

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ ТА НАУКИ УКРАЇНИ
КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
імені ТАРАСА ШЕВЧЕНКА**

АНДРІЙЧУК ТЕТЯНА РОСТИСЛАВІВНА

УДК 577.+612.438.014.481+612.438.014.46

**БІОХІМІЧНІ МЕХАНІЗМИ РЕАЛІЗАЦІЇ
РАДІАЦІЙНО–ІНДУКОВАНОГО АПОПТОЗУ**

03.00.04 – біохімія

АВТОРЕФЕРАТ
дисертації на здобуття наукового ступеня
доктора біологічних наук

Київ – 2017

Дисертацією є рукопис

Робота виконана на кафедрі біохімії ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка МОН України

Науковий консультант: доктор біологічних наук, професор
Остапченко Людмила Іванівна,
Київський національний університет
імені Тараса Шевченка,
директор ННЦ «Інститут біології та медицини»

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук, професор
Столяр Оксана Борисівна,
Тернопільський національний педагогічний
університет імені Володимира Гнатюка МОН України,
професор кафедри хімії та методики її навчання;

доктор біологічних наук, доцент
Калачнюк Лілія Григорівна,
Національний університет біоресурсів і
природокористування України МОН України,
професор кафедри біохімії;

доктор біологічних наук
Дружина Микола Олександрович,
Інститут експериментальної патології, онкології і
радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України,
старший науковий співробітник відділу біологічних
ефектів іонізуючого та неіонізуючого випромінювання

Захист відбудеться «29» грудня 2017 року о 10⁰⁰ годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.001.24 Київського національного університету імені Тараса Шевченка за адресою: м. Київ, проспект Академіка Глушкова, 2, ННЦ «Інститут біології та медицини», ауд. 434

Поштова адреса: 01601, м. Київ, вул. Володимирська, 64/13, Київський національний університет імені Тараса Шевченка, ННЦ «Інститут біології та медицини», спеціалізована вчена рада Д 26.001.24

З дисертацією можна ознайомитись у Науковій бібліотеці ім. М. Максимовича Київського національного університету імені Тараса Шевченка за адресою: м. Київ, вул. Володимирська, 58, зала 12

Автореферат розісланий «28» листопада 2017 року

Вчений секретар спеціалізованої вченої ради

Ракша Н.Г.

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

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 [Fadeel B., Orrenius S., 2005; Фильченков А. А., 2013]. 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 [Favaloro B., 2012; McIlwain D., 2013] 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 [Lemon J., 2008; Maier P., 2016]. 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 [Kondo T., 2012; Алексанин С.С., 2016]. 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 [Кудряшов Ю.Б., 2004; Кучеренко М.Є. 2006; Дружина М.О, 2016], 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 спектро-фото(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(АДФ-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 напряму 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 с'їздах 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 с'їздах по радиационным исследованиям (радиобиология, радиэкология, 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'їзди Українського біофізичного товариства (Харків, Україна, 1998; Львів, Україна, 2002; Донецьк, Україна, 2006); II з'їзди 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).

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.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Матеріали та методи дослідження. Досліди проводили на нелінійних білих щурах-самцях масою 150-170 г, які утримувались за стандартних умов акредитованого віварію ННЦ "Інститут біології та медицини" Київського національного університету імені Тараса Шевченка, згідно з принципами біоетики, законодавчими нормами та вимогами "Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та наукових цілей (Страсбург, 1986) і у відповідності до Закону України № 3447 ІV "Про захист тварин від жорстокого поводження"; Декларації принципів толерантності (28 сесія ЮНЕСКО, 1995), Універсальної декларації по біоетиці та правах людини (ООН, 1997). Прилади, використані для наукових досліджень, підлягали метрологічному контролю.

Інозин (комерційна назва рибоксин) 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.

Лімфоцити тимусу і селезінки щурів виділяли за методами [Хант С., 1990], їх життєздатність визначали з використанням вітального барвника трипанового синього [Хант С., 1990]. Детекцію стану хроматину і ядерної ДНК оцінювали: а) за накопиченням одно- дволанцюгових розривів ДНК та полідезоксирибонуклеотидів (ПДН), визначених спектрофлуориметричним методом з використанням 3',5'-діамінобензойної кислоти (ДАВА) [Дмитренко М.П., Андрійчук Т.Р., 1997; Іванник Б.П., 1986]; б) міжнуклеосомну фрагментацію ДНК – електрофорезом ДНК в агарозному гелі [Маниатис Т., 1984]; в) за ферметатиною активністю полі(ADP-рибозо)полімерази (ПАРП), з використанням 0,001 М 8-¹⁴C-НАД⁺ [Нелипович П.А., 1984]. Вміст НАД⁺ оцінювали спектрофотометричним методом за Пасос Ф., 1985. Вміст білка NF-κB визначали імуноферментним методом з використанням "Colorimetric enzyme immunoassay for NF-κB" (Oxford Biomedical Research, USA). Розподіл фракцій (цитоплазматичну і ядерну фракції лімфоцитів) проводили з використанням набору Nuclear extraction kit (Chemicon International, USA&Canada) та згідно з рекомендаціями Davis J.N, 2001. Вміст білка p53 визначали з використанням імуноферментного аналізу, застосовуючи набір "p53 pan ELISA" (Roshe Applied Science, Germany).

Електрофоретичний аналіз білків проводили за Laemmli U. K. (1970). Визначення концентрації білка проводили спектрофотометрично за методом Bradford M.M. (1976). Імуноблот-аналіз для визначення рівня Bax, Fas, AIF та AP-1 проводили згідно з рекомендаціями "Amersham™ ECL™ Prime Western blotting detection reagents and analysis system" з модифікаціями. Оцінку

каспази-2, каспази-3, каспази-6, каспази-8, каспази-9) проводили спектрофотометрично з використанням "ApoTargetTM Caspase Colorimetric Protease Assay Sampler Kit" (BioSource, USA).

Оцінку функціональної активності мітохондрій здійснювали спектрофотометрично з використанням 3-[4,5-диметилтіазалон-2-іл]-2,5-дифеніл тетразолій бромід (МТТ) згідно з технічним протоколом фірми-виробника "Sigma". Вміст ТБК-активних продуктів оцінювали згідно з методом [Стальная И.Д., 1977]. Швидкість генерування супероксидних аніон-радикалів реєстрували методом електронного парамагнітного резонансу ([Вартанян Л.С., 1989]. Визначення супероксиддисмутази активності проводили згідно з [Чеварі С., 1985]; каталазу активність оцінювали згідно з [Корольок М. А., 1988]. Активність ксантиноксидази та ксантиндегідрогенази визначали за методом [Кишко Т.О., Дмитренко Н.П., 2000]. Ступінь окиснювальної модифікації білків реєстрували спектрофотометрично згідно з методом [Oliver C.N., 1987].

Активність катепсину В визначали спектрофотометрично згідно з [Шатерников В.А., 1976; Березин В.А., 1982]. Активність калпаїнів визначали спектрофлуориметрично за [Bizat N., 2003]. Оцінку протеасомної активності проводили спектрофлуориметрично з використанням "Proteasome Activity Fluorometric Assay Kit" (BioVision, USA).

Вміст АТФ визначали хемілюмінесцентним методом з використанням "ATP Monitoring Kit" (LKB-Wallac, Turku, Finland). Дослідження катаболізму пуринів [Головацкий И. Д., 1989] та активності ферментів його обміну – аденозиндезамінази, 5'-нуклеотидази, АМФ-дезамінази, аденілаткінази [Дмитренко Н.П., Комисаренко С.В., 1980] визначали радіоізотопним методом. Пуриннуклеозидфосфорилазу активність визначали фотоколіриметрично згідно з [Филановская Л.И., 1985].

Протоковоцитометричний аналіз стану лімфоцитів тимусу і селезінки щурів з метою оцінки клітинної загибелі проводили згідно з технічними рекомендаціями [Apoptosis: Applied Reagents and Technologist.– BD Bioscience, 2002].

При статистичній обробці для кожної групи даних розраховували середнє значення (M) 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 вибіркові дані мали тип розподілу відмінний від нормального, дані візуалізували за допомогою діаграм типу "box with whiskers" і використовували непараметричні тести та критерії. Порівняння середніх значень груп проводили шляхом однофакторного дисперсійного аналізу. Оцінку сили взаємозв'язку між окремими показниками проводили 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 [Cohen J., 1988.]. У тих випадках, коли аналізувались порядкові дані,

використовували коефіцієнт тау-в Кендала (r_k). Всі обчислення результатів дослідження та візуалізації проводили за допомогою програм IBM® SPSS Statistics 22, GraphPad Prism 5 та Microsoft Excel 2007.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Ядерно-опосередкований шлях апоптозу. При перебігу молекулярних процесів за радіаційно-індукованого апоптозу особливого значення набувають структурні зміни на молекулярному і надмолекулярному рівнях в генетичному апараті клітин – хроматині в цілому та його складовій – молекулі ДНК, які,

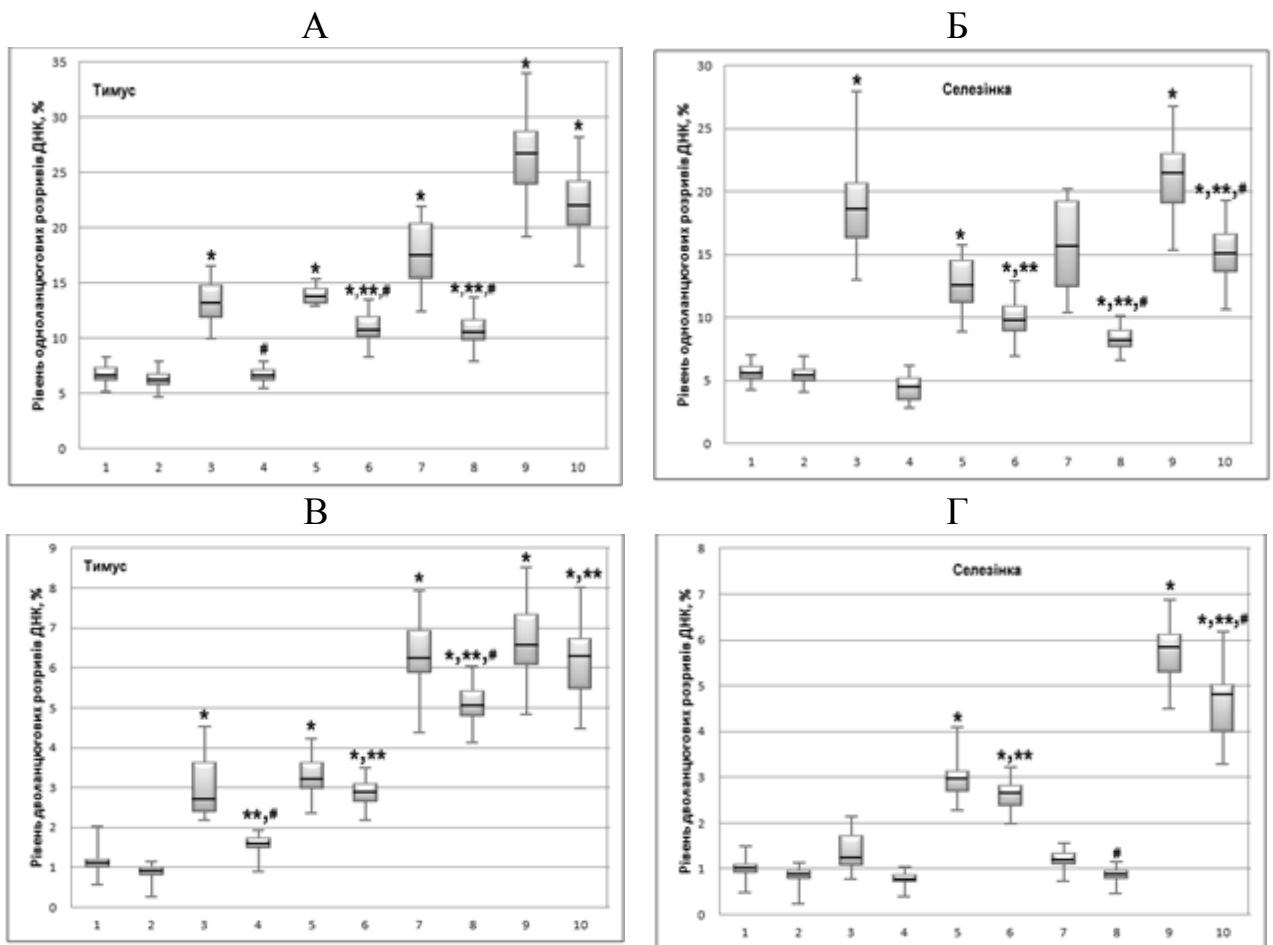


Рис. 1. Рівень одноланцюгових (А,Б) та дволанцюгових (В,Г) розривів ДНК у лімфоцитах тимусу (А,В) та селезінки (Б,Г) щурів за дії іонізуючої радіації та на фоні введення інозину ($M \pm SD$, $n = 5$): 1 – контроль; 2 – контроль + інозин; 3 – через 30 хв після опромінення у дозі 1,0 Гр; 4 – через 30 хв 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 2; 11; 17): * – достовірно відносно контролю; ** – достовірно відносно контролю на фоні введення інозину; # – достовірно відносно відповідних опромінених груп (на рівні значущості $p < 0,05$)

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.

Дослідження рівня одно-і дволанцюгових розривів ядерної ДНК в лімфоцитах тимусу та селезінки щурів продемонстрували залежне від дози опромінення підвищення показників за обох часових інтервалів (рис.1), спричинене як безпосереднім впливом радіаційного чинника, так і за рахунок активних кисневих метаболітів (АКМ). Пошкодження ДНК ініціюють скоординовану відповідь з залученням системи сенсорних, трансдьюсерних і ефекторних білків, які детектують пошкодження ДНК і при недостатній активності репараційних систем, уможлиблюють запуск програмованої клітинної загибелі– апоптозу, активуючи NF-κB– опосередкований (дволанцюгові розриви ДНК) та p53 –залежний (одноланцюгові розриви ДНК) шляхи.

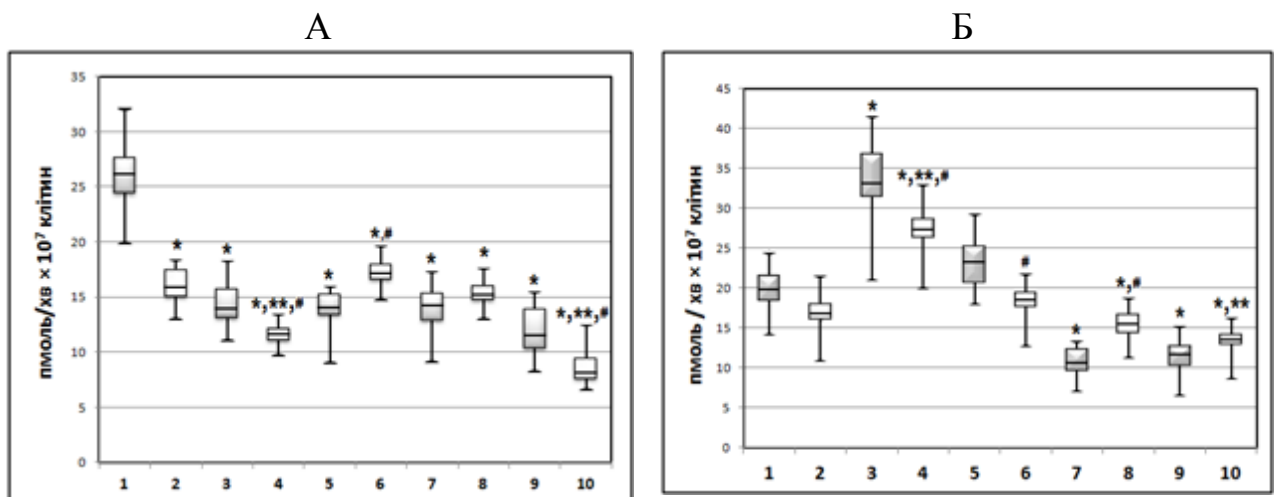


Рис. 2. Активність полі(ADP-рибозо)полімерази у лімфоцитах тимусу (А) і селезінки (Б) щурів за дії іонізуючої радіації та на фоні введення інозину ($M \pm SD$, $n = 5$): 1 – контроль; 2 – контроль + інозин; 3 – через 30 хв після опромінення у дозі 1,0 Гр; 4 – через 30 хв після опромінення у дозі 1,0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

Для з'ясування можливих механізмів репарації ДНК було оцінено активність полі(ADP-рибозо)полімерази (ПАРП) та встановлено її різнонаправлені зміни в імунокомпетентних клітинах лімфоїдних органів: в лімфоцитах тимусу виявлено дозозалежне зниження активності ферменту за обох часових інтервалів, водночас для лімфоцитів селезінки щурів характерне

підвищення активності ПАРП через 30 хв і 3 год (рис.2). Наведені результати узгоджуються з теорією ранніх маркерів апоптозу, висунутою Oliver F.G. (1999), про пріоритетність протеолітичного каспазо-3,-7-опосередкованого розщеплення ПАРП, що уможлиблює ескалацію Ca^{2+}, Mg^{2+} -залежного ендонуклеолізу (починаючи з 3 год після опромінення в обох дозах накопичуються полідезоксирибонуклеотиди), порівняно з гіперактивацією ферменту на фоні накопичення нерепарованих розривів ДНК.

Щодо виявленого нами зниження за дії променевого чинника вмісту НАД⁺ (субстрату ПАРП) в обох популяціях лімфоцитів на фоні пригнічення активності ферменту, то його можна пояснити за рахунок радіаційно-опосередкованого підвищення синтезу циклічної ADP-рибози, яка мобілізує Ca^{2+} з внутрішньоклітинних депо, запускаючи систему Ca^{2+} -залежного сигналювання [Дрель В.Р., 2011].

Враховуючи той факт, що специфічним біохімічним маркером радіаційно-індукованої апоптотичної загибелі лімфоцитів є впорядкована міжнуклеосомна фрагментація хроматину, нами було проведено електрофоретичне розділення фрагментів ДНК, виділеної з лімфоцитів тимусу та селезінки щурів, та показано наявність класичної апоптотичної "драбинки", яка характеризує нуклеосомні ділянки, кратні 180-200 п.н., вміст яких зростає дозозалежним чином.

Реалізація ядерного шляху апоптозу безпосередньо пов'язана зі змінами в регуляції генної експресії завдяки функціонуванню ряду активованих радіаційним чинником редокс - респонсивних транскрипційних факторів: NF-κB, p53, AP-1, під контролем яких знаходяться про-апоптотичні гени *FasL*, *Fas*, *p53*, *Bax*, *Araf-1*, *c-Myc*, *PUMA*, *NOXA*. Згідно з одержаними результатами дія променевого чинника призводить до підвищення вмісту NF-κB (табл. 1) в ядерній фракції лімфоцитів тимусу і селезінки щурів. Наведені дані 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, яка приводить до проліферації і виживання клітин [Janssens S., 2006; Oeckinghaus A., 2011].

Таблиця 1

Вміст NF-κB в ядерній фракції лімфоцитів тимусу та селезінки щурів за впливу іонізуючої радіації (пг/мкг білка; M ±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, $p < 0,05$

Доцільність встановлення вмісту білка p53 за дії променевого чинника пов'язана з функціонуванням сенсорної протеїнкінази АТМ та залежною від неї активацією і стабілізацією транскрипційного фактору p53, що є основним маркером модуляції клітинного транскриптому за накопичення високого рівня ушкодження ДНК [Daniak N, 2005]. Показано (рис.3) більш виражене підвищення рівня p53 у лімфоцитах селезінки щурів за опромінення в дозі 1,0 Гр (3 год після впливу) та 7,78 Гр (30 хв після впливу).

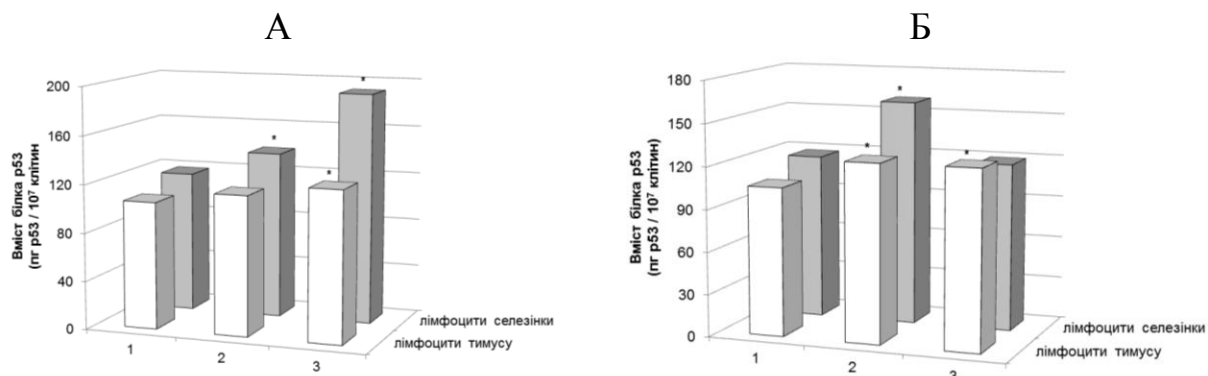


Рис. 3. Вміст білка p53 в лімфоцитах тимусу та селезінки щурів за дії іонізуючої радіації в дозі 1,0 Гр (А) та 7,78 Гр (Б): 1 – контроль; 2 – через 30 хв після опромінення; 3 – через 3 год після опромінення; * – достовірно відносно контролю; $p < 0,05$

Виявлені зміни вмісту транскрипційних факторів p53 і NF-кВ вірогідно спричиняють сенсibilізацію клітини до радіаційно-індукованого апоптозу за рахунок їх взаємної активації з подальшою стимуляцією експресії відповідних генів.

Дослідження рівня транскрипційного фактора AP-1 (рис. 4), який є

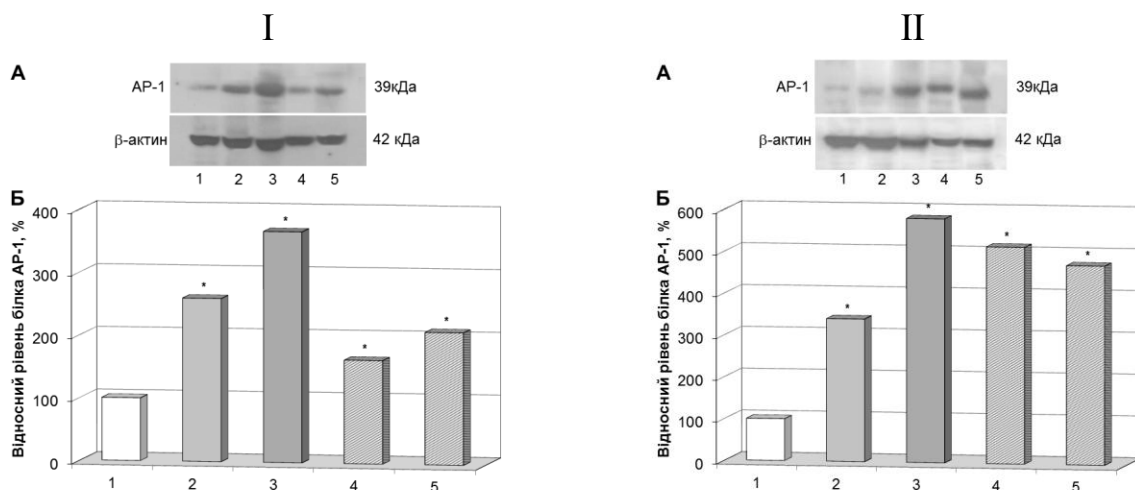


Рис. 4. Відносний рівень транскрипційного фактору AP-1 в лімфоцитах тимусу (І) та селезінки (ІІ) щурів за дії іонізуючої радіації: А – блотограма; Б – гістограма імуноблот-аналізу; 1 – контроль; 2 – 1,0 Гр (30 хв після опромінення); 3 – 1,0 Гр (3 год після опромінення); 4 – 7,78 Гр (30 хв після опромінення);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

продуктом генів ранньої відповіді, дозволило встановити більш виражені показники для лімфоцитів селезінки щурів (дозозалежне підвищення рівня за обох часових інтервалів) порівняно з лімфоцитами тимусу, що уможлиблюється за рахунок калпаїн-залежної та протеасомо-опосередкованої убіквітин-незалежної деградації білка.

Слід зазначити, що досліджені транскрипційні фактори є редокс-залежними, оскільки для функціонування принциповим є їх власний редокс-статус та статус відповідних активаторів. Спричинене радіаційним чинником зростання рівня АКМ на фоні дисрегуляції антиоксидантної системи (див. табл.2 та рис.13) призводить до послаблення мобілізації захисних систем клітин за рахунок модуляції транскрипційної активності редокс-чутливих факторів, проте відмічається стимуляція реакцій, які реалізуються апоптотичною загибеллю клітин [Октябрьский О.Н., 2007].

Привертає увагу той факт, що одним із механізмів, який пов'язує генотоксичний вплив іонізуючої радіації на рівні ушкодження ДНК та реалізацію апоптотичної загибелі клітин, є активація каспази-2, яка належить до цистеїнових протеїназ родини каспаз (ключових регуляторів апоптозу), у складі активаційної апоптотичної платформи PIDDосоми: адапторний білок RAIDD, PIDD (р53-індукований білок) та каспаза-2. Оцінка активності каспази-2 (рис. 5) як маркеру ядерно-опосередкованої ланки апоптозу засвідчила різнонаправленість змін показників в імунокомпетентних клітинах тимусу і селезінки щурів за дії іонізуючої радіації. Розщеплення каспазою-2 ряду субстратів як в ядерному, так, за умови редислокації, і в мітохондріальному компартменті свідчить про виконання ферментом індукторних і ефекторних функцій [Kumar S., 2009].

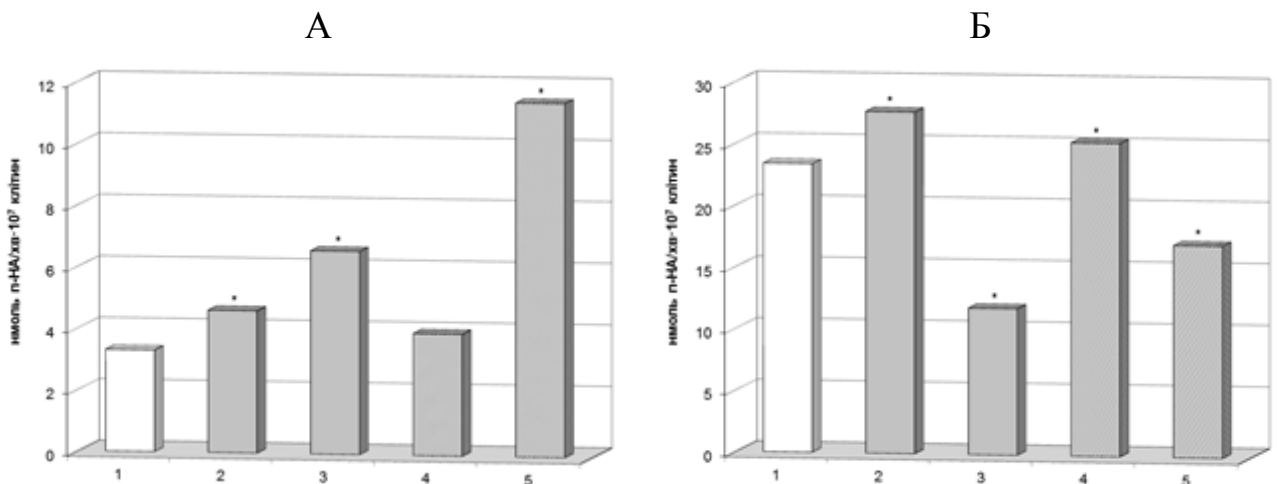


Рис. 5. Активність каспази-2 у лімфоцитах тимусу (А) і селезінки (Б) щурів за дії іонізуючої радіації: 1 – контроль; 2 – 1,0 Гр через 30 хв після опромінення; 3 – 1,0 Гр через 3 год після опромінення; 4 – 7,78 Гр через 30 хв після опромінення; 5 – 7,78 Гр через 3 год після опромінення; * – достовірно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

Радіаційно–індуковані зміни перебігу ядерно-опосередкованого апоптозу, згідно з вищенаведеними показниками, свідчать про більш виражений генотоксичний вплив випромінення в летальній дозі порівняно з дозою 1,0 Гр.

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

Рецептор-опосередкований шлях реалізації радіаційно-індукованого апоптозу. Відповідно до сучасних уявлень, провідну роль в радіаційно-індукованій програмуванні загибелі відіграє DISC-комплекс - 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 через 30 хв і 3 год після дії іонізуючої радіації.

Для підтвердження ступеня залучення рецептор-опосередкованої ланки у апоптоз, спричинений дією променевого чинника, було оцінено внесок основної ініціаторної каспази залежного від рецепторів сигнального шляху – каспази-8, як компонента DISC-комплекса, в реалізацію досліджуваної танатогенної програми.

Показано (рис.6, А), що загальне опромінення тварин у дозах 1,0 Гр та 7,78 Гр призводить до значних змін активності ініціаторної каспази-8. У лімфоїдних клітинах тимусу спостерігається зростання активності ферменту вже через 30 хв після дії іонізуючої радіації та підвищення в 2,2 раза через 3 год після впливу. У лімфоїдних клітинах селезінки (рис.6, Б) спостерігається зростання активності каспази-8 в 1,2 раза через 30 хв, в той час як на третю годину після опромінення активність ферменту знижувалась майже вдвічі порівняно з контролем за дози 1,0 Гр та в 1,6 раза за дози 7,78 Гр. Виявлені відмінності частково можна пояснити різним ступенем диференціювання та відмінною метаболічною активністю обох типів досліджуваних клітин і вірогідною належністю лімфоцитів тимусу до клітин I типу, які для посилення сигналіngu не залучають мітохондріальний шлях апоптозу. Лімфоцити селезінки належать до клітин II типу, для яких характерний дещо нижчий рівень експресії Fas, тому принциповим є етап додаткової активації мітохондріального шляху проведення апоптотичного сигналу з залученням родини білків Bcl-2.

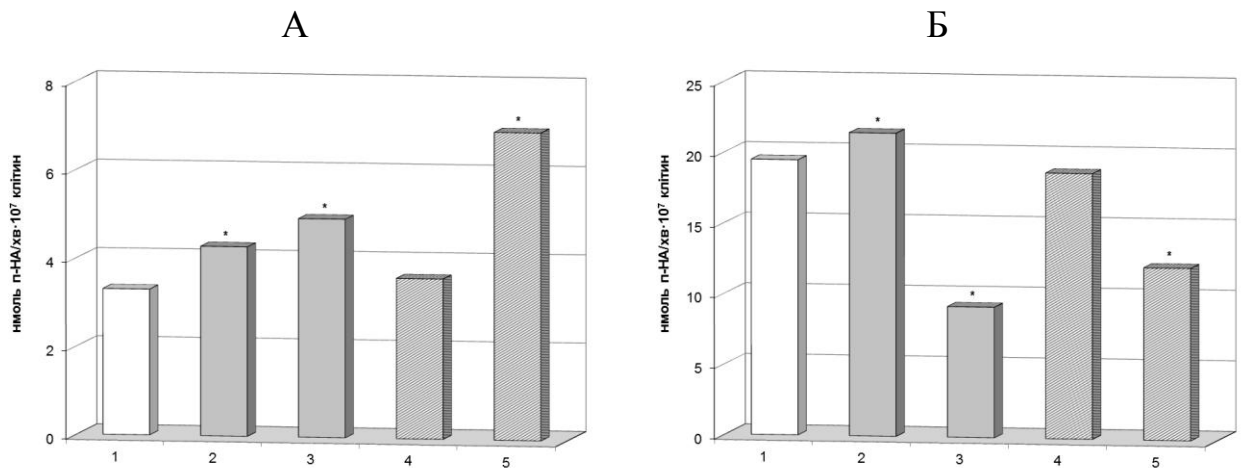


Рис. 6. Активність каспази-8 у лімфоцитах тимусу (А) та селезінки (Б) щурів за дії іонізуючої радіації: 1 – контроль; 2 – 1,0 Гр через 30 хв після опромінення; 3 – 1,0 Гр через 3 год після опромінення; 4 – 7,78 Гр через 30 хв після опромінення; 5 – 7,78 Гр через 3 год після опромінення; * – достовірно відносно контролю; $p < 0,05$

Мітохондріально-опосередкований шлях реалізації радіаційно-індукованого апоптозу. Ефективність функціонування електронно-транспортного ланцюга як показника ступеня активності мітохондрій визначали за МТТ–тестом (рис.7).

В лімфоцитах тимусу і селезінки щурів відмічається дозозалежне зниження (за обох часових інтервалів) ступеня відновлення МТТ, 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.

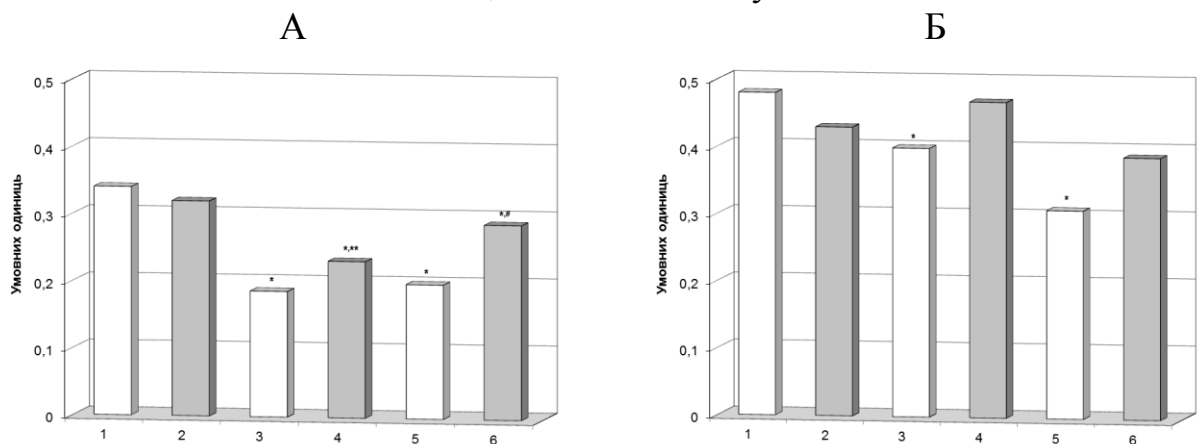


Рис. 7. Ступінь відновлення МТТ у лімфоцитах тимусу (А) та селезінки (Б) щурів за дії іонізуючої радіації та на фоні введення інозину: 1 – контроль; 2 – контроль + інозин; 3 – опромінення в дозі 1,0 Гр; 4 - опромінення в дозі 1,0 Гр + інозин; 5 – опромінення в дозі 7,78 Гр; 6 – опромінення в дозі 7,78 Гр + інозин; * – достовірно відносно контролю; ** – достовірно відносно контролю на фоні введення інозину; # – достовірно відносно відповідних опромінених груп; $p < 0,05$

Показано, що введення інозину приводить до відновлення активності дихального ланцюга мітохондрій, регулюючи функціонування

сукцинатдегідрогенази. Активізуючий вплив інозину на стан окисного фосфорилування у лімфоцитах тимусу щурів за опромінення в дозах 1,0 та 7,78 Гр продемонстровано Ракшою Н. Г., Цудзевичом Б.О. (2004).

Залучення білків родини Bcl-2 до реалізації мітохондріального шляху апоптозу оцінювали за вмістом проапоптотичного члена - білка Вах, який бере безпосередню участь як у процесах пермебілізації зовнішньої мембрани мітохондрій, так і в цілому контролює та інтегрує різні шляхи індукції та реалізації апоптозу.

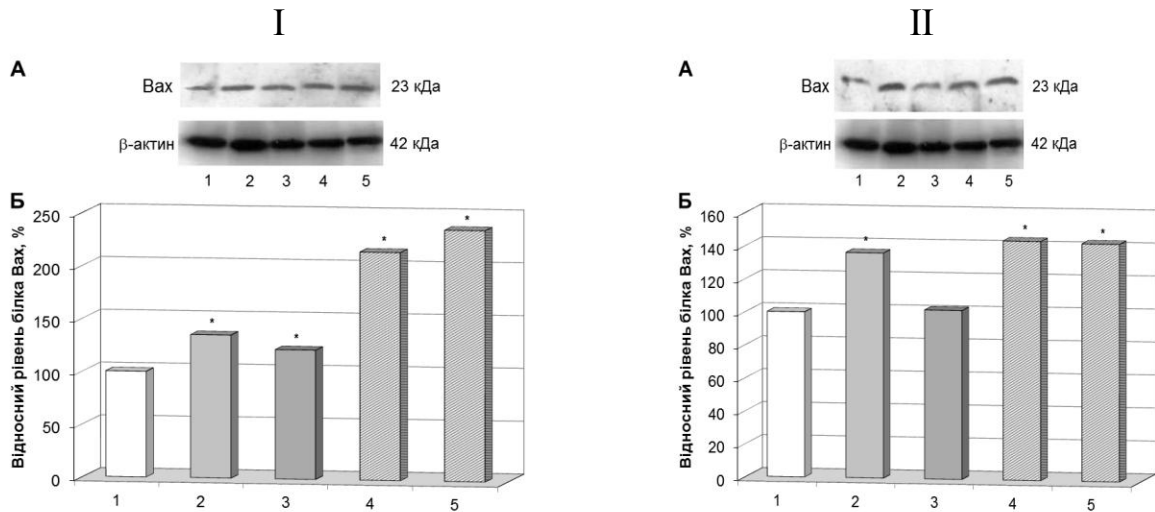


Рис. 8. Відносний рівень Вах у лімфоцитах тимусу (I) та селезінки (II) щурів за дії іонізуючої радіації: А – блотограма; Б – гістограма імуноблот-аналізу; 1 – контроль; 2 – 1,0 Гр (30 хв після опромінення); 3 – 1,0 Гр (3 год після опромінення); 4 – 7,78 Гр (30 хв після опромінення); 5 – 7,78 Гр (3 год після опромінення); * – достовірно відносно контролю; $p < 0,05$

За дії іонізуючої радіації в лімфоцитах тимусу та селезінки щурів відмічається підвищення вмісту Вах (рис.8), яке є більш вираженим за летальної дози. Виявлені зміни рівня білка свідчать про ескалацію процесу активації проапоптотичного Вах із залученням білків родини Bcl-2 – PUMA і Noxa, гени яких є p53-респонсивними [Чумаков П.М, 2010].

Радіаційно-опосередковане посилення неселективної проникності мітохондріальної мембрани супроводжується вивільненням з мітохондрій у цитозоль ряду проапоптотичних факторів: цитохрому *c*, AIF (апоптоз-індукуючого фактору), ендонуклеази G та інших. Вихід цитохрому *c* в цитозоль сприяє утворенню високомолекулярного багатокомпонентного сигнального комплексу (активаційної платформи) апоптосому, до складу якої, окрім цитохрому *c*, входять Araf-1, прокаспаза-9 та АТР (dATP), роль яких зводиться до активації прокаспази-9 – ключової індукторної каспази мітохондріального шляху. В умовах нашого експерименту привертає увагу встановлений дещо коливальний характер змін активності каспази-9 (рис.9), пояснення якому дають посттрансляційні (фосфорилування, надмірне поліубіквітування) модифікації молекули білка. Водночас модельними дослідженнями з

використанням інтактних мітохондрій показано, що спричинене оксидативним стресом підвищення мітохондріального пулу H_2O_2 призводить до формування внутрішньо-молекулярних дисульфідних зв'язків в молекулі прокаспаз-9, активуючи її аутопроцесинг [England K, 2005].

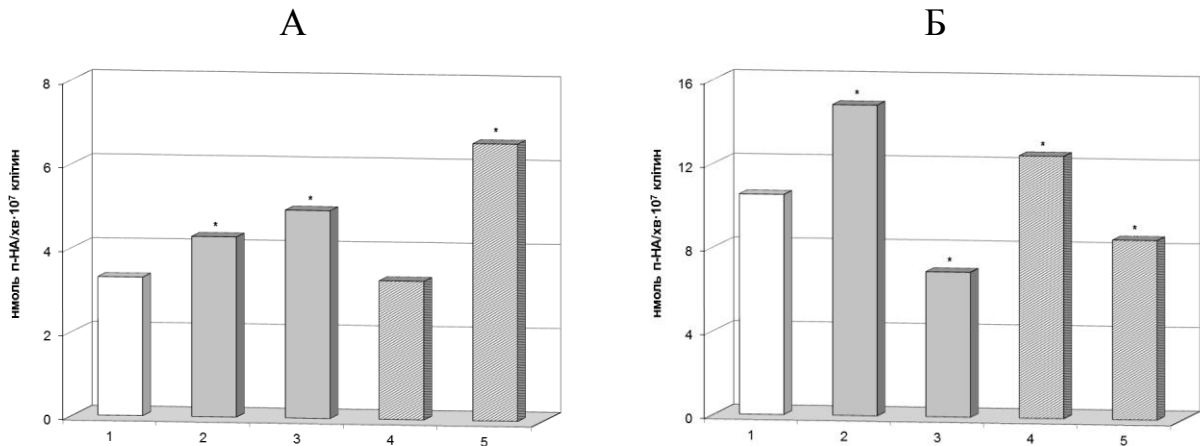


Рис. 9. Активність каспази-9 у лімфоцитах тимусу (А) та селезінки (Б) щурів за дії іонізуючої радіації: 1 – контроль; 2 – 1,0 Гр через 30 хв після опромінення; 3 – 1,0 Гр через 3 год після опромінення; 4 – 7,78 Гр через 30 хв після опромінення; 5 – 7,78 Гр через 3 год після опромінення; * – достовірно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

Для виявлення ролі АІФ як мітохондріального проапоптотичного ефектора, що спричиняє ядерно-опосередковані проапоптотичні процеси каспазо-незалежним чином (шлях Parthanatos), було досліджено рівень АІФ (рис.10) в імунокомпетентних клітинах лімфоїдних органів за дії іонізуючої радіації та встановлено його дозозалежне зниження в лімфоцитах тимусу та підвищення в лімфоцитах селезінки щурів.

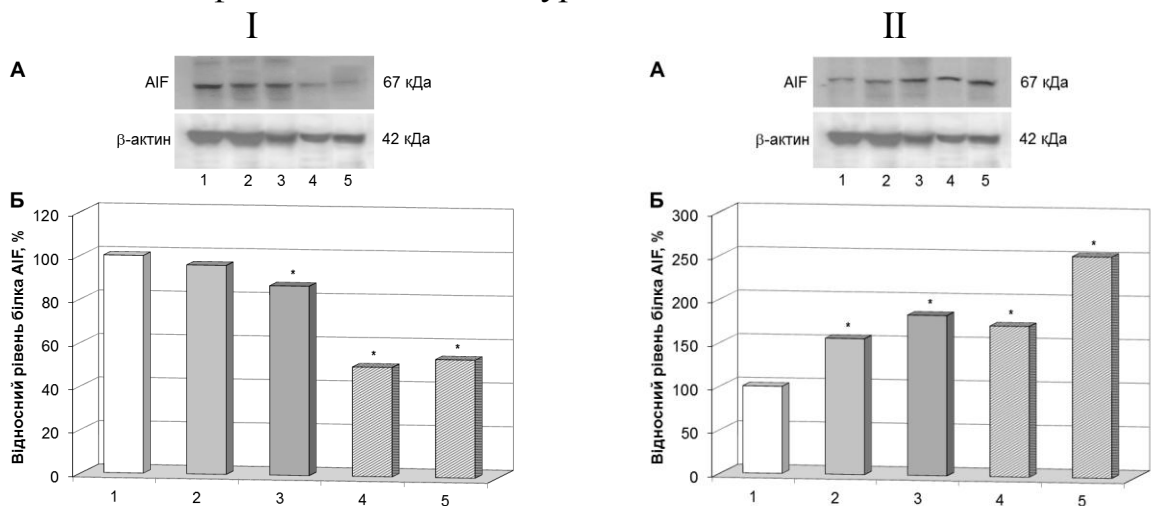


Рис. 10. Відносний рівень АІФ у лімфоцитах тимусу (І) та селезінки (ІІ) щурів за дії іонізуючої радіації: А – блотограма; Б – гістограма імуноблот-аналізу; 1 – контроль; 2 – 1,0 Гр (30 хв після опромінення); 3 – 1,0 Гр (3 год після опромінення); 4 – 7,78 Гр (30 хв після опромінення); 5 – 7,78 Гр (3 год після опромінення); * – достовірно відносно контролю; $p < 0,05$

Одержані результати можна трактувати з урахуванням калпаїн-залежного процесингу активної форми АІФ, функціонування якої у ядрі контролюється за рахунок ПАРП. Отже, АІФ-опосередкований генотоксичний вплив іонізуючого випромінювання призводить до виснаження репараційного потенціалу клітини, конвергуючи мітохондріальний та ядерний шляхи апоптозу.

Залучення каспазо-незалежних протеолітичних каскадів у радіаційно-індукований апоптоз. За впливу променевого чинника спостерігається активація лізосомальних катепсинів, Ca^{2+} -залежних цистеїнових протеїназ калпаїнів та дисрегуляція протеасомо-опосередкованого шляху деградації білків.

Нами відмічено дозозалежне підвищення активності катепсину В у лімфоцитах тимусу та селезінки щурів (рис.11) можливо за рахунок пермебілізації лізосомальної мембрани (ПЛМ), що дає підґрунтя існуванню виокремленої лізосомально-опосередкованої ланки апоптозу. Отримані результати можливо трактувати з огляду на висунуту в 2016 р. Ogawa Y. гіпотезу про "ефект пероксиду водню" (" H_2O_2 effect"). На думку автора в умовах радіаційного стресу накопичення в цитоплазмі клітини значних концентрацій H_2O_2 за умови виснаження пулу пероксидаз сприяє проникненню перекису водню до лізосом, де у реакції Фентона з редокс-чутливим залізом (Fe^{2+}) утворюється гіперактивний гідроксил-радикал ($\text{OH}\cdot$), який активує процеси модифікації ліпідів та білків лізосом і є основною причиною ПЛМ. Редислокація $\text{OH}\cdot$ з лізосом до цитоплазми є активатором другої хвилі вільно-радикальних процесів в опромінених клітинах. Ця гіпотеза стала частиною

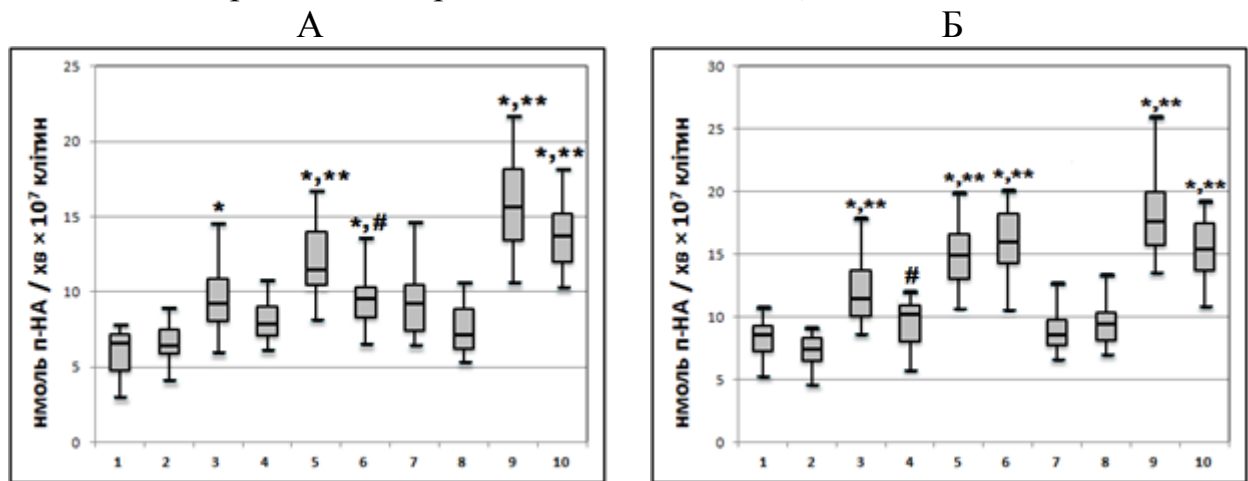


Рис. 11. Активність катепсину В у лімфоцитах тимусу (А) та селезінки (Б) щурів за дії іонізуючої радіації та на фоні введення інозину ($M \pm SD$, $n = 5$): 1 – контроль; 2 – контроль+ інозин; 3 – через 30 хв після опромінення у дозі 1,0 Гр; 4 – через 30 хв після опромінення у дозі 1,0 Гр +інозин; 5 – 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

загальної теорії, яка стверджує, що саме оксидативний стрес є основним медіатором апоптозу.

Оцінка активності нейтральних Ca^{2+} -залежних протеїназ калпаїнів показала її різнонаправлений характер (рис.12) у лімфоцитах тимусу і селезінки щурів за радіаційного впливу, що можна пояснити за рахунок стрес-опосередкованих змін Ca^{2+} -залежного сигналювання, підвищеною редокс-чутливістю ферментів, що призводить як до активації калпаїнів, так і до опосередкованого ними генерування АКМ.

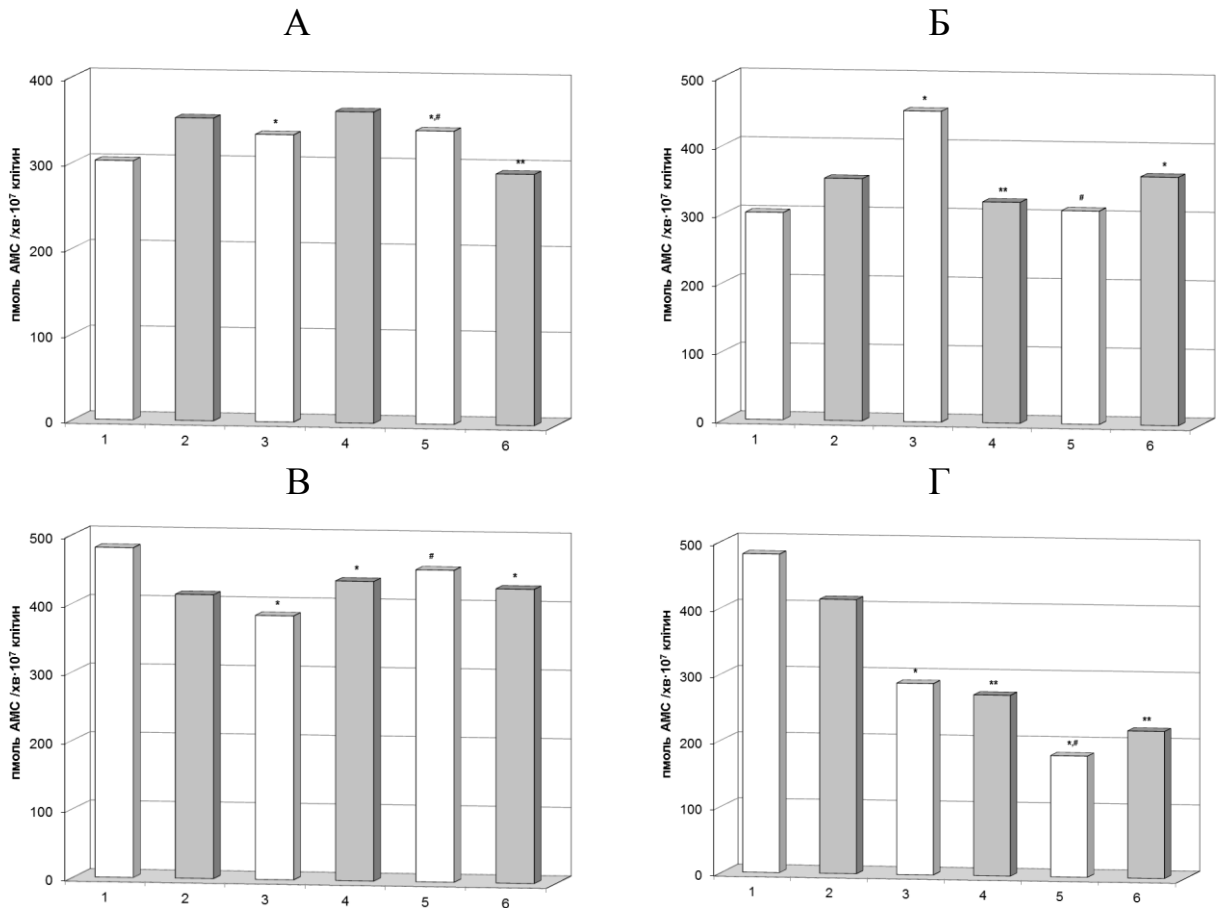


Рис. 12. Активність калпаїнів у лімфоцитах тимусу (А, Б) та селезінки (В,Г) щурів через 30 хв (А,В) та 3 год (Б,Г) після дії іонізуючої радіації та на фоні введення інозину: 1 – контроль; 2 – контроль + інозин; 3 – опромінення в дозі 1,0 Гр; 4 - опромінення в дозі 1,0 Гр+ інозин; 5 – опромінення в дозі 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; $p < 0,05$

Модифікуючий вплив інозину на функціонування катепсину В і 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.

За дії іонізуючої радіації показано дозозалежне зниження протеасомної активності в лімфоцитах тимусу і селезінки щурів за обох часових інтервалів (рис.13), що може бути причиною дисрегуляції чисельних шляхів реалізації

радіаційно-індукованого апоптозу. Інтерпретація отриманих результатів можлива з урахуванням регуляторних механізмів функціонування протеасом, а саме їх деградації шляхом лізосомального та каспазо-3-залежного протеолізу [Livneh I., 2016]. Підвищення рівня АКМ призводить до зниження активності протеасоми. Вплив інозину на систему протеасоми можливо пояснити за рахунок відновлення певного сталого рівня АТФ - регулятора активності протеасоми.

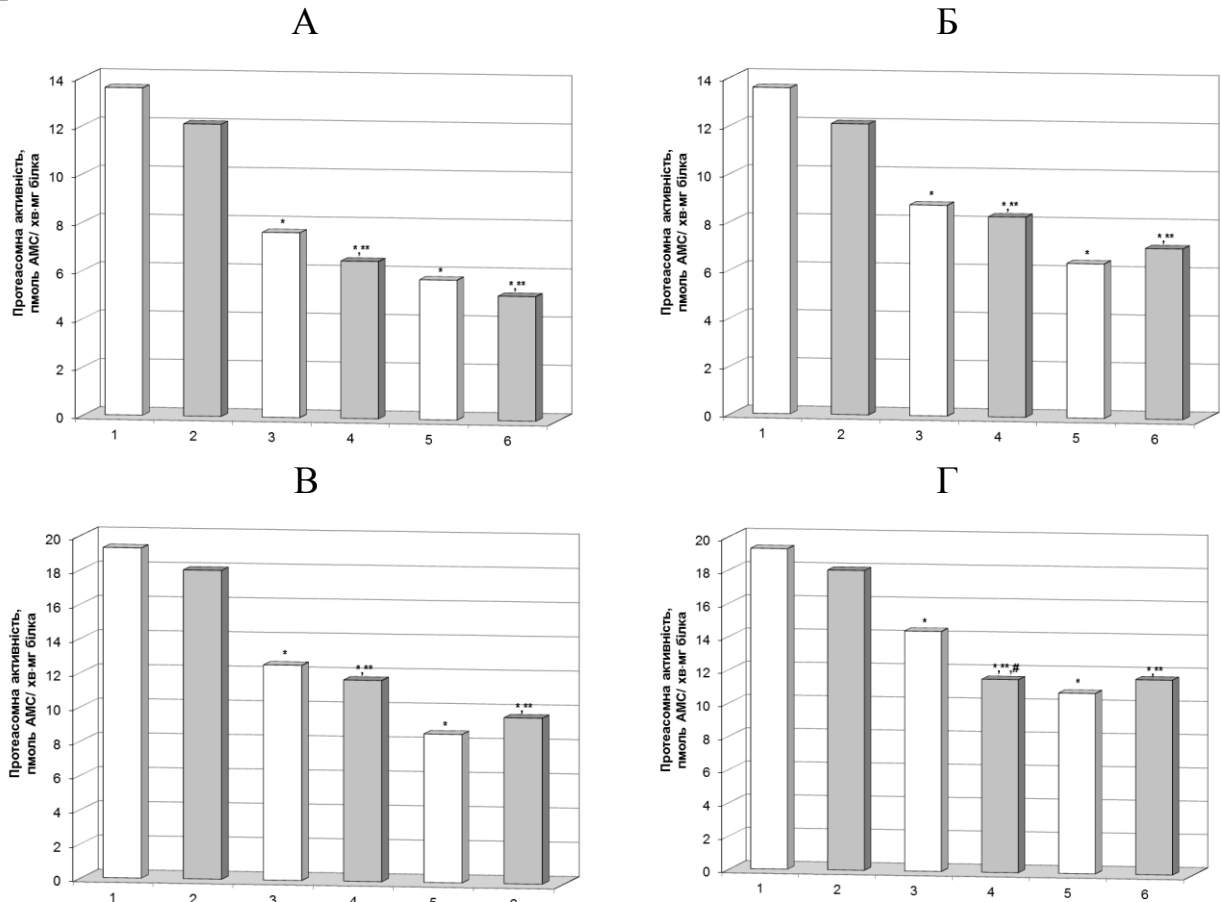


Рис. 13. Протеасомна активність у лімфоцитах тимусу (А, Б) та селезінки (В,Г) щурів через 30 хв (А,В) та 3 год (Б,Г) за дії іонізуючої радіації та на фоні введення інозину: 1 – контроль; 2 – контроль + інозин; 3 – опромінення в дозі 1,0 Гр; 4 - опромінення в дозі 1,0 Гр+ інозин; 5 – опромінення в дозі 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; $p < 0,05$

Оксидативний стрес як маркер ініціації та реалізації апоптозу за дії радіаційного чинника. Згідно з даними, представленими в табл. 2, відмічається значна інтенсифікація ПОЛ за рівнем ТБК-активних продуктів на фоні дисбалансу у функціонуванні системи антиоксидантного захисту (активність СОД і каталази) за обох доз випромінювання та часових інтервалів.

Відомо, що значний внесок у функціонування прооксидантної ланки окиснювального гомеостазу робить ферментна система ксантин-оксидази/ксантиндегідрогенази, функціонування якої спричиняє накопичення супероксидних аніон-радикалів за рахунок активації оксидазної форми ферменту.

Таблиця 2

Вміст ТБК-активних продуктів та активність ферментів антиоксидантного захисту за дії іонізуючої радіації та на фоні введення інозину ($M \pm m$, $n=5$)

Групи тварин		Лімфоцити тимусу			Лімфоцити селезінки		
		ТБК-активні продукти, нмоль/10 ⁷ кл	Активність СОД, ум. од.	Активність каталази, мкмоль Н ₂ О ₂ / хв·10 ⁷ кл	ТБК-активні продукти, нмоль/10 ⁷ кл	Активність СОД, ум. од.	Активність каталази, мкмоль Н ₂ О ₂ / хв·10 ⁷ кл
Контроль		0,62 ± 0,05	1,487 ± 0,07	2,89 ± 0,09	1,16 ± 0,09	1,602 ± 0,13	4,19 ± 0,11
контроль + інозин		0,93 ± 0,08*	1,625 ± 0,05*	1,87 ± 0,05*	1,2 ± 0,06*	1,589 ± 0,17	3,9 ± 0,09*
30 хв П/О	1,0 Гр	0,83 ± 0,09 ^{*,**}	1,949 ± 0,16*	0,61 ± 0,02 ^{*,**}	1,28 ± 0,13*	1,476 ± 0,16 ^{*,**}	6,42 ± 0,25 ^{*,**}
	1,0 Гр + інозин	0,46 ± 0,05 ^{*,**, #}	0,974 ± 0,11 ^{*, **, #}	2,15 ± 0,07 ^{*, **, #}	1,17 ± 0,12 ^{**, #}	1,366 ± 0,11 ^{*, **, #}	5,17 ± 0,18 ^{*, **, #}
	7,78 Гр	0,76 ± 0,04 ^{*,**}	1,113 ± 0,07*	1,23 ± 0,05 ^{*,**}	1,18 ± 0,14 ^{**}	1,845 ± 0,19 ^{*,**}	3,07 ± 0,15 ^{*,**}
	7,78 Гр + інозин	0,77 ± 0,02 ^{*,**}	1,520 ± 0,14 ^{**, #}	2,72 ± 0,07 ^{*, **, #}	1,26 ± 0,11 ^{*, **, #}	1,476 ± 0,14 ^{*, **, #}	5,58 ± 0,17 ^{*, **, #}
3 ГОД П/О	1,0 Гр	0,75 ± 0,05 ^{*,**}	1,622 ± 0,05*	1,47 ± 0,06 ^{*,**}	1,37 ± 0,17 ^{*,**}	1,505 ± 0,17 ^{*,**}	3,9 ± 0,15*
	1,0 Гр + інозин	0,53 ± 0,03 ^{*, **, #}	1,570 ± 0,08 ^{*, **, #}	1,81 ± 0,04 ^{*, #}	1,29 ± 0,12 ^{*, **, #}	1,575 ± 0,14*	4,33 ± 0,22 ^{*, **, #}
	7,78 Гр	1,0 ± 0,03 ^{*, **, #}	1,694 ± 0,11 ^{*, **, #}	3,86 ± 0,09 ^{*, **, #}	1,1 ± 0,08 ^{*, **, #}	1,372 ± 0,11 ^{*, **, #}	2,37 ± 0,14 ^{*, **, #}
	7,78 Гр + інозин	0,64 ± 0,04 ^{*, #}	1,636 ± 0,07*	2,24 ± 0,07 ^{*, **, #}	1,0 ± 0,13 ^{**, #}	1,537 ± 0,12 ^{*, **, #}	3,35 ± 0,12 ^{*, **, #}

* – достовірно відносно контролю;

** – достовірно відносно контролю на фоні введення рибоксину;

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

Нами встановлено, що як у лімфоцитах тимусу, так і селезінки щурів підвищується сумарна ксантиноксидазна/ксантиндегідрогеназна активність за обох доз опромінення. Радіаційно-опосередкована конверсія форм ферменту призводить до переважання активності ксантиноксидази, достовірне підвищення якої спостерігається у лімфоцитах тимусу щурів у 2,3 рази і майже втричі за опромінення в дозі 1,0 Гр і 7,78 Гр та в 1,2 рази у лімфоцитах селезінки за опромінення низькою дозою. Відмічено нормалізуючий вплив інозину на ксантиноксидазну активність за обох досліджуваних доз.

Виявлений різнонаправлений характер змін швидкості генерування супероксидних аніон-радикалів в умовах нашого експерименту свідчить про складні взаємозв'язки між прооксидантними ефектами та антиоксидантним потенціалом клітини за радіаційно-індукованого апоптозу (рис.14).

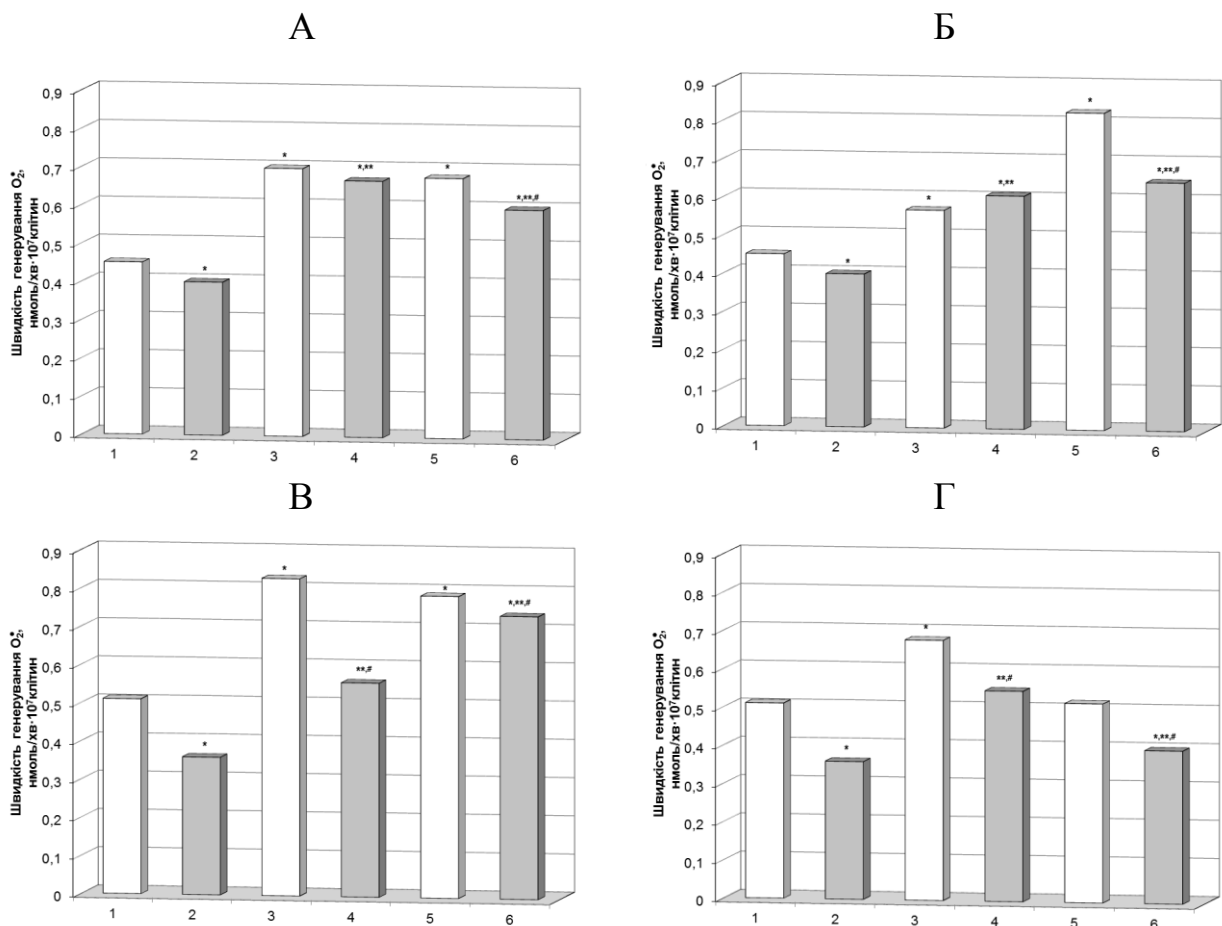


Рис.14. Швидкість генерування супероксидних аніон-радикалів у лімфоцитах тимусу (А,Б) та селезінки (В,Г) щурів через 30 хв (А,В) та 3 год (Б,Г) за дії іонізуючої радіації та на фоні введення інозину: 1 – контроль; 2 – контроль + інозин; 3 – опромінення в дозі 1,0 Гр; 4 - опромінення в дозі 1,0 Гр+ інозин; 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; $p < 0,05$

Раннім критерієм активізації вільнорадикальних процесів слугує окисна модифікація білків (ОМБ). Через 30 хв після дії променевого чинника нами

встановлено дозозалежне підвищення ступеня окисної модифікації білків в обох популяціях лімфоцитів, більш виражене (в 1,7 раза за опромінення в дозі 7,78 Гр) для лімфоцитів селезінки. Одержані дані корелюють з виявленими нами ранніми змінами рівня АКМ в популяціях лімфоцитів тимусу і селезінки щурів за дії променевого чинника. Через три години після опромінення в дозах 1,0 Гр та 7,78 Гр суттєве зростання рівня ОМБ відмічається у лімфоцитах селезінки щурів. Вірогідним наслідком виявлених закономірностей може бути підвищення чутливості білкових молекул до ескалації внутрішньоклітинного протеолізу.

Таким чином, вищенаведені дані свідчать про інтенсифікацію вільно-радикальних процесів за радіаційно-індукованого апоптозу. Введення інозину до опромінення щурів знижує прояви системного оксидативного стресу за рахунок антиоксидантних властивостей, що виявляються за безпосередньої дії продукту розпаду інозину – сечової кислоти, та модуляції функції основних антиоксидантних ферментів.

Активність ефекторних каспаз за радіаційно-індукованого апоптозу.

Конвергенція апоптотичних сигналів, які опосередковують різноманітні ланки програмованої клітинної загибелі, відбувається на рівні активації ефекторної ланки каспазного каскаду. Саме активація виконавчих каспаз-3,-6,-7 за участі ініціаторних каспаз та інших протеїназ є характерним проявом радіаційно-індукованого апоптозу.

Згідно з даними, представленими на рис.15,16, за дії променевого чинника зміни активності каспази-3 і каспази-6 у лімфоцитах тимусу і селезінки щурів є різнонаправленими. На нашу думку, радіаційно-індуковані порушення функціонування регуляторних каскадів, виконавча функція в яких надана каспазам-3,-6, дає підґрунтя для виявлення високої специфічності клітинної відповіді лімфоцитів тимусу та селезінки щурів за дії іонізуючого опромінення.

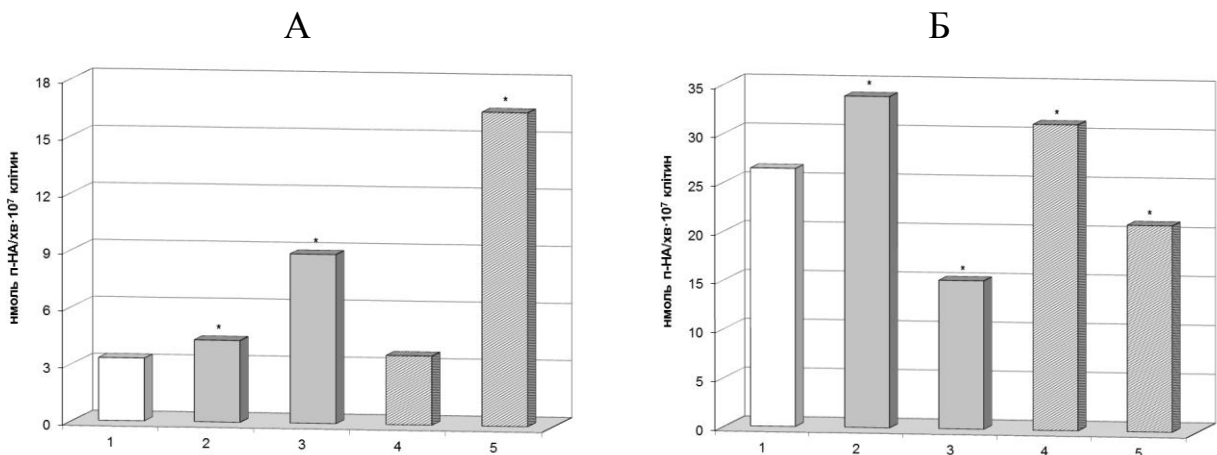


Рис. 15. Активність каспази-3 у лімфоцитах тимусу (А) та селезінки (Б) щурів за дії іонізуючої радіації: 1 – контроль; 2 – 1,0 Гр через 30 хв після опромінення; 3 – 1,0 Гр через 3 год після опромінення; 4 – 7,78 Гр через 30 хв після опромінення; 5 – 7,78 Гр через 3 год після опромінення; * – достовірно відносно контролю; $p < 0,05$

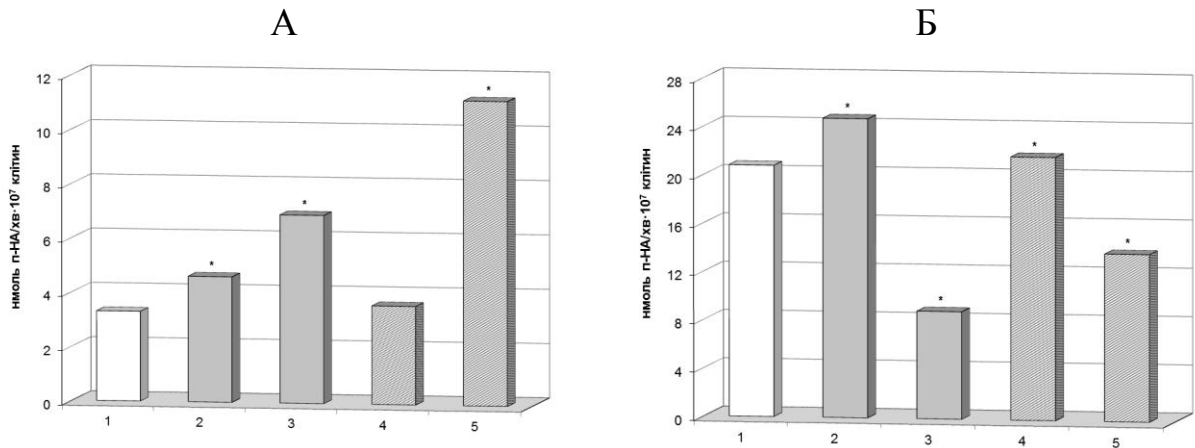


Рис. 16. Активність каспази-6 у лімфоцитах тимусу (А) та селезінки (Б) щурів за дії іонізуючої радіації: 1 – контроль; 2 – 1,0 Гр через 30 хв після опромінення; 3 – 1,0 Гр через 3 год після опромінення; 4 – 7,78 Гр через 30 хв після опромінення; 5 – 7,78 Гр через 3 год після опромінення; * – достовірно відносно контролю; $p < 0,05$

Оцінка рівня АТФ та функціонування системи обміну пуринів за радіаційно-індукованого апоптозу. З урахуванням означення радіаційно-індукованого апоптозу як енергоємного процесу нами було досліджено вміст АТФ у лімфоцитах тимусу та селезінки щурів за дії іонізуючої радіації (рис.17) та встановлено його зниження порівняно з контрольними величинами. Наведені дані корелюють з представленими результатами щодо впливу променевого фактора на АТФ-залежні апоптотичні процеси, насамперед безпосередню активацію апоптосоми та протеасомної системи.

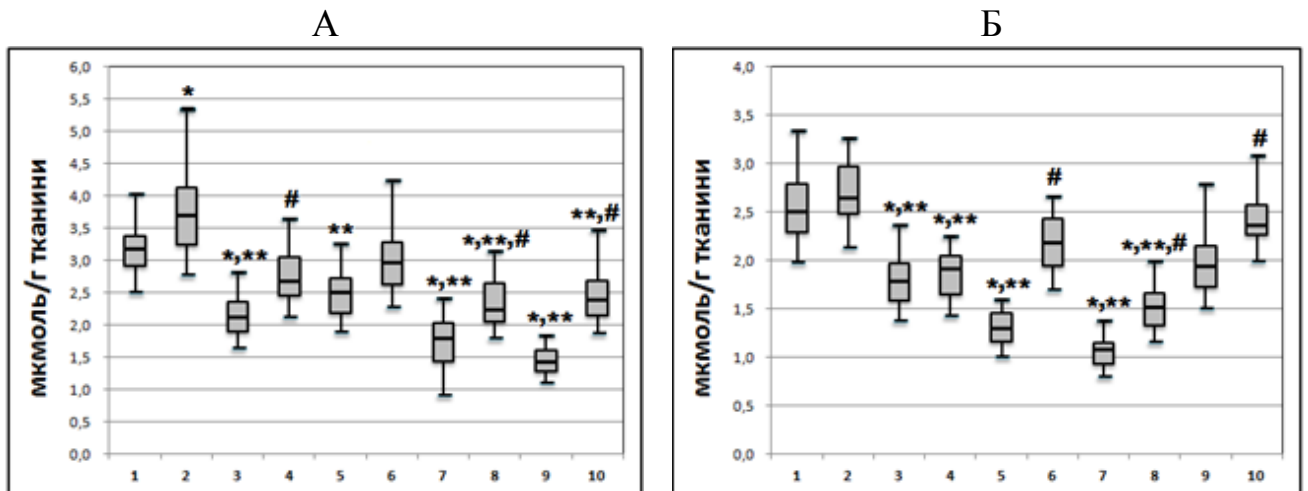


Рис. 17. Вміст АТФ у лімфоцитах тимусу (А) та селезінки (Б) щурів за дії іонізуючої радіації та на фоні введення інозину ($M \pm SD$, $n = 5$): 1 – контроль; 2 – контроль + інозин; 3 – через 30 хв після опромінення у дозі 1,0 Гр; 4 – через 30 хв після опромінення у дозі 1,0 Гр + інозин; 5 – через 3 год 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

Нами також були виявлено зміни активності ключових ферментів обміну пуринів за дії іонізуючої радіації в дозах 1,0 та 7,78 Гр: зростання ферментативної активності аденілаткінази, АМФ-дезамінази, аденозиндезамінази, пурипнуклеозидфосфорилази 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 фактора у досліджуваних дозах, стимуляція пурипнуклеозидфосфорилазної активності для 1,0 Гр та її інгібування після опромінення тварин в дозі 7,78 Гр. На підставі отриманих даних можна зробити висновок, що за променевого ураження в 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.

Визначення стадій перебігу радіаційно-індукованого апоптозу. Конвергенцію вивчених шляхів реалізації досліджуваної танатогенної програми можна візуалізувати із застосуванням методу протокової цитометрії з використанням анексину V, кон'югованого з флуорохромом FITC, та суправітального барвника пропідій йодиду. Виявлено стадії перебігу 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. Було ідентифіковано (рис. 18 і 19) клітини від раннього етапу апоптотичної загибелі (анексин V-позитивні/пропідій йодид-негативні) до кінцевої стадії (анексин V-позитивні/пропідій йодид-позитивні) – дані представлено в квадрантах.

Загальний рівень апоптотичних клітин зазначено цифрами під гістограмами. 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. Водночас відкриття шляху надходження інозину з залученням пуринергічних A2a рецепторів та подальша активація MAP-кіназних каскадів– регуляторів стану клітинного метаболізму сприяло обґрунтуванню молекулярних механізмів цитопротекторних і антизапальних функцій інозину [Szabó C., Haskó G., 2007; Kwanghee K., 2010].

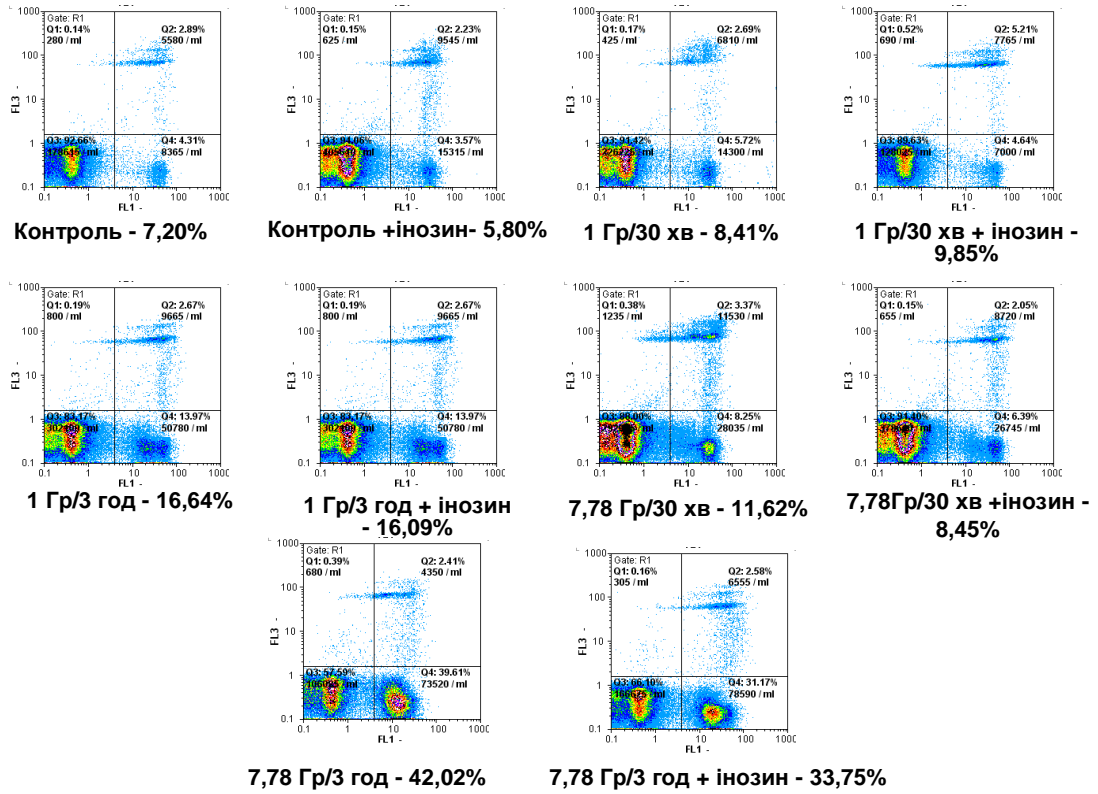


Рис.18. Протоковцитометричний аналіз виявлення апоптотичних лімфоцитів тимусу щурів за дії іонізуючої радіації в дозі 1,0 та 7,78 Гр та на фоні введення інозину

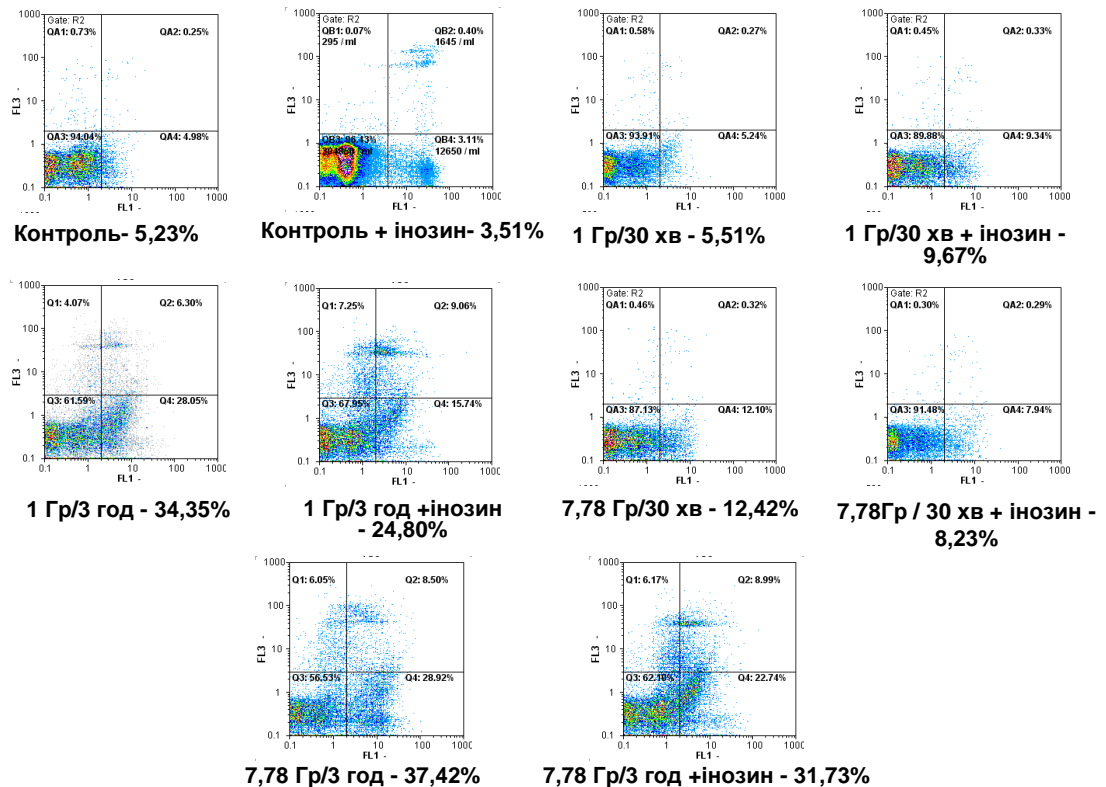


Рис.19. Протоковцитометричний аналіз виявлення апоптотичних лімфоцитів селезінки щурів за дії іонізуючої радіації в дозі 1,0 та 7,78 Гр та на фоні введення інозину

Для оцінки наявності та сили взаємозв'язку між дослідженими біохімічними показниками (змінними) було проведено кореляційний аналіз, за результатами якого побудовано узагальнюючу схему (рис. 20). 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.

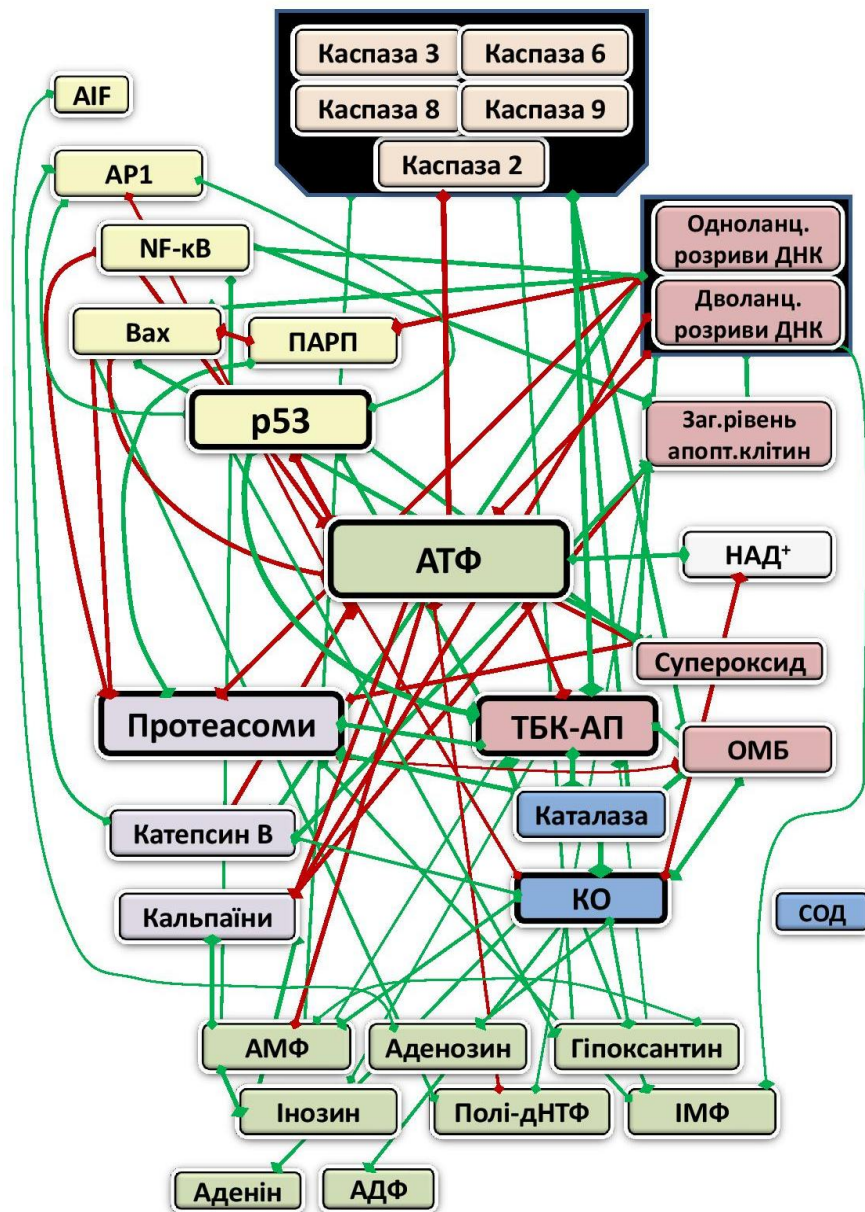


Рис. 20. Карта кореляційних взаємозв'язків досліджених показників лімфоцитів тимусу та селезінки за умов радіаційно-індукованого апоптозу (зеленим позначено позитивну кореляцію, червоним – негативну)

Таким чином, проведені комплексні дослідження біохімічних шляхів реалізації радіаційно-індукованого апоптозу свідчать про існування складних взаємозв'язків вивчених ланок апоптотичної загибелі імункомпетентних 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 НАУКОВИХ ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Монографія:

1. Радіаційно-індукована структурно-метаболична модифікація ентероцитів та лімфоїдних клітин / [Кучеренко М.Є. та ін.]: під загальною редакцією Кучеренка М.Є. – Київ: Фітосоціоцентр, 2006. – 201 с.

Статті у наукових фахових виданнях України:

1. Андрійчук Т.Р. Етапи деградації хроматину тимоцитів щурів, загиблих шляхом апоптозу / Ю. П. Пархомець, Т.Р. Андрійчук, В. А. Харсун, Б. О. Цудзевич // Вісник Київського університету. – 1998. – № 27. – С. 9-11. *(Особистий внесок – здобувачу належить ідея, покладена в основу статті, опрацювання робочої схеми та проведення частини експериментальних досліджень, написання статті).*

2. Андрійчук Т.Р. Вплив низьких доз іонізуючої радіації на стан про- та антиоксидантних систем тимоцитів щурів / Т.Р. Андрійчук, Б.О. Цудзевич, М.Є. Кучеренко, Ю.М. Білокін, Н.Г. Кудіна // Доповіді НАН України. – 2002. – № 5. – С. 179-182. *(Особистий внесок – здобувач є співавтором ідеї роботи, покладеної в основу статті, розробка методики та проведення частини експериментальних досліджень, аналіз результатів та написання статті).*

3. Андрійчук Т.Р. Вплив іонізуючої радіації та інгібіторів енергетики мітохондрій на міжнуклеосомну фрагментацію ДНК у тимоцитах щурів / Б.О. Цудзевич, Т.Р. Андрійчук, Н. Г. Кудіна // Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Серія: Біологія. – 2002. – Вип. 37. – С. 91-93. *(Особистий внесок - здобувач є співавтором ідеї роботи, проведення*

частини експериментальних досліджень, аналіз результатів та написання статті).

4. Андрійчук Т.Р. Вплив рентгенівського опромінення на метаболізм пуринів у лімфоцитах щурів / Т.Р. Андрійчук, Н. Г. Кудіна, Б. О. Цудзевич // Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Серія: Біологія. – 2003. – Вип. 39. – С. 19-20. *(Особистий внесок - здобувачу належить опрацювання робочої схеми експерименту, участь у виконанні експериментальних досліджень, інтерпретація результатів та написання статті).*

5. Андрійчук Т.Р. Радіаційно -індуковані порушення ДНК у тимоцитах щурів / Т.Р. Андрійчук, Л. П. Драган, Н. Г. Ракша // Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Серія: Біологія. – 2004. – Вип. 43. – С. 55-56. *(Особистий внесок - здобувачу належить ідея, покладена в основу статті, опрацювання робочої схеми експерименту, виконання частини експериментальних досліджень, аналіз результатів та написання статті).*

6. Andriychuk T. Oxidant-dependent proteolysis in radiation–induced lymphoid cell death / Tetyana Andriychuk, Ludmyla Dragan, Nataliy Raksha // Annales Universitatis Mariae Curie-Sklodowska, Lublin-Polonia. – 2004. – Vol. XVII, №2 (Sectio DDD: Pharmacia). – P. 353-355. *(Особистий внесок - здобувачу належить ідея роботи, участь у плануванні досліджень, виконання частини експериментальних досліджень, інтерпретація результатів та написання статті).*

7. Андрійчук Т.Р. Активність полі(АДФ-рибозо)-полімерази і рівень одно- та дволанцюгових розривів ДНК в спленоцитах щурів за дії рентгенівського опромінення / Т.Р. Андрійчук., Л.П. Драган, В.В. Полякова, Н.Г. Ракша, Б.О. Цудзевич // Вісник проблем біології і медицини. –2007. – Вип.3. – С. 28-31. *(Особистий внесок - здобувачу належить ідея роботи, участь у плануванні досліджень, розробка методики та проведення частини експериментальних досліджень, інтерпретація результатів та написання статті).*

8. Андрійчук Т.Р Вплив рибоксину на виживання та метаболічну активність лімфоцитів тимуса за променевого ураження / Т.Р. Андрійчук, Н.Г. Ракша, С.Л. Лугова, Л.П. Драган, Б.О. Цудзевич // Медична хімія. – 2008. – № 2. – С. 41-45. *(Особистий внесок - здобувачу належить ідея роботи, розробка методики та проведення частини експериментальних досліджень, інтерпретація результатів та написання статті).*

9. Andriychuk T. Influence of riboxine on radiation–induced proteolysis in rat splenocytes / Viktoria Polyakova, Lyudmila Dragan, Nataliy Raksha, Tetyana Andriychuk // Annales Universitatis Mariae Curie–Sklodowska, Lublin–Polonia. – 2008. – Vol. XXI, № 1, 47(Sectio DDD). – P. 261-263. *(Особистий внесок - здобувачу належить ідея, покладена в основу статті, опрацювання робочої схеми експерименту, виконання частини експериментальних досліджень, аналіз результатів та написання статті).*

10. Андрійчук Т.Р. Вплив іонізуючої радіації та рибоксину на стан системи полі–АДФ–рибозилування лімфоцитів селезінки щурів / Л.П. Драган,

Н.Г. Ракша, Т.Р. Андрійчук // Медична хімія. – 2009. – Т.11, № 3. – С. 124-126. *(Особистий внесок - здобувачу належить ідея роботи, участь у плануванні досліджень, проведення частини експериментальних досліджень, аналіз отриманих результатів та написання статті).*

11. Андрійчук Т. Залучення ферментів родини каспаз у радіаційно–індукований апоптоз лімфоцитів щурів / Т. Андрійчук, Н. Ракша, Л. Драган, С. Лугова // Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Серія: Проблеми регуляції фізіологічних функцій. – 2010. – Вип. 13. – С. 48-52. *(Особистий внесок - здобувачу належить ідея роботи, планування досліджень, розробка методики та проведення частини експериментальних досліджень, інтерпретація результатів та написання статті).*

12. Андрійчук Т. Р. Редокс-чутливі ланки радіаційно–індукованого апоптозу / Т. Р. Андрійчук // Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Серія: Біологія. – 2014. – Вип. 2. – С. 58-62.

*Статті у наукових виданнях, які входять
до міжнародної наукометричної бази SCOPUS:*

1. Андрійчук Т.Р. Определение повреждений ДНК в непролиферирующих клетках животных / Н.П. Дмитренко, Т.Р. Андрійчук, Т.О. Кишко, В.В. Юркина, Б.А. Цудзевич // Укр. біохім. журнал. – 1997. – Т.69, № 1. – С. 69-71. *(Особистий внесок – участь у плануванні досліджень, опрацювання робочої схеми експерименту, участь у виконанні експериментальних досліджень, інтерпретація результатів та написання статті).*

2. Андрійчук Т.Р. Вплив іонізуючої радіації на деградацію хроматину тимоцитів щурів / Б. О. Цудзевич, Ю. П. Пархомець, Т.Р.Андрійчук, В. В. Юркина // Укр. біохім.журнал. – 1998. – Т.70, № 4. – С. 105-110. *(Особистий внесок - здобувачу належить ідея роботи, розробка методики та проведення частини експериментальних досліджень, аналіз результатів та написання статті).*

3. Андрійчук Т.Р. Вплив препаратів "Аммівіт" та "Церулоплазмін" на вміст продуктів пероксидного окислення ліпідів та показники антиоксидантної системи за дії радіації / О.П. Гаділія, Т.Р. Андрійчук, С.П. Меркулов, Л.І. Остапченко, М.Є. Кучеренко // Укр. біохім.журнал. – 2002. – Т.74, №1. – С.97-100. *(Особистий внесок - здобувач є співавтором ідеї роботи, проведення частини експериментальних досліджень, аналіз результатів та написання статті).*

4. Андрійчук Т.Р. Активність ферментів пуринового обміну в тимоцитах щурів за променевого ураження та введення їм рибоксину / Н. Г. Кудіна, Б. О. Цудзевич // Укр. біохім. журнал. – 2003. – Т.75, № 2. – С. 109-112. *(Особистий внесок - здобувачу належить ідея роботи, розробка методики та проведення частини експериментальних досліджень, інтерпретація результатів та написання статті).*

5. Андрійчук Т.Р. Участь ксантинооксидазної системи в розвитку оксидативного стресу за дії променевого чинника / Н. Г. Ракша, Т.Р.Андрійчук, М. Є. Кучеренко // Біополімери і клітина. – 2006. – Т.22, № 2. – С. 132-135. *(Особистий*

внесок - здобувачу належить ідея роботи, розробка методики та проведення частини експериментальних досліджень, аналіз результатів та написання статті).

6. Андрійчук Т.Р. Участь протеолітичних ферментів у радіаційно-індукованому апоптозі лімфоцитів тимуса щурів / Т.Р. Андрійчук, Н.Г. Ракша, Б.О. Цудзевич, Л.І. Остапченко // Укр. біохім.журнал. – 2009. – № 3. – С. 102-107. *(Особистий внесок - здобувачу належить ідея роботи, розробка методики та проведення частини експериментальних досліджень, інтерпретація результатів та написання статті).*

7. Андрійчук Т.Р. Вплив рибоксину на процеси пероксидного окислення ліпідів та активність антиоксидантних ензимів в тимocyтах щурів в умовах променевого ураження / В.В. Полякова, Н.Г. Ракша, Л.П. Драган, Т.Р. Андрійчук // Укр. біохім. журнал. – 2010. – Т.82, № 4. – С. 48-52. *(Особистий внесок - здобувачу належить ідея, покладена в основу статті, опрацювання робочої схеми експерименту, виконання частини експериментальних досліджень, аналіз результатів та написання статті).*

8. Andriichuk T. Structural biochemical assessment of the status of the nuclear apparatus of the rat spleen lymphoid cells under radiation treatment / Lyudmila Dragan, Tetyana Andriychuk, Lyudmila Ostapchenko // Annales Universitatis Mariae Curie-Sklodovska, Lublin-Polonia. – 2010. – Vol. XXIII, № 2, 30 (Sectio DDD). – P.199-202. *(Особистий внесок – здобувач є співавтором ідеї роботи та проведення частини експериментальних досліджень, інтерпретація результатів та написання статті).*

Статті у неперіодичних збірниках наукових праць (ISBN):

1. Андрійчук Т.Р. Радиационно-индуцированные изменения состояния системы АДФ-рибозилирования лимфоцитов тимуса крыс и их модификация рибоксином / Драган Л.П., Ракша Н.Г., Андрійчук Т.Р. // Материалы научной конференции с международным участием, посвященной 120-летию кафедры нормальной физиологии СибГМУ (ТМИ) и кафедры физиологии ТГУ «Нейрогуморальные механизмы регуляции висцеральных органов и систем в норме и при патологии» 22-23 октября 2009 г. – Томск, Россия, 2009. – С.118-120. Томск: СибГМУ, 2009. – 228 с.

2. Андрійчук Т.Р. Влияние ионизирующей радиации на индукцию и реализацию запрограммированной клеточной гибели / Андрійчук Т.Р., Ракша Н.Г., Луговая С.Л., Мандрюк С.Я., Остапченко Л.И. // Сборник статей по материалам Международной конференции "Биологические эффекты малых доз ионизирующей радиации и радиоактивное загрязнение среды" 17-21 марта, 2014г.- Сыктывкар, Россия, 2014. - С.11-14.

Основні тези наукових доповідей:

1. Андрийчук Т.Р. Радиационно-индуцированный апоптоз клеток иммунокомпетентных органов / Цудзевич Б.А., Пархомец Ю.П., Андрийчук 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.
2. Андрийчук Т.Р. Деградація ДНК імунокомпетентних клітин за променевого ураження / Цудзевич Б.О., Пархомец Ю.П., Андрийчук Т.Р., Юркина В.В. // VII Укр. біохімічний з'їзд: 1997 р.: тези доп., ч.3. – К., 1997. – С.134-135.
3. Андрийчук Т.Р. Закономірності деградації структури ДНК за променевого ураження / Пархомец Ю.П., Андрийчук Т.Р., Юркина В.В., Цудзевич Б.О. // II з'їзд Укр. біофізичного товариства, 29 черв. – 3 лип. 1998 р.: тези доп. – Х., 1998. – С.231.
4. Андрийчук Т.Р. Участие системы ксантинооксидаза/ ксантиндегидрогеназа в радиационно–индуцированном апоптозе клеток иммунокомпетентных органов / Т.Р. Андрийчук, Н. Г. Кудина, Б. А. Цудзевич // IV съезд по радиационным исследованиям, 20-24 нояб. 2001 г.: тез. докл.– Т.1. – М., 2001. – С. 343.
5. Андрийчук Т.Р. Активність ферментів обміну пуринів за рентгенівського опромінення та на фоні інозину / Н. Г. Кудина, Андрийчук 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.
6. Андрийчук Т.Р. Рівень деградації хроматину тимоцитів щурів за умов ініціації апоптозу / Т.Р. Андрийчук, Н. Г. Кудина, Б. А. Цудзевич, В. В. Полякова // III з'їзд Укр. біофізичного товариства, 2002 р.: збірник тез. – Л., 2002. – С.13.
7. Андрийчук Т.Р. Влияние ионизирующей радиации и инозина на состояние ферментных систем обмена пуринов / Цудзевич Б.А., Кудина Н.Г., Сорокина Л.П., Андрийчук Т.Р. // III Международный симпозиум «Механизмы действия сверхмалых доз», 3-6 декаб. 2002 г.: тез. докл. – М., 2002. – С.144.
8. 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 B.A. // III з'їзд з радіаційних досліджень (радіобіологія і радіоекологія), 21-25 трав. 2003 р.: тези доп. – К., 2003. – С.18.
9. 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.
10. Андрийчук Т.Р. Участь цистеїнових протеїназ в апоптозі спленоцитів за променевого ураження / Андрийчук Т.Р., Л. П. Драган, Н. Г. Ракша, Б.О.Цудзевич // Міжнародна конференція "Радіобіологічні ефекти: ризики, мінімізація, прогноз", 22-24 берез. 2005 р.: матер. конф., К., 2005. – С.14.
11. 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.-X.: матер. – Укр. біохім. журн. – 2006. – Т. 1. – С. 95.
12. 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.
13. 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. – K., 2006. – P. 65.
14. Андрийчук Т.Р. Модифікуючий вплив препарату рибоксину на функціонування лімфоїдних клітин за опромінення / Андрийчук Т.Р., Ракша Н.Г., Драган Л.П., Цудзевич Б.О. // Міжнародна науково-практична конференція "Віддалені наслідки впливу іонізуючого випромінювання", 23-25 трав. 2007 р.: тези доп. - К., 2007 - С. 5-6.
15. 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.
16. Андрийчук Т.Р. Радиационно-индуцированные изменения активности катепсина В в спленоцитах / Полякова В.В., Драган Л.П., Ракша Н.Г., Андрийчук Т.Р. // Материалы Российской научной конференции "Медико-биологические проблемы токсикологии и радиологии", Санкт-Петербург, 2008 г.: матер. – Вестник Росс. Военно-Медицинской академии. – 2008. – Приложение 1. – №3(23). – С.137.
17. 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.
18. 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.
19. 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.
20. 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: Укр. біохім. журнал (спец. випуск). – 2009. – Т.81, № 4. – С. 115.
21. Андрийчук Т. Р. Окисний стресс як медіатор радіаційно-індукованого апоптозу / Т. Р. Андрийчук, 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.
22. 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, радиозоология, радиационная безопасность), 25– 28 октября 2010 г.: сборник тезисов. – М., 2010. – С. 13.
23. Андрійчук Т.Р. Механізми активації ксантинооксидази 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. – Київ, 2010. – С. 168.
24. 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. – W., 2011. – P. 48.
25. 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. – Y., 2012. – P. 109.
26. 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.
27. 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.
28. 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 тезисов. – К., 2013. – С. 103.
29. 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. – J., 2013. – P. 55.
30. 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.
31. 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.

32. 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. – Київ, 2014. – С. 22.

33. 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. – S., 2015. – P. 443.

34. 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. – S., 2016. – P. 354.

35. Andriychuk T. Implication of the transcription factor NF- κ B 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. – O., 2016. – P. 29.

36. 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. – M., 2017. – P. 13.

АНОТАЦІЯ

Андрійчук Т.Р. Біохімічні механізми реалізації радіаційно-індукованого апоптозу. – Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.04 – біохімія. – 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 дозі 1,0 Гр і 7,78 Гр через 30 хв і 3 год після впливу.

Досліджено 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. Продемонстровано радіаційно-індуковані зміни в мітохондріальному компартменті, а саме порушення у роботі електронно-транспортного ланцюга та вивільнення з міжмембранного простору проапоптотичних чинників. Встановлені особливості функціонування основних класів цистеїнових протеїназ свідчать про значний і специфічний внесок системи

протеолізу у реалізацію радіаційно-індукованого апоптозу. 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.

Показано, що на фоні радіаційного фактора інозин виявляє нормалізуючий вплив на пластичний і енергетичний обмін клітин.

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

АННОТАЦІЯ

Андрийчук Т.Р. Биохимические механизмы реализации радиационно-индуцированного апоптоза. – Рукопись.

Диссертация на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.00.04 – биохимия. – Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко МОН Украины, Киев, 2017.

Диссертация посвящена изучению биохимических механизмов реализации программированной клеточной гибели (апоптоз) в лимфоцитах тимуса и селезенки крыс под действием ионизирующей радиации в дозе 1.0 Гр и 7.78 Гр через 30 мин и 3 ч после облучения.

Изучены ядерно-опосредованный, митохондриальный и рецептор – зависимый пути радиационно-индуцированного апоптоза. Действие ионизирующей радиации, как непосредственно путем повреждения нуклеопротеидных комплексов, так и за счет дисбаланса между экспрессией ряда анти– и проапоптотических генов, приводит к активации ядерно-опосредованного пути клеточной гибели. Выявлены радиационно-индуцированные изменения митохондриального компартмента, а именно нарушение работы электрон-транспортной цепи и высвобождение из межмембранного пространства проапоптотических факторов. Установленные изменения функционирования основных классов цистеиновых протеиназ свидетельствует о существенном и специфическом вкладе системы протеолиза в радиационно-индуцированный апоптоз. Редокс-регуляция компонентов ядерного, рецептор– зависимого, митохондриального и лизосомально-опосредованного сигнальных каскадов определяет их вовлечение в радиационно-индуцированный апоптоз, постулируя окислительный стресс как медиатор апоптоза.

Показано, что на фоне радиационного фактора инозин проявляет нормализующий эффект на пластический и энергетический обмен клеток.

Ключевые слова: пути реализации радиационно-индуцированного апоптоза; лимфоциты тимуса и селезенки крыс; окислительный стресс; инозин.

SUMMARY

Andriichuk T.R. The biochemical mechanisms of the radiation-induced apoptosis. – Manuscript.

The thesis for doctor of biological sciences degree in specialty 03.00.04 – biochemistry. – 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 apoptosis implementation in lymphocytes of rat thymus and spleen upon action of ionizing radiation in a dose of 1.0 Gy and 7.78 Gy in 30 min and 3 h after exposure.

The stages of radiation-induced apoptosis, namely the nuclear-mediated, mitochondrial and receptor-dependent pathways, have been studied. The action of ionizing radiation, both directly through structural damage of nucleoprotein complexes, and due to the imbalance between expression of anti- and proapoptotic genes led to activation of the nuclear path of apoptosis.

Radiation-induced changes in the mitochondrial compartment were established, in particular, the disturbance of electron transport chain and release of proapoptotic factors from the intermembrane space, which was mediated by Bax protein. Fas (as part of the DISC-complex) level has been measured to assess the contribution of receptor pathway to apoptosis upon radiation exposure.

The established changes of functioning of the main classes of cysteine proteases – caspases (2, 3, 6, 8, 9), calpains, and lysosomal cathepsin B indicated a significant and specific contribution of the proteolysis system to radiation-induced apoptosis.

Our results indicated the significant disorders of pro-antioxidative homeostasis upon radiation exposure. Redox-regulation of the components of nuclear, receptor-dependent, mitochondrial, and lysosomal-mediated signaling cascades determined their involvement in radiation-induced apoptosis, postulating oxidative stress as key mediator of apoptosis. The violation of the energy state, which is accompanied by changes in ATP level due to the activation of purine catabolism, has been revealed.

Flow cytometric analysis was used to concern the induction of apoptosis after X-ray exposure and our results showed increased apoptosis (in a dose-dependent manner). So according to our investigations we propose the complex view on molecular architecture (the molecules and pathways) and essential biochemical processes special for radiation-induced apoptosis.

It has been shown that inosine mediates a normalizing effect on plastic and energy metabolism, restores redox balance by affecting certain links of the biochemical pathways of the regulatory network of cellular response to the action of radiation factor.

Key words: pathways of radiation-induced apoptosis; rat's thymus and spleen lymphocytes; oxidative stress; inosine.