Андрійчук Тетяна Ростиславівна, доцент кафедри біохімії ННЦ &laquo;Інститут біології та медицини&raquo; Київського національного університету імені Тараса Шевченка МОН України: &laquo;Біохімічні механізми реалізації радіаційно- індукованого апоптозу&raquo; (03.00.04 - біохімія). Спецрада Д 26.001.24 у Київському національному університеті імені Тараса Шевченка

Київський національний університет імені Тараса Шевченка

Міністерство освіти і науки України

Київський національний університет імені Тараса Шевченка

Міністерство освіти і науки України

Кваліфікаційна наукова

праця на правах рукопису

АНДРІЙЧУК ТЕТЯНА РОСТИСЛАВІВНА

УДК 577.+612.438.014.481+612.438.014.46

ДИСЕРТАЦІЯ

БІОХІМІЧНІ МЕХАНІЗМИ РЕАЛІЗАЦІЇ РАДІАЦІЙНО–ІНДУКОВАНОГО

АПОПТОЗУ

03.00.04- біохімія

Подається на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей,

результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ Андрійчук Т.Р.

Науковий консультант Остапченко Людмила Іванівна, доктор біологічних

наук, професор

Київ – 2017

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ………………………………………. 25

ВСТУП……………………………………………………………………….. 26

РОЗДІЛ 1 БІОХІМІЧНІ МЕХАНІЗМИ АПОПТОЗУ …………………….. 35

1.1 Молекулярні шляхи реалізації апоптозу……………………….…. 36

1.2 Модифікуючі ефекти інозину на перебіг радіаційно–

індукованого апоптозу …………………………………………….. 46

РОЗДІЛ 2 МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ…………………... 50

2.1 Дизайн експерименту……………………………………………… 50

2.2 Метод виділення лімфоцитів тимусу і селезінки щурів та

визначення їх життєздатності …………………………………….. 51

2.3 Визначення рівня одно- та дволанцюгових розривів ядерної

ДНК…………………………………………………………………. 51

2.4 Визначення рівня полідезоксирибонуклеотидів (ПДН)………… 51

2.5 Електрофорез ДНК в агарозному гелі ………………………….... 52

2.6 Метод визначення активності полі(ADP-рибозо)полімерази ….. 53

2.7 Визначення вмісту НАД+

………………………………………….. 53

2.8 Визначення вмісту транскрипційного фактору NF-κB…………. 54

2.9 Отримання цитоплазматичної та ядерної фракції лімфоцитів

тимусу та селезінки щурів………………………………………... 54

2.10 Визначення вмісту транскрипційного фактору р53…………….. 55

2.11 Електрофоретичний аналіз білків………………………………… 55

2.12 Імуноблот-аналіз…………………………………………………… 56

2.13 Визначення активності цистеїнових протеїназ родини каспаз:

каспази -2, каспази –3, каспази -6, каспази -8, каспази -9………. 57

2.14 Оцінка ступеня функціональної активності мітохондрій з

використанням МТТ ………………………………………………. 57

21

2.15 Визначення активності катепсину В ……………………………... 58

2.16 Визначення активності калпаїнів…………………………………. 58

2.17 Визначення протеасомної активності ……………………………. 59

2.18 Визначення концентрації білка …………………………………... 60

2.19 Визначення вмісту ТБК-активних продуктів ……………………. 60

2.20 Визначення швидкості генерування супероксидних аніонрадикалів …………………………………………………………… 61

2.21 Визначення супероксиддисмутазної активності ………………… 61

2.22 Визначення каталазної активності ……………………………….. 62

2.23 Визначення ксантиноксидазної активності ……………………… 63

2.24 Дослідження ступеня окисної модифікації білків ………………. 63

2.25 Визначення стадій клітинної загибелі методом протокової

цитометрії ………………………………………………………….. 64

2.26 Визначення вмісту АТФ …………………………………………… 64

2.27 Дослідження катаболізму пуринів………………………………… 65

2.28 Визначення активності ферментів пуринового обміну………...… 66

2.28.1 Визначення активності аденозиндезамінази, 5′-нуклеотидази,

АМФ-дезамінази, аденілаткінази ………………………………... 66

2.28.2 Визначення активності пуриннуклеозидфосфорилази ………… 68

2.29 Статистичний аналіз результатів досліджень..…………………… 68

РОЗДІЛ 3. ЯДЕРНО-ОПОСЕРЕДКОВАНИЙ ШЛЯХ РЕАЛІЗАЦІЇ

РАДІАЦІЙНО-ІНДУКОВАНОГО АПОПТОЗУ…………………………... 70

3.1 Дослідження структурного стану ДНК у лімфоцитах тимусу і

селезінки щурів за дії іонізуючої радіації та на фоні введення

інозину …………………………………………………...………… 71

3.1.1 Дослідження рівня одно- та дволанцюгових розривів ДНК у

лімфоцитах тимусу і селезінки щурів за дії іонізуючої радіації

та на фоні введення інозину…………………………………..…... 72

22

3.1.2 Дослідження рівня полідезоксирибонуклеотидів (ПДН) за дії

іонізуючої радіації та на фоні введення інозину…………….…... 76

3.1.3 Активність полі (ADP-рибозо) полімерази (ПАРП) та вміст

НАД+

за дії іонізуючої радіації та на фоні введення інозину …... 83

3.2 Оцінка рівня транскрипційних факторів та активності каспази-2

у лімфоцитах тимусу і селезінки щурів за дії іонізуючої радіації 90

3.2.1 Рівень транскрипційного фактору NF-κB у лімфоцитах тимусу і

селезінки щурів за дії іонізуючої радіації ……………………….. 90

3.2.2 Рівень транскрипційного фактора р53 у лімфоцитах тимусу і

селезінки щурів за дії іонізуючої радіації………………………... 95

3.2.3 Рівень транскрипційного фактора АР-1 у лімфоцитах тимусу і

селезінки щурів за дії іонізуючої радіації ……………………….. 100

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

дії іонізуючої радіації …………………………………………….. 105

РОЗДІЛ 4. РЕЦЕПТОР-ОПОСЕРЕДКОВАНИЙ ШЛЯХ РЕАЛІЗАЦІЇ

РАДІАЦІЙНО-ІНДУКОВАНОГО АПОПТОЗУ………………………….. 111

4.1 Рівень Fas-рецептора та активність каспази-8 у лімфоцитах

тимусу і селезінки щурів за дії іонізуючої радіації …………….. 112

РОЗДІЛ 5. МІТОХОНДРІАЛЬНО-ОПОСЕРЕДКОВАНИЙ ШЛЯХ

РЕАЛІЗАЦІЇ РАДІАЦІЙНО –ІНДУКОВАНОГО АПОПТОЗУ …………. 120

5.1 Оцінка ступеня функціональної активності мітохондрій у

лімфоцитах тимусу і селезінки щурів за дії іонізуючої радіації

та на фоні введення інозину ……………………………………… 122

5.2 Вміст білка Bax – члена родини Bcl-2 у лімфоцитах тимусу і

селезінки щурів за дії іонізуючої радіації ……………………….. 125

5.3 Активність каспази-9 та рівень AIF у лімфоцитах тимусу і

селезінки щурів за дії іонізуючої радіації ……………………….. 130

23

РОЗДІЛ 6. ЗАЛУЧЕННЯ КАСПАЗО-НЕЗАЛЕЖНИХ ПРОТЕОЛІТИЧ–

НИХ КАСКАДІВ У РАДІАЦІЙНО-ІНДУКОВАНИЙ АПОПТОЗ ……… 139

6.1 Активність лізосомальної протеїнази катепсину В у лімфоцитах

тимусу і селезінки щурів за дії іонізуючої радіації та на фоні

введення інозину ………………………………………………….. 139

6.2 Активність Са2+-залежних протеїназ калпаїнів у лімфоцитах

тимусу і селезінки щурів за дії за дії іонізуючої радіації та на

фоні введення інозину …………………………………………….. 145

6.3 Протеасомна активність в лімфоцитах тимусу і селезінки щурів

за дії іонізуючої радіації та на фоні введення інозину………….. 153

РОЗДІЛ 7. ОКСИДАТИВНИЙ СТРЕС ЯК МАРКЕР ІНІЦІАЦІЇ І

РЕАЛІЗАЦІЇ РАДІАЦІЙНО–ІНДУКОВАНОГО АПОПТОЗУ.………….. 160

7.1 Вміст продуктів перекисного окиснення ліпідів у лімфоцитах

тимусу і селезінки щурів за дії іонізуючої радіації та на фоні

введення інозину ………………………………………………….. 162

7.2 Рівень генерування супероксидних аніон–радикалів у

лімфоцитах тимусу і селезінки щурів за дії іонізуючої радіації

та на фоні введення інозину ……………………………………… 167

7.3 Ксантиноксидазна активність у лімфоцитах тимусу і селезінки

щурів за дії іонізуючої радіації та на фоні введення інозину …... 172

7.4 Супероксиддисмутазна активність у лімфоцитах тимусу і

селезінки щурів за дії іонізуючої радіації та на фоні введення

інозину ……………………………………………………………... 181

7.5 Каталазна активність у лімфоцитах тимусу і селезінки щурів за

дії іонізуючої радіації та на фоні введення інозину …………...... 187

7.6 Окисна модифікація білків у лімфоцитах тимусу і селезінки

щурів за дії іонізуючої радіації ………………………………….... 192

24

РОЗДІЛ 8. АКТИВНІСТЬ ЕФЕКТОРНИХ КАСПАЗ ТА ВИЗНАЧЕННЯ

СТАДІЙ ПЕРЕБІГУ РАДІАЦІЙНО-ІНДУКОВАНОГО АПОПТОЗУ…... 198

8.1 Дослідження активності каспази – 3 у лімфоцитах тимусу і

селезінки щурів за дії іонізуючої радіації ……………………….. 199

8.2 Дослідження активності каспази – 6 у лімфоцитах тимусу і

селезінки щурів за дії іонізуючої радіації ……………………….. 203

8.3 Визначення стадій перебігу радіаційно-індукованого апоптозу у

лімфоцитах тимусу і селезінки щурів методом протокової

цитометрії ………………………………………………….………. 206

РОЗДІЛ 9. ОЦІНКА РІВНЯ АТФ ТА ФУНКЦІОНУВАННЯ СИСТЕМИ

ОБМІНУ ПУРИНІВ ЗА РАДІАЦІЙНО-ІНДУКОВАНОГО АПОПТОЗУ.. 215

9.1 Вміст АТФ у тимусі і селезінці щурів за дії іонізуючої радіації

та на фоні введення інозину …………………………………….… 216

9.2 Катаболізм пуринів у лімфоцитах тимусу і селезінки щурів за

дії іонізуючої радіації ……………………………………………... 218

9.3 Активність ферментів метаболізму пуринів у лімфоцитах

тимусу та селезінки щурів за дії іонізуючої радіації та на фоні

введення інозину …………………………………………………... 225

АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ ……... 243

ВИСНОВКИ ………………………………………………………………… 253

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ …………………………………... 255

ДОДАТОК 1…………………………………………………………………. 300

ДОДАТОК 2………………………………………………………..………… 312

25

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

АД – АМФ-дезаміназа

АДА – аденозиндезаміназа

АК – аденілаткіназа

АКМ– активні кисневі метаболіти

МДА – малоновий діальдегід

МФД– міжнуклеосомна фрагментація ДНК

ПАРП – полі(ADP-рибозо)полімераза

ПЛМ-пермебіалізації лізосомальної мембрани

ПОЛ – перекисне окислення ліпідів

5'-Н – нуклеотидаза

AIF – апоптоз-індукуючий фактор

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

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

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

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

смерть

DR (Death Receptor)– рецептори смерті

MAP- кінази (MAP kinase - Mitogen-Activated Protein kinase) − мітогенактивовані протеїнкінази

NF-κB (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) −

транскрипційний фактор

р53 – білок р53 − транскрипційний фактор

26

ВСТУП

Актуальність теми. Апоптоз – генетично детермінований

енергоємний процес, що відіграє визначальну роль у підтриманні

фізіологічних процесів, необхідних для нормальної життєдіяльності клітин,

водночас є основним механізмом, який забезпечує селективне видалення

пошкоджених, злоякісно-трансформованих чи інфікованих клітин [1, 2].

З'ясування молекулярно–біохімічних механізмів перебігу апоптотичного

процесу є нагальною проблемою сьогодення, оскільки порушення шляхів

контролю ключових етапів апоптозу, пов’язане з його надмірною активацією

або інгібуванням, призводить до патологічних змін [3, 4] на рівні окремих

органів і систем та, відповідно, є основою для розвитку ряду захворювань

(онкологічних, аутоімунних, нейродегенеративних та ін.).

Дія іонізуючої радіації на клітини радіочутливих органів системи

імунітету (тимус, селезінка) спричиняє ряд порушень як на

надмолекулярному, субклітинному, так і молекулярному рівнях, що є

підґрунтям біохімічних та морфологічних змін, які послідовно реалізуються

шляхами, означеними як радіаційно-індукований апоптоз [5, 6]. Дослідження

біохімічних шляхів апоптозу у відповідь на вплив променевого чинника має

певну складність, оскільки проявляється його мультисистемна дія. Водночас

на особливу увагу заслуговує можливість використання моделі радіаційноіндукованого апоптозу як інструменту для обгрунтування теоретичних засад

специфіки перебігу етапів апоптозу з метою формування парадигми

програмованої клітинної загибелі. Виявлення радіаційних ефектів та

дослідження регуляторної мережі інтегральної відповіді функціональних

систем імунокомпетентних клітин лімфоїдних органів на дію стрес-чинника

визначається як актуальна проблема сучасної біохімії, молекулярної біології

та медицини. Існуючі розрізнені дані та поодинокі концептуальні

дослідження не дають чіткої деталізації зазначеної танатогенної програми [7,

27

8]. Тому вивчення та експериментальне обґрунтування питань, пов’язаних з

реалізацією радіаційно-індукованого апоптозу за умови дисбалансу

функціонування регуляторних каскадів ядерного, рецептор-опосередкованого

та мітохондріального шляхів клітинної загибелі, надасть змогу виявити

причинно-наслідкові зв’язки біохімічних механізмів індукованого радіацією

порушення функціонування імунокомпетентних клітин лімфоїдних органів.

Не менш актуальною на сьогодні вважається проблема модифікації

радіочутливості та пошук ефективних засобів радіомодулюючої дії [9, 10,

11], спрямованих на запобігання та зменшення молекулярно-біохімічних змін

клітин імунної системи, комітованих на загибель шляхом апоптозу, та

порушень в організмі опромінених тварин в цілому. Дані щодо біохімічних

механізмів радіаційно-індукованого апоптозу стали підгрунтям для розробки

методів корекції та запобігання порушень структурно-функціональних

властивостей лімфоїдних клітин та сприяли дослідженню впливу інозину як

засобу, що викликає підвищення загальної резистентності організму шляхом

модифікації певних ланок перебігу радіаційно-індукованого апоптозу.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.

Дисертаційна робота виконана відповідно до плану наукових досліджень

Київського національного університету імені Тараса Шевченка і є

фрагментом таких наукових тем ННЦ "Інститут біології та медицини":

"Розробка наукових основ пошуку біологічно активних сполук радіозахисної

дії" (№ д/р 0101U002291, 1998– 2005 рр.) в рамках комплексної наукової

програми "Здоров’я людини"; "Визначення біохімічних, генетичних,

імунологічних та цитологічних маркерів розвитку патологічних станів з

метою розробки засобів направленої корекції і профілактики (№ д/р

0106U005750, 2006-2010 рр.); "Механізми реалізації адаптаційнокомпенсоторних реакцій організму за умов розвитку різних патологій" (№ д/р

0111U004648, 2011-2015 рр.) та "Механізми регуляції метаболічних процесів

28

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

2018 рр.).

Мета і задачі дослідження. Метою роботи було з'ясування біохімічних

шляхів перебігу процесів, які характеризують радіаційно-індукований

апоптоз у лімфоцитах тимусу і селезінки щурів.

Для досягнення мети було поставлено такі задачі:

1. Виявити особливості ядерного, рецептор-опосередкованого та

мітохондріального шляхів радіаційно-індукованого апоптозу у

лімфоцитах тимусу і селезінки щурів та визначити стадії перебігу

апоптозу за дії променевого чинника. Окреслити взаємозв'язки та виявити

групу ключових параметрів, які характеризують основні біохімічні шляхи

реалізації радіаційно-індукованого апоптозу, з застосуванням

кореляційного аналізу.

2. Встановити ступінь залучення системи каспазо-незалежного протеолізу у

радіаційно-індукований апоптоз лімфоцитів тимусу і селезінки щурів.

3. Визначити роль оксидативного стресу за радіаційно-індукованого

апоптозу лімфоцитів тимусу і селезінки щурів.

4. Визначити активність ефекторних каспаз за радіаційно-індукованого

апоптозу лімфоцитів тимусу і селезінки щурів.

5. Оцінити енергетичний стан лімфоцитів тимусу і селезінки щурів та

функціонування системи обміну пуринів за радіаційно-індукованого

апоптозу.

6. З'ясувати вплив препарату інозину на перебіг радіаційно-індукованого

апоптозу лімфоцитів тимусу і селезінки щурів.

Об'єкт дослідження – біохімічні механізми програмованої клітинної

загибелі шляхом апоптозу за умов дії іонізуючої радіації.

Предмет дослідження – ядерний, рецептор-опосередкований та

мітохондріальний шляхи клітинної загибелі, редокс-залежна сигнальна

29

система, енергетичний стан клітин та обмін пуринів за умов дії іонізуючої

радіації та на фоні введення інозину.

Методи дослідження. У роботі використано спектрофото(флуо)риметричне визначення активності ряду протеїназ, рівня

метаболітів та активності ферментів про-антиоксидантної систем,

концентрації білка, рівня одно- та дволанцюгових розривів ДНК, вмісту

НАД+

, МТТ-тест; радіоізотопний метод (визначення активності ферментів

обміну пуринів та включення С14-аденозину у фонд пуринів; визначення

активності полі(ADP-рибозо)полімерази, метод тонкошарової хроматографії

(розділення метаболітів пуринового обміну), метод електронного

парамагнітного резонансу (визначення швидкості генерування

супероксидних аніон-радикалів), хемілюмінесцентний (визначення вмісту

АТФ); імуноферментний метод (рівень NF-κB, p53), протокова цитометрія

(стадії перебігу апоптозу), вестерн-блот аналіз (рівень AIF, Fas, AP-1, Bax),

електрофоретичне визначення рівня фрагментованої ДНК та статистичний

аналіз.

Наукова новизна одержаних результатів. Уперше проведено

комплексні молекулярно-біохімічні дослідження, на основі яких розширено

існуючі уявлення про механізми програмованої загибелі клітин та

запропоновано концепцію біохімічних шляхів реалізації радіаційноіндукованого апоптозу і можливостей його модифікації.

В результаті проведених досліджень отримано нові дані про

особливості та взаємозв’язок ядерного, рецептор-опосередкованого та

мітохондріального шляхів радіаційно-індукованого апоптозу у лімфоцитах

тимусу і селезінки щурів та визначено ступінь чутливості стадій перебігу

апоптозу до дії променевого чинника.

Вперше виявлено значущість залучення як каспазо-опосередкованого,

так і каспазо-незалежного протеолізу у перебіг радіаційно-індукованого

апоптозу. Отримано нові дані щодо активації редокс-чутливих ланок

30

вищенаведених шляхів реалізації радіаційно-індукованого апоптозу за умови

порушення окисно-антиоксидантної рівноваги, характерні прояви якої

лежать в основі теорії "оксидативний стрес як медіатор апоптозу".

За перебігу шляхів реалізації радіаційно-індукованого апоптозу

виявлено порушення енергетичної рівноваги в імунокомпетентних клітинах

тимусу і селезінки щурів, що корелює зі зниженням вмісту АТФ на фоні

активації катаболічної ланки пуринового обміну.

На підставі отриманих результатів підтверджено модифікуючий

радіопротекторний вплив інозину, основу якого складає підвищення

загальної резистентності організму, та вперше виокремлено певні ланки

біохімічних шляхів регуляторної мережі відповіді клітин за дії радіаційного

чинника.

Практичне значення одержаних результатів. Отримані результати

дисертаційної роботи сприяють формуванню цілісної структурної

молекулярно-біохімічної схеми реалізації радіаційно-індукованого апоптозу.

Проведені експериментальні дослідження дають підстави виявити

особливості механізмів сигналювання, відповідальних за залучення основних

шляхів перебігу апоптотичного процесу за дії променевого чинника на

імунокомпетентні клітини тимусу і селезінки щурів.

Отримані експериментальні дані щодо модифікуючого впливу інозину

на структурно-функціональні порушення функціонування клітин лімфоїдних

органів за дії іонізуючої радіації дають можливість застосовувати його як

засіб направленої корекції з радіомодулюючими властивостями.

Матеріали дисертаційної роботи використовуються в учбовому процесі

кафедри біохімії Навчально-наукового центру "Інститут біології та

медицини" Київського національного університету імені Тараса Шевченка:

лекційний курс "Біохімічні основи імунітету", "Молекулярні механізми

біосинтезу білка" та лабораторні заняття з курсу "Імунохімія". Можливе

31

використання отриманих результатів дисертації для спецкурсів та

лабораторних занять з біологічних та медичних спеціальностей.

Особистий внесок здобувача. Дисертаційна робота є завершеним

дослідженням, виконаним автором відповідно до вищезазначених наукових

програм ННЦ "Інститут біології та медицини". Дисертантом самостійно

обґрунтовано мету та завдання роботи, розроблено методологію

експериментальних досліджень, проведено пошук і аналіз даних літератури,

що дало змогу висвітлити власні ідеї автора, покладені в основу

дисертаційної роботи. Автор зробив основний особистий внесок у

дисертаційну роботу на всіх етапах її практичного виконання, обговорення та

узагальнення результатів дослідження, формулювання висновків та

написання статей і тез доповідей.

Науковий консультант доктор біологічних наук, професор

Остапченко Л.І. брала безпосередню участь у визначенні напряму

досліджень, обговоренні отриманих результатів і висновків.

Протоково-цитометричний аналіз проведено спільно з д.б.н., проф.

Андрейченком С.В., зав. лабораторією радіаційної біохімії ДУ

"Національний науковий центр радіаційної медицини Національної академії

медичних наук України", кореляційний аналіз виконано спільно з к.б.н.

Вакалом С.Є. Результати дисертаційної роботи знайшли відображення у

наукових публікаціях, матеріали яких значною мірою належать автору.

Здобувач вдячний за допомогу у проведенні досліджень колегам, співучасть

яких у виконанні роботи відмічена у спільних публікаціях.

Апробація результатів дисертації. Основні наукові положення,

висновки та практичні рекомендації дисертаційної роботи були представлені

на національних та міжнародних науково-практичних форумах: VII, VIII, ІХ,

Х Українських біохімічних з’їздах (Київ, Україна, 1997; Чернівці, Україна,

2002; Харків, Україна 2006; Одеса, Україна, 2010) та ХІ Українському

біохімічному конгресі (Київ, Україна, 2014); III и IV съездах по

32

радиационным исследованиям (Москва, Россия, 1997; 1998); III

Международном симпозиуме "Механизмы действия сверхмалых доз"

(Москва, Россия, 2002); Российской научной конференции "Медикобиологические проблемы противолучевой и противохимической защиты"

(Санкт-Петербург, Россия, 2004); V,VI,VII съездах по радиационным

исследованиям (радиобиология, радиоэкология, радиационная безопасность)

(Москва, Россия, 2006; 2010; 2014); III з’їзді з радіаційних досліджень

(радіобіологія і радіоекологія) (Київ, Україна, 2003); The 35th Annual Meeting

of the European Radiation Research Society and The 4th Annual Meeting of the

Ukrainian Society for Radiation Biology (Kyiv, Ukraine, 2006); 5th Parnas

Conference “Molecular mechanism of cellular signaling” (Kyiv, Ukraine, 2005);

VII Parnas Conference on Biochemistry and Molecular Biology (Yalta, Crimea,

Ukraine, 2009); VIII Parnas Conference im. Jakuba Karola Parnasa, (Warsaw,

Poland, 2011); IX Jakub K.Parnas Conference “Proteins from Birth to Death”

(Jerusalem, Israel, 2013); II, III, IV з’їзді Українського біофізичного

товариства (Харків, Україна, 1998; Львів, Україна, 2002; Донецьк, Україна,

2006); II з’їзді Українського товариства клітинної біології, (Київ, Україна,

2007); International symposium on cell biology jointly with 3rd Ukrainian

Congress for cell biology (Yalta, Ukraine, 2012); International Symposium on

Cell Biology jointly with 5th Ukrainian Congress for Cell Biology (Odesa,

Ukraine, 2016); Всеукраїнській науковій конференції "Психофізіологічні та

вісцеральні функції в нормі та патології" (Київ, Україна, 2002); ІV, V, VII

Міжнародній науковій конференції Психологічні та вісцеральні функції в

нормі і патології» (Київ, 2008, 2010, 2014); Міжнародній науково-практичній

конференції “Віддалені наслідки впливу іонізуючого випромінювання” (Київ,

2007); Российской научной конференции "Медико-биологические проблемы

токсикологии и радиологии" (Санкт-Петербург, Россия, 2008); 36th Annual

Meeting of the European Radiation research Society (Рaris, France, 2008); 7

International Meeting on the Effects of Low Doses of Radiation in Biological

33

System: New perspectives on human exposure (Lisbon, Portugal, 2008); 34th

FEBS Congress "Life’s Molecular Interaction" (Prahue, Czech Republic, 2009);

конференции "Адаптационные стратегии живых систем" (Новый Свет, Крым,

Украина, 2012); Российской конференции "Острые проблемы разработки

противолучевых средств: консерватизм или модернизация" (Москва, Россия,

2012); Х Международной Крымской конференции "Космос и биосфера"

(Коктебель, Крым, Украина, 2013); Third, Fourth, Fifth International Conference

on Radiation and Application in Various fields of research (Budva, Montenegro,

2015, 2017; Nis, Serbia, 2016).

Публікації. За результатами дослідження опубліковано 68 наукових

праць: 1 монографія, 12 статей у фахових виданнях, затверджених МОН

України, та міжнародних періодичних виданнях, 8 статей у виданнях,

включених до міжнародної наукометричної бази SCOPUS; 47 матеріалів і тез

доповідей на наукових конференціях, форумах та з’їздах.

Структура та обсяг дисертації. Дисертаційна робота складається зі

вступу, огляду літератури, розділу з описом матеріалів і методів

дослідження, розділів власних досліджень, аналізу та узагальнення

результатів, висновків та списку використаних літературних джерел, який

містить 451 найменування. Загальний обсяг дисертації становить 311

сторінок, містить 3 таблиці та 80 рисунків.

Висновок біоетичної експертизи. Згідно з висновком комісії з питань

біоетики ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного

університету імені Тараса Шевченка (протоколу № 3 від 25 вересня 2017 р.)

експериментальні дослідження не суперечать загально прийнятим

біоетичним нормам з дотриманням відповідних міжнародних положень

стосовно проведення експериментальних робіт та клінічних досліджень.

Дослідження виконано відповідно до вимог Хельсінської декларації

(Всесвітня медична асамблея, 1964), Міжнародних принципів Європейської

34

конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних

та інших наукових цілей (Страсбург, 1986), Декларації принципів

толерантності (28 сесія ЮНЕСКО, 1995), Універсальної декларації по

біоетиці та правах людини (ООН, 1997), норм Конвенції про захист прав

людини у зв’язку з впровадженням нових біомедичних технологій,

прийнятою у 1997 році у м. Ов’єдо (Іспанія) та відповідно до Закону України

№ 3447 ІV “Про захист тварин від жорстокого поводження” [12, 13].

ВИСНОВКИ

Наосновіаналізурезультатівекспериментальнихдослідженьта

теоретичногоузагальненняз’ясованоосновнізакономірностіреалізації

процесуапоптотичноїзагибелілімфоїднихклітинтимусуіселезінкищурів

зарадіаційноговпливуВстановленібіохімічнімеханізмиперебігу

радіаційноіндукованоїпрограмованоїзагибелілімфоцитівтимусуіселезінки

щурівопосередковуютьсяоксидативнимстресомякмедіаторомапоптозу

Доведеноактиваціюядернозалежногошляхуприрадіаційноіндукованомуапоптозізарахунокдисбалансуядерноїрепараційноїсистеми

зниженняактивностіПАРПнакопиченнязрізноюінтенсивністю

нерепарованиходнотадволанцюговихрозривівДНК

полідезоксирибонуклеотидівпідвищеннярівняміжнуклеосомноїдеградації

ДНКщосупроводжуєтьсяактивацієюкаспазитаопосередковується

проапоптотичнимисистемамиекспресіїззалученнямредоксчутливих

транскрипційнихфакторівАРріκ

Показанощозарадіаційноіндукованогоапоптозупосилюється

активаціярецептор–опосередкованогошляхузарахунокмобілізації–

залежноїланкитаосновноїініціаторноїкаспазизалежноговідрецепторів

сигнальногошляху–каспази

Виявленопорушенняфункціональноїактивностімітохондрійза

рахунокВахопосередкованоїстимуляціїпороутвореннямембран

мітохондрійзподальшоюактивацієюініціаторноїкаспазитазалежногонуклеолізущоєосновнимискладовимимітохондріальноопосередкованоїланкирадіаційноіндукованогоапоптозу

Встановленорізнонаправленістьзмінкаспазонезалежних

ферментативнихпротеолітичнихкаскадівкалпаїнівлізосомального

катепсинуВтапротеасомноїсистемиякісвідчатьпрокомплексний



характерїхдеструктивнихтасигнальнихфункційурегуляціїперебігу

радіаційноіндукованогоапоптозу

Виявленопорушенняокисноантиоксидантноїрівновагиасаме

підвищеннярівняпродуктівокисненняліпідівібілківнакопичення

супероксидногоаніонрадикалутадисрегуляціяантиоксидантних

ферментнихсистемсупероксиддисмутазиікаталазищопризводитьдо

залученняредоксчутливихланокдослідженихшляхівреалізаціїрадіаційноіндукованогоапоптозухарактерніпроявиякихвизначаютьоксидативний

стресякмедіаторапоптозу

Виявленізарадіаційноіндукованогоапоптозузміниактивності

ефекторнихкаспаз–каспазиікаспази–маютьрізноспрямований

характеробумовленийскладноюамплікативноюсистемоюрегуляціїїх

функціонуваннящозабезпечуєвиконаннянимипорядзефекторноюі

функціїмесенджернихмолекулупроведенніапоптотичногосигналу

Встановленопорушенняенергетичногобалансущо

супроводжуєтьсязмінамивмістуАТФзарахунокактивізаціїкатаболічної

ланкипуриновогообмінузарадіаційноіндукованогоапоптозу

Відміченомодифікуючийвпливінозинунапевніланкибіохімічних

шляхіврегуляторноїмережівідповідіклітинзадіїрадіаційногочинника

Наосновікореляційногоаналізувстановленогрупупоказниківякі

маютьнайвищийступінькореляційнихзв’язківієключовимипараметрами

длявиявленнязмінстанулімфоцитівселезінкитатимусущурівза

радіаційноіндукованогоапоптозу