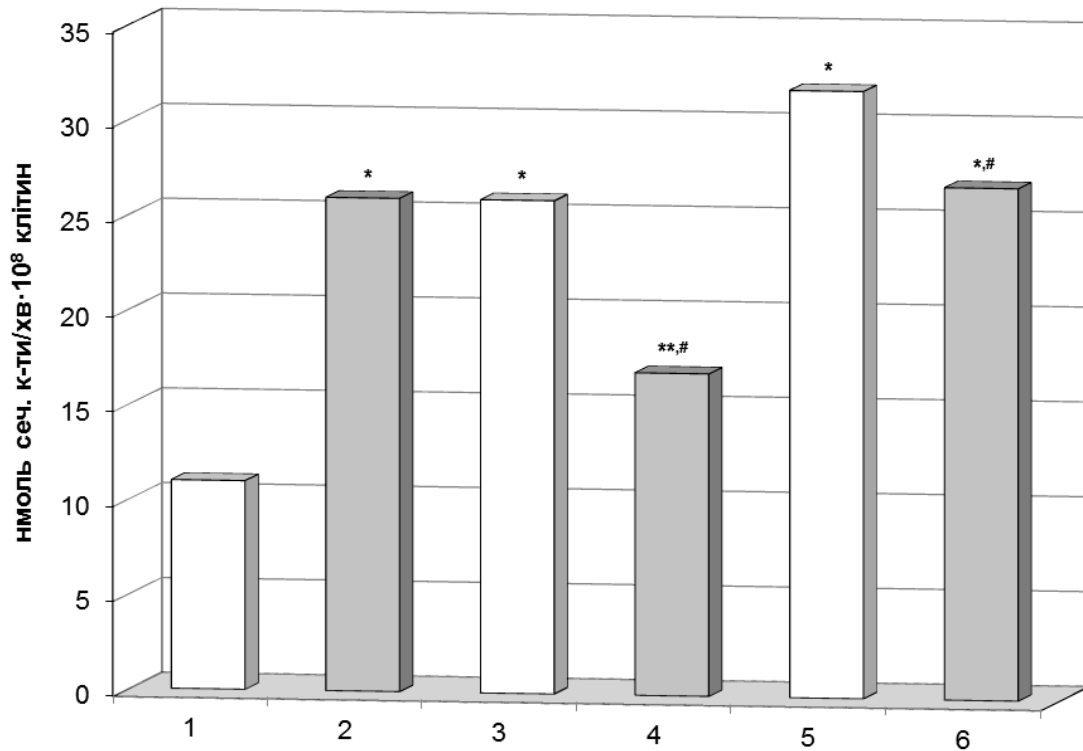


Рис. 7.9 Ксантиноксидазна активність у лімфоцитах тимусу щурів за дії іонізуючої радіації та на фоні введення інозину: 1 – контроль; 2 – контроль+інозин; 3 – опромінення в дозі 1,0 Гр; 4 – опромінення в дозі 1,0 Гр +інозин; 5 – опромінення в дозі 7,78 Гр; 6 – опромінення в дозі 7,78 Гр+інозин

* – достовірно відносно контролю,

** – достовірно відносно контролю на фоні введення інозину,

– достовірно відносно відповідних опромінених груп,

$p < 0,05$

Представлені дані по вивченню дії інозину на активність ферменту за опромінення тварин в дозах 1,0 і 7,78 Гр свідчать про певний нормалізуючий ефект препарату на досліджуваний показник порівняно з результатами за дії променевого чинника. Так, за радіаційного впливу на фоні попереднього введення інозину ферментативна активність КсО у тимоцитах достовірно знижувалася на 35% порівняно з активністю ферменту тварин, опромінених в дозі 1,0 Гр і на 16% за дії летальної дози. Подібний ефект інозину може бути

пояснений з позицій його нормалізуючого впливу на обмінні процеси клітини, зокрема на метаболізм пуринових нуклеотидів, нуклеозидів. Крім того, інгібуючи активність ферменту ПАРП, інозин сприяє збереженню внутрішньоклітинного рівня НАД⁺ (розділ 3), що поряд з встановленим нами фактом, що препарат здатен пригнічувати ПОЛ, а отже частково і накопичення АКМ, може розглядатись як ще один механізм, який попереджає трансформаційний перехід КсД → КсО.

В умовах нашого експерименту спостерігається підвищення сумарної ксантиноксидазної та ксантиндегідрогеназної активності у лімфоцитах тимусу у 1,3 та 1,5 раза відповідно при опроміненні щурів у дозах 1,0 Гр і 7,78 Гр (рис. 7.10). При цьому відсоток КсД від сумарної ферментативної активності знижується до 26% для дози 1,0 Гр та до 20% за опромінення в дозі 7,78 Гр.

Таким чином, іонізуюча радіація на фоні підвищення сумарної активності ферментів активізує процеси аеробного окиснення ксантину, стимулюючи конверсію Д-форми КсО в оксидазну форму. За даними літератури [364] цей трансформаційний перехід може бути зворотним, або незворотним залежно від модифікаційних змін у молекулі ферменту. При окисненні сульфгідрильних груп ферменту гальмується дегідрогеназна активність і ксантиноксидаза переходить в оксидазну форму, але при цьому ще можливе перетворення ферменту у Д-форму. Разом з тим відщеплення поліпептидного фрагменту від однієї з субодиниць супроводжується необоротною конверсією ферменту в О-форму [365]. Останнім часом особлива увага приділяється дослідженню ролі певних класів протеїназ, що здійснюють частковий протеоліз КсД. У роботі [366] постулюється участь у цьому переході протеази, локалізованої у міжмембранному просторі мітохондрій. Посилене генерування радикалу O_2^{\bullet} активує фосфоліпазу А₂,

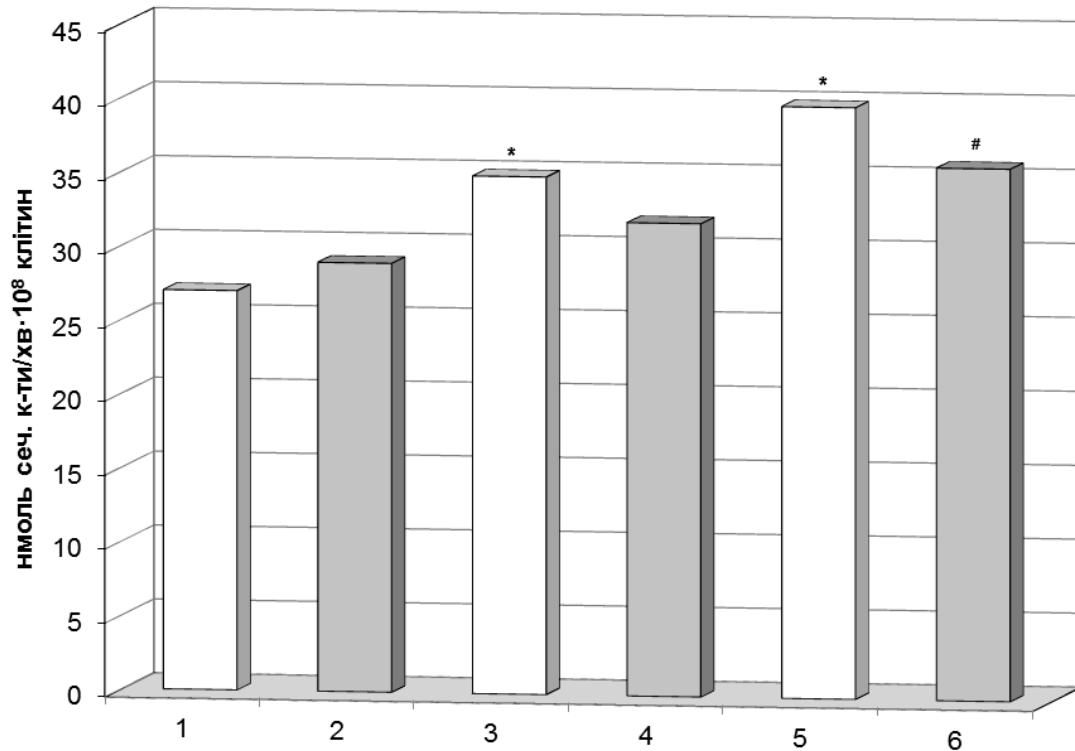


Рис.7.10 Сумарна ксантиноксидазна та ксантиндегідрогеназна активність у лімфоцитах тимусу щурів за дії іонізуючої радіації та на фоні введення інозину: 1 – контроль; 2 – контроль+інозин; 3 – опромінення в дозі 1,0 Гр; 4 – опромінення в дозі 1,0 Гр+інозин; 5 – опромінення в дозі 7,78 Гр; 6 – опромінення в дозі 7,78 Гр+інозин
* – достовірно відносно контролю,
** – достовірно відносно контролю на фоні введення інозину,
– достовірно відносно відповідних опромінених груп,
 $p < 0,05$

що призводить до змін ліпідного складу, порушення цілісності мітохондріальних мембран та вивільнення у цитоплазму клітини протеолітичних ферментів. Подібне твердження знаходить часткове підґрунття у роботі [367], де продемонстровано значне підвищення ксантиноксидазної активності у фракції структурних компонентів, збагаченої ядрами та мітохондріями.

У лімфоїдних клітинах селезінки дія іонізуючого випромінювання у дозі 1,0 Гр також викликає активацію прооксидантної форми ферменту, проте, як видно з рис. 7.11, зростання ксантиноксидазної менш виражено порівняно з активністю ферменту у тимусі за цієї ж дози радіації. Так,

активність КсО спленоцитів зростала у 1,2 раза відносно контрольного показника. Згідно з нашими даними, за умови дії рентгенівського випромінення в дозі 7,78 Гр статистично вірогідного підвищення активності КсО у спленоцитах виявлено не було. Активність ферменту залишалася у межах контрольного значення.

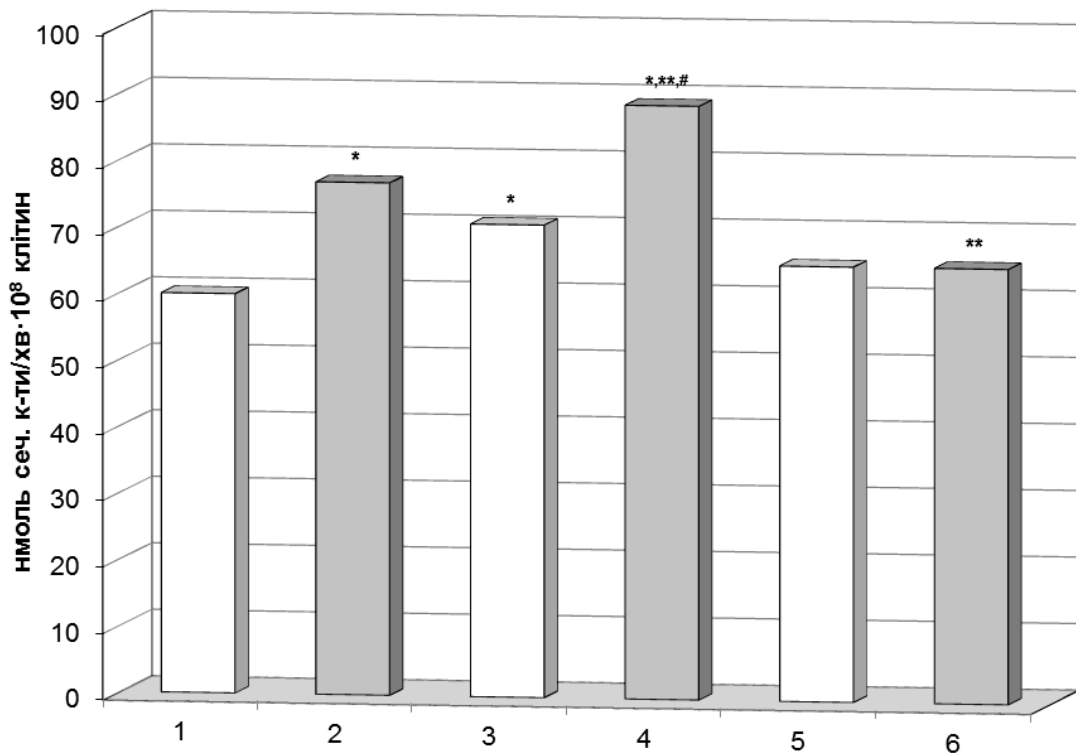


Рис.7.11 Ксантинооксидазна активність у лімфоцитах селезінки щурів за дії іонізуючої радіації та на фоні введення інозину: 1 – контроль; 2 – контроль+інозин; 3 – опромінення в дозі 1,0 Гр; 4 – опромінення в дозі 1,0 Гр +інозин; 5 – опромінення в дозі 7,78 Гр; 6 – опромінення в дозі 7,78 Гр+інозин

* – достовірно відносно контролю,

** – достовірно відносно контролю на фоні введення інозину,

– достовірно відносно відповідних опромінених груп,

$p < 0,05$

Оскільки КсО є одним з кінцевих ферментів пуринового обміну ссавців, її активність тісно пов'язана з інтенсивністю перетворення пуринів [368].

Як відомо [369, 370], індуковане радіацією порушення метаболізму пуринів супроводжується інтенсифікацією деградації аденілових

нуклеотидів. На нашу думку, зростання ксантиноксидазної активності можливе саме за рахунок накопичення у клітинах продуктів розпаду аденілатів – гіпоксантину і ксантину, що виступають специфічними субстратами для КсО. Відповідно до літературних даних, НАД⁺-залежна активність КсО суттєво пригнічується зі збільшенням концентрації останніх, в той час як інгібування субстратом оксидазної форми менш виражено, а при зростанні внутрішньоклітинного рівня молекулярного кисню (як акцептора електронів) інгібуючий вплив взагалі нівелюється. Автори роботи [371] на основі аналізу кінетичних характеристик Д-та О-форми КсО тимоцитів припускають, що концентрація пуринових субстратів близька до 10-кратної величини K_m є критичною для функціонування КсД. Подальше зростання вмісту пуринових основ призводить до конкурентного витіснення пептидного фрагменту, відповідального за спорідненість Д-форми до НАД⁺. Ще однією вірогідною причиною порушення електрон-акцепторної здатності ксантиндегідрогеназної форми ферменту може бути виснаження внутрішньоклітинного фонду НАД⁺, яке спостерігається у ранній післярадіаційний період.

Саме цими твердженнями можна пояснити радіаційно-опосередковані зміни сумарної ксантиноксидазної та ксантиндегідрогеназної активності у лімфоцитах селезінки щурів за дії променевого чинника (рис.7.12).

Доказом на користь значного внеску ксантиноксидазної реакції у механізм розвитку радіаційно-обумовленої загибелі лімфоїдних клітин є показане у роботі Кишко Т.О. збільшення майже на 60% загибелі тимоцитів за умови присутності у культуральному середовищі гіпоксантину [372].

Відсутність достовірних змін ферментативної активності КсО у лімфоцитах селезінки за дії променевого чинника в дозі 7,78 Гр узгоджується з нашими результатами, викладеними у розділі 9, де відзначається пригнічення активності аденозиндезамінази і пурипнуклеозидфосфорилази

лімфоцитів селезінки щурів – ферментів, що каталізують послідовні етапи розпаду пуринових нуклеозидів з утворенням гіпоксантину.

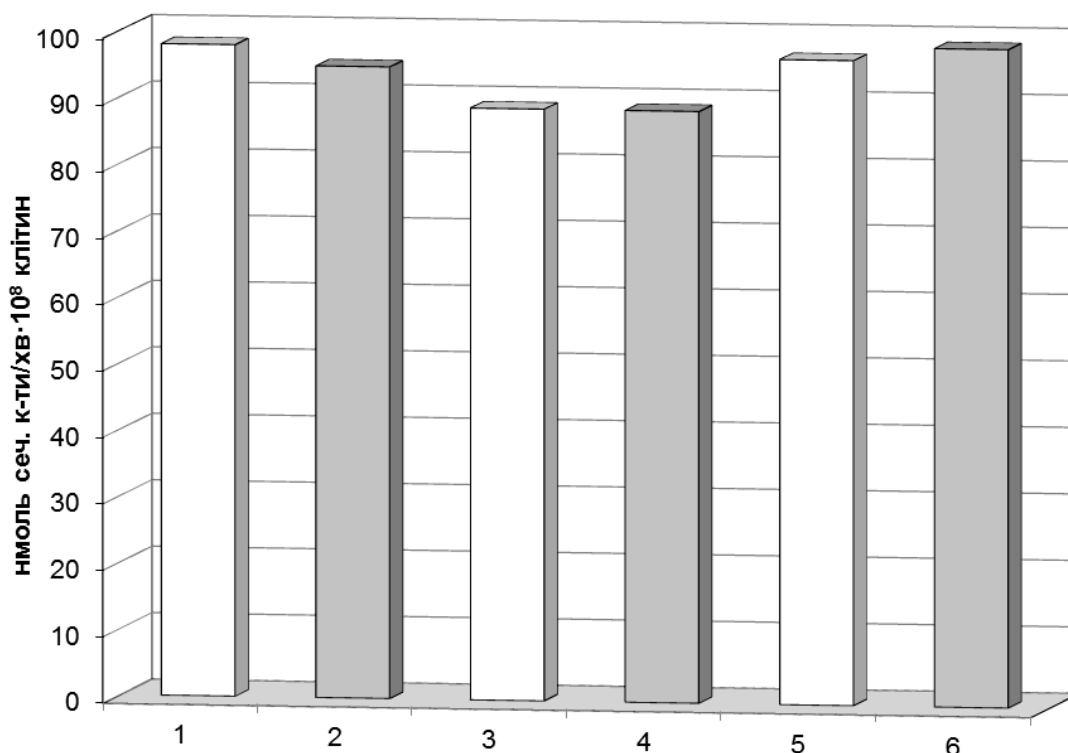


Рис.7.12 Сумарна ксантиноксидазна та ксантиндегідрогеназна активність у лімфоцитах селезінки щурів за дії іонізуючої радіації та на фоні введення інозину: 1 – контроль; 2 – контроль+інозин; 3 – опромінення в дозі 1,0 Гр; 4 – опромінення в дозі 1,0 Гр+інозин; 5 – опромінення в дозі 7,78 Гр; 6 – опромінення в дозі 7,78 Гр+інозин

* – достовірно відносно контролю,

** – достовірно відносно контролю на фоні введення інозину,

– достовірно відносно відповідних опромінених груп,

$p < 0,05$

КсО належить також важлива роль у забезпеченні зв'язку пуринового обміну з процесами ПОЛ. Післяпроменева стимуляція ксантиноксидазної активності через утворення супероксидних аніон-радикалів та перекису водню сприяє формуванню надлишкового рівня реакцій пероксидації ліпідів у радіочутливих тканинах. За даними Кожемякіна Л.А. та співавт. у тимоцитах щурів має місце залежність динаміки накопичення МДА та величини активності О-форми КсО – максимальний прояв оксидазних

реакцій співпадає у часі з найбільшим рівнем малонового диальдегіду у досліджуваному органі [373]. Зворотність цього зв'язку полягає у модуляції активності ксантинооксидази за участю МДА [374]. З огляду на результати досліджень Haberland A. et al. [375], що вказують на здатність МДА взаємодіяти з NH_2 -групами оксидазної, але не дегідрогеназної форми КсО з утворенням основ Шифа, здається логічним припустити, що нижча активність КсО спленоцитів за умови опромінення тварин в дозі 7,78 Гр, порівняно з дією радіації в дозі 1,0 Гр, обумовлена акумуляцією у клітинах за цієї дози певного критичного рівня малонового диальдегіду та його інгібуючим впливом на активність ферменту.

Водночас, враховуючи той факт, що КсО є молібден-, залізо- і мідьвмісним флавопротеїдом, не виключена участь механізму металокаталізуючого окиснення білків в інактивації ферменту при надмірному генеруванні АКМ [376]. У порушенні структурної організації молекули КсО беруть участь похідні перекису водню – при зростанні у клітинах рівня останнього відбувається акцепція електронів H_2O_2 з утворенням високореакційного радикалу OH^- , що супроводжується аутоінактивацією КсО.

З викладеного вище можна зробити висновок, що за дії на тварин рентгенівського випромінювання у досліджуваних дозах відбувається перехід дегідрогеназної форми ксантинооксидази в оксидазну, функціонування якої пов'язано з продукуванням активних кисневих метаболітів, що відповідно з сучасними уявленнями може розглядатися як ще один механізм підсилення процесів ПОЛ та вільнорадикального пошкодження ядерного матеріалу.

7.4. Супероксиддисмутазна активність у лімфоцитах тимусу і селезінки щурів за дії іонізуючої радіації та на фоні введення інозину

Гомеостаз АКМ підтримується рядом антиоксидантних систем. До них належать ферментні системи: супероксиддисмутаза, каталаза, пероксидази та інш.; низькомолекулярні тіолвмісні молекули: глутатіон, глутаредоксини, тіоредоксини, пероксиредоксини; флавоноїди –убіхінон, α -токоферол, сечова кислота, вітаміни; хелатні сполуки, які зв'язують іони металів змінної валентності: церулоплазмін, ферритин, лактоферрин та інші.

Значну роль при різних патологічних станах, що обумовлені впливом променевого чинника, відіграє важливий регулятор окислювального гомеостазу клітини, один з компонентів фізіологічної антиоксидантної системи захисту організму – супероксиддисмутаза. СОД каталізує реакцію знешкодження радикалів O_2^{\bullet} шляхом їх дисмутації з утворенням менш реакційноздатних молекул пероксиду водню і синглетного кисню [377]. Забезпечення блокування ланцюгів вільнорадикальних реакцій у клітинах аеробних організмів також виконується супероксиддисмутазою, що є єдиною серед найбільш активних антиоксидантних ферментів.

За нормальних умов в організмі підтримується певне співвідношення між активністю компонентів антиоксидантної системи, що забезпечують необхідну стаціонарну концентрацію низькомолекулярних метаболітів та реакціями, пов'язаними з продукуванням цих метаболітів. Відомо, що дія на організм іонізуючої радіації супроводжується істотним порушенням антирадикального захисту організму внаслідок зсуву рівноваги у прооксидантно-антиоксидантній системі у бік надмірного генерування АКМ [378].

Враховуючи сучасні уявлення щодо провідної ролі СОД у метаболізмі активних форм кисню та суттєвий внесок супероксидних радикалів в індукцію і розвиток оксидативного стресу, нами проводилися дослідження

активності цитоплазматичної Cu^{2+} - Zn^{2+} -вмісної СОД у лімфоїдних клітинах тимусу та селезінки за дії низької та летальної доз.

В умовах нашого експерименту було встановлено статистично вірогідне підвищення активності СОД у лімфоцитах тимусу через 30 хв та три години після дії на тварин рентгенівського випромінювання в дозах 1,0 та 7,78 Гр.

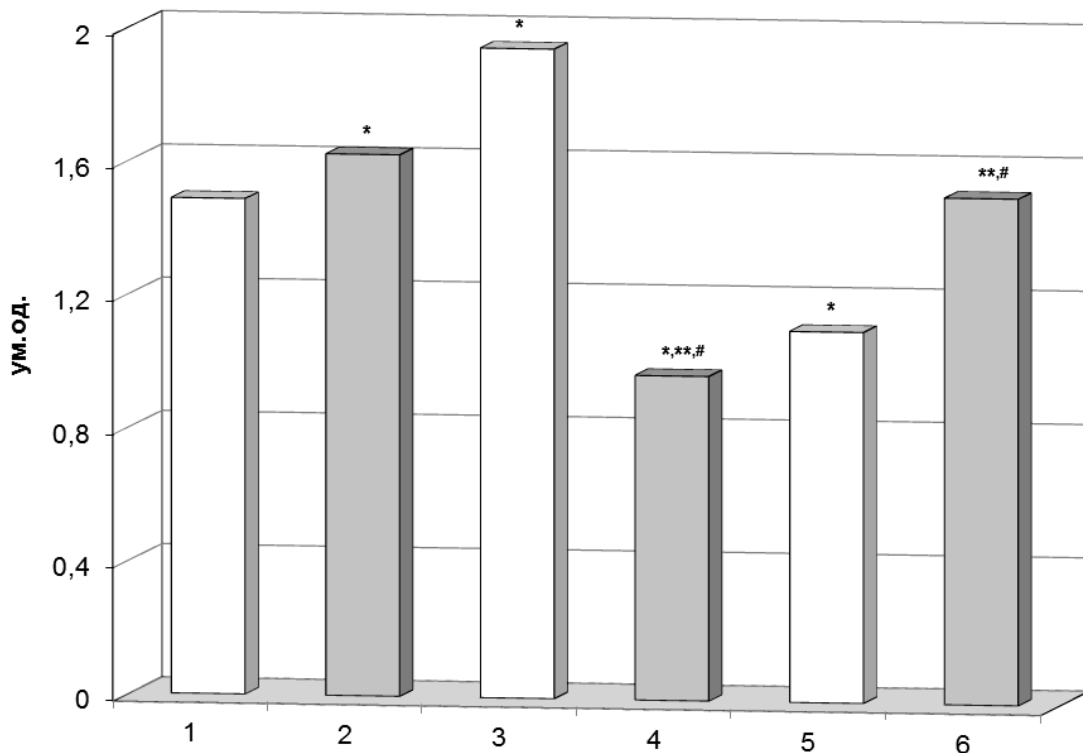


Рис. 7.13. Супероксиддисмутазна активність у лімфоцитах тимусу щурів через 30 хв за дії іонізуючої радіації та на фоні введення інозину: 1 – контроль; 2 – контроль+інозин; 3 – опромінення в дозі 1,0 Гр; 4 – опромінення в дозі 1,0 Гр +інозин; 5 – опромінення в дозі 7,78 Гр; 6 – опромінення в дозі 7,78 Гр +інозин;
* – достовірно відносно контролю,
** – достовірно відносно контролю на фоні введення інозину,
– достовірно відносно відповідних опромінених груп,
 $p < 0,05$

Відповідно до результатів, наведених на рис 7.13, дія радіації в дозі 1,0 Гр викликає зростання в 1,3 раза супероксиддисмутазної активності через

30 хв після дії на тварин рентгенівського випромінювання. За цього ж часового інтервалу відмічається зниження активності ферменту в 1,33 раза при опроміненні в дозі 7,78 Гр. Через 3 год після дії променевого чинника в дозі 1,0 Гр відмічено тенденцію до зростання активності СОД порівняно з контрольним показником, через 3 год після опромінення в дозі 7,78 Гр (рис.7.14) спостерігається підвищення супероксиддисмутазної активності в 1,14 раза. Отримані дані корелюють з результатами [379] по зміні активності даного ферменту за дії іонізуючого випромінювання.

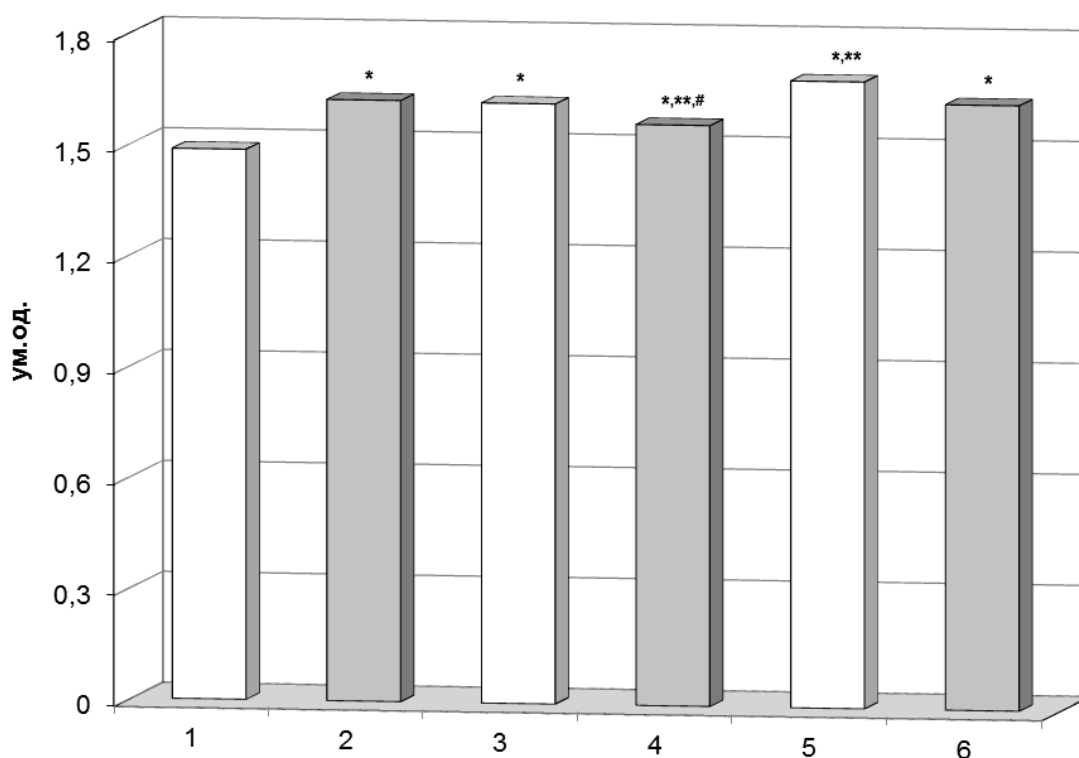


Рис. 7.14. Супероксиддисмутазна активність у лімфоцитах тимусу щурів через 3 год за дії іонізуючої радіації та на фоні введення інозину: 1 – контроль; 2 – контроль+інозин; 3 – опромінення в дозі 1,0 Гр; 4 – опромінення в дозі 1,0 Гр +інозин; 5 – опромінення в дозі 7,78 Гр; 6 – опромінення в дозі 7,78 Гр +інозин;
 * – достовірно відносно контролю,
 ** – достовірно відносно контролю на фоні введення інозину,
 # – достовірно відносно відповідних опромінених груп,
 $p < 0,05$

Внаслідок проведених досліджень встановлено корегуючий вплив інозину на активність СОД в лімфоцитах тимусу щурів. Так, через 3 год після опромінення в дозах 1,0 та 7,78 Гр відмічається наближення активності ферменту до показників контролю на фоні введення інозину. Можливо значне підвищення активності СОД є наслідком збільшення у клітинах концентрації супероксидного радикалу, оскільки відомо, що зміна активності СОД тісно пов'язана з рівнем супероксидних радикалів.

Водночас підвищення ферментативної активності СОД може бути результатом індуктивного синтезу нових молекул ферменту у відповідь на надлишок у клітинах O_2^{\bullet} . Біосинтез внутрішньоклітинних ферментативних АО є генетично детермінованим, а зумовлене опроміненням зростання концентрації АКМ призводить до прямого порушення структурної організації молекули ДНК і, як наслідок, до активації транскрипції ряду генів, серед яких і гени окремих компонентів антиоксидантної системи. Відміченою в нашому дослідженні радіаційно-опосередкованою редокс-регуляцією транскрипційних факторів AP-1 та NF-κB, які стимулюють експресію генів ряду ізоформ Mn-SOD, можна пояснити підвищення вмісту СОД в лімфоцитах тимусу щурів після дії іонізуючої радіації.

У наступній серії досліджень нами вивчалась дія променевого чинника на активність СОД в лімфоцитах селезінки. Показано, що характер післярадіаційних змін активності СОД спленоцитів щурів відрізняється від такого у клітинах тимусу. Результати проведених досліджень представлено на рис. 7.15, 7.16, згідно з якими за обох часових інтервалів та досліджених доз рентгенівського випромінювання відбувається достовірне зниження супероксиддисмутазної активності у спленоцитах щурів; виключення складає тільки активність СОД через 30 хвилин після опромінення щурів в дозі 7,78 Гр. Вона була статистично вищою в 1,17 раза порівняно з контрольним значенням.

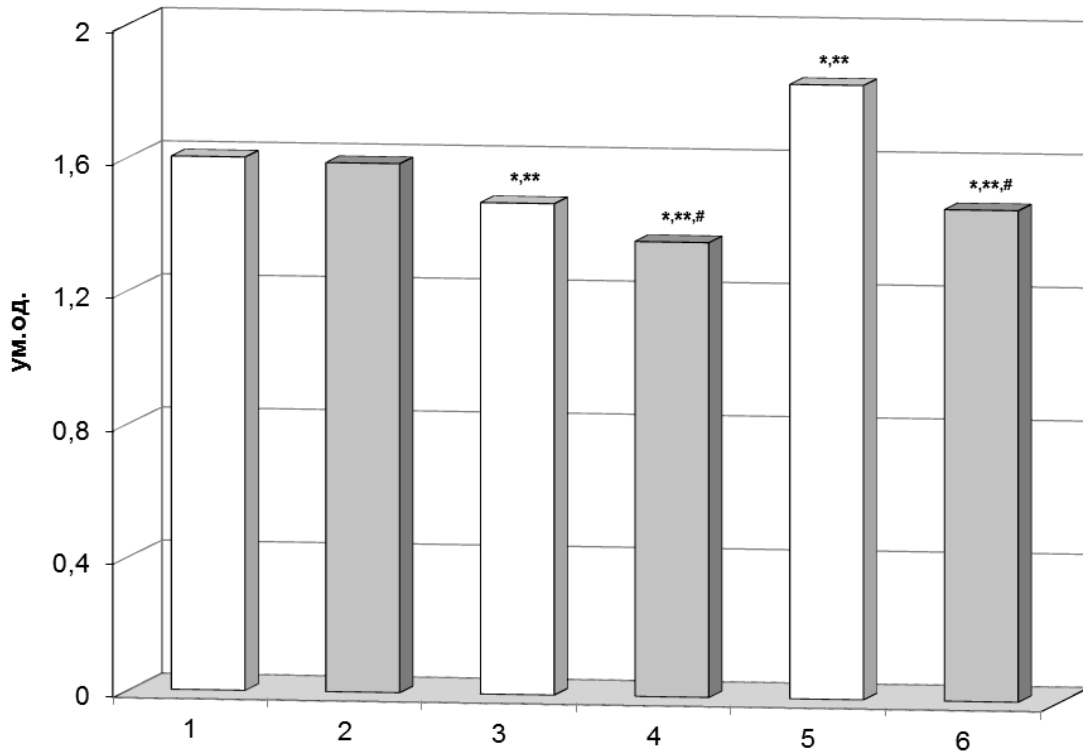


Рис. 7.15. Супероксиддисмутна активність у лімфоцитах селезінки щурів через 30 хв за дії іонізуючої радіації та на фоні введення інозину: 1 – контроль; 2 – контроль+ інозин; 3 – опромінення в дозі 1,0 Гр; 4 – опромінення в дозі 1,0 Гр + інозин; 5 – опромінення в дозі 7,78 Гр; 6 – опромінення в дозі 7,78 Гр + інозин;
 * – достовірно відносно контролю,
 ** – достовірно відносно контролю на фоні введення інозину,
 # – достовірно відносно відповідних опромінених груп,
 $p < 0,05$

Внаслідок проведених досліджень встановлено корегуючий вплив інозину на активність СОД в лімфоцитах тимусу щурів. Так, через 3 год після опромінення в дозах 1,0 та 7,78 Гр відмічається наближення активності ферменту до показників контролю на фоні введення інозину. Можливо значне підвищення активності останньої є наслідком збільшення у клітинах концентрації супероксидного радикалу, оскільки відомо, що зміна активності СОД тісно пов'язана з рівнем супероксидних радикалів.

Згідно з сучасними уявленнями регуляція активності СОД відбувається за участю всієї багатоконпонентної редокс-системи клітини. Активність

ферменту тісно пов'язана з інтенсивністю процесів ПОЛ і залежить від вмісту у клітинах продуктів пероксидації ліпідів – надмірне накопичення токсичних інтермедіатів викликає гальмування активності СОД та інших

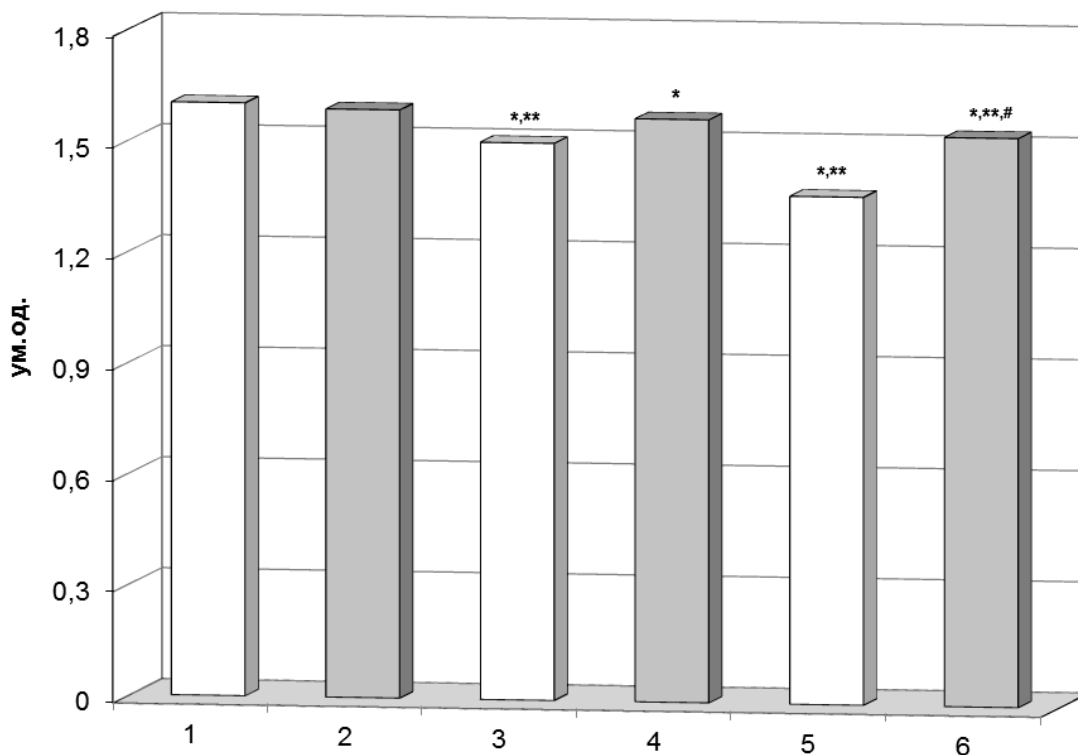


Рис. 7.16. Супероксиддисмутна активність у лімфоцитах селезінки щурів через 3 год за дії іонізуючої радіації та на фоні введення інозину: 1 – контроль; 2 – контроль+інозин; 3 – опромінення в дозі 1,0 Гр; 4 – опромінення в дозі 1,0 Гр +інозин; 5 – опромінення в дозі 7,78 Гр; 6 – опромінення в дозі 7,78 Гр +інозин;
 * – достовірно відносно контролю,
 ** – достовірно відносно контролю на фоні введення інозину,
 # – достовірно відносно відповідних опромінених груп,
 $p < 0,05$

ферментів антиоксидантної системи. Таким чином, підвищення активності ферменту у лімфоцитах тимусу щурів можна розглядати як відповідь на променеву активацію процесів ПОЛ. В той час як показане нами зниження активності супероксиддисмутази у лімфоцитах селезінки, найімовірніше, може бути обумовлено зростанням вмісту продуктів ПОЛ (зокрема пероксиду водню) за рахунок дискоординації дії компонентів

антиоксидантної ферментної системи та виступати проявом їх поступового ушкодження активними продуктами пероксидного окиснення ліпідів

Щодо участі АКМ в окислювальній деструкції мембранних білків цитоплазми та органел, то можна припустити, що внутрішньоклітинне зниження ферментативної активності СОД може бути наслідком окиснювальної модифікації молекули ферменту. Показано, що безпосереднім інактивуючим фермент агентом є гідроксильний радикал OH^\cdot , який утворюється у реакціях Фентона і Хабер-Вайса з пероксиду водню за умови надлишку супероксиду. Разом з тим пригнічення супероксид-дисмутазної активності за принципом зворотного зв'язку викликає різке підвищення у клітинах вмісту продуктів пероксидації ліпідів.

Таким чином, за дії на щурів іонізуючої радіації спостерігаються порушення у функціонуванні ферменту супероксиддисмутази – важливої ланки антиоксидантного захисту організму, що забезпечує регуляцію вільнорадикальних процесів клітинного метаболізму.

Інтенсивність перебігу процесів пероксидації ліпідів, особливо в перші години після дії стрес-агентів, значною мірою залежить від функціональної активності та мобілізації ферментних систем антиоксидантного захисту і зокрема каталази, активність якої ми визначали у лімфоцитах тимусу та селезінки щурів за їх променевого ураження.

7.5. Каталазна активність у лімфоцитах тимусу і селезінки щурів за дії іонізуючої радіації та на фоні введення інозину

Каталаза належить до групи поширених ферментів антиоксидантного захисту. Ферменти розщеплюють перекисний місток у складі H_2O_2 та інших гідропероксидів [380].

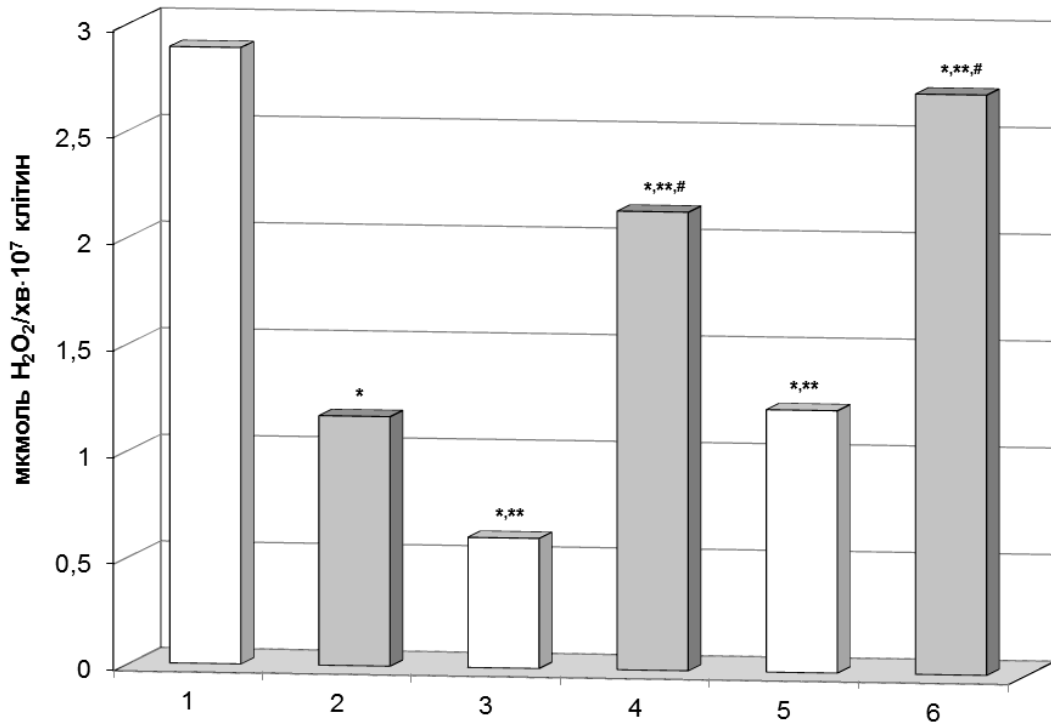


Рис. 7.17. Каталазна активність у лімфоцитах тимусу щурів через 30 хв за дії іонізуючої радіації та на фоні введення інозину: 1 – контроль; 2 – контроль + інозин; 3 – опромінення в дозі 1,0 Гр; 4 – опромінення в дозі 1,0 Гр + інозин; 5 – опромінення в дозі 7,78 Гр; 6 – опромінення в дозі 7,78 Гр + інозин
 * – достовірно відносно контролю,
 ** – достовірно відносно контролю на фоні введення інозину,
 # – достовірно відносно відповідних опромінених груп,
 $p < 0,05$

У нормі функція ферменту полягає у попередженні накопичення пероксиду водню, який утворюється при дисмутації супероксидного аніона та аеробного окиснення відновлених флавопротеїнів. Каталаза виявляє клітинно-специфічну відповідь, яка може бути пов'язана, насамперед, з активацією ферменту, що корелює зі зменшенням спорідненості до мембранних структур і переходом у розчинний стан під дією надлишкових кількостей субстрату, а на більш віддалені терміни – синтезом активніших ізоформ.

Дослідження активності каталази в лімфоцитах тимусу та селезінки щурів засвідчило, що за дії іонізуючої радіації відбуваються значні зміни

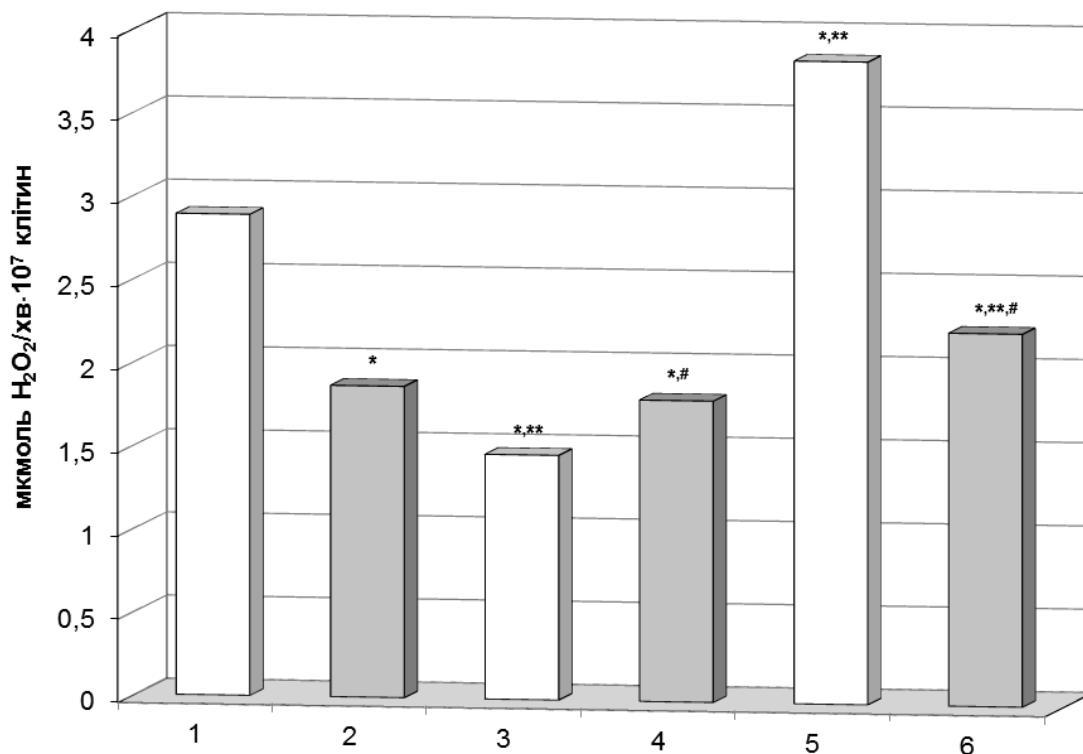


Рис. 7.18. Каталазна активність у лімфоцитах тимусу щурів через 3 год за дії іонізуючої радіації та на фоні введення інозину: 1 – контроль; 2 – контроль +інозин; 3 – опромінення в дозі 1,0 Гр; 4 – опромінення в дозі 1,0 Гр +інозин; 5 – опромінення в дозі 7,78 Гр; 6 – опромінення в дозі 7,78 Гр +інозин

* – достовірно відносно контролю,

** – достовірно відносно контролю на фоні введення інозину,

– достовірно відносно відповідних опромінених груп,

$p < 0,05$

активності ферменту (рис.7.17-7.20). Так, через 30 хв після опромінення в дозах 1,0 Гр та 7,78 Гр встановлено пригнічення ферментативної активності каталази у лімфоцитах тимусу щурів у 4,7 раза та 2,3 раза відповідно порівняно з контрольними значеннями (рис.7.17).

Згідно з одержаними результатами через 3 год після опромінення щурів в дозах 1,0 та 7,78 Гр (рис.7.18) у тимоцитах щурів спостерігаються різноспрямовані зміни активності досліджуваного ферменту.

Встановлене нами пригнічення активності каталази у 2 рази за опромінення в дозі 1,0 Гр на фоні активації СОД може бути як наслідком безпосередньої дії на фермент продуктів радіолізу води, так і результатом

низького вмісту субстрату, за який із каталазою на ранніх етапах після випромінювання конкурує більш специфічна до H_2O_2 глутатіонпероксидаза. Із збільшенням дози опромінення активність каталази зростала у 1,3 раза порівняно з контролем (рис.7.18). Таке підвищення активності можна пов'язати з дозозалежним посиленням утворення у водних і ліпідних фазах клітини вільних радикалів, що за умови достатньої ефективності антиоксидантної системи супроводжується активацією відповідних ферментів їх утилізації.

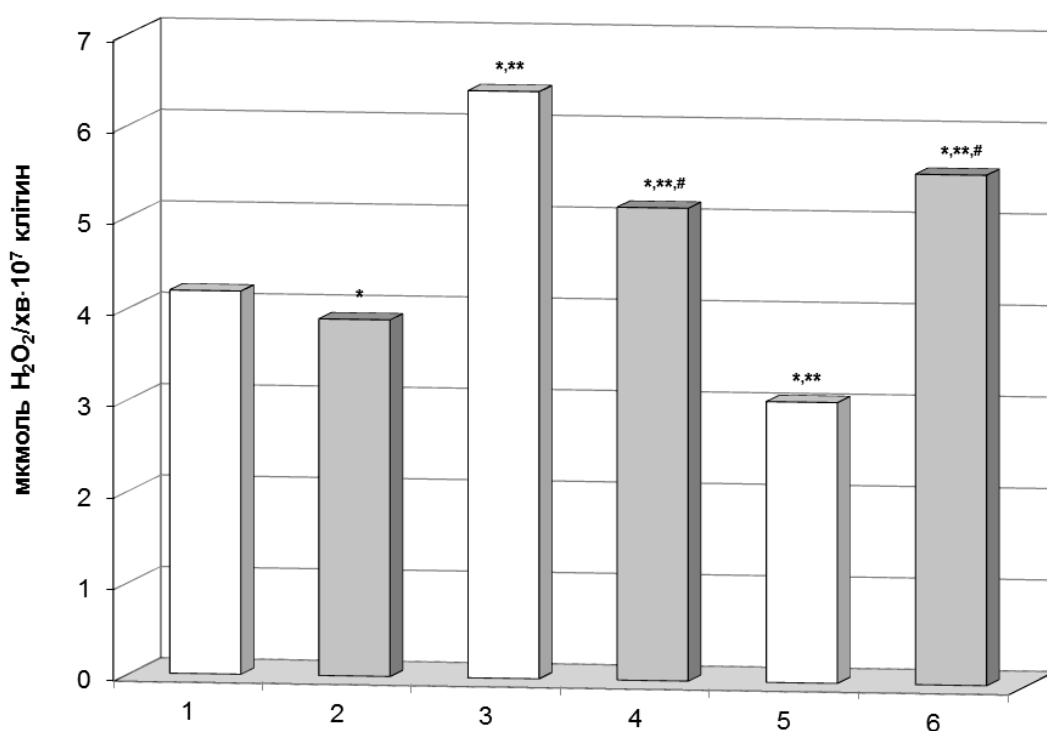


Рис. 7.19. Каталазна активність у лімфоцитах селезінки щурів через 30 хв за дії іонізуючої радіації та на фоні введення інозину: 1 – контроль; 2 – контроль +інозин; 3 – опромінення в дозі 1,0 Гр; 4 – опромінення в дозі 1,0 Гр +інозин; 5 – опромінення в дозі 7,78 Гр; 6 – опромінення в дозі 7,78 Гр +інозин
 * – достовірно відносно контролю,
 ** – достовірно відносно контролю на фоні введення інозину,
 # – достовірно відносно відповідних опромінених груп,
 $p < 0,05$

Дослідження активності каталази у лімфоцитах селезінки щурів через 30 хв після дії іонізуючого випромінювання в дозах 1,0 та 7,78 Гр має

коливальний характер (рис. 7.19). Після дії променевого чинника у дозі 1,0 Гр спостерігається підвищення активності каталази у 1,5 раза відносно контрольного показника. За опромінення у дозі 7,78 Гр відбувається пригнічення у лімфоцитах селезінки щурів ферментативної активності у 1,4 раза порівняно з контрольним значенням.

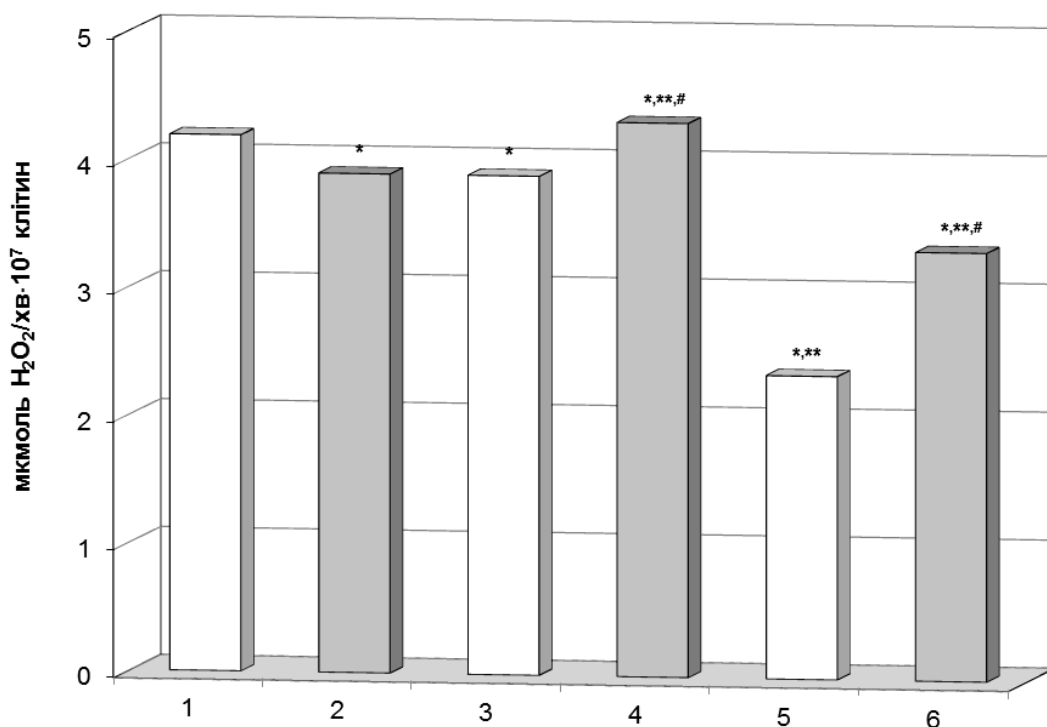


Рис. 7.20. Каталазна активність у лімфоцитах селезінки щурів через 3 год за дії іонізуючої радіації та на фоні введення інозину: 1 – контроль; 2 – контроль +інозин; 3 – опромінення в дозі 1,0 Гр; 4 – опромінення в дозі 1,0 Гр +інозин; 5 – опромінення в дозі 7,78 Гр; 6 – опромінення в дозі 7,78 Гр +інозин
 * – достовірно відносно контролю,
 ** – достовірно відносно контролю на фоні введення інозину,
 # – достовірно відносно відповідних опромінених груп,
 $p < 0,05$

Через 3 год після опромінення щурів у досліджуваних дозах (1,0 та 7,78 Гр) виявлено також пригнічення ферменту в 1,8 раза порівняно з контролем (рис.7.20). Вважають, що пероксид водню у значних концентраціях інгібує активність каталази [381]. Невидалені вчасно H₂O₂ та

O_2^{\bullet} вступають у реакцію Хабер-Вайсса з утворенням високотоксичного OH^{\bullet} , який не підлягає ферментативній інактивації. Введення інозину піддослідним тваринам в умовах експерименту сприяло стимуляції активності каталази у лімфоцитах тимусу і селезінки щурів за обох часових інтервалів.

Таким чином, вказані зміни в досліджуваних показниках (СОД, каталаза) свідчать про порушення механізмів реагування ферментативної ланки антиоксидантного захисту за дії променевого чинника, що, ймовірно, може бути результатом певного виснаження антиоксидантної системи захисту внаслідок радіаційно-індукованого накопичення активних кисневих метаболітів. Особливо ці процеси проявляються за опромінення в дозі 7.78 Гр в обох популяціях лімфоцитів щурів на більш пізніх термінах (3 год) після дії променевого чинника.

Використання як модифікуючого фактору інозину пов'язано, на нашу думку, із здатністю препарату пригнічувати реакції пероксидного окиснення ліпідів та здійснювати активуючий вплив на функціонування ендогенної антиоксидантної системи організму.

7.6. Окисна модифікація білків у лімфоцитах тимусу і селезінки щурів за дії іонізуючої радіації

Представлені вище дані вказують на важливу роль оксидативного стресу у патогенезі променевого ураження. Згідно з літературою останніх років, активні форми кисню зумовлюють не лише активізацію процесів пероксидації ліпідів, порушення структурної організації нуклеїнових кислот, але й окиснювальну деструкцію білкових молекул. Деякі автори [382], вважають, що пошкоджуючого впливу АКМ спочатку зазнають не ліпіди, а білки плазматичної мембрани, що призводить до їх деполімеризації і, врешті-решт, до лізису клітини. Тобто, вільні радикали та продукти ПОЛ можуть впливати самі і виступати як фактори ініціації окислювальної

модифікації білків, що викликає порушення конформації та функціонування як розчинних, так і мембранозв'язаних ферментних комплексів, рецепторів, іонних каналів і супроводжується глибокими змінами метаболізму клітини. Зростання внутрішньоклітинного вмісту окиснених білків може бути раннім критерієм ураження тканин активними кисневими метаболітами і у деяких випадках досягає 50-70% всього клітинного білка [383].

У зв'язку з цим на наступному етапі роботи ми оцінювали ступінь окисної модифікації білкових молекул за розвитку радіаційно-індукованого апоптозу лімфоїдних клітин селезінки і тимусу щурів за дії іонізуючої радіації.

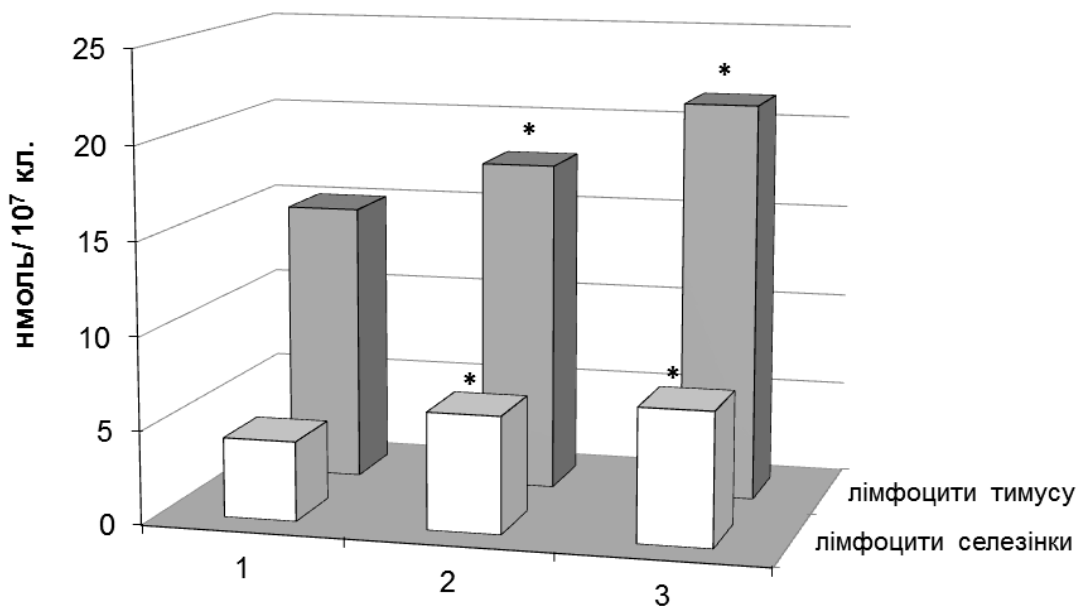


Рис.7.21. Ступінь окисної модифікації білків у лімфоцитах тимусу та селезінки через 30 хв за дії іонізуючої радіації: 1 – контроль; 2 – опромінення в дозі 1,0 Гр; 3 – опромінення в дозі 7,78 Гр; * – достовірно відносно контролю, $p < 0,05$

Починаючи з 30 хв після дії променевого чинника нами встановлено дозозалежне підвищення ступеня окисної модифікації білків в обох

популяціях лімфоцитів. Для лімфоцитів тимусу це підвищення складало 1,2 та 1,4 раза за опромінення в дозах 1,0 та 7,78 Гр, відповідно. Щодо лімфоцитів селезінки, то зростання ступеня окисно-модифікованих білків підвищувалось в 1,5 та 1,7 раза за опромінення в дозах 1,0 та 7,78 Гр, відповідно (рис.7.21). Одержані дані корелюють з виявленими нами ранніми змінами рівня АКМ в популяціях лімфоцитів тимусу і селезінки щурів за дії променевого чинника.

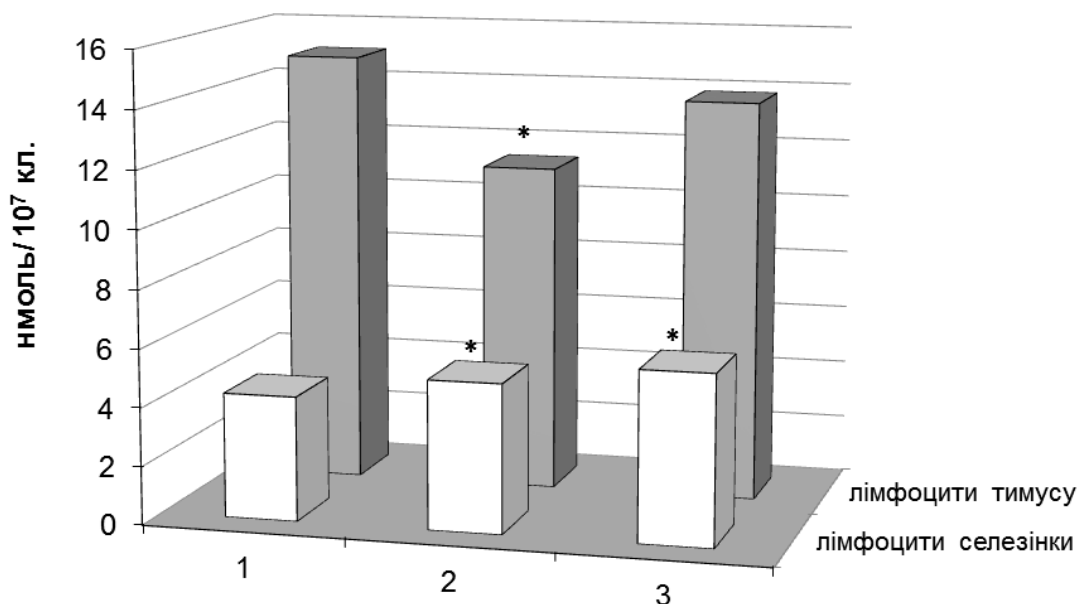


Рис. 7.22. Ступінь окисної модифікації білків у лімфоцитах тимусу та селезінки через 3 год за дії іонізуючої радіації: 1 – контроль; 2 – опромінення в дозі 1,0 Гр; 3 – опромінення в дозі 7,78 Гр; * – достовірно відносно контролю, $p < 0,05$

Аналізуючи результати наступної серії проведених досліджень, можна побачити, що через три години після тотального опромінення щурів в дозах 1,0 та 7,78 Гр (рис.7.22) рівень окисної модифікації білків у лімфоцитах тимусу та селезінки суттєво відрізняється: у спленоцитах має місце зростання вмісту фенілгідразонів за обох доз радіації, в той час як у лімфоцитах тимусу ступінь окиснювальної модифікації білків знижується в 1,3 раза за дози

1,0 Гр та залишається у межах контрольного значення при опроміненні тварин у летальній дозі. Отримані результати свідчать про різну спрямованість радіаційно-обумовлених порушень метаболічних процесів у лімфоїдних клітинах тимусу та селезінки.

Слід зазначити, що процеси модифікації білкових молекул за участі активних кисневих метаболітів протікають не лише при патологічних станах. За фізіологічних умов у клітинах існує деякий рівень окисно-модифікованих білків, який відображає баланс між швидкістю окиснення, протеолітичної деградації та швидкістю синтезу білкових молекул і виступає як можливий механізм регуляції метаболізму білків, активації мультикаталітичних ферментних систем, які забезпечують вибіркоче руйнування окиснених білків [384]. У деяких випадках окисна інактивація є тією маркерною стадією, що робить білки чутливими до прискореного ендogenous протеолізу оскільки протеолітичні ферменти розщеплюють модифіковані білкові молекули набагато швидше, ніж нативні. Один з шляхів розпаду пошкоджених білків полягає в їх неферментативному руйнуванні при сумісній дії супероксидного та гідроксильного радикалів.

Проте, як уже зазначалося, ефективнішою є деградація за участю як окремих цитоплазматичних протеаз, так і високоспецифічних ферментних комплексів. Показане нами деяке зниження ступеня окиснювальної модифікації білкових молекул у лімфоцитах тимусу за опромінення тварин в дозі 1,0 Гр можливо пов'язано з активізацією процесів протеолізу, які згідно з нашими даними (розділ 6) мають місце у тимоцитах на початкових етапах після дії променевого чинника.

За умов одноразового рентгенівського опромінення щурів у досліджуваних дозах через 3 год було виявлено зростання вмісту фенілгідрозонів у лімфоцитах селезінки, причому з підвищенням дози ступінь окиснювальної модифікації білків також збільшувався. Так, вміст альдегід- і кетоніпохідних нейтрального характеру за радіаційного впливу в

дозах 1,0 та 7,78 Гр був вищим за аналогічний показник у спленоцитах інтактних тваринах відповідно на 22% та 39%, що узгоджуються з результатами робіт [385,386], де автори вказують на інтенсифікацію процесів окиснювальної модифікації білків у клітинах селезінки та гепатоцитах у відповідь на дію опромінення в дозі 10 Гр (рис. 7.22).

Внутрішньоклітинний рівень окиснювально модифікованих білків, з одного боку, залежить від інтенсивності генерування АКМ, а, отже, і від факторів, що провокують їх утворення, з іншого – визначається функціональною активністю ендogenous антиоксидантів і пов'язаний з буферною ємністю про- і антиоксидантної системи. Як відомо, зростання рівня АКМ у клітинах поряд з іншими ефектами супроводжується руйнуванням і основних АО ферментів, виходячи з чого можна припустити, що зростання рівня окиснювальної модифікації білків частково обумовлено накопиченням у клітинах, інактивованих у процесі каталізу АО ферментів. Водночас значна активація ферментів-антиоксидантів, зокрема супероксиддисмутази, у лімфоїдних клітинах тимусу можливо попереджує пошкодження структури білкових молекул активними кисневими радикалами при дії іонізуючої радіації в дозі 7,78 Гр.

Згідно з сучасними літературними даними, у клітинах поряд з модифікацією білків за участю кисневих метаболітів існує так званий неокислювальний шлях утворення карбонільних похідних, який полягає у модифікації молекули білка альдегідами. Так, в експериментах Burcham P.C. et al. [387] було показано, що інкубація білків з різним альдегідами, у тому числі МДА, концентраційно-залежним чином індукує зростання ступеня окисної модифікації білкових молекул. А оскільки дія іонізуючої радіації супроводжується інтенсифікацією реакцій ПОЛ та накопиченням у клітинах продуктів пероксидації ліпідів, можна припустити, що відмічене нами зростання ступеня окиснювальної модифікації білків у спленоцитах опромінених щурів частково обумовлено саме неокислювальним механізмом

формування карбонільних похідних. Таким чином, розвиток апоптотичної загибелі лімфоцитів тимусу та селезінки за променевого ураження супроводжується порушенням ступеня окисної модифікації білкових молекул, інтенсивність якої залежить від метаболічного стану клітини і різко зростає при вільно-радикальних патологіях.

Сукупність отриманих результатів свідчить про значні порушення окислювального гомеостазу, а саме підвищення рівня вторинних продуктів ПОЛ, та зниження потужності антиоксидантної ферментної системи, що призводять до ослаблення процесів антирадикального захисту і обумовлюють латентну ендогенну інтоксикацію і, як наслідок – окислювальну деструкцію клітин, характерні прояви якої лежать в основі теорії окисного стресу як медіатора апоптозу [386,387]. Згідно з наведеними у розділі даними більш вираженні зміни спостерігаються за опромінення в дозі 7,78 Гр за обох часових інтервалів на відміну від опромінення в дозі 1,0 Гр. На нашу думку за опромінення низькою дозою спостерігається активація компенсаторних процесів, які корегуються складною системою регулювання про-антиоксидантного стану з залученням відповідних механізмів. Отже за дози 1,0 Гр спостерігається більш виражена мобілізація компенсаторних механізмів для попередження порушень динамічної рівноваги опроміненої системи.

РОЗДІЛ 8

АКТИВНІСТЬ ЕФЕКТОРНИХ КАСПАЗ ТА ВИЗНАЧЕННЯ СТАДІЙ ПЕРЕБІГУ РАДІАЦІЙНО-ІНДУКОВАНОГО АПОПТОЗУ

Беззаперечно основна роль у програмованій клітинній загибелі відводиться системі цистеїнових протеїназ родини каспаз, які залучені у різноманітні шляхи реалізації апоптозу. На сьогодні можливо розглядати роль каспаз в апоптозі як, по-перше, інактивацію білків, які захищають клітини від апоптозу, наприклад розщеплення інгібітору ендонуклеази CAD, яка відповідальна за деградацію ДНК; деградацію антиапоптотичних білків родини Bcl-2: Bcl-2, Bcl-X_l, Bcl-w. По-друге, це безпосередній деструктивний вплив, наприклад на ядерні ламіни, що призводить до дезінтеграції функціонування ядерних мембран та хроматину; на функціонування цитоскелету- білок гелсолін. По-третє, завдяки активації каспаз відбувається дисоціація регуляторних і ефекторних доменів білків-регуляторів клітинного циклу; білків, що беруть участь у репарації ДНК (ДНК-залежна протеїніназа), контролю сплайсингу, ініціації трансляції (фактори eIF-4G, eIF-4B) та активація власне прокаспаз- 2, 3-6,-7,-9 [388, 389, 390, 391].

Конвергенція апоптотичних сигналів, які опосередковують різноманітні ланки програмованої клітинної загибелі, відбувається на рівні активації ефекторної ланки каспазного каскаду. Саме активація каспаз другого ешелону–виконавчі каспази-3,-6,-7 [392,393] з подальшим розщеплення їх клітинних субстратів на етапі до виникнення пізніх морфологічних змін клітин є характерним процесом за умови радіаційно-індукованого апоптозу. Отже, наслідком активації каспазних каскадів за апоптозу є фрагментація ядра, блебінг зовнішньої мембрани з подальшим фагоцитозом апоптотичних клітин, втрата міжклітинних взаємодій, тощо. Дослідження ефекторних механізмів апоптозу за активації апоптотичних комплексів: DISC (розділ 4), апоптосоми (розділ 5) та PIDDosome (розділ 3)

і відповідних їм ініціаторних каспаз: каспази-8, каспази-9 та каспази-2, надали підґрунтя для оцінки перебігу деструктивної фази апоптозу на основі визначення активності ефекторних каспаз-3, - 6.

8.1. Дослідження активності каспази-3 у лімфоцитах тимусу та селезінки щурів за дії іонізуючої радіації

Каспаза-3 є основним представником підродини ефекторних каспаз - еволюційно консервативних цистеїнових протеїназ, які специфічно активуються в апоптичних клітинах.

На відміну від аутопротеолітичної активації ініціаторних каспаз, активація ефекторних каспаз відбувається за механізмом трансактивації, тобто за участі інших протеїназ [394] (ініціаторних каспаз-8,-9, катепсинів та калпаїнів). Саме така протеолітична активація структурує коректну організацію активного центру каспази-3.

Результати проведених досліджень представлено на рис.8.1, відповідно до яких тотальне одноразове опромінення тварин в дозах 1,0 та 7,78 Гр викликає зростання активності ефекторної каспази-3 у лімфоцитах тимусу в 1,3 раза порівняно з контролем. За опромінення у летальній дозі відбувається незначне підвищення ферментативної активності порівняно з контрольним значенням.

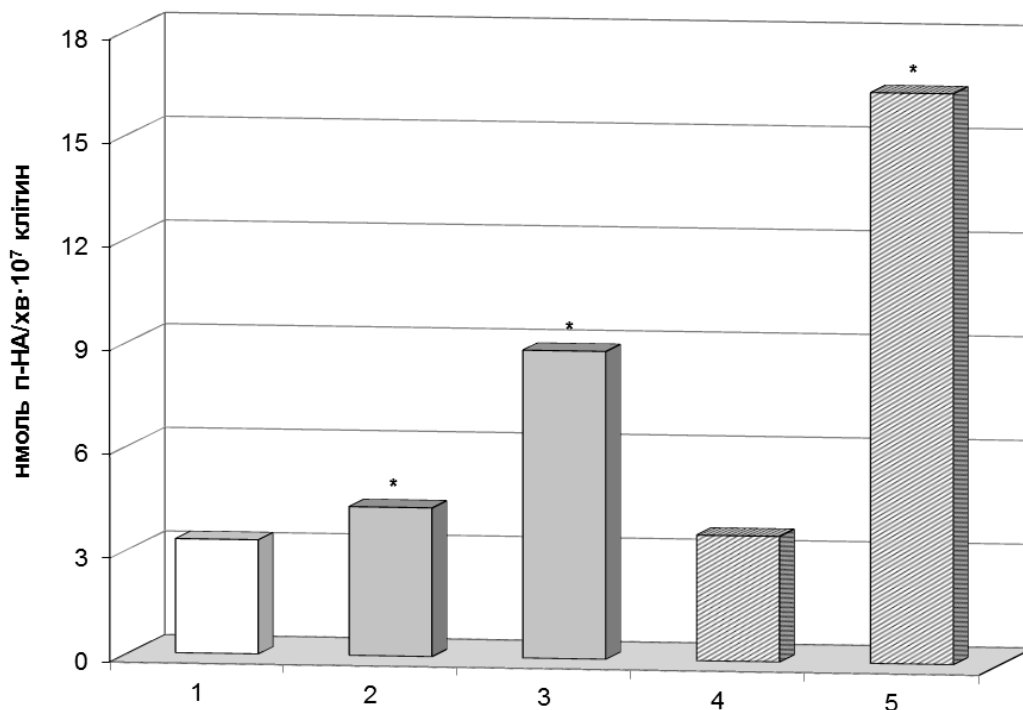


Рис. 8.1. Активність каспази-3 у лімфоцитах тимусу щурів за дії іонізуючої радіації: 1 – контроль; 2 – 1,0 Гр (30 хв після опромінення); 3 – 1,0 Гр (3 год після опромінення); 4 – 7,78 Гр (30 хв після опромінення); 5 – 7,78 Гр (3 год після опромінення); * – достовірно відносно контролю, $p < 0,05$

Через 3 год після опромінення щурів у досліджуваних дозах (1,0 та 7,78 Гр) спостерігається подальша стимуляція активності каспази-3 у лімфоцитах тимусу щурів, яка підвищувалась у 2,7 раза та у 5 раз відносно контрольних величин, відповідно за обох доз опромінення.

Дозозалежне підвищення активності каспази -3 на моделі лімфоцитів периферичної крові за опромінення в дозах 1,0-4,0 Гр продемонстровано в роботі Neyliane F.G. [395.].

Згідно з нашими даними активація каспази- 3 в популяції лімфоцитів тимусу корелює зі змінами активності ініціаторної каспази-8 (розділ 4) з максимальним піком за опромінення в дозі 7,78 Гр. Певний внесок у активаційні процеси робить цитоплазматична фракція лізосомального катепсину В, активація якого підвищена через 3 год після опромінення (розділ 6).

Дані, наведені на рис.8.2, свідчать для лімфоцитів селезінки про значно вищий рівень активності каспази-3 в контролі порівняно з даними для лімфоцитів тимусу. Згідно з нашими результатами, у лімфоцитах селезінки через 30 хв після дії іонізуючої радіації у дозі 1,0 Гр спостерігається підвищення активності каспази-3 у 1,3 раза порівняно з контрольним значенням.

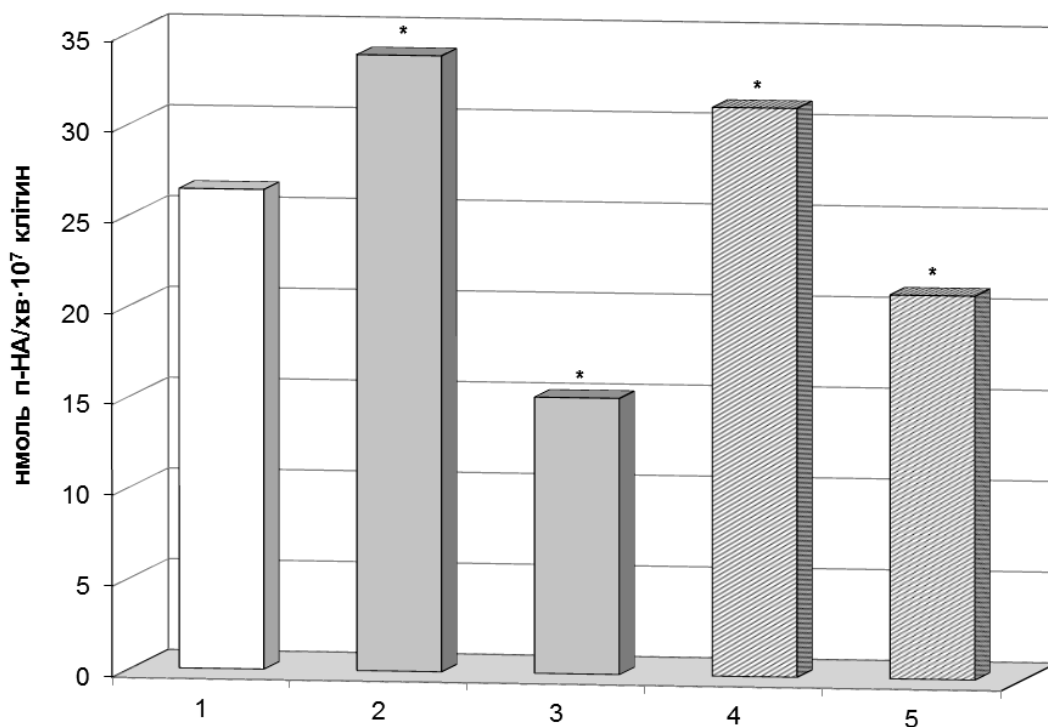


Рис. 8.2. Активність каспази-3 у лімфоцитах селезінки щурів за дії іонізуючої радіації: 1 – контроль; 2 – 1,0 Гр (30 хв після опромінення); 3 – 1,0 Гр (3 год після опромінення); 4 – 7,78 Гр (30 хв після опромінення); 5 – 7,78 Гр (3 год після опромінення);
* – достовірно відносно контролю, $p < 0,05$

В умовах експерименту було встановлено зниження активності каспази-3 у лімфоцитах селезінки через 3 год після опромінення в дозах 1,0 та 7,78 Гр. Субстратами каспази-3 є білки–учасники реалізації всіх наведених у роботі ланок радіаційно-індукованого апоптозу. Одним з функційно значущих субстратів каспази-3 є ядерний фермент полі(ADP-

рибозо)полімераза, який займає чільне місце у процесі радіаційно-індукованої загибелі імункомпетентних клітин і, на думку [396], саме каспазо-опосередкована деградація ПАРП є маркером апоптичної загибелі, нами досліджено рівень активності ферменту за дії іонізуючої радіації (розділ 3). Отримано беззаперечні підтвердження ідеї про превалюючу роль каспазо-опосередковано розщеплення ПАРП на ранніх строках після опромінення, що більш виражено за летальної дози 7,78 Гр. За даними літератури [397], субстратами каспази-3 є актинозв'язуючі білки – гелсолін і фодрин. Каспаза-3 розщеплює білок цитоскелету гелсолін, що веде до дисоціації плазматичної мембрани від цитоскелету на стадії формування апоптичних тілець. За умови деградації фодрину спостерігається порушення асиметрії бішару з подальшим виходом фосфатидилсерину на зовнішню мембрану лімфоцитів, що є маркером пізньої стадії апоптозу, результати визначення якого методом протокової цитометрії проведено в параметрах нашого експерименту.

До регуляторів апоптозу, функції яких є під контролем каспази-3, належать Вах, Bcl-2, інгібітор апоптичної ендонклеази ICAD, p65 субодиниця транскрипційного фактору NF-κB. Каспаза-3 розщепляє компонент комплексу I дихального ланцюга мітохондрій, що призводить до порушення функціонування дихального ланцюга в цілому, накопичення АКМ та порушення цілісності самої мітохондрії.

На нашу думку, радіаційно-індуковані зміни регуляторних каскадів, до яких долучаються вище перераховані фактори, залежать від їх протеолітичного статусу, що і продемонстровано у відповідних розділах роботи. Регуляція активності каспази-3 на пострансляційному рівні відбувається в основному класичними шляхами. Так, на моделі апоптозу нейтрофілів показано, що фосфорилування по серину -150 кіназою MAP-каскаду p38 інгібує активність ферменту. Каспаза-3 підлягає убіквітинуванню з подальшою деградацією в протеасомі. Згідно з [398], інгібування протеасомної активності призводить до стабілізації активованої

каспази -3, за рахунок чого можна частково інтерпретувати отримані нами дані по зниженню протеасомної активності в лімфоцитах тимусу щурів на фоні зростання рівня апоптозу. Нітрозилування ферменту призводить до значного зменшення проапоптичної респонсивності за активації Fas-залежного апоптозу.

8.2. Дослідження активності каспази-6 у лімфоцитах тимусу та селезінки щурів за дії іонізуючої радіації

Каспаза-6 є основною ефекторною каспазою (поряд з каспазою -3), яка активує деградацію білків мішеней за специфічними залишками аспарагінової кислоти. Активаційний протеолітичний каскад каспази-6 включає, ядерні білки: ламіни- В, С; ПАРП, LAP2, білок ядерного мітотичного апарату NuMA, що призводить до дезорганізації хроматину, утворення кластерів в районі ядерних пор з подальшою фрагментацією ядра.

Проте дані щодо участі каспази-6 у радіаційному апоптозі є обмежені. Тому для з'ясування внеску цієї ефекторної каспази у апоптотичній загибелі, досліджували рівень її активності на моделі лімфоцитів тимусу і селезінки щурів за дії іонізуючої радіації.

Як впливає з даних, наведених на рис.8.3 опромінення тварин в дозі 1,0 Гр активує каспазу-6; активність ферменту зростає в 1,4 та 2,1 раза через 30 хв і 3 год, відповідно. За опромінення в дозі 7,78 Гр достовірно значущі зміни відмічені тільки через 3 год після опромінення- активність ферменту підвищувалась в 3,4 рази порівняно з контрольними значеннями. Ймовірно в основу інтерпретації наведених результатів можна покласти той факт, що каспаза-6 є фізіологічним субстратом каспази-3, водночас сама каспаза-6 спроможна протеолітично активувати каспазу-3. Таким чином їх взаємна активація створює цикл ампліфікації апоптотичного протеолітичного сигналу.

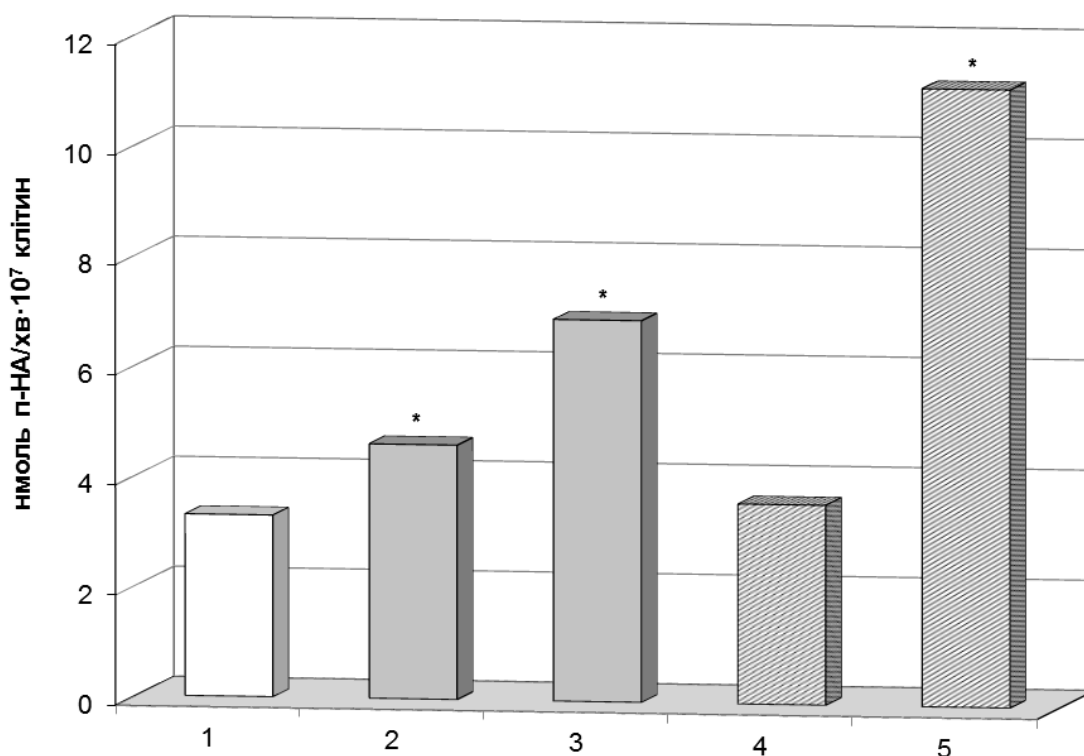


Рис. 8.3. Активність каспази-6 у лімфоцитах тимусу щурів за дії іонізуючої радіації: 1 – контроль; 2 – 1,0 Гр (30 хв після опромінення); 3 – 1,0 Гр (3 год після опромінення); 4 – 7,78 Гр (30 хв після опромінення); 5 – 7,78 Гр (3 год після опромінення);
* – достовірно відносно контролю, $p < 0,05$

Унікальна функція каспази-6 полягає у розщепленні ядерного білка p84N5, який за наявності у нього DD домена спроможний запускати ядерний шлях апоптозу, а також активувати каспазу-6. Підвищена експресія білка p84N5 викликає активацію транскрипційного фактора NF-κB, зростання рівня синтезу проапоптотичних білків Bax, Bcl-Xs та запуск мітохондріальної ланки апоптозу.

Нами досліджено активність каспази-6 у лімфоцитах селезінки щурів за дії іонізуючої радіації в низькій (1,0 Гр) та летальній (7,78 Гр) дозах іонізуючої радіації. Встановлено, що через 30 хв спостерігається підвищення активності ферменту за обох доз опромінення (рис.8.4).

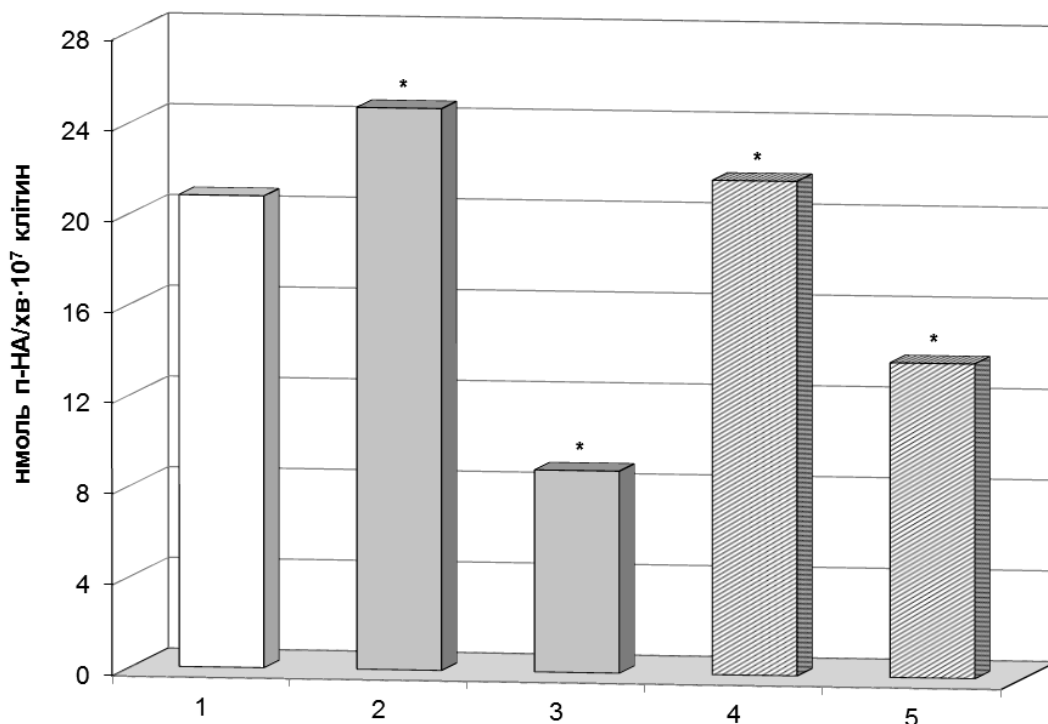


Рис. 8.4. Активність каспази-6 у лімфоцитах селезінки щурів за дії іонізуючої радіації: 1 – контроль; 2 – 1,0 Гр (30 хв після опромінення); 3 – 1,0 Гр (3 год після опромінення); 4 – 7,78 Гр (30 хв після опромінення); 5 – 7,78 Гр (3 год після опромінення); * – достовірно відносно контролю, $p < 0,05$

Водночас через 3 год після дії променевого чинника нами відмічено зниження активності ферменту, що можливо трактувати за умови можливо нижчого рівня активності ефекторної каспази-7, що також може активувати прокаспазу-6 [399]. Фосфорилування по серину 257 протеїнкіназою ARK5 призводить до інгібування каспази-6 та апоптозу в цілому.

До унікальних функцій каспази-6 можливо віднести активацію каспази-8, що також є прикладом складного ампліфікаційного каскаду, оскільки ініціаторна каспаза-8 шляхом обмеженого протеолізу активує ефекторні каспази-3,7. Регуляторні механізми на рівні транскрипції за [400]: ген *каспази-6* є p53- респонсивним. Регуляторний вплив на систему ефекторних каспаз можливо чинить дисбаланс рівня АКМ. Підґрунтям для такого твердження стала робота Sato. T. (2004), [401], де відзначено промотування

АКМ-опосередкованим чином формування апоптосоми з подальшою активацією каспази-9 та каспази-3.

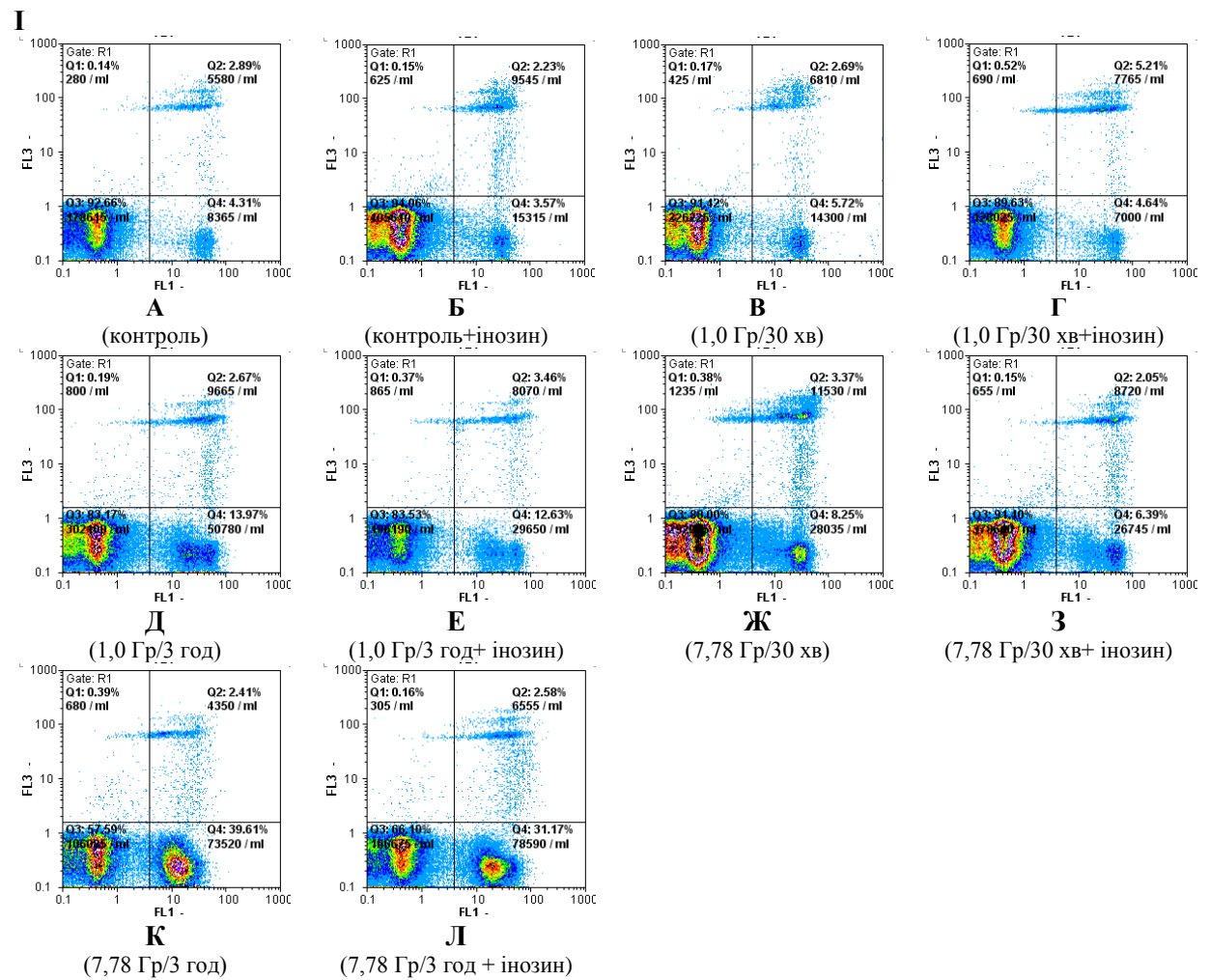
Таким чином, наведені у розділі результати досліджень свідчать про значні різнопланові ефекти променевого чинника на функціонування системи ефекторних каспаз в лімфоцитах тимусу і селезінки щурів. Відсутність вираженої залежності активності ефекторних каспаз може бути обумовлена складною амплікативною каскадною системою регуляції їх функціонування. Дослідженні каспази виступають водночас як безпосередніми ефекторами, так і виконують функцію месенджерних молекул, забезпечуючи проведення апоптотичного сигналу до відповідних клітинних компартментів на початкових етапах розвитку радіаційно-обумовленої клітинної загибелі шляхом апоптозу.

8.3. Визначення стадій перебігу радіаційно-індукованого апоптозу у лімфоцитах тимусу і селезінки щурів методом протокової цитометрії

Апоптоз – біологічно запрограмована загибель клітини, який є багатосхідчастим, алгоритмізованим процесом, що підлягає регуляції, і направлений на підтримання чисельності клітинної популяції та нормального функціонування органів і систем. На кінцевому етапі процесу відбувається елімінація апоптотичних клітин шляхом ефероцитозу [399,400] (специфічного фагоцитозу), який активується за наявності ряду специфічних, так званих "eat me", сигналів, серед яких найбільш вагомою на сьогодні вважається екстерналізація фосфатидилсерину на зовнішню мембрану комітованих на загибель клітин [401,402,403]. Для кількісного визначення певних стадій апоптозу лімфоцитів тимусу і селезінки щурів за дії променевого чинника в дозі 1,0 та 7,78 Гр (через 30 хв і 3 год після опромінення) та на фоні введення інозину застосовували метод протокової

цитометрії з використанням Анексину V (Ca^{2+} -залежного фосфоліпідзв'язуючого білка, який характеризується високою спорідненістю до фосфатидилсерину), кон'югованого з флуорохромом FITC, та суправітального барвника пропідій йодиду. Їх сукупне використання дає змогу оцінити рівень екстерналізації фосфатидилсерину на зовнішню мембрану клітини та власне зв'язування з молекулами ДНК та РНК, що свідчить про стан клітин на різних стадіях індукованої загибелі (рівні раннього і пізнього апоптозу, некрозу та ін.). В умовах нашого експерименту було ідентифіковано клітини як на ранньому етапі апоптотичної загибелі (анексин V-позитивні/пропідій йодид-негативні), так і на кінцевій стадії загибелі клітин (анексин V -позитивні/ пропідій йодид-позитивні).

Аналіз дії радіаційного чинника в дозі 1,0 Гр на лімфоцити тимусу щурів показав залежне від часу після опромінення зниження життєздатності клітин, яке через 3 год досягало 89,7% порівняно з контрольними значеннями (рис.8.5). Виявлення нами фракції анексин V-позитивних клітин (7,20%) серед контрольних лімфоцитів тимусу не суперечило даним літератури і може бути пояснено за рахунок спонтанного апоптозу [404]. Щодо загального рівня апоптотичних клітин, який визначали як суму анексин V^{FITC} (+)/пропідій йодид(-) і анексин V^{FITC} (+)/пропідій йодид(+) та анексин V^{FITC} (-)/пропідій йодид(+) клітин, то через 30 хв після опромінення в дозі 1,0 Гр спостерігається тенденція до його зростання; через 3 год після дії променевого чинника цей показник підвищується в 2,31 раза. Вплив іонізуючої радіації у дозі 7,78 Гр супроводжується більш вираженими змінами досліджуваних показників, особливо через 3 год після опромінення: згідно з даними, представленими на рис.8.5, відсоток життєздатних клітин складає 62% порівняно з контрольними величинами.

**II**

Групи тварин	Анексин V ^{ФІТЦ} (-) / пропідій йодид (-), %	Анексин V ^{ФІТЦ} (+) / пропідій йодид (-) ранні апоптотичні клітини, %	Анексин V ^{ФІТЦ} (+) / пропідій йодид (+), анексин V ^{ФІТЦ} (-) / пропідій йодид (+)		Загальний рівень апоптотичних клітин, %
			пізні апоптотичні клітини, %	пізні некротичні клітини, %	
А	92,66	4,31	3,03	2,89+0,14	7,20
Б	94,06	3,57	2,38	2,23+0,15	5,80
В	91,42	5,72	2,86	2,69+0,17	8,41
Г	89,63	4,64	5,73	5,21+0,52	9,85
Д	83,17	13,97	2,86	2,67+0,19	16,64
Е	83,53	12,63	3,83	3,46+0,37	16,09
Ж	88,00	8,25	3,75	3,37+0,38	11,62
З	91,40	6,40	2,20	2,05+0,15	8,45
К	57,59	39,61	2,80	2,41+0,39	42,02
Л	66,10	31,17	2,74	2,58+0,16	33,75

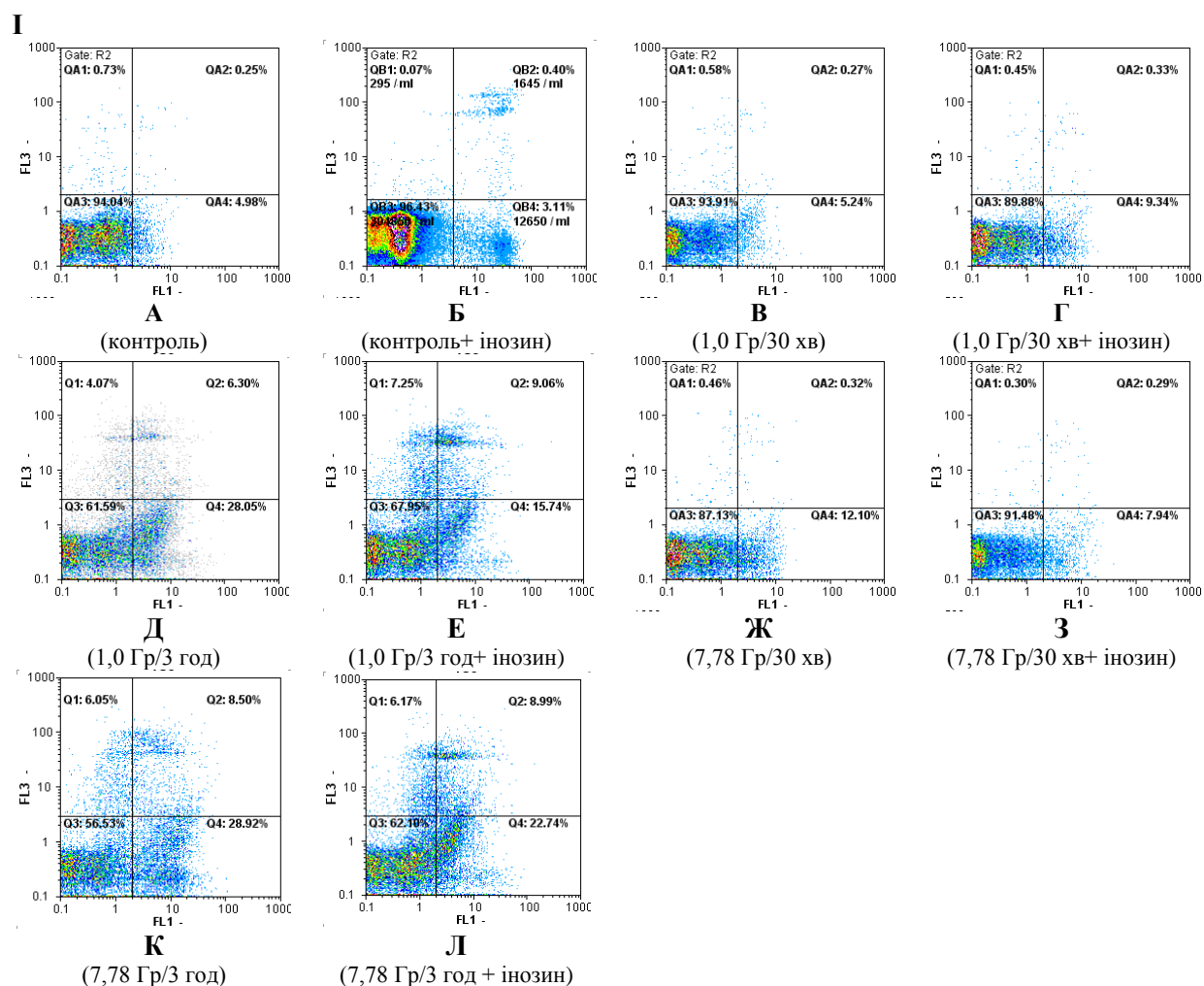
Рис.8.5. Протоковцитометричний аналіз виявлення апоптозу лімфоцитів тимусу щурів за дії іонізуючої радіації в дозі 1,0 та 7,78 Гр та на фоні введення інозину: I – двохпараметрна гістограма; II – таблиця даних, наведених у гістограмі; літерами позначені відповідні групи тварин

Дослідження впливу іонізуючої радіації на життєздатність лімфоцитів селезінки щурів представлено на рис.8.6. Наведені дані свідчать про дозо-залежне зниження кількості життєздатних клітин як через 30 хв, так і 3 год після опромінення. Через 3 год за опромінення в дозі 1,0 Гр зниження сягає 60% порівняно з контрольними величинами. Як і при дослідженні тимо-цитів виявлені нами фракції анексин V-позитивних клітин (5,23%) серед контрольних спленоцитів може бути пояснено за рахунок спонтанного апоптозу.

Згідно з представленими даними загальний рівень апоптотичних клітин в популяції лімфоцитів селезінки через 3 год після опромінення в дозі 1,0 Гр підвищується у 7,15 раза, що значно перевищує подібний показник, встановлений для лімфоцитів тимусу щурів. Стосовно впливу рентгенівського опромінення у дозі 7,78 Гр – зберігається тенденція, подібна до лімфоцитів тимусу. Отже, для популяції лімфоцитів селезінки встановлено, що через 30 хв спостерігається лише тенденція до зниження кількості життєздатних клітин, проте через 3 год після дії променевого фактора рівень життєздатних клітин знижується у 1,5 раза, в той час як загальна кількість апоптотичних клітин підвищується в 2,37 та 6,57 раза, відповідно через 30 хв та 3 год після опромінення.

Беручи до уваги залучення ряду складних метаболічних процесів, які є підґрунтям для розвитку характерних морфологічних і біохімічних ознак апоптотичної загибелі клітин, отримані нами результати корегують з даними, наведеними у відповідних розділах представленої роботи.

Згідно з літературними джерелами [299,300], порушення полімеризації актинових філаментів опосередковується розщепленням ефекторними каспазами (каспаза-3, -6) і Ca^{+} -залежними цистеїновими протеїназами (калпаїнами) молекул α -спектрину, а також регулюється протеолізом білків, які забезпечують зв'язування актинових волокон з плазматичною мембраною. В кінцевому результаті відбувається блебінг плазматичної мембрани і розпад клітин на апоптичні тільця.

**II**

Групи тварин	Анексин V ^{ФІТЦ} (-) / пропідій йодид (-), %	Анексин V ^{ФІТЦ} (+) / пропідій йодид (-) ранні апоптотичні клітини, %	Анексин V ^{ФІТЦ} (+) / пропідій йодид (+), анексин V ^{ФІТЦ} (-) / пропідій йодид (+)		Загальний рівень апоптотичних клітин, %
			пізні апоптотичні клітини, %	пізні некротичні клітини, %	
А	94,04	4,98	0,98	0,25+0,73	5,23
Б	96,43	3,11	0,47	0,40+0,07	3,51
В	93,91	5,24	0,85	0,27+0,58	5,51
Г	89,88	9,34	0,78	0,33+0,45	9,67
Д	61,59	28,05	10,37	6,30+4,07	34,35
Е	67,95	15,74	16,31	9,06+7,25	24,80
Ж	87,13	12,10	0,78	0,32+0,46	12,42
З	91,48	7,94	0,59	0,29+0,30	8,23
К	56,53	28,92	14,55	8,50+6,05	37,42
Л	62,10	22,74	15,16	8,99+6,17	31,73

Рис.8.6. Протоковцитометричний аналіз виявлення апоптозу лімфоцитів селезінки щурів за дії іонізуючої радіації в дозі 1,0 та 7,78 Гр та на фоні введення інозину: I –двохпараметрна гістограма; II- таблиця даних, наведених у гістограмі; літерами позначені відповідні групи тварин

Показано [298], що у лімфоцитах, подібно до еритроцитів, α - фодрин (нееритроїдний α - спектрин) як без по-середньо, так і опосередковано бере участь у підтриманні асиметрії ліпідного бішару мембран, а його деградація полегшує транслокацію фосфоліпідів на зовнішню поверхню плазматичної мембрани, що є важливою складовою апоптозу. На нашу думку, саме активацією вище означених протеолітичних каскадів можна пояснити виявлене нами зростання загальної кількості апоптотичних клітин в популяції лімфоцитів тимусу щурів через 3 год після опромінення у дозах 1,0 та 7,78 Гр та через 30 хв за опромінення в дозі 7,78 Гр. Згідно з наведеними у нашій роботі даними, через 3 год після опромінення за обох досліджуваних доз відмічається значне зростання активності ефektorних каспаз, а саме опромінення в дозі 1,0 Гр спричиняє підвищення активності каспази- 3 та каспази- 6 відповідно у 2,7 та у 2,1 раза, а опромінення в дозі 7,78 Гр - у 5 разів та 3,4 раза порівняно з контрольними значеннями. Водночас залучення у відповідні протеолітичні процеси калпаїнів за рахунок їх радіаційно-індукованої активації відзначається лише через 3 год після опромінення в дозі 1,0 Гр (підвищення активності ферменту на 150 % порівняно з контролем).

Співставлення отриманих результатів, які свідчать про радіаційно-опосередковане збільшення загального рівня апоптотичних клітин в популяції лімфоцитів селезінки за певних доз опромінення та часових інтервалів після його дії, з даними про активність вищеозначених цистеїнових протеаз демонструє менш вагомий внесок представленого вище шляху у біохімічну регуляцію радіаційно-індукованого апоптозу. За опромінення у дозі 7,78 Гр через 3 год після дії спостерігається підвищення активності каспази-3 у 1,2 раза порівняно з контролем та тенденція до підвищення активності каспази-6.

Крім наведених механізмів підтримання/порушення функціональної асиметрії ліпідного бішару плазматичних мембран, на особливу увагу заслу-

говує також ряд ферментів родини трансмембранних гідролаз: Mg^{2+} , АТФ-залежна специфічна амінофосфоліпід-транслоказа (фліпаза), що швидко транспортує фосфатидилсерин із зовнішнього на внутрішній бік мембрани та АТФ-залежна неспецифічна транслоказа, яка каталізує більш повільну зворотну реакцію (флопаза), та скрамблаза, що сприяє транспорту фосфоліпідів через мембрану [405,406,407].

Встановлене нами залежне від дози опромінення та часу після дії чинника зниження вмісту АТФ та порушення метаболізму пуринів в цілому призводить до дерегуляції активності фліпаз та флопаз [408].

Водночас посилення генерації активних форм кисню та інтенсифікація перекисного окислення біологічних субстратів за дії іонізуючої радіації виступають регуляторами активності Mg^{2+} , АТФ-залежної амінофосфоліпід-транслокази. Відзначається пригнічення активності ферменту як за умови окиснення залишків цистеїну в активному центрі, так і у випадку окислення його субстратів—фосфатидилсерину та фосфатидилетаноламіну [409].

Припускають, що не стільки екстерналізація фосфатидилсерину, а його оксидативний статус і розміщення у специфічних ліпідних угрупованнях плазматичної мембрани (lipid rafts) є визначальними ознаками апоптозу [410, 411].

Саме посиленням генерування супероксидного аніон-радикалу (O_2^{\bullet}), як найбільш реакційно-здатного представника АКМ (розділ 7), імовірно пояснюється зростання пулу апоптотичних клітин в популяції лімфоцитів тимусу щурів через 3 год після опромінення у дозах 1,0 і 7,78 Гр та через 30 хв за опромінення в дозі 7,78 Гр; щодо лімфоцитів селезінки, то підвищення рівня апоптотичних клітин спостерігається через 3 год після опромінення в дозі 1,0 Гр та через 30 хв за опромінення в дозі 7,78 Гр.

Вважається, що процес окислення фосфатидилсерину опосередковується за рахунок пероксидазної активності гем-вмісного білка цитохрому с, вивільнення якого з мітохондрій за активізації окисного стресу

запускає мітохондріальну ланку апоптозу (структурування апоптосоми). Висловлене припущення є цілком закономірним як з огляду на літературні джерела [412,413,414], так і підтверджується наведеними в роботі результатами щодо радіаційно-індукованої активації каспази-9 в умовах нашого експерименту, яка поряд з цитохромом *c* є структурною субодиницею апоптосоми. Аналіз наведених даних дозволяє стверджувати: оксидативний статус експонованого на зовнішній бік плазматичної мембрани фосфатидилсерину є визначальним маркером за дії радіаційного апоптотичного чинника.

Щодо ферментів скрамблаз, то на сьогодні розрізняють як мінімум два їх типи. Ca^{2+} -залежні скрамблази (16F), зростання активності яких може регулюватись радіаційно-індукованим підвищенням внутрішньоклітинної концентрації Ca^{2+} . Скрамблази другого типу не є Ca^{2+} -залежними, їх активація відбувається за рахунок часткового протеолізу, опосередкованого каспазами-3, -7 (Xkr8) та виключно каспазою-3 (Xkr4) [415].

Отже, ефекторні каспази ще одним способом залучаються у реалізацію біохімічних процесів, пов'язаних з апоптотичною загибеллю клітин за дії променевого чинника. Ймовірно припустити, що завдяки активізації скрамблаз другого типу (каспазо-7 активованих) спостерігається значне підвищення загального рівня апоптотичних клітин у популяції лімфоцитів селезінки через 3 год після дії променевого чинника у дозі 7,78 Гр.

Таким чином, одержані результати свідчать про значну кореляцію між активацією цистеїнових протеїназ (каспаз, калпаїнів) та транслокацією фосфатидилсерину і можуть бути пояснені протеолітичним розщепленням білків цитоскелету та порушенням функціонування систем транс-мембранного переносу фосфоліпідів, що, на фоні індукованої опромінення інтенсифікації процесів вільнорадикального окиснення ліпідів мембран, значно прискорює структурні і функціональні зміни у лімфоцитах тимусу та селезінки.

Представлені дані щодо впливу інозину на виживання лімфоцитів тимусу і селезінки за умови опромінення щурів у обох дозах вказують на його частково нормалізуючий ефект, ймовірно, переважно за рахунок встановлених антиоксидантних властивостей, що виявляється як за безпосередньої дії продукту розпаду інозину – сечової кислоти, так і за умови модуляції численних про-антиоксидантних систем. До механізмів, які опосередковують потенційну модулюючу дію інозину, належить система пурінергічних рецепторів, які активують серед інших трансдукційні шляхи MAP-кіназ (родини JNK) [71]..

РОЗДІЛ 9

ОЦІНКА РІВНЯ АТФ ТА ФУНКЦІОНУВАННЯ СИСТЕМИ ОБМІНУ ПУРИНІВ ЗА РАДІАЦІЙНО-ІНДУКОВАНОГО АПОПТОЗУ

Підтримання енергетичного балансу у клітині є необхідним для реалізації складних метаболічних процесів. Згідно з даними літератури, зниження внутрішньоклітинного рівня АТФ є одним з ранніх характерних проявів радіаційного ураження клітинних обмінних процесів [280], та можливим реостатом у виявленні апоптотичного/некротичного шляху загибелі клітин за дії променевого чинника [57].

Загально визнано, що апоптоз, як і система репарації ДНК та зупинка клітинного циклу, є енергоємним процесом, тому підтримання певного співвідношення АТФ/АДФ у клітині за умови радіаційно-обумовленого порушення функціонування систем енергозабезпечення, є маркером перебігу радіаційно-індукованого апоптозу [416].

Вищенаведені факти породжують питання про основних "споживачів" АТФ за реалізації програмованої клітинної загибелі. На думку Eguchi Y. et al [417] та Chiarugi A. [418] основним джерелом використання АТФ (дезоксид – АТФ) є мітохондріальний шлях апоптозу, а саме утворення апоптосом з залученням каспази-9 та подальшої активації ефекторного каспазного каскаду. Автори також відмічають вплив АТФ на процеси транспорту проапоптотичних факторів всередину ядра: каспази-2, -3, AIF та ін.

Аналіз біохімічних аспектів апоптозу дав змогу виділити процеси, що призводять до утилізації клітинних запасів АТФ: активація системи протеїнкіназ та аденозинтрифосфатаз різної специфічності, які беруть участь у апоптотичному сигналінгу; зміна концентрації цАМФ; функціонування АТФ-залежних транслоказ, які підтримують асиметрію ліпідного бішару, та системи Ca^{2+} -сигналінгу; лізосомальної ланка апоптозу та системи

протеасомної деградації білків. Просторова стабілізація ушкоджених ланцюгів ДНК за дії променевого чинника проходить з залучення процесів полі(ADP)рибозилування, каталізованих ПАРП, що також пов'язано з використанням значної кількості НАД – субстрату ПАРП.

З огляду на вище наведене, наступним етапом роботи було визначення рівня АТФ та стану системи обміну пуринів за радіаційно-індукованого апоптозу.

9.1. Вміст АТФ у тимусі і селезінці щурів за дії іонізуючої радіації та на фоні введення інозину

Для розуміння біохімічних механізмів радіаційно-індукованого порушення функціонування лімфоцитів важливо дослідити вміст АТФ у лімфоїдних органах щурів на ранніх стадіях розвитку променевого ефекту.

Згідно з результатами досліджень, представлених на рис. 9.1, опромінення щурів в дозі 1,0 Гр призводить до зменшення рівня АТФ у тимусі щурів у 1,5 та 1,3 раза через 30 хв та 3 год після впливу, відповідно. Підвищення дози радіації до 7,78 Гр призводить до подальшого зниження вмісту АТФ у 1,75 раза (через 30 хв після впливу), що становить 60% від контролю. Через 3 год після опромінення щурів в дозі 7,78 Гр рівень АТФ в тимусі знижується в 2,2 раза порівняно з контрольними показниками.

За дії на щурів рентгенівського випромінювання на фоні попереднього введення інозину (рис.9.1) спостерігається підвищення вмісту АТФ як після опромінення в дозі 1,0 Гр так і за опромінення у летальній дозі.

Дослідження вмісту АТФ у селезінці щурів за дії радіаційного чинника виявили зниження вмісту макроерга за обох доз рентгенівського випромінювання (результати представлено на рис. 9.2).

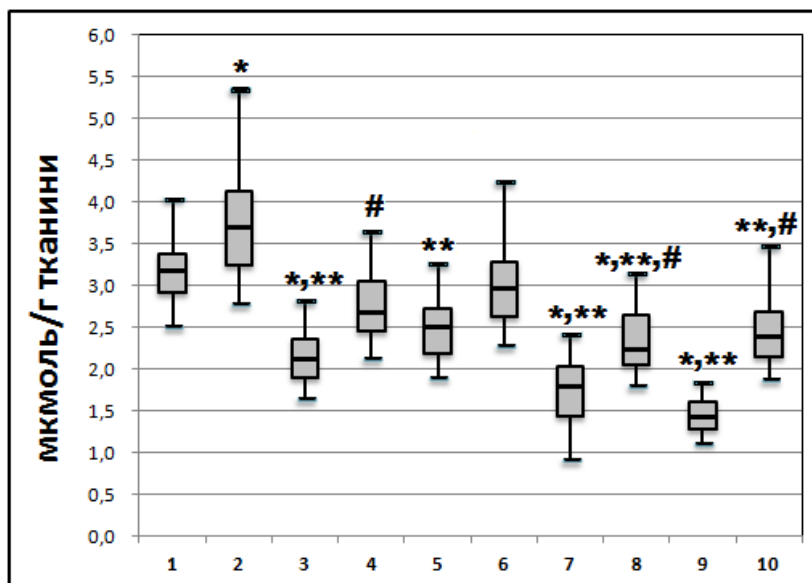


Рис. 9.1. Вміст АТФ у лімфоцитах тимусу щурів через 30 хв та 3 год після впливу іонізуючої радіації на фоні введення інозину ($M \pm SD$, $n = 5$): 1 – контроль; 2 – контроль + інозин; 3 – через 30 хв після опромінення у дозі 1,0 Гр; 4 – через 30 хв після опромінення у дозі 1,0 Гр + інозин; 5 – через 3 год після опромінення у дозі 1,0 Гр; 6 – через 3 год після опромінення у дозі 1,0 Гр + інозин; 7 – через 30 хв після опромінення у дозі 7,78 Гр; 8 – через 30 хв після опромінення у дозі 7,78 Гр + інозин; 9 – через 3 год після опромінення у дозі 7,78 Гр; 10 – через 3 год після опромінення у дозі 7,78 Гр + інозин

Так, через 30 хв після опромінення тварин у дозі 1,0 Гр у селезінці щурів вміст АТФ становив 71% від контрольного показника. значення контролю (рис.9.2); через 3 год цей показник складає 53% від контролю.

При підвищенні дози опромінення до 7,78 Гр спостерігається подальше зниження концентрації АТФ у селезінці щурів порівняно з контрольними показниками: через 30 хв – в 2,4 раза та в 1,3 раза через 3 год після впливу іонізуючої радіації.

Представлені дані узгоджуються з роботами [419,420], де було описано зниження концентрації АТФ у радіочутливих органах на ранніх етапах розвитку променевого ефекту. Також постпроменеве зниження пулу макроергу пов'язують з радіаційними порушеннями метаболізму пуринів.

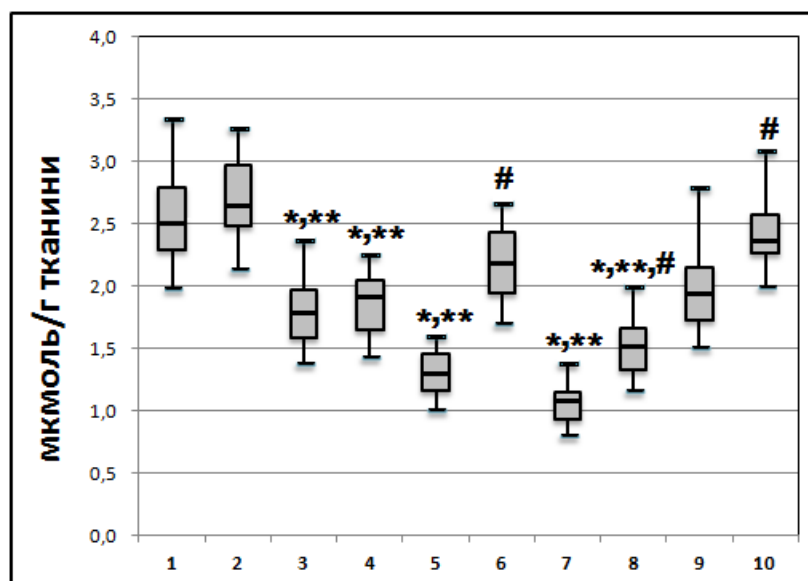


Рис.9.2. Вміст АТФ у лімфоцитах селезінки щурів через 30 хв та 3 год після впливу іонізуючої радіації на фоні введення інозину ($M \pm SD$, $n = 5$): 1 – контроль; 2 – контроль + інозин; 3 – через 30 хв після опромінення у дозі 1,0 Гр; 4 – через 30 хв після опромінення у дозі 1,0 Гр + інозин; 5 – через 3 год після опромінення у дозі 1,0 Гр; 6 – через 3 год після опромінення у дозі 1,0 Гр + інозин; 7 – через 30 хв після опромінення у дозі 7,78 Гр; 8 – через 30 хв після опромінення у дозі 7,78 Гр + інозин; 9 – через 3 год після опромінення у дозі 7,78 Гр; 10 – через 3 год після опромінення у дозі 7,78 Гр + інозин

Таким чином, в параметрах нашого експерименту з використанням хемілюмінесцентного методу було встановлено, що після дії променевого чинника вміст АТФ зберігається на рівні, достатньому для перебігу радіаційно-індукованого апоптозу. Слід зазначити, що за умови опромінення тварин на фоні введення інозину, відмічається його нормалізуючий ефект, що пояснюється включенням цього природного пуринового метаболіту до анаболічної ланки обмінних процесів.

9.2. Катаболізм пуринів у лімфоцитах тимусу і селезінки щурів за дії іонізуючої радіації

На сьогодні, згідно з даними літератури [421,422], можна констатувати важливу роль метаболітів пуринового обміну, зокрема його аденілової

складової, у процесах диференціювання, проліферації та забезпеченні нормального функціонування лімфоїдних клітин.

Дисбаланс рівня внутрішньоклітинного АТФ та стимуляція катаболічних реакцій перетворення аденозину нуклеотидів призводить до зміни активності спряжених метаболічних циклів, порушення рівноважних концентрацій пуринів та піримідинів і, як наслідок, до пригнічення функцій лімфоцитів та виявлення їх загибелі шляхом апоптозу

Для кращого розуміння біохімічних механізмів радіаційно-індукованого порушення функціонування лімфоцитів та можливих шляхів регуляції і корекції їх метаболізму важливо дослідити вміст метаболітів пуринового обміну за розвитку променевого ефекту. Оскільки, згідно з попередніми результатами, узгодження ряду метаболічних шляхів, в які залучені пурини, є більш пізньою подією, ми зосередили свої дослідження дії іонізуючого опромінення в дозах 1,0 та 7,78 Гр через 3 год після впливу променевого чинника.

Про зміни внутрішньоклітинного рівня компонентів аденозину системи робили висновок по включенню ізотопної мітки C^{14} -аденозину у фонд досліджуваних сполук.

Відповідно до одержаних результатів за дії іонізуючого випромінювання в дозах 1,0 та 7,78 Гр спостерігається пригнічення включення C^{14} -аденозину у нуклеотидтрифосфатний пул клітин тимусу та селезінки, що може бути пов'язано з порушенням транспорту аденозину всередину клітини і, разом з тим, можливе за рахунок зниження вмісту клітинного АТФ внаслідок посилення його розпаду. Через 3 год після опромінення в дозі 1,0 Гр кількість радіоактивної мітки у фракції АТФ клітин тимусу зменшувалася на 14% порівняно з контролем (табл. 9.1). За дії на щурів іонізуючої радіації у летальній дозі спостерігається подальше зниження включення мітки у фонд АТФ, що становить 75% від її включення у аденозинтрифосфатний пул тимоцитів контрольних тварин. У спленоцитах

включення C^{14} -аденозину у фракцію АТФ зменшується на 16% для 1,0 Гр та на 30% за дії променевого чинника в дозі 7,78 Гр (табл. 9.2). Ці дані узгоджуються з результатами досліджень [423], де було продемонстровано зниження концентрації АТФ у радіочутливих органах на ранніх етапах розвитку променевого ефекту.

Таблиця 9.1

Рівень включення C^{14} -аденозину у метаболіти пуринового обміну лімфоцитів тимусу щурів за дії іонізуючої радіації (імп/хв на 10^7 клітин) ($M \pm m$; n=6)

Метаболіти	Контроль	1,0 Гр	7,78 Гр
АТФ	5521±990	4707±765	4180±680*
АДФ	637±61	473±42*	429±39*
АМФ	270±20	321±22*	370±31*
ІМФ	1010±94	1613±76*	2144±201*
Аденозин	248±35	156±18*	143±15*
Інозин	967±97	1241±111*	1132±132
Гіпоксантин	250±22	287±26	370±44*
Аденін	309±28	169±20*	224±28*

* – різниця з контролем достовірна, $p < 0,05$

Зниження рівня клітинного АТФ викликає активізацію катаболічної ланки перетворення аденілових нуклеотидів, які через недостатнє енергозабезпечення нездатні повністю реутилізуватися, накопичуються у цитоплазмі та посилено вивільняються у позаклітинне середовище [424,425]. В результаті такої послідовності реакцій найбільших втрат зазнає саме фракція АТФ, оскільки надлишок АМФ відразу ж дезамінується з подальшим вивільненням з клітини значної частини гіпоксантину.

Згідно з даними, представленими у табл. 9.1, за дії іонізуючого випромінювання відбувається пригнічення включення C^{14} -аденозину у

внутрішньоклітинний пул АДФ лімфоцитів тимусу. Так, за опромінення тварин в дозах 1,0 та 7,78 Гр спостерігається статистично вірогідне зниження рівня C^{14} -АДФ відповідно у 1,3 та 1,5 раза.

Таблиця 9.2

Рівень включення C^{14} -аденозину у метаболіти пуринового обміну лімфоцитів селезінки щурів за дії іонізуючої радіації (імп/хв на 10^7 клітин) ($M \pm m$; n=6)

Метаболіти	Контроль	1,0 Гр	7,78 Гр
АТФ	2241±425	1897±563	1572±198*
АДФ	718±64	601±54*	1041±101*
АМФ	622±59	778±76*	1159±94*
ІМФ	439±52	547±54	736±57*
Аденозин	178±22	335±41*	345±39*
Інозин	2408±196	1803±160*	3166±230*
Гіпоксантин	970±84	1389±130*	1117±100
Аденін	184±26	234±34	331±32*

* – різниця з контролем достовірна, $p < 0,05$

У клітинах селезінки відмічається різнонаправлений характер включення ізоотопу у фракцію АДФ: у відповідь на дію випромінювання в дозі 1,0 Гр кількість мітки знижується у 1,2 раза, в той час як підвищення дози до 7,78 Гр призводить до зростання загальної радіоактивності фракції аденозин-5'-дифосфату у 1,5 раза порівняно з контрольним значенням (табл. 9.2).

Таким чином, зменшення кількості радіоактивної мітки у фракції АДФ на фоні посиленого розпаду АТФ може свідчити про порушення реакцій фосфорилування мононуклеотидів чи подальше інтенсивне розщеплення

аденозин-5'-дифосфату, що підтверджується акумуляцією у клітинах АМФ, причому у спленоцитах кількість ізотопної мітки, що включилася у фонд аденозин-5'-монофосфату, виявилася вищою. Як видно з наведених результатів, за опромінення тварин вищезгаданими дозами кількість C^{14} -АМФ у лімфоїдних клітин тимусу і селезінки зростала відповідно на 18 та 25% відносно контролю для дози 1,0 Гр та на 37 і 86% при опроміненні щурів в дозі 7,78 Гр.

Оскільки одним з можливих шляхів деградації клітинного АТФ є його дезамінування, доцільно було дослідити вміст продукту деградації АМФ-ІМФ за дії променевого чинника. Згідно з нашими даними, через 3 год після рентгенівського опромінення щурів спостерігається значне зростання включення C^{14} -аденозину у пул ІМФ лімфоцитів тимусу та селезінки. За опромінення в дозі 1,0 Гр кількість радіоактивної мітки у фракції ІМФ зростає у 1,2 і 1,6 рази, відповідно для клітин селезінки та тимусу. Опромінення щурів у летальній дозі призводить до подальшого збільшення кількості C^{14} -ІМФ у спленоцитах, що становить 168% від значення контролю. У тимоцитах за радіаційного впливу в дозі 7,78 Гр включення мітки у фонд інозинової кислоти зростає вдвічі. На підставі отриманих даних можна припустити, що у лімфоїдних клітинах радіочутливих органів за дії іонізуючої радіації відбувається інтенсифікація процесів деградації АМФ з утворенням ІМФ.

Включення C^{14} -аденозину переважно у пул аденозин- та інозин-5'-монофосфатів лімфоцитів опромінених тварин призводить до значного розведення радіоактивної мітки у даних метаболітах, що на фоні посилення реакцій деградації АТФ та інгібування процесів синтезу макроергу обумовлює зниження кількості міченої речовини у фракції АТФ.

Деградація аденілатів супроводжуються акумуляцією у клітинах пуринових нуклеозидів. Аденозин та інозин – субстрати двох послідовних етапів катаболізму аденілових нуклеотидів. В умовах нашого експерименту рівень ізотопної мітки у продуктах деградації нуклеотидів відрізняється від

аналогічних показників у контролі, причому характер цих змін у лімфоїдних клітинах тимусу та селезінки відмінний. З результатів, наведених у табл. 9.2, видно, що при опроміненні тварин в дозі 1,0 Гр включення мітки у внутрішньоклітинний фонд аденозину клітин селезінки зростає у 1,9 раза, в той час як у лімфоцитах тимусу спостерігається зниження кількості C^{14} -аденозину у 1,6 раза. Щодо включення мітки у пул інозину, то у спленоцитах щурів, опромінених в дозах 1,0 Гр та 7,78 Гр має місце, відповідно, пригнічення включення у 1,4 раза та зростання кількості C^{14} -інозину у 1,3 раза порівняно з контролем. У тимоцитах спостерігається збільшення кількості радіоактивної мітки у фракції інозину у 1,3 раза у відповідь на дію радіації в дозі 1,0 Гр та певне її зниження (на 8,8%) за радіаційного впливу в дозі 7,78 .

Одним з можливих механізмів відновлення фонду аденілових нуклеотидів є утилізація пуринової основи аденіну, вміст якої у клітинах значно зростає під час посилення розпаду нуклеїнових кислот. Слід зазначити, що через низьку фосфорилітичну активність ферменту аденінфосфорибозилтрансферази (АФРТ) лімфоцитів, аденілова кислота не може розщеплюватися до аденіну [426]. Враховуючи важливе значення даної основи для підтримання стабільного фонду клітинного АМФ, було розглянуто дію іонізуючого випромінювання на включення C^{14} -аденозину у фракцію аденіну. Як видно з табл. 9.2 у лімфоїдних клітинах селезінки спостерігається посилення включення міченої сполуки у фонд аденіну, що за умови опромінення щурів у дозах 1,0 і 7,78 Гр становить 127 та 180% від контрольних значень. Оскільки утилізація клітинного аденіну, з одного боку, прямо залежить від концентрації ФРПФ (5-фосфорибозил-1-пірофосфату), а дія іонізуючої радіації супроводжується зниженням у клітинах рівня останнього і, разом з тим, вміст аденіну визначається активністю ферменту АФРТ, зростання кількості C^{14} -аденіну у спленоцитах може свідчити про пригнічення активності даного ферменту. У лімфоцитах тимусу, навпаки, має

місце зниження кількості мітки у фракції аденіну у 1,8 раза при дії променевого чинника в дозі 1,0 Гр і у 1,4 раза за опромінення тварин в дозі 7,78 Гр. Одержані нами дані не суперечать результатам роботи [427], де автори вказують на стимуляцію аденінфосфорибозилтрансферазної активності у гомогенатах тимусу впродовж перших двох годин після опромінення щурів в дозі 8,0 Гр та значне інгібування АФРТ у подальшому.

Одним з кінцевих продуктів розпаду аденілових нуклеотидів у лімфоцитах щурів є гіпоксантин. Нами показано, що дія іонізуючої радіації призводить до акумуляції у клітинах даної пуринової основи. Так, за дії рентгенівського випромінювання в дозах 1,0 Гр і 7,78 Гр спостерігається зростання кількості мітки у фракції гіпоксантину лімфоцитів тимусу (табл.9.1) відповідно на 15 та 48%. У лімфоцитах селезінки (табл.9.2) досліджуваний показник зростав у 1,4 раза для дози 1,0 Гр та у 1,2 раза при опроміненні щурів в дозі 7,78 Гр. На нашу думку, акумуляція у клітинах гіпоксантину, яка корелює у часі з зниженням включення C^{14} -аденозину у фракцію АТФ та супроводжується вираженим дисбалансом вмісту решти пуринових інтермедіатів, є ще одним доказом на користь стимуляції катаболічної ланки перетворення аденілатів. Таким чином, метаболічна ситуація у лімфоїдних клітинах радіочутливих органів на початкових етапах індукованої радіацією апоптотичної загибелі характеризується значним порушенням обміну пуринів, що пов'язано з посиленням деградації аденілових нуклеотидів.

Незважаючи на важливу біологічну роль зазначених нуклеотидів у клітинних обмінних процесах як за нормальних умов, так і під час розвитку ряду імунодефіцитних та аутоімунних станів, на теперішній час практично не дослідженими залишаються механізми, зокрема ензиматичні, що обумовлюють розвиток порушень метаболізму пуринових нуклеотидів за променевого ураження. Тому дослідження характеру змін активності ферментів метаболізму аденілових нуклеотидів, з'ясування причин та

можливих шляхів регуляції ферментативної активності має важливе значення для кращого розуміння молекулярних механізмів дії іонізуючої радіації та комітування лімфоцитів на шлях програмованої клітинної загибелі.

9.3. Активність ферментів метаболізму пуринів у лімфоцитах тимусу та селезінки щурів за дії іонізуючої радіації та на фоні введення інозину

Наступним завданням було дослідити активність ферментів аденозиндезамінази, пурипнуклеозидфосфорилази, АМФ-дезамінази, 5'-нуклеотидази, які обумовлюють направленість катаболічних перетворень пуринів та аденілаткінази (АК) – ферменту анаболічної ланки метаболізму аденілових нуклеотидів за дії рентгенівського випромінювання.

За фізіологічних умов у клітинах підтримується рівновага між фосфорними похідними аденілової кислоти, перефосфорилування яких протікає за участю ферменту аденілаткінази, що каталізує реакцію синтезу АДФ при використанні АТФ і АМФ та об'єднує ці нуклеотиди у загальний внутрішньоклітинний фонд. У клітинах опромінених тварин відбуваються метаболічні перебудови, які пов'язані не тільки зі зміною концентрації інтермедіатів пуринового обміну, а й з порушенням співвідношення між окремими компонентами аденілової системи.

Згідно з нашими даними, за дії іонізуючої радіації спостерігаються значні порушення у функціонуванні АК, причому характер цих змін у лімфоїдних клітинах тимусу та селезінки відрізняється. Через три години після дії на тварин рентгенівського випромінювання в дозах 1,0 та 7,78 Гр відбувається стимуляція активності ферменту у тимоцитах, в той час у лімфоцитах селезінки має місце пригнічення ферментативної активності АК.

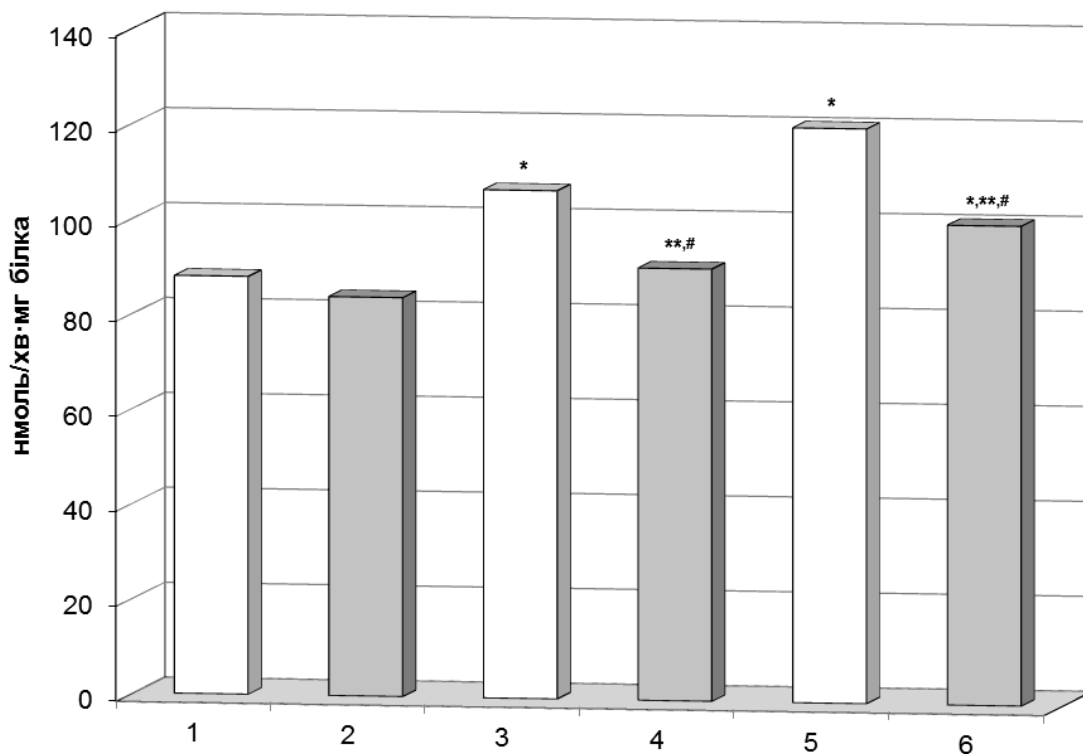


Рис. 9.3. Аденілаткіназна активність у лімфоцитах тимусу щурів за дії іонізуючої радіації та на фоні введення інозину: 1 – контроль; 2 – контроль + інозин; 3 – опромінення в дозі 1,0 Гр; 4 – опромінення в дозі 1,0 Гр + інозин; 5 – опромінення в дозі 7,78 Гр; 6 – опромінення в дозі 7,78 Гр+ інозин
 * – достовірно відносно контролю,
 ** – достовірно відносно контролю на фоні введення інозину;
 # – достовірно відносно відповідних опромінених груп,
 $p < 0,05$

На рис. 9.3 представлено результати дослідження аденілаткіназної активності у лімфоцитах тимусу, відповідно до яких за опромінення в дозі 1,0 Гр активність АК становила 121% від активності ферменту у тимоцитах контрольних тварин. При підвищенні дози випромінювання до 7,78 Гр спостерігається подальше зростання аденілаткіназної активності і на третю годину активність АК складала 137% від контрольного значення, що супроводжується інтенсифікацією перетворення АТФ і АМФ в АДФ. Отримані нами дані узгоджуються з результатами дослідження [428], де

було продемонстровано стимуляцію активності ферменту після дії променевого чинника.

Введення піддослідним тваринам за 15 хв до опромінення інозину призводить до статистично вірогідного зниження активності АК на 15 та 16% порівняно з активністю ферменту у тимоцитах щурів, опромінених відповідно в дозах 1,0 та 7,78 Гр.

Метаболічні перебудови, зумовлені дією іонізуючої радіації, пов'язані насамперед з посиленням використання енергетичних ресурсів клітини для забезпечення репарації пошкоджень макромолекул, клітинних структур та розвитку енергозалежних апоптичних процесів. Оскільки у тимоцитах за нормальних умов основним шляхом метаболізму АМФ є його фосфорилування в аденілаткіназній реакції [429], можна припустити, що показане нами зростання активності ферменту за умови опромінення є своєрідним компенсаторним механізмом і спрямовано на збереження аденіннуклеотидного фонду. Так, у результаті активізації процесів деградації АТФ останній розщеплюється до пірофосфату та АМФ. При цьому АМФ використовується в аденілаткіназній реакції, що супроводжується зростанням у клітині рівня АДФ та його подальшим включенням у процеси, пов'язані з ресинтезом аденозинтрифосфату.

На нашу думку, зростання активності АК у лімфоцитах тимусу щурів може бути пов'язано як з безпосередньою стимуляцією цитозольної форми ферменту через накопичення у клітинах одного з субстратів реакції (АМФ), так і за рахунок перерозподілу ферментативної активності між структурними компонентами клітини та цитоплазмою. Згідно з роботою [430], під час розвитку програмованої клітинної загибелі має місце порушення структурної цілісності мітохондріальної мембрани та вивільнення з міжмембранного простору поряд з апоптогенними чинниками і ізоферменту аденілаткінази II. Водночас така значна інтенсифікація процесів фосфорилування аденілової кислоти, що корелює у часі з пригніченням реакцій окисного

фосфорилування у тимоцитах щурів в результаті призводить до зниження вмісту АТФ і поряд з іншими механізмами обумовлює виснаження внутрішньоклітинного пулу АТФ.

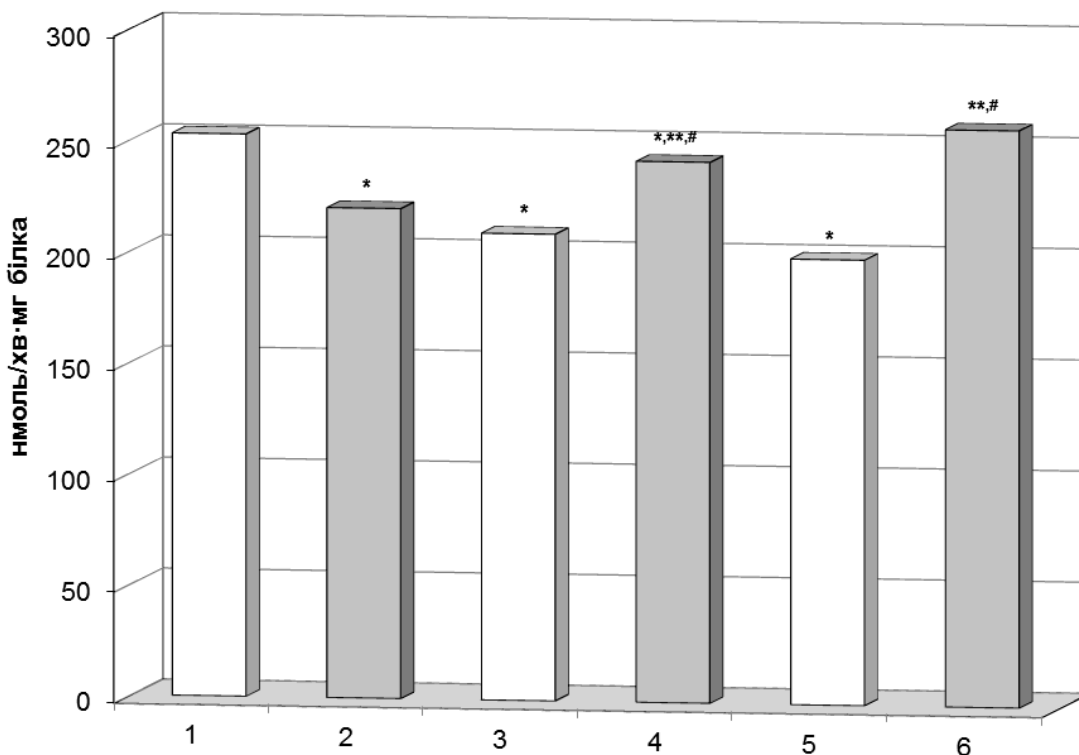


Рис. 9.4. Аденілаткіназна активність у лімфоцитах селезінки щурів за дії іонізуючої радіації та на фоні введення інозину: 1 – контроль; 2 – контроль + інозин; 3 – опромінення в дозі 1,0 Гр; 4 – опромінення в дозі 1,0 Гр + інозин; 5 – опромінення в дозі 7,78 Гр; 6 – опромінення в дозі 7,78 Гр+ інозин
 * – достовірно відносно контролю,
 ** – достовірно відносно контролю на фоні введення інозину;
 # – достовірно відносно відповідних опромінених груп,
 $p < 0,05$

У лімфоцитах селезінки спостерігається пригнічення ферментативної активності АК за променевого ураження. Так, у відповідь на дію іонізуючої радіації в дозі 1,0 Гр відбувається статистично вірогідне зниження активності АК у 1,2 раза. З рис. 9.4 видно, що одноразове опромінення щурів рентгенівським опроміненням в дозі 7,78 Гр викликає пригнічення ферментативної активності АК на 21% порівняно з контрольним значенням,

що супроводжується зменшенням інтенсивності взаємоперетворення аденілових нуклеотидів.

Слід зазначити, що за умови опромінення щурів на фоні попереднього введення інозину, відмічається нормалізуючий ефект препарату – активність ферменту зростала на 16% порівняно з активністю АК спленоцитів щурів, що зазнали дії випромінювання в дозі 1,0 Гр та у 1,3 раза для тварин, опромінених у летальній дозі. Характерною рисою кінетики аденілаткіназної реакції є конкурентне інгібування продуктами реакції та її легка оборотність. Тому зниження активності АК у спленоцитах щурів може бути обумовлено зменшенням внутрішньоклітинної концентрації АТФ.

Одним з можливих механізмів деградації інтрацелюлярного АМФ є його гідролітичне дезамінування за участю ферменту АМФ-дезамінази (АД) з утворенням інозинової кислоти та аміаку. Ця реакція має важливе значення у метаболізмі клітини, оскільки вона зсуває рівновагу між різними фосфорними похідними аденілатів. Так, з одного боку фермент АД контролює внутрішньоклітинний рівень АМФ, з іншого - через накопичення ІМФ, сприяє ініціації реакцій синтезу пуринових нуклеотидів, зокрема АТФ.

Результати проведених досліджень представлено на рис. 9.5-9.6, відповідно до яких рентгенівське опромінення щурів в дозах 1,0 та 7,78 Гр викликає порушення функціональної активності АД, а саме – стимуляцію АМФ-дезаміназної активності, причому в обох досліджуваних органах спрямованість цих змін виявилася однаковою. За умови опромінення у летальній дозі спостерігається стимуляція ферментативної активності АД, яка становить 126% від активності ферменту у тимоцитах інтактних тварин. При дії променевого чинника на фоні попереднього введення інозину відмічається наближення активності АД до контрольних величин за обох доз опромінення (рис.9.5).

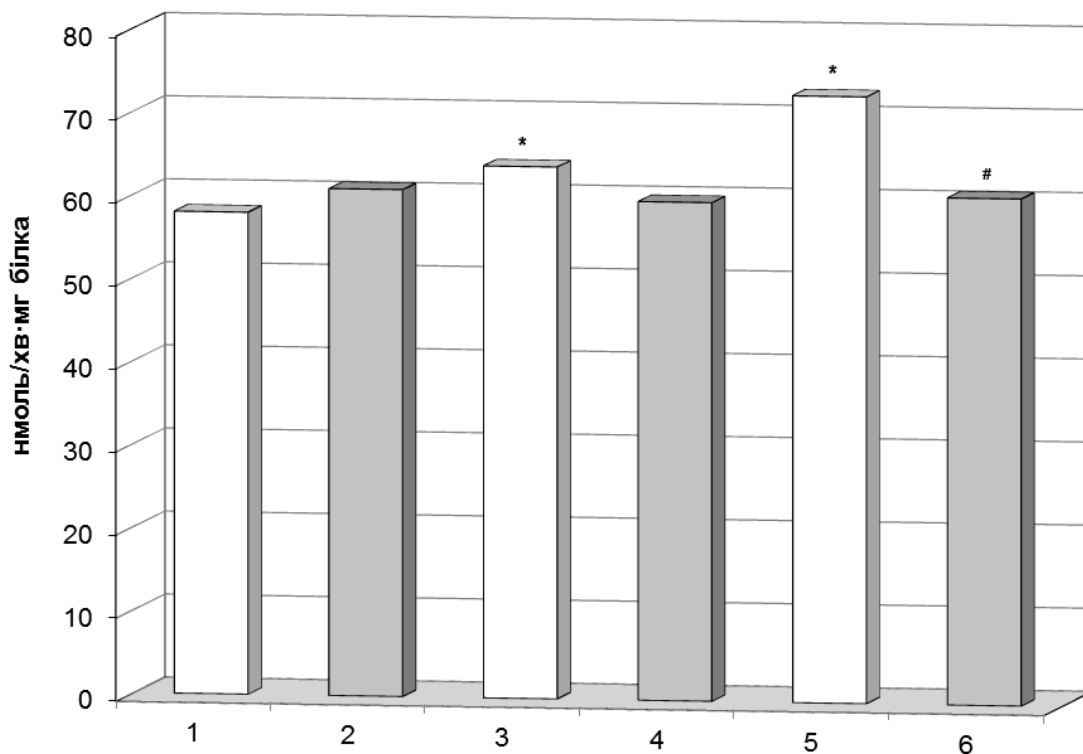


Рис. 9.5. АМФ-дезаміназна активність у лімфоцитах тимусу щурів за дії іонізуючої радіації та на фоні введення інозину: 1 – контроль; 2 – контроль + інозин; 3 – опромінення в дозі 1,0 Гр; 4 – опромінення в дозі 1,0 Гр + інозин; 5 – опромінення в дозі 7,78 Гр; 6 – опромінення в дозі 7,78 Гр+ інозин

* – достовірно відносно контролю,

** – достовірно відносно контролю на фоні введення інозину;

– достовірно відносно відповідних опромінених груп,

$p < 0,05$

Слід відзначити, що АМФ-дезаміназна реакція інтенсивніше протікає у лімфоцитах селезінки опромінених тварин порівняно з активністю ферменту у лімфоцитах тимусу. Так, у відповідь на дію іонізуючої радіації в дозах 1,0 Гр та 7,78 Гр у лімфоцитах селезінки (рис. 9.6) спостерігається зростання активності досліджуваного ферменту у 1,8 раза для дози 1,0 Гр і в 1,9 раза за опромінення тварин у летальній дозі.

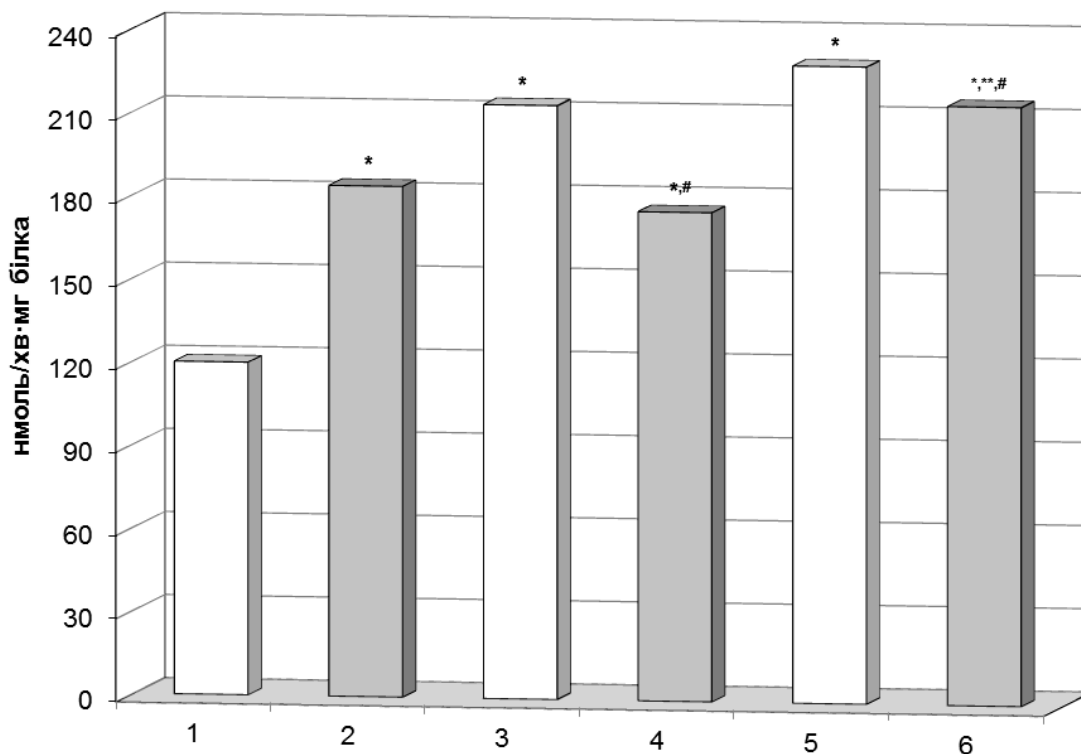


Рис. 9.6. АМФ-дезаміназна активність у лімфоцитах селезінки щурів за дії іонізуючої радіації та на фоні введення інозину: 1 – контроль; 2 – контроль + інозин; 3 – опромінення в дозі 1,0 Гр; 4 – опромінення в дозі 1,0 Гр + інозин; 5 – опромінення в дозі 7,78 Гр; 6 – опромінення в дозі 7,78 Гр+ інозин
 * – достовірно відносно контролю,
 ** – достовірно відносно контролю на фоні введення інозину;
 # – достовірно відносно відповідних опромінених груп,
 $p < 0,05$

Отримані нами дані узгоджуються з результатами [431], що свідчать про порушення реакцій дезамінування аденілової кислоти за променевого ураження організму. Механізми, що обумовлюють зміни активності ферментів у тканинах опромінених тварин, є складними і багатосторонніми. Відомо, що за фізіологічних умов АД підлягає алостеричному контролю з боку багатьох клітинних метаболітів та ефекторів. Важливим ендogenous регулятором функціональної активності ферменту виступає АТФ, яка вияляє стимулюючий ефект на активність ферменту. Оскільки обумовлене радіацією зниження рівня клітинного АТФ спричиняє посилення катаболічних реакцій та призводить до дисбалансу вмісту решти

аденіннуклеотидів, а саме до зростання частки АМФ, можна припустити, що однією з причин стимуляції АМФ-дезаміназної активності є зростання концентрації аденілової кислоти, що узгоджується з нашими результатами.

Зважаючи на те, що функціональна роль АД полягає у стабілізації енергетичного потенціалу клітини шляхом вилучення з реакційного середовища надлишку АМФ, а дія рентгенівського випромінювання через порушення рівноваги між компонентами аденілової системи призводить до падіння величини заряду, логічно припустити, що стимуляція активності ферменту відбувається у відповідь на зниження аденілатного заряду. Отже, післяпроменева інтенсифікація катаболічної ланки перетворення аденілової кислоти у лімфоцитах тимусу і селезінки щурів відбувається переважно за рахунок активації ферменту АМФ-дезамінази.

Поряд з реакціями дезамінуванням АМФ його розщеплення може відбуватися шляхом дефосфорилування, що каталізується ферментом 5'-нуклеотидазою (5'-Н).

Нами показано пригнічення активності 5'-нуклеотидази у лімфоїдних клітинах тимусу та селезінки за умови опромінення тварин за обох досліджуваних доз. Так, при дії променевого чинника в дозі 1,0 Гр спостерігається статистично вірогідне зниження ферментативної активності 5'-Н тимоцитів і спленоцитів відповідно у 1,2 та 1,6 раза (рис. 9.7, 9.8). З наведених результатів видно, що за даної дози опромінення у клітинах селезінки має місце більш виражене пригнічення активності ферменту. Підвищення дози опромінення до 7,78 Гр призводить до подальшого інгібування активності 5'-Н тимоцитів на 48% у відношенні до контрольного показника. У лімфоцитах селезінки у відповідь на дію іонізуючої радіації також відбувається зниження 5'-нуклеотидазної активності у 1,7 раза, що складає 57% від контролю. Згідно з одержаними даними, при введенні тваринам за 15 хв до опромінення інозину спостерігається модифікуючий ефект препарату на активність досліджуваного ферменту порівняно з

відповідними результатами при дії рентгенівського випромінювання. Так, за дії іонізуючої радіації в дозі 1,0 Гр на фоні введення препарату активність 5'-Н у тимоцитах та спленоцитах наближалася до контрольних величин, а за опромінення тварин в дозі 7,78 Гр спостерігалася статистично достовірне підвищення активності ферменту на 19 і 37% відповідно для лімфоцитів тимусу та селезінки.

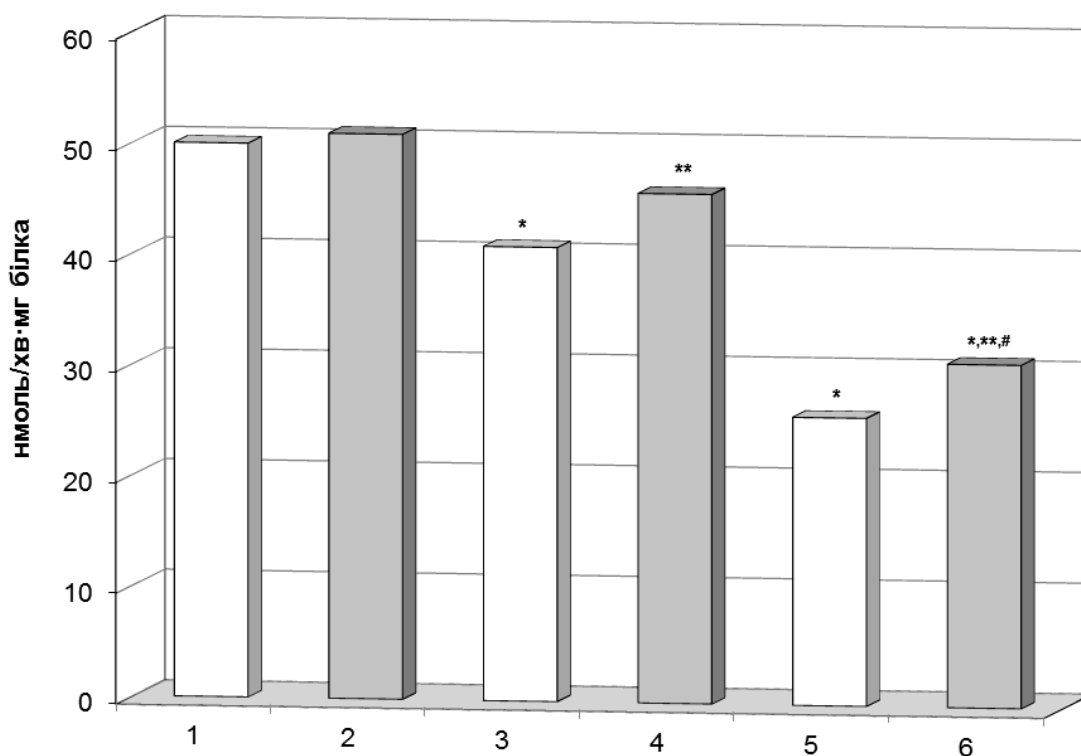


Рис.9.7 5'-нуклеотидазна активність у лімфоцитах тимусу щурів за дії іонізуючої радіації та на фоні введення інозину: 1 – контроль; 2 – контроль + інозин; 3 – опромінення в дозі 1,0 Гр; 4 – опромінення в дозі 1,0 Гр + інозин; 5 – опромінення в дозі 7,78 Гр; 6 – опромінення в дозі 7,78 Гр+ інозин

* – достовірно відносно контролю,

** – достовірно відносно контролю на фоні введення інозину;

– достовірно відносно відповідних опромінених груп,

$p < 0,05$

Слід зазначити, що більшість авторів [432,433] вказують на фазовий характер післяпроменевого змін 5'-Н – властиве зростання ферментативної активності на пізніших етапах розвитку променевого ефекту, що створює

передумови для накопичення у клітинах аденозину – цитотоксичного агента і, як наслідок, призводить до розвитку імунодефіцитних станів.

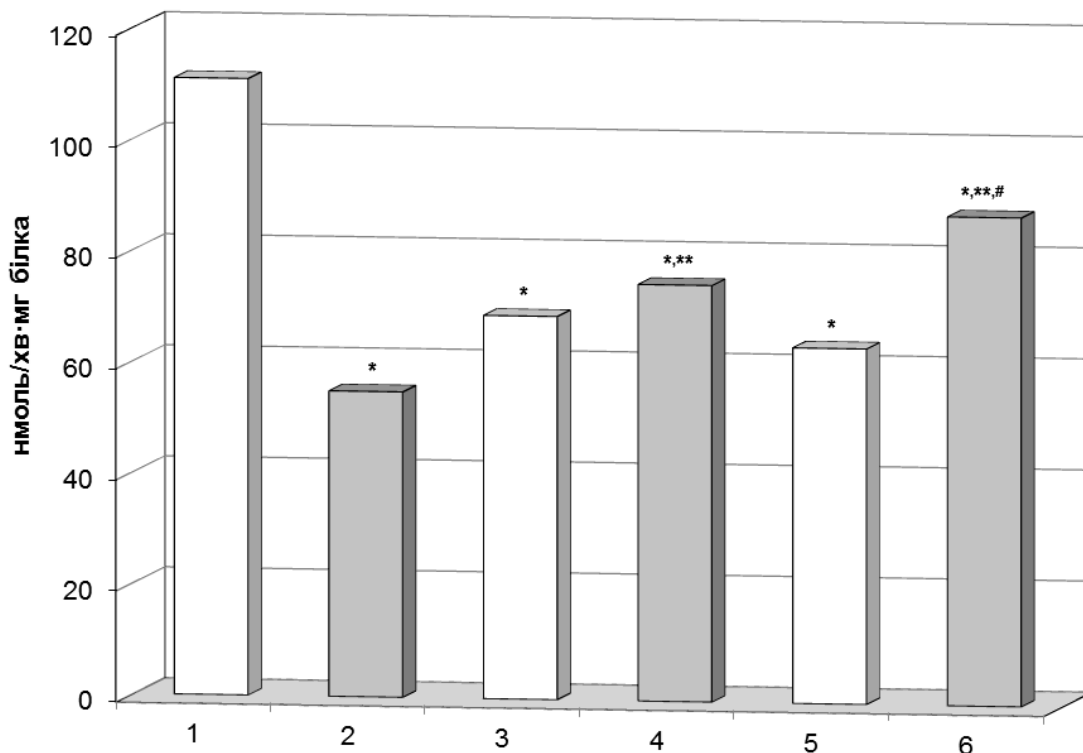


Рис.9.8 5'-нуклеотидазна активність у лімфоцитах селезінки щурів за дії іонізуючої радіації та на фоні введення інозину: 1 – контроль; 2 – контроль + інозин; 3 – опромінення в дозі 1,0 Гр; 4 – опромінення в дозі 1,0 Гр + інозин; 5 – опромінення в дозі 7,78 Гр; 6 – опромінення в дозі 7,78 Гр+ інозин

* – достовірно відносно контролю,

** – достовірно відносно контролю на фоні введення інозину;

– достовірно відносно відповідних опромінених груп,

$p < 0,05$

На основі аналізу співвідношення активності ферментів АМФ-дезамінази і 5'-нуклеотидази у лімфоцитах інтактних тварин та їх клітинної локалізації постулюється, що за нормальних умов у цитоплазмі цих клітин деградація АМФ протікає головним чином через АМФ-дезаміназну реакцію. Показане нами пригнічення ферментативної активності 5'-нуклеотидази у тимоцитах та спленоцитах опромінених щурів на фоні зростання АМФ-дезаміназної активності, ймовірно, свідчить про переважну участь на ранніх

етапах радіаційно-обумовленої загибелі клітин внутрішньоклітинного механізму деградації АМФ саме через реакцію дезамінування нуклеотиду.

Літературні дані свідчать про чутливість екто-5'-нуклеотидази до дії АКМ, зокрема супероксидного аніон-радикалу, синглетного кисню, перекису водню та можливість інактивації ферменту за їх участю [434,435]. Вище викладене дає змогу припустити, що однією з можливих причин пригнічення активності ферменту в умовах нашого експерименту є посилення продукування АКМ та розвиток у клітинах оксидативного стресу, який має місце при дії на організм іонізуючої радіації [436].

Оскільки одним з проміжних продуктів деградації АТФ є аденозин, на наступному етапі досліджували ферментативну активність аденозиндезамінази (АДА) – ферменту, який бере участь у регуляції клітинного рівня даного нуклеозиду. Дія рентгенівського випромінювання в дозі 1,0 Гр призводить до зростання ферментативної активності АДА на 158% порівняно з контрольним показником (рис. 9.9). При дії на тварини іонізуючої радіації в дозі 7,78 Гр відбувається підвищення аденозиндезаміназної активності на 79%, в той час як активність АДА лімфоцитів тимусу щурів, опромінених на фоні введення інозину, статистично вірогідно знижувалася на 32% порівняно з активністю ферменту за дії летальної дози випромінювання.

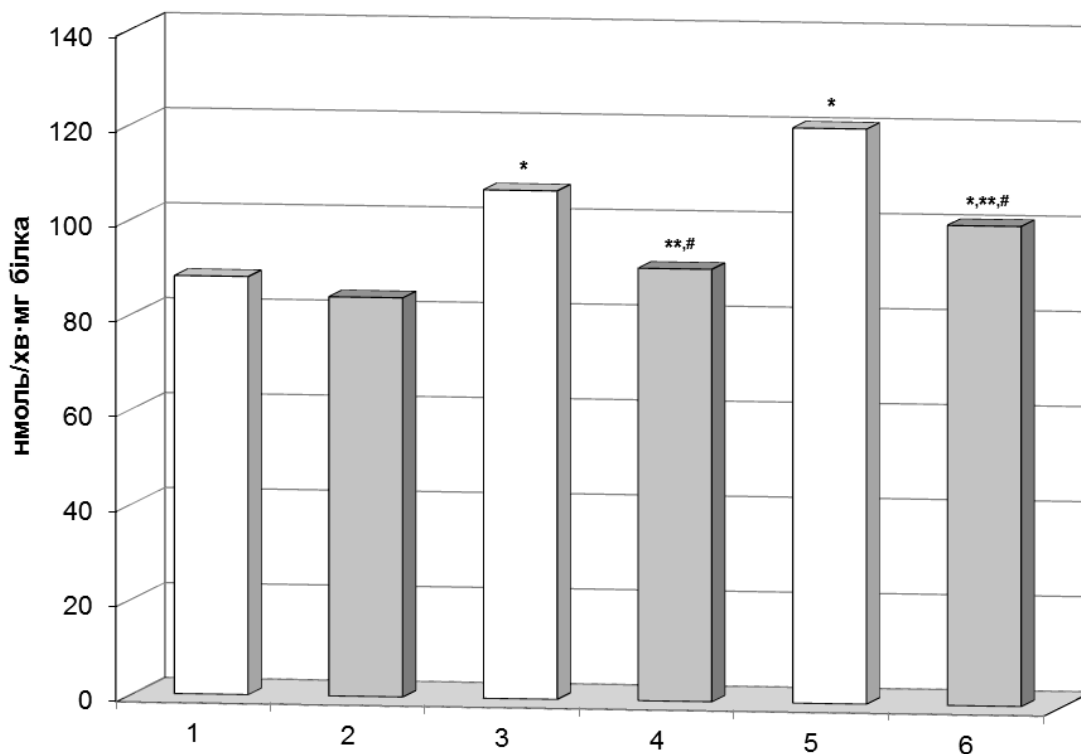


Рис. 9.9 Аденозиндезаміназна активність у лімфоцитах тимусу щурів за дії іонізуючої радіації та на фоні введення інозину: 1 – контроль; 2 – контроль + інозин; 3 – опромінення в дозі 1,0 Гр; 4 – опромінення в дозі 1,0 Гр + інозин; 5 – опромінення в дозі 7,78 Гр; 6 – опромінення в дозі 7,78 Гр+ інозин

* – достовірно відносно контролю,

** – достовірно відносно контролю на фоні введення інозину;

– достовірно відносно відповідних опромінених груп,

$p < 0,05$

На нашу думку, джерелом аденозину в клітинах за умови пригнічення активності екто-5'-нуклеотидази виступає цитозольна форма ферменту, яка зазвичай ефективніше каталізує гідроліз ІМФ та ГМФ, ніж АМФ. Спорідненість цитозольного ферменту до АМФ визначається енергетичним станом клітини і різко зростає при зниженні аденілатного енергетичного заряду.

В умовах посилення катаболізму аденілових нуклеотидів активацію АДА можна розглядати як своєрідну компенсаторну реакцію у відповідь на накопичення у цитоплазмі аденозину, оскільки вона попереджає цитотоксичну дію високих концентрацій останнього як безпосередньо на клітину, так і на прилеглі тканини. Разом з тим значна стимуляція

аденозиндезаміназної реакції за рахунок субстратної активації прооксидантної форми ферменту ксантинооксидази сприяє розвитку вільнорадикальних процесів і може розглядатися як ще один механізм реалізації генотоксичного ефекту радіації.

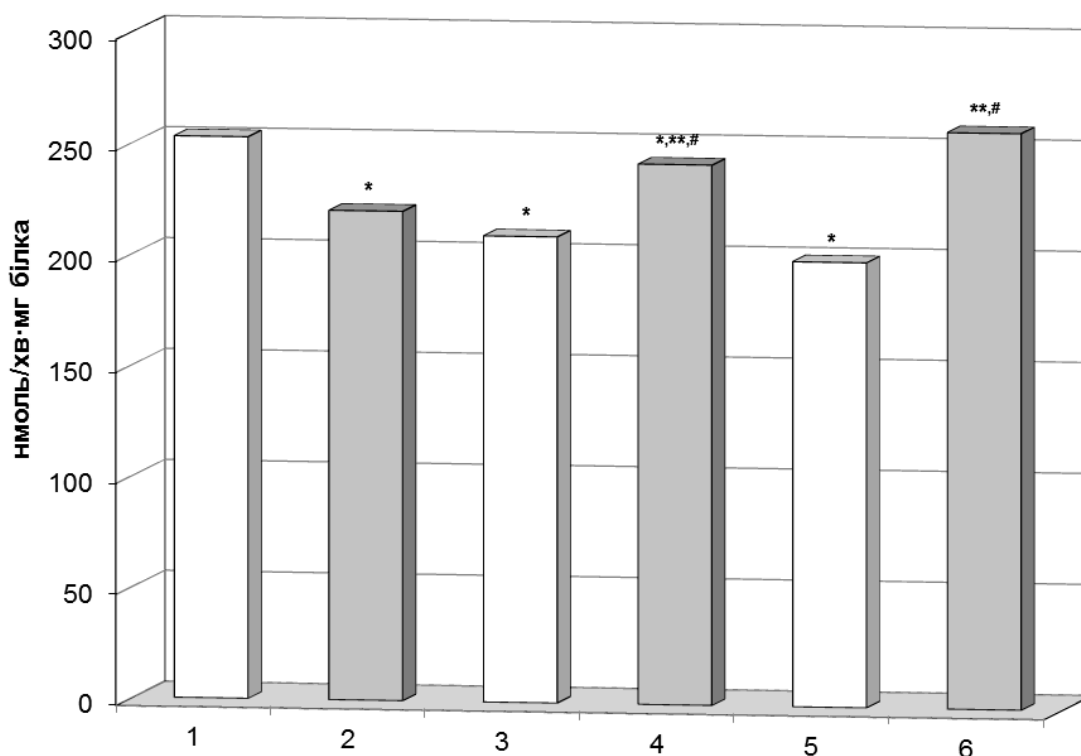


Рис.9.10 Аденозиндезаміназна активність у лімфоцитах селезінки щурів за дії іонізуючої радіації та на фоні введення інозину: 1 – контроль; 2 – контроль + інозин; 3 – опромінення в дозі 1,0 Гр; 4 – опромінення в дозі 1,0 Гр + інозин; 5 – опромінення в дозі 7,78 Гр; 6 – опромінення в дозі 7,78 Гр+ інозин

* – достовірно відносно контролю,

** – достовірно відносно контролю на фоні введення інозину;

– достовірно відносно відповідних опромінених груп,

$p < 0,05$

У лімфоцитах селезінки навпаки має місце пригнічення активності АДА при опроміненні щурів у досліджуваних дозах (рис. 9.10). Так, за радіаційного впливу в дозі 1,0 Гр спостерігається статистично вірогідне зниження ферментативної активності АДА при опроміненні щурів на фоні введення інозину аденозиндезаміназна активність у лімфоцитах тимусу

залишалася у межах контрольної величини. Отже дія іонізуючої радіації викликає різнонаправлений характер змін активності АДА у лімфоцитах тимусу і селезінки щурів, можливо за рахунок особливостей популяційного складу досліджуваних органів [437].

Показане нами пригнічення аденозиндезаміназної активності у спленоцитах, можливо, обумовлено акумуляцією у клітинах аденозину, адже відповідно до роботи [438] при зростанні внутрішньоклітинного вмісту цього нуклеозиду відбувається інгібування активності ферменту. Зниження активності аденозиндезамінази супроводжується пригніченням синтезу молекул ДНК, появою одноланцюгових розривів та накопиченням нерепарованих пошкоджень у структурі ДНК, що було показано в розділі 3 нашої роботи. Це можна пояснити за рахунок алостеричного інгібування дАТФ і дГТФ рибонуклеотидредуктазної реакції і, як наслідок, дефіцитом інших дезоксинуклеозидтрифосфатів – попередників під час синтезу нуклеїнових кислот [439,440]. Перераховані ефекти на фоні зумовленого випроміненням інгібування активності рибонуклеотидредуктази сприяють ще більшому поглибленню метаболічних порушень у клітинах лімфоїдних органів за променевого ураження.

Фермент пурипнуклеозидфосфорилаза (ПНФ) каталізує наступний етап деградації інозину з утворенням пуринової основи гіпоксантину. Згідно з нашими результатами, представленими на рис. 9.11 і 9.12, дія іонізуючого випромінювання в дозі 1,0 Гр викликає стимуляцію ферментативної активності ПНФ у лімфоїдних клітинах тимусу та селезінки. Так, активність ферменту зростала у 1,4 і 1,3 раза відповідно для тимоцитів та спленоцитів. При дії на щурів, що попередньо отримали інозин, радіації в дозі 1,0 Гр відмічається модулюючий вплив препарату на активність ПНФ лімфоцитів, а саме статистично вірогідне пригнічення ферментативної активності ПНФ на 23% для тимоцитів та на 32% для лімфоцитів селезінки порівняно з активністю ПНФ тварин, опромінених в дозі 1,0 Гр. За тотального

опромінення щурів у летальній дозі спостерігається різнонаправлений характер змін активності ПНФ у лімфоцитах досліджуваних органах. Так, у клітинах тимусу (рис.9.11) має місце зростання ферментативної активності ПНФ на 62% порівняно з контролем..

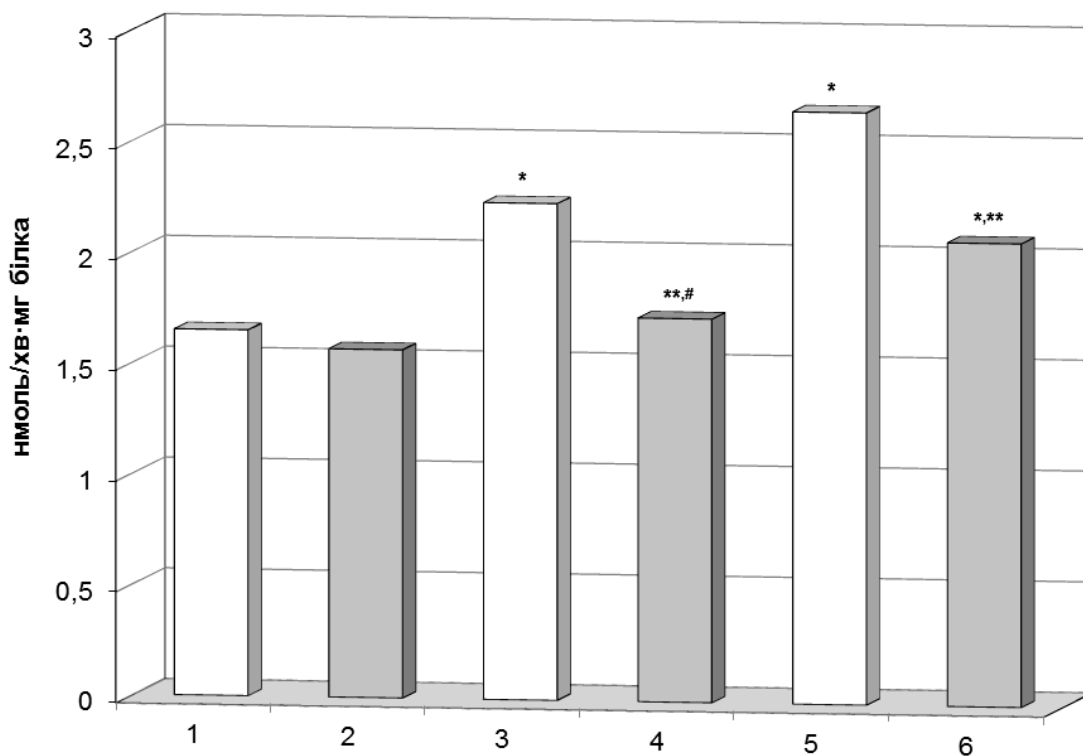


Рис.9.11. Пурипнуклеозидфосфорилазна активність у лімфоцитах тимусу щурів за дії іонізуючої радіації та на фоні введення інозину: 1 – контроль; 2 – контроль + інозин; 3 – опромінення в дозі 1,0 Гр; 4 – опромінення в дозі 1,0 Гр + інозин; 5 – опромінення в дозі 7,78 Гр; 6 – опромінення в дозі 7,78 Гр+ інозин
 * – достовірно відносно контролю,
 ** – достовірно відносно контролю на фоні введення інозину;
 # – достовірно відносно відповідних опромінених груп,
 $p < 0,05$

У лімфоцитах селезінки (рис.9.12) у відповідь на дію рентгенівського випромінювання в дозі 7,78 Гр відбувається пригнічення пурипнуклеозидфосфорилазної активності у 1,4 раза, що становить 72% від контрольного показника. Активація ПНФ створює умови для акумуляції у клітинах гіпоксантину, який, згідно [441] здатний викликати деградацію ядерного

матеріалу як безпосередньо, так і опосередковано через активацію прооксидантної форми ферменту КсО.

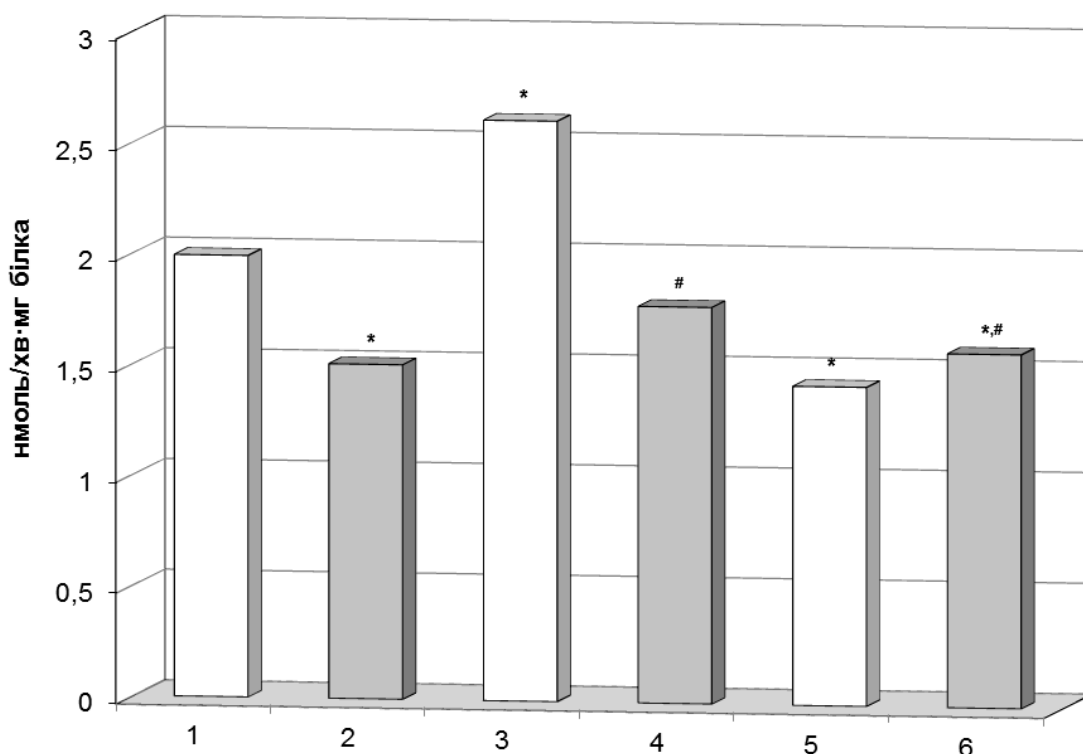


Рис.9.12 Пурипнуклеозидфосфорилазна активність у лімфоцитах селезінки щурів за дії іонізуючої радіації та на фоні введення інозину: 1 – контроль; 2 – контроль + інозин; 3 – опромінення в дозі 1,0 Гр; 4 – опромінення в дозі 1,0 Гр + інозин; 5 – опромінення в дозі 7,78 Гр; 6 – опромінення в дозі 7,78 Гр+ інозин
* – достовірно відносно контролю,
** – достовірно відносно контролю на фоні введення інозину;
– достовірно відносно відповідних опромінених груп,
 $p < 0,05$

Підсумовуючи вищевикладене, можна виділити такі зміни активності ключових ферментів обміну пуринів за дії іонізуючої радіації в дозах 1,0 і 7,79 Гр, а саме: зростання ферментативної активності аденілаткінази, АМФ-дезамінази, аденозиндезамінази, пурипнуклеозид- фосфорилази у лімфоцитах тимусу та АМФ-дезамінази у лімфоцитах селезінки за обох доз рентгенівського випромінювання; пригнічення активності аденілаткінази, аденозиндезамінази у лімфоцитах селезінки та 5'-нуклеотидази у лімфоцитах

тимусу і селезінки за дії променевого фактору у досліджуваних дозах, а також стимуляцію пуриноклеозидфосфорилазної активності для 1,0 Гр та її інгібування після опромінення тварин в дозі 7,78 Гр. Враховуючи суттєве значення вмісту ендogenous АТФ для забезпечення нормального протікання клітинних реакцій та його участь як безпосереднього субстрату реакції та алостеричного ефектору у регуляції активності багатьох ферментних систем, в тому числі і ферментів метаболізму пуринів, показаний нами модифікуючий ефект рибоксину на активність досліджуваних ферментів можна пояснити саме за рахунок описаної у літературі здатності препарату нормалізувати рівень макроергу. На нашу думку, оскільки інозин є одним з інтермедіатів пуринового обміну, що знаходиться на перехресті двох метаболічних шляхів деградації аденілової кислоти (дефосфорилювання та дезамінування) певний нормалізуючий вплив інозину на ферментативну активність за умови опромінення тварин можливий внаслідок або стимуляції, або пригнічення активності відповідних ферментів за механізмом зворотного зв'язку. Отже на підставі отриманих даних можна зробити висновок, що за променевого ураження у лімфоїдних органах опромінених тварин відбуваються значні порушення функціональної активності ферментів пуринового обміну, а саме активізація катаболічних реакцій, що, враховуючи важливе значення аденілових нуклеотидів у метаболізмі клітини, призводить до розвитку променевих ефектів та може розглядатися як ще один із механізмів реалізації цито- та генотоксичного ефекту іонізуючої радіації. Представлені дані по вивченню дії інозину на активність ферментів обміну пуринів у лімфоцитах опромінених тварин свідчать про певний нормалізуючий вплив препарату на досліджувані показники порівняно з відповідними результатами за дії променевого чинника.

Узагальнюючим висновком представленого розділу може бути встановлене нами [442,443], по-перше, дозо-залежне зниження рівня АТФ у лімфоцитах тимусу і селезінки щурів, більш виражене за опромінення дозою

7,78 Гр. Проте виснаження пулу макроерга (АТФ) не досягає критичної відмітки, а зберігається на рівні, достатньому як для запуску, так і для здійснення ефекторної стадії радіаційно-індукованого апоптозу. По-друге, виявлено значну дезінтеграцію системи обміну пуринів за дії іонізуючої радіації за обох досліджуваних доз, яка безумовно регламентує інтенсивність пластичного і енергетичного у лімфоцитах тимусу і селезінки щурів. Вплив інозину, як метаболіту пуринового обміну, відзначається як нормалізуючий на досліджувані ланки метаболізму пуринів порівняно з відповідними результатами за дії іонізуючої радіації.

АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

З'ясування молекулярно–біохімічних механізмів впливу іонізуючої радіації на клітини та пошук засобів його корекції є нагальною проблемою сучасної біохімії, молекулярної біології та медицини. Складність оцінки впливу іонізуючого випромінення полягає в його мультисистемній дії на всіх структурних рівнях організму. Основними мішенями на клітинному рівні, за Гродзинським Д. [444], є хроматин клітинного ядра, мембранна система клітини, генетичний матеріал мітохондрій та надмолекулярні асоціати. Виявлення радіаційних ефектів та формування регуляторної мережі відповіді на клітинному рівні привели до необхідності виокремлення певних шляхів підтримки проліферації (репараційний потенціал) чи запуску відповідних програм загибелі клітин за впливу різних доз випромінення.

Радіаційний чинник у низьких та летальних дозах запускає програму загибелі клітин шляхом апоптозу. Апоптоз – генетично детермінований енергоємний процес, що відіграє визначальну роль у підтриманні фізіологічних механізмів, необхідних для нормальної життєдіяльності клітин, водночас є основним механізмом, який забезпечує селективне видалення пошкоджених, злоякісно-трансформованих чи інфікованих клітин. Дія іонізуючої радіації на клітини радіочутливих органів системи імунітету (тимус, селезінка) спричиняє ряд порушень як на надмолекулярному, субклітинному, так і молекулярному рівнях, що є підґрунтям біохімічних та морфологічних змін, які послідовно реалізуються шляхами, означеними як радіаційно-індукований апоптоз.

Аналітичний огляд літературних джерел дає можливість стверджувати, що деталізація молекулярних механізмів апоптозу залишається на сьогодні одним з пріоритетних напрямків досліджень не лише в галузі біології, а й сучасної медицини, оскільки порушення шляхів контролю ключових етапів апоптозу призводить до патологічних змін на рівні окремих органів і систем

та, відповідно, є основою для розвитку ряду захворювань (онкологічних, аутоімунних, нейродегенеративних та ін.).

На основі аналізу наукової літератури та власних експериментальних досліджень було виокремлено основні ланки на шляху реалізації радіаційно-індукованого апоптозу, конвергенція яких і призводить до загибелі досліджених популяцій лімфоїдних клітин за механізмом генетично-детермінованої клітинної загибелі (апоптозу):

- 1) рецептор-опосередкований зовнішній шлях апоптозу;
- 2) мітохондріально-опосередкований внутрішній шлях апоптозу;
- 3) ядерно-опосередкований шлях апоптозу.

Перебіг основних шляхів апоптозу регулюється численними ферментами, серед яких основне місце займають протеїнази. Специфічними виконавцями апоптозу вважаються цистеїнові протеїнази– каспази. Літературні дані останніх років дають підставу стверджувати, що функціонування системи протеасоми, калпаїнів та катепсинів робить значний внесок поряд з каспазами у реалізацію радіаційно-індукованого апоптозу [пов]. Загально визнано, що апоптоз є енергетично залежним процесом, тому визначення енергетичного балансу як інтегрального показника вмісту аденіннуклеотидів за умови регуляції функціонування системи обміну пуринів та АТФ-залежних апоптотичних процесів є актуальною частиною нашого дослідження. Згідно з запропонованою окисно-пероксидною теорією апоптозу [445] та на основі результатів експериментальної частини роботи можна відмітити, що саме оксидативний стрес з урахуванням його метаболічної, деструктивної та сигнальної функцій є основним інтегратором вищенаведених шляхів реалізації апоптозу за дії радіаційного чинника.

Згідно з класичною догмою радіобіології [444] вважається, що радіочутливість ядра є значно вищою, ніж цитоплазми, проте має місце залежність масштабу прояву ядерних порушень від ступеня ураження мембранних структур і відповідних компонентів клітини та надмолекулярних

асоціатів – ультраструктури електронно-транспортного ланцюга, молекулярних угруповань трансляційного апарату. Згідно з отриманими результатами (розділ 3), за впливу іонізуючої радіації розгортаються події ранньої дезінтеграції хроматину, а саме дозозалежне накопичення одно-і дволанцюгових розривів ДНК за обох часових інтервалів з більш пізньою міжнуклеосомною деградацією ДНК (3 год після опромінення) за рахунок каспазо-3- опосередкованої активації апоптотичної ДНКазиди CAD. У репараційні події залучається система полі(ADP-рибозо)полімерази, значне виснаження якої відбувається під контролем каспази-3, за рахунок чого відзначається активація Ca^{2+} , Mg^{2+} -залежної ендонуклеази DNAS1L3. Отже, виявлені нами порушення у функціонуванні ядерного апарату на різних рівнях реалізуються завдяки запуску каскаду протеолітичних реакцій за участі каспази-3, калпаїнів, субстратами яких (крім вище перерахованих) є структурні білки цитоскелету, фактори транскрипції p53 та AP1 (c-Fos/c-Jun) та каспази-6, яка каталізує протеолітичну деградацію ламіни B та білка ядерного мітотичного апарату NuMA. Нашими дослідженнями показано різнонаправлені зміни активності каспаз-3, -6 (розділ 8) і калпаїнів (розділ 6), що, з одного боку, свідчить про залучення системи протеолізу до реалізації основної маркерної функції ядерно-опосередкованого апоптозу, а з другого – такі зміни є результатом складної ампліфікативної каскадної системи регуляції функціонування протеїназ за дії іонізуючої радіації.

Ми провели дослідження по виявленню активності унікальної, на думку [13], каспази-2. Згідно з отриманими результатами можна припустити, що достовірне підвищення активності ферменту через 3 год після опромінення за обох доз в лімфоцитах тимусу та відповідне зниження активності у лімфоцитах селезінки щурів свідчить про перерозподіл пулу ферменту між ядерною і мітохондріальною фракціями, що є ще одним свідченням на користь належності лімфоцитів селезінки до клітин II типу (розділ 5).

На більш пізніх термінах після опромінення нерепаровані дволанцюгові розриви ДНК спричиняють активацію ядерного транскрипційного фактора NF- κ B. На основі аналізу нечисленних літературних джерел та отриманих нами результатів було висловлено припущення про шлях радіаційно-опосередкованої NF- κ B–залежної індукції апоптозу, що змінила усталені погляди про класичний RIP–опосередкований TNF- α - сигналінг за активації NF- κ B, який сприяє проліферації і виживанню клітин. Посередником активаційного сигналу до NF- κ B, на нашу думку, виступає фосфорінозитид-3-подібна протеїнкіназа ATM. Експресія проапоптотичного NF- κ B-респонсивного гена *Fas* приводить до підвищення вмісту відповідного білкового продукту у фракції лімфоцитів тимусу щурів через 30 хв після опромінення в дозі 1,0 Гр (розділ 4), що узгоджується з достовірним підвищенням вмісту NF- κ B в ядерній фракції за таких же умов проведення експерименту та опосередковано свідчить про активацію рецептор-залежної ланки апоптозу.

Результати нашої роботи по оцінці рівня білка p53 в лімфоцитах тимусу і селезінки засвідчили його підвищення за обох доз опромінення та за обох часових інтервалів. Заслуговує на увагу той факт, що, за даними літератури [446], надходження білка p53 у ядро сприяє виконанню ним, окрім генно-респонсивної, частково функції ферментативної репарації ДНК. У комплексі з ДНК p53 є мішенню для протеїнкінази ATM, що викликає його накопичення у ядрі і сприяє виконанню ним функції транскрипційного фактора, ініціюючи експресію ряду проапоптотичних генів.

Аналіз вмісту білка p53 в лімфоцитах тимусу та селезінки щурів дав можливість зробити інформативні висновки про залучення різних компартментів клітини (мітохондрії та ядро) до реалізації функцій білка p53. За опромінення в дозі 1,0 Гр спостерігається значно вищий рівень білка p53 в обох популяціях лімфоцитів через 3 год після опромінення, що, на думку Чумакова П. [447], є маркером виконання білком функції транскрипційного

фактора, виявленій на фоні незначного зниження протеасомної активності. Водночас опромінення в дозі 7,78 Гр сприяє більш вираженому підвищенню p53 через 30 хв після дії чинника в обох популяціях клітин та уможливорює транслокацію білка до мітохондрій і запуск мітохондріальної ланки апоптозу (через зв'язок з Вах і Від та подальшим відкриттям мітохондріальної пори), яка передує в часі ядерній функції p53. Можливо такий перерозподіл дає підґрунтя для виявлення компенсаторно-адаптаційних властивостей клітин за опромінення в низькій дозі (p53-респонсивними генами є гени, що контролюють клітинний цикл, та ті, що кодують компоненти репараційної системи). Активація фактора AP-1 за дії радіаційного чинника відбувається за безпосередньої участі кінази Jnk (родина MAP-кіназ), яка, в свою чергу, фосфорилуючи білок p53, уможливорює виконання ним ядерних функцій. На думку [448] саме MAP-кіназна система є чи не головним модулем у регуляторній мережі відповіді клітин на радіаційне ушкодження.

Кооперативні зв'язки між учасниками ядерно-опосередкованої та мітохондріальної ланки апоптозу та виявлення особливостей перебігу апоптотичних процесів в мітохондріях наводять на думку про складність регуляторних механізмів за радіаційно-індукованого апоптозу. Так, виявлене значне підвищення вмісту білка Вах за опромінення в дозі 7,78 Гр, особливо виражене в лімфоцитах тимусу, може опосередковано свідчити про незворотне комітування лімфоїдних клітин на апоптоз за високої дози радіації. Встановлену активацію каспази-9 в параметрах нашого експерименту вважаємо маркером мітохондріальної ланки апоптозу. Привертає особливу увагу дослідження ролі білка AIF в модуляції радіаційно-опосередкованих апоптотичних сигналів за їх узгодженої дії на рівні мітохондрій і ядра. Відкриття групою Wang Y. [пов] нуклеазної функції білка MIF дало відповідь на питання, яким чином білок AIF, попередньо процесований калпаїнами після вивільнення з мітохондрій, у комплексі з ПАР (полімерами полі(ADP-рибози) спричиняє крупномасштабну фрагмент-

тацію (50 тис.п.н) ядерної ДНК. Це відбувається саме завдяки специфічним білок-білковим взаємодіям з нуклеазою MIF. Отримані нами дані свідчать про можливий каспазо-незалежний внесок, опосередкований AIF/MIF, у деградацію ядерної ДНК лімфоцитів тимусу щурів після дії променевого чинника.

Залучення рецепторного шляху у реалізацію радіаційно-індукованого апоптозу оцінювали по відносному вмісту рецептору Fas та активації ефекторної каспази-8, яка в параметрах активаційної платформи DISK запускає зовнішній шлях апоптозу. Регуляція шляхом фосфорилування кіназою активованою за дії променевого чинника. Пострадіаційна олігомеризації Fas, за умови фосфорилування активованою протеїнкіназою Jnk, спричиняє як результат активацію каспази-8 майже за всіх досліджуваних нами дозах і часових інтервалах.

Виокремлення внеску каспазо-незалежних протеолітичних каскадів у реалізацію радіаційно-індукованого апоптозу не заперечує тісного взаємозв'язку між ними та вищеописаними ланками, що знайшло своє відображення у з'ясуванні ролі калпаїнів (розділ 6).

Ряд дослідників виокремлює лізосомальний шлях апоптозу, хоча наша експериментальна робота дає підстави стверджувати про тісний контакт цього шляху з мітохондріальним за рахунок індукції перміабілізація лізосомальної мембрани та активації цистеїнової протеїнази– катепсину В.

Встановлені нами зміни функціонування протеасоми, а саме дозозалежне зниження активності за дії радіаційного чинника, можуть частково пояснити активацію каспаз та накопичення активних форм ядерних транскрипційних факторів AP-1 і NF-κB в параметрах нашого експерименту.

Апоптоз є досить енергоємним процесом. За нашими даними для радіаційно-індукованого апоптозу є характерним зниження вмісту АТФ за умови стимуляції катаболічних реакцій перетворення аденілових нуклеотидів та можливого прямого (та опосередкованого АКМ) деструктивного впливу

іонізуючого опромінення на мембрани мітохондрій, внаслідок чого відбувається зниження швидкості синтезу АТФ, і, як наслідок, пригнічення функцій лімфоцитів. Основними унікальними "споживачами" АТФ в процесі апоптозу вважаються апоптосома, протеасома та транслокази, підтримка їх роботи (та інших процесів) вимагає значних енергетичних запасів.

Узагальнюючи наведений експериментальний матеріал, можна зробити висновок, що універсальною системою регуляції перерахованих вище апоптотичних каскадів є оксидативний стрес, який виступає медіатором радіаційно-індукованого апоптозу. Саме він займає чільне місце в регулярних мережах відповіді клітини на радіаційний чинник [пов]. Нами визначено вміст АКМ (супероксидний радикал) і оцінено стан його функціональних "акцепторів" - порушення структури і функції ліпідів мембран (ПОЛ) та окисний статус білків (ступінь окислювальної модифікації білків). Встановлено дисбаланс у функціонуванні прооксидантної й антиоксидантної систем, що отримало пояснення як в рамках киснево-пероксидної теорії [445], так і за гіпотезою Ogawa Y. "ефект пероксиду водню" – " H_2O_2 effect"[266], в якій наголошується на ролі лізосомального компартменту як активатора другої хвилі вільно-радикальних процесів в опромінених клітинах. На основі одержаних результатів можна відмітити можливе залучення протеасоми до деструкції окисно-модифікованих білків, оскільки, за даними літератури [449], імовірно саме вони виконують ці функції. Тому зниженням активності протеасоми можна пояснити накопичення окисно-модифікованих білків за дії іонізуючої радіації в низькій та летальній дозах. Існуюча в науковій літературі теорія про функції АКМ у системах сигналювання підтверджуються нашими результатами про залучення редокс-залежних транскрипційних факторів та відповідних респонсивних генів у всі досліджені шляхи реалізації радіаційно-індукованого апоптозу, що, на думку Рязанцевой Н.В., Часовских Н.Ю. [372],

свідчить про роль АКМ як вторинних месенджерів, що опосередковують активацію факторів транскрипції.

Виконане експериментальне дослідження дає можливість поглибити уявлення про пострадіаційні функціональні порушення досліджених систем за опромінення в дозі 1,0 Гр як складову загальної неспецифічної адаптаційної реакції клітинної системи на дію випромінювання [450].

Згідно з Кудряшовим Ю.Б. [451] за опромінення в дозі 1,0 Гр спостерігається більш виражена мобілізація компенсаторних механізмів, а саме ДНК-репараційних систем, та системи підтримки про-антиоксидантного балансу, які характеризують ступінь ураження клітин. На основі досліджень Aleksanin S.S. [8] було висунуто гіпотезу про існування альтернативних ефектів, відмінних від стохастичних та детерміністичних, при гострому опроміненні тварин у дозах 0,25-1,5 Гр, проте їх молекулярний механізм на сьогодні залишається до кінця не з'ясованим. Водночас виявлені нами показники більш вираженого генотоксичного та цитотоксичного впливу випромінювання у дозі 7,78 Гр на лімфоцити тимусу і селезінки щурів свідчать про значне комітування клітин на загибель шляхом апоптозу вже на ранніх строках (30 хв і 3 год) після дії променевого чинника.

На сьогодні проблема модифікації радіочутливості та пошук засобів, спрямованих на запобігання та зменшення молекулярно-біохімічних змін в організмі опромінених тварин, залишається однією з найбільш актуальних та інтенсивно досліджуваних проблем не тільки сучасної біохімії і радіобіології, але й інших суміжних дисциплін. З метою модифікації променевих ефектів ми застосовували пуриновий нуклеозид. Представлені нами дані по вивченню дії інозину за опромінення тварин в дозах 1,0 Гр і 7,78 Гр свідчать про його певний нормалізуючий вплив на перебіг досліджуваних процесів порівняно з відповідними результатами за дії іонізуючої радіації. Подібний ефект інозину можна пояснити з позицій його модифікуючої дії на клітинні обмінні процеси. Так, продукти деградації інозину, включаючись у

різноманітні метаболічні шляхи, сприяють покращенню енергетичного та пластичного обміну клітини, що призводить до підвищення загальної (неспецифічної) резистентності організму до несприятливих умов середовища, в тому числі і до дії променевого фактору. Нещодавно виявлено рецептор-залежний шлях дії інозину, який опосередковує вплив метаболіту на енергетичний баланс клітини та, за умови залучення каскадів MAP-кіназ, чинить регуляторну дію на ядерно-опосередковані процеси (ПАРП, AP-1, NF-κB), що визначає його цитопротекторні та протизапальні властивості. Посилаючись на полярографічні дослідження Ракші Н.Г., Цудзевича Б.О. [66], можна стверджувати, що нормалізуючий ефект інозину пов'язаний зі стимуляцією енергетичних процесів у клітинах, що, враховуючи важливе значення рівня ендогенного АТФ в умовах радіаційно-обумовленого порушення клітинного метаболізму, створює передумови для покращення функціонування репараційних систем організму.

Для оцінки наявності та сили взаємозв'язку між дослідженими біохімічними показниками (змінними) було проведено кореляційний аналіз, за результатами якого побудовано узагальнюючу схему - рис. 10 (1). Розподіл всіх дослідних груп за схожістю молекулярно-біохімічного профілю за результатами кластерного аналізу представлено в додатку 2, рис.10 (2).

Виходячи з результатів проведеного кореляційного аналізу, можна виділити ряд показників, які мають найбільшу кількість кореляційних зв'язків. Серед них – вміст АТФ, рівень ТБК-активних продуктів, активність кожної із п'яти досліджених каспаз, вміст білка p53, ксантиноксидазна та протеасомна активності. Змінні цієї групи можна означити як розраховані ключові параметри, що пропонуються для визначення з метою отримання повноцінного уявлення про стан лімфоцитів селезінки і тимусу щурів за умов експериментального радіаційно-індукованого апоптозу.

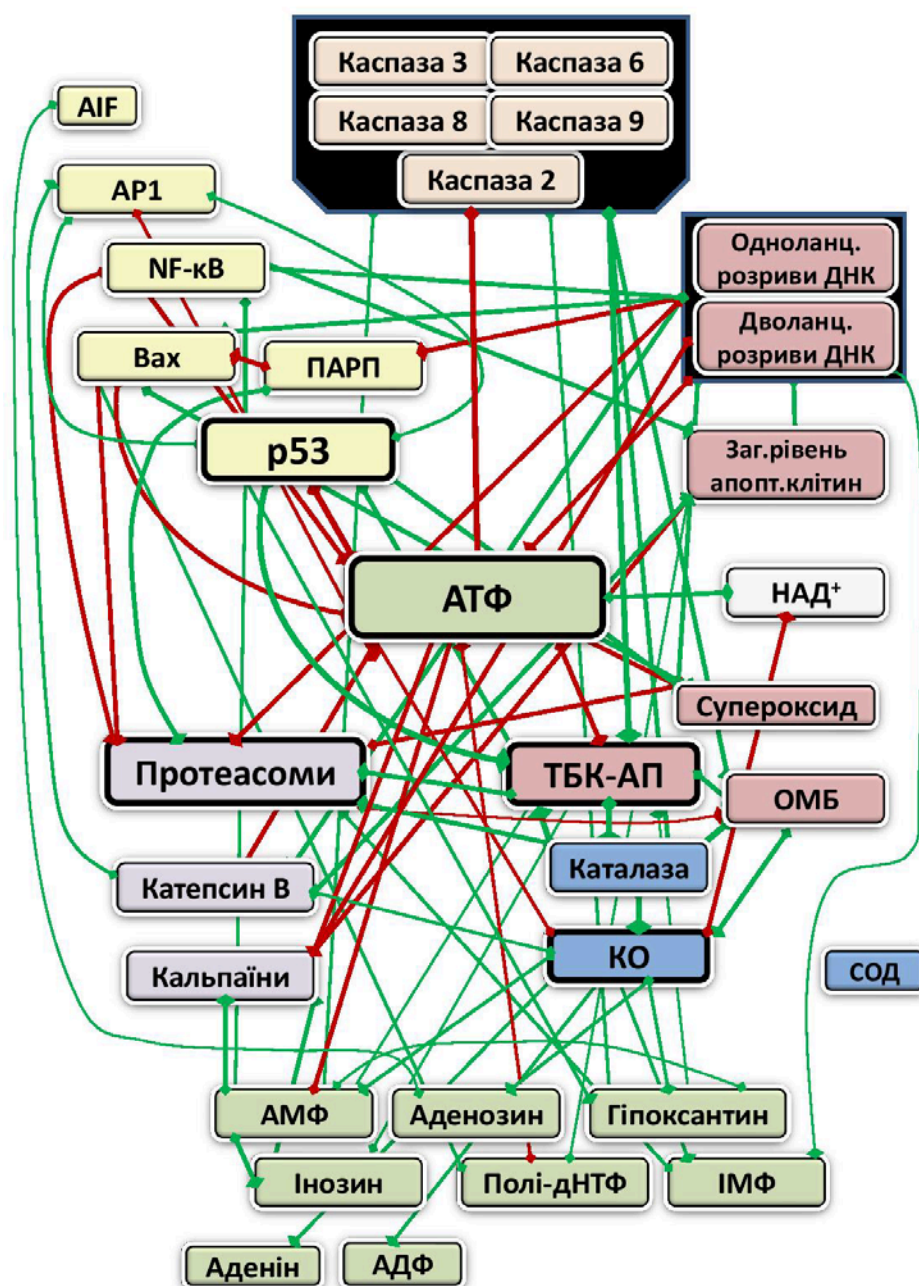


Рис. 10 (1). Карта кореляційних взаємозв'язків досліджених показників лімфоцитів тимусу та селезінки за умов радіаційно-індукованого апоптозу (зеленим позначено позитивну кореляцію, червоним – негативну)

Таким чином, проведені комплексні дослідження біохімічних шляхів реалізації радіаційно-індукованого апоптозу свідчать про існування складних взаємозв'язків вивчених ланок апоптотичної загибелі імунокомпетентних клітин лімфоїдних органів на рівні функціонування регуляторних біохімічних мереж відповіді клітин на дію радіаційного фактора.

ВИСНОВКИ

На основі аналізу результатів експериментальних досліджень та теоретичного узагальнення з'ясовано основні закономірності реалізації процесу апоптотичної загибелі лімфоїдних клітин тимусу і селезінки щурів за радіаційного впливу. Встановлені біохімічні механізми перебігу радіаційно-індукованої програмованої загибелі лімфоцитів тимусу і селезінки щурів опосередковуються оксидативним стресом як медіатором апоптозу.

1. Доведено активацію ядерно-залежного шляху при радіаційно-індукованому апоптозі за рахунок дисбалансу ядерної репараційної системи (зниження активності ПАРП), накопичення з різною інтенсивністю нерепарованих одно- та дволанцюгових розривів ДНК, полідезоксирибонуклеотидів, підвищення рівня міжнуклеосомної деградації ДНК, що супроводжується активацією каспази-2 та опосередковується проапоптотичними системами експресії з залученням редокс-чутливих транскрипційних факторів AP-1, p53 і NF-κB.

2. Показано, що за радіаційно-індукованого апоптозу посилюється активація рецептор–опосередкованого шляху за рахунок мобілізації Fas – залежної ланки та основної ініціаторної каспази залежного від рецепторів сигнального шляху – каспази-8.

3. Виявлено порушення функціональної активності мітохондрій за рахунок Вах-опосередкованої стимуляції пороутворення мембран мітохондрій з подальшою активацією ініціаторної каспази-9 та AIF-залежного нуклеолізу, що є основними складовими мітохондріально-опосередкованої ланки радіаційно-індукованого апоптозу.

4. Встановлено різнонаправленість змін каспазо-незалежних ферментативних протеолітичних каскадів (калпаїнів, лізосомального катепсину В та протеасомної системи), які свідчать про комплексний

характер їх деструктивних та сигнальних функцій у регуляції перебігу радіаційно-індукованого апоптозу.

5. Виявлено порушення окисно-антиоксидантної рівноваги, а саме підвищення рівня продуктів окиснення ліпідів і білків, накопичення супероксидного аніон-радикалу та дисрегуляція антиоксидантних ферментних систем (супероксиддисмутази і каталази), що призводить до залучення редокс-чутливих ланок досліджених шляхів реалізації радіаційно-індукованого апоптозу, характерні прояви яких визначають оксидативний стрес як медіатор апоптозу.

6. Виявлені за радіаційно-індукованого апоптозу зміни активності ефекторних каспаз – каспази-3 і каспази-6 – мають різноспрямований характер, обумовлений складною амплікативною системою регуляції їх функціонування, що забезпечує виконання ними поряд з ефекторною і функції месенджерних молекул у проведенні апоптотичного сигналу.

7. Встановлено порушення енергетичного балансу, що супроводжується змінами вмісту АТФ за рахунок активізації катаболічної ланки пуринового обміну за радіаційно-індукованого апоптозу.

8. Відмічено модифікуючий вплив інозину на певні ланки біохімічних шляхів регуляторної мережі відповіді клітин за дії радіаційного чинника.

9. На основі кореляційного аналізу встановлено групу показників, які мають найвищий ступінь кореляційних зв'язків, і є ключовими параметрами для виявлення змін стану лімфоцитів селезінки та тимусу щурів за радіаційно-індукованого апоптозу.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Fadeel B, Orrenius S. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in human disease. *Journal of Internal Medicine*. 2005;258(6):479-517.
2. Фильченков АА. Реактиваторы апоптоза как препараты целевой противоопухолевой терапии. *Биомедицинская химия*. 2013;59(2):119-143.
3. Favalaro B, Allocati N, Graziano V, Di Ilio C, De Laurenzi V. Role of Apoptosis in disease. *Aging (Albany NY)*. 2012 May;4(5):330-349.
4. McIlwain DR, Berger Th, Mak TW. Caspase functions in cell death and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2013 Apr 1; 5(4):a008656.
5. Lemon J, Rollo C, McFarlane N, Boreham D. Radiation-induced apoptosis in mouse lymphocytes is modified by a complex dietary supplement: the effect of genotype and gender. *Mutagenesis*. 2008;23(6):465-472.
6. Maier P, Hartmann L, Wenz F, Herskind C. Cellular pathways in response to ionizing radiation and their targetability for tumor radiosensitization. *International Journal of Molecular Sciences*. 2016;17(1):102.
7. Kondo T. Radiation-induced cell death. *Nihon Rinsho*. 2012 Mar; 70(3):389-393.
8. Aleksanin SS, Fedortseva RF, Vychkovskaya IB. The problem of remote effects of radiation. Special cell effects and somatic consequences of low doses exposure. *Medical and Biological Problems of Life Activity*. 2016;1(15):54-62.
9. Кудряшов ЮБ. Радиационная биофизика (ионизирующие излучения). М.: Физматлит; 2004. 446 с.
10. Кучеренко МЄ, під редакцією. Радіаційно-індукована структурно-метаболична модифікація ентероцитів та лімфоїдних клітин. Київ: Фітосоціоцентр; 2006. 201 с.
11. Шестопапов ВМ, Моїсеєв АЮ, Родіонова НК, Ганжа ОБ, Маковецька ЛІ, Дружина МО. Вплив мінеральної води березівського родовища на

кровотворну систему опромінених тварин. Ядерна фізика та енергетика. 2016;16(1):68-76.

12. Закон "Про захист тварин від жорстокого поводження". Верховна Рада України. Відомості Верховної Ради України. 2006;27:230 с.

13. Rozemond H. Laboratory animal protection: the European Convention and the Dutch Act. *The Veterinary quarterly*. 1986;8(4):346–349.

14. Galluzzi L, Vitale I, Abrams JM, Alnemri ES, Baehrecke EH, et al. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death Differ*. 2012 Jan; 19(1):107-220.

15. Escobar ML, Echeverría OM, Vázquez-Nin GH. Necrosis as programmed cell death. Croatia: INTECH; 2015. Chapter 19, Cell death- autophagy, apoptosis and necrosis. p.420-434.

16. Taylor R, Cullen S, Martin S. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2008; 9(3):231-241.

17. Белушкина НН, Хасан ХА, Северин СЕ. Молекулярные основы апоптоза. *Вопросы биол., мед. и фарм. Химии*. 1998;4:15-24.

18. Elmore S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic Pathology*. 2007;35(4):495-516.

19. Xiao-Ming Yin, Zheng Dong, editors. *Essentials of Apoptosis: A Guide for Basic and Clinical Research*. Humana Press, Springer Science & Business Media; 2009. 742 p.

20. Watters D. Molecular mechanisms of ionizing radiation-induced apoptosis. *Curtin Conference. Immunology and Cell Biology*. 1999; 77: 263–271.

21. Hongmei Z. Extrinsic and intrinsic apoptosis signal pathway. Review. Croatia: INTECH; 2012. Chapter 1, Apoptosis and Medicine; p.4-22.

22. Orrenius S, Gogvadze V, Zhivotovsky B. Mitochondrial oxidative stress: implications for cell death. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2007;47:143-83.

23. Riedl SJ, Salvesen GS. The apoptosome: signalling platform of cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007 May;8(5):405-13.

24. Youle RJ, Strasser A. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediated cell death. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*. 2008; 9:47-59.
25. Giam M, Huang DCS, Bouillet P. BH-3-only proteins and their roles in programmed cell death. *Oncogene*. 2009; 27:S126-136.
26. Scott I, Youle RJ. Mitochondrial fission and fusion. *Essays Biochem*. 2010;47: 85–98.
27. Ni Hong-Min, Williams JA, Ding W-X. Mitochondrial dynamics and mitochondrial quality control. *RedoxBiology*. 2015;4:6–13.
28. Dragan L, Andriychuk T, Ostapchenko L. Structural biochemical assessment of the status of the nuclear apparatus of the rat spleen lymphoid cells under radiation treatment. *Annales Universitatis Mariae Curie–Sklodovska, Lublin–Polonia*. 2010; XXIII(2)(30)(Sectio DDD):199-202.
29. Газиев АИ. Повреждение ДНК в клетках под действием ионизирующей радиации. *Молекулярная радиобиология*. 1999;39(6):630-638.
30. Fischer U, Jänicke RU, Schulze-Osthoff K. Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates. *Cell Death Differ*. 2003 Jan;10(1):76-100.
31. Александровская НИ, Ванюшин БФ. Эндонуклеазы и апоптоз у животных. *Успехи биологической химии*. 2012;52:63–96.
32. Errami Y, Naura AS, Kim H, Ju J, Suzuki Y, El-Bahrawy AH, et al. Apoptotic DNA fragmentation may be a cooperative activity between caspase-activated deoxyribonuclease and the poly(ADP-ribose) polymerase-regulated DNAS1L3, an endoplasmic reticulum-localized endonuclease that translocates to the nucleus during apoptosis. *The Journal of Biol. Chem*. 2013; 288(5):3460 –3468.
33. Тронов ВА, Репарация ДНК и апоптоз. *Цитология*. 1999;41(5):405-410.
34. Тронов ВА, Константинов ЕМ, Крамаренко ИИ. Роль эксцизионных механизмов репарации ДНК в индукции апоптоза. *Биохимия*. 2002;67(7): 882–889.

35. Желтухин АО, Чумаков ПМ. Желтухин АО, Чумаков ПМ. Повседневные и индуцируемые функции гена P53. Успехи биологической химии. 2010; 50:447-454.
36. Kuranaga E. Caspase signaling in animal development. *Development, Growth & Differentiation*. 2011;53(2):137-148.
37. Launay S, Hermine O, Fontenay M, Kroemer G, Solary E, Garrido C. Vital functions for lethal caspases. *Oncogene*. 2005 Aug 4;24(33):5137-5148.
38. Li J, Yuan J. Caspases in apoptosis and beyond. *Oncogene*. 2008;27: 6194-6206.
39. Zhivotovsky B, Orrenius S. Caspase-2 function in response to DNA damage. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2005;331(3):859-867.
40. Logue SE, Martin SJ. Caspase activation cascades in apoptosis. *Biochem Soc Trans*. 2008 Feb; 36(Pt 1):1-9.
41. Kumar S. Caspase-2 in apoptosis, the DNA damage response and tumour suppression: enigma no more? *Nature Reviews. Cancer*. 2009; 9:897-903.
42. Tinel A, Tschopp J. The PIDDosome, a protein complex implicated in activation of caspase-2 in response to genotoxic stress. *Science*. 2004 May; 304(5672):843-846.
43. Fava LL, Bock FJ, Geley S, Villunger A. Caspase-2 at a glance. *J Cell Sci*. 2012 Dec 15;125(Pt 24):5911-5.
44. Silke J, Meier P. Inhibitor of apoptosis (IAP) proteins-modulators of cell death and inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2013 Feb 1;5(2): a008730.
45. Kumar S. Apoptosis: Mechanisms and role in disease. Berlin: Springer Science & Business Media; 2013. 255 p.

46. Parrish AB, Freel CD, Kornbluth S. Cellular mechanisms controlling caspase activation and function. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2013 Jun 1; 5(6): a008672.
47. Chakraborti S, Dhalla NS, editors. *Pathophysiological aspects of proteases.* Singapore: Springer, 2017. 671 p.
48. Solary E, Eymin B, Droin N, Haugg M. Proteases, proteolysis, and apoptosis. *Cell Biology and Toxicology.* 1998; 14: 121–132.
49. Boya P, Kroemer G. Lysosomal membrane permeabilization in cell death. *Oncogene.* 2008;27(50):6434-6451.
50. Eguchi Y., Srinivasan A., Tomaselli K. ATP-dependent steps in Apoptotic Signal Transduction. *Cancer Research.* 1999; 59:174-2181.
51. Lane AN, Fan TW.-M. Regulation of mammalian nucleotide metabolism and biosynthesis. *Nucleic Acids Research.* 2015;43(4):2466–2485.
52. Sévigny J, Martín-Satué M, Pintor J. Purinergic signalling in immune system regulation in health and disease. *Mediators of Inflammation.* 2015:1-3.
53. Lehnert S. *Biomolecular action of ionizing radiation.* Boca Raton, Florida: CRC Press, Talor & Francis; 2007. 560 p.
54. Михайлов ВФ, Мазурик ВК, Бурлакова Е.Б. Сигнальная функция активних форм кислорода в регуляторных сетях ответа клеток на повреждающее воздействия: участие в реализации радиочувствительности и нестабильности генома. *Радиационная биология. Радиоэкология.* 2003;43(1): 5-18.
51. Легеза ВИ, Владимиров ВГ. Новая классификация профилактических противолучевых средств. *Радиационная биология. Радиоэкология.* 1998; 38(3):416-425.

52. Кудряшов ЮБ, Гончаренко ЕН. Современные проблемы противолучевой химической защиты организма. Радиационная биология. Радиоэкология. 1999; 39(2-3):197-211.
53. Kwanghee K, McBride WH. Modifying radiation damage. *Curr Drug Targets*. 2010 Nov; 11(11): 1352–1365.
54. Koukourakis MI. Radiation damage and radioprotectants: new concepts in the era of molecular medicine. *The British Journal of Radiology*. 2012; 85:313–330.
55. Васин М. В. Классификация противолучевых средств как отражение современного состояния и перспективы развития радиационной фармакологии. Радиационная биология. Радиоэкология. 2013; 53(5):459–467.
56. Попова НР, Гудков СВ, Брусков ВИ. Природные пуриновые соединения как радиозащитные средства. Радиационная биология. Радиоэкология. 2014; 54(1): 38–49.
57. Swennen ELR. ATP as a modulator of inflammation and oxidative stress [doctoral thesis]. The Netherlands, Universitaire Pers Maastricht; 2007. 148p.
58. Вартанян ЛП, Крутовских ГН, Пустовалов ЮИ. Радиозащитное действие рибоксина (инозина). Радиобиология. 1989; XXIX(5):707-708.
59. Hou B, Xu ZW, Yang CW, Gao Y, Zhao SF, Zhang CG. Protective effects of inosine on mice subjected to lethal total-body ionizing irradiation. *J Radiat Res*. 2007 Jan;48(1):57-62.
60. Легеза ВИ, Абдуль ЮА, Антушевич АЕ. Влияние рибоксина на резистентность мышечной ткани к пролонгированному γ -облучению в нелетальной дозе. Радиационная биология. Радиоэкология. 1993;33(2):658-664.
61. Легеза ВИ. Медицинская защита при радиационных авариях: некоторые итоги и уроки Чернобыльской катастрофы. Радиационная биология. Радиоэкология. 2011; 51(1):70–75.
62. Гудков СВ, Гудкова ОЮ, Штаркман ИН, Гапеев АБ, Чемерис НК, Брусков ВИ. Гуанозин и инозин как природные генопротекторы для клеток

крови мышей при воздействии рентгеновского излучения. Радиационная биология. Радиоэкология. – 2006;46(6):713–718.

63. Gudkov SV, Gudkova OY, Chernikov AV, Bruskov VI. Protection of mice against X-ray injuries by the post-irradiation administration of guanosine and inosine. *Int. J. Radiat. Biol.* 2009 Feb; 85(2):116–125.

64. Гудков СВ, Брусков ВИ. Гуанозин и инозин (рибоксин). Антиоксидантные и радиозащитные свойства. Saarbrücken: LAP Lambert Academic Publishing; 2011. 188 с.

65. Меньщикова ЕБ, Зенков НК. Антиоксиданты и ингибиторы радикальных окислительных процессов. *Успехи соврем. биологии.* -1993;113(4):442-454.

66. Ракша НГ. Метаболізм пуринів у клітинах імунокомпетентних органів щурів за променевого ураження [дисертація], Київ, Київ. нац. ун-т ім. Тараса Шевченка; 2004. 149 с.

67. Virag L, Szabo C. Purines inhibit poly(ADP-ribose) polymerase activation and modulate oxidant-induced cell death. *FASEB J.* 2001;15:99-107.

68. Haskó G, Linden J, Cronstein B, Pacher P. Adenosine receptors: therapeutic aspects for inflammatory and immune diseases. *Nat Rev Drug Discov.* 2008 Sep;7(9):759-70.

69. Burnstock G, Boeynaems JM. Purinergic signalling and immune cells. *Purinergic Signal.* 2014 Dec;10(4):529-64.

70. Cekic C, Linden J. Purinergic regulation of the immune system. *Nat Rev Immunol.* 2016 Mar; 16(3):177-92.

71. Hasko G, Cronstein BN, Szabo C. Adenosine Receptors: Therapeutic Aspects for Inflammatory and Immune Diseases. Boca Raton, Florida: CRC Press, Taylor & Francis; 2007. 363 p.

72. Клаус Дж, редактор. Лимфоциты. М: Мир; 1990. 395с.

73. Дмитренко НП, Андрийчук ТР, Кишко ТО, Юркина ВВ, Цудзевич БА. Определение повреждений ДНК в непролиферирующих клетках животных. Укр. биохим. журнал. 1997;69(1):69-71.
74. Иванник БП, Синькова РВ, Конов АВ и др. Эндонуклеолиз хроматина в тимocyтах облученных и необлученных крыс. Радиобиология. 1986;26(2):162-166.
75. Нелипович ПА, Кулагина ТП, Уманский СР. Роль нарушения поли-(АДФ-рибозилирования) в активации Ca^{2+}/Mg^{2+} -зависимой эндонуклеазы. Радиобиология. 1984;24(7):435-438.
76. Пасос Ф, Телепнева ВИ. Содержание никотинамидных коферментов в нормальной и регенерирующей печени крыс. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 1985;99(4): 432-434.
77. Davis J, Kucuk O, Djuric Z, Sarkar F. Soy isoflavone supplementation in healthy men prevents NF- κ B activation by TNF- α in blood lymphocytes. Free Radical Biology and Medicine. 2001;30(11):1293-1302.
78. Laemmli U. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. Nature. 1970;227(5259):680-685.
79. Петрова ГВ, Донченко ГВ. Влияние α -токоферола на апоптоз и некроз тимocyтов крыс, индуцированные Ca^{2+} -ионофором A23187 в различных концентрациях. Укр.биохим.журн. 2004;76(1):103-107.
80. Шатерников ВА. Унифицированные клинические лабораторные методы исследования. Лаб. дело. 1976;12: 748-752.
81. Березин ВА, Чорная ВИ, Рева АД, Смагина ЛД. Очистка и некоторые свойства тиол-активируемых катепсинов из больших полушарий коры головного мозга и мозжечка быка. Укр. биохим. журн. 1982;54(3):249-253.

82. Bizat N, Hermel J-M, Boyer F, Jacquard C, Cre´minon C, Ouary S, et al. Calpain is a major cell death effector in selective striatal degeneration induced in vivo by 3-nitropropionate: implications for huntington’s disease. *The Journal of Neuroscience*. 2003 Jun; 23(12):5020-5030.
83. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976;72:248-54.
84. Орехович ВН, редактор. *Современные методы в биохимии*. М: Медицина; 1977. 392с.
85. Вартамян ЛС, Гуревич СМ. NADH-і NADPH-зависимое образование супероксидных радикалов в ядрах печени. *Биохимия*. 1989;54(6):1020-1025.
86. Чевари С, Чаба И, Секей Й. Роль супероксиддисмутазы в окислительных процессах клетки и метод определения ее в биологических материалах. *Лабораторное дело*. 1985;11:678-681.
87. Королюк МА, Иванова ЛИ, Майорова ИГ, и др. Метод определения активности каталазы. *Лаб. дело*. 1988;1:16-19.
88. Кишко ТО, Дмитренко НП. Роль ксантиноксидазной и ксантиндегидрогеназной систем в апоптозе тимоцитов, индуцированном папаверином. *Укр. біохім. журн*. 2000;73(3):95-104.
89. Oliver CN, Ahn BW, Moerman EJ, et al. Age-related changes in oxidized proteins. *J. Biol. Chem*. 1987;262(12):5488-5491.
90. Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit I // Technical data sheet. – BD Bioscience. – 2002. – 3 p.
91. Apoptosis: Applied Reagents and Technologist // Instruction Manual. – BD Bioscience. – 1998. –2 ed. – 2002. – 99 p.

92. Головацкий ИД, Петличная ЛИ, Лашкай АФ. Поглощение и превращение [8-¹⁴C]-аденозина и 2',3'-О-изопропилиденаденозина клетками и гомогенатами клеток гепатомы Зайделя. Укр. біохім. журн. 1989;61(2):64-69.
93. Дмитренко НП, Комисаренко СВ, Уманский ВЮ. Субклеточное распределение некоторых ферментов обмена аденозина и АМФ в лимфоцитах тимуса крысы. Доклады АН УССР. Серия "Б". 1980;4:69-71.
94. Головацький ІД. Мікрометод одночасного визначення гептулози і пентоз та деякі особливості обміну цих сполук в тканинах тварин. Укр. біохім. журн. 1965;37(6):927-934.
95. Филановская ЛИ, Вартамян НЛ, Того АВ, и др. Ферменты катаболических превращений пуриновых нуклеотидов лимфоцитов в норме и при хроническом лимфолейкозе. Вопр. мед. химии. 1985;31(3):48-53.
96. Cohen J. Statistical power analysis for the behavioral sciences. Routledge, Elsevier Inc. 2nd edition, 1988. 400 p.
97. Surova O, Zhivotovsky B. Different modes of cell death induced by DNA damage. Chapter 4.2. The Cellular Response to the Genotoxic Insult: The Question of Threshold for Genotoxic Carcinogens. Edited by Greim H., Albertini RJ; Toxicology. 2012;13: 239-265.
98. Janssens S, Tschopp J. Signals from within: the DNA-damage-induced NF-kappaB response. Cell Death Differ. 2006 May;13(5):773-784.
99. Shiloh Y, Ziv Y. The ATM protein kinase: regulating the cellular response to genotoxic stress, and more. Nat Rev Mol Cell Biol. 2013 Apr; 14(4):197-210.
100. Пескин АВ. Взаимодействие активного кислорода с ДНК. Обзор. Биохимия. 1997;62(12):1571-1578.
101. Norbury C, Zhivotovsky B. DNA damage-induced apoptosis. Oncogene. 2004; 23:2797-2808.

102. Белецкий ИП, Уманский СР. Природа разрывов, индуцируемых в ДНК на ранних этапах интерфазной гибели клеток. Радиобиология. 1987;26(2): 227-230.
103. Magnander K. Formation and repair of complex DNA damage induced by ionizing radiation/К. Magnander. – Department of Oncology, Institute of Clinical Sciences, Sahlgrenska Academy at University of Gothenburg, 2013. – 57 p.
104. Mognato M, Grifalconi M, Canova S, Girardi C, Celotti L. The DNA-damage response to ionizing radiation in human lymphocytes. Croatia: INTECH; 2011. Chapter 1.Selected Topics in DNA Repair; p.4-28.
105. Surova O, Zhivotovsky B. Various modes of cell death induced by DNA damage. Oncogene. 2012:1–9.
106. Desouky O, Ding N, Zhou G. Targeted and non-targeted effects of ionizing radiation. Journal of Radiation Research and Applied Sciences. 2015; 8(2):247-254.
107. Бурлакова ЕБ, Михайлов ВФ, Мазурик ВК. Система окислительно-восстановительного гомеостаза при радиационно-индуцированной нестабильности генома. Радиационная биология. Радиоэкология. 2001;41(5):489-499.
108. Konishi A, Shimizu S, Hirota J, Takao T, Fan Y, Matsuoka Y et al. Involvement of histone H1.2 in apoptosis induced by DNA double-strand breaks. Cell. 2003 Sep 19;114(6):673-88.
109. Redon CE, Nakamura AJ, Zhang YW, Ji JJ, Bonner WM, Kinders RJ et al. Histone γ H2AX and poly(ADP-ribose) as clinical pharmacodynamic biomarkers. Clin Cancer Res. 2010 Sept; 16(18): 4532-42.
110. Shultz LB, editor. Cell Apoptosis: Regulation and Environmental Factors. Haarpodje, New York, USA: Nova Publishers; 2007. Nakajima T. Kinase networks in the regulation of radiation-induced apoptosis-understanding cascade from initiation to promotion of apoptosis; p.69-91.

111. Rashi-Elkeles S, Elkon R, Shavit S, Lerenthal Y, Linhart C, Kupershtein A et al. Transcriptional modulation induced by ionizing radiation: p53 remains a central player. *Molecular Oncology*. 2011;5(4):336-348.
112. Cohen JJ. Programmed cell death in the immune system. *Adv Immunol*. 1991;50(1):55-85.
113. Матышевская О.П. Биохимические аспекты вызванного радиацией апоптоза. *Укр. біохім. журн*. 1998;70(5):15-29.
114. Цудзевич БО, Пархомець ЮП, Андрійчук ТР, Юркіна ВВ. Вплив іонізуючої радіації на деградацію хроматину тимоцитів щурів. *Укр. біохім. журнал*. 1998;70(4):105-10.
115. Пархомець ЮП, Андрійчук ТР, Харсун ВА, Цудзевич БО. Етапи деградації хроматину тимоцитів щурів, загиблих шляхом апоптозу. *Вісник Київського університету*. 1998;27:9-11.
116. Белецкий ИП, Лихтенштейн АВ, Уманский СР. Закономерности деградации индивидуальных генов в тимоцитах облученных крыс. *Радиобиология*. 1989;XXIX (4):435-440.
117. Cohen GM, Sun XM, Snowden RT, Dinsdale D, Skilleter DN. Key morphological features of apoptosis may occur in the absence of internucleosomal DNA fragmentation.. *Biochem J*. 1992 Sep; 286:331-334.
118. Strasser A, O'Connor L, Dixit VM. Apoptosis signaling. *Annu Rev Biochem*. 2000;69:217-45.
119. Цудзевич БО, Андрійчук ТР, Кудіна НГ. Вплив іонізуючої радіації та інгібіторів енергетики мітохондрій на міжнуклеосомну фрагментацію ДНК у тимоцитах щурів. *Вісник КНУ імені Тараса Шевченка. Сер.: Біологія*. 2002; 37:91-3
120. Golden EB, Pellicciotta I, Demaria S, Barcellos-Hoff MH, Formenti SC, Formenti SC. The convergence of radiation and immunogenic cell death signaling pathways. *Front Oncol*. 2012 Aug; 2(Article88):1-8.

121. D'amours D, Desnoyers S, D'silva I, Poirier G. Poly(ADP-ribosyl)ation reactions in the regulation of nuclear functions. *Biochem. J.* 1999; 342:249-268.
122. Кучмеровская ТМ, Шиманський ІО, Донченко ГВ, Клименко АП. Роль полі- АДФ-рибозополімерази в патогенезі діабетичної енцефалопатії: ефект нікотинаміду. *Доповіді НАН України.* 2004;1:165-170.
123. Дрель ВР, Шиманський ІО, Сибірна НО, Великий ММ. Роль PARP та процесу полі-ADP-рибозилування протеїнів у регулюванні клітинних функцій. *Укр. біохім. журн.* 2011;83(6):5-34.
124. Luo X, Kraus W. On PAR with PARP: cellular stress signaling through poly(ADP-ribose) and PARP-1. *Genes & Development.* 2012; 26(5):417-432.
125. Gibson B, Kraus W. New insights into the molecular and cellular functions of poly(ADP-ribose) and PARPs. *Nature Reviews Molecular Cell Biology.* 2012;13(7):411-424.
126. Chaitanya G, Alexander J, Babu P. PARP-1 cleavage fragments: signatures of cell-death proteases in neurodegeneration. *Cell Communication and Signaling.* 2010;8(1):31.
127. Oliver FJ, Menissier-de Murcia J, de Murcia G. Poly(ADP-Ribose) Polymerase in the Cellular Response to DNA Damage, Apoptosis, and Disease. *Am. J. Hum. Genet.* 1999;64:1282-1288.
128. Nelipovich PA, Nikonova LV, Umansky SR. Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase as a possible reason for activation of Ca^{2+}/Mg^{2+} -dependent endonuclease in thymocytes of irradiated rats. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med.* 1988 May;53(5):749-65.
129. Kaufmann SH, Desnoyers S, Ottaviano Y, Davidson NE, Poirier GG. Specific proteolytic cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase: an early marker of chemotherapy-induced apoptosis. *Cancer Res.* 1993 Sep 1;53(17):3976-85.
130. Virag L., Szabo C. The Therapeutic Potential of Poly(ADP-Ribose) Polymerase Inhibitors. // *Pharmacol. Rev.* 2002., Vol. 54. N. 3. P.375-429.

131. Андрійчук ТР, Драган ЛП, Полякова ВВ, Ракша НГ, Цудзевич БО. Активність полі (АДФ-рибозо)-полімерази і рівень одно- та дволанцюгових розривів ДНК в спленоцитах щурів за дії рентгенівського опромінення. Вісник проблем біології і медицини. 2007;3:28-31.
132. Драган ЛП, Ракша НГ, Андрійчук ТР. Вплив іонізуючої радіації та рибоксину на стан системи полі-АДФ-рибозилування лімфоцитів селезінки щурів. Медична хімія. 2009;11(3):124-6.
133. Зиглер М. Транслоказа адениловых нуклеотидов – переносчик, который, возможно, участвует в синтезе NAD в митохондриях // Биохимия. 2005. – Т.70, вып.2. –С.214-218.
134. Ying W. NAD⁺/NADH and NADP⁺/NADPH in cellular functions and cell death: regulation and biological consequences. *Antioxid Redox Signal*. 2008 Feb; 10 (2): 179-206.
135. Imai Shin-ichiro. The NAD World: A new systemic regulatory network for metabolism and aging – Sirt1, systemic NAD biosynthesis, and their importance *Cell Biochem Biophys*. 2009; 53(2): 65–74.
136. Bosch-Presegué L, Vaquero A. The dual role of sirtuins in cancer. *Genes & Cancer*. 2011; 2(6) 648–662.
137. Bosh -Presegue L, Vaquero A.. Sirtuins in stress response: guardians of the genome. *Oncogene*. 2014; 3:3764–3775.
138. Altmeyer M, Messner S, Hassa PO, Fey M, Hottiger MO. Molecular mechanism of poly(ADP-ribosyl)ation by PARP1 and identification of lysine residues as ADP-ribose acceptor sites. *Nucleic Acids Res*. 2009. 37: 3723–3738.
139. Hassa PO, Haenni SS, Buerki C, Meier NI, Lane WS, Owen H, Gersbach M, Imhof R, Hottiger MO. Acetylation of poly(ADP-ribose) polymerase-1 by p300/CREB-binding protein regulates coactivation of NF-kB-dependent transcription. *J Biol Chem*. 2005;280: 40450–40464.

140. Kang HC, Lee YI, Shin JH, Andrabi SA, Chi Z, Gagne JP, et al. Iduna is a poly(ADP-ribose) (PAR)-dependent E3 ubiquitin ligase that regulates DNA damage. *Proc Natl Acad Sci*. 2011; 108: 14103–14108.
141. Arnold J, Grune T. PARP-mediated proteasome activation: A co-ordination of DNA repair and protein degradation? *BioEssays*. 2002; 24(11):1060-1065.
142. McGinnis KM, Gnegy ME, Park YH, Mukerjee N, Wang KK. Procaspase-3 and poly(ADP)ribose polymerase (PARP) are calpain substrates. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999;263:94-99.
143. Hong SJ, Dawson TM, Dawson VL. Nuclear and mitochondrial conversations in cell death: PARP-1 and AIF signaling. *TRENDS in Pharmacological Sciences* 2004 May;25(5):259-264.
144. Wang Y, Dawson VL, Dawson TM. Poly (ADP-ribose) signals to mitochondrial AIF: a key event in Parthanatos. *Exp Neurol*. 2009 Aug; 218(2): 193–202.
145. Stilmann M, Hinz M, Arslan SC, Zimmer A, Schreiber V, Scheidereit C. A nuclear poly(ADP-ribose)-dependent signalosome confers DNA damage-induced I κ B kinase activation. *Mol Cell*. 2009; 36: 365–378.
146. Greim H, Marrs T, Albertini R. Cellular Response to the Genotoxic Insult: The Question of Threshold for Genotoxic Carcinogens. *Royal Society of Chemistry*; 2012. Chapter 4.2. Different Modes of Cell Death Induced by DNA Damage; p. 239-265.
147. Hayden MS, Ghosh S. Signaling to NF-kappaB. *Genes Dev*. 2004 Sep 15;18(18):2195-224.
148. Janssens S, Tschopp J. Signals from within: the DNA-damage-induced NF- κ B response. *Cell Death and Differentiation*. 2006; 13(5):773-784.
149. Pahl HL. Activators and target genes of Rel/NF- kappaB transcription factors. *Oncogene*. 1999 Nov; 22;18(49):6853-6866.

150. Kucharczak J, Simmons MJ, Fan Y, Gélinas C. To be, or not to be: NF-kappaB is the answer--role of Rel/NF-kappaB in the regulation of apoptosis. *Oncogene*. 2003 Dec;22(56):8961-82.
151. Israël A. The IKK Complex, a Central Regulator of NF-kB. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2010;2: a000158:1-14.
152. Oeckinghaus A, Ghosh S. The NF- kB Family of Transcription Factors and Its Regulation. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2009;1 a000034:1-14.
153. Oeckinghaus A, Hayden MS, Ghosh S. Crosstalk in NF-κB signaling pathways. *Nature Immunology*. 2011 Aug; 12(8): 695-708.
154. Frelin C, Imbert V, Bottero V, Gonthier N, Samraj A, Schulze-Osthoff K et al. Inhibition of the NF-κB survival pathway via caspase-dependent cleavage of the IKK complex scaffold protein and NF-κB essential modulator NEMO. *Cell Death and Differentiation*. 2007;15(1):152-160
155. Perkins ND. Integrating cell-signalling pathways with NF-kappaB and IKK function. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007 Jan; 8(1):49-62.
156. Chen Lin-Feng, Greene WC. Shaping the nuclear action of NF-κB. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*. 2004 May; 5: 392-401.
157. Claudio E, Brown K, Siebenlist U. NF-κB guides the survival and differentiation of developing lymphocytes. *Cell Death and Differentiation*. 2006;13: 697–701.
158. Hayden MS, Ghosh S. Signaling to NF-kappaB. *Genes Dev*. 2004 Sep 15; 18(18):2195-224.
159. Stephany J. Veuger, Jill E. Hunter, and Barbara W. Durkacz Ionizing radiation-induced NF-κB activation requires PARP-1 function to confer radio-resistance. *Oncogene*. 2009 February 12; 28(6): 832–842
160. Hassa PO, Buerki C, Lombardi C, Imhof R, Hottiger MO. Transcriptional coactivation of nuclear factor-kappaB-dependent gene expression by p300 is regulated by poly(ADP)-ribose polymerase-1. *J Biol Chem*. 2003 Nov; 278(46): 45145-45153.

161. Bohuslav J, Chen LF, Kwon H, Mu Y, Greene WC. p53 induces NF-kappaB activation by an IkappaB kinase-independent mechanism involving phosphorylation of p65 by ribosomal S6 kinase 1. *J Biol Chem*. 2004 Jun 18; 279(25):26115-25.
162. Monora M, Greabu M, Totan A, Mitrea N, Battino M. Redox-sensitive signaling factors and antioxidants. *Farmacologia*. 2009. 57(4): 399-411.
163. Турпаев КТ. Активные формы кислорода и регуляция экспрессии генов. *Биохимия*. 2002; 67(30): 339-352.
164. Nakano H, Nakajima A, Sakon-Komazawa S, Piao JH, Xue X, Okumura K. Reactive oxygen species mediate crosstalk between NF-kappaB and JNK. *Cell Death Differ*. 2006 May;13(5):730-737.
165. Hirota K, Murata M, Sachi Y, Nakamura H, Takeuchi J, Mori K et al. Distinct roles of thioredoxin in the cytoplasm and in the nucleus. A two-step mechanism of redox regulation of transcription factor NF-kappaB. *J Biol Chem*. 1999; 274:27891-27897.
166. Gianluca TG, Quadrifoglio F, Tiribelli C, Kelley MR. The many functions of APE1/Ref-1: not only a DNA Repair Enzyme, Antioxidants & Redox Signaling. 2009;11: 601-620.
167. Октябрьский ОН, Смирнова Г.В. Редокс-регуляция клеточных функций. *Биохимия*. 2007; 72(2): 158-174.
168. Genestra M. Oxyl radicals, redox-sensitive signalling cascades and antioxidants. *Cell Signal*. 2007 Sep;19(9):1807-1819.
169. Morgan MJ, Liu ZG. Crosstalk of reactive oxygen species and NF-kB signaling. *Cell Res*. 2011 Jan; 21(1):103-15.
170. Jackson JG, Post SM and Lozano G. Regulation of tissue- and stimulus-specific cell fate decisions by p53 in vivo. *J Pathol* 2011; 223: 127–136.
171. Fischer M. Census and evaluation of p53 target genes. *Oncogene*. 2017 Jul 13;36(28):3943-3956.

172. Levine AJ, Hu W, Feng Z (2006) The p53 pathway: what questions remain to be explored? *Cell Death Differ* 13(6):1027–1036.
173. Nicholas D Lakin, Stephen P Jackson Regulation of p53 in response to DNA damage. *Oncogene* (1999) 18, 7644 – 7655.
174. Perry ME. Mdm2 in the response to radiation. *Mol Cancer Res.* 2004 Jan; 2(1):9-19.
175. Ranaweera RS, Yang X. Auto-ubiquitination of Mdm2 enhances its substrate ubiquitin ligase activity. *J Biol Chem.* 2013 Jun 28;288(26):18939-46.
176. Ю.В. Перетятко, Л.О. Дацюк, У.В. Старанко, Н.О. Сибірна Роль апоптоз-регуляторних білків у розвитку генетично запрограмованої смерті клітин імунної системи за дії рентгенівського випромінювання. *Експериментальна і клінічна фізіологія та біохімія.* 2010.2.: 11–17.
177. Ofir-Rosenfeld Y, Boggs K, Michael D, Kastan MB, Oren M. . Mdm2 regulates p53 mRNA translation through inhibitory interactions with ribosomal protein L26. *Mol Cell.* 2008 Oct 24;32(2):180-9.
178. Pariat M, Carillo S, Molinari M, Salvat C, Debüßsche L, Bracco L, Milner J, Piechaczyk M. Proteolysis by calpains: a possible contribution to degradation of p53. *Mol Cell Biol.* 1997 May;17(5):2806-15
179. Erster S, Mihara M, Kim RH, Petrenko O, Moll UM. In Vivo Mitochondrial p53 Translocation Triggers a Rapid First Wave of Cell Death in Response to DNA Damage That Can Precede p53 Target Gene Activation/ *Molecular and cellular biology,* Aug. 2004, p. 6728–6741 Vol. 24, No. 15
180. Velasco-Miguel S, Buckbinder L, Jean P, Gelbert L, Talbott R, Laidlaw J, Seizinger B, Kley N. PA26, a novel target of the p53 tumor suppressor and member of the GADD family of DNA damage and growth arrest inducible genes. *Oncogene* 1999; 18(1): 127–137
181. Vousden KH, Ryan KM. p53 and metabolism. *Nature Reviews Cancer* 9, 691–700 (2009).

182. Yu Y, Zhang D, Huang H, et al. NF- κ B1 p50 promotes p53 protein translation through miR-190 downregulation of PHLPP1. *Oncogene* (2014) 33, 996–1005
183. p53 and NF- κ B: different strategies for responding to stress lead to a functional antagonism. Prashanth Ak and Arnold J. Levine¹. *The FASEB Journal* 2010;24(10): 3643-3652
184. *Mech Dev.* 2008 Nov-Dec;125(11-12):919-31. p53 family in development. Danilova N(1), Sakamoto KM, Lin S. 2008 Feb 1;314(3):509-29.
185. Webster GA, Perkins ND Transcriptional cross talk between NF- κ B and p53. *Mol Cell Biol.* 1999 May;19(5):3485-95.
186. Karin M, Liu Zg, Zandi E. AP-1 function and regulation. *Curr Opin Cell Biol.* 1997 Apr;9(2):240-6.
187. Criswell T, Leskov K, Miyamoto S, Luo G, Boothman DA. Transcription factors activated in mammalian cells after clinically relevant doses of ionizing radiation. *Oncogene.* 2003 Sep ;22(37):5813-5827.
188. Chastel C, Jiricny J, Jaussi R. Activation of stress-responsive promoters by ionizing radiation for deployment in targeted gene therapy. *DNA Repair.* 2004; 3: 201-215.
189. Hayakawa R, Hayakawa T, Takeda K, Ichijo H. Therapeutic targets in the ASK1-dependent stress signaling pathways. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.* 2012;88(8):434-53.
190. Hiram Syu-ichi, Kawasaki H, Yani M, Suzuki K. Degradation of transcription factors, c-Jun and c-Fos, by calpain. *FEBS Letters.* 1991; 287 (1,2):57-61.
191. Orłowski RZ. The role of the ubiquitin-proteasome pathway in apoptosis. *Cell Death and Differentiation.* 1999; 6:303 – 313.
192. Tiphanie Gomard, Isabelle Jariel-Encontre, Jihane Basbous, Guillaume Bossis, Gabriel Mocquet-Torcy and Marc Piechaczyk¹ Fos family protein degradation by the proteasome 858-863. *Biochemical Society Transactions* (2008) Volume 36, part 5.

193. Matsuzawa A, Ichijo H. Redox control of cell fate by MAP kinase: physiological roles of ASK1-MAP kinase pathway in stress signaling. *Biochim Biophys Acta*. 2008 Nov;1780(11):1325-36.
194. Laborde E. Glutathione transferases as mediators of signalling pathways involved in cell proliferation and cell death. *Cell Death and Differentiation*. 2010; 17:1373–1380.
195. Karimpour S, Lou J, Lin L, Rene L, Lagunas L, Ma X et al. Thioredoxin reductase regulates AP-1 activity as well as thioredoxin nuclear localization via active cysteines in response to ionizing radiation. *Oncogene*. 2002;21(41):6317-6327.
196. NF-kappaB and AP-1 connection: mechanism of NF-kappaB-dependent regulation of AP-1 activity. Fujioka S(1), Niu J, Schmidt C, Sclabas GM, Peng B, Uwagawa T, Li Z, Evans DB, Abbruzzese JL, Chiao PJ. *Mol.Cell Biol* 2004 Sep;24(17):7806-19.
197. Baliga BC, Read SH and Kumar S. The biochemical mechanism of caspase-2 activation. *Cell Death and Differ*. 2004;11:1234–1241.
198. Robertson JD, GogvadzeV, Kropotov A, Vakifahmetoglu H, Zhivotovsky B, Orrenius S. Processed caspase-2 can induce mitochondria-mediated apoptosis independently of its enzymatic activity. *EMBO reports*. 2004;5(6):643-648.
199. Lopez-Cruzan M, Sharma R, Tiwari M, Karbach S, Holstein D, Martin CR et al. Caspase-2 resides in the mitochondria and mediates apoptosis directly from the mitochondrial compartment. *Cell Death Discovery*. 2016; 2(16005):1-9.
200. Tinel A, Janssens S, Lippens S, Cuenin S, Logette E, Jaccard B, et al. Autoproteolysis of PIDD marks the bifurcation between pro-death caspase-2 and pro-survival NF-κB pathway. *The EMBO J*. 2007;26:197-208.
201. Кудряшов ЮБ. Основные принципы в радиобиологии. Радиационная биология. Радиоэкология. 2001; 41(5): 531-548.

202. Peter ME, Krammer PH. The CD95(APO-1/Fas) DISC and beyond. *Cell Death Differ.* 2003 Jan;10(1):26-35.
203. Lavrik IN, Krammer PH. Regulation of CD95/Fas signaling at the DISC. *Cell Death Differ.* 2012 Jan; 19(1):36-41.
204. Schütze S, Schneider-Brachert W. Impact of TNF-R1 and CD95 Internalization on Apoptotic and Antiapoptotic Signaling. *Results Probl Cell Differ.* 2008;23:1-23
205. Feltham R, Vince JE, Lawlor KE. Caspase-8: not so silently deadly. *Clinical & Translational Immunology.* 2017; 6:1-13
206. Koval TM, editor. Stress-inducible process in higher eukaryotic cells. Berlin: Springer Science & Business Media; 2013. 256 p.
207. Praveen K, Saxena N. Crosstalk between Fas and JNK determines lymphocyte apoptosis after ionizing radiation *Radiation Research.* 2013;179: 725–736.
208. NTuli TM, editor. Apoptosis and Medicine. Croatia:INTECH; 2012.Chapter 1. Hongmei Z. Extrinsic and intrinsic apoptosis signal pathway; p.4-22.
209. Reap EA, Roof K, Maynor K, Borrero M, Booker J, Cohen PL. Radiation and stress-induced apoptosis: a role for Fas/Fas ligand interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997 May 27; 94(11):5750-5.
210. Belka C, Rudner J, Wesselborg S, Stepczynska A, Marini P, Lepple-Wienhues A. et al. Differential role of caspase-8 and BID activation during radiation- and CD95-induced apoptosis. *Oncogene.* 2000 Feb 24;19(9):1181-90.
211. Bouvard V, Zaitchouk T, Vacher M, Duthu A, Canivet M, Choisy-Rossi C, et al. Tissue and cell-specific expression of the p53-target genes: bax, fas, mdm2 and waf1/p21, before and following ionising irradiation in mice. *Oncogene.* 2000 Feb 3; 19(5):649-60.
212. Yu J, Zhang L. The transcriptional targets of p53 in apoptosis control. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005 Jun 10; 331(3):851-8.

213. Wertz IE, Dixit VM. Regulation of death receptor signaling by the ubiquitin system. *Cell Death Differ.* 2010 Jan;17(1):14-24.
214. Thompson S, Loftus L, Ashley M, Meller R. Ubiquitin-proteasome system as a modulator of cell fate. *Curr Opin Pharmacol.* 2008 Feb; 8(1): 90–95.
215. Tchikov V, Bertsch U, Fritsch J, Edelmann B, Schutze S. Subcellular compartmentalization of TNF receptor-1 and CD95 signaling pathways. *Eur. J. Cell. Biol.* 201;90(6–7):467–475.
216. Kolesnick RN, Fuks Z. Radiation and ceramide-induced apoptosis. *Oncogene.* 2003; 22: 5897-5906.
217. De Palma C, Perrotta C. Ceramide as a target of chemotherapy: its role in apoptosis and autophagy. *Clinical Lipidology.* 2012;7(1):111-119.
218. Wang L, Azad N, Kongkaneramt L, Chen F, Lu Y, Jiang B et al. The Fas death signaling pathway connecting reactive oxygen species generation and FLICE inhibitory protein down-regulation. *The J Immunology.* 2008; 180(5): 3072- 3080.
219. Jacob C, Winyard PG, editors. *Redox Signaling and Regulation in Biology and Medicine.* Hoboken, New Jersey, United States: John Wiley & Sons; 2009. 514 p.
220. Barnhart BC, Alappat EC, Peter ME. The CD95 type I/type II model. *Semin Immunol.* 2003 Jun;15(3):185-93.
221. Roy S, Nicholson DW. Cross-Talk in Cell Death Signaling. *J. Exp. Med.* 2000;192(8):21-25.
222. Mizuno T, Zhong X, Rothstein TL. Fas –induced apoptosis in B-cell. *Apoptosis.* 2003; 8(5):451-460.
223. Tumang JR, Negm RS, Solt LA, Schneider TJ. BCR engagement induces Fas resistance in primary B cells in the absence of functional Bruton's tyrosine kinase. *J. Immunol.* 2002;168: 2712–2719.
224. Мартынова ЕА. Регуляция активности каспаз в апоптозе. *Биоорганическая химия.* 2003;29(5):518-543.

225. Parrish A, Freel C, Kornbluth S. Cellular Mechanisms Controlling Caspase Activation and Function. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology. 2013;5(6).
226. Circu ML, Aw TY. Reactive oxygen species, cellular redox systems and apoptosis. Free Radic Biol Med. 2010 March;48(6): 749–762.
227. Booker JK, Reap EA Expression and Function of Fas on Cells Damaged by γ -Irradiation in B6 and B6/lpr Mice. The Journal of Immunology. 1998;161:4536–4541.
228. Андрійчук Т, Ракша Н, Драган Л, Лугова С. Залучення ферментів родини каспаз у радіаційно–індукований апоптоз лімфоцитів щурів. Вісник КНУ імені Тараса Шевченка. Сер.: Проблеми регуляції фізіологічних функцій. 2010;13:48-52.
229. Бра М., Квинан Б., Сузин С.А. Митохондрии в программированной гибели клетки: различные механизмы гибели. // Биохимия 2005, Т.70, вып. 2, С.284-293.
230. Chunxin Wang and Richard J. Youle The Role of Mitochondria in Apoptosis. Annu Rev Genet. 2009; 43: 95–118.
231. Orrenius S, Gogvadze V, Zhivotovsky. Mitochondrial oxidative stress: implications for cell death Annu Rev Pharmacol Toxicol. 2007;47:143-83..
232. Raha S, Robinson BH. Mitochondria, oxygen free radicals, disease and ageing. Trends Biochem Sci. 2000 Oct;25(10):502-8.
233. Акопова В, Носарь ВИ, Маньковская ИН, Сагач ВФ. Влияние Ca^{2+} -индуцированного открывания циклоспоринчувствительной поры на потребление кислорода и функциональное состояние митохондрий печени крыс. Укр. біохім. журн. 2013;8(5): 37-49
234. Kinnalle KW, Peixoto PM, Ryu S-Y, Dejean LM. Is mPTP the gatekeeper for necrosis, apoptosis, or both? Biochim Biophys Acta. 2011 Apr; 1813(4): 616–622.
235. Kroemer G, Galluzzi L, Brenner C. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. Physiol Rev. 2007 Jan;87(1):99-163.

236. Virag L, Szabo C. Purines inhibit poly(ADP-ribose)polymerase activation and modulate oxidant-induced cell death. *The FASEB J.* 2001 Jan;15:99-107.
237. *Biochim Biophys Acta.* 2014 Oct;1837(10):1790-800. doi: 10.1016/j.bbabbio.2014.07.005. Epub 2014 Jul 11. Evidence of oxidative stress and mitochondrial respiratory chain dysfunction in an in vitro model of sepsis-induced kidney injury.
238. Mitochondrial respiratory chain complexes: apoptosis sensors mutated in cancer? A Lemarie & S Grimm. *Oncogene* 30, 3985–4003 (22 September 2011)
239. Вернигорова Л.А., Жорова Е.С., Попов Б.А., Парфенова И.М. Совместное профилактическое применение рибоксина и альгисорба при поступлении в желудочно-кишечный тракт крыс 239PU. *Радиационная биология. радиоэкология.* 2005; 45(2):201-206
240. Григорьева М.Б. Влияние инозина на обмен веществ (обзор) // *Хим.-фармац. журн.-1982.-№4.-С.387-422.*
241. Николаева Л.Ф., Черпаченко Н.М., Соколова Р.И. Влияние инозина на метаболизм миокарда вне зоны инфарктирования // *Кардиология.-1971.-№5.-С.111-114.*
242. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008 Jan;9(1):47-59. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. Youle RJ(1), Strasser A.
243. Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy Peter E. Czabotar, Guillaume Lessene, Andreas Strasser & Jerry M. Adams. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 15, 49–63 (2014)
244. Andrew M. Petros, Edward T. Olejniczak, Stephen W. Fesik. Structural biology of the Bcl-2 family of proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA).* March 2004;1644 (2–3): 83-9
245. *Nature.* 1994 May 26;369(6478):321-3. BH1 and BH2 domains of Bcl-2 are required for inhibition of apoptosis and heterodimerization with Bax. Yin XM(1), Oltvai ZN, Korsmeyer SJ.

246. Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. Wei MC(1), Zong WX, Cheng EH, Lindsten T, Panoutsakopoulou V, Ross AJ, Roth KA, MacGregor GR, Thompson CB, Korsmeyer SJ. *Science*. 2001 Apr 27;292(5517):727-30.
247. Proapoptotic Bax and Bak form stable protein-permeable pores of tunable size Stephanie Bleicken¹, Olatz Landeta², Ane Landajuela², Gorka Basañez² and Ana J. García-Sáez¹ First Published on JBC Papers in Press. Published on October 7, 2013 as Manuscript M113.512087
248. Chorna IV, Datsyuk LO, Stoika RS. Expression of Bax, Bad and Bcl-2 proteins under x-radiation effect towards human breast carcinoma MCF-7 cells and their doxorubicin-resistant derivatives. *Exp. Oncol.* 2005;27(3):196-201.
249. *Cancer Lett.* 2003 Jan 28;189(2):221-30. Calpain-induced Bax-cleavage product is a more potent inducer of apoptotic cell death than wild-type Bax. Toyota H(1), Yanase N, Yoshimoto T, Moriyama M, Sudo T, Mizuguchi J
250. Zheni Shen, Cunqi Ye, Keanna McCain, and Miriam L. Greenberg The Role of Cardiolipin in Cardiovascular Health. *BioMed Research International.*(2015); 2015. Article ID 891707, 12 pages
251. Nechushtan A., Smith C.L., Hsu Y.-T., Youle R.J. (1999). Conformation of the Bax C-terminus regulates subcellular location and cell death.. *EMBO J.* 18. c. 2330 — 2341
252. Fuminori Tsuruta, Jun Sunayama, Yasunori Mori,¹ Seisuke Hattori, Shigeomi Shimizu, Yoshihide Tsujimoto, et al. JNK promotes Bax translocation to mitochondria through phosphorylation of 14-3-3 proteins *EMBO J.* 2004 Apr 21; 23(8): 1889–1899.
253. Liu L1, Xing D, Chen WR, Chen T, Pei Y, Gao X. . Calpain-mediated pathway dominates cisplatin-induced apoptosis in human lung adenocarcinoma cells as determined by real-time single cell analysis. *Int J Cancer.* 2008 May 15;122(10):2210-22

254. Villunger A, Michalak EM, Coultas L, Müllauer F, Böck G, Ausserlechner MJ, Adams JM, Strasser A. p53- and drug- induced apoptotic responses mediated by BH3-only proteins puma and noxa. *Science*. 2003 Nov 7;302(5647):1036-8
255. Transcriptional Regulation by P53 Rachel Beckerman and Carol Prives Cite this article as *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2010;2:a000935 Rachel Beckerman and Carol Prives
256. Zagurovskaya M., Shareef M.M., Das A. et al. EGR-1 forms a complex with YAP-1 and upregulates Bax expression in irradiated prostate carcinoma cells // *Oncogene*, 2009. Vol. 28. P. 1121-1131.
257. Qi-Heng Yang, Robin Church-Hajduk, Jinyu Ren, Michelle L. Newton,¹ and Chunying Omi/HtrA2 catalytic cleavage of inhibitor of apoptosis (IAP) irreversibly inactivates IAPs and facilitates caspase activity in apoptosis Du^{1,3} *Genes & development* 17:1487–1496
258. Intramitochondrial serine protease activity of Omi/HtrA2 is required for caspase-independent cell death of human neutrophils. E Blink, N A Maianski, E S Alnemri, A S Zervos, D Roos & T W Kuijpers. *Cell Death and Differentiation* 11, 937–939 (2004)
259. Loss of caspase-9 provides genetic evidence for the type I/II concept of CD95-mediated apoptosis. Ajoy K. Samraj, Eric Keil, Nana Ueffing, Klaus Schulze-Osthoff, and Ingo Schmitz . Running title: Caspase-9 dependence of CD95 type II cells. *JBC Papers in Press*. Published on August 8, 2006 as Manuscript M603487200.
260. Shultz LB, editor. *Cell apoptosis: regulation and environmental factors*. Hauppauge, New York, USA: Nova Publishers; 2007. 211 p.
261. Allan LA, Morrice N, Brady S, Magee G, Pathak S, Clarke PR. *Nat Cell*. Inhibition of caspase-9 through phosphorylation at Thr 125 by ERK MAPK. *Biol*. 2003 Jul;5(7):647-54
262. Riedl SJ, Shi Y. Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2004 Nov;5(11):897-907.

263. Miguel Martins, Ingram Iaccarino, Tencho Tenev, Stephen Gschmeissner, Nicholas F. Totty, Nicholas R. Lemoine, John Savopoulos, Carol W. Gray, Caretha L. Creasy, Colin Dingwall and Julian Downward The Serine Protease Omi/HtrA2 Regulates Apoptosis by Binding XIAP through a Reaper-like Motif *The Journal of Biological Chemistry*. January 4, 2002;277, 439-444.
264. Zuo Y, Xiang B, Yang J, Sun X, Wang Y, Cang H, et al. Oxidative modification of caspase-9 facilitates its activation via disulfide-mediated interaction with Apaf-1. *Cell Res*. 2009 Apr;19(4):449-57.
265. Терешкова, О. Ю. Плетюшкина, Б. В. Черняк, П. М. Чумаков. Действие белка Р66shc на устойчивость клеток рака толстого кишечника гко к окислительному стрессу. *Молекулярная биология*, 2012, том 46, № 1, с. 139–146.
266. Ogawa Y. Paradigm Shift in Radiation Biology/Radiation Oncology-Exploitation of the “H₂O₂ Effect” for Radiotherapy Using Low-LET (Linear Energy Transfer) Radiation such as X-rays and High-Energy Electrons. *Cancers*. 2016;8(3):28.
267. Wang Y, Dawson VL, Dawson TM. Poly(ADP-ribose) signals to mitochondrial AIF: a key event in parthanatos. *Exp Neurol*. 2009 Aug;218(2):193-202
268. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010 May 21;396(1):95-100. doi: 10.1016/j.bbrc .2010.02.163. Mitochondrial regulation of cell death: processing of apoptosis-inducing factor (AIF). Norberg E(1), Orrenius S, Zhivotovsky B.
269. David J. Granville and Roberta A. Gottlieb. Mitochondria: Regulators of Cell Death and Survival . *TheScientificWorld JOURNAL* (2002) 2, 1569–1578
270. Wang Y et al. A nuclease that mediates cell death induced by DNA damage and poly(ADP-ribose) polymerase-1. *Science*, 354(6308), [aad6872].
271. Ravagnan L, Gurbuxani S, Susin SA, Maise C, Daugas E, Zamzami N, Mak T, Jäättelä M, Penninger JM, Garrido C, Kroemer G. Heat-shock protein 70 antagonizes apoptosis-inducing factor. *Nat Cell Biol*. 2001 Sep;3(9):839-43.

272. Utz PJ, Anderson P. Life and death decisions: regulation of apoptosis by proteolysis of signaling molecules. *Cell Death Differ.* 2000 Jul; 7(7): 589-602.
273. Surgova TM, Sidorenko MV. Role of proteolytic enzymes and their inhibitors in tumor progression and in pregnancy. 1997; 19(1): 7-19.
274. Яровая ГА, Нешкова ЕА, Мартынова ЕА, Блохина ТБ. Роль протеолитических ферментов в контроле различных стадий апоптоза. *Лабор. медицина.* 2011; 11:39-52.
275. Repnik U, Stoka V, Turk V, Turk B. Lysosomes and lysosomal cathepsins in cell death. *Biochim Biophys Acta.* 2012 Jan; 1824(1):22-33
276. Johansson AC, Appelqvist H, Nilsson C, Kågedal K, Roberg K, Ollinger K. Regulation of apoptosis-associated lysosomal membrane permeabilization. *Apoptosis.* 2010 May; 15(5):527-40.
277. Persson LH, Kurz T, Eaton JW, Brunk Ulf T. Radiation-induced cell death: importance of lysosomal destabilization. *Biochem. J.* 2005; 389:877–884.
278. Aits S, Jaattela M. Lysosomal cell death at a glance. *Journal of Cell Science.* 2013; 126(9):1905-1912.
279. Nilsson C, Johansson U, Johansson AC, Kagedal K, Ollinger K. Cytosolic acidification and lysosomal alkalization during TNF- α induced apoptosis in U937 cells. *Apoptosis.* 2006; (11): 1149–1159.
280. Кузин АМ. Структурно-метаболическая теория в радиобиологии. Москва: Наука; 1986. 283 с.
281. Johnson DE. Noncaspase proteases in apoptosis. *Leukemia.* 2000; 14:1695–1703.
282. Löser R, Pietzsch J. Cysteine cathepsins: their role in tumor progression and recent trends in the development of imaging probes. *Front. Chem.* 2015 Jun; 3(37):1-36.
283. Repnik U, Cesen M, Turk B. The endolysosomal system in cell death and survival. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2013; 5(1):1-14.

284. Yamashima T, Saido TC, Takita M et al. Transient brain ischaemia provokes Ca^{2+} , PIP2 and calpain responses prior to delayed neuronal death in monkeys. *Eur J Neurosci.* 1996; 8:1932–1944.
285. Stoka V, Turk B, Turk V. Lysosomal cysteine proteases: structural features and their role in apoptosis. *IUBMB Life.* 2005;57(4-5):347-353.
286. Turk B, Stoka V. Protease signalling in cell death: caspases versus cysteine cathepsins. *FEBS Lett.* 2007; 581:2761–2767
287. Droga-Mazovec G, Bojič L, Petelin A, Ivanova S, Romih R, Repnik U, Guy S, Salvesen, Stoka V, Turk V, Turk B. Cysteine cathepsins trigger caspase-dependent cell death through cleavage of Bid and antiapoptotic Bcl-2 homologues. *The Journal of Biological Chemistry.* 2008 Jul; 283(27):19140–19150.
288. Li N, Zheng Y, Chen W, Wang C, Liu X, He W et al. Adaptor protein LAPF recruits phosphorylated p53 to lysosomes and triggers lysosomal destabilization in apoptosis. *Cancer Res.* 2007 Dec; 67: (23):11176-11185.
289. Kroemer G, Jaattela M. Lysosomes and autophagy in cell death control. *Nat. Rev. Cancer.* 2005;5(11):886–897.
290. Law RH, Zhang Q, McGowan S, Buckle AM, Silverman GA, Wong W et al. An overview of the serpin superfamily. *Genome Biol.* 2006; 7: 216.
291. Gudkov SV, Shtarkman IN, Smirnova VS, Chernikov AV, Bruskov VI. Guanosine and inosine display antioxidant activity, protect DNA in vitro from oxidative damage induced by reactive oxygen species, and serve as radioprotectors in mice. *Radiat Res.* 2006 May; 165(5):538-45.
292. Polyakova V, Dragan L, Raksha N, Andriychuk T. Influence of riboxine on radiation-induced proteolysis in rat splenocytes. *Annales Universitatis Mariae Curie-Sklodowska, Lublin-Polonia.* 2008;XXI(1) 47(Sectio DDD):261-3.
293. Полякова ВВ, Ракша НГ, Драган ЛП, Андрійчук ТР. Вплив рибоксину на процеси пероксидного окислення ліпідів та активність антиоксидантних

ензимів в тимоцитах щурів в умовах променевого ураження. Укр. біохім. журн. 2010;82(4):48-52.

294. Sorimachi H, Ishiura S, Suzuki K. Structure and physiological function of calpains. *Biochemical Journal*. 1997; 328(3):721-732.

295. Стародуб МФ, Самохіна ЛМ, Коваль СМ, Снігурська ІО. Кальпаїни: характеристика та роль за різних станів організму. Укр. біохім. журн. 2014; 86(1):5-20.

296. Momeni HR. Role of calpain in apoptosis. *Cell Journal (Yakhteh)*, 2011; 13 (2): 65-72

297. Goll DE, Thompson VF, Li H, Wei W, Cong J. The calpain system. *Physiol. Rev.* 2003 Jul;83(3):731-801.

298. Vanags DM, Porn-Ares MI, Coppola S, Burgess DH, Orrenius S. Protease involvement in fodrin cleavage and phosphatidylserine exposure in apoptosis. *J Biol Chem*. 1996; 271:31075–31085

299. Liu X, Schnellmann RG. Membrane permeability and proteolysis of cytoskeleton-associated paxillin, talin, and vinculin during renal cell death. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2003 Jan; 304 (1):63-70.

300. Wang K.K.W. Calpain and caspase: can you tell the difference? *Trends Neuroscience*. 2000; 23:20-26.

301. Del Buono BJ, Williamson PL, Schlegel RA. Relation between the organization of spectrin and of membrane lipids in lymphocytes. *J. Cell Biol.* 1988; 106: 697–703.

302. Johnson DE. Noncaspase proteases in apoptosis. *Leukemia*. 2000;14:1695–1703.

303. Chen Q, Paillard M, Gomez L, Ross T, Hu Y, Xu A, Lesnefsky EJ. Activation of mitochondrial μ -calpain increases AIF cleavage in cardiac mitochondria during ischemia-reperfusion. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011 Dec;415(4):533-8.

304. Shang L, Huang JF, Ding W, Chen S, Xue LX, Ma RF, Xiong K. Calpain: a molecule to induce AIF-mediated necroptosis in RGC-5 following elevated hydrostatic pressure. *BMC Neurosci*. 2014 May; 15: 63.
305. Smith MA, Schnellmann RG. Calpains, mitochondria, and apoptosis. *Cardiovascular Research*. 2012; 96: 32–37.
306. Gao G, Dou QP. N-terminal cleavage of Bax by calpain generates a potent proapoptotic 18-kDa fragment that promotes Bcl-2-independent cytochrome C release and apoptotic cell death. *J Cell Biochem*. 2000 Sep;80(1):53-72.
307. Harwood SM, Yaqoob MM, Allen DA. Caspase and calpain function in cell death: bridging the gap between apoptosis and necrosis. *Ann Clin Biochem*. 2005; 42: 415–431
308. Liu Th, Van Vleet T, Schnellmann RG. The Role of calpain in oncotic cell death. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 2004; 44:349-370.
309. Orrenius S, Zhivotovsky B, Nicotera P. Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2003 Jul; 4(7):552-65.
310. Bano D, Young KW, Guerin CJ, Lefevre R, Rothwell NJ, Naldini L, Rizzuto R, Carafoli E, Nicotera P. Cleavage of the plasma membrane $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger in excitotoxicity. *Cell*. 2005 Jan 28; 120(2):275-85.
311. Yamashima T, Kohda Y, Tsuchiya K, Ueno T, Yamashita J, Yoshioka T, et al. Inhibition of ischaemic hippocampal neuronal death in primates with cathepsin B inhibitor CA-074: a novel strategy for neuroprotection based on "calpain-cathepsin hypothesis". *Eur J Neurosci*. 1998 May; 10(5):1723-33.
312. Sazontova TG, Matskevich AA., Arkhipenko YV. Calpains: physiological and pathophysiological significance. *Pathophysiology*. 1999; 6: 91–102.
313. Waterhouse NJ, Finucane DM, Green DR, Elce JS, Kumar S, Alnemri ES et al. *Cell Death Differ*. Calpain activation is upstream of caspases in radiation-induced apoptosis. 1998 Dec; 5(12):1051-61.

314. Wood David E., Newcomb Elizabeth W. Caspase-dependent activation of calpain during drug-induced apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry*. 1999; 274(12): 8309-8316.
315. Watters D. Molecular mechanisms of ionizing radiation-induced apoptosis. Curtin Conference. *Immunology and Cell Biology*. 1999; 77: 263–271.
316. Squier MK, Cohen JJ. Calpain, an upstream regulator of thymocyte apoptosis. *J Immunol*. 1997 April; 158 (8): 3690-3697.
317. Stark K, Seubert P, Lynch G, Baudry M. Proteolytic conversion of xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase: evidence against a role for calcium-activated protease (calpain). *Biochem Biophys Res Commun*. 1989 Dec 15;165(2):858-64.
318. Кожемякин ЛА, Краевой СА. Молекулярные механизмы воздействия ионизирующих излучений. *Военно-медицинский журн*. 1993; 4:33-38.
319. Kumar S, editor. *Apoptosis: Biology and Mechanisms*. Berlin –Heidelberg: Springer-Verlag; 1999. Grimm LM, Osborne VA. Apoptosis and the proteasome; p. 209-228.
320. McBride WH, Iwamoto KS, Syljuasen R, Pervan M, Pajonk F. The role of the ubiquitin/proteasome system in cellular responses to radiation. *Oncogene*. 2003; 22: 5755–5773.
321. Vucic D, Dixit VM, Wertz IE. Ubiquitylation in apoptosis: a post-translational modification at the edge of life and death. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*. 2011 Jul; 12:439-452.
322. Pajonk F, McBride WH. Ionizing radiation affects 26s proteasome function and associated molecular responses, even at low doses. *Radiother Oncol*. 2001 May;59(2):203-12.
323. McBride WH, Chiang C-S, Olson JL, Wang C-C, Hong J-H, Pajonk F, et al. A Sense of Danger from Radiation. *Radiation Res*. 2004 162 (1): 1–19.
324. Vugmeyster Y, Borodovsky A, Maurice MM, Maehr R, Furman Margo H, Ploegh HL. The ubiquitin–proteasome pathway in thymocyte apoptosis: caspase-dependent processing of the deubiquitinating enzyme USP7 (HAUSP).

Molecular Immunology. 2002; 39: 431–441

325. Beyette J, Mason GF, Murray RZ, Cohen GM, Rivett AJ. Proteasome activities decrease during dexamethasone-induced apoptosis of thymocytes. *Biochem. J.* 1998; 332: 315-320.

326. Vigneron N, Van den Eynde BJ. Proteasome Subtypes and Regulators in the Processing of antigenic peptides presented by Class I Molecules of the Major Histocompatibility Complex Biomolecules. 2014 Dec; 4(4): 994–1025.

327. Bader M, Steller H. Regulation of cell death by the ubiquitin-proteasome system. *Curr Opin Cell Biol.* 2009 Dec; 21(6):878-84.

328. Pervan M, Iwamoto KS, McBride WH. Proteasome structures affected by ionizing radiation. *Mol Cancer Res.* 2005 Jul; 3(7):381-90.

329. Bhattacharyya S, Yu H, Mim C, Matouschek A. Regulated protein turnover: snapshots of the proteasome in action. *Nature Reviews Molecular Cell Biology.* 2014 Jan; 15(2):122-133.

330. Yeha T-C, Bratton SB. Caspase-dependent regulation of the ubiquitin–proteasome system through direct substrate targeting. *PNAS.* 2013 Aug; 110(35): 14284–14289.

331. Livneh I, Cohen-Kaplan V, Cohen-Rosenzweig C, Avni N, Ciechanover A. The life cycle of the 26S proteasome: from birth, through regulation and function, and onto its death. *Cell Res.* 2016 Aug;26(8):869-85.

332. Aiken CT, Kaake RM, Wang X, Huang L. Oxidative stress-mediated regulation of proteasome complexes. *Mol Cell Proteomics.* 2011 May;10(5): R110.006924.

333. Brohem CA, Massaro RR, Tiago M, Marinho CE, Jasiulionis MG, de Almeida RL, et al. Proteasome inhibition and ROS generation by 4-nerolidylcatechol induces melanoma cell death *Pigment Cell Melanoma Res.* 25; 354–369.

334. D'Autréaux B. ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007 Oct;8(10):813-24.

335. How mitochondria produce reactive oxygen species Michael P. Murphy
Biochem J. 2009 Jan 1; 417 (Pt 1): 1–13.
336. Лю Б.Н. Кислородно-перекисная концепция апоптоза и возможные варианты его механизма .Усп. совр. биологии. 2001.121(5):. 488-501.
337. Варшавский Б. Я., Галактионова Л. П., Кореновский Ю. В.
Химия и биохимия свободно-радикального окисления. Барнаул, 2007. 157 с.
338. Buttke TM, Sandstrom PA Oxidative stress as a mediator of apoptosis.
Immunol Today. 1994 Jan;15(1):7-10
339. Перекисное окисление и радиация. Вилен Абрамович Барабой . 1991.
Наук. Думка. 255 с.
340. Kiang JG, Fukumoto R, Gorbunov NV. Lipid peroxidation after ionizing irradiation leads to apoptosis and autophagy. Croatia: INTECH; 2012. Chapter 13, Lipid Peroxidation; p.261-278.
341. Восстановительные и компенсаторные процессы при лучевых поражениях Ленинград 1979. Под ред. Хансона К.П. 195 с.
342. Free Radic Res. 2010 Oct;44(10):1098-124. doi: 10.3109/10715762.2010.498477. Chemistry and biochemistry of lipid peroxidation products. Guéraud F(1), Atalay M, Bresgen N, Cipak A, Eckl PM, Huc L, Jouanin I, Siems W, Uchida K.
343. Тимочко М. Ф. Вільнорадикальні реакції та їх метаболічна роль / М. Ф. Тимочко, Л. І. Кобильська. Мед. Хімія. 2002. 1(1):. 19–24.
344. DNA Adducts with Lipid Ian A. Blair Peroxidation Products. . J. Biol Chem. 2008 Jun 6; 283(23): 15545–15549.
345. Кучеренко Н.Е., Матышевская О.П., Остапченко Л.И. и др. Содержание циклических нуклеотидов, свободного цитоплазматического Ca²⁺ и малонового диальдегида в лимфоцитах селезенки и тимоцитах крыс при действии невысоких доз радиации .Радиобиология. 1991;31(5):739-742.
346. Барабой ВА, Сутковой ДА. Окислительно-антиоксидантный гомеостаз в норме и патологии. К.: Чернобыльинтеринформ; 1997. 202 с.

347. Кожемякин ЛА, Краевой СА. Молекулярные механизмы воздействия ионизирующих излучений. Военно-медицинский журн. 1993;4:33-38.
348. Magdalena L. Circu and Tak Yee Aw. Reactive oxygen species, cellular redox systems and apoptosis Free Radic Biol Med. 2010 March 15; 48(6):749-762.
349. Зенков НК, Менщикова ЕБ. Активированные кислородные метаболиты в биологических системах. Успехи соврем. биологии. 1993;113(3):286-296.
350. Мецищен ІФ, Польовий ВП. Механізм окиснювальної модифікації білків. Буков. мед. вісник. 1999;3(1):196-205.
351. Барабой ВА, Олійник СА, Хмелєвський ЮВ. Стан антиоксидантної системи за дії іонізуючої радіації у низьких дозах та низької інтенсивності. Укр. біохім. журн. 1994;66(4):3-18.
- 352 Parks D.A., Granger D.N. Xanthine oxidase: biochemistry distribution and physiology. Acta Physiol. Scand.1986.126:87-99.
353. Radi R., Tan S., Prodanov E. et al. Inhibition of xanthine oxidase by uric acid and its influence on superoxide radical production // Biochim. Et Biophys. Acta.-1992.-V.1159, №2.-P.178-182.
354. Ryan M.G., Balendran A., Harrison R. et al. Xanthine oxidoreductase: dehydrogenase to oxidase conversion // Biochem. Soc. Trans.-1997.-V.25, №3.-P.530-534.
355. Антушевич АЕ, Петров АС, Белошапка АН. Влияние ионизирующего излучения на интенсивность пуринового обмена и процессы перекисного окисления липидов в радиочувствительных и радиорезистентных тканях. Медицинская радиология. 1990;35(10):3-4.
356. Structure and function of xanthine oxidoreductase: where are we now? Roger Harrison Free Radical Biology & Medicine, Vol. 33, No. 6, pp. 774–797, 2002
357. Roy P.S., McCord J.M. Ischemia-induced conversion of xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase .Fed. Proc.-1982.-V.41, №15.-P.767-769.

358. Saksela M., Lapatto R., Raivio K.O. Irreversible conversion of xanthine dehydrogenase into xanthine oxidase by a mitochondrial protease. *FEBS Lett.*-1999;443(2):117-120.
359. Кишко ТО. Роль ксантиноксидазно-ксантиндегідрогеназної системи в механізмі дії ксенобіотиків [Автореф. дис.канд. біол. наук:03.00.04]. Київ; 2002. 20 с
360. Кожемякин ЛА, Антонов ВГ, Каликанов СА, и др. Обнаружение ксантиноксидазной активности в мононуклеарных клетках крови человека. *Бюл. экс. биол. мед.* 1992;13(2):138-139.
361. Романцев ЕФ, Блохина ВД, Жуланова ЗИ. Биохимические основы действия радиопротекторов. М.: Атомиздат; 1980. 165 с.
362. Хансон КП, Комар ВЕ. Молекулярные механизмы радиационной гибели клеток. М.: Энергоатомиздат; 1985. 150 с.
363. Шелепина ЕП, Антонов ВГ, Кожемякин ЛА. Молекулярный механизм трансформации активности ксантиноксидазы под действием субстрата. *Биохимия.* 1990;55(9):1707-1712.
364. Кишко ТО. Роль ксантиноксидазно-ксантиндегідрогеназної системи в механізмі дії ксенобіотиків [Автореф. дис...канд. біол. наук:03.00.04]. Київ; 2002. 20 с.
365. Кожемякин ЛА, Шелепина ЕП, Антонов ВГ, и др. Ксантиноксидазная активность тимоцитов при действии рентгеновского облучения. *Радиобиология.* 1989;29(6):749-752.
366. Cighetti G., Bortone L., Sala S et al. Mechanisms of action of malondialdehyde and 4-hydroxynonenal on xanthine oxidoreductase // *Arch. Biochem. Biophys.*-2001.-V.389, №2.-P.195-200.
367. Haberland A., Rootwelt T., Saugstand O.D. Modulation of the xanthine oxidase/ xanthine dehydrogenase ratio by reaction of malondialdehyde with NH₂-groups. *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.*1994.;32 (4).-P.267-277.

368. Дубинина ЕЕ. Некоторые особенности функционирования ферментативной антиоксидантной системы защиты плазмы крови человека. Биохимия. 1993;58(2):268-273.
369. Поберезкина НБ, Осинская ЛФ. Биологическая роль супероксиддисмутазы. Укр. біохім. журн. 1989;61(2):14-27.
370. Барабой ВА, Олійник СА, Хмельевський ЮВ. Прооксидантна ланка окислювального гомеостазу за малих доз іонізуючої радіації та низької інтенсивності. Укр. біохім. журн. 1994;66(3):3-16.
371. Zhang X., Wang G., Ding B. et al. Effects of simulated weightlessness and irradiation on metabolism of rat myocardial cells cultured in vitro // Space Med. Eng.-1998.-V.11, №4.-P.258-261.
372. Рязанцева НВ, Новицкий ВВ, Часовских НЮ, Кайгородова ЕВ, Старикова ЕГ, Стариков ВЕ и др. Роль редокс-зависимых сигнальных систем в регуляции апоптоза при окислительном стрессе. Цитология. 2009;51(4):329-333.
373. Cancer Metastasis Rev. 2004 Aug-Dec;23(3-4):311-22. Metabolic oxidation/reduction reactions and cellular responses to ionizing radiation: a unifying concept in stress response biology. Spitz DR(1), Azzam EI, Li JJ, Gius D.
374. Scibior D, Czczot H. Catalase: structure, properties, functions Postepy Hig Med Dosw (Online). 2006;60:170-80.
375. Biochim Biophys Acta. 1996 Jul 18;1295(2):222-38. Reversible inhibition and irreversible inactivation of catalase in presence of hydrogen peroxide. Lardinois OM(1), Mestdagh MM, Rouxhet PG. Author information:
376. Ciolino H.P., Levine R.L. Modification of proteins in endothelium cell death during oxidative stress // Free Radic. Biol. Med.-1997.-V.22, №7.-P.1277-1282.
377. Лушак В.И Свободнорадикальное окисление белков и его связь с функциональным состоянием организма (обзор).Биохимия. 2007; 72(8): 8995-1017.

378. Berlett BS, Stadtman ER. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J. Biol. Chem.* 1997;272(33):20313-20316.
379. Sukharev S.A., Pleshakova O.V., Moshnikova A.B. et al. Age- and radiation-dependent changes in carbonyl content, susceptibility to proteolysis, and antigenicity of soluble rat liver proteins // *Comparative Biochem. and Physiol. Part B: Biochem. and Mol. Biol.*-1997.-V.116, №3.-P.333-338.
380. Burcham PC, Kuhan YT. Introduction of carbonyl groups into proteins by the lipid peroxidation product, malondialdehyde. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1996;220(3):996-1001.
381. Kulbacka J, Saczko J, Chwilkowska A, Choromańska A, Skońska N. Apoptosis, free radicals and antioxidant defense in antitumor therapy. Croatia: INTECH; 2012. Chapter 10, Antioxidant Enzyme; p.266-302.
382. NTuli TM, editor. *Apoptosis and Medicine*. Croatia: INTECH; 2012. Chapter 4. Cell death and cancer, novel therapeutic strategies. Hongmei Z. Extrinsic and intrinsic apoptosis signal pathway; p.4-22.
383. Leist M, Jäättelä M. Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2001;2(8):589-598.
384. Marion MacFarlane, Ann C. Williams. Apoptosis and disease: a life or death decision Conference and Workshop on Apoptosis and Disease EMBO reports. 5(7):|2004 674-678.
385. K. Sadowski-Debbing et al. Caspases in Apoptosis and Other Processes *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 2002, 50, 19–34.
386. Caspase Substrates and Inhibitors Marcin Poreba¹, Aleksandra Strożyska¹, Guy S. Salvesen², and Marcin Drać¹ as Cold Spring Harb Perspect Biol 2013;5:a008680
387. Neurotoxicology. 2004 Mar;25(3):387-98. Increased activity and involvement of caspase-3 in radiation-induced apoptosis in neural cells precursors from developing rat brain. Michelin S(1), del Rosario Perez M, Dubner D, Gisone P.

388. Executioner Caspase-3, -6, and -7 Perform Distinct, Non-redundant Roles during the Demolition Phase of Apoptosis* Elizabeth A. Slee, Colin Adrain and Seamus J. Martin‡ *The Journal of Biological Chemistry* 2001 276, 7320-7326.
389. Neyliane F.G. et al. Active caspase-3 expression levels as bioindicator of individual radiosensitivity *An Acad Bras Cienc* (2017) 89 (1 Suppl.) 649-659.
390. *J Biol Chem.* 1999 Aug 13;274(33):22932-40. Role of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) cleavage in apoptosis. Caspase 3-resistant PARP mutant increases rates of apoptosis in transfected cells. Boulares AH(1), Yakovlev AG, Ivanova V, Stoica BA, Wang G, Iyer S, Smulson M.
391. Caspase-3 is required for alpha-fodrin cleavage but dispensable for cleavage of other death substrates in apoptosis. Jänicke RU1, Ng P, Sprengart ML, Porter AG. *J Biol Chem.* 1998 Jun 19;273(25):15540-5.
392. Jean-Ehrland Ricci, Roberta A. Gottlieb, Douglas R. Green. Caspase-mediated loss of mitochondrial function and generation of reactive oxygen species during apoptosis. *J Cell Biol.* 2003 Jan 6; 160(1): 65–75.
393. Ting-Chun Yeha,b and Shawn B. Brattonb. Caspase-dependent regulation of the ubiquitin–proteasome system through direct substrate targeting .*Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013 Aug 27; 110(35): 14284–14289.
394. *BMB Rep.* 2013 Dec;46(12):588-93. Identification of the novel substrates for caspase-6 in apoptosis using proteomic approaches. Cho JH, Lee PY, Son WC, Chi SW, Park BC, Kim JH, Park SG(1).
395. *J Biol Chem.* 2000 Aug 18;275(33):25336-41. Apoptosis induced by the nuclear death domain protein p84N5 is associated with caspase-6 and NF-kappa B activation. Doostzadeh-Cizeron J(1), Yin S, Goodrich DW.
396. Suzuki A, Kusakai G, Kishimoto A, Shimojo Y, Miyamoto S, Ogura T, Ochiai A, Esumi H. Regulation of caspase-6 and FLIP by the AMPK family member ARK5. *Oncogene.* 2004 Sep 16;23(42):7067-75.

397. Timothy K. MacLachlan Wafik S. El-Deiry Apoptotic threshold is lowered by p53 transactivation of caspase-6. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Jul 9; 99(14): 9492–9497.
398. Sato T(1), Machida T, Takahashi S, Iyama S, Sato Y, Kuribayashi K, Takada K, Oku T, Kawano Y, Okamoto T, Takimoto R, Matsunaga T. .Fas-mediated apoptosome formation is dependent on reactive oxygen species derived from mitochondrial permeability transition in Jurkat cells. *J Immunol*. 2004 Jul 1;173(1):285-96.
399. Birge R B, Boeltz S, Kumar S, Carlson J, Wanderley J, Calianese D, et al Phosphatidylserine is a global immunosuppressive signal in efferocytosis, infectious disease, and cancer. *Cell Death and Differentiation*. 2016; 23: 962–978.
398. Elliott MR, Koster KM, Murphy PS. Efferocytosis Signaling in the Regulation of Macrophage Inflammatory Responses. *J Immunol*. 2017 Feb 15;198(4):1387-1394.
401. Segawa K, Nagata S. An Apoptotic 'Eat Me' Signal: Phosphatidylserine Exposure. *Trends Cell Biol*. 2015 Nov; 25(11):639-50.
402. Quinn PJ. Plasma membrane phospholipid asymmetry. *Subcell Biochem*. 2002;36:39-60
403. Callahan MK, Williamson P, Schlegel RA. . Surface expression of phosphatidylserine on macrophages is required for phagocytosis of apoptotic thymocytes. *Cell Death Differ*. 2000; 7:645-653.
404. Tiso M, Gangemi R, Bargellesi Severi A, Pizzolitto S, Fabbi M, Risso A. Spontaneous apoptosis in human thymocytes. *Am J Pathol*. 1995 Aug; 147(2): 434–444.
405. *J Cell Sci*. 2004 Feb 29;117(Pt 6):805-13. Tracking down lipid flippases and their biological functions. Pomorski T(1), Holthuis JC, Herrmann A, van Meer G.
406. *J Biol Chem*. 2000 Jul 28;275(30):23065-73. Regulation of phospholipid scramblase activity during apoptosis and cell activation by protein kinase Cdelta.

- Frasch SC(1), Henson PM, Kailey JM, Richter DA, Janes MS, Fadok VA, Bratton DL.
407. Melissa K. Callahan Margaret S. Halleck, Stephen Krahling, Andrew J. Henderson, †. Patrick Williamson, ‡ and Robert A. Schlegel .Phosphatidylserine expression and phagocytosis of apoptotic thymocytes during differentiation of monocytic cells.
408. Gleiss B, Gogvadze V, Orrenius S, Fadeel B. Fas-triggered phosphatidylserine exposure is modulated by intracellular ATP. *FEBS Lett.* 2002 May 22;519(1-3):153-8.
409. *J Biol Chem.* 1997 Oct 17;272(42):26159-65. Appearance of phosphatidylserine on apoptotic cells requires calcium-mediated nonspecific flip-flop and is enhanced by loss of the aminophospholipid translocase. Bratton DL(1), Fadok VA, Richter DA, Kailey JM, Guthrie LA, Henson PM.
410. Kagan VE, Fabisiak JP, Shvedova AA, Tyurina YY, Tyurin VA, Schor NF, Kawai K Oxidative signaling pathway for externalization of plasma membrane phosphatidylserine during apoptosis. *FEBS Lett.* 2000 Jul 14;477(1-2):1-7.
411. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005 Feb 4;327(1):94-9. Distinct localization of lipid rafts and externalized phosphatidylserine at the surface of apoptotic cells. Ishii H(1), Mori T, Shiratsuchi A, Nakai Y, Shimada Y, Ohno-Iwashita Y, Nakanishi Y.
412. Kapralov AA, Kurnikov IV, Vlasova II, Belikova NA, Tyurin VA, Basova LV, The hierarchy of structural transitions induced in cytochrome c by anionic phospholipids determines its peroxidase activation and selective peroxidation during apoptosis in cells. *Biochemistry.* 2007 Dec 11;46(49):14232-44.
413. Yulia Y Tyurina, Indira Shrivastava, Vladimir A Tyurin "Only a Life Lived for Others Is Worth Living": Redox Signaling by Oxygenated Phospholipids in Cell Fate Decisions. *Antioxid Redox Signal.* 2017 Oct 16. 0.1089/ars.2017.7124.
- 414 Atkinson J, Kapralov AA, Yanamala N, Tyurina YY, Amoscato AA, Pearce L, Peterson J, Huang Z, Jiang J, and Samhan-Arias AK et al.

- A mitochondria targeted inhibitor of cytochrome c peroxidase mitigates radiation-induced death. *Nat Commun* .2011;2:497.
415. Sahu SK(1), Gummadi SN, Manoj N, Aradhyam GK. Phospholipid scramblases: an overview. *Arch Biochem Biophys*. 2007 Jun 1;462(1):103-14
416. Мазурик ВК. Роль регуляторных сетей ответа клеток на повреждения в формировании радиационных эффектов. *Радиационная биология. Радиоэкология*. 2005; 45(1):26-45.
417. Eguchi Y., Srinivasan A., Tomaselli K. ATP-dependent steps in Apoptotic Signal Transduction. *Cancer Research*. 1999; 59:174-2181.
418. Chiarugi A “Simple but not simpler”: toward a unified picture of energy requirements in cell death. *FASEB J*.2005; 19:1783-1788.
419. Барабой ВА., Сутковой ДА. Энергетический обмен при стрессовых воздействиях (на примере ионизирующей радиации), его саморегуляция и коррекция. *Укр. біохім. журн*.1983;55(1):93-105.
420. Хансон К.П., Комар В.Е. Молекулярные механизмы радиационной гибели клеток.-М.: Энергоатомиздат, 1985.-150 с.
421. Sahota A, Taylor MW, editors. *Purine and Pyrimidine Metabolism in Man VIII*.Berlin:Springer Science & Business Media; 2013, 836 p.
422. Робинсон МВ, Труфакин ВА Ферменты пуринового обмена в жизнедеятельности иммунокомпетентных клеток. *Успехи соврем, биологии*. 1993;113(1):82-94.
423. Байсхатов Р, Хансон КП. Исследование содержания адениловых нуклеотидов в селезенке крыс в норме и после рентгеновского облучения. *Радиобиология*. 1978;18(5):738-739.
424. Дмитренко НП. Пуриновый обмен и его регуляция в лимфоцитах. К.: Наукова думка; 1991. 179 с.
425. Kojima S, Ohshima Y, Nakatsukasa H, Tsukimoto M. Role of ATP as a Key Signaling Molecule Mediating Radiation-Induced Biological Effects. *Dose Response*. 2017 Feb 15;15(1):1559325817690638.

426. Елисеева ВВ, Полтавченко ГМ. Роль аденозина в регуляции физиологических функций организма. Санкт-Петербург: Наука; 1991. 120 с.
427. Кузнецова ЕВ, Кощеенко НН, Романцев ЕФ. Пострадиационные нарушения аденин-фосфорибозилтрансферазного пути биосинтеза АМФ. Радиобиология. 1984;22(4):347-350.
428. Литовченко ИН, Савицкий ИВ. Роль аденилаткиназы, АМФ-аминогидролазы и 5'-нуклеотидазы в метаболизме адениловых нуклеотидов. Биохимия. 1984;49(8):1248-1252.
429. Kohler C., Gahn A., Noma T. et al. Release of adenylate kinase 2 from the mitochondrial intermembrane space during apoptosis. FEBS Lett. 1999;447(1):10-12.
430. Дмитренко Н. П. Внеклеточный аденозинтрифосфат, его источники и влияние на функции клеток животных. Укр. биох. журнал. 1990;62(2): 3-12.
431. Савицкий ИВ, Литовченко ИН. Активность аденилатдезаминазы в лейкоцитах, эритроцитах и сыворотке крови при лучевой болезни. Укр. біохімі. журн. 1982;62(2):111-113.
432. Бездробный ЮВ, Божок ОВ. Изменение активности 5'-нуклеотидазы и протеинкиназы плазматической мембраны печени в зависимости от мощности дозы при рентгеновском облучении крыс. Радиобиология. 1992;32(3):401-405.
433. Якубовский СМ. Влияние общего γ -облучения на активность 5'-нуклеотидазы в плазме крови крыс. Радиобиология. 1993;33(3):398-400.
434. Kitakaze M., Hori M., Takashima S. et al. Superoxide dismutase enhances both adenosine release and coronary hyperemic flow through protection of 5'-nucleotidase against its degradation during reperfusion following ischemia in dogs. Biorheology. 1993;30 (5):359-370.
435. Zhai X., Zhou X., Ashraf M. Interaction of singlet oxygen with 5'-nucleotidase in rat hearts. J. Mol. and Cell. Cardiology. 1995;27(1):1234-1241.

436. Jacob C, Winyard PG, editors. Redox Signaling and Regulation in Biology and Medicine. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim; 2009. 481 p.
437. Григоренко ДЕ, Ерофеева ЛМ, Сапин МР. Цитологический профиль тимуса и селезенки мышей после гамма-облучения. Морфология. 1997;112(6):53-57.
438. В. В. Елисеев, Н. С. Сапронов, ред. Аденозин и функции миокарда. С.-Петербург: Лань; 2000, 160 с.
439. Cohen A., Thompson E. DNA repair in nondividing human lymphocytes: inhibition by deoxyadenosine. Cancer Res. 1986;46 (10): 1585-1593.
440. Seto S., Carrera C.J., Wasson D.B. et al. Inhibition of DNA repair by deoxyadenosine in resting human lymphocytes. J. Immunol. 1986; 136 (8):2839-2843.
441. Требенюк ЗА, Солдатенков ВА, Сорокина НИ, и др. Роль гипоксантина в радиационной гибели тимоцитов *in vitro*. Радиобиология. 1985;25(4):521-524.
442. Андрійчук ТР, Кудіна НГ, Цудзевич БО. Вплив рентгенівського опромінення на метаболізм пуринів у лімфоцитах щурів. Вісник КНУ імені Тараса Шевченка. Сер.: Біологія. 2003;39:19-20.
443. Андрійчук ТР, Кудіна НГ, Цудзевич БО. Активність ферментів пуринового обміну в тимоцитах щурів за променевого ураження та введення їм рибоксину. Укр. біохім. журнал. 2003;75(2):109-12.
444. Гродзинський ДМ, редактор. Радіобіологічні ефекти хронічного поромінення рослин у зоні впливу Чорнобильської катастрофи. Київ: Наукова думка; 2008. 373 с.
445. Лю БН, Лю МБ. Кислородно-перекисная концепция апоптоза: повышение уровня аргументации и развития. Успехи современной биологии. 2005; 125(6):567-578.
446. Williams AB, Schumacher B. p53 in the DNA-Damage-Repair Process. Cold Spring Harb Perspect Med. 2016 May 2;6(5): a026070: 1-21.

447. Чумаков ПМ. Белок p53 и его универсальные функции. Успехи биологической химии. 2007; 47:3-52.
448. Munshi A, Ramesh R. Mitogen-Activated Protein Kinases and Their Role in Radiation Response. *Genes Cancer*. 2013 Sep; 4(9-10): 401–408.
449. Jung T, Höhn A, Grune T. The proteasome and the degradation of oxidized proteins: Part III—Redox regulation of the proteasomal system. *Redox Biology*. 2014. Vol. 2. P. 388
450. Остапченко Л.І. Молекулярні механізми регуляції активності циклонуклеотид– та кальційзалежних протеїнкіназ лімфоїдних клітин в умовах радіаційного впливу. Київ: Фітосоціоцентр; 1999. 107 с.
451. Kudryashov Yu.B. The main principles of radiation biology / In book: "The Effects of Low Dose Radiation: New Aspects of Radiobiological Research Prompted by The Chernobyl Nuclear Disaster". Edited by E.B.Burlakova and V.I.Naidich. V S P BV, NE/Brill Academic Pubs, 2004, p. 362-395.

ДОДАТОК

Основні наукові положення, висновки та практичні рекомендації дисертаційної роботи були апробовані на національних та міжнародних науково-практичних форумах: VII, VIII, IX, X Українських біохімічних з'їздах (Київ, Україна, 1997; Чернівці, Україна, 2002; Харків, Україна 2006; Одеса, Україна, 2010) та XI Українському біохімічному конгресі (Київ, Україна, 2014); III и IV съездах по радиационным исследованиям (Москва, Россия, 1997; 1998); III Международном симпозиуме "Механизмы действия сверхмалых доз" (Москва, Россия, 2002); Российской научной конференции "Медико-биологические проблемы противолучевой и противохимической защиты" (Санкт-Петербург, Россия, 2004); V,VI,VII съездах по радиационным исследованиям (радиобиология, радиоэкология, радиационная безопасность) (Москва, Россия, 2006; 2010; 2014); III з'їзді з радіаційних досліджень (радіобіологія і радіоекологія) (Київ, Україна, 2003); The 35th Annual Meeting of the European Radiation Research Society and The 4th Annual Meeting of the Ukrainian Society for Radiation Biology (Kyiv, Ukraine, 2006); 5th Parnas Conference "Molecular mechanism of cellular signaling" (Kyiv, Ukraine, 2005); VII Parnas Conference on Biochemistry and Molecular Biology (Yalta, Crimea, Ukraine, 2009); VIII Parnas Conference im. Jakuba Karola Parnasa, (Warsaw, Poland, 2011); IX Jakub K.Parnas Conference "Proteins from Birth to Death" (Jerusalem, Israel, 2013); II, III, IV з'їзді Українського біофізичного товариства (Харків, Україна, 1998; Львів, Україна, 2002; Донецьк, Україна, 2006); II з'їзді Українського товариства клітинної біології, (Київ, Україна, 2007); International symposium on cell biology jointly with 3rd Ukrainian Congress for cell biology (Yalta, Ukraine, 2012); International Symposium on Cell Biology jointly with 5th Ukrainian Congress for Cell Biology (Odesa, Ukraine, 2016); Всеукраїнській науковій конференції "Психофізіологічні та вісцеральні функції в нормі та патології" (Київ, Україна, 2002); IV, V, VII Міжнародній науковій конференції Психологічні та вісцеральні функції в

нормі і патології» (Київ, 2008, 2010, 2014); Міжнародній науково-практичній конференції «Віддалені наслідки впливу іонізуючого випромінювання» (Київ, 2007); Российской научной конференции "Медико-биологические проблемы токсикологии и радиологии" (Санкт-Петербург, Россия, 2008); 36th Annual Meeting of the European Radiation research Society (Paris, France, 2008); 7 International Meeting on the Effects of Low Doses of Radiation in Biological System: New perspectives on human exposure (Lisbon, Portugal, 2008); 34th FEBS Congress "Life's Molecular Interaction" (Prahue, Czech Republic, 2009); конференції "Адаптационные стратегии живых систем" (Новый Свет, Крым, Украина, 2012); Российской конференции "Острые проблемы разработки противолучевых средств: консерватизм или модернизация" (Москва, Россия, 2012); X Международной Крымской конференции "Космос и биосфера" (Коктебель, Крым, Украина, 2013); Third, Fourth, Fifth International Conference on Radiation and Application in Various fields of research (Budva, Montenegro, 2015, 2017; Nis, Serbia, 2016).

Список публікацій здобувача за темою дисертації

1. Кучеренко МЄ, редактор. Радіаційно-індукована структурно-метаболична модифікація ентероцитів та лімфоїдних клітин Київ: Фітосоціоцентр; 2006. Цудзевич Б.О., **Андрійчук Т.Р.**, Ракша Н.Г. Дослідження обміну пуринів в імунокомпетентних клітинах щурів за променевого ураження та при введенні рибоксину; с.148-201.
2. Пархомець ЮП, **Андрійчук ТР**, Харсун ВА, Цудзевич БО. Етапи деградації хроматину тимоцитів щурів, загиблих шляхом апоптозу. Вісник Київського університету. 1998;27:9-11.
3. **Андрійчук ТР**, Цудзевич БО, Кучеренко МЄ, Білокінь ЮМ, Кудіна НГ. Вплив низьких доз іонізуючої радіації на стан про- та антиоксидантних систем тимоцитів щурів. Доповіді НАН України. 2002;5:179-182.

4. Цудзевич БО, **Андрійчук ТР**, Кудіна НГ. Вплив іонізуючої радіації та інгібіторів енергетики мітохондрій на міжнуклеосомну фрагментацію ДНК у тимоцитах щурів. Вісник КНУ імені Тараса Шевченка. Сер.: Біологія. 2002;37:91-3
5. **Андрійчук ТР**, Кудіна НГ, Цудзевич БО. Вплив рентгенівського опромінення на метаболізм пуринів у лімфоцитах щурів. Вісник КНУ імені Тараса Шевченка. Сер.: Біологія. 2003;39:19-20.
6. **Андрійчук ТР**, Драган ЛП, Ракша НГ. Радіаційно -індуковані порушення ДНК у тимоцитах щурів. Вісник КНУ імені Тараса Шевченка. Сер.: Біологія. 2004;43:55-6.
7. **Andriychuk T**, Dragan L, Raksha N. Oxidant-dependent proteolysis in radiation-induced lymphoid cell death. *Annales Universitatis Mariae Curie-Sklodowska, Lublin-Polonia. Sectio DDD: Pharmacia.* 2004;XVII(2):353-5.
8. **Андрійчук ТР**, Драган ЛП, Полякова ВВ, Ракша НГ, Цудзевич БО. Активність полі(АДФ-рибозо)-полімерази і рівень одно- та дволанцюгових розривів ДНК в спленоцитах щурів за дії рентгенівського опромінення. Вісник проблем біології і медицини. 2007;3:28-31.
9. **Андрійчук ТР**, Ракша НГ, Лугова СЛ, Драган ЛП, Цудзевич БО. Вплив рибоксину на виживання та метаболічну активність лімфоцитів тимуса за променевого ураження. Медична хімія. 2008;2:41-5.
10. Polyakova V, Dragan L, Raksha N, **Andriychuk T**. Influence of riboxine on radiation-induced proteolysis in rat splenocytes. *Annales Universitatis Mariae Curie-Sklodowska, Lublin-Polonia.* 2008;XXI(1)47(Sectio DDD):261-3.
11. Драган ЛП, Ракша НГ, **Андрійчук ТР**. Вплив іонізуючої радіації та рибоксину на стан системи полі-АДФ-рибозилування лімфоцитів селезінки щурів. Медична хімія. 2009;11(3):124-6.
12. **Андрійчук Т**, Ракша Н, Драган Л, Лугова С. Залучення ферментів родини каспаз у радіаційно-індукований апоптоз лімфоцитів щурів. Вісник КНУ

імені Тараса Шевченка. Сер.: Проблеми регуляції фізіологічних функцій. 2010;13:48-52.

13. **Андрійчук ТР.** Редокс-чутливі ланки радіаційно-індукованого апоптозу. Вісник КНУ імені Тараса Шевченка. Сер.: Біологія. 2014;2:58-62.

14. Дмитренко НП, **Андрійчук ТР**, Кишко ТО, Юркина ВВ, Цудзевич БА. Определение повреждений ДНК в непролиферирующих клетках животных. Укр. биохим. журнал. 1997;69(1):69-71.

15. Цудзевич БО, Пархомець ЮП, **Андрійчук ТР**, Юркіна ВВ. Вплив іонізуючої радіації на деградацію хроматину тимоцитів щурів. Укр. біохім. журнал. 1998;70(4):105-10.

16. Гаділія ОП, **Андрійчук ТР**, Меркулов СП, Остапченко ЛІ, Кучеренко МЄ. Вплив препаратів "Аммівіт" та "Церулоплазмін" на вміст продуктів пероксидного окислення ліпідів та показники антиоксидантної системи за дії радіації. Укр. біохім. журнал. 2002;74(1):97-100.

17. **Андрійчук ТР**, Кудіна НГ, Цудзевич БО. Активність ферментів пуринового обміну в тимоцитах щурів за променевого ураження та введення їм рибоксину. Укр. біохім. журнал. 2003;75(2):109-12.

18. Ракша НГ, **Андрійчук ТР**, Кучеренко МЄ. Участь ксантиноксидазної системи в розвитку оксидативного стресу за дії променевого чинника. Біополімери і клітина. 2006;22(2):132-5.

19. **Андрійчук ТР**, Ракша НГ, Цудзевич БО, Остапченко ЛІ. Участь протеолітичних ферментів у радіаційно-індукованому апоптозі лімфоцитів тимуса щурів. Укр. біохім. журнал. 2009;3:102-7.

20. Полякова ВВ, Ракша НГ, Драган ЛП, **Андрійчук ТР.** Вплив рибоксину на процеси пероксидного окислення ліпідів та активність антиоксидантних ензимів в тимоцитах щурів в умовах променевого ураження. Укр. біохім. журн. 2010;82(4):48-52.

21. Dragan L, **Andriychuk T**, Ostapchenko L. Structural biochemical assessment of the status of the nuclear apparatus of the rat spleen lymphoid cells under

radiation treatment. *Annales Universitatis Mariae Curie-Sklodovska, Lublin-Polonia*. 2010; XXIII(2)(30)(Sectio DDD):199-202.

22. Драган ЛП, Ракша НГ, **Андрійчук ТР**. Радиационно-индуцированные изменения состояния системы АДФ-рибозилирования лимфоцитов тимуса крыс и их модификация рибоксином. Сборник статей по материалам науч. конф. с международным участием Нейрогуморальные механизмы регуляции висцеральных органов и систем в норме и при патологии; 2009 окт. 22-23; Томск. Томск: СибГМУ; 2009:118-120.

23. **Андрійчук ТР**, Ракша НГ, Луговая СЛ, Мандрюк СЯ, Остапченко ЛИ Влияние ионизирующей радиации на индукцию и реализацию программированной клеточной гибели. Сборник статей по материалам Международ. конф. Биологические эффекты малых доз ионизирующей радиации и радиоактивное загрязнение среды; 2014 март 17-21; Сыктывкар. Сыктывкар: Редакционно-издательский отдел Коми НЦ УрО РАН; 2014:11-14.(ISBN 978-5-89606-510-4©).

24. Андрійчук Т.Р. Радиационно-индуцированный апоптоз клеток иммунокомпетентных органов / Цудзевич Б.А., Пархомец Ю.П., Андрійчук Т.Р., Юркина В.В., Кучеренко Н.Е. // III съезд по радиационным исследованиям, 14-17 окт. 1997 г.: тез. докл. Т.1. – М., 1997. – С. 136-137.

25. Андрійчук Т.Р. Деградація ДНК імунікомпетентних клітин за променевого ураження / Цудзевич Б.О., Пархомець Ю.П., Андрійчук Т.Р., Юркіна В.В. // VII Укр. біохімічний з'їзд: 1997 р.: тези доп., ч.3. – К., 1997. – С.134-135.

26. Андрійчук Т.Р. Закономірності деградації структури ДНК за променевого ураження / Пархомець Ю.П., Андрійчук Т.Р., Юркіна В.В., Цудзевич Б.О. // II з'їзд Укр. біофізичного товариства, 29 черв. – 3 лип. 1998 р.: тези доп. – Х., 1998. – С.231.

27. Андрійчук Т.Р. Участие системы ксантинооксидаза/ ксантиндегидрогеназа в радиационно-индуцированном апоптозе клеток иммунокомпетентных

органов / Т.Р. Андрійчук, Н. Г. Кудина, Б. А. Цудзевич // IV съезд по радиационным исследованиям, 20-24 нояб. 2001 г.: тез. докл.– Т.1. – М., 2001. – С. 343.

28. Андрійчук Т.Р. Активність ферментів обміну пуринів за рентгенівського опромінення та на фоні інозину / Н. Г. Кудина, Андрійчук Т.Р., Л. П. Сорокіна, Б. О. Цудзевич // VIII Укр. біохімічний з'їзд, 1-3 жовтн. 2002 р.,- Ч.,: матер. – Укр. біохім. журн. – 2002. – Т.74, № 4 б (дод. 2). – С.226.

29. Андрійчук Т.Р. Рівень деградації хроматину тимоцитів щурів за умов ініціації апоптозу / Т.Р. Андрійчук, Н. Г. Кудина, Б. А. Цудзевич, В. В. Полякова // III з'їзд Укр. біофізичного товариства, 2002 р.: збірник тез. – Л., 2002. – С.13.

30. Андрійчук Т.Р. Ферменти метаболізму пуринів за променевого ураження організму / Ракша Н.Г., Андрійчук Т.Р. // Психофізіологічні та вісцеральні функції в нормі і патології: Всеукраїнська наук. конф., 3-4 жовт. 2002 р.: тези доп. – К., 2002. – С.13.

31. Андрійчук Т.Р. Влияние ионизирующей радиации и инозина на состояние ферментных систем обмена пуринов / Цудзевич Б.А, Кудина Н.Г., Сорокіна Л.П., Андрійчук Т.Р. // III Международный симпозиум «Механизмы действия сверхмалых доз», 3-6 декаб. 2002 г.: тез. докл. – М., 2002. – С.144.

32. Andriychuk T.R. The influence of ionizing radiation upon the state of chromatin of the cells from immunocompetent rat's organs / Andriychuk T.R., Kudina N.G., Dragan L.P., Tszudzevich V.A. // III з'їзд з радіаційних досліджень (радіобіологія і радіоекологія), 21-25 трав. 2003 р.: тези доп. – К., 2003. – С.18.

33. Андрійчук Т.Р. Оцінка впливу іонізуючої радіації на окиснювальну модифікацію білків / Н.Г. Кудина, Т.Р. Андрійчук, Сорокіна Л.П. // Актуальные вопросы современного естествознания: Всеукраинская конф. молод. ученых, 11-13 апр. 2003 г.: тезисы . – С., 2003. – С.50.

34. Андрийчук Т.Р. Радиационно–индуцированные изменения активности ферментов пуринового обмена на фоне рибоксина /Т.Р. Андрийчук, Н. Г. Ракша, Л. П. Драган // Медико–биологические проблемы противолучевой и противохимической защиты: Российская науч. конф., 2004 г.: сборник тез. – Санкт-Петербург, 2004. – С. 48.
35. Andriychuk T.R. Role of poly(ADP)ribosylation in radiation–induced apoptosis of immunocompetent cells / Andriychuk T.R., L. P. Dragan, N. G. Raksha, M.E. Kucherenko // 5th Parnas Conference “Molecular mechanism of cellular signaling”, April 27-29, 2005, Jalta. - Укр. біохім. журн.(спеціальний випуск). – 2005. – Т. 77, № 2. – С. 93.
36. Андрийчук Т.Р. Участь цистеїнових протеїназ в апоптозі спленоцитів за променевого ураження / Андрийчук Т.Р., Л. П. Драган, Н. Г. Ракша, Б.О.Цудзевич // Радіобіологічні ефекти: ризики, мінімізація, прогноз: Міжнарод. конф., 22-24 берез. 2005 р.: матер.конф. – К., 2005. – С. 14.
37. Андрийчук Т.Р. Участие лизосомальных факторов в реализации программированной клеточной гибели (апоптозе) / Андрийчук Т.Р., Ракша Н.Г., Драган Л.П. // Современные проблемы науки и образования: Международ. междисциплинар. конф., 30 апр. – 9 мая 2005 г.: матер. конф. – Х., 2005. – С. 70.
38. Andriychuk T.R. Caspases–mediated regulation of poly(ADP–ribose)polymerase activity during radiation–induced apoptosis / T.R. Andriychuk, N. G. Raksha, L. P. Dragan, B. A. Tszudzevich // IX Укр. біохімічний з'їзд, 24-27 жовтн. 2006 р. – Х.: матер. – Укр. біохім. журн. – 2006. – Т. 1. – С. 95.
39. Андрийчук Т.Р. Радіаційно–індуковані порушення ДНК у спленоцитах щурів та їх модифікація рибоксином / В. В. Полякова, Л.П. Драган, Андрийчук Т.Р., Н. Г. Ракша / IX Укр. біохімічний з'їзд, 24-27 жовтн. 2006 р. – Х.: матер. – Укр. біохім. журн. – 2006. – Т. 2. – С. 218.

40. Андрийчук Т.Р. Влияние ионизирующей радиации и инозина на состояние системы поли-АДФ-рибозилирования лимфоцитов тимуса / Т.Р. Андрийчук, Н. Г. Ракша, Л. П. Драган, Б. О. Цудзевич // V съезд по радиационным исследованиям (радиобиология, радиоэкология, радиационная безопасность), 10-14 апр. 2006 г.: тез. докл. – М., 2006. – С.19.
41. Andriychuk T.R. Radiation-induced apoptosis: relationship between main executioners / Andriychuk T.R. N. G. Raksha, V.V. Polyakova, L. P. Dragan, B. A. Tszudzevich // The 35th Annual Meeting of the European Radiation Research Society and The 4th Annual Meeting of the Ukrainian Society for Radiation Biology, 22-25 Aug. 2006: abstracts. – К., 2006. – P. 65.
42. Андрійчук Т.Р. Вплив препарату рибоксину на життєздатність клітин селезінки за дії променевого чинника / Андрійчук Т.Р., Ракша Н.Г. // IV з'їзд Українського біофізичного товариства: 19 -21 груд. 2006 р.: збірник тез. – Д., 2006. – С.105-106.
43. Андрійчук Т.Р. Оцінка структурного стану ядерних нуклеїнових кислот лімфоцитів селезінки щурів за дії іонізуючої радіації та на фоні введення рибоксину / Л. П. Драган, В. В. Полякова, С. Л. Луговая, Л. П. Бучацький, Андрийчук Т.Р. // IV з'їзд Українського біофізичного товариства: 19 -21 груд. 2006 р.–2006 р.: збірник тез. – Д., 2006. – С. 46-47.
44. Андрійчук Т.Р. Модифікуючий вплив препарату рибоксину на функціонування лімфоїдних клітин за опромінення / Андрійчук Т.Р., Ракша Н.Г., Драган Л.П., Цудзевич Б.О. // Віддалені наслідки впливу іонізуючого випромінювання: Міжнарод. науково-практ. конф., 23-25 трав. 2007 р.: тези доп. - К., 2007 - С. 5-6.
45. Andriychuk T. Signal transduction factors in apoptosis induced by ionizing radiation / T. Andriychuk, N. Raksha, L. Dragan // II З'їзд Укр. товариства клітинної біології, 23-26 жовтн. 2007 р.: збірник тез. – К., 2007. – С. 271.
46. Андрийчук Т.Р. Радиационно-индуцированные изменения активности катепсина В в спленоцитах / Полякова В.В., Драган Л.П., Ракша Н.Г.,

Андрійчук Т.Р. // Медико-биологические проблемы токсикологии и радиологии: Росс. науч. конф., Санкт-Петербург, 2008 г.: матер. – Вестник Росс. Военно-Мед. академии. – 2008. – Приложение 1. – № 3 (23). – С.137.

47. Андрійчук Т.Р. Кальпаин-зависимый протеолиз при радиационно-индуцированной клеточной гибели / Андрійчук Т.Р., Ракша Н.Г., Луговая С.В. // Окружающая среда и здоровье человека: Второй Санкт-Петербургский международный экологический форум; Санкт-Петербург, 2008 г.: матер. – Вестник Росс. Военно-Мед. академии. – 2008. – Приложение 2.-Часть 1. - №3 (23). – С. 231.

48. Andriychuk T. Role of cytoplasmic and nuclear signaling in apoptotic death of lymphocytes under x-irradiation / T. Andriychuk, N. Raksha, S. Andreychenko, A. Klepko // 36th annual meeting of the European Radiation research Society, 2008.: abstracts. – Paris, 2008. – V.43, № 5. – P.146.

49. Андрійчук Т.Р. Інтенсивність процесів ПОЛ за дії іонізуючої радіації та можливі шляхи їх корекції / Драган Л.П., Андрійчук Т.Р., Полякова В.В., Ракша Н.Г. // Психофізіологічні та вісцеральні функції в нормі і патології: IV Міжнарод. наук. конф., 8-10 жовт. 2008 р.: тези доп. – К., 2008. – С. 74-75.

50. Андрійчук Т.Р. Особливості функціонування системи антиоксидантного захисту за дії променевого чинника / Ракша Н.Г., Андрійчук Т.Р., Полякова В.В., Драган Л.П., Лугова С.Л. // Біофізичні механізми функціонування живих систем: IV Міжнарод. наук. конф., 16-18 жовт. 2008 р.: тези доп. – Л., 2008. – С.6.

51. Andriychuk T. Influence of inosine on oxidative homeostasis of immunocompetent cells under exposure to low dose ionizing radiation / T. Andriychuk, N. Raksha, S. Andreychenko, A. Klepko // 7 International Meeting on the Effects of Low Doses of Radiation in Biological System: New perspectives on human exposure, 27-29 Nov. 2008: abstracts.– Lisbon, 2008. – P.150.

52. Andriychuk T. Role of proteolytic enzymes in rat's lymphocytes apoptosis under x-ray exposure / T. Andriichuk, N. Raksha, L. Ostapchenko // 34th FEBS

Congress Life's Molecular Interaction, 4-9 Jul. 2009: abstracts. – Prague, 2009. – P. 186.

53. Andriychuk T. Regulation of the intrinsic apoptosis pathway under X-ray irradiation / N. Raksha, S. Lugovaya, T. Andriichuk // VII Parnas Conference on Biochemistry and Molecular Biology, 3-7 Oct 2009.– Yalta. – Укр. біохім. журнал (спец. випуск). – 2009. – Т.81, № 4. – С. 115.

54. Андрійчук Т. Р. Окисний стресс як медіатор радіаційно-індукованого апоптозу / Т. Р. Андрійчук, Н. Г. Ракша, Л. П. Драган, В. В. Полякова, С. Л. Луговая, Б. О. Цудзевич // X Укр. біохімічний з'їзд, 13-17 верес. 2010 р. – Одеса: матер. – Укр. біохім. журн. – 2010. – Т.82, №4 (дод. 1). – С.152-153.

55. Андрійчук Т.Р. Активация каскада протеолитических ферментов в условиях радиационно-индуцированного апоптоза / Т. Р. Андрійчук, Н. Г. Ракша, Б. О. Цудзевич // VI съезд по радиационным исследованиям (радиобиология, радиоэкология, радиационная безопасность), 25– 28 окт. 2010 г.: сборник тез. – М., 2010. – С. 13.

56. Андрійчук Т.Р. Механізми активації ксантиноксидази за апоптозу, індукованого дією променевого чинника / Ракша Н.Г., Лугова С.Л., Андрійчук Т.Р. // Психофізіологічні та вісцеральні функції в нормі і патології: V Міжнарод. наук. конф., 6-8 жовтн. 2010 р.: тези доп. – К., 2010. – С. 168.

57. Andriychuk T. R. Metabolic role of free radical reactions under radiation-induced apoptosis / N. G. Raksha, T. R. Andriychuk, L. I. Ostapchenko // VIII Parnas Conference, 27-31 august 2011: abstracts. – Warsaw, 2011. – P. 48.

58. Andriichuk T. Lysosomal –dependent apoptosis of lymphocytes under irradiation conditions / Andriichuk Tetiana, Raksha Natalia, Ostapchenko Liudmila, Lugovaya Svitlana // International symposium on cell biology jointly with 3rd Ukrainian Congress for cell biology, 16-20 may 2012.: abstracts. – Yalta, 2012. – P. 109.

59. Андрійчук Т. Участь проапоптотичних факторів у радіаційно-індукованому апоптозі / Імедадзе А., Ракша Н., Лугова С., Андрійчук Т. // Молодь і поступ біології: VII Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів, 3-6 квітня 2012 р.: зб. тез – Л, 2012. – С.48.
60. Андрійчук Т.Р. Стан системи протеолізу та шляхи корекції за радіаційно-індукованого апоптозу / Андрійчук Т.Р., Ракша Н.Г. // Конференція «Адаптационные стратегии живых систем», 11-16 июня 2012, Новый Свет, АР Крым, Украина . – С. 212.
61. Андрійчук Т.Р. Модифицирующее влияние препарата рибоксина на редокс-чувствительные звенья радиационно-индуцированного апоптоза / Т.Р. Андрійчук, Н. Г. Ракша, С. Я. Мандрык, С. Л. Луговая, Б. О. Цудзевич // Российская конференция «Острые проблемы разработки противолучевых средств: консерватизм или модернизация», 13-14 ноября 2012 г.: сборник тезисов. – М., 2012. – С. 29.
62. Андрійчук Т.Р. Радіаційно-індукований апоптоз як шлях загибелі імункомпетентних клітин лімфоїдних органів / Т.Р. Андрійчук, Л. І. Остапченко // X Международная Крымская конференция «Космос и биосфера», 23-28 сентября 2013г.: сборник тез. – К., 2013. – С. 103.
63. Andriichuk T. R. The study of poly (ADP-ribose)polymerase(PARP) function as a molecular regulator during radiation – induced apoptosis / Andriichuk Teiana R., Lugova Svitlana L., Mandryk Sergii Ya., Ostapchenko Liudmila I. // IX Jakub K. Parnas Conference “Proteins from Birth to Death”, Sept 29-Oct 2, 2013.: abstracts. – Jerusalem, 2013. – P. 55.
64. Андрійчук Т. Р. Біохімічні шляхи реалізації радіаційно-індукованого апоптозу / Т. Р. Андрійчук, Н. Г. Ракша, Л. І. Остапченко // XI Укр. біохімічний конгрес, 6-10 жовтн. 2014 р. – К., матер. – The Ukrainian Biochemical Journal- 2014. – Vol.86, №5 (Suppl.) – P.124-125.
65. Андрійчук Т. Р. Некоторые аспекты реализации радиационно-индуцированного апоптоза / Т. Р. Андрійчук, Н. Г. Ракша, Л. И. Остапченко,

Б. О. Цудзевич // VII Съезд по радиационным исследованиям (радиобиология, радиэкология, радиационная безопасность), 21-24 октября 2014 г.: сборник тезисов. – М., 2014. – С. 17.

66. Андрійчук Т.Р. Залучення рецептор-опосередкованого шляху у проведення апоптогенного сигналу за дії іонізуючої радіації / Андрійчук Т.Р., Лугова С.Л., Ракша Н.Г. // Психофізіологічні та вісцеральні функції в нормі і патології: VII Міжнарод. наук. конф., 7-9 жовт. 2014 р.: тези доп. – К., 2014. – С. 22.

67. Andriychuk T. Some aspects of radiation–Induced apoptosis / T. Andriychuk, L. Ostapchenko // Third International Conference on Radiation and Application in Various fields of research, 8-12 June 2015: abstracts. – Budva, Montenegro, 2015. – P. 443.

68. Andriychuk T. ATP– dependent steps of radiation–induced apoptosis / T. Andriychuk, N. Raksha, S. Lugova, L. Ostapchenko // Fourth International Conference on Radiation and Application in Various fields of research, 23-27 May 2016: abstracts. – Nis, Serbia, 2016. – P. 354.

69. Andriychuk T. Implication of the transcription factor NF–KB in pro–antioxidant system function under radiation injury / T. Andriychuk, N. Raksha, S. Lugova, L. Ostapchenko // International Symposium on Cell Biology jointly with 5th Ukrainian Congress for Cell Biology, 2-6 Oct. 2016: abstracts. – Odessa, 2016. – P. 29.

70. Andriychuk T. The role of xanthine oxidase system in rat's lymphocytes apoptosis under X–ray exposure / T. Andriychuk, N. Raksha, S. Lugova, L. Ostapchenko // Fifth International Conference on Radiation and Applications in Various Fields of Research, 12-16 June 2017: abstracts. – Budva, Montenegro, 2017. – P. 13.

ДОДАТОК 2

Результати кластерного аналізу. Наявність позитивної кореляції для загального рівня апоптичних клітин виявлено з такими показниками як рівень дволанцюгових розривів ДНК ($r_k = 0,525$; $p = 0,001$), активність катепсину В ($r_k = 0,586$; $p < 0,001$), вміст NF- κ B ($r = 0,600$; $p = 0,016$) та вміст полідезоксирибонуклеотидів ($r = 0,539$; $p = 0,031$). Також встановлено помірну негативну кореляцію між загальним рівнем апоптичних клітин та активністю кальпаїнів ($r = -0,364$; $p = 0,025$) і ПАРП ($r_k = -0,349$; $p = 0,032$) та помірну позитивну кореляцію даного показника із рівнем одноланцюгових розривів ДНК ($r_k = 0,470$; $p = 0,004$).

Швидкість генерування супероксидних аніон-радикалів у лімфоцитах тимусу та селезінки щурів позитивно корелювала із наступними показниками: рівень одноланцюгових розривів ДНК ($r_k = 0,409$; $p = 0,012$), вміст білка p53 ($r = 0,523$; $p = 0,038$), рівень проапоптичного білка Вах ($r = 0,552$; $p = 0,030$). Разом з тим, спостерігалась негативна кореляція даного показника із вмістом АТФ ($r_k = -0,525$; $p = 0,001$) та сумарною протеасомною активністю ($r = -0,377$; $p = 0,021$).

За результатами кореляційного аналізу виявлено наявність позитивного зв'язку рівня одноланцюгових розривів ДНК із загальним рівнем проапоптичних клітин ($r_k = 0,470$; $p = 0,004$), швидкістю генерування супероксидного аніон-радикалу ($r_k = 0,409$; $p = 0,012$), рівнем дволанцюгових розривів ДНК ($r_k = 0,529$; $p = 0,001$), активністю катепсину В ($r_k = 0,401$; $p = 0,014$), рівнем білка Вах ($r_k = 0,764$; $p = 0,002$) та вмістом полідезоксирибонуклеотидів ($r_k = 0,689$; $p = 0,006$). Також показано негативну кореляцію даного показника із активністю ПАРП ($r_k = -0,438$; $p = 0,007$), вмістом АТФ ($r_k = -0,326$; $p = 0,044$) та протеасомною активністю ($r_k = -0,337$; $p = 0,038$).

Для рівня дволанцюгових розривів ДНК результати є подібними,

щоправда із деякими виключеннями (позначено #). Виявлено позитивну кореляцію із загальним рівнем апоптичних клітин ($r_k = 0,525$; $p = 0,001$), вмістом NF- κ B[#] ($r_k = 0,629$; $p = 0,012$), рівнем ІМФ[#] ($r_k = 0,733$; $p = 0,039$) та вмістом полідезоксирибонуклеотидів ($r_k = 0,511$; $p = 0,040$). Негативна кореляція із рівнем дволанцюгових розривів ДНК встановлена для активності кальпаїнів[#] ($r_k = -0,497$; $p = 0,002$), ПАРП ($r_k = -0,324$; $p = 0,047$) та протеасомної активності ($r_k = -0,413$; $p = 0,011$).

Встановлено, що вміст НАД⁺ у лімфоцитах тимусу та селезінки щурів значуще корелював лише із двома показниками – вмістом АТФ ($r_k = 0,411$; $p = 0,011$) та ксантиноксидазною активністю ($r_k = -0,534$; $p = 0,016$).

За результатами нашого аналізу найбільшу кількість кореляційних зв'язків (при цьому всі вони негативного характеру, окрім вищезгаданого зв'язку із вмістом НАД) із усіх показників виявлено для вмісту АТФ: із рівнем супероксидного аніон-радикалу ($r_k = -0,525$; $p = 0,001$) та одноланцюгових розривів ДНК ($r_k = -0,326$; $p = 0,044$), вмістом ТБК-активних продуктів ($r_k = -0,427$; $p = 0,009$), транскрипційних факторів p53 ($r_k = -0,778$; $p = 0,002$), NF- κ B ($r_k = -0,511$; $p = 0,040$) та AP-1 ($r_k = -0,494$; $p = 0,048$), рівнем білка Вах ($r_k = -0,539$; $p = 0,031$), вмістом полідезоксирибонуклеотидів ($r_k = -0,556$; $p = 0,025$), ксантиноксидазною активністю ($r_k = -0,473$; $p = 0,033$) та вмістом АМФ ($r_k = -0,733$; $p = 0,039$). Ці дані підкреслюють ключову роль АТФ у нормальному функціонуванні та вирішенні клітинної долі лімфоцитів тимусу та селезінки щурів за умов радіаційно-індукованого апоптозу.

Маркер інтенсивності прооксидантних процесів у клітині – рівень ТБК-активних продуктів – також корелював із найбільшою кількістю показників, але, на відміну від АТФ, позитивно: каталазна активність ($r = 0,561$; $p = 0,001$), протеасомна активність ($r = 0,364$; $p = 0,025$), вміст білка p53 ($r = 0,556$; $p = 0,025$), АМФ ($r_k = 0,733$; $p = 0,039$), інозину ($r = 0,733$; $p = 0,034$), гіпоксантину ($r = 0,867$; $p = 0,015$), ксантиноксидазна активність

($r = 0,569$; $p = 0,002$), вміст АТФ ($r_k = -0,733$; $p = 0,039$). Особливо слід відзначити, що вміст ТБК-АП позитивно корелював із активністю всіх досліджених каспаз: r коливався від $0,589$ ($p = 0,006$) для каспази 6 до $0,633$ ($p = 0,003$) для каспази 2. Наявність настільки значної кількості позитивних кореляційних зв'язків вказує на активне залучення ТБК-активних продуктів до патогенезу радіаційно-індукованого апоптозу лімфоцитів тимусу та селезінки щурів за даних експериментальних умов.

Ще один показник, який відображає інтенсивність процесів ВР-окиснення у клітині, однак з позиції білків, а не ліпідів, – це ступінь окисної модифікації білків. Даний показник корелював із такими змінними: вмістом ТБК-АП ($r = 0,556$; $p = 0,025$), протеасомною активністю ($r = -0,544$; $p = 0,009$), вмістом ІМФ ($r = 0,440$; $p = 0,012$), сумарною КО- та КД-активністю ($r = 0,433$; $p = 0,039$). Також дана змінна корелювала із активністю всіх досліджених каспаз, при цьому r варіював у межах $0,411$ – $0,556$.

Активність ключового ферменту першої ланки антиоксидантного захисту клітин – супероксиддисмутази – не корелювала значуще із жодним іншим показником. Разом із тим, активність одного з ключових ферментів системи антипероксидного захисту – каталази – мала кореляційні зв'язки із такими змінними: активність ПАРП ($r_k = 0,360$; $p = 0,027$), вміст ТБК-АП ($r = 0,561$; $p = 0,001$), протеасомна активність ($r = 0,375$; $p = 0,021$) та активність ксантинооксидази ($r = 0,385$; $p = 0,009$), ступінь окисної модифікації білків ($r = -0,556$; $p = 0,025$) та вміст ІМФ ($r = -0,733$; $p = 0,039$). Аналогічно до вмісту ТБК-АП, каталазна активність мала сильні позитивні зв'язки із активністю каспаз: r мав значення від $0,511$ ($p = 0,040$) для каспази 3 до $0,600$ ($p = 0,016$) для каспази 8.

Активність Ca^{2+} -залежних цистеїнових протеаз кальпаїнів мала меншу кількість кореляційних зв'язків, переважно із показниками нуклеотидного обміну – вмістом АТФ ($r_k = -0,733$; $p = 0,039$), АМФ ($r = 0,711$; $p = 0,039$),

інозину ($r = 0,711$; $p = 0,039$). Також показано негативну кореляцію із рівнем дволанцюгових розривів ДНК ($r_k = -0,497$; $p = 0,002$) та загальним рівнем апоптичних клітин ($r = -0,364$; $p = 0,025$).

Показано, що активність лізосомальної протеази катепсину В мала кореляційні зв'язки із такими змінними: рівнем одно- ($r_k = 0,400$; $p = 0,014$) та дволанцюгових ($r_k = 0,370$; $p = 0,023$) розривів ДНК, загальним рівнем апоптичних клітин ($r_k = 0,586$; $p < 0,001$), вмістом АТФ ($r_k = -0,358$; $p = 0,027$), вмістом фактору AP1 ($r_k = 0,494$; $p = 0,048$), сумарною ксантиноксидазною та ксантиндегідрогеназною активністю ($r_k = 0,473$; $p = 0,033$).

Результати кореляційного аналізу за даних експериментальних умов показали наявність великої кількості значущих кореляцій для протеасомної активності: позитивного характеру – із активністю ПАРП ($r_k = 0,459$; $p = 0,005$), вмістом ТБК-АП ($r = 0,364$; $p = 0,025$) та каталазною активністю ($r = 0,375$; $p = 0,021$), негативного характеру – із вмістом ІМФ ($r = -0,633$; $p = 0,039$), ступенем окисної модифікації білків ($r = -0,544$; $p = 0,009$), рівнем білків Вах ($r = -0,574$; $p = 0,007$) та NF-κB ($r = -0,511$; $p = 0,040$), швидкістю генерації супероксидного радикалу ($r = -0,377$; $p = 0,021$) та рівнем дволанцюгових розривів ДНК ($r_k = -0,413$; $p = 0,011$).

Враховуючи ключову роль транскрипційного фактора p53 у регуляції клітинного циклу та підтриманні стабільності геному, його вміст мав очікувано велику кількість кореляційних зв'язків, зокрема, з такими змінними: вмістом гіпоксантину ($r = 0,433$; $p = 0,039$), рівнем АМФ ($r = 0,567$; $p = 0,015$) та АТФ ($r_k = -0,589$; $p = 0,018$), вмістом транскрипційних факторів AP1 ($r = 0,439$; $p = 0,031$) та NF-κB ($r = 0,556$; $p = 0,025$), рівнем ТБК-АП ($r = 0,556$; $p = 0,033$).

Для іншого важливого транскрипційного фактору NF-κB показано менш насичені результати: його рівень корелював лише із такими змінними: протеасомною активністю ($r = -0,511$; $p = 0,040$), вмістом АТФ ($r_k = -0,467$;

$p = 0,033$), загальним рівнем апоптичних клітин ($r = 0,500$; $p = 0,016$) та дволанцюгових розривів ДНК ($r_k = 0,629$; $p = 0,012$). Рівень ще одного транскрипційний фактору – AP1 – корелював лише із трьома змінними: активністю катепсину В ($r_k = 0,394$; $p = 0,048$), вмістом фактора p53 ($r = 0,439$; $p = 0,031$) та рівнем АТФ ($r_k = -0,494$; $p = 0,042$).

Мітохондріальний індуктор апоптозу AIF мав значущий кореляційний зв'язок лише із однією змінною – вмістом нуклеозиду аденозину ($r = 0,566$; $p = 0,017$), тоді як рівень апоптичного білка Вах корелював із істотно більшою кількістю показників: рівнем супероксид-аніону ($r = 0,452$; $p = 0,030$) та одно ланцюгових розривів ДНК ($r_k = 0,764$; $p = 0,002$), активністю ПАРП ($r_k = -0,523$; $p = 0,038$), вмістом АТФ ($r_k = -0,439$; $p = 0,031$), протеасомною активністю ($r = -0,574$; $p = 0,007$) та рівнем дезоксирибонуклеотидів ($r = 0,528$; $p = 0,022$).

Активність основних протеолітичних ферментів апоптозу – ініціаторних та ексекторних каспаз (2, 3, 6, 8 та 9) – мала чітко узгоджені кореляційні зв'язки із іншими змінними: із вмістом ТБК-активних продуктів (r в межах 0,589-0,633), ступенем окисної модифікації білків (r варіював від 0,411 до 0,556), каталазною активністю (r у діапазоні 0,511-0,600), вмістом АТФ (r_k в межах $-0,440 \dots -0,622$), АМФ (r варіював від 0,433 до 0,589) та гіпоксантину (r у діапазоні 0,427-0,566). Також, цілком очікувано, між активністю окремих каспаз була пряма кореляція на рівні $r = 0,544-0,723$.

Активність ксантиноксидази, що залучена до обміну пуринових нуклеотидів та генерації вільних радикалів, також мала ряд значущих кореляційних зв'язків, зокрема, із вмістом НАД ($r_k = -0,434$; $p = 0,016$), рівнем ТБК-активних продуктів ($r = 0,569$; $p = 0,002$), каталазною активністю ($r = 0,385$; $p = 0,009$), активністю катепсину В ($r = 0,473$; $p = 0,033$) та вмістом усіх проаналізованих нуклеотидів, нуклеозидів та азотистих основ (r у діапазоні 0,398-0,542).

В ході проведено експериментального дослідження було визначено

вміст окремих метаболітів пуринового обміну, а саме АТФ, АДФ, АМФ, ІМФ, аденозину, інозину, гіпоксантину та аденіну. Рівень АТФ значуще негативно корелював лише із вмістом АМФ ($r_k = -0,733$; $p = 0,039$). Рівень АМФ прямо корелював із вмістом інозину ($r = 0,533$; $p = 0,042$) та гіпоксантину ($r = 0,567$; $p = 0,022$). Між вмістом АДФ, ІМФ, інозину, аденозину, аденіну та іншими показниками пуринового обміну не спостерігалось значущих кореляційних зв'язків. Зокрема, вміст аденіну не корелював взагалі із жодним іншим дослідженим показником.

Виходячи з результатів проведеного кореляційного аналізу, можна виділити ряд показників, які мають найбільшу кількість кореляційних зв'язків. Серед них – вміст АТФ, рівень ТБК-активних продуктів, активність кожної із п'яти досліджених каспаз, вміст білка р53, ксантиноксидаза та протеасомна активності. Змінні цієї групи можна означити як розраховані ключові параметри, що пропонуються для визначення з метою отримання повноцінного уявлення про стан лімфоцитів селезінки і тимусу щурів за умов експериментального радіаційно-індукованого апоптозу.

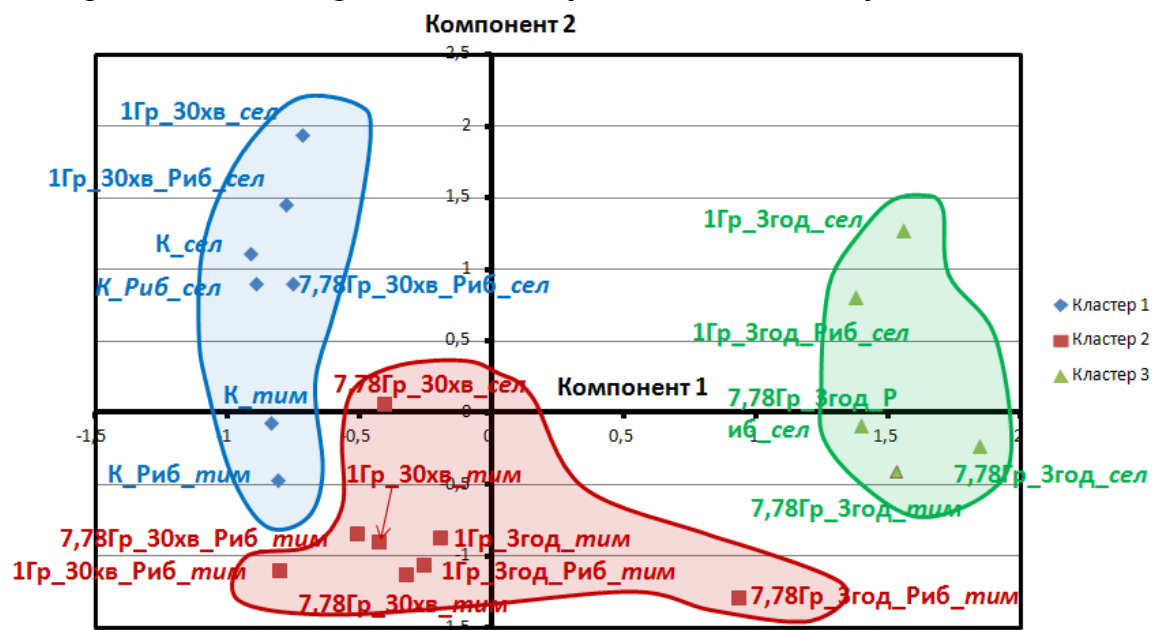


Рис.10 (2). Результати кластерного аналізу (центроїдне групування) редукованих даних з експериментальних груп ($k = 3$). Окремі кластери відображено контурами різного кольору