

КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
імені ТАРАСА ШЕВЧЕНКА

На правах рукопису

ДРАГАН ЛЮДМИЛА ПЕТРІВНА

УДК 577.+612.438.014.481+612.438.014.46

**УЧАСТЬ ПРОТЕЇНАЗ ТА СИСТЕМИ ПОЛІ-АДФ-
РИБОЗИЛЮВАННЯ У РАДІАЦІЙНО-ІНДУКОВАНОМУ АПОПТОЗІ
КЛІТИН ТИМУСА ТА СЕЛЕЗІНКИ ЩУРІВ**

03.00.04 – біохімія

дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук

Науковий керівник
Цудзевич Борис Олександрович
доктор біологічних наук, професор

КИЇВ — 2006

-	2
ЗМІСТ	
ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ	4
ВСТУП	5
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	10
1.1. Біохімічні та морфологічні ознаки апоптичної загибелі клітин.....	10
1.2 Значення протеолітичних систем у розвитку апоптичної загибелі клітин.....	20
1.2.1. Роль цистеїнових протеїназ родини каспаз в апоптозі клітин...	20
1.2.2. Участь лізосомальних протеїназ у активації та розвитку апоптозу.....	28
1.3. Стан полі-(АДФ-рибозо)-полімеразної системи за дії іонізуючої радіації	32
1.4. Біохімічні та фізіологічні аспекти дії рибоксину	39
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	46
2.1. Реактиви та матеріали.....	46
2.2. Умови проведення експерименту.....	46
2.3. Метод виділення лімфоїдних клітин тимуса і селезінки щурів та визначення їх життєздатності.....	47
2.4. Оцінка структурного стану ядерних нуклеїнових кислот лімфоцитів тимуса та селезінки щурів.....	47
2.5. Визначення активності ендогенних протеїназ лімфоцитів тимуса та селезінки щурів	48
2.6. Визначення активності катепсину В у тимоцитах та спленоцитах щурів	49
2.7. Визначення активності цистеїнової протеїнази (каспази –3) у лімфоцитах тимуса та селезінки щурів	50
2.8. Метод визначення активності полі-(АДФ-рибозо)-полімерази у лімфоїдних клітинах тимуса і селезінки щурів.....	50
2.9. Визначення вмісту НАД ⁺ у тимусі та селезінці щурів.....	51

-	3
2.10. Метод визначення вмісту АТФ у тимусі та селезінці щурів.....	52
2.11. Визначення рівня одно- та дволанцюгових розривів ДНК у тимоцитах та спленоцитах щурів	53
2.12. Метод визначення Ca^{+2} , Mg^{2+} -залежної ендонуклеазної активності у лімфоїдних клітинах тимуса та селезінки щурів.....	54
2.13. Статистична обробка отриманих результатів	55
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ОБГОВОРЕННЯ.....	56
3.1. Оцінка структурного стану нуклеопротейнового комплексу за дії іонізуючого випромінювання та на фоні введення рибоксину.....	56
3.2. Особливості протеолітичної активності ендогенних протеїназ лімфоцитів тимуса і селезінки щурів за умов радіаційного впливу та на фоні введення рибоксину	62
3.3. Активність катепсину В за опромінення та на фоні введення рибоксину у лімфоцитах тимуса і селезінки щурів	64
3.4. Дослідження активності каспази –3 у тимоцитах та спленоцитах щурів за дії іонізуючої радіації	74
3.5. Активність полі-(АДФ-рибозо)-полімерази у лімфоїдних клітинах тимуса і селезінки щурів за дії іонізуючого випромінювання та на фоні введення рибоксину	80
3.5.1. Вміст НАД^{+} та АТФ у тимусі та селезінці щурів за дії променевого чинника та на фоні введення рибоксину	87
3.6. Дослідження рівня одно- та дволанцюгових розривів ДНК у тимоцитах та спленоцитах щурів за дії іонізуючої радіації та на фоні введення рибоксину	96
3.7. Дослідження активності Ca^{+2} , Mg^{2+} -залежної ендонуклеази у лімфоцитах тимуса та селезінки щурів за дії іонізуючої радіації	100
ЗАКЛЮЧЕННЯ	104
ВИСНОВКИ	112
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	113

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

АДФ – аденозин-5'-дифосфат
АКМ – активні кисневі метаболіти
АМФ – аденозин-5'-фосфат
АТФ – аденозин-5'-трифосфат
АО – акридин оранжевий
ДАБК - діамінобензойна кислота
ДНК-дезокирибонуклеїнова кислота
ДР – дволанцюгові розриви
ЕДТА – етилендіамінтетраоцтова кислота
КМФ – ксантозин-5'-фосфат
НАД⁺ – нікотинамідаденіндинуклеотид
НАДН – нікотинамідаденіндинуклеотид відновлений
ОР - одноланцюгові розриви
ПАР - полі-АДФ-рибоза
ПАРП – полі-(АДФ-рибозо)-полімераза
ПДН – полідезоксирибонуклеотиди
ПОЛ – перекисне окиснення ліпідів
РНК - рибонуклеїнова кислота
ФРПФ – 5-фосфорибозил-1-пірофасфат
AIF – апоптозіндукуючий фактор
SDS - додецилсульфату натрію

ВСТУП

Актуальність теми. Дослідження біохімічних механізмів розвитку апоптозу є актуальною проблемою сучасної біохімії. Така форма загибелі може індукуватися не лише за фізіологічних умов, а й під впливом чинників різної природи, включаючи іонізуюче випромінювання. Індукція апоптозу залежить від багатьох факторів, таких як метаболічна активність клітин, стадія диференціювання, рівень і тривалість дії апоптогенного (ендо- чи екзогенного) чинника. Певною мірою все це обумовлює велику варіабельність залучення внутрішньоклітинних регуляторів біохімічних процесів.

Згідно з сучасними уявленнями апоптоз лімфоїдних клітин при променевому ураженні пов'язаний насамперед з порушенням структурної цілісності хроматину [16]. Пошкодження ДНК призводить до порушення активації шляхів трансдукції сигналу, які залучені до стресорної відповіді - затримки клітинного циклу, репараційних процесів та апоптозу.

На сьогодні постулюється, що сенсором пошкоджень ДНК є полі-(АДФ-рибозо)-полімераза, яка стимулює клітинну відповідь в цілому на дію генотоксичних агентів. Остання включає в себе запуск каскаду протеолітичних реакцій, у результаті яких відбувається розщеплення різноманітних клітинних білків, що врешті - решт призводить до порушення нормального функціонування клітини, її дезінтеграції та загибелі. При радіаційно-індукованих процесах вирішальна роль належить численній родині каспаз, активація яких призводить до протеолізу життєвоважливих білків клітини.

Особливо актуальними у сучасній радіаційній біохімії залишаються дослідження механізмів дії апоптичних чинників та пошук шляхів нормалізації біохімічних змін в організмі опромінених тварин. В

цьому сенсі заслуговує на увагу рибонуклеозид гіпоксантину – інозин (рибоксин), як ефектор перебігу енергетичних та синтетичних реакцій у клітинах, зокрема, біосинтезу нуклеотидів та коферментів за променевого ураження організму [35,129,141].

Дослідження типових змін і особливостей структурних, метаболічних та функціональних порушень у високорадіочутливих клітинах тимуса і селезінки за дії іонізуючої радіації надасть можливість більш коректного тлумачення природи багатьох захворювань та відкрити нові перспективні підходи для ефективного регулювання імунодефіцитних станів.

Мета і завдання дослідження. Метою роботи було дослідити участь протеїназ та системи полі-АДФ-рибозилування у радіаційно-індукованому апоптозі лімфоїдних клітин тимуса і селезінки щурів, а також можливість корекції радіогенних змін за допомогою препарату рибоксину. Відповідно до мети було поставлено такі завдання:

1. Дослідити структурний стан ДНК за дії іонізуючої радіації та на фоні введення рибоксину.
2. Визначити активність ендогенних протеїназ за дії іонізуючої радіації.
3. Визначити активність катепсину В за дії іонізуючої радіації та на фоні введення рибоксину.
4. Дослідити активність каспази-3 за дії іонізуючої радіації.
5. Визначити полі-(АДФ-рибозо)-полімеразну активність у лімфоцитах тимуса і селезінки щурів за дії іонізуючої радіації та на фоні введення рибоксину.
6. Дослідити вміст НАД і АТФ у тимусі та селезінці щурів за дії променевого чинника та на фоні введення рибоксину.
7. Оцінити рівень одно- та дволанцюгових розривів ДНК і визначити Ca^{2+} , Mg^{2+} -залежну ендонуклеазну активність у лімфоїдних клітинах тимуса та селезінки щурів за дії іонізуючої радіації.

Об'єкт дослідження. Біохімічні механізми радіаційно-індукованого апоптозу в лімфоїдних клітинах тимуса та селезінки щурів.

Предмет дослідження. Структурний стан ДНК, ферментативна активність ендогенних протеїназ, активність катепсину В, каспази-3, полі-(АДФ-рибозо)-полімеразна активність, вміст НАД і АТФ за дії іонізуючої радіації та на фоні введення рибоксину.

Методи дослідження. Люмінесцентна мікроскопія (оцінка структурного стану ядерних нуклеїнових кислот), спектрофотометричні (визначення активності катепсину В, каспази-3, вмісту НАД), флуориметричні (визначення активності ендогенних протеїназ, Ca^{2+} , Mg^{2+} -залежної ендонуклеазної активності, рівня одно- та дволанцюгових розривів ДНК), хемілюмінесцентний (визначення вмісту АТФ), радіоізотопний (визначення активності полі-(АДФ-рибозо)-полімерази) та методи математичної статистики.

Наукова новизна роботи. У роботі вперше проведено комплексне дослідження каскаду взаємопов'язаних біохімічних реакцій за радіаційно-індукованого апоптозу лімфоїдних клітин тимуса та селезінки щурів. Встановлено, що на початкових етапах за дії опромінення підвищується активність ендогенних протеїназ, лізосомальних катепсинів, а також цистеїнових протеїназ родини каспаз, зокрема каспази – 3, у лімфоцитах тимуса та селезінки щурів. За дії іонізуючої радіації відбуваються зміни активності полі-(АДФ-рибозо)-полімерази (ПАРП).

Так, на ранніх етапах після дії рентгенівського випромінення в дозах 1,0 Гр та 7,78 Гр, як правило, підвищується активність цистеїнових протеїназ, а активність полі-(АДФ-рибозо)-полімерази пригнічується. Паралельно з цим встановлено зниження вмісту НАД та АТФ у клітинах досліджуваних органів. Більш помітні зміни цих показників відбуваються після опромінення у летальній дозі. Одночасно підвищується активність Ca^{2+} , Mg^{2+} -залежної ендонуклеази, зростає кількість одно- та дволанцюгових розривів ДНК, що є характерною ознакою пізньої стадії

апоптозу і призводить до клітинної загибелі. Введення препарату рибоксину до опромінення тварин сприяє нормалізації досліджуваних показників.

Практичне значення одержаних результатів. Одержані результати доповнюють і поглиблюють існуючі уявлення щодо біохімічних механізмів разової дії іонізуючого випромінювання та розширюють уявлення щодо початкових механізмів післярадіаційного порушення обміну речовин у лімфоїдних клітинах тимуса і селезінки тварин. В той же час результати дослідження модифікуючого ефекту препарату рибоксину за променевого ураження можуть бути експериментальним підґрунтям для пошуку ефективних засобів радіопрофілактики та радіотерапії. Викладені у роботі основні положення можуть бути рекомендовані до включення у навчальні програми природничих вузів, де викладаються курси “Радіобіологія”, “Радіаційна медицина”, “Радіаційна біохімія” тощо.

Особистий внесок здобувача. Дисертантом особисто здійснено інформаційний пошук, аналіз та оцінку наукової літератури за темою дисертаційної роботи, виконані експериментальні дослідження, здійснено обґрунтування отриманих результатів. Планування та розробку методичних підходів, виконання комплексу лабораторних досліджень було проведено спільно з науковим керівником та співробітниками лабораторії фізико-хімічної біології кафедри біохімії.

Апробація результатів роботи. Основні результати дисертаційної роботи було представлено на: III з’їзді з радіаційних досліджень (радіобіологія і радіоекологія) (Київ, 2003), Міжнародній конференції “Радіобіологічні ефекти : ризики, мінімізація, прогноз” (Київ, 2005), 6-ой международной междисциплинарной научно-практической конференции “Современные проблемы науки и образования” (Харьков, 2005), V съезде по радиационным исследованиям (радиобиология, радиоэкология, радиационная безопасность) (Москва, 2006), The 35th Annual Meeting of the

European Radiation Research Society (Kyiv, 2006), IX Українському біохімічному з'їзді (Харків, 2006).

Публікація матеріалів. За матеріалами дисертації опубліковано 4 статті у фахових журналах та 7 тез доповідей у матеріалах вітчизняних і міжнародних з'їздів та конференцій.

Структура та обсяг дисертації Дисертація складається з вступу, огляду літератури, опису матеріалів та методів дослідження, результатів та їх обговорення, заключення, висновків, списку використаних джерел, що включає 216 посилань. Робота викладена на 133 сторінках друкованого тексту, ілюстрована 22 рисунками та 3 таблицями.

Зв'язок з науковими програмами, планами, темами. Робота відповідає плану науково-дослідної роботи кафедри біохімії біологічного факультету Київського національного університету імені Тараса Шевченка та виконана у рамках теми № 01БФ036-04 "Розробка наукових основ пошуку біологічно-активних сполук радіозахисної дії".

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Біохімічні та морфологічні ознаки апоптичної загибелі клітин

У живому організмі постійно підтримується баланс між кількістю утворених та загиблих клітин, між синтезом і утилізацією різноманітних медіаторів, компонентів позаклітинного матриксу. На основі аналізу морфологічних та біохімічних показників чисельність популяції клітин пов'язана з двома протилежно направленими процесами: розмноженням та апоптичною чи некротичною деградацією певної частини клітин [133].

На сьогодні феноменологія загибелі клітин за механізмом апоптозу та некрозу добре досліджена та описана. Апоптоз – активний процес, викликаний внутрішніми або зовнішніми сигналами, що супроводжується розвитком типових морфологічних ознак, а саме втратою клітинною мембраною мікроворсинок і нормальної складчастості, зменшенням розмірів клітини, що призводить до порушення міжклітинних контактів; клітина бере активну участь у процесі самоліквідації в результаті активізації каскаду послідовних біохімічних реакцій, пов'язаних з транскрипцією та синтезом нових білкових молекул [77,210]. Важливою ознакою цього процесу є те, що цілісність плазматичної мембрани не порушується та відсутні запальні процеси.

Однією з перших ознак апоптозу, яку можна спостерігати візуально, є ущільнення ядерного хроматину та формування його осмофільних скупчень поблизу ядерної мембрани. Еухроматинові (генетично активні) та спіралізовані гетерохроматинові ділянки хроматину стають суперконденсованими і розташовуються у формі напівмісяця по периферії ядра. У подальшому в ядерній мембрані утворюються інвагінації, але вона зберігає двошарову структуру з інтактними порами.

У цитоплазмі також спостерігається конденсація та зморщування гранул, відбувається розширення ендоплазматичного ретикулуму та формування на його поверхні пухирців, які зливаються з цитоплазматичною мембраною, вивільняючи свій вміст у позаклітинний простір, що призводить до конденсації цитоплазми. Окрім того, зменшення об'єму клітини, ущільнення мембрани та формування стійкого до дії детергентів покриву можливе за рахунок активації Ca^{2+} -залежної трансглутамінази II типу, яка каталізує утворення перехресних зшивок між мембранними білками [64].

Така динаміка процесу загибелі клітини та характерні морфологічні зміни виявляються за допомогою флуоресцентної мікроскопії. З цією метою також застосовують нові автоматизовані комплекси з швидкою комп'ютерною обробкою інформації про стан клітин і методи проточної цитофлуориметрії [12]. Детектори проточних цитофлуориметрів дозволяють реєструвати поляризацію флуоресценції, спектральний максимум та інші характеристики об'єкту [179].

Слід відмітити, що під час розвитку апоптозу виражені біохімічні зрушення реєструються дещо раніше у плазматичній мембрані ніж у ядрі і пов'язані зі зміною асиметрії складових ліпідного бішару, зокрема фосфоліпідів мембран. Окисне порушення взаємозв'язку цитоскелету з мембранними білками призводить до накопичення зановосинтезованого на поверхні клітини фосфатидилсерину – одного з основних мембранних маркерів апоптичних клітин, завдяки чому забезпечується виключно висока ефективність фагоцитозу [10,130]. Мембранні перебудови пов'язані також з відомими маркерними молекулами. Так, одним з неспецифічних проявів апоптозу Т-лімфоцитів є послаблення синтезу рецепторних молекул CD4 та CD8 на поверхні клітини.

На заключній стадії апоптозу відбувається фрагментація клітини на вкриті плазматичною мембраною компактні везикули – апоптичні тільца, які фагоцитуються макрофагами або сусідніми клітинами [61].

Відомо три морфологічно відмінних типи апоптозу [49]: перший тип аналогічний вище описаному; другий, – названий аутофагальною загибеллю клітини, характеризується формуванням аутофагальних вакуолей і збільшенням лізосом; за третього типу не відбувається конденсація цитоплазми і хроматину, а фрагментація клітин здійснюється без участі ферментів лізосом. Передбачається, що перший та другий морфологічний тип активної загибелі клітин відображають різні механізми апоптозу, проте в деяких клітинах вони зустрічаються одночасно [138].

Згідно сучасних уявлень апоптоз – багатостадійний процес, який можна поділити на кілька етапів, що включають дію низки факторів – стадія індукції, передача сигналу від рецепторної молекули в клітинне ядро, активація летальних генів, синтез апоптозспецифічних білків і заключна стадія, визначальна – активація ендонуклеаз і фрагментація ДНК [179]. Наявність в організмі фізіологічних факторів – індукторів та інгібіторів апоптозу – дозволяють зробити висновок, що запрограмована клітинна загибель залежить від співвідношення чинників, які викликають апоптоз та блокують його, а також від регуляторних внутрішньоклітинних механізмів [10].

На сьогодні не знайдено апоптозспецифічної сигнальної системи, тому, що в активній загибелі клітини беруть участь внутрішньоклітинні регулятори біохімічних механізмів, що відіграють ключову роль і при інших фізіологічних процесах. Сигнали, що призводять до розвитку апоптозу, відрізняються варіабельністю залучення різних факторів в залежності від природи клітин, стадії їх розвитку та апоптогенного стимулу [130].

Ключовою ланкою у механізмі розвитку апоптозу вважається активація каскаду цистеїнових протеїназ (каспаз), що призводить до протеолітичного розщеплення їх субстратів і в кінцевому результаті до активації ендонуклеаз та фрагментації ДНК.

Прийнято виділяти кілька основних типів фрагментації ДНК під час загибелі клітин шляхом апоптозу. Крупноблочна деградація ДНК пов'язана з утворенням фрагментів, що мають довжину 50-300 тис. пар основ [56]. Вважають, що такий тип деградації ДНК здійснюється за участі топоізомерази II, яка локалізується у місцях приєднання хроматину до ядерного матриксу та є Mg^{2+} -залежним ферментом [197]. Топоізомераза II може брати участь у початковій фрагментації ДНК двома шляхами – по-перше, вносити подвійні розриви у ділянки прикріплення петель хроматину; по-друге, змінювати стан ДНК, роблячи структуру хроматину більш доступною для нуклеолітичної атаки. Окрім того, показано, що у клітинах з фрагментованою ДНК відбувається специфічне протеолітичне розщеплення топоізомерази II одночасно з утворенням фрагментів ДНК довжиною 50 тис. пар основ, тобто протеоліз топоізомерази II може супроводжуватись експозицією ДНК у місцях її прикріплення до ядерного матриксу.

Ще одним ферментом, який викликає утворення фрагментів ДНК довжиною більше 50 тис. пар основ є ендонуклеаза G, що широко представлена у клітинах хребетних. В активному стані це димер, який складається з двох субодиниць з молекулярною масою близько 30 кДа та проявляє специфічність до РНК, одно- і дволанцюгових ділянок ДНК [164]. Ендонуклеаза G локалізована переважно у мітохондріях, але за дії індукторів апоптозу спостерігається її вивільнення у цитоплазму та подальша міграція до ядра. Встановлено [145], що фермент може діяти як незалежний від цистеїнових протеїназ ефектор міжнуклеосомної фрагментації ДНК. Так відомо, що порушення цілісності мітохондріальних мембран може відбуватися як за рахунок обумовленого каспазами

розщеплення проапоптичного білка Bid до tBid з наступною транслокацією цього фрагмента до мітохондрій, так і за незалежним від цистеїнових протеїназ механізмом, зокрема внаслідок розщеплення калпаїнами іншого представника родини Bcl-2 – Бах. Білок - фрагмент Бах-p18 спричиняє вивільнення з мітохондрій ендонуклеази G, цитохрому c та ініціацію виконавчої стадії апоптозу [113].

Окрім того, ген p53 з одного боку транскрипційно активує синтез гену Бах за рахунок наявності у ньому p53-респонсивного елементу і, разом з тим, репресує експресію гену Bcl-2, що призводить до зміщення балансу Bcl-подібних білків та зростання їх проапоптичної активності [24].

Співвідношення та комбінації Bcl-2-подібних білків є одним з механізмів, що визначає вибір між вступом клітини на шлях апоптичної загибелі та її подальшим функціонуванням. Більшість білків родини Bcl-2 містять у своїй структурі гідрофобний С-кінцевий трансмембранний домен, що дозволяє їм інтегруватись у внутрішньоклітинні мембрани [74]. Згідно з результатами лазерного сканування та електронної мікроскопії, білок Bcl-2 був виявлений у складі ядерної мембрани, ендоплазматичного ретикулуму і, особливо, на зовнішній поверхні мітохондрій [124]. Таке розподілення передбачає його участь у процесах регуляції трансмембранного потенціалу мітохондрій [194]. Оскільки при експресії білка Bcl-2 спостерігається значне пригнічення процесу перекисного окиснення ліпідів було запропоновано модель, згідно з якою локалізація Bcl-2 у місцях інтенсивного генерування вільних радикалів пов'язують з його антиоксидантною функцією [124]. Важливу роль в антиапоптичній дії білка Bcl-2 відіграє його здатність взаємодіяти з кальцієвими каналами у мембранах ендоплазматичного ретикулуму, оскільки такий механізм передбачає регуляцію потоків іонів кальцію у клітинах [137].

Остаточний механізм антиапоптичної дії білка Bcl-2 ще не встановлено, але найбільш вірогідним є його вплив на експресію ряду генів або модифікація цистеїнових протеїназ [89].

Поряд із зазначеними факторами при розриві зовнішньої мембрани мітохондрій у цитоплазму також надходить флавопротеїн AIF. Додавання останнього до ізольованих ядер викликає швидко, впродовж 1 хв, конденсацію хроматину та крупноблочну фрагментацію ДНК [180].

На основі аналізу літератури можна зробити висновок, що крупноблочна деградація ДНК відбувається переважно за участі ферментів топоізомерази II, ендонуклеази G, білка AIF та інших, тоді як утворення олігонуклеосомних фрагментів пов'язано з функціонуванням Ca^{2+} , Mg^{2+} -залежних ендонуклеаз.

Співвідношення між крупноблочною та міжнуклеосомною деградацією ДНК вивчено недостатньо. Ряд дослідників вважають, що продукти крупноблочної фрагментації ДНК є безпосередніми субстратами для ферментів, які забезпечують розщеплення ДНК до олігонуклеосом, хоча деякі автори припускають, що обидва типи деградації ядерного матеріалу не пов'язані між собою і можуть відбуватися одночасно. Утворення відмінних за величиною фрагментів молекули ДНК пов'язують з функціонуванням різних ферментних систем [49].

В результаті міжнуклеосомної деградації ДНК відбувається утворення фрагментів, що мають довжину, співстановленою з розміром нуклеосом або олігонуклеосом [61]. Подібні фрагменти, починаючи з 180-190 пар основ, спостерігаються при електрофорезі в агарозному гелі у вигляді „драбини”. При такому розпаді хроматину можуть утворюватися більш довгі, збагачені H1-гістонами і короткі оліго- та моонуклеотиди, збагачені HMG-білками [41].

Розщеплення ДНК між нуклеосомами найбільш характерно для хроматину клітин імунної системи, тоді як у випадку епітеліальних або

трансформованих клітин такий тип деградації ДНК зустрічається рідше [63].

Тривалий час вважалось, що міжнуклеосомна деградація ДНК становить молекулярну основу конденсації хроматину та пікнозу ядер. Проте дослідження останніх років показали, що її не можна розглядати як обов'язкову біохімічну ознаку апоптозу [93,170]. Іноді формування апоптичних тілець відбувається раніше ніж розпад ядерного матеріалу до олігонуклеосом, а конденсація хроматину корелює в часі скоріше з утворенням великих фрагментів молекули ДНК. Більш того, в експериментах Oberhammer F. et al. [155] було продемонстровано, що у ряді випадків апоптична загибель клітини взагалі не супроводжується появою олігонуклеосомних фрагментів.

Суттєвий внесок у процес фрагментації вносять ендонуклеази, які здійснюють одноланцюгові розриви у збагачених АТ ділянках ДНК у місцях прикріплення до ядерного матриксу [184], а також у лінкерних ділянках [198,199]. У таких ушкоджених зонах ДНК відбуваються конформаційні зміни та посилюється чутливість до нуклеаз, які здійснюють подальшу міжнуклеосомну фрагментацію ДНК.

На сьогодні більшою мірою досліджено конститутивні Ca^{2+} , Mg^{2+} -залежні ендонуклеази. Першим з білків даної родини було виділено та очищено ДНКазу I. ДНКазу I – фермент з молекулярною масою 35 кДа, який здійснює загальне розщеплення нуклеїнових кислот. У ядрах багатьох тканин була виявлена активність інших ферментів, наприклад з молекулярною масою 27 кДа та 29 кДа – у печінці, 25-31 кДа – у тимусі. Ці ферменти були активні за нейтральних рН, пригнічувались іонами цинку та ауриотрикарбоновою кислотою і відрізнялися від ДНКазу I тим, що проявляли специфічність до лінкерних ділянок ДНК. Припускають, що невеликі (18 – 50 кДа) білки з Ca^{2+} , Mg^{2+} -залежною ендонуклеазною активністю можуть утворюватись зі спільного поліпептида-попередника з

молекулярною масою 145 – 400 кДа [102,139]. Так, показано, що за апоптозу тимоцитів, викликаного дією глюкокортикоїдів, активується Ca^{2+} , Mg^{2+} -залежна ендонуклеаза, названа NUC18 [112,150], яка у інтактних клітинах входить до складу високомолекулярного комплексу (більше 100 кДа), а за дії апоптогенного чинника вивільняється із нього у низькомолекулярній формі (18 кДа) [200].

Гомолог ДНКазы I, ізольований з ядер лімфоцитів тимуса щурів відомий як γ -дезоксирибонуклеаза (ДНКазы γ) [144]. Є дані, що за фрагментацію хроматину при індукованому радіацією апоптозі тимоцитів відповідальний саме даний фермент. Активність ДНКазы γ проявляється за нейтральних значень рН, при одночасній присутності іонів Ca^{2+} та Mg^{2+} , в результаті дії ферменту утворюються 3'-ОН / 5'-Ф-олігонуклеосомні фрагменти [169,179].

Нажаль, за виключенням ДНКазы I, детально охарактеризовано лише деякі з цих ендонуклеаз, лише до деяких отримано антитіла і жоден з їх генів не клонований. Показано, зокрема, що Ca^{2+} , Mg^{2+} -залежна ендонуклеаза з екстрактів тимоцитів вступає в реакцію імунопреципітації з антитілами до ДНКазы I [158].

Таким чином, ендонуклеази, які відрізняються від секреторної ДНКазы I, але характеризуються Ca^{2+} , Mg^{2+} -залежністю, існують у багатьох типах клітин і беруть участь у деградації ДНК за апоптозу.

Нуклеаза, що обумовлює міжнуклеосомну деградацію ДНК є також ДНКазы II, активність якої спостерігається за кислих значень рН (4,6 - 5,0) і не залежить від катіонів. Фермент виявляє специфічність до лінкерних ділянок ДНК і, на відміну, від Ca^{2+} , Mg^{2+} -залежних ендонуклеаз призводить до утворення 3'-Ф / 5'-ОН фрагментів. Оскільки максимальна активність ДНКазы II спостерігається за низьких значень рН, припускають, що фермент задіяний на пізніх етапах фрагментації ДН [108].

Окрім ядерних ендонуклеаз до деградації хроматину залучені цитоплазматичні ферменти, які також можуть розщеплювати хроматин у міжнуклеосомних ділянках.

За дії іонізуючого випромінювання на клітинні макромолекули, зокрема на ДНК, відбуваються розриви хімічних зв'язків в результаті як безпосередньої іонізації (пряма дія), так і внаслідок дії продуктів вільнорадикальних реакцій, що призводять до пошкодження нуклеопротейнового комплексу. Насамперед це поодинокі пошкодження (одноланцюгові розриви, модифікації основ) та чисельні пошкодження - мультисайтові кластерні, дволанцюгові розриви, міжмолекулярні зшивки типу ДНК-білок, ДНК-ДНК. В утворенні одноланцюгових розривів ДНК превалюють механізми непрямой дії радіації, які швидко та ефективно репаруються. Впродовж 10-30 хв після дії радіації близько 50% таких пошкоджень зникає. Проте наявність навіть одного одноланцюгового розриву в ДНК достатньо для порушення вищих рівнів організації хроматину. Значні пошкодження, що виникають за рахунок прямої дії іонізуючого випромінювання, відіграють ключову роль у радіаційній загибелі клітини [160,204]. Вважають, що основним місцем утворення подвійних розривів є ділянки з'єднання ДНК з ядерним матриксом, які є переважаючою мішенню для ендонуклеаз [212]. Серед пошкоджень ДНК, що виникають внаслідок дії іонізуючої радіації, дволанцюгові розриви відновлюються з найменшою швидкістю – 50% пошкоджень репаруються впродовж 2-4 год і навіть до 24 год після опромінення [17].

Тривалий час вважалось, що нерепаровані пошкодження ДНК приводять клітину до загибелі у результаті порушення функцій усіх біохімічних систем через неможливість повноцінної транскрипції генів, які містять дефекти у матриці ДНК. Згідно сучасних уявлень механізм загибелі клітин, які містять пошкодження ДНК здійснюється за певною генетичною програмою. На основі досліджень по індукції апоптозу було встановлено, що характер загибелі клітини залежить від рівня та часу дії

агента. Крім того, важливе значення в індукції апоптозу належить фазі клітинного циклу, активності метаболічних процесів, стадії розвитку організму.

У результаті пошкоджуючої дії радіації можливі два, протилежних за наслідками, варіанти розвитку подій, один з яких пов'язаний з репараційним відновленням структурної організації молекули ДНК. Інший варіант супроводжується видаленням з популяції клітин, що містять не сумісні з нормальною життєдіяльністю пошкодження, і пов'язаний з індукцією програми клітинної загибелі. Численні дослідження свідчать, що у клітинах існує декілька шляхів генерування та проведення сигналу. Так, утворення сигналу може відбуватися безпосередньо в ядрі, або формуватися на рівні плазматичної мембрани. Отриманий стимул підсилюється та поступово передається у клітинах за участю месенджерних молекул різного порядку і, у кінцевому результаті, досягає ядра, де відбувається ініціація програмованої загибелі клітини шляхом активації летальних або репресії антилетальних генів [41,42].

Дослідження біохімічних механізмів апоптозу тимоцитів тварин на молекулярному рівні показало, що іонізуюче випромінювання впливає на експресію певних генів. Серед останніх важливу роль відіграють гени ранньої відповіді (p53, c-myc, c-fos, c-jun, gadd), що відповідають за синтез онкогенів, цитокінів та інших регуляторів проведення сигналу у клітинах [16,42]. Так, підвищення рівня p53 може призводити до затримки клітинного циклу у фаз G1 та G2 до реплікації ДНК і мітозу відповідно. Це дає час на репарацію ДНК і запобігає появі мутантних клітин [123,166]. Якщо активність репараційних систем недостатня і пошкодження ДНК зберігаються, то в таких клітинах запускається програма апоптозу [183]. Мутації гену p53 дозволяють таким клітинам зберігати життєдіяльність, в результаті чого вони стають онкологічно трансформованими. Так, тимоцити тварин, які втратили ген p53, не піддаються апоптозу під дією таких ДНК-пошкоджуючих агентів, як радіація та етопозид [147,189]. За

даними Мазурік В.К. та співавт. [38] існує пряма кореляція між радіочутливістю, підвищенням вмісту у клітинах білка p53 та частотою апоптозу. Значне збільшення вмісту білка p53 було характерним для тимоцитів та спленоцитів [38]. Таким чином, p53 не тільки збільшує час репарації ДНК, але і захищає організм від мутантних клітин.

Загальноприйнятою є концепція, що незважаючи на все різноманіття пускових сигналів та початкових механізмів реалізації апоптичної програми заключні етапи є універсальними для багатьох різновидів апоптозу. До них належать два відносно автономні прояви загального шляху індукції апоптозу – протеолітична активація цистеїнових, серинових протеїназ та зниження трансмембранного потенціалу мітохондріальної мембрани [55].

1.2 Значення протеолітичних систем у розвитку апоптичної загибелі клітин

1.2.1 Роль цистеїнових протеїназ родини каспаз в апоптозі клітин

У складному каскадному механізмі програмованої клітинної загибелі бере участь велика кількість ферментів, однак провідна роль під час індукції та реалізації апоптозу належить протеїназам, зокрема цистеїновим, сериновим протеїназам, калпаїнам, протеасомам та іншим.

На сьогодні центральне значення у розвитку радіаційно-індукованої загибелі лімфоцитів відводиться цистеїновим протеїназам типу ICE, що визначають розвиток ключових подій як на відносно ранніх, так і на кінцевих етапах апоптозу. Цистеїнові протеїнази об'єднуються у родину каспаз, яка у ссавців налічує понад 14 представників. Залежно від

біологічних функцій каспази можна поділити на ферменти, що забезпечують процесінг і активацію цитокінів, зокрема інтерлейкінів IL-1 β , IL-18 під час розвитку запальних процесів (каспази-1, -4, -5) та ферменти, що обумовлюють реалізацію програми апоптичної загибелі (каспази-2, -3, -6, -7, -8, -9, -10) [100,118,201]. Однак, незважаючи на те, що за даною класифікацією каспази-1, -4, -5 не належать до апоптичних не можна повністю виключити їх участь в апоптозі. Так, показано, що апоптоз тимоцитів, індукований NO, чи Fas-опосередкована загибель клітин лінії Jurkat пов'язані з активацією відповідно каспази-1 та каспази-5 [111,136].

Однією з характерних особливостей каспаз є наявність в активному центрі ферменту залишку цистеїну та специфічне розщеплення білкових субстратів після залишків аспарагінової кислоти [90]. Каспази – конститутивні ферменти, що присутні у клітинах у вигляді неактивних мономерних проформ (30-50 кДа), активація яких відбувається за каскадним механізмом шляхом обмеженого протеолізу. За фізіологічних умов прокаспази виявляються у певних клітинних компартаментах, що обумовлює їх просторове відмежування від специфічних клітинних субстратів та попереджує можливість виникнення спонтанного апоптозу. Разом з тим, розвиток програмованої клітинної загибелі супроводжується активацією та координованою транслокацією каспаз до місць локалізації субстратів. Так, згідно з результатами субклітинного фракціонування, прокаспази -3, -9 виявляються у цитозолі та у міжмембранному просторі мітохондрій, прокаспаза-2 присутня у цитозолі, апараті Гольджі та ядрі, прокаспаза-12 – на зовнішній поверхні ендоплазматичного ретикулуму, в той час як прокаспази -7, -8 – це виключно цитоплазматичні ферменти [107,125,154].

Ферменти характеризуються структурною подібністю і містять N-кінцевий продомен, що відрізняється значною варіабельністю як за розмірами, так і за амінокислотною послідовністю, велику (20 кДа) та малу (10 кДа) субодиниці, з'єднані, залежно від типу каспаз, або за допомогою

лінкерного пептиду, або залишками аспарагінової кислоти. Саме наявність аспарагіну обумовлює можливість транс- та аутоактивації ферментів, в результаті чого відбувається розщеплення молекули каспази на дві субодиниці з подальшою асоціацією останніх спочатку у гетеродимер, а потім у каталітично активний тетраметр, що містить два функціонально незалежних активних центри. Слід зазначити, що згідно з сучасними уявленнями, відщеплення N-кінцевого продомену не є обов'язковою умовою для активації каспаз [92,100].

Залежно від довжини N-кінцевого продомену та виконуваних функцій ферменти поділять на два основні класи – каспази першого ешелону, або ініціаторні (каспази-2, -8, -9,-10) мають продомен, що містить більше ніж 200 залишків амінокислот і забезпечують передачу апоптичного сигналу та активацію безпосередніх виконавців, які здійснюють гідроліз структурних білків клітини – ефекторних каспаз, та каспаз другого ешелону (каспази-3, -6, -7), продомен яких містить приблизно 22 амінокислотних залишки [75,103].

На сьогодні розрізняють декілька механізмів активації каспаз. Так, активація проферментів може відбуватися шляхом їх протеолітичного ауто-, чи трансрозщеплення при просторовому зближенні молекул прокаспаз під час утворення димер/олігомерних комплексів з рецепторами (TNF, FAS) чи цитоплазматичними факторами (APAF-1) [215,216]. Регуляторні прокаспази мають незначну протеолітичну активність (1-2% від активності зрілого ферменту), проте вона достатня для забезпечення аутопротеолізу. Після активації каспаз другого ешелону розпочинаються деструктивні зміни і на цьому етапі загибель клітини вже є передбачуваною.

Активація ініціаторних каспаз відбувається у так званих сигнальних комплексах, що індукують смерть (DISC) або апоптосомах, що утворюються як у відповідь на взаємодію лігандів з поверхневими клітинними рецепторами (зовнішній шлях апоптозу), так і за рахунок

внутрішньоклітинних сигналів (внутрішній шлях апоптозу) [92,100]. Найбільш охарактеризованою є активація каспази-8, що рекрутується Fas-рецептором через адаптер FADD. У даній моделі взаємодія ліганда і рецептора призводить до олігомеризації та утворення кластерів рецепторних молекул з подальшою взаємодією їх цитоплазматичних ділянок з адаптерними молекулами, які зв'язуючи молекули прокаспаз-8 забезпечують просторове зближення останніх та їх взаємну активацію. Асоціація проензимів у комплексах може здійснюватись за рахунок гідрофобних або електростатичних білкових взаємодій двох модульних ділянок продоменів каспаз (DED-домен у випадку каспаз -8, -10 та CARD-домен для каспаз -2, -9) з продоменами відповідних адаптерних молекул (FADD, TRADD) [103].

В подальшому каспаза -8, шляхом обмеженого протеолізу, активує ефекторні каспази, насамперед превалуючу у клітині каспазу -3, а також каспази -6 та -7. Ці ферменти призводять до деградації у ядрі клітини певних білкових субстратів, що супроводжується конденсацією ДНК та міжнуклеосомним розщепленням хроматину. Найбільш важливим функціональним ядерним білком, який при цьому розщеплюється, є полі-(АДФ-рибозо)-полімераза. Фермент гідролізується каспазами або іншими ферментами, наприклад гранзимом В [64,148,165,167,188]. Полі-(АДФ-рибозо)-полімераза виконує в ядрі декілька функцій: бере участь в репарації ДНК, пригнічує активність Ca^{2+} , Mg^{2+} -залежних ендонуклеаз та активує протеасомне розщеплення пошкоджених ядерних білків [193]. Ca^{2+} , Mg^{2+} -залежні ендонуклеази, які активуються у результаті опосередкованої каспазами інактивації ПАРП, викликають упорядковане розщеплення молекули ДНК, що характерно для апоптозу.

Слід зазначити, що в деяких видах клітин апоптичний сигнал, опосередкований мембранними рецепторами не викликає достатньої для реалізації ефекторної стадії апоптозу активації каспазного каскаду до тих пір поки не буде ампліфікований за участі мітохондрії [73,142]. Зв'язок між

каспазним сигнальним каскадом та мітохондріями здійснюється за допомогою проапоптичного білка Bid, гідроліз якого каспазою-8 сприяє транслокації С-кінцевого фрагменту останнього (tBid) до мітохондрій та індукції як самостійно, так і за участі білків Bax і Bak, вивільнення з міжмембранного простору мітохондрій проапоптичних чинників з подальшою активацією каскаду протеолітичних ферментів родини каспаз.

Слід відмітити, що мітохондріальний шлях реалізації апоптозу передбачає активацію переважно каспази-3, однак в даному випадку до взаємодії залучається ініціаторна каспаза-9. Вивільнення з мітохондрій цитохрому *c* викликає АТФ-залежне перетворення прокаспази-9 у активну форму за участі цитоплазматичного фактору APAF-1. APAF-1 – це білок, основна функція якого полягає у просторовому зближенні компонентів та формуванні ініціюючого комплексу. Так, конформаційні перебудови APAF-1, обумовлені його взаємодією з цитохромом *c*, сприяють укладці APAF-1 у певну мультимерну структуру, до CARD-доменів якої у еквімолярному співвідношенні приєднуються молекули прокаспази-9 [73]. Просторове зближення останніх, як вважають, призводить до міжмолекулярної взаємної активації прокаспаз-9. Далі до утвореного комплексу приєднуються молекули прокаспази-3 і формується апоптосома – протеолітичний комплекс, який включає цитохром *c*, APAF-1, каспазу-9, прокаспазу-3 та призначений для відповідної просторової орієнтації прокаспаз-3 відносно активних центрів каспази-9. Внаслідок чого відбувається протеолітичний процесінг прокаспази-3 з утворенням активної форми цієї ефекторної каспази [82,162,202,206,214].

Поряд з описаними вище механізмами, активація деяких ініціаторних та ефекторних каспаз може відбуватися за участі ряду протеолітичних ферментів, що не належать до родини каспаз, зокрема серинової протеїнази гранзиму В [188,192]. Даний фермент каталізує гідроліз залишку аспарагінової кислоти у лінкерній ділянці між малою та великою субодиницями молекули прокаспази, що в кінцевому результаті

обумовлює утворення каталітично активного тетрамеру та подальшу взаємну активацію каспаз за каскадним механізмом. Показано, що *in vivo* гранзим В більш ефективно, порівняно з іншими каспазами, здійснює активацію каспази-3 та каспази-7. Так, згідно з роботою [209] за дії гранзиму В процесинг прокаспази-3 відбувається у 5 разів швидше ніж каспази-8 та у 17 разів швидше у порівнянні з каспазою-10. Однак, слід відмітити, що такий шлях активації цистеїнових протеїназ актуальний переважно у випадку індукції апоптозу цитотоксичними Т-лімфоцитами.

Ще одним класом ферментів, які як безпосередньо так і опосередковано беруть участь в процесі активації каспаз під час розвитку апоптозу, індукованому дією чинників різної природи є лізосомальні протеїнази - катепсини, вивільнення яких у цитоплазму спостерігається на ранніх етапах програмованої клітинної загибелі [125,206]. На клітинах ліній HeLa та L929 була продемонстрована здатність катепсину В викликати процесинг прокаспази -1, -3, -11. Заслужовують на увагу дослідження [101], в яких показано, що специфічне розщеплення каспаз саме за залишком аспарагіну не є обов'язковою умовою активації даних ферментів, оскільки їх розрізання, зокрема каспази-7 після залишку гліцину у положенні 194 катепсином G також призводить до активації ферменту.

Існують дані наукових досліджень в яких вказується на безпосередню участь цистеїнових протеїназ в активації ряду ферментів, причетних до деградації ДНК. Епагі та співав. [106], досліджуючи цитозольні екстракти клітин, індукованих до апоптозу, виявили фермент, що у клітинах людей був ідентифікований як дезоксирибонуклеаза DFF [48]. Даний фермент є гетеродимером, що складається з 40 кДа каталітичної (DFF40) та 45 кДа інгібіторної (DFF45) субодиниць. В інтактних клітинах фермент локалізований у цитоплазмі, де перебуває у неактивному стані. Під час апоптозу за дії каспази-3 та меншою мірою каспази-7 відбувається протеолітична деградація DFF45 у специфічному

сайті розпізнання (Asp^{117} і Asp^{224}), що призводить до вивільнення з комплексу DFF40 та його міграції у ядро. Недавно проведені дослідження [48] продемонстрували можливість розщеплення інгібіторної субодиниці за участі гранзиму В. Слід зазначити, що каспаза-3 та гранзим В мають спільний сайт розрізання, що важливо для індукції фрагментації ДНК під час каспазо-залежного та каспазо-незалежного шляхів апоптозу.

Активовані каспази розщеплюють зв'язки, утворенні карбоксильними групами залишків аспарагінової кислоти. Специфічність розщеплення забезпечується природою трьох або більше амінокислот, які знаходяться у пептидному ланцюгу безпосередньо перед залишком аспарагінової кислоти. Однак, не зважаючи на те, що велика кількість білків мають специфічну для розщеплення каспазами послідовність амінокислот, лише деякі з них розщеплюються каспазами. Тому такий протеоліз пов'язаний лише з певними ключовими білками [14,65,216].

Субстратами каспаз є актинзв'язуючі білки – гельзолін та філамін. Каспаза -3 розщеплює білок цитоскелету гельзолін, що веде до дисоціації плазматичної мембрани від цитоскелету на стадії формування апоптичних тілець. Філамін з молекулярною масою 280 кДа також гідролізується під дією каспаз [83]. Проте механізм його впливу на процес апоптозу вивчений недостатньо.

Окрім каспаз до клітинної загибелі залучені протеїнази інших типів. Показана роль серинових протеїназ (гранзимів) у апоптозі, індукованому радіацією, глюкокортикоїдами. Субстратами серинових протеїназ є білки ядерного матриксу, гістони та негістонові білки [120,167,205].

До апоптозу лімфоцитів тимуса та селезінки щурів, викликаного дією променевого чинника, також залучені Ca^{2+} -залежні протеїнази калпаїни, субстратами яких також є білки ядерного матриксу та цитоскелету [14,34]. Окрім того, показана роль убіквітин-залежних

протеїназ у загибелі лімфоцитів після дії γ -радіації, при цьому розщеплюється білок p53, онкобілок c-myc та різні цикліни [94].

Згідно з сучасними уявленнями регуляція активації каспаз може відбуватися за декількома механізмами: по-перше, на рівні регуляції транскрипції генів прокаспаз, по-друге, за рахунок обумовленого антиапоптичними білками родини Bcl-2 та деякими поліпептидами пригнічення просторового зближення і, відповідно, взаємної трансактивації молекул прокаспаз. Окрім того, активність каспаз на всіх етапах апоптозу контролюється специфічними клітинним білковими інгібіторами (IAPs). Принципове значення при цьому має взаємодія мітохондріального білка DIABLO, який з'єднуючись у цитоплазмі з IAP, сприяє протеосомній деградації останнього та активації каспази-3 та -9 [146,162,214]. Разом з тим, сама каспаза-3 також здатна розщеплювати IAP-1 з утворенням фрагментів з молекулярною масою 52 кДа та 35 кДа [95,182]. Встановлено [190], що у деяких пухлинних клітинах активність каспази-8 регулюється за участі ще одного інгібіторного білка (FLIP), який розпізнаючи та зв'язуючи сигнальний комплекс DISC попереджує передачу апоптичного сигналу у цитоплазму.

Слід зазначити, що до появи морфологічних ознак апоптозу (конденсація ядерного матеріалу, фрагментація ядра), відбувається зниження величини електричного потенціалу мітохондріальної мембрани. Механізм зміни потенціалу мітохондрій пов'язують із відкриттям так званих пор зміни проникності (permeability transition pore – PTP) та вивільненням із міжмембранного простору у цитозоль апоптогенних факторів [18,79,119].

На сьогодні запропоновано дві гіпотези, які пояснюють механізми вивільнення апоптогенних чинників з мітохондрій: перший - осмотично індукований розрив зовнішньої мітохондріальної мембрани, який відбувається у результаті набрякання мітохондрій, другий – утворення специфічних каналів у зовнішній мембрані мітохондрій за участі білків

підродини Вах [117.119]. Результатом обох шляхів пермеабілізації зовнішньої мембрани є вивільнення з міжмембранного простору мітохондрій проапоптичних білків, таких як цитохром c, AIF (апоптозіндукуючий фактор), інгібіторів антиапоптичних регуляторних білків SMAC/ DIABLO та Omi/HtrA2 [134.181].

Таким чином, каспази відіграють вирішальну роль в розвитку радіаційно-індукованої програмованої клітинної загибелі, здійснюючи проведення як екзо-, так і ендогенних апоптичних сигналів до відповідних ефекторних молекул та забезпечуючи їх взаємозв'язок.

1.2.2. Участь лізосомальних протеїназ у активації та розвитку апоптозу

На сьогодні не викликає сумніву, що участь лізосомальних протеїназ в індукторній та ефекторній стадіях апоптозу – запрограмованої клітинної загибелі є одним з важливих регуляторних механізмів життєдіяльності. Апоптоз є реалізацією програми, яка закладена у геномі клітин. Це активний і контрольований фізіологічний механізм клітинної загибелі, який задіяний також у патогенезі ряду захворювань, та реалізується при дії різноманітних індукторів, у тому числі і іонізуючої радіації.

Згідно концепції лізосомального апоптичного шляху, порушення цілісності лізосом є найбільш раннім етапом деградаційного каскаду, який передуює активації таких маркерів апоптозу як каспази, збільшенню проникності внутрішньої мембрани мітохондрій та інш. На особливу увагу заслуговує катепсин В (КФ 3.4.22.1), оскільки він є найбільш стійким з усіх катепсинів при переході з кислого внутрішньолізосомального середовища у нейтральне середовище цитоплазми і відіграє провідну роль у різноманітних моделях апоптозу, зокрема радіаційно-індукованому.

Вважають, що катепсину В належить важлива роль в катаболізмі білків, хоча дослідження дії цього ферменту ускладнюються тим, що його важко відрізнити від дії інших цистеїнових протеїназ. Проте можна припустити, що в розщепленні основної маси білків у клітинах беруть участь окрім катепсину В також інші лізосомальні протеїнази, зокрема катепсини Н і L, оскільки повністю блокувати деградацію білка в клітинах лейпептином не вдається. При деяких патологічних станах клітин, наприклад у клітинах меланоми миші, а також у деяких нормальних клітинах (щитоподібна залоза) спостерігається перерозподіл катепсину В і поява цього лізосомального ферменту в інших клітинних структурах та у цитоплазмі.

На сьогодні у людей ідентифіковано 11 представників родини катепсинів, які згідно з роботами [81,192] поділяються на катепсин L-подібні (катепсини L, V, S, K, F, H) та катепсин В-подібні (катепсини В, С, О, Х) протеїнази. Лізосомальні цистеїнові протеїнази це невеликі білкові молекули, молекулярна маса яких, за виключенням катепсину С (200 кДа), знаходиться в межах 20-30 кДа. Для більшості ізоферментів катепсину В на N-кінці поліпептиду виявлено залишок лейцину; окрім того, до складу молекули катепсину В входить 12 залишків цистеїну.

Катепсини синтезуються у ендоплазматичному ретикулумі у вигляді неактивних проферментів, протеолітичний процесинг яких відбувається на стадії формування пізніх ендосом або у лізосомах шляхом аутоактивації чи за участі інших пептидаз, зокрема пепсину, еластази нейтрофілів та інших [153,172].

Окрім традиційної функції неселективної деградації білків всередині лізосом катепсини беруть участь у протеолізі ряду білків за межами лізосом. Так, катепсини В, L, S залучені до процесингу та презентації антигенів під час імунної відповіді, катепсин К – до ремоделювання клітинного матриксу під час розвитку кісткової тканини [89,116]. До цитоплазми ферменти надходять у вигляді мономерів, які,

зазвичай, для прояву активності не потребують конформаційних змін молекули. Хоча, катепсин В поза клітинами виявляється в двох формах. Одна з яких – латентна і активується при обробці пепсином, друга – активна. За величиною молекул обидві форми приблизно однакові.

Відповідно до сучасних уявлень лізосомальні цистеїнові протеїнази розглядаються як позитивні медіатори апоптозу, що задіяні в реалізації як початкових, так і кінцевих етапів клітинної загибелі, однак роль конкретних механізмів та зв'язок з іншими клітинними апоптичними шляхами залишається до кінця не з'ясованим. Серією експериментальних досліджень було продемонстровано, що лізосомальні протеїнази можуть залишатися стабільними та зберігати активність при фізіологічних значеннях рН впродовж кількох годин після надходження до цитоплазми, що і обумовлює їх деструктивний потенціал під час розвитку клітинної загибелі за шляхом апоптозу [172]. Ряд авторів постулює участь катепсинів в активації безпосередніх виконавців апоптозу – ефекторних каспаз [128,163,178,211]. Експерименти, проведені *in vitro* показали, що дія катепсину В направлена переважно на превалюючу у клітині каспазу-3. Окрім того, була показана роль катепсину В у розвитку апоптозу, індукованого $\text{TNF}\alpha$, у клітинах де каспази були заблоковані [110]. Це дозволяє припустити, що механізм дії катепсину В може відбуватися незалежно від каспаз.

Проте, у сучасній науковій літературі більш поширеною є модель згідно з якою вивільнення лізосомальних протеїназ викликає мітохондріальну дисфункцію та надходження до цитоплазми проапоптичних білків в результаті прямої та опосередкованої дії катепсинів [86,87]. Дослідження Zhao M. et al. [211] показали, що додавання очищених катепсинів В і D до мітохондрій *in vitro* призводить до значного зростання ступеня генерування мітохондріями активних кисневих метаболітів. Встановлено [116], що катепсин В індукує мінімальний вихід цитохрому с, в той час як інкубація ізольованих

мітохондрій з катепсином В за присутності цитоплазматичних екстрактів супроводжується значним вивільненням цитохрому с та розвитком характерних морфологічних ознак апоптозу. Для пояснення одержаних результатів Stoka et al. [178] запропонував механізм опосередкованого катепсинами розвитку апоптозу. В основі даного механізму є безпосереднє розщеплення катепсинами молекули проапоптичного білка Bid, який ініціює апоптоз за мітохондріальним шляхом. Як відомо, деградація Bid може здійснюватися також за участі каспази-8 та гранзиму В, але локуси розрізання при цьому відмінні від сайту, що розпізнається катепсинами.

Отже, на початкових етапах апоптозу катепсини можуть діяти як самостійні медіатори апоптозу, викликаючи активацію залежного від мітохондрій шляху індукції програмованої клітинної загибелі.

До цього часу залишаються невідомими механізми виходу протеолітичних ферментів із лізосом у відповідь на дію різноманітних індукторів програмованої клітинної загибелі, а також специфічність їх дії до тих чи інших регуляторних систем апоптозу. Показано, що пермеабілізація мембран лізосом спостерігається майже відразу після дії індукторів апоптозу і відбувається внаслідок сукупного впливу ряду факторів, зокрема радіаційно-обумовленого накопичення у клітинах вільних радикалів і подальшої активації за їх участі процесів перекисного окиснення ліпідів та активації фосфоліпаз. Підвищення проникності мембран також може бути пов'язано з внутрішньолізосомальними чинниками, наприклад, з акумуляцією всередині лізосом сфінгозину – речовини, що володіє вираженими лізосомотропними властивостями і подібно до детергентів викликає порушення цілісності лізосом [131].

Слід відмітити, що ступінь пошкодження лізосомальних мембран є одним із факторів, які визначають спрямованість клітинної загибелі по шляху апоптозу чи некрозу. Так, при незначних пошкодженнях лізосом спостерігається апоптична загибель, в той час як при значному порушенні цілісності мембран, обумовленому, зокрема розвитком у клітинах

оксидативного стресу відбувається надмірне надходження у цитоплазму лізосомальних гідролітичних ферментів і індукція некрозу.

Таким чином, на сьогодні запропонована модель лізосомальної теорії апоптозу, яка деталізується шляхом доповнення, розширення і отримання нових експериментальних підтверджень. У результаті дії як поза- так і внутрішньолізосомальних факторів відбувається порушення цілісності лізосомальних мембран і гідролітичні ферменти, які вивільнилися з лізосом можуть: по-перше, прямо атакувати мітохондрії з подальшим надходженням проапоптичних факторів (у тому числі і цитохром c, AIF та інші) у цитоплазму. У цьому процесі визначна роль належить білку Bid, який після протеолізу запускає каскад мітохондріально-опосередкованої клітинної загибелі, і по-друге - активувати літичні проферменти, такі як фосфоліпаза A₂, дія яких направлена на дестабілізацію мітохондріальних та лізосомальних мембран, а також стимулювати каспазний каскад.

1.3. Стан полі-(АДФ-рибозо)-полімеразної системи за дії іонізуючої радіації

В останній час увагу дослідників привертає питання про участь полі-АДФ-рибозилування у механізмах апоптичної загибелі клітин. Чільне місце у модифікації білків хроматину належить саме системі полі-АДФ-рибозилування. Інтенсивним дослідженням реакцій АДФ-рибозилування передували ряд відкриттів. Встановлено, що інкубація ізольованих ядер з нікотинамідмононуклеотидом значно збільшує включення мічених по аденіну залишків АТФ у полінуклеотид, склад якого був ідентифікований як полі-АДФ-рибоза. Пізніше у роботах Colier і Rappengeimer (1968) була

показана можливість моно-АДФ-рибозилування цитоплазматичних білків у клітинах ссавців під дією бактеріальних токсинів [97].

АДФ-рибоза характеризується високою метаболічною лабільністю. Залежно від типу клітин та фізіологічного стану організму вона може існувати як у мономерному, так і полімерному станах. *In vivo* більша частина залишків полі-АДФ-рибози зв'язана з білками, однак показана можливість синтезу вільного полімеру [28,208]. Встановлено, що АДФ-рибозилуванню підлягають ряд ферментів, які беруть участь у метаболізмі ДНК (реплікація, репарація, транскрипція) та широкий спектр білків, задіяних у підтриманні структури хроматину.

На сьогодні встановлено, що ферментом, який виявляє такі каталітичні функції, як НАД⁺-глікогідролазну та полі-АДФ-рибозополімеразну (ініціація та моно-(АДФ-рибозилування) субстратів, елонгація та розгалуження полі-АДФ-рибози) [60] і є основним у реалізації останньої за умов пошкодження ДНК є полі-(АДФ-рибозо)-полімераза (ПАРП) або АДФ-рибозотрансфераза (КФ 2.4.99). Характерною особливістю цього ферменту є складна мультидоменна структура (ДНК-зв'язуючий домен, аутомодифікуючий та каталітичний домен), що пов'язана з широким спектром функцій ПАРП - підтримання стабільності ДНК із залученням у процеси її репарації, регуляція активності ендонуклеаз, підтримка структурної і функціональної цілісності хроматину, регуляція транскрипції та клітинна диференціація. Але, на думку багатьох авторів, головним субстратом ферменту є сама полі-(АДФ-рибозо)-полімераза.

Встановлено, що активація (АДФ-рибозо)-полімерази відбувається за присутності одно- та дволанцюгових розривів у молекулі ДНК. ПАРП зв'язується електростатично з кінцями розривів, утворених як при безпосередньому пошкодженні ДНК генотоксичними чинниками, так і під час дії ферментів ексцизійної репарації [175]. Таким чином, з'єднуючи кінці розриву ДНК, фермент з одного боку захищає її від дії нуклеаз і,

разом з тим, перешкоджає гомологічним рекомбінаціям та обмінам між сестринськими хроматидами. При цьому активність полі-(АДФ-рибозо)-полімерази зростає майже у 500 разів порівняно з активністю ферменту за присутності нативної ДНК. Результати ряду досліджень свідчать, що активація полі-(АДФ-рибозо)-полімерази залежить як від типу розривів (одно- чи дволанцюгові), так і від хімічної будови кінцевих ділянок ДНК.

В експериментах Davies M. et al. [98], які досліджували особливості активності ПАРП у L-клітинах мишей за променевого ураження, було показано, що максимальна активність ферменту спостерігається через 15 хв після опромінення та нормалізується через 2-3 години після дії променевого чинника. За іншими даними [43] показано зниження активності полі-(АДФ-рибозо)-полімерази у тимоцитах щурів за дії іонізуючої радіації у дозі 10 Гр. Ферментативна активність ПАРП майже не змінювалась протягом першої години після дії променевого чинника, а вже через 2 та 3 год починала знижуватись на 35% і 45% відносно контролю [133]. Вважається, що такі зміни є одним з проявів відповідної реакції лімфоцитів на опромінення.

Для пояснення таких суперечностей Kaufmann et. al. [132] вперше було висловлено гіпотезу, що на ранніх етапах радіаційно-індукованої програмованої загибелі активність інтактної ПАРП стимулюється розривами ДНК, але на більш віддалених термінах протеолітична деградація ферменту призводить до зниження його активності. Вже через 30 хв після дії індуктора апоптозу відбувається розщеплення ПАРП за участю протеаз родини каспаз на 24 кДа фрагмент, зв'язаний з ДНК та 89 кДа фрагмент, що містить каталітичний та аутомодифікуючий домени [164]. На сьогодні немає одностайної думки з приводу ролі процесів полі-(АДФ)-рибозилування в реалізації апоптозу. Так, на думку Suzuki K [183], полі –АДФ-рибозилування ядерних білків є необхідним етапом апоптозу. В той же час ряд дослідників [164,201] висувують гіпотезу, що у певних формах програмованої клітинної загибелі ПАРП не задіяна, але її

протеолітичне розщеплення є необхідною умовою перебігу саме апоптичних процесів.

Субстратом ПАРП є нікотинамідаденіндинуклеотид (НАД^+), і на сьогодні постулюється, що катаболізм НАД^+ в клітинах ссавців протікає в основному за участі полі-(АДФ-рибозо)-полімерази. За дії ряду ДНК-пошкоджуючих агентів, в тому числі і γ -радіації, кінетика розпаду НАД^+ має двофазний характер: зниження на 65-75% рівня НАД^+ може бути індуковано невеликими дозами генотоксичних агентів, в той час як останні 25-35% вимагають дуже високих доз ушкоджуючих стимулів [154]. Так, в експериментах Денисенко М.Ф. та співавт [21] при дослідженні рівня нікотинамідаденіндинуклеотиду у лімфоцитах тимуса мишей за променевого ураження в дозі 10 Гр, було показано, що концентрація НАД^+ знижується на 43% відносно контролю.

Згідно з [164,174]. різке зниження вмісту НАД^+ при дії ряду ДНК-ушкоджуючих стимулів може бути завершено впродовж 15-30 хвилин.

Деградація НАД^+ і приєднання кожного залишку АДФ-рибози до полімеру супроводжується утворенням молекули нікотинаміду. Останній включається у реакції ресинтезу НАД^+ , які протікають безпосередньо в ядрі. Слід зазначити, що надлишок нікотинаміду викликає пригнічення каталітичної функції полі-(АДФ-рибозо)-полімерази, при цьому фермент не оборотно зв'язується з розривами ДНК, перешкоджаючи їх репарації [43].

Активація ПАРП, яка супроводжується розщепленням НАД^+ з утворенням нікотинаміду та АДФ-рибози, призводить у свою чергу до зниження рівня клітинного АТФ: з одного боку НАД^+ є носієм електрону в реакції окиснення гліцеральдегід-3-фосфату в гліколітичній ланці синтезу АТФ, з іншого – реконверсія нікотинаміду в НАД^+ вимагає енергії АТФ. Таким чином, надмірне споживання НАД^+ призводить до зменшення вмісту АТФ. Пригнічення репарації запобігає витрати енергії та зберігає АТФ у клітині на достатньому для завершення апоптозу рівні. Проте,

зниження вмісту АТФ до 30 % призводить до розвитку некротичної загибелі [177].

Біологічна функція полімеру АДФ-рибози на сьогодні остаточно не з'ясована. На основі аналізу сучасних літературних джерел можна зробити висновок про важливість АДФ-рибозилування ядерних білків для забезпечення нормального протікання внутрішньоклітинних процесів, зокрема, таких як синтез ДНК і модифікація її структури, регуляція клітинної проліферації, генна експресія та інше (табл. 1) [99]. За деякими класифікаціями [126] полі-АДФ-рибозу відносять до нового класу сигнальних молекул, оскільки специфічна взаємодія між полімерами АДФ-рибози та ряду клітинних білків може призвести до активації додаткових сигнальних шляхів клітинної відповіді.

Ядерними субстратами ПАРП є катіон-залежні ендонуклеази. В нормі синтезовані молекули нуклеаз досягають клітинного ядра, де відбувається їх модифікація – (АДФ)-рибозилування. Наявність кількох залишків АДФ-рибози забезпечує інактивацію нуклеази. Показано, що в результаті дії апоптогенних чинників в ізольованих ядрах розщеплення ДНК спостерігається після певного періоду. Вірогідно, в цей час відбувається відщеплення полі-(АДФ)-рибози від молекул ферменту, що призводить до його активації з наступною фрагментацією генетичного матеріалу. За протеолітичної деградації полі-(АДФ-рибозо)-полімерази синтезовані молекули Ca^{2+} , Mg^{2+} -залежної ендонуклеази не модифікуються і залишаються активними.

За останні роки значно збільшилась кількість робіт, що вказують на залучення системи полі-АДФ-рибозилування у процес відновлення структурної цілісності ДНК. Так, на сьогодні показана участь ПАРП у системі ексцизійної репарації, деякі фактори якої функціонально об'єднанні у багатокомпонентні білкові комплекси, до яких окрім полімерази входять також XRCC1, ДНК-лігаза III, ДНК-полімераза β . Робота мультиферментного репараційного комплексу ускладнена завдяки

щільній укладці ДНК у нуклеосоми, що значно знижує швидкість репарації цих ділянок геному [185]. Саме завдяки участі ПАРП відбувається як модифікація білків хроматину з подальшими структурними перебудовами, так і прискорення орієнтації комплексу ексцизійної репарації до сайтів ушкодженої ДНК.

Таблиця 1

Ядерні субстрати ферменту полі – (АДФ-рибозо)-полімерази [99]

СУБСТРАТИ	ФУНКЦІЇ
Гістон H1	Модулятори структури хроматину
Гістони: H2A; H2B; H3; H3d; H4; H5	
HMGпротеїни	
LMGпротеїни	
ПАРП	
Топоізомераза I	
Топоізомераза II	
ДНК-лігаза I	Синтез ДНК
ДНК-лігаза II	
ДНК-полімераза α	
ДНК-плімераза β	
Топоізомераза II	
ПАРП	Репарація ДНК
ДНК-лігаза I	
ДНК-лігаза II	
ДНК-полімераза α	
ДНК-плімераза β	
Гістони	Клітинний цикл
p53	
Ca ²⁺ , Mg ²⁺ ендонуклеази	Інші функції
Ламіни: A; B	
нуклеолін	

Згідно з літературними даними ПАРП відіграє провідну роль під час репарації ДНК, структурно організованої у хроматин. Відомо, що модифікації білків хроматину можуть призводити як до посилення, так і до послаблення їх зв'язування з ДНК і, відповідно, до зміни ступеня

конденсації хроматину та доступності ДНК для ферментів репарації. У сучасній науковій літературі широко представлені дані відповідно до яких кінетика репарації залежить від присутності на молекулі ДНК гістонів [208]. Розриви ланцюгів ДНК, обумовлені дією генотоксичних чинників або інцизією пошкоджених основ ендонуклеазами, є сигналом для синтезу полімерів АДФ-рибози. При цьому відбувається збільшення негативного заряду гістону H1 внаслідок його АДФ-рибозилування, що викликає дисоціацію останнього від ДНК та зміну щільності укладання ДНК у хроматинових гранулах [21]. Ці локальні порушення конформації можуть виявитись критичними для репарації висококонденсованого хроматину.

Підтвердженням цьому є той факт, що за відсутності ПАРП репарація конденсованих транскрипційно неактивних ділянок геному протікає менш ефективно, ніж транскрипційно активних, які переважно характеризуються відкритою хроматиною структурою, що полегшує доступ для факторів транскрипції та ферментів репарації.

Отже на сьогодні постулюється присутність балансу між позитивним (участь у репарації ДНК) та негативним (проапоптичним та пронекротичним) впливом ПАРП на виживання клітини.

Згідно з сучасною концепцією участі ПАРП в процесах клітинної загибелі за впливу генотоксичних чинників відмічаються три шляхи в залежності від інтенсивності дії :

1. Активація ПАРП помірними генотоксичними стимулами сприяє репарації ДНК шляхом взаємодії з білками ДНК-репараційного комплексу та ДНК-залежною протеїнкіназою. В результаті цього процесу відбувається репарація дезоксирибонуклеїнової кислоти з подальшим виживанням клітин.
2. Більш значні порушення ДНК індукують програмовану клітинну загибель, під час якої каспази- основні ефекторні ферменти апоптозу,

інактивують ПАРП. Цей шлях сприяє елімінації клітин з незворотними порушеннями дезоксирибонуклеїнових комплексів. Деградація ПАРП при цьому попереджує можливість значної активації ферменту за рахунок подальшого зростання рівня фрагментованої ДНК, що може, в свою чергу, призвести до протікання клітинної загибелі шляхом некрозу.

3. Третій шлях індукується значними структурними порушеннями ДНК, що стимулюються в основному за рахунок оксидативного стресу. При цьому відбувається гіперактивація ПАРП з подальшим виснаженням НАД⁺ і відповідно АТФ. Зміни стану енергезації клітини призводять до порушення нормального протікання апоптичних процесів, ряд етапів яких є АТФ-залежними. Таким чином активуються процеси, пов'язані з ескалацією некротичного шляху загибелі клітин.

Отже, за дії променевого чинника в клітинах лімфоїдних органів активується реалізація програмованої клітинної загибелі шляхом апоптозу, в якій значна роль належить процесам, пов'язаним з відхиленням в роботі системи АДФ-рибозилування.

1.4. Біохімічні та фізіологічні аспекти дії рибоксину

Дослідження особливостей пуринового обміну у нормі та при різних видах патологій вказують на корегуючу дію пуринових нуклеотидів і нуклеозидів при корекції ряду метаболічних порушень. У сучасній науковій літературі широко представлено дані щодо активуючого ефекту рибонуклеозиду гіпоксантину – інозину (рибоксину) на перебіг енергетичних та синтетичних реакцій у клітинах, зокрема на біосинтез нуклеотидів і коферментів. У дослідях з використанням міченого інозину було показано, що його введення піддослідним тваринам супроводжується зростанням рівня АТФ у клітинах, які перебувають у стані аноксії.

Враховуючи суттєве значення рівня ендogenous АТФ для нормалізації біохімічних процесів після дії променевого чинника, а також участь макроергу у стимуляції ферментних систем репарації, проводилися дослідження різноманітних попередників синтезу АТФ як можливих протипроменевих засобів. Було показано, що профілактичне введення піддослідним тваринам препаратів високополімерної РНК чи ДНК внаслідок їх модифікуючого впливу на біоенергетичні, біосинтетичні реакції та стимуляцію процесів післяпроменевого відновлення критичних систем організму сприяє зростанню частки особин, які вижили після дії іонізуючої радіації [39]. Подальші дослідження проведені у даному напрямку дозволили виявити певні захисні властивості у ряду полінуклеотидів і нуклеозидів [149]. Згідно з результатами, представленими у літературі, рибоксин має здатність знижувати ступінь променевого ураження організму за опромінення тварин у широкому діапазоні доз як гострого, так і хронічного опромінення [32,36,159]. На підставі аналізу літератури можна зробити висновок про існування певної залежності захисного ефекту рибоксину від дози іонізуючої радіації. Так, за умови опромінення безпорідних мишей R-променями в дозі 7,5 Гр профілактичне введення рибоксину сприяє виживанню близько 32% порівняно з тваринами, що зазнали дії променевого чинника [13]. Експерименти, проведені на більш радіостійких гібридних мишах, дозволили виявити захисний ефект препарату (72%) при дії променевого фактору в дозі 8,0 Гр [69]. Соколов І.К. з співав. [54] вказують на радіозахисний ефект рибоксину за радіаційного впливу в дозі 10 Гр: при його однократному введенні щурам перед опроміненням спостерігається зниження показника смертності тварин на 40% та відзначається тенденція до зростання середньої тривалості життя піддослідних тварин. Подальше підвищення дози радіації призводить до послаблення захисного ефекту рибоксину і у діапазоні доз вище 12 Гр введення рибоксину не забезпечує захист тварин.

Спостерігається стимулюючий ефект рибоксину на процеси регенерації у високорадіочутливих тканинах. Легеза В.І. та співавт. [35] виявили, що введення рибоксину перед опроміненням тварин в дозі 4,0 Гр сприяє більш ранньому відновленню загальної кількості ядровмісних клітин у кістковому мозку. На основі дослідження мітотичної активності та аналізу реципрокних взаємодій між основними групами клітин автори показали, що у кістковому мозку захищених рибоксином тварин зберігається більше клітин-попередників, необхідних для відтворення популяційного складу. Застосування рибоксину попереджає різке зниження вмісту еритроцитів, ретикулоцитів, лейкоцитів та в цілому приводить до більш інтенсивного гемопоезу. Так, на 15-ту добу після радіаційного впливу вміст лейкоцитів у крові мишей, що отримували препарат, був у 2,5 раза вищим, кількість лімфоцитів та нейтрофілів також зростала порівняно з опроміненими тваринами. Цими ж авторами показано стабілізуючий вплив рибоксину на клітинні мембрани, про що свідчить підвищення стійкості еритроцитів до гемолізу, індукованого застосуванням 2,5% пероксиду водню. Встановлено, що використання рибоксину послаблює пошкоджуючу дію іонізуючої радіації на генетичний апарат клітин кісткового мозку: через добу кількість клітин, що містила хромосомні аберації, була приблизно на 15% нижчою, ніж у тварин, опромінених в дозі 4,0 Гр [69].

Вважається, що реалізація захисного ефекту рибоксину можлива за рахунок підвищення загальної (неспецифічної) резистентності організму до несприятливих умов середовища, в тому числі і до дії променевого фактору, внаслідок мобілізації захисних ресурсів організму [36].

Вплив препарату на перебіг клітинних процесів може визначатися його здатністю корегувати рівень ендогенного цАМФ, який, як відомо, відіграє певну роль у забезпеченні резистентності організму до іонізуючої радіації [50] та згідно сучасних уявлень бере участь у реалізації механізмів дії багатьох імуномодуючих агентів і радіопротекторів. Остапченко Л.І.

і співавт. [46] було показано значні післярадіаційні зміни вмісту циклічних нуклеотидів, зокрема, зниження концентрації цАМФ у лімфоцитах селезінки щурів внаслідок порушень у функціонуванні ферментних систем їх синтезу та гідролізу. Рибоксин здатний інгібувати активність ферменту фосфодіестерази [13] і цим призводить до збереження на момент опромінення вмісту циклічного нуклеотиду. Останній сприяє зростанню у клітинах концентрації НАД⁺, активує ферментні системи відновлення генетичних структур, забезпечує біосинтез нуклеїнових кислот.

Підвищення при застосуванні рибоксину загальної стійкості організму до дії променевого чинника може бути пов'язано з відомим фактом про здатність препарату інгібувати процеси перекисного окиснення ліпідів та здійснювати активуючий вплив на функціонування ендогенної антиоксидантної системи організму [5,59], в результаті чого у клітинах виникає своєрідний „біохімічний фон”, що сприяє зниженню інтенсивності первинних радіаційно-індукованих деструктивних процесів. Так, на момент радіаційного впливу вміст МДА у крові мишей, що отримували рибоксин, був на 30% нижчим порівняно з опроміненими тваринами; дана тенденція зберігалася впродовж 6 год з моменту опромінення [35]. Згідно з Рудик Б.І. [52] препарат сприяє зростанню концентрації відновленого глутатіону при одночасному зниженні інтенсивності вільнорадикального окиснення ліпідів у клітинах міокарду за гострого інфаркту. Аналогічні результати було отримані у роботах [72,143], де автори відзначають активацію антиоксидантного ферменту СОД у крові та зменшення вмісту МДА у гепатоцитах щурів при введенні інозину. Нарешті, продукт деградації інозину – сечова кислота має виражені антиоксидантні властивості: її утворення можна розглядати як своєрідний компенсаторний механізм при розвитку у клітинах оксидативного стресу, оскільки ця речовина здатна вступати в обмінні реакції з активними кисневими метаболітами, інгібуючи таким чином процеси ПОЛ [191].

Інозин є природнім метаболітом пуринового обміну в організмі людини та тварин. Його включення у фонд пуринів можливе лише за умови розпаду на складові, оскільки безпосереднє перетворення інозину на відповідний моонуклеотид обмежується низькою спорідненістю ферменту інозинкінази (КФ2.7.1.73) до субстрату [22]. У клітинах рибоксин швидко метаболізує за участю ферменту ПНФ з утворенням пуринової основи гіпоксантину та рибозо-1-фосфату, які у подальшому включаються у різноманітні обмінні процеси [168]. Є дані щодо здатності рибоксину стимулювати деякі реакції гліколітичного окиснення глюкози, пентозофосфатного шляху, системи транспорту електронів у різних тканинах [141,207]. Первинний продукт перетворення інозину – рибозо-1-фосфат у фосфорибозилмутазній реакції перетворюється на рибозо-5-фосфат, який виступає головним попередником у реакціях, пов'язаних з синтезом нуклеотидів, нуклеїнових кислот та коферментів. Наступні перетворення рибозо-5-фосфату можуть відбуватися за кількома метаболічними шляхами. У роботі [45] відзначається стимулюючий ефект препарату рибоксину на активність ферменту початкового етапу пентозофосфатного циклу. Показано, що внесення до культурального середовища рибозо-5-фосфату викликає активацію неокиснювальної стадії пентозофосфатного шляху, у результаті чого рибозо-5-фосфат через транскето- та трансальдозазну реакції метаболізує з утворенням проміжних субстратів гліколізу (гліцеральдегід-3-фосфату і фруктозо-6-фосфату), забезпечуючи таким чином взаємозв'язок між гліколітичним та пентозофосфатним шляхами окиснення глюкози [129]. На зв'язок метаболічних реакцій перетворення інозину з гліколізом вказує також той факт, що введення препарату в організм або його інкубація з еритроцитами супроводжується зростанням у клітинах вмісту 2,3-дифосфогліцерату [109].

Включення рибозного залишку рибоксину у реакції гліколізу, з одного боку дозволяє зекономити дві молекули АТФ, що витрачаються на

ранніх стадіях і, разом з тим, за рахунок насичення субстратом гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназної реакції забезпечує протікання другого етапу гліколізу, під час якого енергія акумулюється у макроергічних зв'язках АТФ.

На основі результатів гістохімічних та електронномікроскопічних досліджень встановлено, що застосування рибоксину при експериментальному інфаркті міокарду сприяє нормалізації ультраструктури мітохондрій [45]. Позитивний вплив препарату на клітинну енергетику може бути обумовлений подальшим залученням гліколітичних продуктів до обмінних процесів. Так, продукт окисного декарбоксилювання пірувату – ацетил-КоА як початковий субстрат циклу Кребса сприяє інтенсифікації цієї важливої ланки енергозабезпечення. Ці дані узгоджуються з результатами інших дослідників, які вказують на стимулюючий вплив рибоксину на ферментативну активність сукцинатдегідрогенази [20], що у комплексі з переліченими фактами сприяє поліпшенню енергетичного стану клітини та метаболічного статусу організму в цілому.

Рибозо-5-фосфат через утворення 5-фосфорибозил-1-пірофосфату (ФРПФ) бере безпосередню участь у синтезі пуринів, оскільки на основі молекули ФРПФ можлива побудова нових нуклеозидмонофосфатів [80]. Так, при інкубації фібробластів людини з інозином спостерігається зростання концентрації рибозо-5-фосфату та ФРПФ відповідно у 40 і 3 рази, що свідчить про залучення рибозного залишку до реакцій синтезу 5-фосфорибозил-1-пірофосфату [20]. Цим можна пояснити той факт, що включення гіпоксантину у нуклеотидний фонд пуринів приблизно у 2 рази вище за умови інкубації клітин з інозином, ніж при інкубації фібробластів лише з гіпоксантином. Водночас рибозо-5-фосфат, як прямий попередник ФРПФ, забезпечує контроль над синтезом пуринів *de novo*. При збільшенні у клітинах концентрації останнього швидкість синтезу зростає, що поряд з іншими відомими механізмами забезпечує підтримання необхідного для

протікання клітинних процесів рівня АТФ. Так, внесення до перфузату рибози призводить до зростання концентрації макроергу в ізольованому серці після ішемії [19]. Окрім того рибозо-5-фосфат через ФРПФ сприяє збереженню певного рівня внутрішньоклітинного НАД⁺. 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 зниженням концентрації АТФ, що витрачається під час ресинтезу НАД⁺ та індукцією катаболічної ланки обміну пуринів. Введення рибоксиину, 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 [195].

Поряд з рибозним залишком пуриновий фрагмент рибоксиину, активуючи реутилізаційний шлях синтезу пуринів, також сприяє відновленню нуклеотидного фонду, що можливо у результаті фосфорибозилування гіпоксантину до інозинової кислоти з подальшим її включенням до складу аденілових чи гуанілових нуклеотидів через перетворення на АМФ чи ксантозин-5'-фосфату [122].

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Враховуючи мету і завдання наукового дослідження нами був вибраний наступний методологічний підхід та комплекс лабораторних методів дослідження.

2.1. Реактиви та матеріали

Синтетичні субстрати: п-нітроанілід N^a-бензоїл-D,L-аргінін (БАПНА) (“Fluka” Швейцарія), 3',5'-діамінбензойна кислота (3',5'-ДАБК) (“Fluka” Швейцарія), акридиновий оранжевий (“Sigma” США), C¹⁴-НАД⁺ (“Amersham” Англія), “ATP Monitoring Kit” (“Sigma” США), алкогольдегідрогеназа (“Reanal”, Угорщина), Caspase Colorimetic Protease Assay Sampler Kit (Caspases3) (“BioSource”, США), п-нітроанілін (“Sigma” США), флуоресцеїнізотіоціанат (“Sigma” США)

2.2. Умови проведення експерименту

Досліди проводили на білих нелінійних щурах-самцях масою 150-170 гр. Тварин утримували на стандартному раціоні віварію. З метою попередження можливого впливу добових ритмів на досліджувані показники досліди проводили в один і той же час доби. Всі експерименти на тваринах здійснювали у відповідності з „Правилами використання лабораторних експериментальних тварин”.

Препарат рибоксин у вигляді 2% водного розчину вводили за 15 хв до опромінення внутрішньочеревинно з розрахунку 150 мг препарату на 1 кг маси тварини. Опромінення здійснювали на рентгенівській установці РУМ-17 в дозах 1,0 Гр та 7,78 Гр за умов: фільтри 0,5 мм Си та 1 мм Al, 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.

2.3. Метод виділення лімфоїдних клітин тимуса і селезінки та визначення їх життєздатності

Лімфоцити тимуса виділяли згідно з методом, описаним у [68].

Тимус очищали від сполучної тканини і ретельно перетирали через нейлонову сітку з відповідним розміром пор у розчині Хенкса з 0,01М трис-НСІ, рН 7,4. Клітини відмивали у середовищі виділення 2 рази з подальшим центрифугуванням при 200g протягом 5 хв.

Очищену від сполучної тканини селезінку (600 мг) подрібнювали у чашці Петрі у розчині Хенкса з 0,01 М трис-НСІ, рН 7,4 з наступним перетиранням через чотири шари нейлону. Після десятихвилинного відстоювання надосадову рідину наносили на градієнт щільності Ficoll-Raque (густина – $1,077\text{г/см}^3$) за методом [85]. Вміст центрифугували впродовж 40 хв при 1000g після чого клітинну суспензію на межі розподілу фаз обережно відбирали за допомогою пастерівської піпетки та двічі відмивали у середовищі виділення.

Кількість одержаних клітин підраховували, використовуючи камеру Горяєва. Контроль числа лімфоїдних клітин, що загинули, проводили після профарбовування суспензії клітин барвником трипановим синім.

2.4. Оцінка структурного стану ядерних нуклеїнових кислот лімфоцитів тимуса і селезінки щурів

З метою біохімічної оцінки стану флуорохромованої ДНК ядер фіксованих клітин проводили їх мікроскопію. Аліквоту з отриманої фракції лімфоїдних клітин наносили на покривне скельце і фіксували

сумішшю Карнуа (етанол, хлороформ, льодяна оцтова кислота- 6 : 3 : 1). Підсушені при кімнатній температурі мазки профарбовували у буфері з використанням барвника акридинового оранжевого (АО) протягом 15 хв. Надалі застосовували розроблену Брітом І.С. методику зйомки та обробки клітин [12]. Виконували двохвильову послідовну фотометрію кольорових зображень (фотознімків) біологічних об'єктів, одержаних з використанням цифрової фотокамери "Olympus" C-2000 Zoom, встановленої на люмінесцентному мікроскопі фірми Carl Zeiss Iena (Німеччина). Програма автоматично розраховувала співвідношення інтенсивностей люмінесценції вимірюваних зон клітин у червоній (640 нм) і зеленій (530 нм) областях спектру (точність: $\alpha \pm 0,05$) та будувала графіки за параметром α [$\alpha = I_{640} / I_{530}$], який відповідає інтегральному показнику ступеня спіралізації ядерного хроматину та стану синтетичного апарату клітини.

2.5. Визначення активності ендогенних протеїназ лімфоцитів тимуса та селезінки щурів

Лімфоїдні клітини (2×10^7 клітин) ресуспендували у щільно притертому гомогенізаторі Поттера в 20 об'ємах буфера, який містив: (0,1 М трис-НСl, рН 8,5; 0,05 М NaCl; 0,05% тритон X-100).

Протеолітичну активність визначали флуоресцентним методом згідно з [40].

Як субстрат використовували казеїн з флуоресцентною міткою (флуоресцеїнізотіоціанат). До 0,1 мл гомогенату додавали 2,5 мл 0,5 М боратного буфера рН 8,8, з 0,15 М NaCl та 0,2 мл казеїн-флуоресцеїнізотіоціанату. Проби інкубували при 37°C протягом 4 годин. Реакцію зупиняли додаванням 5% ТХО.

Флуоресценцію вимірювали на спектрофлуориметрі Shimadzu RF-150 при довжині хвилі збудження 490 нм та емісії 525 нм.

Приготування казеїн-флуоресцеїнізотіоціанату проводили згідно [173]. 1 г казеїну розчиняли у 100 мл 0,05 М карбонатного буфера, рН 9,5, що містив 0,15 М NaCl. До розчину додавали 40 мг флуоресцеїнізотіоціанату, суміш перемішували при кімнатній температурі протягом години. Далі проводили діалізи: в 2 л дистильованої води при 4°C; потім проти 0,05 М трис-HCl буфера, рН 7,2. Після центрифугування проб при 400g протягом 10 хв, осад розчиняли в 0,05 М трис-HCl буфері, рН 7,2.

2.6. Визначення активності катепсину В у тимоцитах та спленоцитах щурів

Активність катепсину В визначали згідно з методом [71].

Клітинну суспензію (2×10^7 клітин) осаджували шляхом центрифугування при 200g протягом 5 хв. Одержаний осад обережно ресуспендували у буфері, що містив 0,02М трис-HCl, 0,005 М MgSO₄, рН 7,2, та 0,05 мл 0,008% дигітоніну з подальшою інкубацією проб при 4°C впродовж 20 хв. Після чого до проб додавали 0,001 М EDTA та поміщали на 10 хв у водяну баню (37°C). По закінченні інкубації у пробірки послідовно додавали 0,2 М натрій-фосфатний буфер, рН 6,0 та 0,1 мл 0,065 М розчину α -бензоїл-D,L-аргінін-п-нітроаніліну (БАПНА). Ретельно перемішавши, проби інкубували на водяній бані впродовж 60 хв. Реакцію зупиняли додаванням 25% ТХО. Ферментативну активність катепсину В визначали у надосадовій рідині після центрифугування проб при 300g протягом 7хв.

Екстинкцію проб вимірювали на спектрофотометрі СФ-46 при довжині хвилі 390 нм. Ферментативну активність виражали в нмолях п-нітроаніліну, відщепленого від БАПНА за хвилину інкубації при 37°C.

2.7. Визначення активності цистеїнової протеїнази (каспази –3) у лімфоцитах тимуса та селезінки щурів

Визначення активності каспази–3 проводили з використанням Caspase Colorimetric Protease Assay Sampler Kit.

У проби, що містили 3×10^6 клітин додавали 0,05 мл охолодженого лізуючого буфера. Після 10 хв інкубації на льоді проби центрифугували протягом 3 хв (1000g). В подальших дослідженнях використовували супернатант (цитозольний екстракт), до якого додавали 0,05 мл реакційного буфера з 0,01 М дитіотреїтолом. До інкубаційної суміші додавали 0,005 мл 0,004 М субстрату каспази-3 - DEVD-p-NA (кінцева концентрація 2×10^{-4} М). Проби інкубували протягом 90 хв при 37°C в темряві. Екстинкцію вимірювали на рідері фірми Thermo Labsystems Opsys MR (США) із програмним забезпеченням Dynex Revelation Quieklinc при довжині хвилі 405 нм.

Ферментативну активність виражали в нмолях p-нітроаніліну, відщепленого від субстрату DEVD-p-NA за хвилину інкубації при 37°C.

2.8. Метод визначення активності полі-(АДФ-рибозо)-полімерази у лімфоїдних клітинах тимуса і селезінки щурів

Визначення активності полі-(АДФ-рибозо)-полімерази проводили згідно з методом [43].

У пробірки з інкубаційним середовищем (0,05 М трис-HCl, 0,01 М MgCl₂, 0,025 М KCl, pH 7,8) вносили клітинний лізат, який отримували шляхом ресуспендування лімфоцитів у буфері, що містив 0,02 М трис-HCl, 0,005 М MgSO₄, pH 7,2, 0,008% дигітонін. Після хвилинної преінкубації при 30°C реакцію починали 0,001 М 8-¹⁴C-НАД⁺. Проби інкубували на водяній бані впродовж 20 хв, реакцію зупиняли додаванням 5% ТХУ.

Після ресуспендування вміст проби наносили на нітроцелюлозний фільтр (діаметр пор 0,4 мкм, “Synpor”, Чехія) та послідовно промивали сумішшю 5% ТХО з 0,01 М $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ і 70% етиловим спиртом.

Висушені фільтри поміщали у флакони з сцинтиляційною рідиною ЖС-106 та проводили вимірювання радіоактивності проб на лічильнику Бета.

2.9. Визначення вмісту НАД^+ у тимусі та селезінці щурів

Вміст НАД^+ визначали згідно з методом, описаним у [3].

Тимус і селезінку швидко поміщали у рідкий азот. Наважку замороженої тканини (1г) ретельно перетирали у фарфоровій ступці, додаючи 4-х кратний об'єм охолодженої 0,6 М хлорної кислоти. Проби залишали на 20-30 хв при 4°C для більш повної екстракції НАД^+ . Білки відділяли шляхом центрифугування при 300g впродовж 15 хв. Надосадову рідину нейтралізували 30% КОН до рН 6,0 після чого проби центрифугували 5 хв при 300 g.

У спектрофотометричну кювету послідовно вносили: 1 мл 0,05 М пірофосфатного буферу, рН 8,8 з 0,02 М семикарбазидом, 1 мл нейтралізованого тканинного екстракту та 0,3 мл 95% етилового спирту. Оптичну густину досліджуваних проб (ΔE_1) вимірювали на спектрофотометрі СФ-46 при довжині хвилі 340 нм проти контрольної проби, що містила дистильовану воду.

Потім до контрольної та досліджуваної проб додавали фермент алкогольдегідрогеназу (вихідна активність 25 од/мг) та реєстрували значення оптичної густини ΔE_2 через кожну хвилину доти, поки її величина не перестане змінюватись.

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;

$\Delta E = \Delta E_2 - \Delta E_1$; де **$\Delta E_2$** - значення оптичної густини;

ΔE_1 - оптична густина досліджуваних проб;

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.

2.10. Метод визначення вмісту АТФ у тимусі та селезінці щурів

1 г замороженої у рідкому азоті тканини розтирали у фарфоровій ступці з 0,6 М хлорною кислотою з розрахунку 1:4 для тимусу та 1:2 для селезінки, слідкуючи за тим, щоб тканина не розмерзалася. 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” (“Sigma” США).

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 – кількість АТФ у АТФ–стандарті, мкмоль;

D – наважка тканини, г

2.11. Визначення рівня одно- та дволанцюгових розривів ДНК у тимоцитах та спленоцитах щурів [23].

Принцип методу полягає в тому, що при різних значеннях рН буфера на місці розривів, які утворилися під дією різних фізичних та хімічних факторів, відбувається розщеплення ДНК (при рН 8,3 реєструється дволацюгові розриви ДНК – слабоколушний лізис, при рН 12,4 реєструється одноланцюгові розриви – лужний лізис). При центрифугуванні неушкоджена ДНК осаджується, а ушкоджена ДНК знаходиться в супернатанті. При взаємодії з діамінобензойною кислотою (ДАБК) утворюється флуоресцентний комплекс, ступінь флуоресценції якого прямопропорційний кількості ДНК.

До однієї частини проб (1×10^7 клітин), які знаходились у льодяній бані, послідовно додавали буфер, що містив 2%-ний розчин додецилсульфату натрію (SDS), 0,01 М ЕДТА, 0,01 М трис-НСІ, рН 8,3 (слабоколушний лізис), а до другої, за тих самих умов – буфер того ж складу, але рН якого перед використанням доводили 0,05 М NaOH до 12,4 рН (лужний лізис). Після додавання 0,15 М KCl проби інкубували при 65°C впродовж 10 хв, центрифугували при 6000 g протягом 20 хв на холоду.

До надосадової рідини та осаду додавали 1% розчин БСА, 1% розчин РНК та 0,05 М ацетат натрію в 95% етиловому спирті, ретельно перемішували і залишали на 15 хв при -10°C. Утворений осад двічі відмивали у 75% етиловому спирті та висушували у термостаті до повного випаровування спирту. До осадів додавали 40% розчин 3',5'-діамінобензойної кислоти (ДАБК) і залишали на 30 хв при 60°C. Після охолодження до пробірок додавали 1 М HCl. Інтенсивність флуоресценції вимірювали на спектрофлуориметрі Shimadzu RF-150 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.

2.12. Метод визначення Ca^{+2} , Mg^{2+} -залежної ендонуклеазної активності у лімфоїдних клітинах тимуса та селезінки щурів

Оцінку рівня ендонуклеолізу хроматина в умовах, оптимальних для Ca^{+2} , Mg^{2+} -залежної ендонуклеазної активності проводили згідно з [53].

Суспензію лімфоцитів (2×10^7 клітин у пробі) інкубували протягом 60 хв при 37°C в 1 мл буфера такого складу: 0,05 М трис- HCl , рН 7,5, 0,01 М MgCl_2 , 0,001 М CaCl_2 .

Після завершення інкубації при 37°C проби охолоджували у льодяній бані, центрифугували протягом 5 хв при 300g. Для екстракції продуктів деградації хроматину (ПДН) осад ресуспендували в 2,5 мл 7×10^{-4} М ЕДТА з подальшою інкубацією на холоду на протязі 60 хв.

Екстракцію ПДН зупиняли додаванням NaCl (кінцева концентрація 0,15 М). Після центрифугування протягом 30 хв при 2000g в осаді, що містив недеградований хроматин, і супернатанті, що містив ПДН, визначали рівень ДНК флуориметричним методом за допомогою ДАБК. Інтенсивність флуоресценції вимірювали на спектрофлуориметрі Shimadzu RF-150 при довжині хвилі збудження 405 нм та емісії – 520 нм.

Відсоток ДНК в екстрагованих фрагментах (ПДН) від загальної 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.

2.13. Статистична обробка отриманих результатів

Статистичну обробку експериментальних даних здійснювали загальноприйнятими методами варіаційної статистики з вирахуванням середнього значення (M) і середньої квадратичної похибки (m). Для визначення достовірності відмінностей між двома вибірками використовували критерій Стюдента (t).

Статистичну обробку результатів та побудову графіків проводили на IBM PC ET з використанням стандартних пакетів прикладних програм.

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Оцінка структурного стану нуклеопротейнового комплексу за дії іонізуючого випромінювання та на фоні введення рибоксину

На сьогодні з'ясування молекулярних механізмів та часових закономірностей процесів, що розвиваються у відповідь на дію іонізуючого випромінювання і у кінцевому результаті обумовлюють клітинну деструкцію є предметом численних досліджень. Суттєва роль у розвитку і реалізації програмованої клітинної загибелі належить порушенню надмолекулярних рівнів організації та транскрипційної активності хроматину, що на кінцевих етапах інтерфазної загибелі клітин супроводжується пікнозом ядер та деградацією ДНК.

З метою біохімічної оцінки стану ДНК ядер фіксованих клітин ми проводили їх мікроскопію, цифрову зйомку та комп'ютерну двохвильову фотометрію кольорових зображень за програмою Photometry [12], яка дозволяє оцінити ступінь структурної упорядкованості хроматину лімфоїдних клітин тимуса та селезінки щурів.

На рис. 3.1 - 3.2 представлено мікрофотографії морфологічних змін, виявлених методом прижиттєвого фарбування клітин із застосуванням флуоресцентного барвника – акридинового оранжевого.

За результатами люмінесцентної мікроскопії тимоцити і спленоцити інтактних щурів мають характерний високий рівень ядерно/цитоплазматичного співвідношення з розміщенням хроматину у центральній частині ядра. В той час як тимоцити та спленоцити опромінених тварин виявляють типові морфологічні ознаки радіаційно-індукованої інтерфазної загибелі через три години після опромінення, в дозі 1,0 Гр та 7,78 Гр, з утворенням гранул висококонденсованого хроматину та їх розміщенням поблизу ядерної мембрани [55,161].

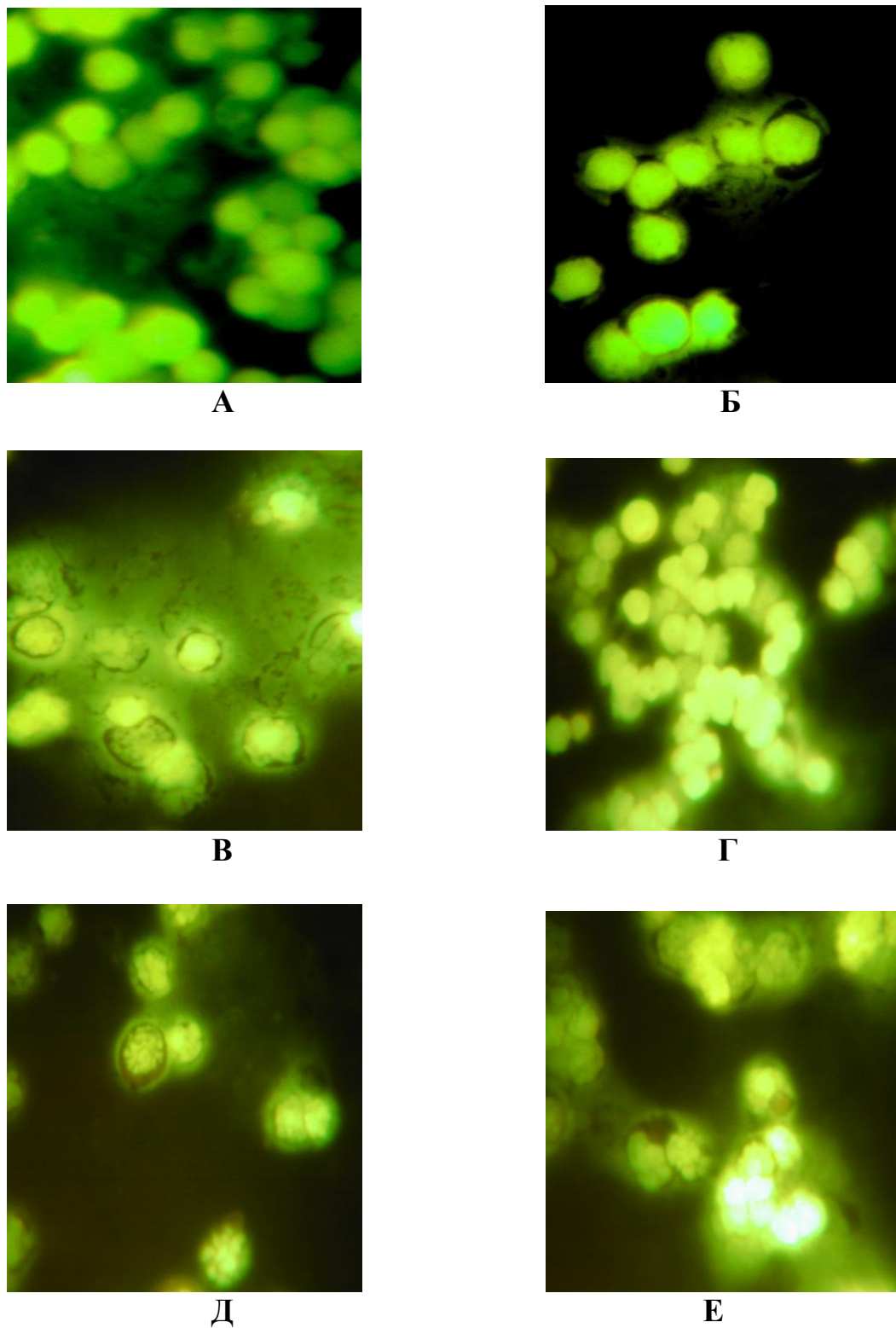


Рис.3.1. Мікрофотографії тимоцитів щурів через 3 години після дії іонізуючої радіації::

А - контроль; **Б** - контроль на фоні введення рибоксину; **В** - 1,0 Гр;
Г - 1,0 Гр на фоні введення рибоксину; **Д** - 7,78 Гр; **Е** - 7,78 Гр на фоні введення рибоксину

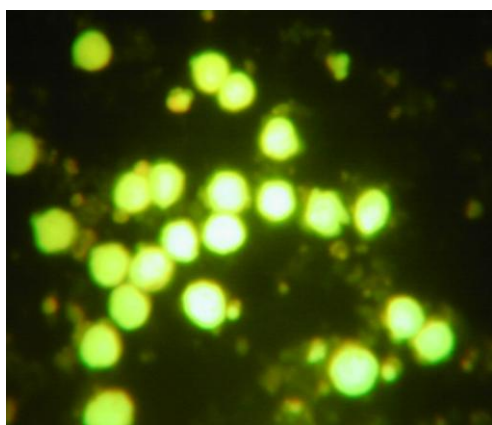
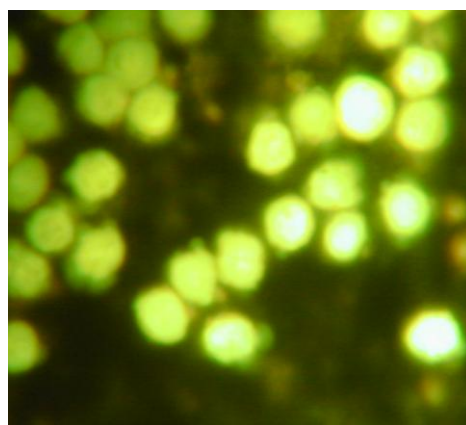
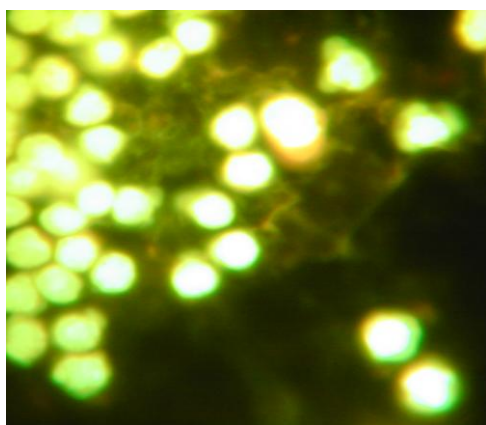
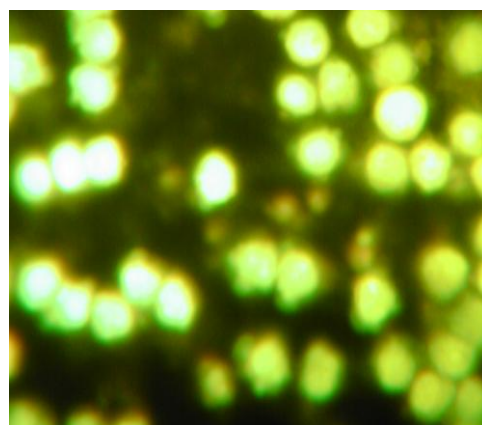
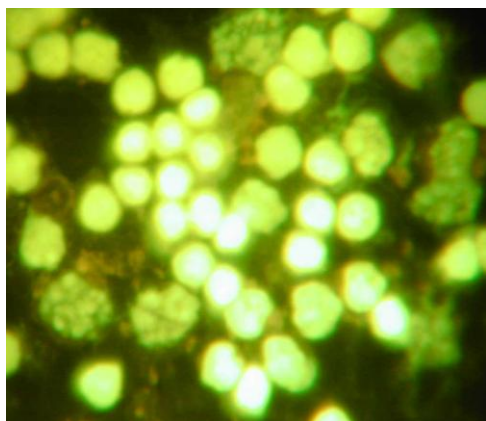
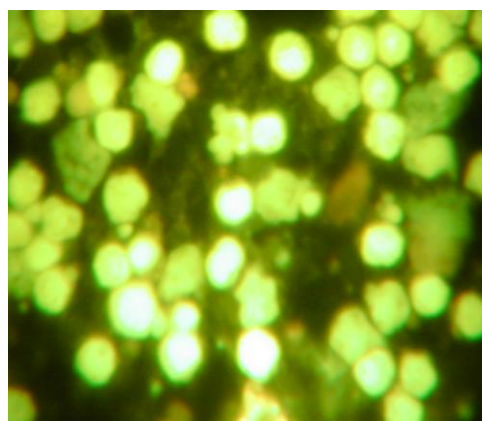
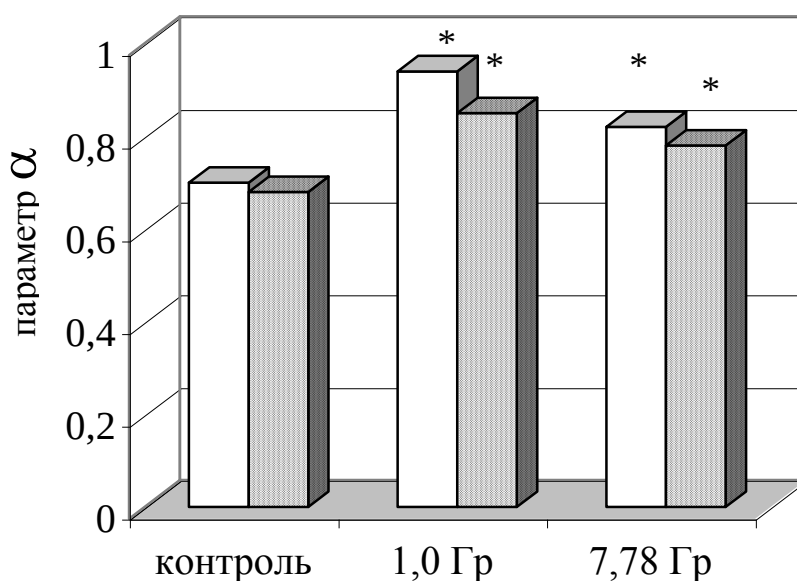
**А****Б****В****Г****Д****Е**

Рис.3.2. Мікрофотографії спленоцитів щурів через 3 години після дії іонізуючої радіації:

А - контроль; **Б** - контроль на фоні введення рибоксину; **В** - 1,0 Гр; **Г** - 1,0 Гр на фоні введення рибоксину; **Д** - 7,78 Гр; **Е** - 7,78 Гр на фоні введення рибоксину

Для дослідження структурної упорядкованості нуклеїнових кислот за умов їх профарбовування поліхромним барвником акридиновим оранжевим ми застосовували розроблену Брітом І.С. методику обробки та зйомки клітин. Цим методом ми проводили двохвильову фотометрію кольорових зображень (фотознімків) біологічних об'єктів, одержаних з використанням цифрової фотокамери "Olympus" C-2000 Zoom, встановленої на люмінесцентному мікроскопі фірми Carl Zeiss Iena (Німеччина). Програма автоматично розраховувала співвідношення інтенсивностей люмінесценції вимірюваних зон клітин у червоній (640 нм) і зеленій (530 нм) областях спектру (точність: $\alpha \pm 0,05$) та будувала графіки за параметром α [$\alpha = I_{640}/I_{530}$]. Ці дані вважаються інтегральним показником ступеня спіралізації ядерного хроматину та стану синтетичного апарату клітини.

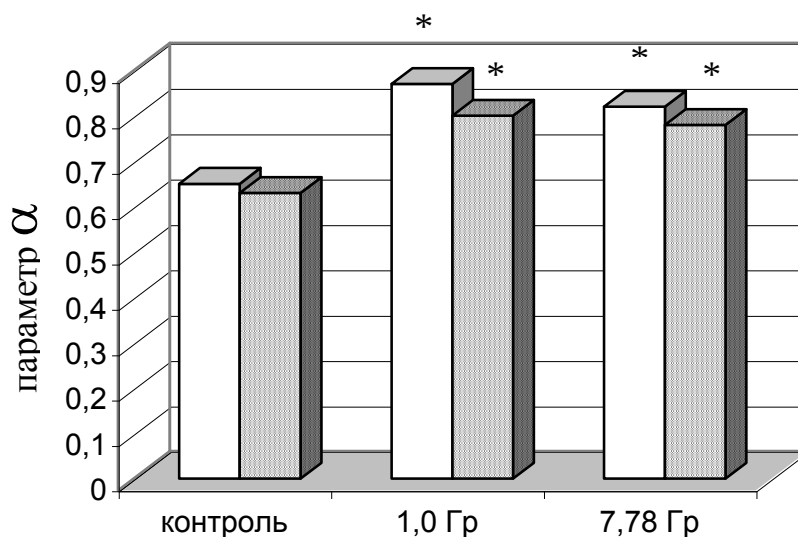


□ - без введення рибоксину, ▨ - на фоні введення рибоксину

Рис.3.3. Значення параметру α для лімфоцитів тимуса щурів за дії іонізуючої радіації через три години після опромінення та на фоні введення рибоксину

*- різниця з контролем достовірна, $P \leq 0,05$

Згідно з результатами, представленими на рис. 3.3 -3.4 після опромінення тварин в дозі 1,0 Гр спостерігається збільшення параметру α на 34% у тимоцитах та на 32% у спленоцитах щурів порівняно з контролем, що частково пояснюється структурними змінами ДНК у складі нуклепротеїнового комплексу. Оскільки, при дії іонізуючої радіації відбуваються розриви фосфодієфірних зв'язків у молекулі ДНК, то за рахунок цього акридиновий оранжевий, зв'язуючись з деблокованими фосфатними групами, активно інтеркалює в ланцюг дезоксирибонуклеїнової кислоти.



□ - без введення рибоксину, ▨ - на фоні введення рибоксину

Рис. 3.4. Значення параметру α для лімфоцитів селезінки щурів за дії іонізуючої радіації через три години після опромінення та на фоні введення рибоксину

*- різниця з контролем достовірна, $P \leq 0,05$

Подальшими нашими дослідженнями показано, що за дії променевого чинника в дозі 7,78 Гр також має місце підвищення параметру α , на 17% у лімфоцитах тимуса та на 15% у лімфоцитах

селезінки відносно контролю. Певне зниження досліджуваного показника порівняно із даними за опромінення тварин в дозі 1,0 Гр може бути обумовлено збільшенням ступеня компактизації хроматину і, як наслідок, зниженням його доступності для барвника. Так, у роботі [37] показано, що зміни у надмолекулярній структурі хроматину відбуваються за участю РНК-полімерази, β' -субодиниця якої сприяє утворенню додаткових згинів у місцях посадки ферменту. На думку ряду авторів [76,187] певна роль у регуляції рівня конденсації хроматину під час розвитку програмованої клітинної загибелі належить модифікаціям гістонових білків, а саме деацетилюванню гістону H4, що призводить до ущільнення центральної частини лінкерної ділянки за рахунок підвищення позитивного заряду нуклеосом та додаткового зв'язування ДНК з гістоновим кором.

На сьогодні одним з напрямків радіобіологічних досліджень є теоретичне обґрунтування та експериментальна розробка засобів, спрямованих на запобігання радіаційно-індукованого порушення обміну речовин, а також пошук шляхів нормалізації біохімічних процесів в організмі опромінених тварин. Для модифікації променевих ефектів ми застосовували нуклеозид інозин у вигляді фармакологічного препарату рибоксину, який є природним метаболітом обмінних процесів організму і бере безпосередню участь у синтезі нуклеотидів, коферментів та поліпшує енергозабезпечення шляхом стабілізуючого впливу на структуру мітохондрій, сприяючи, таким чином, нормалізації рівня клітинного АТФ та стимулює синтетичні процеси у клітинах [91,97,140]. Тому на наступному етапі роботи ми вивчали вплив препарату рибоксину на морфологічний стан та структурну упорядкованість нуклеїнових кислот лімфоїдних клітин тимуса і селезінки інтактних та опромінених щурів у дозах 1,0 Гр і 7,78 Гр. Згідно даних представлених на рис.3.3., 3.4. після опромінення на фоні введення рибоксину спостерігається зменшення параметру α у тимоцитах щурів на 10% у дозі 1,0 Гр та на 5% в дозі 7,78 Гр порівняно з відповідними результатами при дії рентгенівського

випромінювання. У лімфоцитах селезінки відбувається зниження параметру α на 8% та 7% відповідно при опроміненні у дозах 1,0 Гр та 7,78 Гр на фоні введення тваринам рибоксину. Таким чином, проведена нами двохвильова фотометрія локальних ділянок люмінесцентних зображень лімфоїдних клітин тимуса та селезінки щурів за допомогою нової комп'ютерної версії обробки даних дозволила встановити зміни інтегрального показника ступеня упорядкованості ДНК за дії іонізуючого випромінювання.

3.2. Особливості протеолітичної активності ендogenous протейназ лімфоцитів тимуса і селезінки щурів за умов радіаційного впливу та на фоні введення рибоксину

Протеолітичні ферменти відіграють важливу роль у життєдіяльності клітини. Вони беруть участь як у катаболічних, так і у регуляторних процесах. Участь протейназ в апоптозі виявляється в деградації різних структурних і функціональних білків імунокомпетентних клітин.

При радіаційно-індукованій загибелі клітин відбувається протеоліз білків ядерного матриксу, які відіграють провідну роль в підтриманні структури і цілісності ядер. В експериментах Нага [120] було показано, що за апоптозу, індукованого рядом чинників, відбувається протеолітична деградація ламіна В та ряду інших білків цитоскелету (гельсольвін, фодрин).

Опромінювання тварин викликає активацію протейназ, які розщеплюють структурні білки хроматину, що призводить до підсилення деградації ДНК нуклеазами. Відомо, що у формуванні радіобіологічних ефектів беруть участь ферменти, в тому числі і ядерні протейнази, які вивільнюються з субклітинних структур в результаті пошкодження мембран [179].

Активация лужных і Ca^{2+} -залежних протеїназ у перші години після опромінення тварин у дозі 10 Гр спостерігається у ядрах клітин периферичної крові [164]. Також відбувається активация Ca^{2+} -залежних протеїназ при апоптозі тимоцитів, індукованих низькими дозами γ -радіації і дексаметазоном [179]. Необхідно зазначити, що активация протеїназ в апоптичних клітинах при дії радіації та глюкокортикоїдів не пов'язана з синтезом протеїназ *de novo* - інгібітор синтезу білка циклогексимід не запобігає цьому процесу [31]. З'ясування механізмів активации ендogenous протеїназ у апоптичних клітинах за променевого ураження представляє значний інтерес, сприяє пошуку засобів регулювання процесу клітинної загибелі.

Згідно з одержаними результатами, через 3 год після рентгеновського опромінення в дозах 1,0 та 7,78 Гр активність ендogenous протеїназ у лімфоїдних клітинах тимуса підвищується на 18% та 30% відповідно (рис.3.5.). При цьому спостерігається підвищення активності протеїназ у спленоцитах щурів на 8% та 14% відповідно до контрольного показника.

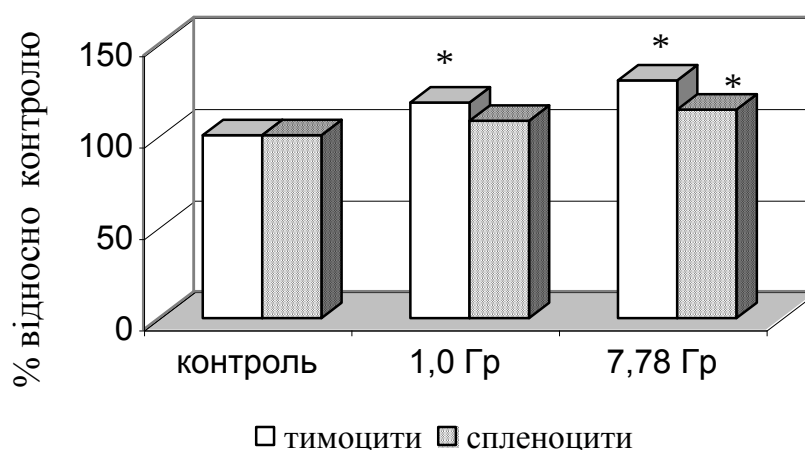


Рис.3.5. Активність ендogenous протеїназ у лімфоїдних клітинах через три години після опромінення

*- різниця з контролем достовірна, $P \leq 0,05$

Аналогічний ефект був отриманий і іншими дослідниками. Так, при вивченні ендогенної протеолітичної активності у тимоцитах щурів за дії загального рентгенівського випромінювання в дозі 4,0 Гр [31]. Було встановлено підвищення протеолітичної активності у тимоцитах через 3-6 год після дії променевого чинника. Такі зміни активності ендогенних протеїназ можуть бути пояснені завдяки механізмам регулювання активності цих ферментів – процесу взаємодії їх з інгібіторами. Передбачається, що ця взаємодія здійснюється за допомогою реакцій тіол-дисульфідного обміну між тіоловою групою молекули інгібітора і дисульфідним зв'язком у молекулі ферменту [25,90,123]. Окиснення SH-груп інгібітора призводить до його інактивації і порушення рівноваги у системі протеїназа – інгібітор [123], внаслідок чого відбувається гіперактивація внутрішньоклітинних протеїназ. Можливо зміна активності протеїнази веде до порушення внутрішньоклітинного метаболізму білків і протеолітичної регуляції біохімічних процесів.

3.3. Активність катепсину В за опромінення та на фоні введення рибоксину у лімфоцитах тимуса і селезінки щурів

На сучасному етапі розвитку біохімічних досліджень постулюється, що розпад білків у тканинах, який викликаний дією іонізуючої радіації, обумовлений активацією протеолітичних процесів. Насамперед, виникає це внаслідок пошкодження внутрішньоклітинних мембран у тканинах опромінених тварин та підвищення активності лізосомальних ферментів [81].

На основі чисельних досліджень з використанням різних моделей апоптозу була запропонована гіпотеза, що лізосомальна пермеабілізація і частковий вихід протеолітичних ферментів у цитозоль є більш ранньою і

превалюючою подією, а не частиною більш пізніх ефекторних стадій клітинної загибелі по шляху апоптозу [81].

За дії іонізуючої радіації спостерігається активація лізосомальних ферментів, що можливо індукується накопиченням у клітині аномальних метаболітів, токсинів і при цьому спостерігається підвищення активності протеїназ родини катепсинів. Дія променевого чинника порушує функцію АТФ-залежної протонної помпи лізосомальної мембрани, яка підтримує низький рівень внутрішньолізосомального рН за рахунок транспорту протонів, вивільнених при гідролізі АТФ. Лізосомальні цистеїнові протеїнази, що активовані за дії іонізуючої радіації, і окрім виконання традиційних функцій неселективної деградації білків в середині лізосом можуть, за умови їх вивільнення у цитоплазму, стимулювати каскад внутрішньоклітинних деградаційних подій [153].

Таким чином, при дії іонізуючого випромінювання створюються умови для часткового виходу катепсинів із лізосом з активацією подальшого розпаду білкових структур, що призводить до порушення чисельних метаболічних процесів у клітині [87,128,211].

Дослідження механізмів часткової селективної лізосомальної пермеабілізації, яка призводить до транслокації у цитоплазму певних апоптичних протеїназ, показали, що значну роль в цьому процесі відіграє сфінгозин за рахунок своїх лізосомотропних властивостей. Так, на клітинах лінії Jurkat за TNF- α індукованого апоптозу було встановлено, що накопичення сфінгозину всередині лізосоми призводить до порушення цілісності її мембрани, і цей процес передуює активації каскаду каспаз і порушенню функціонування мітохондрій [128]. Подібна роль відведена і цераміду - попереднику сфінгозину, підвищення вмісту якого спостерігається за радіаційно-індукованого апоптозу [58]. Цей вторинний месенджер бере участь у порушенні цілісності лізосомальної мембрани опосередковано через активацію автопротеолізу прокатепсину D з утворенням активної форми ферменту, який у свою чергу запускає

активаційний каскад низки лізосомальних протеїназ. На думку деяких дослідників [156] перетворення проформ катепсину В у активну форму відбувається саме за участі катепсину D.

На особливу увагу заслуговує вивчення активації лізосомальної деструкції за участі активних кисневих метаболітів, що передують порушенням у функціонуванні мітохондрій, оскільки, на нашу думку, саме вона може бути реалізована за радіаційно-індукованого апоптозу. Так, підвищення вмісту активних кисневих метаболітів, яке відбувається за дії променевого чинника [178], може індукувати лізосомальну пермеабілізацію опосередковано через активацію фосфоліпази A_2 [172], яка спричиняє значну дестабілізацію мембран органел, в тому числі лізосомних і мітохондріальних шляхом деградації мембранних фосфоліпідів. За дії ряду апоптичних чинників було також встановлено, що вплив на мітохондрії транслокованих до цитоплазми лізосомальних ферментів призводить до активації генерування мітохондріальних активних кисневих метаболітів, які, в свою чергу, підвищують рівень лізосомальної пермеабілізації.

На цілісність лізосом за апоптозу впливають і самі лізосомальні ферменти, що свідчить про їх роль у процесах, які опосередковують мембранну дестабілізацію. Так, за $TNF-\alpha$ індукованого апоптозу катепсином В в гепатоцитах спостерігалось значне підвищення резистентності до лізосомальної пермеабілізації [116].

Отже, після індукованої різноманітними чинниками дестабілізації лізосомальної мембрани в цитозоль вивільняється ряд протеїназ, які залучені до апоптичних процесів. Оскільки рН цитозолу наближено до нейтрального, а за дії іонізуючої радіації спостерігається його закислення [33], то зверталась увага на значимість активаційного каскаду катепсинів за дії опромінення [70]. В той же час, роботами Turk [192] продемонстровано, що саме катепсину В відведена провідна роль у різних моделях апоптозу, оскільки він є найбільш стабільним ферментом навіть

при фізіологічних рН на початкових етапах (до год) за дії різних апоптичних чинників.

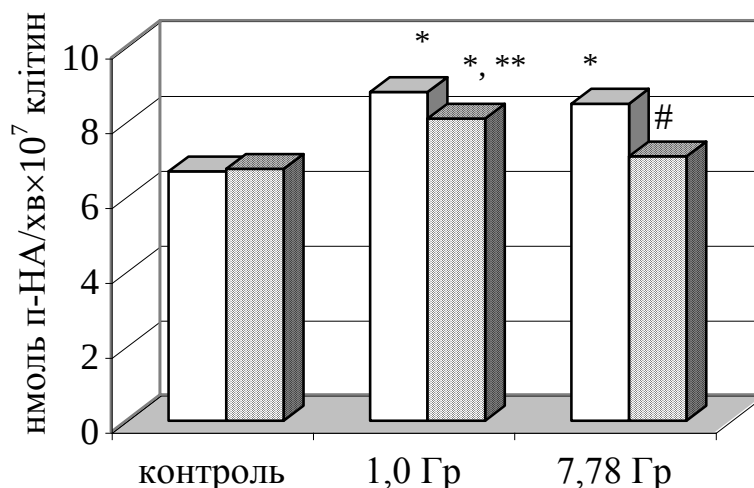
Враховуючи викладене вище, доцільно було вивчити активність катепсину В у лімфоїдних клітинах тимуса та селезінки за дії променевого чинника.

Отримані дані показали, що при загальному разовому опроміненні тварин у дозах 1,0 Гр і 7,78 Гр спостерігається підвищення активності катепсину В у лімфоїдних клітинах тимуса і селезінки щурів (рис. 3.6 - 3.9).

Згідно з представленими результатами (рис. 3.6.) активація ферменту змінюється залежно від дози та часу після опромінення. Так, активність катепсину В у тимоцитах щурів через 30 хв після рентгенівського випромінювання в дозах 1,0 Гр та 7,78 Гр зростала відповідно у 1,3 раза та 1,2 раза порівняно з контролем.

За дії іонізуючої радіації на щурів, яким попередньо було введено рибоксин, відмічається нормалізуючий ефект препарату у тимоцитах, а саме ферментативна активність катепсину В знижувалась на 9% за дії іонізуючої радіації в дозі 1,0 Гр та на 17% за летальної дози, порівняно з активністю ферменту в опромінених тваринах.

Посилення протеолізу за участі лізосомальних ферментів у тканинах при опроміненні можна пояснити порушенням мембранної проникності лізосом і вивільненням катепсинів, що узгоджується з наведеними вище літературними даними, а також послабленням дії інгібіторів білкової та небілкової природи [163].



□ - без введення рибоксину, ▨ - на фоні введення рибоксину

Рис. 3.6. Активність катепсину В у тимоцитах щурів за дії іонізуючої радіації через 30 хвилин після опромінення та на фоні введення рибоксину

*- достовірно по відношенню до контролю;

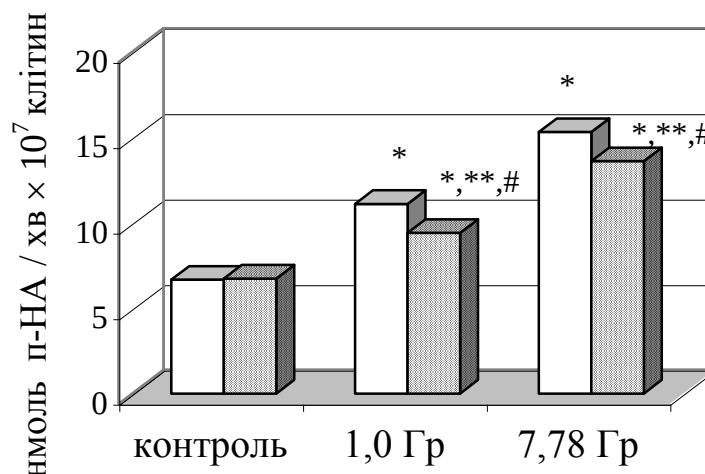
** - достовірно по відношенню до контролю на фоні введення рибоксину;

- достовірно по відношенню до відповідних опромінених груп;

$P \leq 0,05$

Відповідно до одержаних нами результатів через три години після дії на щурів рентгенівського випромінювання в дозах 1,0 Гр і 7,78 Гр у лімфоцитах тимуса спостерігається подальша стимуляція активності катепсину В. Так, активність ферменту зростала у 1,7 раза за дії променевого чинника в дозі 1,0 Гр та у 2,3 раза за опромінення тварин в дозі 7,78 Гр порівняно з контролем (рис.3.7).

Слід зазначити, що за умов опромінення тварин на фоні введення рибоксину, відмічається пригнічення активності катепсину В на 19 і 13 % порівняно з активністю ферменту у тимоцитах тварин опромінених відповідно в дозах 1,0 Гр та 7,78 Гр.



□ - без введення рибоксину, ▨ - на фоні введення рибоксину

Рис. 3.7. Активність катепсину В у тимоцитах щурів за дії іонізуючої радіації через три години після опромінення та на фоні введення рибоксину

*- достовірно по відношенню до контролю;

** - достовірно по відношенню до контролю на фоні введення рибоксину;

- достовірно по відношенню до відповідних опромінених груп;

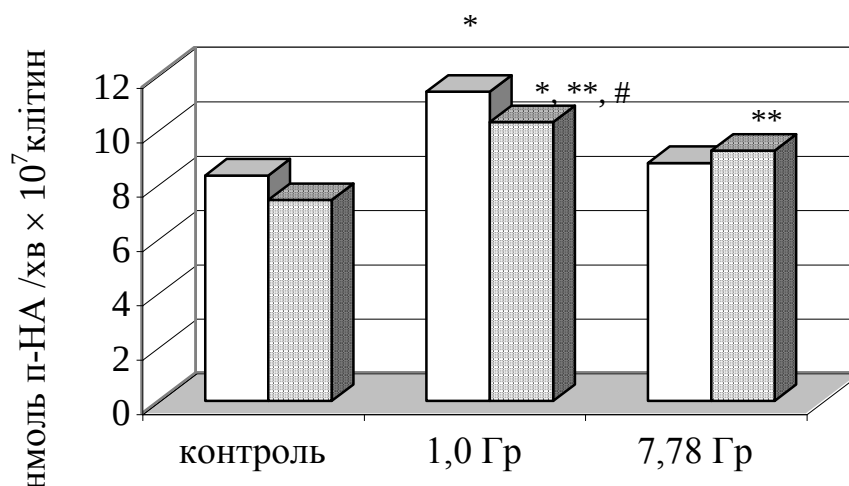
$P \leq 0,05$

Таким чином, активність катепсину В у тимоцитах опромінених щурів значно підвищується, а характер цієї активації є дозо-часовим, тобто встановлена пряма кореляція активності катепсину В тимоцитів від дози та періоду після загального опромінення тварин.

При цьому слід зауважити, що за вказаної залежності введення тваринам рибоксину сприяє статистично достовірному зменшенню активності катепсину В у тимоцитах опромінених тварин. Подібний ефект може бути пояснений здатністю цієї сполуки у певній мірі проявляти

захисну дію, яка можлива за рахунок підвищення загальної (неспецифічної) резистентності організму до дії променевого фактору внаслідок мобілізації захисних ресурсів організму [192].

Дослідження активності катепсину В у лімфоцитах селезінки щурів за дії іонізуючого випромінювання в дозі 1,0 Гр також викликає активацію ферменту (рис.3.8).



□ - без введення рибоксину, ▨ - на фоні введення рибоксину

Рис 3.8. Активність катепсину В у спленоцитах щурів за дії іонізуючої радіації через 30 хвилин після опромінення та на фоні введення рибоксину

*- достовірно по відношенню до контролю;

** - достовірно по відношенню до контролю на фоні введення рибоксину;

- достовірно по відношенню до відповідних опромінених груп;

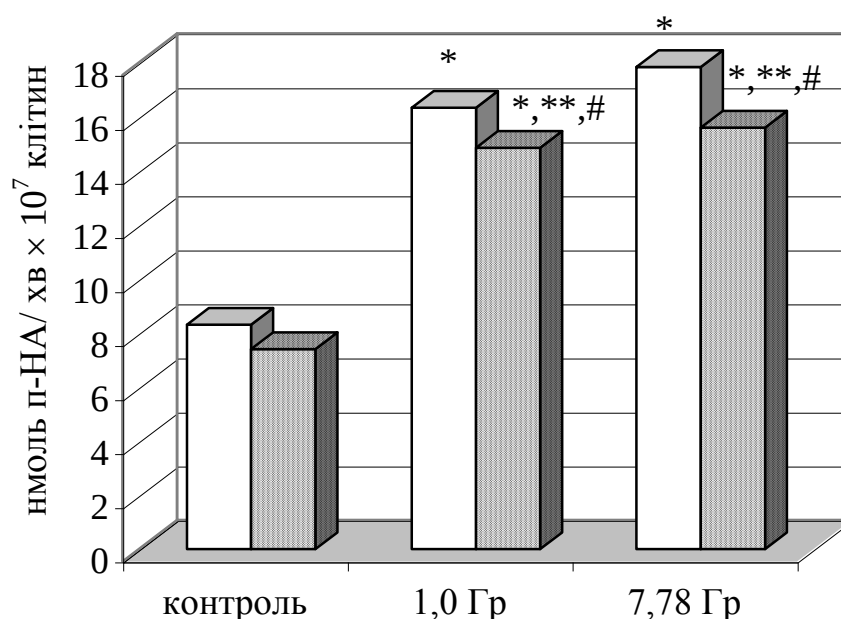
$P \leq 0,05$

Так, через 30 хв після дії променевого чинника у лімфоїдних клітинах селезінки спостерігається підвищення активності катепсину В у

1,4 раза відносно контрольного показника, а введення піддослідним тваринам рибоксину призводить до зниження його активності на 10 %.

При опроміненні тварин в дозі 7,78 Гр протеїназна активність залишалась у межах контрольної величини.

Через 3 год після опромінення тварин активність катепсину В у лімфоїдних клітинах селезінки значно підвищується (рис.3.9). Так, активність ферменту зростала відносно контрольного значення у 2 рази за дози 1,0 Гр та у 2,2 рази за умов опромінення в дозі 7,78 Гр .



□ - без введення рибоксину, ▨ - на фоні введення рибоксину

Рис 3.9. Активність катепсину В у спленоцитах щурів за дії іонізуючої радіації через три години після опромінення та на фоні введення рибоксину

*- достовірно по відношенню до контролю;

** - достовірно по відношенню до контролю на фоні введення рибоксину;

- достовірно по відношенню до відповідних опромінених груп;

$P \leq 0,05$

При введенні рибоксину за 15 хв до опромінення, активність катепсину В у спленоцитах знижується. Так, через 3 год після тотального

рентгенівського опромінення ферментативна активність знижується на 9% і на 13% порівняно з активністю ферменту тварин, опромінених відповідно в дозах 1,0 Гр та 7,78 Гр.

Показаний нами модулюючий ефект рибоксину може бути пов'язаний з описаною у літературі здатністю препарату інгібувати процеси перекисного окиснення ліпідів (один із механізмів, що обумовлює порушення цілісності мембрани лізосом) та здійснювати активуючий вплив на функціонування ендогенної антиоксидантної системи організму [84,121].

Ці дані узгоджуються з результатами ряду досліджень, де було експериментально показано, що активність тіолових протеїназ селезінки значно збільшується через 3 год після дії променевого чинника.[78,86,131].

З отриманих результатів можна зробити висновок, що розпад білків, викликаний іонізуючою радіацією, обумовлений посиленням автолітичних процесів, до яких залучені лізосомальні протеїнази. Насамперед виникає це внаслідок пошкодження цілісності лізосомальної мембрани з подальшим порушенням компартменталізації ферментів, що призводить до вивільнення та зміни у функціонуванні тіолзалежних протеїназ.

Таким чином, узагальнюючий висновок, який можна зробити із отриманих результатів при вивченні активності катепсину В у спленоцитах тварин за умов їх опромінення та на фоні введення рибоксину є таким, що як і у випадку з тимоцитами, в них спостерігається дозо-часова залежність і аналогічність змін. Але, на відміну від клітин тимуса, в спленоцитах, які також є лімфоїдними клітинами радіочутливих органів, не виявлено підвищення активності катепсину В через 30 хв після опромінення в дозі 7,78 Гр. Подібний феномен, на нашу думку, пояснюється своєрідною первісною реакцією організму на дію летальної дози опромінення. Дійсно, на ранніх етапах радіаційно-обумовленої загибелі клітин переважну участь беруть внутрішньоклітинні механізми, які обумовлені посиленням

предукуванням активно-кисневих метаболітів, що викликане дією на організм іонізуючої радіації [31]. Наробка активно-кисневих продуктів може стимулювати або пригнічувати активність катепсинів В в спленоцитах ураженого летальною дозою організму.

Важливу роль у регуляції активності катепсину В відіграють окисно-відновні реакції за участю системи глутатіону [156]. Цей та ряд інших ендогенних тіолів, залежно від ступеня їх відновлення, можуть виступати інгібіторами чи активаторами катепсинів і впливати на взаємодію протеїназ із специфічними білковими інгібіторами. Отже, стан системи глутатіону за дії променевого чинника може відігравати провідну роль в запуску активаційних каскадів за участю цистеїнових протеїназ.

Лізосомальні протеїнази можуть також здійснювати безпосередній вплив на систему активації ряду каспаз (каспази 1,3 і 11). Хоча на сьогодні вважається більш доведеною участь лізосомальних ферментів в порушенні функціонування мітохондрій з подальшим вивільненням з міжмембранного мітохондріального простору проапоптичних факторів. В досліджах Zhao et al. [211] показано вплив катепсинів В і D на мітохондрії. На думку Charman [89] це відбувається за участі білків родини Bcl-2, які контролюють направленість мітохондріальних змін у бік активації ефекторної ланки програмованої клітинної загибелі. Так, було встановлено провідну роль катепсину В у деструкції Bid - представника родини Bcl-2, який, на відміну від Bcl-x, що знаходиться у мітохондріальній мембрані і унеможливорює вихід апоптогенних чинників у цитоплазму, сприяє відкриттю мітохондріальних каналів з подальшим вивільненням AIF та цитохрому с – активатора каспази-9, що призводить до подальшої стимуляції ефекторних каспаз, серед яких чільне місце належить каспазі-3. Отже, протеолітична деградація локалізованого у цитоплазмі Bid з наступною його транслокацією у мітохондрії, завдяки чому стимулюється протеолітичний каскад за участі родини каспаз, є більш пізньою подією,

якій передуює лізосомальна дестабілізація, спричинена дією ряду апоптичних чинників.

Таким чином, дослідження участі лізосомального фактору у радіаційно-індукованій програмованій загибелі – механізмів і сигнальних шляхів, що опосередковують лізосомальну деструкцію та апоптичних субстратів для лізосомальних протеїназ, є вирішальними у зв'язку з відокремленням лізосомально-опосередкованого шляху реалізації програмованої клітинної загибелі.

Поряд з лізосомальними протеїназами, які залучені у реалізацію програмованої клітинної загибелі, як на ініціюючій так і ефекторній стадіях, значну роль відводять цистеїновим протеїназам родини каспаз, які вважаються центральною ланкою апоптозу, індукованого різноманітними чинниками.

3.4. Дослідження активності каспази –3 у тимоцитах та спленоцитах щурів за дії іонізуючої радіації

Каспаза-3 (КФ 3.4.22.36) належить до родини еволюційно консервативних цистеїнових протеїназ другого ешелону (ефекторні), яка специфічно активується в апоптичних клітинах, каталізує обмежене розщеплення клітинних білків, і є кінцевою ланкою передачі сигналу клітинної загибелі. Характерною особливістю каспази є наявність в активному центрі ферменту залишку цистеїну та специфічне розщеплення білкового субстрату після залишку аспаргінової кислоти у положенні P1 [90].

Каспаза-3 присутня у клітині в латентній формі у вигляді прокаспази-3. Вона локалізується у цитозолі, виявлена також і в міжмембранному просторі мітохондрій [103,114,181,213].

Різні шляхи реалізації апоптичного сигналу залучають у взаємодію різні каспази, які розщеплюють білки, локалізовані в ядрі, цитозолі та білки цитоскелету. Так, мембранний механізм запуску апоптозу передбачає активацію каспази-8 [214]. 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 превалуючу у клітині каспазу-3.

Вагомий внесок у реалізації загибелі лімфоїдних клітин за променевого ураження належить мітохондріям, що виступають як інтегратори різноманітних проапоптичних сигналів у загальний шлях ефекторної фази [142,186].

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, dATP (АТФ) каспази-9, та прокаспази-3 і призначений для орієнтації прокаспази-3 відносно активного центру каспази-9. Внаслідок цього відбувається протеолітичний процесінг прокаспази-3 з утворенням її активної форми [82,127,162,202,214].

Чисельні літературні дані свідчать, що при дії променевого чинника першими активуються ініціаторні каспази, які мають довший продомен, ніж ефекторні. Однак, каспази, які беруть участь у процесінгу цитокінів, також можуть активувати ефекторні каспази. Припускають декілька механізмів активації каспаз: аутоактивація, трансактивація або активація за допомогою інших протеолітичних ферментів [188,206,214].

Як відомо, із усіх відомих клітинних каспаз найбільшу протеолітичну активність має каспаза -3. Вона відповідає за протеоліз інгібіторів апоптичної ДНКаз (CAD), приймає участь в репарації ДНК, сплайсингу мРНК, реплікації ДНК, руйнує білки цитоскелету (ламіни, актин, фодрин, кератини, фермент гальдолін) та білки-регулятори клітинного поділу; каспаза -3 розщеплює антиапоптичні білки родини Bcl-2, проапоптичні білки Bid та IAP; за участю каспази -3 модифікуються білки-регулятори клітинного поділу та ті, що приймають участь у міжклітинній сигналізації і ядерні фактори транскрипції [55].

Взагалі каспазам властива здатність в певній послідовності активувати одне одного, утворюючи своєрідний каскад, до того ж – розгалужений. Важливо, що не залежно від сигналу запуску цього каскаду, його вузловою ланкою є саме каспаза -3. Вона активується каспазами -8 та -9 (ініціюючи ферменти), хоча мішенню каспази -3 можуть бути і інші – прокаспази -6, -7 і т.д. (латентні форми каспаз другого ешелону) та навіть деякі некаспазні білки [43].

Крім того, важливість каспази -3 у протеолізі життєважливих білків (ядерних та цитоплазматичних) вказує той факт, що після її активації клітина необоротно згублює шляхи до виживання.

Подібна значимість каспази -3 у регуляції апоптозу та інших клітинних функцій дали нам вагомі підстави до визначення її активності в умовах наших досліджень.

Результати проведених експериментів представлено на рис.3.10, відповідно до яких тотальне одноразове опромінення тварин в дозах 1,0 Гр та 7,78 Гр викликає зміни активності прокаспази-3 у тимоцитах щурів, а саме - призводить до активації каспази-3, причому ця активація різна і залежить як від часу після опромінення, так і від дози ураження.

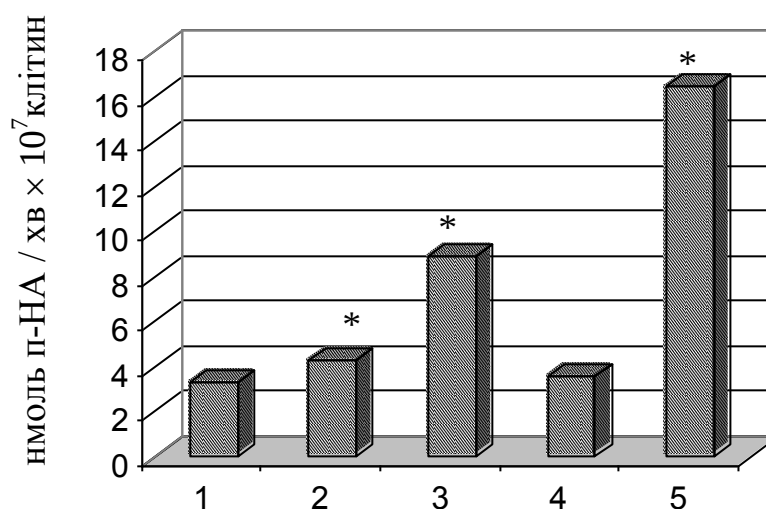


Рис. 3.10. Активність каспази-3 у тимоцитах щурів за дії іонізуючої радіації

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 по відношенню до контролю, $P \leq 0,05$

Так, через 30 хв після дії іонізуючої радіації в дозі 1,0 Гр відбувається зростання активності ефекторної каспази-3 у лімфоцитах тимуса в 1,3 раза порівняно з контролем. За опромінення у летальній дозі відбувається підвищення ферментативної активності на 9% порівняно з контрольним значенням.

Через три години після опромінення щурів у досліджуваних дозах (1,0 Гр, та 7,78 Гр) спостерігається значне підвищення активності каспази-3 у тимоцитах щурів, яка підвищувалась у 2,7 та у 5 разів відносно контрольних величин відповідно.

Встановлене нами різке підвищення каспазної активності в тимоцитах щурів свідчить про те, що через 30 хв, а особливо - через три години після отримання тваринами летальної дози опромінення відбувається запуск каскадного механізму проапоптичної активності каспаз в клітинах лімфоцитів [118].

Згідно з нашими даними у лімфоцитах селезінки через 30 хв після дії іонізуючої радіації у дозі 1,0 Гр спостерігається підвищення активності каспази-3 у 1,28 раза порівняно з контрольним значенням, а за опромінення піддослідних тварин в дозі 7,78 Гр каспазна активність спленоцитів зростає у 1,18 раза порівняно з контрольним показником.

В умовах експерименту було встановлено пригнічення активності каспази-3 у лімфоцитах селезінки через три години після дії на тварин рентгенівського випромінювання в дозах 1,0 Гр та 7,78 Гр. Відповідно до результатів, наведених на рис. 3.11, дія радіації в дозі 1,0 Гр викликає зниження активності ефекторної каспази-3 у 1,73 раза порівняно з контрольним значенням. При підвищенні дози до 7,78 Гр спостерігається зниження ферментативної активності у 1,25 раза відносно контрольного показника.

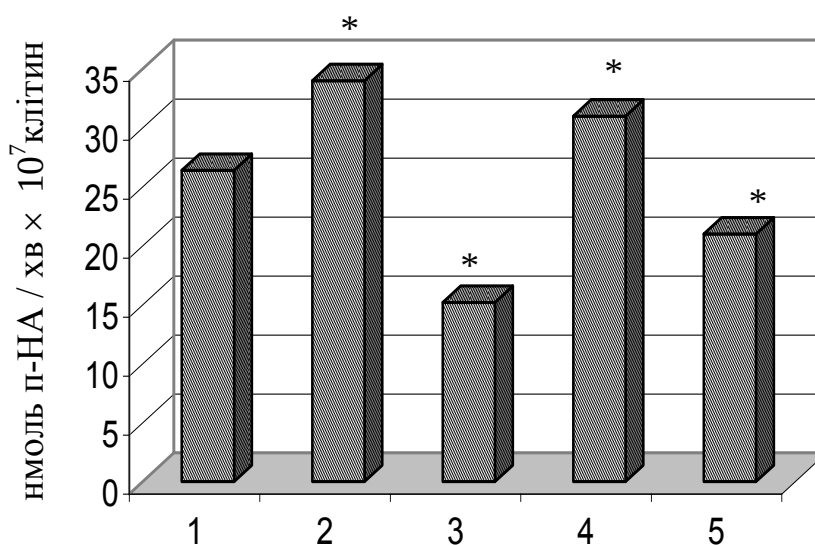


Рис. 3.11. Активність каспази-3 у спленоцитах щурів за дії іонізуючої радіації

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 по відношенню до контролю, $P \leq 0,05$

На відміну від загальної картини підвищення активності каспази -3 у тимоцитах в умовах опромінення тварин, у спленоцитах спостерігається майже обернена залежність – через 30 хв та 3 години після опромінення тварин летальними дозами активність каспази -3 пригнічується. Вважаємо, що різні за спрямованістю результати в активності каспази -3 в тимоцитах та спленоцитах опромінених в дозі 7,78 Гр тварин вказує на певні відмінності у метаболічній відповіді цих тканин на стрес. Крім того подібні відмінності обумовлені органоспецифічністю.

Дослідженнями, проведеними на моделях лімфобластних клітинних ліній MOLT 4, встановлено, що за дії рентгенівського випромінювання відбувається активація прокаспази-3 у даних клітинах [63]. Подальші дослідження показали значний приріст активності ферменту вже через 2 год після опромінення в дозі 10 Гр, максимальна ферментативна активність була встановлена через 4-6 год після дії чинника. Також відмічено кореляцію між апоптичними змінами, виявленими за морфологічними ознаками, підвищенням активності каспази-3, а також порушеннями її субклітинної локалізації за дії іонізуючої радіації.

В роботі Hallan et. al. [118] відзначено, що гамма-опромінення В-лімфоцитів *in vitro* в дозі 6 Гр призводить до значного підвищення активності каспази-3. Через 8 год та 24 год після опромінення активність досліджуваного ферменту відповідно підвищувалась майже втричі та в 3,6 рази порівняно з контролем. Автори роблять висновок, що значне підвищення рівня апоптозу В-лімфоцитів, встановлене з використанням TUNEL - методу, відбувається за безпосередньої участі ефекторної каспази -3.

Активація каспази-3 була також виявлена [63] у Т-лімфоцитах, стимульованих мітогенами IL-2. Було показано, що при стимуляції Т- та В-лімфоцитів відмічаються не лише підвищення активності каспази-3, але й

розщеплення її специфічних ядерних субстратів - ДНК-залежних протеїнкіназ ПАРП, ламіну В, Numa, Acinus.

Оскільки, одним з субстратів каспази -3 є фермент полі-(АДФ-рибозо)-полімераза, який займає чільне місце у процесі радіаційно-індукованої загибелі імунокомпетентних клітин і, на думку деяких дослідників, саме каспазо-опосередкована деградація ПАРП є маркером апоптичної загибелі, наступним етапом роботи було дослідити активність даного ферменту за дії іонізуючої радіації [196].

3.5. Активність полі-(АДФ-рибозо)-полімерази у лімфоїдних клітинах тимуса і селезінки щурів за дії іонізуючого випромінювання та на фоні введення рибоксину

На сьогодні численними дослідженнями постулюється участь полі-(АДФ-рибозо)-полімерази в ключових процесах, пов'язаних з функціонуванням клітини в цілому, зокрема таких як збереження цілісності геному та участь в ДНК-репараційних комплексах, регуляції експресії ряду білків на транскрипційному рівні, а також активації ряду шляхів елімінації клітин за дії різноманітних гено- та цитотоксичних чинників.

За радіаційно-індукованого апоптозу в імунокомпетентних клітинах включаються сенсорні біохімічні механізми, які передають сигнал про ушкодження у молекулі ДНК до різних ядерних та цитоплазматичних факторів, серед яких чільне місце належить ПАРП.

Для чіткого розуміння участі системи полі-АДФ-рибозилування в програмованій клітинній загибелі за дії іонізуючої радіації, було необхідно дослідити активність ПАРП у лімфоїдних клітинах тимуса та селезінки щурів.

Згідно з одержаними даними, за дії іонізуючої радіації відбуваються значні зміни активності полі-(АДФ-рибозо)-полімерази,

причому характер цих змін у лімфоїдних клітинах тимуса та селезінки різний. Так, через 30 хв після опромінення в дозах 1,0 Гр та 7,78 Гр встановлено пригнічення ферментативної активності ПАРП у тимоцитах щурів у 1,87 раза та 1,78 раза порівняно з контрольними значеннями. Такий характер змін в активності ферменту за певного рівня радіаційного пошкодження ДНК пов'язаний, на нашу думку, з процесами, які мають відношення до автомодифікації власне ПАРП і наступний протеоліз.

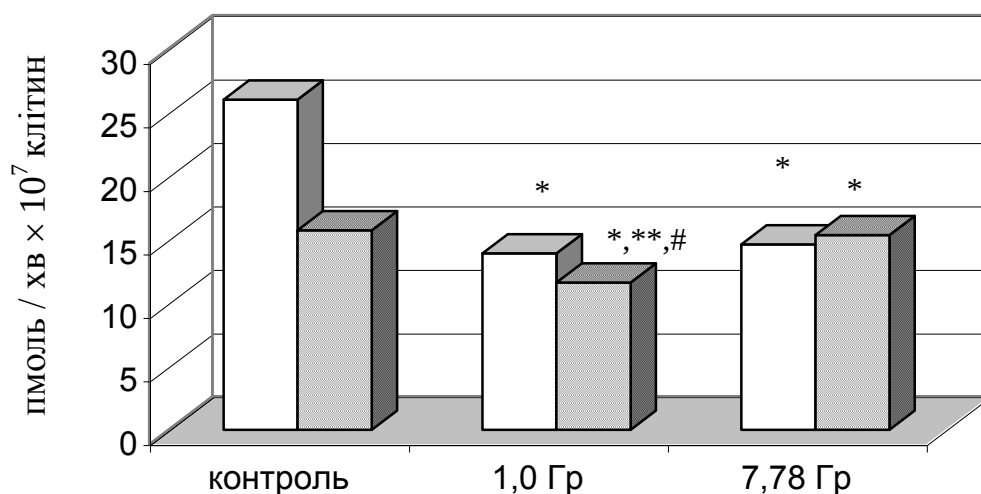
Так, за даними Germain [115] за деградацію аутомодифікованої ПАРП відповідає переважно каспаза-7. Саме за її участю можна пояснити значне зниження ферментативної активності ПАРП на фоні встановленої нами активації каспази -3.

Участь ПАРП у реалізації апоптичної ланки клітинної загибелі за дії радіації постулюється рядом вчених. Так, Oliver et. al. [158] запропонували, що не гіперактивація ПАРП за умови виникнення розривів у ДНК, а її розрізання каспазами -3 і -7 є фундаментальною характеристикою апоптичного процесу, оскільки відсутність ПАРП, як і ДНК-зв'язаної протеїнкінази - іншої мішені каспаз, призводить до дисбалансу механізмів корегування цілісності клітинного геному, а саме попереджає репарацію ДНК, яка в свою чергу затримує фрагментацію хроматину. Разом з тим, розщеплена ПАРП покращує доступ ендонуклеаз до хроматину, а також сприяє активації цих ферментів, особливо Ca^{2+} , Mg^{2+} -залежних, не рибозилуючи ці білки.

Таким чином, каспазозалежне розщеплення ПАРП можна розглядати як один із маркерів апоптичної загибелі, що спричинена різноманітними чинниками. Фрагменти, що при цьому утворюються (89 і 24 кДа), активують супресію ферменту шляхом інгібування гомоасоціації (p89) та зв'язування з ДНК інтактною ПАРП (p24). Так, 24 кДа фрагмент, що містить цинкові «пальці», необхідні для асоціації з молекулою ДНК, як і 46 кДа ДНК- зв'язуючий домен нативної ПАРП, може незворотно зв'язуватись з ушкодженою ДНК, таким чином попереджуючи доступ

репараційних комплексів до розривів. Наявність такої позитивної зворотної регуляції ще раз підкреслює важливість каспазо-опосередкованої деградації ПАРП у функціонуванні апоптичної системи. Таким чином, фрагмент 24 кДа може виступати як трансдомінантний інгібітор недеградованої молекули ПАРП, знижуючи її активність, що і спостерігається при дії променевого чинника в дозах 1,0 та 7,78 Гр.

При опроміненні тварин на фоні введення рибоксину через 30 хв після дії радіації встановлене зниження активності ПАРП на 21% порівняно з активністю ферменту у тимоцитах щурів, опроміненних в дозі 1,0 Гр (рис.3.12), в той час як за опроміненням в дозі 7,78 Гр статистично вірогідних змін активності ферменту за цих умов не спостерігалось. Реалізація захисного ефекту рибоксину спостерігається тільки у тимоцитах тварин через 3 години після опромінення в дозі 1,0 Гр (рис. 3.13).



□ - без введення рибоксину, ▒ - на фоні введення рибоксину

Рис. 3.12. Активність ПАРП у тимоцитах щурів за дії іонізуючої радіації через 30 хв після опромінення та на фоні введення рибоксину

*- достовірно по відношенню до контролю;

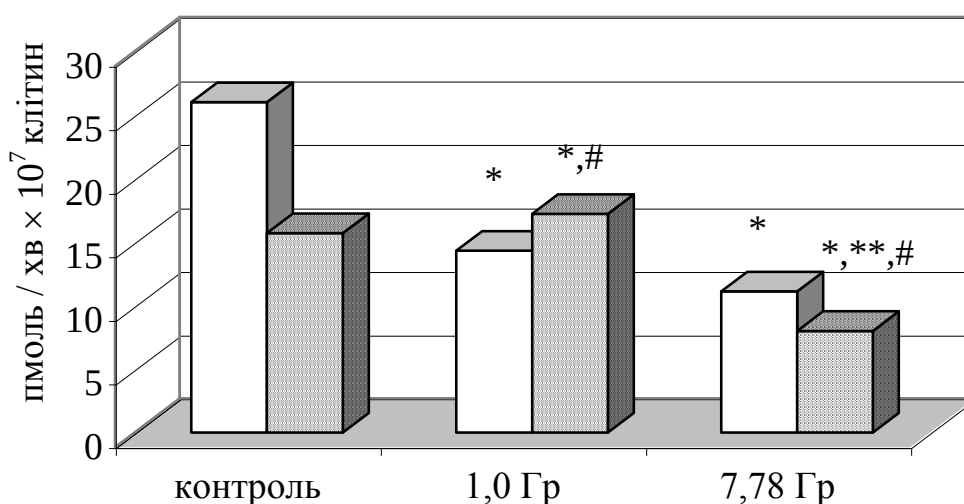
** - достовірно по відношенню до контролю на фоні введення рибоксину;

- достовірно по відношенню до відповідних опромінених груп;

$P \leq 0,05$

Таким чином, введений щурам рибоксин не сприяє в цілому нормалізації індукованому радіацією пригніченого рівня в активності ПАРП у тимоцитах щурів.

Аналогічне пригнічення активності ПАРП у клітинах тимуса виявлено і через 3 години після опромінення щурів. Так, дія рентгенівського випромінювання в дозі 1,0 Гр призводить до зниження ферментативної активності у 1,8 раза порівняно з контрольним показником. При дії на тварин іонізуючої радіації в дозі 7,78 Гр відбувається подальше пригнічення активності у 2,3 раза відносно контролю (рис. 3.13).



□ - без введення рибоксину, ▒ - на фоні введення рибоксину

Рис. 3.13. Активність ПАРП у тимоцитах щурів за дії іонізуючої радіації через три години після опромінення та на фоні введення рибоксину

*- достовірно по відношенню до контролю;

** - достовірно по відношенню до контролю на фоні введення рибоксину;

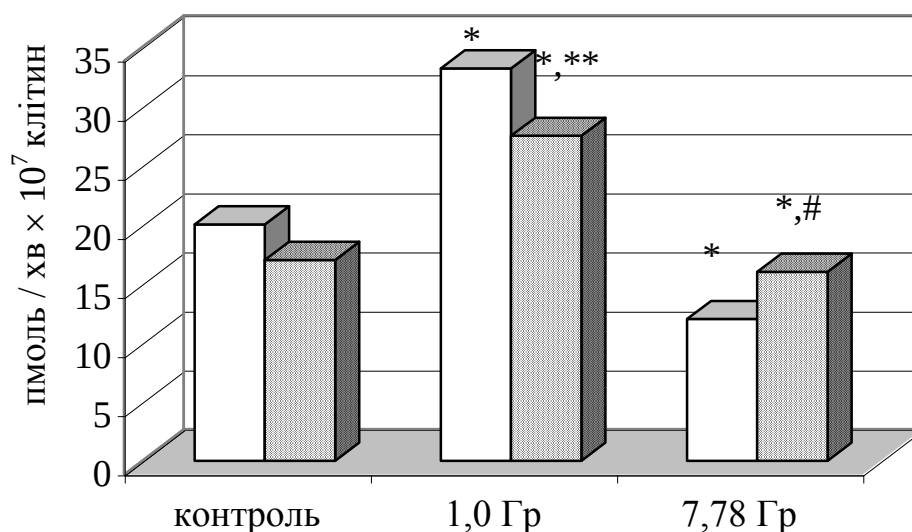
- достовірно по відношенню до відповідних опромінених груп;

$P \leq 0,05$

Представлені нами дані узгоджуються з результатами інших досліджень. Так, Nelipovich et. al. [152], було встановлено значне зниження активності ПАРП за радіаційно-індукованого апоптозу в тимocyтах щурів. Згідно з результатами досліджень, проведених двома групами вчених Wang et. al. [203] та de Murcia [151] на моделях трансгенних мишей, у яких ген ПАРП був інактивований в результаті генного нокаута, встановлено підвищену чутливість останніх до дії гамма-радіації та алкілюючих агентів, порівняно з мишами дикого типу. Зокрема, за опромінення в дозі 8 Гр було показано значні порушення в системі ексцизійної репарації у ПАРП, так званий нокаут мишей; встановлена участь ПАРП у підтриманні хромосомної стабільності у спленоцитах мишей за дії іонізуючої радіації.

Згідно з результатами, представленими на рис 3.14 у спленоцитах щурів через 30 хв після дії іонізуючого випромінювання в дозі 1,0 Гр активність ПАРП зростає на 16%. В той час, як при підвищенні дози випромінювання до 7,78 Гр у лімфоцитах селезінки активність ПАРП знижується на 40% порівняно з контрольним показником.

Зміни активності ПАРП у спленоцитах щурів через 30 хв після дії променевого чинника у дозі 1,0 Гр пов'язані, на нашу думку, зі значним зростанням рівня нерепарованих одноланцюгових розривів, що призводить до активації ферменту [203].



□ - без введення рибоксину, ▨ - на фоні введення рибоксину

Рис. 3.14. Активність ПАРП у спленоцитах щурів за дії іонізуючої радіації через 30 хв після опромінення та на фоні введення рибоксину

*- достовірно по відношенню до контролю;

** - достовірно по відношенню до контролю на фоні введення рибоксину;

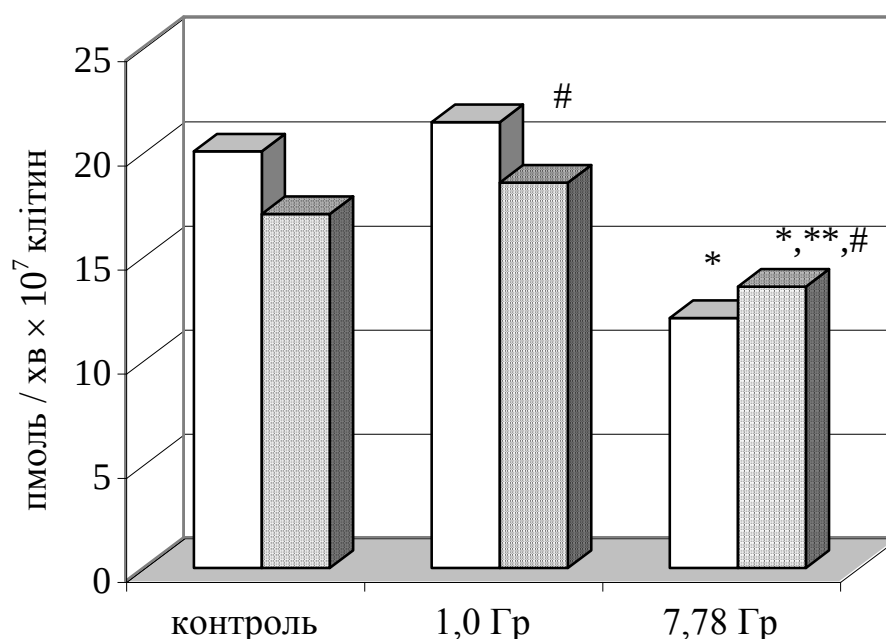
- достовірно по відношенню до відповідних опромінених груп;

$P \leq 0,05$

Через 3 години після дії променевого чинника активність ПАРП зростає на 7% порівняно з контролем (рис.3.15). Така залишкова базальна активність може, на думку деяких авторів [176,196], належати р89 фрагменту ПАРП, який утворюється після дії каспаз. За тотального рентгенівського опромінення щурів у летальній дозі спостерігається пригнічення ферментативної активності на 40% у відношенні до контролю.

При співставленні результатів, які отримані при визначенні активності ПАРП в спленоцитах щурів через 30 хв та 3 години виявляється аналогічність змін – спостерігається активація ферменту за дози

опромінювання щурів в 1,0 Гр, а при опроміненні тварин в дозі 7,78 Гр – пригнічення ПАРП у згаданих інтервалах часу.



□ - без введення рибоксину, ▨ - на фоні введення рибоксину

Рис. 3.15. Активність ПАРП у спленоцитах щурів за дії іонізуючої радіації через три години після опромінення та на фоні введення рибоксину

*- достовірно по відношенню до контролю;

** - достовірно по відношенню до контролю на фоні введення рибоксину;

- достовірно по відношенню до відповідних опромінених груп;

$P \leq 0,05$

Що стосується впливу рибоксину на активність ПАРП в спленоцитах щурів (рис.3.14, 3.15), то насамперед треба відмітити, що активність цього ферменту у спленоцитах опромінених тварин на фоні введення рибоксину зазнає закономірних корегуючих змін. Причому, активність ПАРП незалежно від часу після опромінення, має стійку тенденцію наближення до контрольних значень.

З погляду на приведені результати, найбільш вагомим поясненням подібних зрушень є наступне: оскільки ПАРП має відношення до пуринового обміну, логічно було б допустити, що рибоксин (інозин) може сприяти відновленню нуклеотидного фонду. Це знаходить своє підтвердження в інших аналогічних дослідженнях [122]. За даними, отриманими Virag [195], спостерігався модулюючий вплив пуринів на активність ПАРП за оксидативного стресу. На моделях активованих макрофагів встановлено цитопротекторні властивості пуринів та їх участь у реалізації клітинної загибелі. В дослідях *in vitro* показано зниження активності ПАРП за умов інкубування з аденозином, інозином та гіпоксантином (мілімолярні концентрації) за пероксинітрид - індукованого апоптозу.

Аналізуючи дані в цілому по вивченню активності ПАРП в лімфоїдних клітинах опромінених щурів, можна констатувати, що найбільш вірогідними причинами варіабельності поведінки ферменту в спленоцитах з одного боку і тимоцитах – з іншого, є різна індивідуальна органочутливість і специфічна внутрішньоклітинна реакція на дію радіочинника. При цьому, можливо, має місце специфічний запуск дій ефекторних каспаз та розрізняльна каспазалежна фрагментація ПАРП [152].

3.5.1. Вміст НАД⁺ та АТФ у тимусі та селезінці щурів за дії променевого чинника та на фоні введення рибоксину

Залучення полі-АДФ-рибозилування ядерних білків до процесів репарації ДНК може пояснити істотне зниження рівня внутрішньоклітинного НАД⁺ у лімфоцитах тимуса та селезінки щурів.

Однією з структурно-функціональних постсинтетичних модифікацій білків є АДФ-рибозилування, яке відбувається шляхом ковалентного приєднання АДФ-рибози, донором якої є НАД⁺, а, отже і субстратом для ПАРП [33]. Разом з тим, спираючись на власні експериментальні дані деякі дослідники вбачають взаємозв'язок між активністю ПАРП і рівнем НАД⁺ в клітинах [21,154]. Виходячи з цього цілком закономірно було дослідити вміст НАД⁺ за дії променевого чинника у досліджуваних дозах (1,0 Гр та 7,78 Гр).

Результати проведених нами досліджень представлено у таблиці 2. Аналіз цих даних показав, що у тимусі щурів через 30 хв після дії іонізуючого випромінювання в дозі 1,0 Гр спостерігається зниження рівня НАД⁺ на 32% порівняно з контролем. При підвищенні дози випромінювання до 7,78 Гр вміст НАД⁺ знижувався у 1,5 раза порівняно з контрольним показником.

Через три години після тотального 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⁺ знижувався на 22% у порівнянні з контролем. У селезінці щурів, навпаки, має місце зниження вмісту НАД⁺ на 36% через 30 хв після дії іонізуючої радіації в дозі 1,0 Гр та залишається у межах контрольного значення при опроміненні тварин у летальній дозі. Через три години після дії променевого чинника в дозах 1,0 Гр і 7,78 Гр спостерігається зниження вмісту НАД⁺ на 27% та 40% відповідно.

Встановлене нами зниження рівня НАД⁺ в тимоцитах та спленоцитах щурів за дії іонізуючої радіації можна пояснити активацією ферменту АДФ-(рибозил)-циклази, який здатний утилізувати НАД⁺ і разом з тим активувати процес синтезу цикло-АДФ-рибози, який є потенційно проапоптотичним агентом [29]. Крім того, додатковим чинником у зниженні рівня НАД⁺ в клітинах опромінених тварин може

бути вплив різних представників родини ПАРП. Так, активація ПАРП-2, що також утилізує НАД⁺ і стимулюється розривами у молекулі ДНК, була продемонстрована на різних клітинних лініях з використанням інгібіторів активності ПАРП-1 [66].

Таблиця 2

Вміст НАД⁺ у лімфоїдних органах щурів за дії іонізуючої радіації
(M±m, n=5)

Вміст НАД ⁺ , нмоль/г тканини				
СТАН	Тимус		Селезінка	
	30 хв після опромінення	3 год після опромінення	30 хв після опромінення	3 год після опромінення
КОНТРОЛЬ	110,1 ± 9,2	110,1 ± 9,2	107,3 ± 8,4	107,3 ± 8,4
КОНТРОЛЬ +рибоксин	105,2 ± 8,1	105,2 ± 8,1	96,6 ± 7,3	96,6 ± 7,3
1,0 Гр	74,8 ± 3,9 *	110,2 ± 8,7	68,8 ± 2,9 *	78,5±4,1 *, **
1,0Гр + рибоксин	89,5 ± 5,6*,**, #	115,3 ± 6,4	82,2±5,7*,**, #	91,3 ± 6,7 *, #
7,78Гр	75,4 ± 3,2 *	85,5 ± 3,1 *	99,3 ± 5,3	64,9 ± 2,8 *
7,78 Гр + рибоксин	78,6 3,2 *,**	95,7 ± 4,8 *, #	102,1 ± 6,9	94,2 ± 7,5 #

*- достовірно по відношенню до контролю;

** - достовірно по відношенню до контролю на фоні введення рибоксину;

- достовірно по відношенню до відповідних опромінених груп;

P ≤ 0,05

При введенні тваринам попередньо за 15 хв до опромінення рибоксину спостерігається модифікуючий ефект препарату на вміст НАД⁺ в обох органах порівняно з відповідними показниками при дії рентгенівського опромінення. Причому, не залежно від дози опромінення

та часу після дії іонізуючої радіації, рибоксин сприяє підвищенню рівня НАД⁺ в клітинах порівняно з таким, що має місце при опроміненні тварин (без рибоксину), або створює умови для стабілізації рівня НАД⁺, що відповідає (чи близькі) значенням контролю. Характер дії рибоксину можна пояснити із урахуванням безпосереднього зв'язку обміну пуринових нуклеотидів з метаболізмом НАД⁺. Нікотинова кислота та нікотинамід фосфорибозилуються за участі фосфорибозилпірофосфату (ФРПФ), який до того ж є першим субстратом біосинтезу пуринів *de novo*. Разом з тим, АТФ є необхідним компонентом при аденілюванні нікотинамідмононуклеотиду за участі ключового ферменту біосинтезу НАД⁺ – аденілілтрансферази. З іншого боку НАД⁺ бере участь у регуляції як біосинтезу пуринів *de novo*, так і в шляхах перетворення і деградації останніх. Таким чином, метаболіти пуринового обміну, до яких належить інозин (рибоксин), відіграють значну роль у підтриманні внутрішньоклітинної концентрації НАД⁺.

Згідно з даними літератури, зниження внутрішньоклітинного рівня АТФ є одним з ранніх характерних проявів променевого ураження клітинних обмінних процесів [7,27,51,135], а на думку деяких дослідників – можливою причиною апоптозу лімфоцитів за дії іонізуючої радіації [62,67]. Стимуляція катаболічних реакцій перетворення аденілових нуклеотидів призводить до зміни активності спряжених метаболічних циклів, дисбалансу рівноважних концентрацій пуринів та піримідинів і, в кінцевому результаті, до пригнічення функцій лімфоїдних клітин.

Слід зазначити, що реалізація пошкоджень енергозабезпечуючих систем клітин відбувається як шляхом безпосереднього порушення даних систем дією радіації, так і опосередковано, через зміни функції регуляторів окиснення (андреналіну, інсуліну, глюкокортикоїдів) і нейрогуморальної системи в цілому [6,104].

Вивчення динаміки перерозподілу аденілових нуклеотидів [2,26] показало, що вже при початкових станах після опромінення у дозах 6-10 Гр

відбувається суттєве зниження вмісту АТФ. Рівень аденозиндифосфату, якщо й знижується, то у незначній мірі, а концентрація аденозинмонофосфату різко підвищується.

Для кращого усвідомлення біохімічних механізмів радіаційно - індукованого порушення функціонування лімфоцитів важливо дослідити вміст АТФ у лімфоїдних органах щурів на ранніх стадіях розвитку променевого ураження. Тому метою наступного етапу роботи було вивчити вплив іонізуючої радіації на вміст аденозинтрифосфату у тимусі та селезінці опромінених тварин.

Згідно з результатами досліджень представлених на рис. 3.16, через 30 хв після опромінення щурів в дозі 1,0 Гр рівень АТФ у тимусі зменшується на 34% порівняно з контролем. Підвищення дози радіації до 7,78 Гр призводить до подальшого зниження вмісту АТФ до 57% від контролю. Разом з тим через 30 хв після опромінення на фоні введенного рибоксину встановлено підвищення вмісту АТФ порівняно з такими після опромінення – на 29% і 20% відповідно.

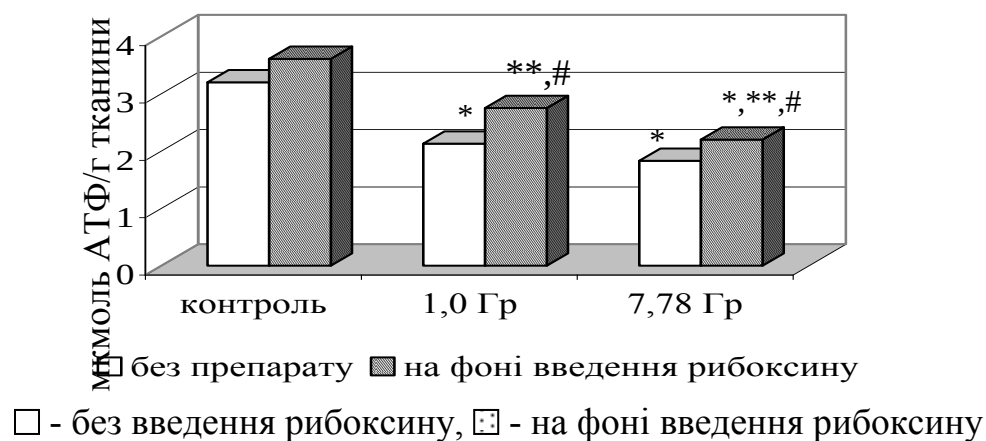


Рис.3.16. Вміст АТФ у тимусі щурів за дії іонізуючої радіації через 30 хвилин після опромінення та на фоні введення рибоксину

*- достовірно по відношенню до контролю;

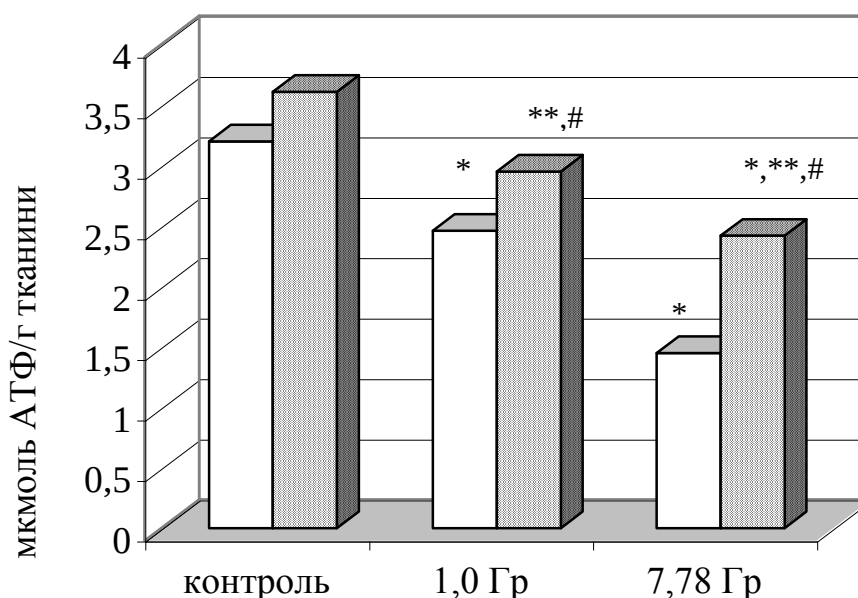
** - достовірно по відношенню до контролю на фоні введення рибоксину;

- достовірно по відношенню до відповідних опромінених груп;

$P \leq 0,05$

Через три години після дії на щурів променевого чинника в дозах 1,0 Гр та 7,78 Гр у тимусі спостерігається також зниження порівняно з контролем вмісту АТФ на 23% та 55% відповідно (рис. 3.17). За дії на щурів рентгенівського випромінювання на фоні попереднього введення препарату рибоксину спостерігається підвищення вмісту АТФ у 1,29 раза після опромінення в дозі 1,0 Гр і у 1,66 раза за летальної дози відповідно опромінених тварин.

Таким чином, характер змін вмісту АТФ у тимусі щурів за дії іонізуючої радіації через 30 хв і 3 години після опромінення та на фоні введеного рибоксину є однотиповим.



□ - без введення рибоксину, ▨ - на фоні введення рибоксину

Рис.3.17. Вміст АТФ у тимусі щурів за дії іонізуючої радіації через три години після опромінення та на фоні введення рибоксину

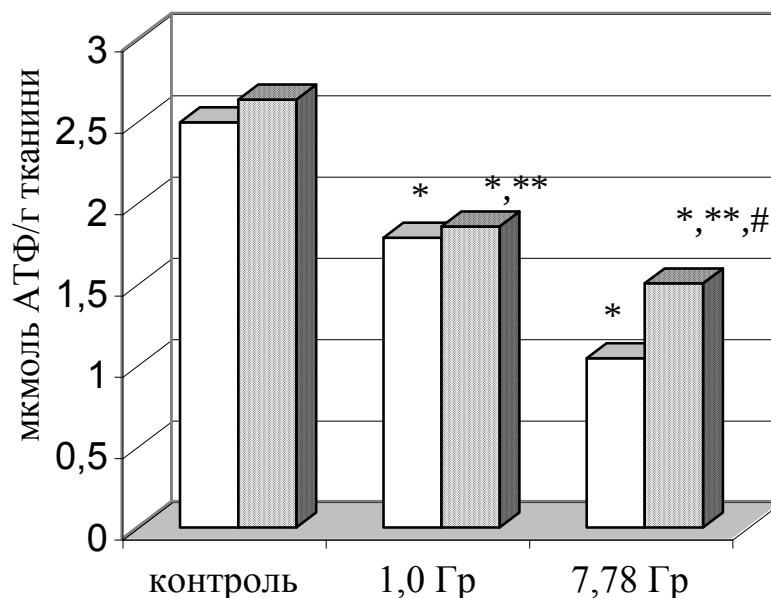
*- достовірно по відношенню до контролю;

** - достовірно по відношенню до контролю на фоні введення рибоксину;

- достовірно по відношенню до відповідних опромінених груп;

$P \leq 0,05$

При дослідженні вмісту АТФ у селезінці щурів через 30 хв і 3 години після дії променевого чинника (рис. 3.18-3.19), відбувається також зниження вмісту АТФ.



□ - без введення рибоксину, ■ - на фоні введення рибоксину

Рис.3.18. Вміст АТФ у селезінці щурів за дії іонізуючої радіації через 30 хвилин після опромінення та на фоні введення рибоксину

*- достовірно по відношенню до контролю;

** - достовірно по відношенню до контролю на фоні введення рибоксину;

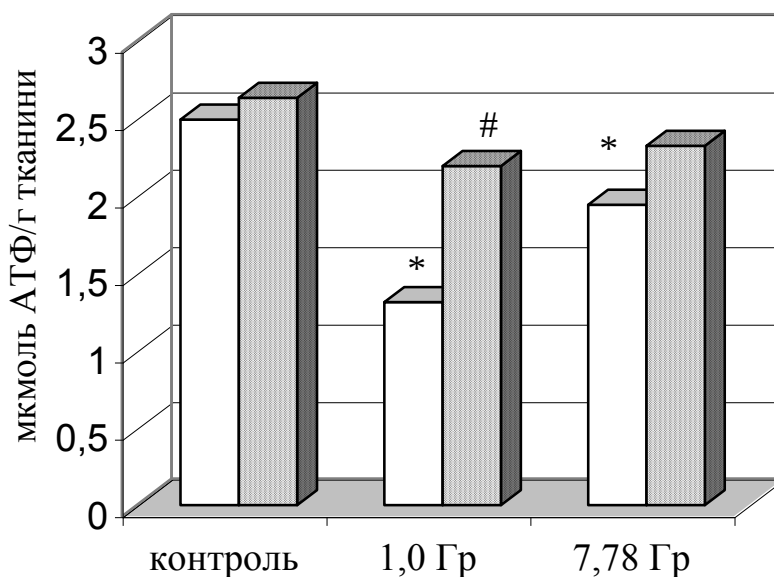
- достовірно по відношенню до відповідних опромінених груп;

$P \leq 0,05$

Так, через 30 хв після опромінення тварин у дозі 1,0 Гр в селезінці щурів вміст АТФ становив 71% від значення контролю. При підвищенні дози опромінення до 7,78 Гр спостерігається також зниження концентрації АТФ на 58%. Через три години після променевого ураження тварин у селезінці спостерігається подальше зниження концентрації АТФ у 1,9 раза за опромінення в дозі 1,0 Гр та у 1,3 рази за дози 7,78 Гр.

Ефективність корегуючої дії рибоксину, також як і у випадку тимусу, на вміст АТФ у селезінці щурів була значною, особливо це стосується даних, що отримані через 3 години після опромінення (рис.3.19).

Закономірності змін вмісту АТФ встановлені нами узгоджуються з результатами ряду досліджень [4,5,67], де було показано зниження концентрації АТФ у радіочутливих органах на ранніх етапах розвитку променевого ефекту. Внутрішньоклітинний фонд АТФ у тканинах опромінених тварин на початкових етапах розвитку інтерфазної загибелі може зменшуватись за рахунок посилення реакцій деградації пуринових нуклеотидів. Також післяпроменеве зниження пулу макроергу пов'язують з радіаційним порушенням біосинтезу пуринів [91].



□ - без введення рибоксину, ▒ - на фоні введення рибоксину

Рис.3.19. Вміст АТФ у селезінці щурів за дії іонізуючої радіації через три години після опромінення та на фоні введення рибоксину

*- достовірно по відношенню до контролю;

** - достовірно по відношенню до контролю на фоні введення рибоксину;

- достовірно по відношенню до відповідних опромінених груп;

$P \leq 0,05$

Більшість дослідників на сьогодні зазначають, що радіаційно-індукована програмована загибель клітин є досить енергоємним процесом, оскільки в ньому спряжені етапи синтезу транскрипційних факторів та інших регуляторних молекул та деградація структурних елементів клітини з залученням як складової, наприклад, системи гідролітичного розщеплення молекул - АТФ-убіквітинування [192]. Отже, рівень АТФ у клітині потенційно здатний впливати на швидкість проходження апоптозу.

Eguchi et. al [105] показали, що залучення АТФ-залежних процесів за Fas-індукованого апоптозу пов'язане з утворенням апоптосомного комплексу, до складу якого входить, поряд з іншими компонентами, dАТР (АТР) і прокаспаза-9. Остання після аутопротеолізу в свою чергу активує ефекторну каспазу-3, перехід якої разом з іншими апоптичними чинниками до ядра відбувається за участі механізмів активного ядерного транспорту, який потребує енергії гідролізу АТФ.

Таким чином, в умовах нашого досліду, з використанням люциферин-люциферазного методу, було встановлено, що після дії променевого чинника вміст АТФ зберігається на рівні, достатньому як для запуску, так і для здійснення ефекторної стадії радіаційно-індукованого апоптозу, чому, можливо, сприяє саме каспазо-опосередкована деградація ПАРП.

Оскільки на сьогодні вважається, що ПАРП є одним з перших факторів, який розпізнає пошкодження у молекулі ДНК і бере безпосередню участь у функціонуванні системи ексцизійної репарації, на наступному етапі роботи було важливо дослідити рівень одно- та дволанцюгових розривів за дії променевого чинника.

3.6. Дослідження рівня одно- та дволанцюгових розривів ДНК у тимоцитах та спленоцитах щурів за дії іонізуючої радіації та на фоні введення рибоксину

Кінцевою ланкою апоптозу в каскаді молекулярних порушень, що приводять клітину до загибелі є міжнуклеосомна ензиматична деградація хроматину. Пряма дія іонізуючого випромінювання на структуру молекули ДНК, а також непряма, яка опосередкована дією продуктів вільнорадикальних реакцій, що індукуються радіацією (H , OH , HO_2 , H_2O_2), викликають ушкодження нуклеопротейнових комплексів ядра. Насамперед це односайтові пошкодження, до яких належать одноланцюгові розриви, в утворенні яких переважають механізми непрямой дії радіації і вони швидко та ефективно репаруються (50% впродовж 10 - 45 хв) і, локальні множинні пошкодження, куди входять дволанцюгові розриви, негомологічна репарація 50 % яких відбувається до 4 год післярадіаційного часу [17,47]. У випадку коли активність репараційних систем недостатня і пошкодження ДНК зберігаються, то в клітинах запускається програма апоптозу [9]. Тому важливо було дослідити рівень одно- та дволанцюгових розривів ДНК в умовах нашого експерименту.

За нашими даними (табл.3) в лімфоцитах тимуса щурів через 30 хв після опромінення тварин в дозі 1,0 Гр кількість одноланцюгових розривів ДНК підвищується у 1,9 раза порівняно з контролем; за дози 7,78 Гр кількість одноланцюгових розривів ДНК збільшується у 2,5 раза. Рівень дволанцюгових розривів достовірно зростає в 2,3 раза при опроміненні в дозі 1,0 Гр і майже в 6 разів за дії променевого чинника в дозі 7,78 Гр. Аналогічні результати були отримані і іншими дослідниками. Так, збільшення кількості одноланцюгових розривів ДНК було встановлено в тимоцитах щурів вже через 15 хв після опромінення тварин в дозі 1,0 Гр, при цьому кількість дволанцюгових розривів збільшувалась на другу годину після дії променевого чинника [1].

Через 30 хв після опромінення тварин на фоні введення рибоксину кількість одноланцюгових розривів ДНК в тимоцитах щурів наближається до контрольного рівня, а кількість дволанцюгових розривів ДНК зменшується в 1,6 раза порівняно з показником у опроміненних в дозі 1,0 Гр тварин. Зниження виходу одно- і дволанцюгових розривів ДНК при введенні рибоксину до опромінення спостерігається і за дози 7,78 Гр відповідно в 1,6 та 1,3 раза.

Таблиця 3

Вплив іонізуючої радіації в дозі 1,0 Гр і 7,78 Гр на рівень одно- та дволанцюгових розривів ДНК у лімфоїдних клітинах тимуса і селезінки щурів ($M \pm m$; $n=5$)

ТИМОЦИТИ (1×10^7 клітин)					СПЛЕНОЦИТИ (1×10^7 клітин)			
	Одноланцюгові розриви, %		Дволанцюгові розриви, %		Одноланцюгові розриви, %		Дволанцюгові розриви, %	
	30 хв п/о	3 год п/о	30 хв п/о	3 год п/о	30 хв п/о	3 год п/о	30 хв п/о	3 год п/о
Контроль	6,7 $\pm$ 0,5	6,7 $\pm$ 0,5	1,1 $\pm$ 0,8	1,1 $\pm$ 0,8	5,6 $\pm$ 0,45	5,6 $\pm$ 0,45	1,0 $\pm$ 0,08	1,0 $\pm$ 0,08
Контроль+ рибоксин	6,2 $\pm$ 0,4	6,2 $\pm$ 0,4	0,9 $\pm$ 0,07	0,9 $\pm$ 0,07	5,4 $\pm$ 0,4	5,4 $\pm$ 0,4	0,86 $\pm$ 0,07	0,86 $\pm$ 0,07
1,0 Гр	12,8 $\pm$ 0,9 *	13,3 $\pm$ 0,1 *	2,5 $\pm$ 0,1 *	3,3 $\pm$ 0,3 *	18,0 $\pm$ 1,6 *	12,3 $\pm$ 1,1 *	1,2 $\pm$ 0,1 *	2,9 $\pm$ 0,2 *
1,0 Гр + рибоксин	6,6 $\pm$ 0,4 #	11 $\pm$ 0,9 *, **, #	1,6 $\pm$ 0,1 **, #	2,87 $\pm$ 0,2 *, **	4,8 $\pm$ 0,3 *, #	9,9 $\pm$ 0,9 *, **	0,78 $\pm$ 0,06 *, #	2,6 $\pm$ 0,2 *, **
7,78 Гр	16,9 $\pm$ 1,4 *	26,3 $\pm$ 2,3 *	6,4 $\pm$ 0,5 *	6,7 $\pm$ 0,6 *	15,8 $\pm$ 1,3 *	21 $\pm$ 1,9 *	1,22 $\pm$ 0,1 *	5,7 $\pm$ 0,4 *
7,78 Гр + рибоксин	10,7 $\pm$ 0,8 *, **, #	22,2 $\pm$ 1,9 *	5,1 $\pm$ 0,3 *, **, #	6,5 $\pm$ 0,5 *, **	8,3 $\pm$ 0,6 *, **, #	15,1 $\pm$ 1,4 *, **, #	0,87 $\pm$ 0,07 #	4,9 $\pm$ 0,4 *, **, #

*- достовірно по відношенню до контролю;

** - достовірно по відношенню до контролю на фоні введення рибоксину;

- достовірно по відношенню до відповідних опроміnenних груп;

$P \leq 0,05$

Через 3 год після опромінення, за умов стимулювання вторинної ферментативної деградації ДНК, кількість одноланцюгових розривів в тимоцитах зростає в 2 і майже в 4 рази відповідно за дії рентгенівського випромінення в дозах 1,0 Гр і 7,78 Гр.

Встановлено, що рівень дволанцюгових розривів має дозозалежний характер і підвищується в 3 та в 6,3 раза відповідно при опроміненні в дозах 1,0 Гр і 7,78 Гр. На сьогодні чітко встановлено, що саме рівень нерепарованих дволанцюгових розривів корелює з частотою хромосомних аберацій і може бути летальним для клітин за впливу іонізуючої радіації [1].

При опроміненні тварин на фоні введення рибоксину в тимоцитах щурів рівень одно- і дволанцюгових розривів через 3 год після дії чинників зменшувався порівняно з відповідними результатами при дії рентгенівського випромінювання (табл.3). Так, кількість одноланцюгових розривів ДНК зменшується в 1,2 раза за доз 1,0 Гр і 7,78 Гр, а рівень дволанцюгових розривів ДНК знижується в 1,6 та в 1,3 раза відповідно при опроміненні в дозах 1,0 Гр і 7,78 Гр на фоні введення тваринам рибоксину. Отже, згідно з одержаними даними при введенні тваринам за 15 хв до опромінення рибоксину спостерігається модифікуючий ефект препарату на досліджувані показники порівняно з відповідними результатами за дії рентгенівського випромінювання; рибоксин сприяє активації репараційних процесів і таким чином можна стверджувати про те, що захисна дія рибоксину полягає в компенсації дезінтегруючого ефекту опромінення.

В лімфоїдних клітинах селезінки при опроміненні тварин пошкодження ДНК мали аналогічний характер. Через 30 хв після дії променевого чинника в дозі 1,0 Гр та 7,78 Гр кількість одноланцюгових розривів збільшувалась в 3,2 раза і 2,8 раза відповідно. Кількість дволанцюгових розривів зростала у 1,2 раза порівняно з контролем за обох доз опромінення. Через 3 год в спленоцитах щурів, опромінених у досліджуваних дозах рівень одноланцюгових розривів зростав в 2,2 та 3,8

раза, а дволанцюгових розривів - майже у 3 рази та 5,7 рази відповідно за доз 1,0 Гр та 7,78 Гр. Ці дані узгоджуються з результатами інших досліджень [8,15], де також встановлене значне збільшення кількості розривів ДНК у лімфоїдних клітинах опромінених тварин в діапазоні 2,0 – 12,0 Гр.

При опроміненні тварин на фоні введення рибоксину кількість одноланцюгових і дволанцюгових розривів ДНК через 30 хв після дії чинників знижувалась відповідно в 3,8 та 1,5 рази порівняно з спленоцитами тварин, що зазнали дії радіації в дозі 1,0 Гр і майже у 2 рази та 1,4 рази менше за умови опромінення в дозі 7,78 Гр. Через три години після опромінення на фоні рибоксину кількість одноланцюгових розривів зменшується в 1,2 рази, а кількість дволанцюгових розривів не змінювалась відносно показника у опромінених тварин в дозі 1,0 Гр. Частка одно- і дволанцюгових розривів ДНК в спленоцитах щурів, що піддалися опроміненню в дозі 7,78 Гр на фоні рибоксину складала $15,1 \pm 1,4$ та $4,9 \pm 0,4$, що в 1,4 та 1,2 рази нижче за результати, які отримані через 3 години після радіаційного ураження в дозі 7,78 Гр.

Одержані дані по рівню одно- і дволанцюгових розривів ДНК в лімфоїдних клітинах тимусу і селезінки опромінених в мінімальних та сублетальних дозах щурів узгоджуються з попередніми даними по накопиченню у лімфоцитах полідезоксирибонуклеотидів, зростанню швидкості генерування супероксидних радикалів [11] і свідчать, що через 30 хв та 3 години після дії на тварин іонізуючої радіації в дозах 1,0 Гр та 7,78 Гр у лімфоїдних клітинах тимуса і селезінки відбуваються значні деструктивні зміни пов'язані з пошкодженням структурної організації хроматину, що супроводжується посиленням деградації ядерного матеріалу і згідно з сучасними уявленнями класифікується як прояв загибелі клітин за механізмом апоптозу [21].

Таким чином, представлені експериментальні результати радіаційно-індукованого підвищення рівня одно- і дволанцюгових розривів ДНК та зниженням активності ферменту полі-(АДФ-рибозо)-полімерази на фоні активації протеолітичного каскаду цистеїнових протеїназ призводить, на нашу думку, до зменшення ефективності роботи системи ексцизійної репарації ДНК в лімфоцитах тварин. Така система подій та наслідків в умовах радіаційного ураження обумовлена, можливо, необоротнім приєднанням фрагменту (p24) ДНК-зв'язуючого домену полі-(АДФ-рибозо)-полімерази [202].

Реєстрований нами модифікуючий ефект рибоксину можна пояснити з позиції підвищення загальної резистентності організму внаслідок мобілізації захисних ресурсів. Згідно з сучасними уявленнями введення препарату стимулює біоенергетичні реакції, що призводить до нормалізації рівня клітинного АТФ. Враховуючи важливу участь аденозин-5'-трифосфату у внутрішньоклітинних репараційних процесах можна припустити, що застосування рибоксину попереджує зменшення внутрішньоклітинної концентрації АТФ, що сприяє репараційному відновленню структурної організації молекули ДНК.

Оскільки вважається установленною провідна роль Ca^{2+} , Mg^{2+} -залежної ендонуклеази в післяпроменевій деградації хроматину, доцільно було дослідити активність цього ферменту в умовах нашого досліджу.

3.7. Дослідження активності Ca^{+2} , Mg^{2+} -залежної ендонуклеази у лімфоцитах тимуса та селезінки щурів за дії іонізуючої радіації

Міжнуклеосомне розщеплення ядерної ДНК є характерною ознакою ефекторної стадії апоптичної загибелі клітин лімфоїдних органів за дії іонізуючої радіації. Цей процес каталізується широким спектром

ферментів, серед яких чільне місце займають ендонуклеази. До них належать катіон-залежні ферменти – Mg^{2+} -залежна дезоксирибонуклеаза CAD (caspase-activated DNase), що активується за участі каспази-3 та каспази-7; родина Ca^{2+} , Mg^{2+} -залежних ендонуклеаз: Nuc 18, Nuc 40, ДНКаза I та Днк аза II. Гомологом ДНКазы I в ядрах тимоцитів щурів є γ -ДНКаза, яка згідно з даними літератури [169,179] бере безпосередню участь у фрагментації хроматину за радіаційно-індукованого апоптозу лімфоїдних клітин. Показано [164], що активація Ca^{2+} , Mg^{2+} -залежних ендонуклеаз після опромінення пов'язана з радіаційним порушенням їх післятрансляційних модифікацій, а саме шляхом полі-АДФ-рибозилування. Тому доцільно було дослідити рівень Ca^{2+} , Mg^{2+} -залежного накопичення полідезоксирибонуклеотидів (ПДН) – фрагментів, що утворюються в результаті міжнуклеосомної деградації хроматину у лімфоцитах тварин за дії променевого чинника.

В дослідях по вивченню процесів накопичення ПДН при дії іонізуючої радіації в дозі 1,0 Гр нами встановлено, що через три години після дії променевого чинника рівень полідезоксирибонуклеотидів за умов активації Ca^{2+} , Mg^{2+} -залежного ендонуклеолізу у тимоцитах підвищується у 5,9 рази. За опромінення в дозі 7,78 Гр спостерігається подальше накопичення ПДН у 9,6 раза, що становить 25,4% (рис.3.20).

Представлені нами дані узгоджуються із результатами робіт [30,43], де показано, що в радіаційно-індукованій міжнуклеосомній фрагментації ДНК і в накопиченні ПДН задіяні Ca^{2+} , Mg^{2+} -залежні ендонуклеази. Згідно з сучасними уявленнями молекули ендонуклеази синтезуються в цитоплазмі і переходять в ядро, де підлягають модифікації шляхом АДФ-рибозилування. Оскільки, Ca^{2+} , Mg^{2+} -залежні ендонуклеази є полі-(АДФ-рибозо)-залежними ферментами, то приєднання навіть декількох залишків полі-АДФ-рибози (ПАР) забезпечує їх інактивацію в ядрі. Експериментальними дослідженнями було показано, що автолітичне розщеплення ядерної ДНК починається після певного лаг - періоду, під час

якого відбувається відщеплення залишків ПАР від молекули нуклеази, що призводить до активації ферменту та фрагментації ДНК [44].

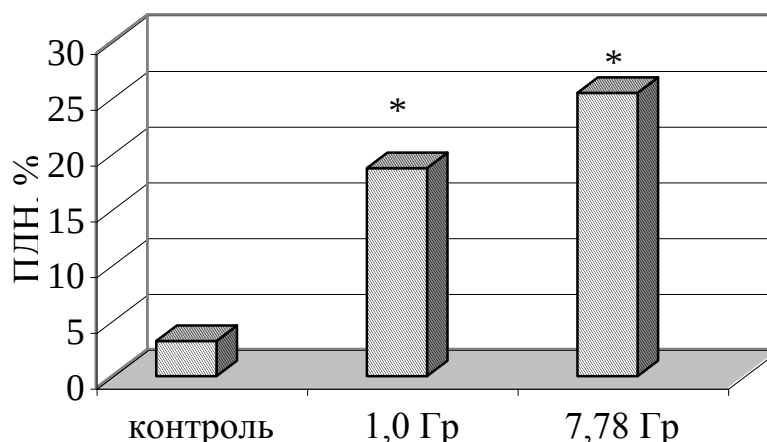


Рис.3.20. $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -залежне накопичення полідезоксирибонуклеотидів у тимоцитах щурів через три години після опромінення

*- достовірно по відношенню до контролю, $P \leq 0,05$

Нами показано радіаційно-індуковане $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -залежне накопичення ПДН у лімфоцитах селезінки щурів за обох досліджуваних доз. Так, рівень полідезоксирибонуклеотидів підвищувався у 6,14 раза порівняно з контролем при опроміненні в дозі 1,0 Гр. За дії променевого чинника в дозі 7,78 Гр відбувається нарощування ПДН і складає 22,3% (рис.3.21), що майже у 9 разів більше за контрольних значень.

Результати наших досліджень узгоджуються з даними [57], де встановлено підвищення рівня вмісту полідезоксирибонуклеотидів, що пов'язано, на думку авторів, з активацією $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -залежного ендонуклеолізу.

Результати наших досліджень узгоджуються з даними [57], де встановлено підвищення рівня вмісту полідезоксирибонуклеотидів, що пов'язано, на думку авторів, з активацією $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -залежного ендонуклеолізу.

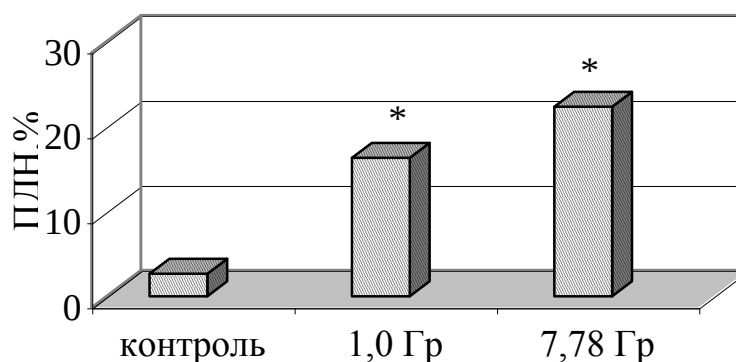


Рис.3.21. Ca^{2+} , Mg^{2+} -залежне накопичення полідезоксирибонуклеотидів у спленоцитах щурів через три години після опромінення

*- достовірно по відношенню до контролю, $P \leq 0,05$

Ca^{2+} , Mg^{2+} -ендонуклеазна активність залежить від внутрішньоклітинної концентрації Ca^{2+} , зміни якого є важливою передумовою апоптичної загибелі. Роль Ca^{2+} у програмованій загибелі клітин лімфоїдних органів полягає не стільки у підвищенні його загального рівня у цитозолі, скільки у порушенні перерозподілу катіону серед внутрішньоклітинних депо. На основі проведених досліджень Yakovlev A.G. et al [208] запропонували модель апоптозу, згідно з якою часткова активація Ca^{2+} , Mg^{2+} -залежної ендонуклеази, що обумовлена зростанням концентрації внутрішньоклітинного Ca^{2+} , призводить до утворення розривів у молекулі ДНК і, як наслідок, до активації PARP. В свою чергу полі-АДФ-рибозилування ендонуклеази викликає пригнічення активності ферменту. Подальше розрізання та інактивація PARP за участю каспаз попереджує полі-АДФ-рибозилування ядерних білків. Окрім того, фермент PAR-глікогідролаза, каталізуючи відщеплення залишків полімеру від цих білків, сприяє активації Ca^{2+} , Mg^{2+} -залежного ендонуклеолізу. Активована нуклеаза здійснює міжнуклеосомну фрагментацію ДНК, що є характерною ознакою пізньої стадії апоптозу.

ЗАКЛЮЧЕННЯ

Дослідження біохімічних механізмів апоптичної загибелі лімфоїдних клітин становить значний науковий інтерес.

Процес програмованої клітинної загибелі (апоптоз) розвивається у відповідь на різні сигнали, які надходять з оточуючого середовища. Такі сигнали адресовані біохімічним регуляторам життєдіяльності клітини, зокрема, ферментним системам – протеїназам і нуклеазам. Якщо ці події призводять до різких змін у функціонуванні регуляторів, то настає значна структурна перебудова таких ядерних компонентів як хроматин, ядерна мембрана, ядерний матрикс та розщеплення ДНК і ядерних білків; зупинка проліферації і загибель клітин. Паралельно з цим в клітині існує складна система противаги, яка нейтралізує дію сигналу, або ж її підсилює. Тому дослідження причинно-наслідкових зв'язків та виявлення відмінних та спільних ланок у порушенні структурної організації хроматину за дії чинників різної природи є важливим для розуміння загальних закономірностей механізмів загибелі та адаптації клітин.

У зв'язку з цим принципового значення набуває пошук метаболічних порушень, які б могли виконувати роль пускових у розвитку апоптозу. Одним з підходів до вирішення такої проблеми є визначення динаміки вмісту метаболітів, що беруть участь у формуванні сигналу на рівні зовнішньої мембрани клітини та у передачі такого сигналу в ядро.

Основні біохімічні механізми запуску апоптозу умовно поділено на три групи: мембранні (рецепторно-опосередковані), мітохондріальні та ядерні.

Мембранні, або рецепторно-опосередковані механізми включають реалізацію апоптогенного сигналу через спеціальні рецептори – трансмембранні білки, що передають цитотоксичний сигнал. Перш за все,... до них належать рецептори родини фактора некрозу пухлин (TNF). С-кінцевий внутрішньо-клітинний домен цих рецепторів здатний ініціювати наступні етапи розвитку апоптозу. Зв'язування рецептора з

відповідними лігандами на поверхні лімфоцитів в подальшому активує специфічні протеїнази – каспази -3, -7, -8.

В процесі реалізації цитотоксичної дії лімфоцити виділяють також серинові протеїнази (гранзими) та білок, що утворює канали (пори) в мембрані (перфорин). Запуск такого варіанту апоптозу може бути пов'язаний не тільки з плазматичною мембраною, але й з мембранами органел. Так, рецептори TNF виявлені на мембранах ендоплазматичного ретикулуму, а їх активація ініціює апоптоз [130]. Розвиток апоптозу може відбуватися за умови активації цитоплазматичних рецепторів, наприклад, рецепторів глюкокортикоїдів, естрогенів та інших гормонів.

Мітохондріальні механізми також відіграють важливу роль в апоптозі. У внутрішньомітохондріальному просторі виявлено ряд білків (цитохром С, едонуклеаза G та інші) при транслокації яких в цитоплазму активується апоптоз [61,130,180,202]. Окрім цього для регуляції “мітохондріального” апоптозу існує система білків, яка здійснює контроль за виходом із мітохондрій проапоптичних факторів. Серед них виділяють апоптичні та антиапоптичні білки родини Bcl-2.

Біохімічні механізми запуску апоптозу у ядрі передбачають дестабілізацію структури хроматину, фрагментацію ДНК, порушення функціонування клітини, її дезінтеграцію і загибель.

Дослідження широкого спектру індукторів апоптозу виявили залежність загибелі клітин від систем клітинної сигналізації, які здатні посилювати отриманий сигнал та передавати його специфічним ефектором апоптозу, таким як цистеїнові протеїнази – каспази, ендонуклеази, а також транскрипційним факторам – регулятором експресії певних генів. Значного успіху у з'ясуванні біохімічних закономірностей програмованої клітинної загибелі було досягнуто завдяки встановленню того факту, що радіаційна загибель лімфоцитів, одних з найбільш чутливих клітин організму, є різновидністю апоптозу.

Ланцюг біохімічних подій в апоптозному процесі супроводжується характерними морфологічними порушеннями клітинних структур. Так спостерігається компактизація ядерного хроматину з різкими змінами границь ядра, зміни цитоплазматичних органел, ущільнення цитоплазми з утворенням апоптичних тілець і розпадом клітини на фрагменти.

Тому, першочерговим етапом наших досліджень було вивчення морфологічних показників клітин тимусу і селезінки контрольних щурів та тварин опромінених в дозах 1,0 та 7,78 Гр. Згідно з даних люмінесцентної мікроскопії тимоцити та спленоцити контрольних щурів мають характерний високий рівень ядерно-цитоплазматичного співвідношення з розміщенням хроматину у центральній частині ядра. В той час як тимоцити і спленоцити опромінених тварин виявляють типові морфологічні ознаки радіаційно-індукованої апоптозної загибелі через 3 години після опромінення з утворенням гранул високо конденсованого хроматину та їх розміщення поблизу ядерної мембрани.

Дослідженнями ступеню структурної упорядкованості хроматину встановлено, що як в тимоцитах так і в спленоцитах за опромінення в дозі 1,0 Гр та 7,78 Гр спостерігаються структурні зміни ДНК в складі нуклепротейнового комплексу. Ці зміни проявляються у збільшенні розрахункового параметру α , який вважається інтегральним показником ступеню спіралізації нуклеїнових кислот.

В складному багато етапному процесі апоптозу беруть участь багато різних ферментних систем. Однак провідну роль відіграють протеолітичні ферменти, до яких належать каспази, лізосомальні ферменти, кальпаїни та інші.

Відомо, що деякі протеолітичні ферменти лізосом (еластаза, хімотрипсин, катепсин В,С,Д та інші) при внесенні в інкубаційне середовище або безпосередньо в клітину, а також за пошкодження лізосом клітини ініціюють розвиток апоптозу [131,178].

Особливо заслуговує на увагу лізосомальний фермент - катепсин В, який належить до класу цистеїнових протеїназ. Так, катепсин В *in vitro* може активувати прокаспази шляхом їх розщеплення і запускати процеси апоптозу [178]. Ця дія ферменту направлена переважно на ініціаторну прокаспазу 8 і на ряд попередників ефекторних каспаз. Інший механізм дії катепсину В пов'язаний з безпосереднім відщепленням цим ферментом регуляторного фрагменту від молекули проапоптичного білка Bid, який запускає апоптоз по мітохондріальному шляху [92].

Враховуючи той факт, що іонізуюча радіація пошкоджує лізосомальні мембрани і сприяє не тільки вивільненню лізосомальних ферментів в цитоплазму, але й їх активації, ми дослідили рівень активності катепсину В за тотального рентгенівського опромінення у дозах 1,0 та 7,78 Гр. Згідно з отриманих експериментальних даних у лімфоїдних клітинах тимусу і селезінки активність ферменту, як правило, підвищується в усі досліджувані строки після опромінення.

Отже, однією з причин активації лізосомального шляху реалізації апоптозу у лімфоїдних клітинах за дії радіації може бути селективне порушення мембранної проникності лізосом і вивільнення катепсинів, а також послаблення дії їх інгібіторів.

Апоптоз в більшості випадків пов'язаний з протеолітичною активацією каскаду каспаз – родини еволюційно консервативних цистеїнових протеїназ, які специфічно впізнають певні тетрапептидні ланки білків і розщеплюють пептидний зв'язок по карбоксильному кінцю залишку аспарагінової кислоти. Родина каспаз у ссавців нараховує близько 14 представників [82,202,206,214]. Каспази синтезуються в клітинах у вигляді неактивних попередників – прокаспаз, які в результаті обмеженого протеолізу перетворюються в активну форму. Всі каспази умовно поділяють на ініціюючі (каспази -2,-8,-9,-10,-12), ефекторні (каспази -3,-6,-7,-8) а також каспази, що беруть участь в процесінгу цитокінів (каспази -1,-4,-5,-11,-13,-14). Активація каспаз може здійснюватись шляхом

автоактивації, трансактивації, або активації з допомогою інших протеолітичних ферментів [188,209,214].

Різні шляхи реалізації апоптогенного сигналу включають участь певних каспаз, які розщепляють білки ядер, цитозолу або цитоскелету. Так, мембранний механізм запуску апоптозу зв'язаний з активацією каспази-8. Каспаза-8 шляхом обмеженого протеолізу активує ефекторні каспази-1 в першу чергу каспазу-3, а також каспази-6 та -7. Ці ферменти беруть участь в деградації ядерних білків – субстратів, що супроводжується конденсацією ДНК та міжнуклеосомним розщепленням хроматину. Поряд з цим, субстратом для ефекторних каспаз може бути ICAD – інгібітор апоптичної ДНК-ази, після протеолітичного розщеплення якого спостерігається значна активація CAD з подальшою фрагментацією хроматину.

Встановлено також, що порушення механізмів апоптозу за участі каспаз може бути в основі розвитку багатьох патологічних процесів [125].

Враховуючи все вищенаведене, ми дослідили активність каспази-3 в лімфоїдних органах щурів, а саме в клітинах тимусу та селезінки за радіаційно-індукованого апоптозу. Як показали результати досліджень, опромінення в дозах 1,0 Гр та 7,78 Гр сприяє активації каспази-3 у клітинах тимусу через 30 хв після дії. Висока активність каспази-3 в клітинах тимусу відмічається і через 3 години після опромінення. Аналогічні дані були отримані іншими авторами, які спостерігали активацію каспази-3 і кореляцію між апоптичними змінами, виявленими за морфологічними ознаками та фрагментацією ДНК за типом “драбини” [106].

Поряд з цим активність каспази-3 спленоцитів щурів, достовірно підвищується через 30 хв з подальшим пригніченням через 3 години після опромінення в досліджуваних дозах.

Відомо, що одним із субстратів каспази-3 є ядерний конститутивний білок полі-АДФ-рибозополімераза (ПАРП). Вона виконує в ядрі декілька

функцій: репарує розриви ДНК, пригнічує активність Ca^{2+} , Mg^{2+} -залежних ендонуклеаз та активує протеасомне розщеплення пошкоджених ядерних білків. Функція ПАРП зв'язана з активним використанням НАД⁺ та АТФ. Зокрема, ПАРП модифікує гістони, приєднуючи до нього розгалужений полімер АДФ-рибози. За таких умов нуклеосоми легко “мігрують” по молекулі ДНК при цьому звільняються пошкоджені ділянки для репарації. Окрім цього, ПАРП тимчасово фіксує кінці розриву ДНК і зупиняє його розширення за рахунок ендонуклеазної атаки; аутомодифікація ПАРП приводить до дисоціації ферменту від ДНК, звільненню кінців розриву для репарації.

Згідно з Кауфман і співавт. [132] в процесі апоптозу ПАРП розщеплюється протеазами на два домени. Просторове розділення цих доменів в результаті унеможливорює активацію ферменту розривами ДНК. На нашу думку розщеплення ПАРП є раннім маркером апоптозу, індукованого дією іонізуючої радіації. Дослідження різних клітин за спонтанного або індукованого апоптозу показали, що протеоліз ПАРП передуює або проходить одночасно з міжнуклеосомною фрагментацією ДНК.

Враховуючи вищезгадане, ми також дослідили участь системи полі-АДФ-рибозилування в програмованій загибелі тимоцитів щурів за дії іонізуючої радіації. Як свідчать отримані дані, вже через 30 хв після опромінення спостерігається пригнічення ферментативної активності ПАРП. Існує думка, що на ранніх етапах після прямої дії променевого чинника в тимоцитах щурів виникає велика кількість нерепарованих одониткових розривів ДНК, внаслідок чого відбувається активація ПАРП з значним посиленням аутомодифікації ферменту. В свою чергу деградацію аутомодифікованої ПАРП здійснює ефекторна протеїназа - каспаза-7. Значне зниження ферментативної активності ПАРП в тимоцитах спостерігається і через 3 години після опромінення тварин.

На наш погляд, зниження ферментативної активності ПАРП може відбуватися як безпосередньо внаслідок активації каспаз так і опосередковано за рахунок пригнічення іонізуючою радіацією енергетичних процесів і відповідно субстратів для АДФ-рибозилування. Так, згідно з отриманих нами даних вміст НАД та АТФ в тимоцитах та спленоцитах опромінених щурів суттєво знижується майже в усі досліджені строки, а ступінь цих змін має дозозалежний характер.

Заслуговує на увагу той факт, що використання як модифікуючого фактору рибоксину (інозину) сприяє не тільки стабілізації вмісту НАД та АТФ, але й знижує темпи апоптичних реакцій за дії іонізуючої радіації.

В каскаді апоптичних реакцій на кінцевій стадії задіяні реакції, які призводять до міжнуклеосомної деградації ДНК, яка може здійснюватись внаслідок підвищення активності специфічних ендонуклеаз, а також змін в структурі хроматину, які викликають підвищення його чутливості до дії нуклеаз. Так, експериментальними дослідженнями встановлено, що в лімфоцитах тимусу і селезінки відбувається накопичення одно- і дволанцюгових розривів ДНК, а також підвищення рівня полідезоксинуклеотидів (ПДН) за дії радіації. Процес деградації ДНК тісно пов'язаний з активністю ПАРП в зв'язку з тим, що активація Ca^{2+} , Mg^{2+} -ендонуклеази залежить від АДФ-рибозилування.

Підсумовуючи отримані експериментальні дані, каскад досліджених нами взаємопов'язаних реакцій радіаційно-індукованого апоптозу в клітинах тимусу та селезінки можливо об'єднати в таку схему:



Рис.22. Участь протеїназ та полі-АДФ-рибозо-полімераз у радіаційно-індукованій загибелі лімфоїдних клітин шляхом апоптозу

ВИСНОВКИ

1. Досліджено участь цистеїнових протеїназ та системи полі-АДФ-рибозилування за радіаційно-індукованого апоптозу (через 30 хв та 3 години після дії на організм тварин рентгенівського випромінення в дозах 1,0 Гр та 7,78 Гр) у лімфоїдних клітинах тимуса і селезінки щурів. Також показана можливість використання препарату рибоксину як корегуючого протипроменевого чинника.
2. Сукупність отриманих результатів свідчить про значну радіочутливість процесів, пов'язаних з активацією протеолізу в імунокомпетентних клітинах тимуса та селезінки за опромінення тварин. Встановлено підвищення активності ендогенних протеїназ, а також зростання активності лізосомального катепсину В на ранньому етапі радіаційно-індукованого апоптозу.
3. Встановлено залучення родини каспаз до процесів розвитку апоптозу в лімфоїдних клітинах у ранній післяпроменевий період. Залежно від дози радіації та часу після опромінення показано різноспрямованість змін активності каспази – 3 у тимусі та селезінці щурів.
4. Дія іонізуючого випромінення призводить до пригнічення активності полі-(АДФ-рибозо)-полімерази у тимоцитах щурів, а в спленоцитах виявлено її підвищення через 30 хв після опромінення за дози 1,0 Гр та пригнічення активності ферменту за дози 7,78 Гр, що супроводжується характерними змінами вмісту НАД і АТФ у клітинах цих органів.
5. Виявлено, що динаміка та характер пострадіаційних зрушень в організмі тварин призводить до збільшення ступеня фрагментації хроматину за рахунок Ca^{2+} , Mg^{2+} -залежного ендонуклеолізу та підвищення кількості одно- та дволанцюгових розривів ДНК у лімфоїдних клітинах тимуса та селезінки щурів.
6. Введення тваринам препарату рибоксину активує біоенергетичні процеси і сприяє нормалізації у досліджуваних клітинах активності цистеїнових протеїназ, полі-(АДФ-рибозо)-полімерази та зниженню рівня одно- та дволанцюгових розривів ДНК.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Андрійчук Т.Р., Драган Л.П., Ракша Н.Г. Радіаційно-індуковані порушення ДНК у тимоцитах щурів // “Вісник” КНУ імені Тараса Шевченка 2004, вип.43. С.55.
2. Артемова В.В., Юрченко Г.О., Дощенко Н.П., Кулагин И.Н. Оценка эффективности применения новых лекарственных средств, синтетических и биологических покрытий у больных с ожогами. // Труды Московского НИИ скорой помощи.- 1982. – Т.51. – С.116-120.
3. Асатиани В.С. Ферментные методы анализа // М. Наука 1969.- 740 стр.
4. Байсхатов Р., Хансон К.П. Исследование содержания адениловых нуклеотидов в селезенке крыс в норме и после рентгеновского облучения // Радиобиология.-1978.-Т.XVIII, №5.-С.738-739.
5. Банадига Н.В. Антигіпоксанта здатність рибоксину в комплексній терапії бронхіальної астми у дітей // Фармацевтический журнал.-1998, №1.-С.70-73.
6. Барабой В.А., Сутковой Д.А. Гормональная регуляция энергетического обмена при воздействии ионизирующей радиации // Медрадиология. – 1983. № 12.-С.40-44.
7. Барабой В.А., Сутковой Д.А. Энергетический обмен при стрессовых воздействиях (на примере ионизирующей радиации), его саморегуляция и коррекция // Укр. біохім. журн.-1983.-Т.55, №1.-С.93-105.
8. Белецкий И.П., Уманский С.Р. Природа разрывов, индуцируемых в ДНК на ранних этапах интерфазной гибели клеток // Радиобиология 1987, Т.26, вып. 2, С. 227-230.
9. Белушкина Н.Н., Хасан Хамад А., Северин С.Е. Молекулярные основы апоптоза. // Вопросы биол.,мед. и фарм. химии, 1998, № 4, - С.15 - 24.

10. Болдырев А.А. Дискриминация между апоптозом и некрозом нейронов под влиянием окислительного стресса // Биохимия.-2000.-Т.65, №7.-С.981-990.
11. Бра М., Квинан Б., Сузин С.А. Митохондрии в программированной гибели клетки: различные механизмы гибели. // Биохимия 2005, Т.70, вып. 2, С.284-293.
12. Бучацкий Л.П., Брит И.С., Дыма П.К. // Тез. III Укр. конф. по перспективным космическим исследованиям.- Кацевели, 2003.
13. Вартамян Л.П., Крутовских Г.Н., Пустовалов Ю.И. Радиозащитное действие рибоксина (инозина) // Радиобиология.-1989.-Т. XXIX, №5.-С.707-708.
14. Веремеенко К.Н., Досенко В.Е., Нагибин В.С., Кизим А.И., Мойбенко А.А. Протеолитические ферменты и апоптоз // Український біохімічний журнал.- 2003. – Т.75, №6.-С.10-24.
15. Владимиров Ю.А. Нарушение барьерных свойств внутренней и наружной мембран митохондрий, некроз и апоптоз // Биологические мембраны, 2002, Т.19, № 5, С.356-377.
16. Волянский Ю.Л., Колотова Т.Ю., Васильев Н.В. Молекулярные механизмы программированной клеточной гибели // Успехи соврем. биологии.-1994.-Т.114, №6.-С.679-691.
17. Газиев А.И. Повреждение ДНК в клетках под действием ионизирующей радиации // Молекулярная радиобиология. – 1999. – Т.39, №6. – С.630-638.
18. Галитовский В.Е., Гогвадзе В.Г. Влияние энергетического состояния митохондрий на межнуклеосомную фрагментацию ДНК в тимоцитах после облучения // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2001.-Т. 41, №2. – С.137-140.
19. Голубев М.А., Никулин И.Р., Стволинская Н.С. Влияние экзогенного рибозо-5-фосфата на уровень АТФ в культуре

-
кардиомиоцитов в условиях "метаболической ишемии" и аноксии // Вопр. мед. химии.-1988.-Т. XXXIV, №4.-С.94-96.

20. Григорьева М.Б. Влияние инозина на обмен веществ (обзор) // Хим.-фармац. журн.-1982.-№4.-С.387-422.

21. Денисенко М.Ф., Беловская Л.Н., Филиппович И.Б. Роль поли(АДФ-рибозилирования) белков в радиочувствительности лимфоцитов тимуса // Радиобиология. –1987. –Т.27, №1. –С.75-77.

22. Дмитренко Н.П. Пуриновый обмен и его регуляция в лимфоцитах.-К.: Наукова думка, 1991.-179с.

23. Дмитренко Н.П., Андрийчук Т.Р., Кишко Т.О. и др. Преципитационный метод определения ДНК в непродлиферирующих клетках и тканях животных // Укр.биох.журнал, 1997, т.69.,№1-С.69.

24. Дубинина Е.Е., Шугалей И.В. Окислительная модификация белков // Успехи соврем. биологии.-1993.-Т.113, №1.-С.71-81.

25. Дубиніна О.Ю. Окислювальний стрес і окислювальна модифікація білків // Медична хімія.-2001.-Т.3, №2.-С.5-12.

26. Ермолаева Н.В., Водолазская Н.А. Взаимосвязь между уровнем распада ядерного хроматина и падением содержания АТФ в тимусе крыс после γ -облучения, введения дегранола и гидрокортизона. // Радиобиология. -1980.-Т.20. –В.2.-С.169-174.

27. Ерофеева Л.М., Сапин М.Р., Григоренко Д.Е. Реакции различных популяций в тимусе мышей на однократное гамма-облучение // Авиакосмическая и экологическая медицина.-1998.-Т.32, № 2.-С.55-60.

28. Заалишвили Т.М., Габриадзе И.Ю., Маргиани Д.О. Пострадиационное ингибирование поли(АДФ-рибозо)-полимеразы не определяется межядерного матрикса в репарации ДНК // Радиобиология. – 1985. –Т.25. –С.7-10.

29. Зиглер М. Транслоказа адениловых нуклеотидов – переносник, который, возможно, участвует в синтезе NAD в митохондриях // Биохимия. 2005. – Т.70, вып.2. –С.214-218.

30. Иванник Б.П., Синькова Р.В., Конов А.В., Рябченко Н.И. Эндонуклеолиз хроматина в тимocyтaх облучённых и необлучённых крыс. // Радиобиология 1986. Т.26. вып.2. С.162-166.
31. Кожемякин Л.А., Краевой С.А. Молекулярные механизмы воздействия ионизирующих излучений // Военно-медицинский журн.-1993.-№4.-С.33-38.
32. Кудряшов Ю.Б., Гончаренко Е.Н. Современные проблемы противолучевой химической защиты организма // Радиационная биология. Радиоэкология.-1999.-Т.39, №2-3.-С.197-211.
33. Кузин А.М. Структурно-метаболическая теория в радиобиологии // Москва "Наука" 1986. 285стр.
34. Куцый М.П., Кузнецова Е.А., Газиев А.И. Активация ядерных протеаз гамма-радиацией и митохондриальными апоптогенными факторами // Материалы IV съезда по радиационным исследованиям (20-24 ноября 2001г.). Москва. – 2001. – С.267.
35. Легеза В.И., Абдуль Ю.А., Антушевич А.Е. и др. Влияние рибоксина на резистентность мышей к пролонгированному γ -облучению в нелетальной дозе // Радиационная биология. Радиоэкология.-1993.-Т.33, №2(5).-С.658-664.
36. Легаза В.И., Владимиров В.Г. Новая классификация профилактических противолучевых средств // Радиационная биология. Радиоэкология.-1998.-Т.38, №3.-С.416-425.
37. Магаршак Ю.Б. // Биофизика. – 1997. – Т.42, № 4, С. 855-863.
38. Мазурик В.К., Мороз Б.Б. Проблемы радиобиологии и белок р53 // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2001.- Т.41, №5. – С.548-572.
39. Мазурик В.К., Москалева Е.Ю. ДНК-зависимая ДНК-полимеразная и аспртат-карбомойлтрансферазная активности при разделении клеток костного мозга и селезенки крыс в градиенте плотности альбумина в норме, после облучения и введения ДНК // Радиобиология.-1977.-Т.17, №5.-С.716-721.

40. Малахова Л.В., Суркенова Г.Н., Газиев А.И. Исследование активности протеиназ в ядрах клеток крыс после воздействия на них радиации и метилнитромолекулы // Радиобиология, 1990, вып. 30, №3, С.312-316.
41. Матишевська О.П. Апоптоз-запрограмована орма клітинної загибелі // Вісник КУ. –1998.-27.-С.3-7.
42. Матышевская О.П. Биохимические аспекты вызванного радиацией апоптоза // Укр. біохім. журн.-1998.-Т.70, №5.-С.15-29.
43. Нелипович П.А., Никонова Л.В., Уманский С.Р. Пострадиационное ингибирование поли-(АДФ-рибозо)-полимеразы не определяется межнуклеосомной фрагментацией ДНК. // Радиобиология 1985. Т.25. вып.1. С.7-11.
44. Нелипович П.А., Кулагина Т.П., Уманский С.Р. Роль нарушения поли-(АДФ-рибозилирования) в активации $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -зависимой эндонуклеазы // Радиобиология 1984. Т.24. вып.4. С.435-438.
45. Николаева Л.Ф., Черпаченко Н.М., Соколова Р.И. Влияние инозина на метаболизм миокарда вне зоны инфарктирования // Кардиология.-1971.-№5.-С.111-114.
46. Остапченко Л.І. Молекулярні механізми регуляції активності циклонуклеотид- та кальційзалежних протеїніназ лімфоїдних клітин в умовах радіаційного впливу.-К.: Фітосоціоцентр, 1999.-108с.
47. Полевина И.Н. и др. Выживаемость облученных клеток млекопитающих и репарация ДНК. // М. Энергоатомиздат, 1985. –120стр.
48. Радько С.П., Папонов В.Д., Сигора Г.А., Лысцов В.Н. О природе мишени при радиационном воздействии на хроматин реализующемся на уровне топологии ДНК // Радиобиология. -1992. Т.32, №1, С. 35-37.
49. Разин С.В., Юдинкова Е.Ю. Крупномасштабная фрагментация ДНК при апоптозе: разрезается ли геном по границам топологических доменов // Известия АН. Серия биология.-1998.-№2.-С.167-171.

50. Романцев Е.Ф., Блохина В.Д., Жуланова З.И. Биохимические основы действия радиопротекторов.-М.: Атомиздат, 1980.-165с.
51. Романцев Е.Ф., Блохина В.Д., Жуланова З.И. Молекулярные механизмы лучевой болезни.-М.: Медицина, 1984.-207с.
52. Рудык Б.И., Швед Н.И., Блинова Н.Г. и др. Влияние рибоксина на перекисное окисления липидов у больных острым инфарктом миокарда // Врачебное дело.-1989.-Т.965, №8.-С.14-15.
53. Рябченко Н.И., Иванник Б.П. Структурная организация хроматина как фактор, определяющий скорость его эндонуклеолиза в облученных и необлученных тимоцитах. // Радиобиология 1987. Т.27. вып.2. С.155-159.
54. Савицкий И.В. Повышение активности 5'-нуклеотидазы и снижение гуанилаткиназы в головном мозге и печени облученных крыс // Укр. біохім. журн.-1990.-Т.54, №3.-С.327-330.
55. Самуилов В.Д., Олескин А.В., Лагунова Е.М. Программируемая клеточная смерть // Биохимия.-2000.-Т.65, №8.-С.1029-1046.
56. Соловьян В.Т., Андреев И.О., Кунах В.А. Фракционирование ДНК эукариот в пульсирующем электрическом поле. 1. Ядерная ДНК как составная часть ДНК-топоизомеразного комплекса // Биополимеры и клетка.-1993.-9, №5. –С. 44-51.
57. Солодушко В.О., Матишевська О.П., Кучеренко М.Є. Ендонуклеоліз хроматину у лімфоцитах селезінки та тимуса щурів після опромінення // Укр.. біохімію журн., 1997 Т.69. №4. С.88-94.
58. Степанов Ю.М., Фильченков А.А., Кушлинский Н.Е. Система Fas/Fas-лиганд // Днепропетровск “ДИА” 2000. - 48стр.
59. Ступин И.В., Новокшенов А.И., Пирогова Л.Б. Сопоставление противогипоксического эффекта α -токоферола, НАД и инозина при длительном искусственном кровообращении // Фармакология и токсикология.-1984.-Т.XLVII, №1.-С.88-93.
60. Суханова М.В., Ходырева С.Н., Лаврик О.И. Поли-(АДФ-рибоза)-полимераза 1 ингибирует синтез ДНК с вытеснением цепи,

катализируемый ДНК-полимеразой β . // Биохимия. 2004, Т.69, вып. 5, С. 686-698.

61. Уманский С.Р. Апоптоз: молекулярные и клеточные механизмы // Молекулярная биология.-1996.-Т.30, №3.-С.487-502.

62. Утешев А.Б. Роль окислительно-восстановительных ферментов при радиационном поражении.-Алма-Ата.: Наука, 1981.-122с.

63. Фильченков А.А., Стойка Р.С. Апоптоз: краткая история, молекулярные механизмы, методы выявления и возможное значение в онкологии // Экспериментальная онкология. – 1996, №18. –С.435-448.

64. Фильченков А.А., Стойка Р.С. Апоптоз рак. К.: Морион. 1999. 184с.

65. Фильченков А.А. Каспазы: регуляторы апоптоза и других клеточных функций. // Биохимия. –2003.-Т.68, вып.4. –С.453-466.

66. Хаитов Р.М., Манько В.М., Ярилин А.А. Внутриклеточные сигнальные пути, активирующие или ингибирующие функции клеток иммунной системы.// Успехи современной биологии. 2005. Т.125, №4, С.348-359.

67. Хансон К.П., Комар В.Е. Молекулярные механизмы радиационной гибели клеток.-М.: Энергоатомиздат, 1985.-150с.

68. Хант С. Выделение лимфоцитов и вспомогательных клеток // Лимфоциты: Методы.-М: Мир, 1990.-395с.

69. Чертков К.С., Глушков В.А., Сбитнева М.Ф. и др. Экспериментальные подходы к выявлению защитных свойств препаратов при воздействии ионизирующего излучения в малых и сублетальных дозах // Радиобиология.-1992.-Т.32, №5.-С.706-711.

70. Чорна В.І. Цистеїнові катепсини в умовах променевого ураження та злоякісного росту: Автореф. дис...д-ра біолог. наук: 03.00.01/ КНУ імені Тараса Шевченка. - К. , 2001.-37 с.

71. Шатерников В.А. Унифицированные клинические лабораторные методы исследования // Лаб. дело, 1976, №12, С.748-752.

72. Шлемкевич М.П., Тимочко М.Ф., Федорович И.П. Влияние рибоксина на поддержание баланса перекисного окисления липидов и антиоксидантной активности при старении // Тезисы и рефераты докладов Всесоюзн. Симпозиума “Гериатрические средства: экспериментальный поиск и клиническое использование”.-Том.1.-Киев.-1999.-С.200-201.
73. Acehan D., Jiang X., Morgan D.G., Heuser J. E. Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation. *Mol. Cell* 2002 Vol. 9(2)P. 423-432.
74. Adams S., Green P., Claxton R. et al. Reactive carbonyl formation by oxidative and non-oxidative pathways // *Front. Biosci.*-2001.-№6.-P.17 - 24.
75. Alnemri E.S., Livingston D.J., Nicholson D.W. et al. Human ICE/CED-3 protease nomenclature // *Cell.*-1996.-V.87, №1.-P.171-174.
76. Allera C.,Lazzanni G., Patrone E. // *J. Biol. Chem.* – 1997. – Vol. 272. №16. – P.10817-10822.
77. -Arends M.J., Wyllie A.H. Apoptosis: mechanisms and roles in pathology // *Int. Rev. Exp. Pathol.*-1991.-Vol. 32, №2.-P.223-254.
78. Barrett A.J.//*Proteinases in mammalian cells and tissues.* Norh-Holland Publ.Company.Amsterdam-N.Y.-Oxford.-1997.-P.209-248.
79. Bernardi P., Scorrano L., Colonna R., Petronilli V., Di Lisa F. Mitochondria and cell death : Mechanisstic aspects and methodological issues // *Eur. J. Biochem.* – 1999. – V. 264 .- P. 687-701.
80. Berman P.A., Human L. Regulation of 5-phosphoribosyl 1-pyrophosphate and of hypoxanthine uptake and release in human erythrocytes by oxypurine cycling // *J. Biol. Chem.*-1990.-V.265, №12.-P.6562-6568.
81. Berti P.J., Storer A.C. Alignment/phylogeny of the papain superfamily of cysteine proteases. // *J. Mol. Biol.*1995,Vol. 246, P. 273-283.
82. Bratton S.B., Cohen G.M. // *TRENDS. Pharmacological Sci.* 2001.Vol. 22, N 6. P. 306-318.
83. Browne K.A., Johnstone R .W., Jans D.A., // *J. Biol. Chem.* 2000. Vol.275, N 50. P. 39262-39266.

84. Brömme D., Steinert A., Frittkau S., Kirschke H. // FEBS Lett. - 1987. - 219, N2. - P. 441-444
85. Boyum A. Separation of leucocytes from blood and bone marrow // Scand. J. Clin. Lab. Invest. - 1968. - Vol. 21. - P. 28-30.
86. Boya P., Andreau K., Poncet D., Zamzami N., Perfettini J-L., Metivier D., Ojcius D., Jaattela M., Kroemer G. Lysosomal Membrane Permeabilization Induces Cell Death in a Mitochondrion-dependent Fashion // J. Exp. Med. 2003, Vol. 197, P. 1323-1334.
87. Brunk U.T., Neuzil J., Eaton J.W. Lysosomal involvement in apoptosis // Redox Report 2001, Vol. 6, P. 91-97.
88. Browne K.A., Johnstone R. W., Jans D.A., // J. Biol. Chem. 2000. Vol. 275, N 50. P. 39262-39266.
89. Chapman H.A., Riese R.J., Shi G.-P. Emerging roles for cysteine proteases in human biology. // Annu. Rev. Physiol. 1997, Vol. 59, P. 63-88.
90. Chang H. Y., Yang X. Proteases for Cell Suicide: Functions and Regulation of Caspases // Microbiol. and Mol. Biol. Rev. - 2000. - V. 64. - №4. - P. 821-846.
91. Chen C.F, Wang D, Hwang C.P, Liu H.W, Wei J, The protective effect of niacinamide on ischemia-reperfusion-induced liver injury // J Biomed Sci. - 2001. - Vol. 8. - P. 446-452.
92. Cohen, G.M. Caspases: the executioners of apoptosis // J. Biochem. 1997. Vol. 326. P. 1-16.
93. Cohen G.M., Sun X.M., Snowden R.T. et al. Key morphological features of apoptosis may occur in the absence of internucleosomal DNA fragmentation // Biochem. J. - 1992. - V. 286, №2. - P. 331-334.
94. Ciechanover A. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway // Cell. - 1994. - Oct. 79 (1). P. 13-21.
95. Clem R.J., Sheu T.T., Richter B.W. et al. // J. Biol. Chem. 2001. Vol. 276, N 10. P. 7602-7608.

96. Counis M.F., Torriglia A. Dnases and apoptosis. // Biochem. Cell Biol. 2000 Vol. 78. P. 405-414
97. Davidovich L, Vodenicharov M, Affar EB Importance of poly(ADP-ribose) glycohydrolase in the control of poly(ADP-ribose) metabolism. Exp Cell.-2001.-Vol. 268.-P.7-13.
98. Davies K.J.A. Protein modification by oxidants and the role of proteolytic enzymes // Biochem. Soc. Transact.-1993.-№21.-P.346-353.
99. D'amours D., Desnoyers S., D'silva I., Poirier G. Poly(ADP-ribosyl)ation reactions in the regulation of nuclear functions // Biochem. J. 1999. Vol. 342. P.249-268.
100. Denault J.B., Salvesen G.S. Caspases: keys in the ignition of cell death. // ChemRev 2002 Vol. 102(12), P.4489-4500.
101. Denault, J.-B. and Salvesen, G. S. Human caspase-7 activity and regulation by its N-terminal peptide. J. Biol. Chem. 2003 Vol.278 P.34042-34050.
102. Deng G., Podack E.R. Deoxyribonuclease induction in apoptotic cytotoxic T lymphocytes. // FASEB J. – 1995.-Vol. 9. P. 665-669.
103. Earnshaw W.C., Martins L.M., Kaufmann S.H. et al. Mammalian caspases: Structure, activation, substrates and functions during apoptosis // Annu. Rev. Biochem.-1999.-V.68, №189.-P.383-424.
104. Edelman I.S. Mechanim of action of aldosterone: enegetic and permeability factore // J. Endocr. 2003. Vol. 81.P.49-53.
105. Eguchi Y., Srinivasan A., Tomaselli K. ATP-dependent steps in Apoptotic Signal Transduction. // Cancer research 1999. Vol. 59. P. 174-2181.
106. Enari M., Sakahira H., Yokoyama H. et al. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis and its inhibitor ICAD // Nature.-1998.-V.391, №6667.-P.643-650.
107. Feng Y, Hu J, Xie D, Qin J, Zhong Y, Li X, Xiao W, Wu J, Tao D, Zhang M, Zhu Y, Song Y, Reed E, Li QQ, Gong J.// Subcellular localization of caspase-3 activation correlates with changes in apoptotic morphology in MOLT-

4 leukemia cells exposed to X-ray irradiation. *Int J Oncol.* 2005 Vol.27 N 3 P. 699-704.

108. Fielden E.M., O'Neill P. *The Early Effects of Radiation on DNA.-B.: Springer, 1991. – 230 p.*

109. Filipski J., Leblank J., Youdale T. et al. Periodicity of DNA folding in higher order chromatin structures // *EMBO J.*-1990.-V.9.-P.1319-1327.

110. Foghsgaard L., Wissing D., Mauch D. // *J/Cell. Biol.* 2001. Vol. 153, N 5. P.999-1010.

111. FueUentes-Prio P., Salvesen Guy S. The protein structures that shape caspase activity, specificity, activation and inhibition.// *J.Biochem.* 2004 Vol.384. P.201-232.

112. Gaido M. Cidlovski J. Identification, purification and characterisation of a calcium-dependent endonuclease (NUC-18) from apoptotic rat thymocytes // *J. Biol. Chem.* – 1991.- Vol. 266. –P. 18580-18585.

113. Gao G., Dou Q.P. 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 -Vol. 80. P. 53-72.

114. Green D.R., Reed J. Apoptotic pathways: the roads to run // *Cell.* – 1998. Vol. 94, N 6. – P. 695-698.

115. Germain M.,El Bchir Affar, D'Amours D et.al. Cleavage of Automodified Poly (ADP-ribose) Polymerase during Apoptosis // *J. Biol. Chem.* 1999, Vol.274, N40, P.28379-28384.

116. Guicciardi M.E., Leist M., Gores G.J. Lysosomes in cell death // *Oncogene* 2004, Vol. 23, P. 2881-2890.

117. Gunter T.E., Gunter K.K., Sheu S.S, Gavin C.E. Mitochondrial calcium transport: physiological and pathological relevance // *Amer. J. Physiol.*- 1994. – V.67, N 2. – P 313-339.

118. Hallan E., Blomhoff H.K., Smeland E.B., Lomo J. Involvement of ICE (Caspase) Family in γ -Radiation-Induced Apoptosis of Normal B Lymphocytes // J. Immunol 1997. Vol. 46 P. 601-608
119. Halestrap A. P., Woodfield K.Y., Connern C.P. Oxidative stress, thiol reagents, and membrane potential modulate the mitochondrial permeability transition by affecting nucleotide binding to the adenine nucleotide translocase // J. Biol. Chem. –1997. – Vol272. –P. 3346-3354.
120. Hara S., Halicka H.D., Bruno S., Gong J., Traganos F., Darzynkiewicz Z. Effect of protease inhibitors on early events of apoptosis // Exp Cell Res, Mar. –1996-223(2): 372-384.
121. Hara K., Suzumatsu A., Ishihara T.//Nippon Suisan Gak Kaishi.-1988.-54,N7.-P.1243-1252.
122. Harmsen E. Enhanced ATP and GTP synthesis from hypoxanthine or inosine after myocardial ischemia // Amer. J. Physiol.-1984.-V.246, №1. - P.37 -43.
123. Heinrichs S.,Deppert W. Apoptosis or growth arrest: modulation of the cellular response to p53 by proliferative signals // Oncogene. – 2003.-Vol.22, №4.- P.555-571.
124. Hockenbery D.M., Oltvai Z.N., Yin X.M. et al. Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis // Cell.-1993.-V.75, №2.-P.241-251.
125. Howard Y. C. and Xiaolu Y .Proteases for Cell Suicide: Functions and Regulation of Caspases. //Mikrobiol. Molecul.Biol., 2000 Vol. 64, No. 4, P. 821–846.
126. Hong S.J., Dawson T.M., Dawson V.L. Nuklear and mitochondrial conversations in cell death: PARP-1 and AIF signaling. // TRENDS in Pharmacological Sciences 2004, Vol. 25, N 5, P.259-264.
127. Howard Y. C. and Xiaolu Y .Proteases for Cell Suicide: Functions and Regulation of Caspases. // Mikrobiol. Molecul.Biol., 2000 Vol. 64, No. 4, P. 821–846

128. Isahara K., Ohsawa Y., Kanamori S., Shibata M., Waguri S., Sato N., Gotow T., Watanabe T., Momoi T., Urase K., Kominami E., Uchiyama Y. Regulation of a novel pathway for cell death by lysosomal aspartic and cysteine proteinases. // *Neuroscience*. 1999, Vol. 91, P. 233-249.
129. Jurkowitz M.S., Litsky M.L., Browning M.J. et al. Adenosine, inosine, and guanosine protect glial cells during glucose deprivation and mitochondrial inhibition: correlation between protection and ATP preservation // *J. Neurochemistry*.-1998.-V.71.-P.535-548.
130. Kagana V.E., Fabisiaka J.P., Shvedovad A.A. Oxidative signaling pathway for externalization of plasma membrane phosphatidylserine during apoptosis // *FEBS Lett.*-2000.-Vol.477, №1.-P.1-7
131. Kagedal K., Zhao M., Svensson I., Brunk U.T. Sphingosine-induced apoptosis is dependent on lysosomal proteases. // *J. Biochem.* 2001, Vol. 359, P.335-343.
132. Kaufmann SH, Desnoyers S, Ottaviano Y, Davidson N.E Specific proteolytic cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase: an early marker of chemotherapy-induced apoptosis // *Cancer Res.*-1993.-Vol. 53.-P.3976–3985.
133. Kerr J.F.R., Winterford C.M., Harmon B.V. Apoptosis. Its significance cancer therapy // *Cancer* 1994. -Vol. 73. P. 2013-2026.
134. Kluck R.M., Bossy-Wetzel E., Green D.R., Newmeyer D.D. The Release of Cytochrome c from Mitochondria: A Primary Site for Bcl-2 Regulation of Apoptosis // *Science*. –1997. – Vol. 275. –P.1132-1136.
135. Kocic G., Pavlovic D., Jevtovic T. et al. Oxidative modification of rat liver 5'-nucleotidase: the mechanisms for protection and re-activation // *Arch. Physiol. Biochem.*-2001.-V.109, №4.-323-330.
136. Komoriya A., . Packard B., Brown M., Ming-Lei Wu., Henkart P. Assessment of Caspase Activities in Intact Apoptotic Thymocytes Using Cell-permeable Fluorogenic Caspase Substrates // *J. Experimental Medicine* 2000• Vol. 191, N 11, P. 1819–1828.

137. Kuo T.H., Kim H.R., Zhu L. et al. Modulation of endoplasmic reticulum calcium pump by Bcl-2 // *Oncogene*.-1998.-V.17.-P.1903-1910.
138. Lagarkova M.A., Iarovaia O.V., Razin S.V. The large-scale fragmentation of mammalian DNA in the course of apoptosis proceeds via excision of chromosomal DNA loops and their oligomers // *J. Biol. Chem.*-1995.-Vol.270, №35.-P.20239-20241
139. Lemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T-4 // *Nature*. 1970/ Vol. 227. P. 680-685.
140. Levine R.L. Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging, and disease // *Free Radical Biology and Medicine*.-2002.-V.32, №1.-P.790-796.
141. Lewandowski E.D., Johnston D.L., Roberts R. Effects of inosine on glycolysis and contracture during myocardial ischemia // *Circulation Res.*-1991.-V.68, №4.-P.578-587.
142. Li, H., H. Zhu, C. Xu, and J. Yuan. Cleavage of BID by caspase-8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis.// *Cell* 1998.Vol 94.P.491–501.
143. Liaudet L., Mabley J.G., Soriano F.G. Inosine reduces systemic inflammation and improves survival in septic shock induced by cecal ligation and puncture // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*-2001.-V.164, №10.-P.1213-1220.
144. Liu Q.S., Pandey S., Singh R.K., Lin W., Ribocco M., Borowy-Borowski H. et al. Dnase γ : a rat Dnase I – like gene coding for a constitutively expressed chromatin-bound endonuclease. // *Biochemistry* 1998 Vol. 37 P. 10134-10143.
145. van Loo G., Schotte P., van Gurp M., Demol H., Hoorelbeke B., Gevaert K., Rodrigues I., Ruiz-Carillo A., Vandekerckhove J. Endonuclease G: a mitochondrial protein degradation. // *Cell Death Differ.*2001 Vol.8 P.1136-1142.
146. van Loo G., Saelens X., van Gurp M. et al // *Cell Death Differ.* 2002. **9**, N 10. P. 1031-1042.
147. Lowe S.W., Schmitt E.M., Smitt S.W. p53 required for radiation-induced apoptosis in mouse thymocytes // *Nature*. – 1993.-Vol.362. – P.847-852.

148. Meng X.W., Fraser M. J. M., Ziegler J. B. // Apoptosis. 2000. Vol. 5, N3. P. 243-254.
149. Mlejnek P., Kozubek S. Protective effect of adenine on DNA synthesis in irradiated Ehrlich ascites tumor cells // Radiat. Res.-1997.-V.147, №4. - P.477 - 483.
150. Montague J. W., Cidlowski J.A. Cellular catabolism in apoptosis: DNA degradation and endonuclease activation. // Experientia. – 1996. Vol. 52. – P. 957-962.
151. Murcia J.M.,Nidergang C., Trucco C. et. al. Requirement of poly(ADP-ribose) polymerase in recovery from DNA damage in mice and in cells // Cell Biology 1997. Vol.94. P.7303-7307.
152. Nelipovich P.A., Nikonova L.V., Umansky S.R. Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase as a possible reason for activation of $\text{Ca}^{2+} / \text{Mg}^{2+}$ -dependent endonuclease in thymocytes of irradiated rats. // J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med. 1988. Vol.53. P. 749-765.
153. Nishimura Y., Kawabata T., Kato K. Identification of latent procathepsins B and L in microsomal lumen: characterization of enzymatic activation and proteolytic processing in vitro. Biochem. Biophys. 1988 Vol. 261, P.64-71.
154. Norbury C., Zhivotovsky B. DNA damage-induced apoptosis // Oncogene 2004 Vol.23. P.2797-2808.
155. Oberhammer F., Wilson J.W., Dive C. et al. Apoptotic death in epithelial cells: cleavage of DNA to 300 and/or 50 kb fragments prior to or in the absence of internucleosomal fragmentation // EMBO J.-1993.-V.12.-P.3679-3684.
156. Ohsawa T.,Higashi T.,Tsuji T.//Acta med. Okajama.-1989.-43,N1.- P.9-15.
157. .Ohsawa T.,Higashi T.,Tsuji T.//Acta med. Okajama.-1989.-43,N1.- P. 9 - 15.

158. Oliver F.J., J. Menissier-de Murcia, and Gilbert de Murcia Poly(ADP-Ribose)Polymerase in the Cellular Response to DNA Damage, Apoptosis, and Disease. // *Am. J. Hum. Genet.* 1999, Vol.64, P. 1282-1288.
159. Peitsch M.C., Polzar B., Stephan H., Crompton T., MacDonald H.R., Mannherz H.G., Tschopp J. Characterization of the endogenous deoxyribonuclease involved in nuclear DNA degradation during apoptosis (programmed cell death). // *EMBO J.* – 1993. Vol. 12. – P. 371-377.
160. P. Pfeiffer, N. `Gottlich, S. Reichenberger, E. Feldmann, P. Daza, J.F. Ward, J.R. Milligan, L.H. Mullenders, A.T. Natarajan DNA lesions and repair // *Mutat. Res.* – 1996. – Vol.366, №2. – P.69-80.
161. Quagliano D., Ronchetti P. // *Apoptosis.* – 2001.- Vol. 6, № 5. – P.389-401.
162. Ravagnan L., Roumier G. // *J. Cell. Physiol.* 2002. Vol.192, N 2. P. 131-137.
163. Roberg K., Kagedal K., Olinger K. Mikroinjection of cathepsin D induces caspase-dependent apoptosis in fibroblasts. // *Am. J. Pathol.*, 2002, Vol. 161, P. 89-96.
164. Rogalinska M. Alterations in Cell nuclei during apoptosis // *Cell. And Molec.* 2002. Vol.7. P.995-1018.
165. Rotonda J., Garcia-Calvo M., Bull H.G. et. Al. // *Chem. Biol.* 2001. Vol. 8, N 4, P.357-368.
166. Rubbi C.P., Milner J. p53 is a chromatin accessibility factor for nucleotide excision repair of DNA damage // *EMBO J.* -2003.- Vol. 22, №4.- P.975-986.
167. Sharif-Askari E., Alam A., Rheaume E. et al. // *EMBO J.* 2001. Vol.20, N12 P. 3101-3113.
168. Sharma R.J., Fernando A.R., Griffiths J.R. Inosine metabolism in the rat // *Biochem. J.* -1982.- V.208, №3.- P.839-844.

169. Shiokawa D., Ohyama T., Yamada T. Identification of an endonuclease responsible for apoptosis in rat thymocytes // J. Biochem. 1994 Vol 226.P.23-30.
170. Schulze-Osthoff F.J., Walczak H., Droge W. Cell nucleus and DNA fragmentation are not required for apoptosis // J. Cell Biol.-1994.-V.127, №1.- P.15-20.
171. Sakahira H., Takemura Y., Nagata S., // Arch. Biochem. Biophys. 2001.Vol.388,N 1. P. 91-99.
172. Salvesen G. S. A lysosomal protease enters the death scene //J. Biol. Chem., 2001, Vol. 276, P. 3149-3157. The J. of Clinical Investigation. 2001,
173. Sally S. Twing. Fluorescein isothiocyanate-labeled casein assay for proteolytic enzymes // Analytical biochem. –1984. Vol. 143. P. 30-34.
174. Skidmore C.R., Davies M.I., Goodwin P. M., Halldorson H, Lewis P.J., Shall S. and Zia'ee A. // Eur. J. Biochem. Vol. 101 P. 135-142.
175. Smulson M.E., Lyer S., Boulares A.H., Transient poly(ADP-ribosyl)ation of nuclear proteins and role of poly(ADP-ribose)polymerase in the early stages of apoptosis // J. Biol. Chem.-1998.-Vol. 273.-P.13703-13712.
176. Stansberg C., Cunningham C.// Develop. Compar. Immunol. 2004. Vol. 28. N5. P.2001.
177. Stefanelli C., Bonavita F., Stanic I., Farruggia G., Falcieri E., Robuffo L., Pignatti C., Muscari C., Rossoni C.,Guarnieri C. and Caldarera M. ATP depletion inhibits glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis // Biochem. J. 1997 Vol. 322, P. 909-917.
178. Stoka V., Turk B., Schendel S., Tae-Hyoung Kim¶, Cirman T., Snipas S.M., Ellerby L.M., Bredesen D., Freeze H., Abrahamson M., Brömme D., Krajewski S., Reed J., Xiao-Ming Yin¶, Turk V., Salvesen G. Lysosomal Protease Pathways to Apoptosis Cleavage of Bid, not Pro-Caspases, is the most likely route. // J. Biol. Chem., 2001, Vol. 276, P. 3149-3157.

179. Sunaga S., Kobayashi T., Yoshimori A., Shiokawa D., Tanuma S. A novel inhibitor that protects apoptotic DNA fragmentation catalyzed by Dnase gamma. // *Biochem. Biophys.* 2004. Vol. 325 (4). P. 1292-1297.
180. Susin S.A., Lorenzo H.K., Zamzani N., Marzo I., Snow B.E., Brothers G.M. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. // *Nature* 1999 Vol. 95. P. 441-446.
181. Susin S. A., Lorenzo H.K., Zamzami N. Mitochondrial Release of Caspase-2 and -9 during the Apoptotic Process // *J. Exp. Med.* –1999. –Vol. 189. -. 381 - 394.
182. Suzuki Y., Nakabayashi Y., Takahashi R. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2001. Vol.98, N 15. P. 8662-8667.
183. Suzuki K., Yokoyama S., Waseda S., Kodama S., Watanabe M. Delayed reactivation of p53 in the progeny of cells surviving ionizing radiation // *Cancer Res.* -2003.- Vol.63, №5.- P.936-941.
184. Szabo G., Bacso Z. Chromatin isolated from viable human PBLs contains DNA fragmented to > 50 kb. // *Cell Differ.* – 1996. – Vol. 3. – P. 237-241.
185. Szabo C. Role of poly(ADP-ribose)synthetase in inflammation // *Eur. J. Pharmacol.*-1998.-Vol. 350.-P.1-19.
186. Terutoshi H., Saeko Tada-Oikawa, Kaoru T., Yasuo M., Toshio N., Yumi T., Yataro Y., Takashi U., and Shosuke K. Caspase-3 Activation by Lysosomal Enzymes in Cytochrome c-independent Apoptosis in Myelodysplastic Syndrome-derived Cell Line P391. // *Cancer research* 2001, Vol.61, P. 2878–2884.
187. Thang J.P.H. // *Biochem. Cell. Biol.* – 2001. – Vol. 79. №3 – P. 305-311.
188. Thornberry, N. A., Rano, T. A., Peterson, E. P., Rasper, D. M., Timkey, T., Garcia-Calvo, M., Houtzager, V. M., Nordstrom, P. A., Roy, S., Vaillancourt, J. P. et al. A combinatorial approach defines specificities of members of the caspase family and granzyme B. Functional relationships established for key mediators of apoptosis.// *J. Biol. Chem.* 1997 Vol.272, P.17907–17911.

189. Thymocyte apoptosis induced by p53-dependent and independent pathways / A.R.Clarke, C.A.Purdie, D.J.Harrison, R.G.Morris, C.C.Bird, M.L.Hooper, A.H.Wyllie // *Nature*.- 1993.- Vol.362,№6423.-P.849-852.
190. Tschopp J., Irmeler M., Thome M. (1998) Inhibition of Fas death signals by FLIPs. *Curr. Opin. Immunol.* 10, 552-558.
191. Tsukada K., Hasegawa T., Tsutsumi S. et al. Effect of uric acid on liver injury during hemorrhagic shock // *Surgery*.-2000.-V.127, №6.-P.439-446.
192. Turk B., Turk D., Turk V. Lysosomal cysteine proteases: more than scavengers.// *Biochim. Biophys.* 2000, *Acta* 1477, P. 98-111.
193. Ullrich O., Reinheckel T., Sitte N. et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1999. Vol. 96. P. 6223-6228.
194. Vander Heiden M.G., Chandel N.S., Williamson E.K. et al. Bcl-xL regulates the membrane potential and volume homeostasis of mitochondria // *Cell*.-1997.-V.91, №5.-P.627-637.
- 195 Virag L., Szabo C. Purines inhibit poly (ADP-ribose) polymerase activation and modulate oxidant-induced cell death // *FASEB J*.-2001.-V.15.-P.99-107.
- 196 Virag L., Szabo C. The Therapeutic Potential of Poly(ADP-Ribose) Polymerase Inhibitors. // *Pharmacol. Rev.* 2002., Vol. 54. N. 3. P.375-429.
- 197 Walker P.R., Smith C., Youdale T., et al. Topoisomerase II-reactive chemotherapeutic drugs induce apoptosis in thymocytes // *Cancer. Rrs.* – 1994. – Vol. 51. – P. 1078.
- 198 Walker P.R., LeBlanc J., Sikorska M. Evidence that DNA fragmentation in apoptosis is initiated and propagated by single-strnd breaks // *Cell Death Differ.* – 1997. Vol. 4. – P. 506-515.
- 199 Walker P.R., Weaver V.M., Lach B., LeBlanc J., Sikorska M. Endonuclease acties associated with high molecular weight and internucleosomal DNA fragmentation in apoptosis. // *Exp Cell Res.* – 1994. Vol. 213. – P. 100-106.

- 200 Walker P.R., , Sikorska M. New aspects of the mechanism of DNA fragmentation in apoptosis. // *Biochem Cell Biol.* 1997. – Vol. 75. – P.287-299.
- 201 Wang S., Miura M., Jung Y. K., Zhu H. Li E. and Yuan J. Murine caspase-11, an ICE-interacting protease, is essential for the activation of ICE // *Cell* 1998. Vol. 92(4), P 501-509
- 202 Wang G.H., Bertin J., Wang Y. et al // *Ibid.* 1997. Vol. 71, N 11. P.8928-8932
- 203 Wang Z., Stingl L., Morrison C. et al. PARP is important for genomic stability but dispensable in apoptosis. // *Genes Development* 1997. Vol.11. P.2347-2358.
- 204 Ward J.F. Radiation mutagenesis: the initial DNA lesions responsible // *Radiat. Res.* – 1995.- Vol.142, №3.- P.362-368.
- 205 Weaver V.M., Lach B., Walker P.R., Sikorska M. Role of proteolysis in apoptosis: involvement of serine proteases in internucleosomal DNA fragmentation in immature thymocytes // *Biochem Cell Biol*, Sep 1993; 71 (9-10): 488-500.
- 206 Wolf B., Green D. Suicidal Tendencies: Apoptotic Cell Death by Caspase Family Proteinases // *J.Biol. Chemistry* 1999 Vol. 274, No. 29, P. 20049–20052.
- 207** Yabe Y., Yoshimura S. Effect of inosine on left ventricular performance and its clinical significance // *Jap. Heart J.*-1981.-V.22.-P.915-928.
- 208 Yakovlev A.G., Wang G., Stoica B.A. et al. A role of the Ca²⁺/Mg²⁺ - dependent Endonuclease in Apoptosis and its Inhibition by Poly(ADP-ribose)Polymerase // *J. Biol. Chem.* -2000. -Vol. 275. -P.21302-21308.
- 209 Yang X., Stennicke H.R., Wang B., Green D.R., Janicke R.U., Srinivasan A., Seth P., Salvesen G.S., Froelich C.J. (1998) Granzyme B mimics apical caspases. Description of a unified pathway for transactivation of executioner caspase-3 and -7. *J. Biol. Chem.* 273, 34278-34283.

-
- 210 Zakeri Z. Cell death: programmed, apoptosis, necrosis, or other // Cell Death Differ.-1995.-Vol.2, №1.-P.83-92. 223.
- 211 Zhou Q. and Salvesen G.S. Activation of pro-caspase-7 by serine proteases includes a noncanonical. specificity. // Biochem. J. 1997,Vol. 324, P. 361-364.
- 212 Zhao M., Antunes F., Eaton J.W., Brunk U.T. Lysosomal enzymes promote mitochondrial oxidant production, cytochrome c release and apoptosis // Eur. J. Biochem. 2003. Vol. 270, P. 3778-3786.
- 213 Zhivotovsky B.D., Seiliev A.A., Hanson K.P. Effect of gamma-irradiation on DNA-dependent RNA polymerase activity in rat thymus cells // Radiat. Biol. Relat. Stud. Phys. Chem. Med. -1982.- Vol.42,№2.- P.199-204.
- 214 Zhivotovsky B., Samali A., Gahm A., Orrenius S. Caspases: their intracellular localization and translocation during apoptosis // Cell. Death. Differ. – 1999. – Vol.6. – P.644-651.
- 215 Zou H., Henzel W.J., Liu X., Lutschg A., Wang X. Apaf-1, a human protein homologous to C. elegans CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3 // Cell. –1997. – Vol. 90, N 3. – P. 405-413.
- 216 Zou H., Li Y., Liu X., Wang X. An APAF-1 Cytochrome c Multimeric Complex Is a Functional Apoptosome That Activates Procaspase-9 // J. Biol. Chem.- 1999. – Vol. 274. – P. 11549-11556.