

**ТБИЛИССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ**

*На правах рукописи*

*М а й я   С а р а л и д з е*

**Плаферон ЛБ, как регулятор оксидативного стресса при радиационном облучении**

**14.00.36. - Аллергология и иммунология**

**А В Т О Р Е Ф Е Р А Т**

**диссертации на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук**

Тбилиси  
2006

**Работа выполнена в Институте Медицинской Биотехнологии  
Грузинской Академии Наук.**

- Научный руководитель** - **Тамар Саникидзе**, доктор биологических наук, профессор.
- Официальные оппоненты:
- **Нодар Гогешашвили**, доктор медицинских наук, профессор (14.00.36),
  - **Лиана Гогешашвили**, доктор медицинских наук, профессор (14.00.15).

Защита диссертации состоится \_\_\_\_ \_\_\_\_\_ 2006 года в \_\_\_\_\_ часов на Заседании диссертационного совета 14.10 №5 Тбилисского Медицинского Государственного Университета (0177, Тбилиси, пр. Важа-Пшавела, №33).

Ознакомиться с диссертацией можно в библиотеке Тбилисского государственного медицинского университета (0160, Тбилиси, пр. Важа-Пшавела, №29).

Автореферат разослан \_\_\_\_\_ 2006 года.

Ученый секретарь диссертационного совета,  
Доктор медицинских наук, профессор -

Т. Чиковани

**ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ**

### **Актуальность проблемы.**

Лучевая терапия целенаправленно применяет ионизирующую радиацию для лечения опухолевых и неопухолевых (постоперационные инфильтрационные процессы, осложнения после ампутации, воспалительные и дегенеративные изменения суставов и др.) заболеваний. Однако, эффективность радиотерапии ограничивается рядом осложнений, связанных с повреждением радиочувствительных (кровенворная, иммунная системы, различные типы эпителия, органы репродуктивной системы и др.) и радионечувствительных органов.

С целью изучения механизмов радиационного поражения и природы пострадиационных процессов проведено множество исследований на физико-химическом, биохимическом и молекулярном уровнях живого организма. Известно, что эти этапы радиационного повреждения тесно связаны с течением свободнорадикальных реакций.

В процессе радиация-индуцированного повреждения ведущая роль принадлежит оксидативному повреждению биологических мембран, которое осуществляется с помощью реактивных соединений кислорода, генерированных под воздействием ионизирующей радиации. Во многих исследованиях было показано, что во время облучения возрастает интенсивность пероксидации липидов, снижается активность антиоксидантных ферментов (особенно каталазы и глутатион оксидазы). В развитии пострадиационного адаптационного ответа клеток установлена важная роль статуса тиолсодержащих белков и Mn-SOD (Biaglow J.E., et al., 2003, Guo G., et al., 2003).

Среди субклеточных органелл митохондрия обладает выраженной чувствительностью к оксидативному стрессу, что определяет ее значительную роль в механизмах развития радиация индуцированной цитотоксичности и гибели клетки. Радиация приводит к развитию интенсивного окислительного стресса в митохондриях как нормальных так и опухолевых клеток. Модуляция редокс-статуса митохондрий имеет потенциальное значение как для превенции лучевого заболевания в нормальных тканях, так и при регрессии опухоли (Kamat J.P., et al., 1999).

Анализ накопленных экспериментальных данных показывает, что при  $\gamma$ -облучении причиной быстрой гибели клеток радиочувствительных органов является радиация-индуцированный апоптоз, протекающий с участием белков p-53 и Bcl-2 (Mathieu J., et al., 1999). Благодаря антиоксидантным свойствам Bcl-2 обладает способностью регулировать редокс статус клетки и редокс-зависимый апоптоз (Pan Z., et al., 1999). Выявлено ингибирование экспрессии Bcl-2 при активации радиация-индуцированного апоптоза, что указывает на важную роль митохондрий в этом процессе. p-53 вызывает развитие апоптоза с помощью механизмов, зависящих или не зависящих от транскрипции различных генов, включая сфинголипиды, церамиды и реактивные формы кислорода. Регуляция этих апоптозных путей возможна с помощью ингибирования мембраносвязанной сфингомиелиназы и инициации церамид - индуцированного апоптозного каскада (Zavodnik L.V., et al., 2003).

При радиационном воздействии возникновение апоптозного сигнала зависит не только от дозы облучения, но и от интенсивности пострадиационного оксидативного стресса (Lyng F.M., et al., 2001). Вместе с тем, в регуляции апоптоза особое значение придается активности тканевых антиоксидантов. Было показано, что аккумуляция церамидов и снижение уровня глутатиона под воздействием радиации обусловлены активацией p-53 (El-Assaad W., et al., 2003). В связи с этим интерес представляет изучение изменений антиоксидантной системы и интенсивности экспрессии проапоптозного маркера p-53 в организме в ответ на воздействие радиации.

В патогенезе радиационного повреждения большое значение имеет NO. При радиационном повреждении NO исполняет двойную роль: радиозащитную и радиотоксическую. Радиопротекторная роль NO обеспечивается антиоксидантными свойствами этой молекулы (Gisone P., et al., 2003), а в основе радиация индуцированного

повреждения лежит биологическая деградация NO в цитотоксический пероксинитрит в условиях радиация-индуцированного окислительного стресса (Soloviov A. I., 2003). Установлено, что ингибиторы NO предупреждают развитие радиация индуцированного апоптоза путем подавления нисходящих каспаз вследствие уменьшения степени повреждения митохондрий (Chen Y., et al., 2001).

Препарат плаферон ЛБ обладает отчетливо выраженным мембранозащитным действием, обусловленным не способностью препарата scavенгировать реактивный кислород, а способностью регулировать внутриклеточный редокс-статус. По данным предварительных экспериментальных исследований можно предполагать, что в основе этого механизма лежит стабилизация редокс-статуса переносчиков митохондриальной транспортной цепи. Сохранение редокс-статуса клеток (тканей) обеспечивает как стабилизацию в них редокс чувствительных факторов (NF- $\kappa$ B) и ограничение экспрессии индуцибельной NOS, так и снижение трансформации синтезированного оксида азота в пероксинитрит и сохранение физиологической функции этой сигнальной молекулы.

Многочисленные исследования продемонстрировали нормализацию показателей антиоксидантной системы крови (церулоплазмин-трансферрин), восстановление содержания уменьшенного Fe<sup>3+</sup>-т-трансферрина и NO под воздействием Плаферона ЛБ, что способствует нормализации NO-регулируемого метаболизма железа в организме и восстановлению синтеза железосодержащих белков и интенсивности зависящих от него пролиферативных процессов (Chavchanidze D., et al., 1998, JavaxiSvili n., da sxv., 2001, Mamamtavrishvili N., et al., 2002, Shakarashvili R., Sanikidze T., et al., 2003., Мегреладзе, И.И., и др., 2004). Вместе с тем, было показано, что плаферон ЛБ обладает способностью, активировать апоптоз в опухолевых клетках (Bachitashvili a., et al., 2001). Принимая во внимание вышеописанные свойства препарата, мы решили изучить эффективность плаферона ЛБ при радиационном повреждении.

Исходя из вышесказанного, **целью нашей работы** явилось установление молекулярных механизмов развития радиационного повреждения и выяснение эффективности защитного и лечебного действия препарата плаферон ЛБ при радиационном повреждении.

Для достижения вышеназванной цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Установление молекулярных механизмов радиационного повреждения, для чего в условиях однократного облучения было изучено:
  - а) интенсивность митохондриального дыхания и целостность электронно-транспортной цепи в печени облученных крыс; Электронно-парамагнитные (ЭПР) сигналы (убисемихинонов, FeS центров NADH дегидрогеназы, ксантинооксидазы), железосодержащих парамагнитных комплексов (Fe<sup>2+</sup>, Fe<sup>3+</sup>-трансферрина), параметры отражающие метаболизм оксида азота (свободный NO, Hb-NO, FeS-NO), интенсивность свободнорадикального окисления (спин-меченых кислорода и свободных липидных радикалов, оксида азота);
  - б) Содержание проапоптозного белка p-53 в печени облученных крыс.
  - в) Параметры отражающие содержание антиоксидантных ферментов (церулоплазмина, Fe<sup>3+</sup>-трансферрина, каталазы, глутатион-редуктазы, супероксиддисмутазы) и прооксидантной системы (Mn<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup> ионов, свободных радикалов липидов и кислорода, оксида азота), а также Met-Hb, комплексов NO с дезоксигемоглобином (Hb-NO) в крови облученных крыс.
  - г) Параметры отражающие содержание общего холестерина, триглицеридов и липопротеинов низкой плотности (LDL) в крови облученных крыс.
  - д) Параметры деформабельности эритроцитов в крови облученных крыс.
2. Изучение эффективности превентивного и лечебного действия традиционного радиопротектора антиоксидантного характера, витамина С и плаферона ЛБ на все вышеперечисленные параметры в облученных крысах.

### **Научная новизна работы:**

- a. впервые изучены механизмы радиозащитного действия плаферона ЛБ при однократном сильном радиационном облучении.
- b. установлено, что первичное (1 час спустя после облучения)  $\gamma$  – радиационное повреждение гепатоцитов является следствием развития пострадиационного оксидативного стресса, инициирующего цепные реакции перекисидации липидов. На втором этапе  $\gamma$ -радиационного повреждения (24 часа спустя после облучения) гепатоцитов имеется интенсификация цепных реакций липопероксидации, усугубление повреждения гепатоцитов, нарушение работы митохондриальной электронно-транспортной цепи на участке NADH:убихинон-оксидоредуктазы, высвобождение ионов железа, усиленный синтез NO и развитие p53-зависимого апоптоза, индуцированного оксиген-нитрогенным стрессом.
- c. установлено, что при пре- и пострадиационном воздействии плаферон ЛБ обеспечивает восстановление редокс-гомеостаза организма и нормализацию метаболизма NO.
- d. Выявлено, что Плаферон ЛБ способен предотвращать NO-индуцированную активацию p53 белка и развитие NO-зависимого p53-индуцированного апоптоза.

### **Основные положения, вынесенные на защиту:**

1. В основе механизма радиационного повреждения организма лежит избыточное образование свободных радикалов кислорода и изменения активности системы антиоксидантной защиты. Радиоиндуцированные свободнорадикальные цепные процессы приводят к повреждению мембранных структур, нарушению клеточного метаболизма, усиленную продукцию окиси азота, расстройству окислительного гомеостаза, развитию апоптоза и некроза, и прогрессированию  $\gamma$ -индуцированного облучения.
2. При пре- и пострадиационном воздействии плаферон ЛБ обеспечивает восстановление редокс-гомеостаза организма и нормализацию метаболизма NO, предотвращает NO-индуцированную активацию p53 белка и развитие NO-зависимого p53-индуцированного апоптоза.

### **Практическая ценность работы:**

Установленные в эксперименте на крысах эффективность радиозащитного действия плаферона ЛБ и механизмы его действия дают нам основание, рекомендовать применение данного препарата в качестве радиопротектора при радиотерапии.

### **Апробация работы:**

Материалы диссертации были рассмотрены на расширенном заседании отделов биотехнологии и иммунологии Института Медицинской Биотехнологии Грузинской Академии Наук.

### **Публикации:**

По материалам диссертации в рецензируемых журналах, в том числе международного распространения, опубликованы 3 статьи.

### **Структура и объем диссертации:**

Диссертационная работа содержит 120 печатных страниц; состоит из следующих частей: введение, обзор литературы, материал и методы исследования, результаты исследования, обсуждение результатов исследования, выводы, практические рекомендации. В качестве иллюстраций в диссертации приведены 8 таблиц, 9 рисунков, 8 диаграмм. Опубликованный список использованной литературы содержит 187 источника.

## **МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ:**

### **1. Радиационное облучение.**

Эксперименты проводились на половозрелых белых крысах самках со средней массой 180-200 г. (90 крыс). Экспериментальные животные были разделены на 6 групп:

- I группа - контрольные животные (15 крыс)
- II группа - радиационное облучение (15 крыс)
- III группа - радиационное облучение + витамин С (15 крыс)
- IV группа - радиационное облучение + плаферон ЛБ (15 крыс)
- V группа - витамин С + радиационное облучение (15 крыс)
- VI группа - плаферон ЛБ + радиационное облучение (15 крыс)

Экспериментальным животным проводилась однократная  $\gamma$ -радиотерапия в дозах 6 Гр с помощью аппарата АГАТ РС. Радиопротекторы (витамин С и плаферон ЛБ) вводились внутримышечно сразу после облучения и 18 часов спустя после облучения (3 и 5 группы), и в течение 5 дней до облучения (5 и 6 группы) в дозах 0,40 г/кг и 0,25 мг/кг, соответственно. Животные забивались под наркозом эфира через 1 и 24 часа после облучения.

### **Биохимические исследования:**

Определение активности каталазы в сыворотке крови:

Активность антиоксидантного фермента каталазы определяли по методу Aebi (1984), модифицированному Королюком М.А., Ивановой Л.И. и др (1988) с помощью спектрометра СФ-46 ЛОМО.

Определение активности супероксиддисмутазы (СОД) в сыворотке крови:

Активность супероксиддисмутазы (СОД) определяли по методу Риеда (1970), модифицированному Макаренко Е.В. (1988).

Определение холестерина, триглицеридов и липопротеинов низкой плотности (LDL) в сыворотке крови: Содержание холестерина и триглицеридов в плазме крови определяли с помощью рефлектофотометра Acctrend-GCT типа (фирмы Roche).

Спектроскопные исследования электронного парамагнитного резонанса (ЭПР):

ЭПР исследования проводились на радиоспектрометре РЭ-1307 (Россия), который оперирует в среде сверхвысоких частот с 9.77 GHz частотой модуляции 50 kHz, при температуре жидкого азота (-196°C).

Определяли ЭПР спектры крови и печени. В крови определяли ЭПР сигналы прооксидантной (ионы металлов переменной валентности ( $Mn^{2+}$  ( $g_1=2,14$ ),  $Fe^{2+}$  ( $g=2,37$ ,  $\Delta H=350$ Гс), метгемоглобина (MetHb)  $g=6,0$ ) и антиоксидантной (церулоплазмина ( $g=2,05$ ),  $Fe^{3+}$ -трансферрина ( $g=4,3$ )) систем (Пулатова М.К., и др., 1999). Регистрация спектров проводилась на модуляции амплитуды 0,6 мТ на мощности 100 мВт микроволнового излучения.

В печени определяли показатели митохондриального дыхания (ЭПР сигналы убисемихинонов ( $g=2,00$ ) и железо-серных центров (FeS) ( $g=1,94$ )); ЭПР сигналы микросомных цитохром Р-450 ( $g=2,25$ ), и  $Mn^{2+}$  содержащих центров ( $g=2,14$ )).

Для определения содержания свободного оксида азота в крови и печени использовали спин-ловушку - диэтилдитиокарбамат натрия (DMTC) (SIGMA). DETC (в дозе 500 мг/кг) и Fe<sup>2+</sup>-цитрат (50 мгFeSO<sub>4</sub>· 6H<sub>2</sub>O+ 250 мг цитратнатрия кг-1) вводили интраперитонеально (Beltran B., et al., 2000). Животных забивали через 10 минут после введения спин-ловушки; ЭПР спектры NO-Fe<sup>2+</sup>-(DETC)<sub>2</sub> комплексов определялись при температуре жидкого азота на микроволновой мощности 20 мВт (Галаган М.Е., Киладзе А.Ф., 1997, Meng F., Lowell C.A., 1997).

Для определения содержания липидных пероксид радикалов (LOO<sup>·</sup>) в крови и печени использовали спин-ловушку, α-фенил -тетр-бутилнитрон (PBN) (SIGMA), которую вводили интраперитонеально в дозе 10 мг/кг (Sweet M.J., Hume D.A., 1996). Животные забивались 10 минут спустя после введения спин-ловушки. ЭПР спектры LOO<sup>·</sup> определяли при комнатной температуре на микроволновой мощности 20 мВт.

Для определения содержания супероксид радикалов в тканях использовали спин-ловушку диметил-1-пролин-N-оксид (DNPO) (SIGMA). Проводили инкубацию крови с DMPO (в дозе 50 mM на 1мл крови) в течение трех минут при комнатной температуре (Sweet M.J., Hume D.A.. J. Leukocyte Biol., 1996, v. 60, p. 8-26.). ЭПР спектры супероксид радикалов определяли при комнатной температуре на микроволновой мощности 20 мВт.

Определение деформабельности эритроцитных мембран проводили по компьютерному фильтрационно-фотометрическому методу (Хулузаури О, Ткешелашвили Б, 1990).

Гистологические исследования:

Для определения жизнеспособности клеток применяли иммуногистохимический метод – выявление проапоптозного маркера, p53 белка с помощью мышиных моноклеарных антител IgG-2b класса А(Novo-Castra, RTU-p53-D07 каталога). Фиксация продуктов реакции происходила в универсальных сыворотках фирмы Novo-Castra и комплексе стрептовидин-пероксидазы (Novostain Universal Quick Kit, фирма Novo-Castra, код NCL-RTU-QU). Визуализацию проводили в 3,3-диабензидинтетрахлориде (DAB; 0,5 mg/ml; pH 7,6; 0,001% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, BD Biosciences Pharmingen)

## ПОЛУЧЕННЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что возможности радио- и химиотерапии ограничены тяжелыми осложнениями, связанными с повреждением радиочувствительных тканей. Из анализа накопленных экспериментальных данных следует, что причиной быстрой гибели радиочувствительных клеток при γ-облучении служит развитие p-53-зависимого апоптоза (Assaad W, 2003). Существует предположение, что подавление функционирования белка p-53 в первые часы развития радиация-индуцированного стресса уменьшит повреждение нормальных тканей во время радиотерапии. Выявлению таких препаратов антиапоптозного действия служит наша работа. Как уже отмечали, мы задавались целью установить радиозащитный эффект плаферона ЛБ при одноразовом сильном радиационном облучении.

При радиационном воздействии на клетки значительная роль отводится окислительному повреждению биологических мембран, которое осуществляется с помощью свободных радикалов кислорода, генерируемых ионизирующей радиацией.

Результаты нашего исследования показывают, что в крови γ-облученных (в дозах 6 Gr) крыс 1 и 24 часа спустя после облучения резко возрастает содержание супероксид радикалов (O<sub>2</sub><sup>·-</sup>) и липопероксидов (LOO<sup>·</sup>), что проявляется усилением их спин-меченых ЭПР сигналов, и что свидетельствует об интенсификации процессов свободнорадикального окисления (диграмма 1). Соответственно, меняется активность антиоксидантной системы крови. Активность каталазы уменьшается на 71% через 1 час после облучения, и – на 96% - через 24 часа после облучения; активность супероксиддисмутазы и глутатионредуктазы повышается

и к 24-му часу наблюдения составляет 166% и 160% соответственно (диграмма 2). Резко возрастает уровень окисленного церулоплазмينا и снижается содержание  $Fe^{3+}$ -трансферрина. Эти данные указывают на развитие дисбаланса между про- и антиоксидантными системами в организме при радиационном воздействии.

В ЭПР спектре крови облученных животных через 1 и 24 часа после облучения выявляется интенсивный ЭПР сигнал  $Mn^{2+}$ -содержащих комплексов, что наряду с появлением ЭПР сигнала липопероксидов ( $LOO^{\cdot}$ ) указывает на повреждение мембранных структур (диграмма 3). Развитие радиация индуцированного оксидативного стресса вызывает реорганизацию жирных кислот, что в свою очередь, приводит к изменению биофизических свойств мембран, снижение текучести липидного матрикса, увеличению жесткости липидно-белковой мембранной поверхности (Benderitter M., et al., 2002).. Пострадиационные деструктивные процессы развиваются как в гидрофобных так и в гидрофильных слоях мембраны (Shadyro O.I., et al., 2000).

После воздействия радиационным облучением в крови крыс нами обнаружено снижение деформабельности эритроцитов и накопление метгемоглобина: через час после облучения деформабельность эритроцитов уменьшается на 28%, а содержание метгемоглобина повышается на 25%; 24 часа спустя после облучения показатель деформабельности эритроцитов снижается дополнительно на 24%, а содержание метгемоглобина в крови повышается на 135% по сравнению с контрольными показателями (диаграмма 4,5).

Следствием окислительного повреждения эритроцитных мембран облученных крыс оказывается резкое повышение уровня метгемоглобина в крови. Накопление метгемоглобина в крови на фоне резкого падения уровня  $Fe^{3+}$ -трансферрина и снижения эритропоэза является новым патогенетическим звеном развития гипоксии и интенсификации свободнорадикального окисления в организме.

Как известно, холестерин в живом организме участвует во многих физиологических процессах, в том числе, обуславливает морфофункциональные и пластические свойства клеточных мембран, обеспечивает их жесткость, избирательную проницаемость, и тем самым способствует сохранению стабильности внутриклеточной среды. Участие холестерина в регуляции проницаемости мембран осуществляется посредством изменения их текучести и мембранного потенциала (Крылов В.И. и др., 1985). Установлено, что при радиация индуцированном повреждении мембранных липидов холестерин подвергается структурным изменениям, а степень повреждения зависит от концентраций этих агентов (Mishra K.P., 2004).

Обнаруженное нами резкое увеличение содержания общего холестерина в плазме крови облученных животных (диграмма 6) является результатом интенсификации липолиза и усиленного высвобождения этого соединения из мембран. Высвобождение холестерина из мембранных структур может быть обусловлено инициацией процессов перекисидации мембранных липидов, структурными изменениями их липидно-белкового матрикса, ослаблением или разрывом связей холестерина с другими компонентами мембраны.

Уменьшение содержания холестерина в эритроцитных мембранах приводит к их жесткости и снижению их текучести, уменьшению деформабельности и резистентности кровяных клеток.

Таким образом, на основании анализа наших результатов можно заключить, что интенсификация процессов свободнорадикального окисления в организме, характерная для радиационного поражения, вызывает активацию липолиза и функциональные и структурные изменения эритроцитов, проявляющиеся снижением их деформабельности и накоплением метгемоглобина.

Печень –полифункциональный орган; она регулирует ключевые звенья метаболизма в организме. Нарушение метаболизма гепатоцитов приводит к расстройству липидного

обмена, синтеза белков, детоксикационных и других процессов. Кроме того, гепатоциты в больших количествах содержат железо, поэтому их повреждение создает опасность интенсификации свободнорадикального окисления в организме, инициированного ионами железа.

В отличие от других тканей печень является радиорезистентным органом. Он не характеризуется особенно выраженной чувствительностью к радиационному облучению. Результаты нашего исследования показывают, что через 1 час после радиационного облучения в печеночной ткани имеет место умеренная интенсификация перекисидации липидов, что свидетельствуется появлением неинтенсивных ЭПР сигналов липопероксидов и (LOO<sup>•</sup>) и Mn<sup>2+</sup> ионов в ЭПР спектре печени.; происходит интенсификация цитохром Р-450 зависимых детоксикационных процессов, что приводит к ослаблению ЭПР сигнала ферритохорма Р-450 (диаграмма 7). Известно, что радиация вызывает деструкцию микросомного цитохрома Р-450 и конверсию последнего в инактивированный цитохром Р-420, интенсификацию перекисидации липидов, окисление мембранных SH-групп (Zavidnik L.V., 2003). 24 часа спустя после облучения в ЭПР спектре печени увеличивается интенсивность ЭПР сигналов (LOO<sup>•</sup>) и Mn<sup>2+</sup> ионов, имеется нарушение электронного транспорта в митохондриальной электронно-транспортной цепи на участке NADH:убихинон-оксидоредуктазы (что проявляется накоплением убисемихинонов и повышением восстановленной NADH-дегидрогеназы). Таким образом, исходя из анализа полученных результатов, первичное повреждение гепатоцитов является следствием развития пострадиационного оксидативного стресса, вызывающего инициацию цепных реакций липидной перекисидации и повреждение мембран гепатоцитов. В результате интенсификации цепных реакций, инициированных липопероксидами, возрастает степень повреждения гепатоцитов. 24 часа спустя после облучения налицо нарушение работы митохондриальной и микросомной электронно-транспортных цепей. Следует отметить, что образованный комплекс NADH:убихинон-оксидоредуктазы является мощным генератором супероксид радикалов. Радиация индуцированная модификация мембранных белков, обусловленная окислительным стрессом, зависит от концентрации ионов переменных металлов (Khalil A.V., Fulop T., 2001). Концентрация последних определяет радиопротекторные свойства хелаторов атомов металлов переменной валентности (Gueiman L.R., et al., 2004, Badzhinian S.A., et al., 2004). Ионы железа, высвобожденные из железных депо в межклеточное пространство в результате повреждения гепатоцитов, представляют собой дополнительный источник для интенсификации свободнорадикального окисления.

Таким образом, в патогенезе радиационного поражения организма значительная роль отводится свободным радикалам кислорода. Пострадиационная ответная реакция клеток проявляется изменениями активности антиоксидантной защитной системы, что подтверждается многочисленными литературными данными (Biaglow J.E., et al., 2003, Guo G., et al., 2003, Ustinova A.a., Riabinin V.E., 2003). При радиационном воздействии повреждение мембранных структур, обусловленное избытком свободных радикалов кислорода, приводит к нарушению клеточного метаболизма, к расстройству гомеостаза и развитию оксидативного стресса. Радиоиндуцированные свободнорадикальные цепные процессы играют важную роль в прогрессировании  $\gamma$ -индуцированного повреждения гепатоцитов.

В патогенезе радиационного повреждения особое значение имеет оксид азота (Lestaevel P. et al., 2003). Было показано, что во время радиационного воздействия NO может проявлять как радиозащитное, так и радиотоксическое действие, что обусловлено высокой реактивностью этой молекулы. Характер действия NO зависит от редокс-статуса организма.

Результаты нашего исследования показывают, что через 1 час после облучения уровень свободного оксида азота в крови и печени резко снижается (диаграмма 8), что может быть обусловлено его трансформацией в пероксинитрит вследствие интенсивного взаимодействия

с супероксид радикалом. В дальнейшем, 24 часа спустя после облучения, окись азота в крови начинает увеличиваться, что может быть вызвано усилением экспрессии NO синтазы в условиях окислительного стресса. В литературе существуют данные о значительном увеличении активности iNOS и содержания нитритов/нитратов через 24 часа после облучения (Lestaevel P. et al., 2003); Следовательно, радиация способна воздействовать на NO-ергическую систему. При этом в ЭПР спектре печени появляются интенсивные ЭПР сигналы нитрозильных комплексов гемового и негемового железа (диграмма 7), что является следствием усиленной продукции окиси азота.

Окись азота – значительнейшая биологическая молекула, участвующая в регуляции многочисленных биологических процессов, включая иммунный ответ, цитотоксичность, нейротрансмиссию и вазодилатацию (Aloni-Grinstein R. et al., 1995). На основе применения селективных ингибиторов NOS показано, что повышение содержания радиоиндуцированного NO осуществляется за счет индуцибельной NO синтазы. Установлено, что в основе радиация индуцированного повышения синтеза NO лежит активация редокс-чувствительного NF-kappaB и усиление экспрессии iNOS. При радиационном повреждении NO выполняет двойную роль – радиозащитную и радиотоксическую. Радиозащитная роль NO определяется антиоксидантными свойствами этой молекулы (Gisone P., et al., 2003). Было показано, что введение донора NO уменьшает хромосомные aberrации в HeLa клетках (Zhong G.Z., et al., 2004). Вместе с тем, в основе радиационного повреждения лежит биологическая деградация NO в цитотоксический пероксинитрит в условиях радиация-индуцированного окислительного стресса (Soloviov A. I., 2003). Продемонстрирован также радиозащитный эффект ингибитора iNOS, L-NAME, объяснимый, вероятно, тем что iNOS ограничивает экспрессию реактивного кислорода (Giliano N.I., et al., 2004). Установлено, что ингибиторы NO предупреждают радиация индуцированный апоптоз. Их превентивное действие основывается на ингибировании нисходящих каспаз, уменьшении степени митохондриального поражения и подавление активации p-53 (Chen Y., et al., 2001). Среди биологических реакций, протекающих с участием NO, следует отметить повреждение ДНК (Christersson L.A., et al., 1987, Comayras C.S., et al., 1997, Cortes0Bratti X., et al., 2001). Высокие концентрации NO вызывают дезаминирование дезоксирибонуклеотидов (Christersson L.A., et al., 1987) и развитие мутаций (Dulie V., et al., 1994). NO индуцированное повреждение ДНК происходит посредством различных механизмов, в том числе: нитрозильного дезаминирования (Wink D.A., et al., 1991), разрыва цепей ДНК (Gorsdorf S., Appel K.E., Engelholm C., Obe G. Carcinogenesis., 1990, 11, 37-41) и окислительного повреждения, индуцированного пероксинитритом (Beckman J.S., et al., 1994). При этом, поли(ADP-рибоза) полимераза (PARP), активированная в ответ на радиационное повреждение ДНК, представляет собой дополнительный источник для интенсификации оксидативного стресса (Ibuki Y., et al., 2003, Conde C., et al., 2001). NO участвует также в развитии апоптоза опухолевых клеток, индуцированного цитокинами и активированными макрофагами (Dyson N.P., et al., 1989).

Как правило, повреждение ДНК и разрыв ее цепей, инициированные УФ-, ионизирующим облучением и некоторыми экзогенными мутациями, осуществляется с участием белка p53 (Hartwell L.H., et al., 1989). Активация белка p53 регулируется на посттрансляционном уровне. В результате стрессорного воздействия происходит стабилизация белка p53 и накопление последнего в ядре, где этот белок, связываясь со специфическими отрезками ДНК модулирует транскрипцию ряда p53 –регулируемых генов (p21/Waf-1, 14-3-3-σ, bax, и т.д.). p53 белок активирует, увеличивает регулируемые гены, например, p21WAF-1/Cip1, GADD45, циклин G, что приводит к аресту клеточного цикла в фазе G<sub>1</sub> (Forrester K., et al., 1996, Kastan M.B., et al., 1994), к транскрипции генов, участвующих в апоптозе, напр bax. Кроме того, p53 может взаимодействовать с репарационной системой ДНК, осуществлять репарацию поврежденной ДНК или

регулировать апоптоз клеток (Clarke A.R., 1993, Lane D.P., 1992). Индуцибельная изоформа NO (iNOS) производит высокие концентрации NO под воздействием оксидативного стресса и провоспалительных цитокинов, потенциально обеспечивает цитотоксичность, повреждение ДНК и деструкцию тканей. Показано, что NO может инициировать экспрессию p53 и развитие апоптоза, что свидетельствует о том, что NO индуцированный апоптоз протекает путем повреждения ДНК и аккумуляции p53 (Mesmer U.K., et al., 1994). Повышение проапоптозной транскрипционной активности p53 осуществляется посредством NO-индуцированного фосфорилирования серина 15 NH<sub>2</sub>Терминала, что в свою очередь, происходит путем стимуляции ДНК-зависимой протеинкиназы и p38 митоген-активированной протеинкиназы (Abraham J, et al., 1999; Brooks CL, Gu W., 2003, Schneiderhan N, et al., 2003, Unger T, et al., 1999). Forrester K. и сотрудники продемонстрировали, что p53 исполняет важную роль в экспрессии гена iNOS, и следственно, в регуляции потенциально мутагенной и канцерогенной активности NO. p53 имеет большое значение в процессе сохранения генома.

Реактивным формам кислорода придается также большое значение в инициации p53 – зависимого апоптоза (Li P.-F., et al., 1999).

В печени  $\gamma$ -облученных крыс 24 часа спустя после облучения в обследуемых участках паренхимы на фоне экстра- и внутриклеточного отека встречаются гепатоциты, находящиеся на разных стадиях дистрофии. В некоторых из них, особенно расположенных вокруг центральной вены, обнаружены некробиотические изменения, в том числе - некроз.

Гепатоциты представляют стабильную популяцию клеток со сравнительно низкой пролиферативной активностью. По этой причине при воздействии  $\gamma$ -облучением p53-зависимый апоптоз в печеночной ткани, в отличие от радиочувствительных органов, не носит массового характера. Хотя белок p53 экспрессируется в ядрах определенного количества гепатоцитов, клеток мезенгиального происхождения, макрофагов. В стенке центральной вены печени облученных крыс, в частности в интима, выявлена слабая экспрессия белка p53; в макрофагах (клетках Купфера) экспрессия проапоптозного белка p53 усилена. Клетки увеличены в размерах, всюду отмечается экспрессия p53 белка. Следует отметить, что частота экспрессии p53 возрастала от централобулярной доли печени к препортальной зоне. В некоторых гепатоцитах выявлены апоптозные тельца, свидетельствующие о фрагментации клеточного ядра. В очагах некроза и гомогенизации гепатоцитов экспрессия проапоптозного белка p53 оказывалась негативной.

Таким образом, исходя из результатов нашего исследования, интенсификация оксидативного стресса и синтеза окси азота в гепатоцитах облученных крыс приводит к усиленной экспрессии p53 белка, интенсификации апоптоза и некроза в печеночной ткани. На основе литературных данных и анализа результатов нашего исследования можно заключить, что:

1. в патогенезе радиационного повреждения оксидативному стрессу отводится важная роль;
2. высокая чувствительность митохондрий к радиация индуцированному оксидативному стрессу определяет важную роль этих органелл в механизме развития радиация индуцированного апоптоза;
3. проявление цитозащитных и цитотоксических свойств NO при радиационном повреждении зависит от интенсивности оксидативного стресса и от потенциала антиоксидантной защиты организма.

Исходя из вышесказанного, при радиационном повреждении тканей с целью подавления апоптоза целесообразным представляется применение антиоксидантных препаратов, оказывающих NO-модулирующее действие. Мы изучили превентивные и пострadiационные защитные эффекты общепринятого радиопротектора, витамина С и плаферона ЛБ.

Результаты нашего исследования показывают, что витамин С, благодаря своему антиоксидантному действию, способствует восстановлению активности каталазы, глутатион редуктазы и церулоплазмينا; тем не менее, на фоне высокого содержания супероксида и липопероксидов в крови он не обеспечивает нормализации активности СОД и содержания  $Fe^{3+}$ -трансферрина. Как предварительное так и пострадиационное применение плаферона ЛБ приводило к стабилизации активности каталазы, СОД, глутатион редуктазы и к повышению уровня  $Fe^{3+}$ -трансферрина в крови облученных животных. Стимулирующее действие плаферона ЛБ на содержание  $Fe^{3+}$ -трансферрина было обнаружено и в ранних исследованиях, при липотрипсии почек и вирусном гепатите В (PavliaSvili D., et al., 2000, Chavchanidze D., et al., 1998). Известно, что экспрессия трансферрина регулируется посредством взаимодействия HIF-1 $\alpha$  (hipoxia inducible factor) - индуцированного IRP (airon responsive protein) и IRE (iron responsive element), обеспечивающего активацию экспрессии гена трансферрина. Этот процесс индуцируется с помощью NO-зависимого механизма. Установлено, что в условиях оксидативного стресса в результате редокс-зависимой трансформации NO в пероксинитрит происходит нитрозилирование цитозольной аконитазы, которая превращается в IRP. IRP редокс-зависимо связывается с mRNA IRE трансферрина (в условиях гипоксии) и ферритина (при оксидативном стрессе), и обеспечивает регуляцию интенсивности супрессии-экспрессии синтеза этих белков (Турпаев А., 2000). Отсюда становится ясным, что стимулирующее действие плаферона ЛБ на  $Fe^{3+}$ -трансферрин обусловлено регуляцией этим препаратом окислительного гомеостаза организма и активности NO. Причиной сравнительно высокой эффективности превентивного применения плаферона ЛБ, возможно, является сравнительно длительное применение препарата (5 дней).

При радиационном повреждении в условиях пре- и пострадиационного применения витамина С и плаферона ЛБ содержание свободных радикалов кислорода и липидов, и окиси азота уменьшается по сравнению с соответствующими показателями контрольной группы. Соответственно, снижается степень окислительного повреждения эритроцитов, что проявляется уменьшением структурных разрушений биомембранных липидных матриц, индуцированных свободными радикалами и повышением деформабельности эритроцитов до уровня контрольных показателей. Сохранение деформабельности эритроцитов способствует нормализации реологических свойств крови. Следует отметить, что хотя мощный антиоксидант жидких сред, витамин С, увеличивает степень деформабельности эритроцитов, тем не менее, не обеспечивает антигемолитическую защиту эритроцитов, что подтверждается высоким уровнем метгемоглобина. Под воздействием плаферона ЛБ снижается степень гемолиза эритроцитов, что является следствием стабилизации клеточных мембран под действием данного препарата.

Следует отметить, что несмотря на положительный эффект применяемых радиопротекторов на деформабельность эритроцитов, содержание холестерина и триглицеридов в крови остается высоким. Эти данные дают возможность предположить, что в наших экспериментах основной причиной повышения холестерина служит не повреждение эритроцитных мембран, а общее нарушение липидного обмена в организме, что обусловлено расстройством энергетического метаболизма и интенсификацией липолиза в условиях радиация индуцированного окислительного стресса.

При превентивном воздействии витамином С и плафероном ЛБ уровень свободного NO в крови облученных животных поднимается до контрольного показателя. Пострадиационное введение витамина С оказалось неэффективным; на фоне пострадиационного воздействия плаферона ЛБ содержание свободного NO статистически достоверно возрастает. По нашему предположению, механизм такого действия плаферона ЛБ заключается не в превенции редокс-зависимой трансформации NO в пероксинитрит (что имеет место в случае витамина С) а в модулирующем воздействии данного препарата на синтез NO, возможно, на уровне регуляции ядерных факторов и генов, что подтверждается многочисленными

исследованиями, проведенными на этом препарате (Gongadze M. et al., 2001, Нозадзе Л., и др., 2005, Насрашвили М. И др., 2005).

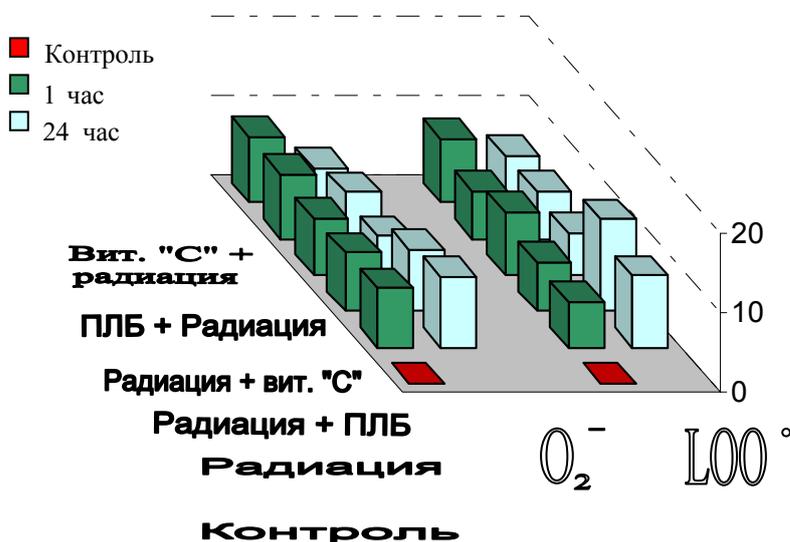
В условиях предварительного и пострadiационного применения плаферона ЛБ в печеночной ткани происходит восстановление работы митохондриальной электронно-транспортной цепи, коррекция метаболизма оксида азота и сохранение его содержания на уровне контрольных показаний. Это должно быть обусловлено, в первую очередь, антиоксидантными, мембраностабилизирующими свойствами препарата (Бахуташвили З. В., и др., 2004, Мегреладзе И.И., и др., 2004, Джавахишвили Н., и др., 2001, Саралидзе М.А., и др., 2005). Через час после облучения посредством коррекции окислительного метаболизма плаферон ЛБ уменьшает интенсивность пострadiационной продукции свободных радикалов кислорода и предотвращает трансформацию окиси азота в пероксинитрит. 24 часа спустя после облучения плаферон ЛБ ограничивает усиленную экспрессию iNOS, индуцированную пострadiационным окислительным стрессом и другими факторами, и способствует ее снижению в печеночной ткани (Мегреладзе И.И., и др., 2004, Джавахишвили Н., и др., 2001, Gongadze M., et al., 2002). Этому факту придается большое значение ввиду важной роли NO при повышении радиочувствительности тканей. Как известно, проапоптозная транскрипционная активация p-53 белка обусловлена активацией NO-индуцированной ДНК-зависимой протеинкиназы и p38 митоген-активированной протеинкиназы и фосфорилированием серина 15 NH<sub>2</sub> терминала (Abraham J, et al., Brooks CL, Gu W., 2003, Schneiderhan N, et al., 2003, Unger T, et al., 1999).

При применении витамина С в экспериментах обнаружено отчетливо выраженная экспрессия p53 белка в макрофагах и клетках сосудистых стенок, эндотелиоцитах. В эндотелиоцитах с экспрессированным p53 белком отмечается выраженное сморщивание ядер. В макрофагах интенсивность включения p53 белка меньше. Таким образом, при применении витамина С в качестве радиопротектора супрессия белка p53 не проявляется.

В случае применения плаферона ЛБ в качестве радиопротектора выявлено гораздо меньшее количество клеток, находящихся в стадии апоптоза, чем в случае витамина С; общая картина долей печени не изменена, сохранена костноподобное строение долей, характерное для ориентации гепатоцитов. На фоне воздействия плафероном ЛБ значительно снижается экспрессия маркера апоптоза, белка p53. Нормализация структуры долей печени, резкое уменьшение очагов некроза и гомогенизации, и снижение экспрессии проапоптозного белка p53 свидетельствует о защитном эффекте плаферона ЛБ при  $\gamma$ - радиационном повреждении.

Диаграмма № 1

Изменения интенсивности ЭПР сигналов O<sub>2</sub><sup>-</sup> и LOO<sup>•</sup> в крови крыс



**Радиационно-индуцированные изменения активности антиоксидантных ферментов (Каталаза, Сод и Гр) в крови крыс при помощи витамина «С» и Плаферона ЛБ**

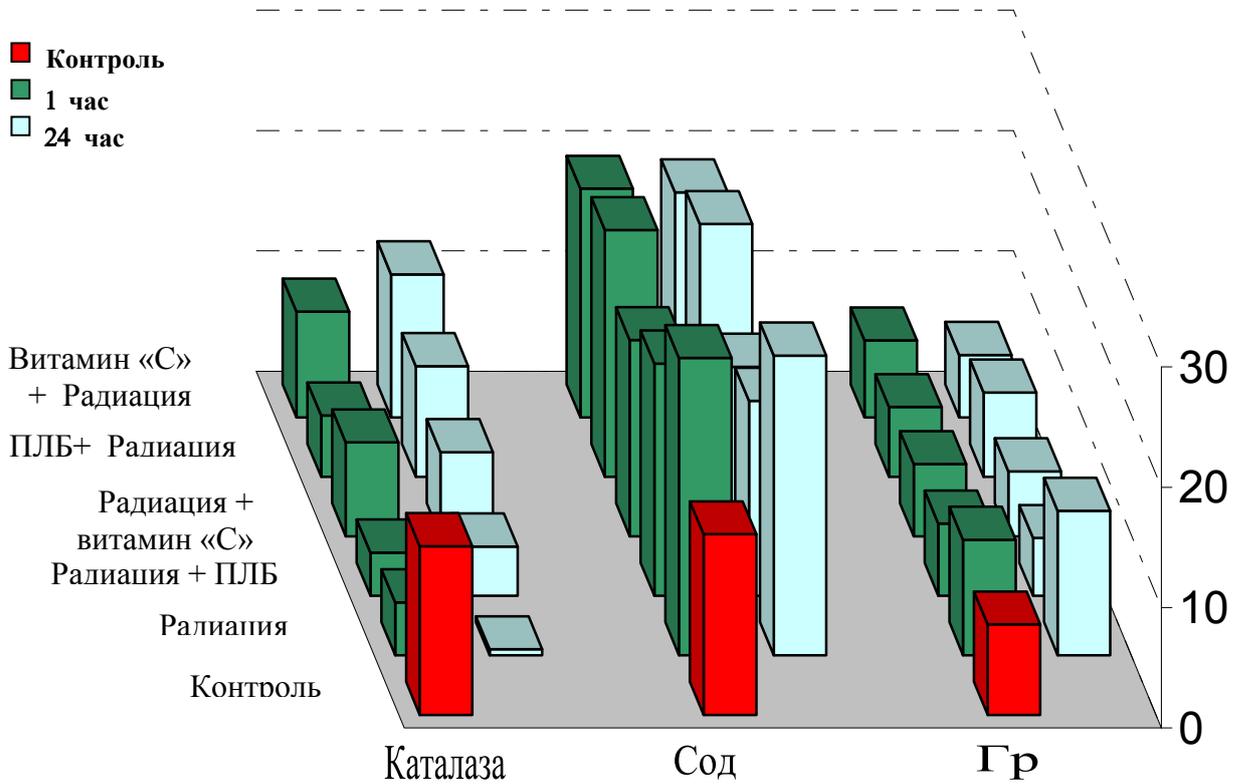


Диаграмма №3

**Изменения интенсивности ЭПР сигналов выражающих активность про- и антиоксидантной системы в крови крыс при радиационной воздействию**

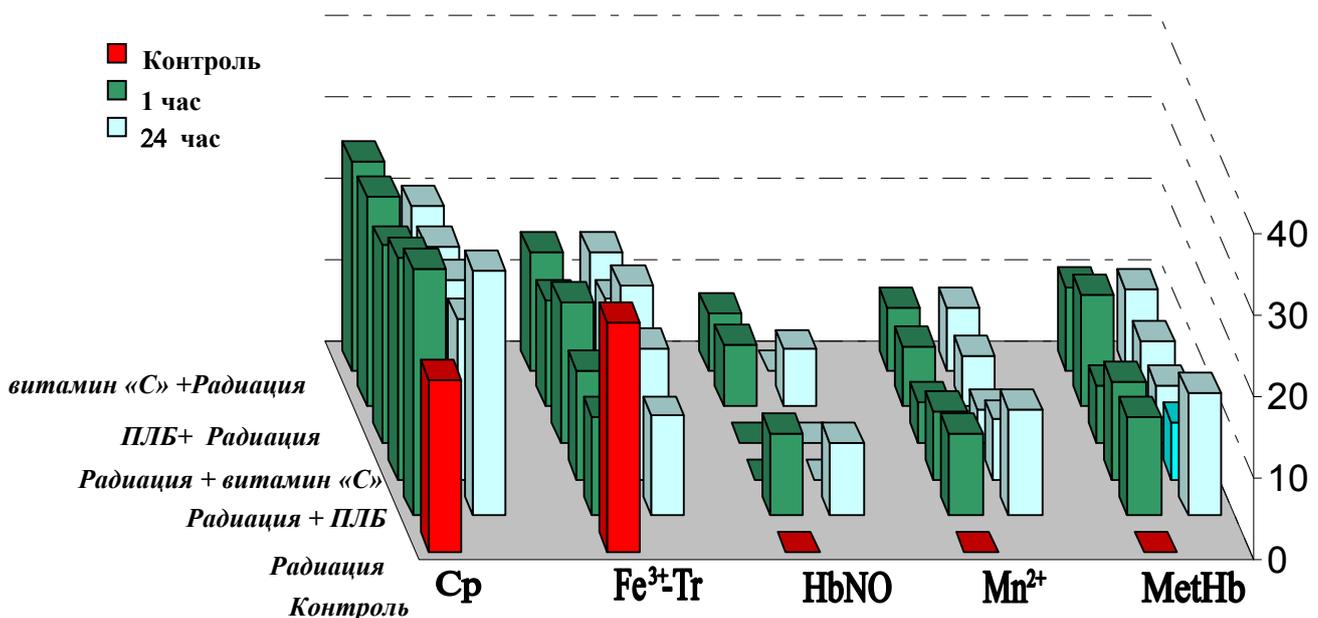


Диаграмма №4

Изменения деформабельности эритроцитов при воздействии  $\gamma$  – лучей, Плаферона ЛБ и витамина «С»

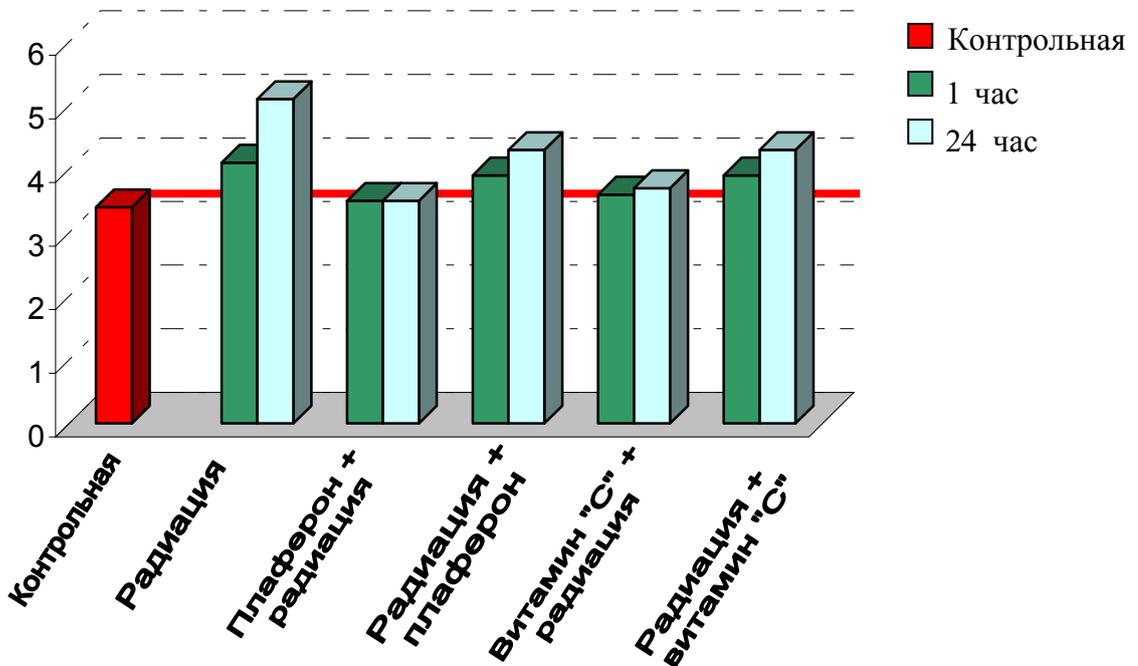


Диаграмма №5

Изменения содержимости метгемоглобина при воздействии  $\gamma$  – лучей, Плаферона ЛБ и витамина «С»

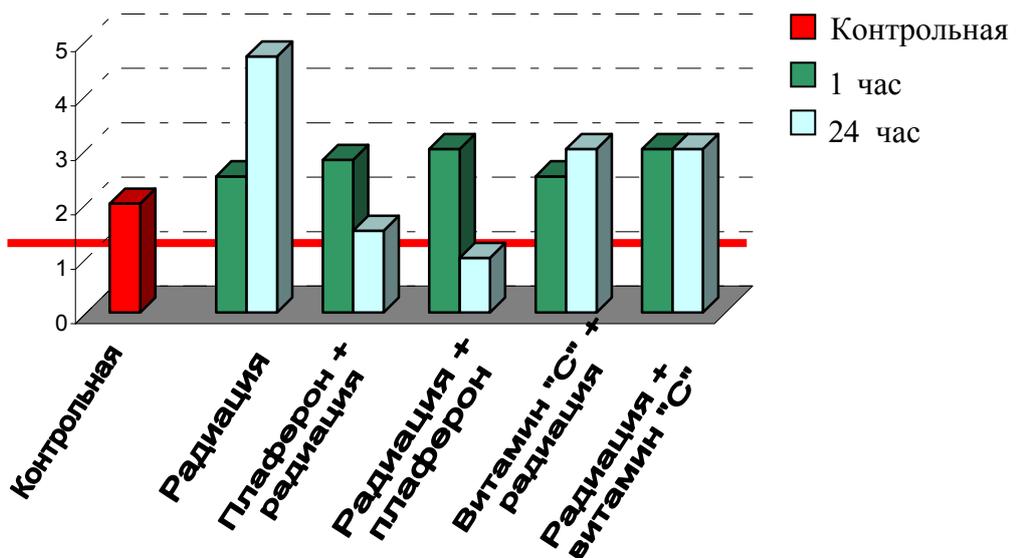
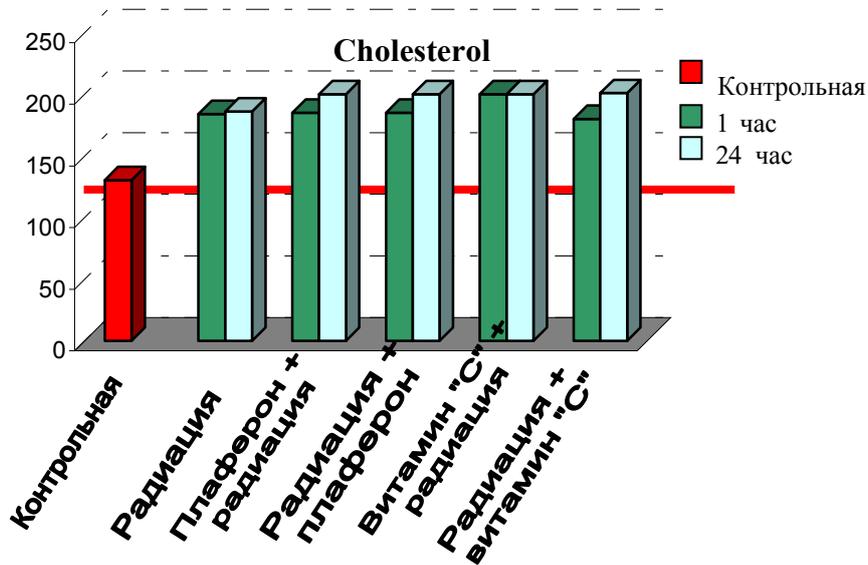
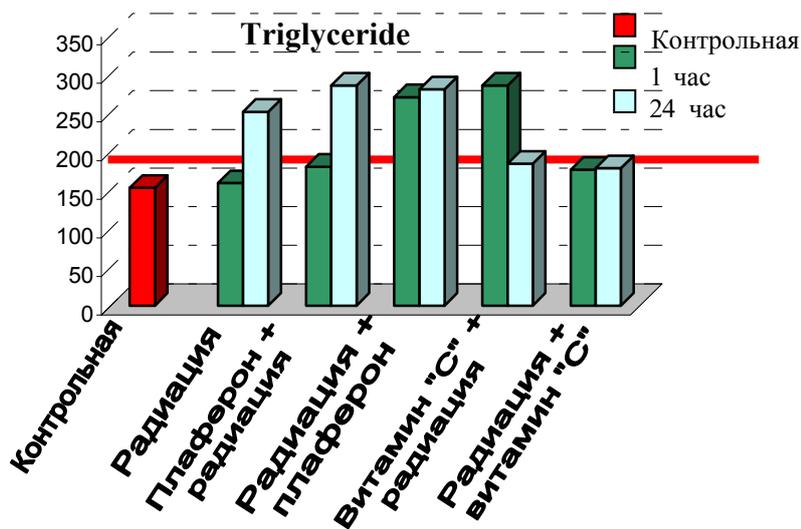


Диаграмма №6 (а, б).

Показатели липидного обмена при воздействии  $\gamma$  – лучей,  
Плаферона ЛБ и витамина «С»



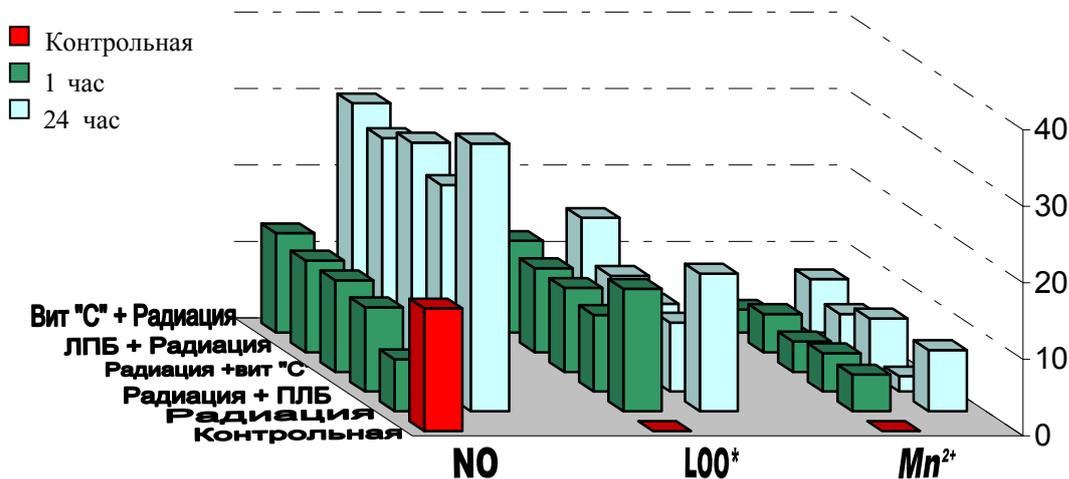
а)



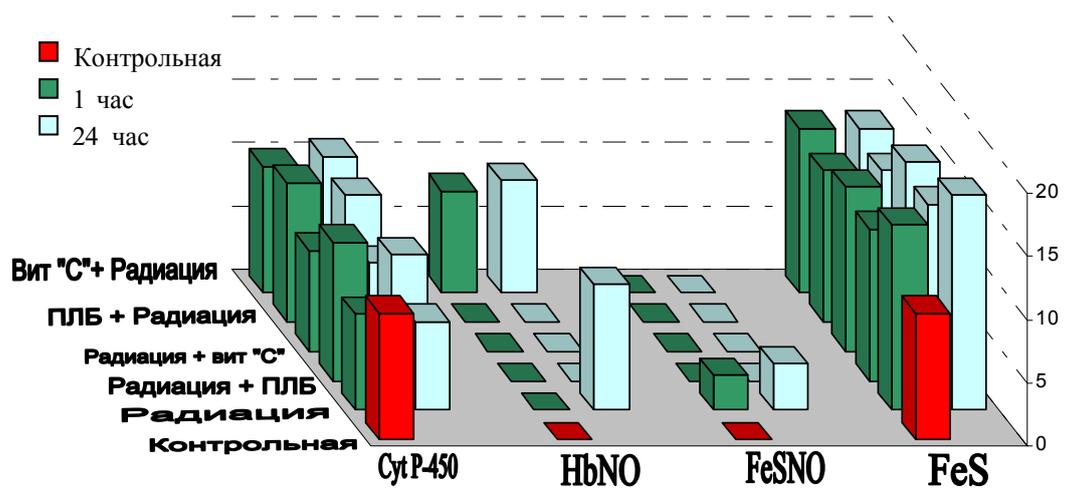
б)

Диаграмма №7

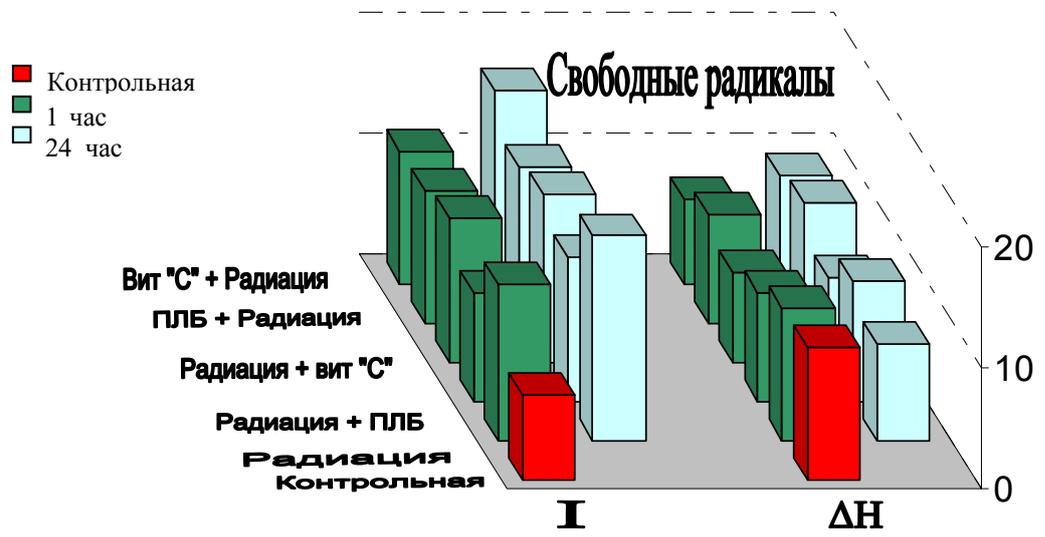
Изменения парамагнитных центров в печени крыс  
при радиационного облучения, лечебного и превентивного воздействия  
Плаферона Лб и витамина «С»



а)

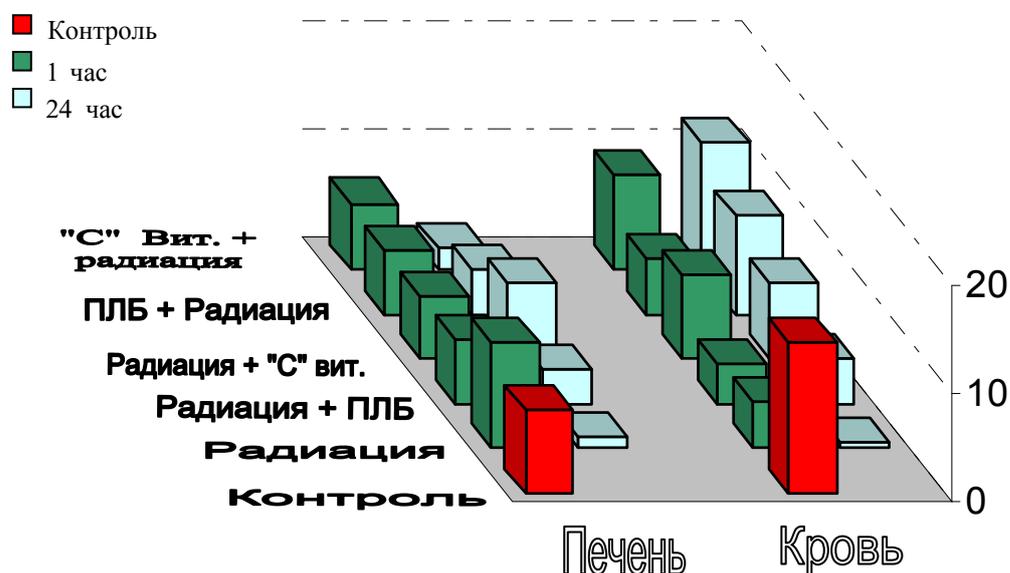


б)



в)

Изменения NO в крови и печени крыс



Таким образом, результаты нашего исследования показывают, что при  $\gamma$ -индуцированном повреждении интенсификация оксиген-нитрогенного стресса приводит к развитию p53-зависимого апоптоза в печеночной ткани. Плаферон ЛБ способствует подавлению радиация индуцированной гиперпродукции окиси азота, восстановлению редокс-гомеостаза организма, предотвращает активацию NO-индуцированного p53 белка и развитие NO-зависимого p53-индуцированного апоптоза.

**ВЫВОДЫ:**

1. В основе механизма радиационного повреждения лежат избыточное образование свободных радикалов кислорода и изменения активности системы антиоксидантной защиты.
2. Под воздействием  $\gamma$ -радиационного облучения в эритроцитарных мембранах крыс происходит инициация процессов пероксидации липидов, высвобождение холестерина, что проявляется жесткостью и снижением текучести мембранных структур, уменьшением деформабельности и резистентности кровяных клеток, и накоплением метгемоглобина.
3. Первичное (час спустя после облучения)  $\gamma$ -радиационное повреждение гепатоцитов является следствием развития пострadiационного оксидативного стресса, проявляющегося инициацией цепных реакций липидной пероксидации, повреждением мембран гепатоцитов, накоплением липидных пероксидов (LOO $\cdot$ ) и Mn $^{2+}$  ионов, интенсификацией цитохром P-450 - зависимых процессов детоксикации.
4. На втором этапе  $\gamma$ -радиационного повреждения гепатоцитов (24 часа спустя после облучения) имеется интенсификация цепных реакций липопероксидации, усугубление повреждения гепатоцитов, нарушение работы митохондриальной

электронно-транспортной цепи на участке NADH:убихинон-оксидоредуктазы, высвобождение ионов железа, усиленный синтез NO, и развитие p53-зависимого апоптоза, индуцированного оксиген-нитрогенным стрессом.

5. При пре и пострадиационном воздействии плаферон ЛБ обеспечивает восстановление редокс-гомеостаза организма и нормализацию метаболизма NO.
6. Плаферон ЛБ предотвращает NO-индуцированную активацию белка p53 и развитие NO-зависимого p53-индуцированного апоптоза.

### **ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ**

1. Учитывая глубину нарушения прооксидантных процессов антиоксидантной системы и свободнорадикального повреждения клеточных мембран рекомендуем использование антиоксидантной терапии при радиотерапии и радиоиндуцированном повреждении организма.
2. Выявленная в результате проведенных исследований эффективность радиопротекторного действия Плаферона ЛБ позволяет рекомендовать использование этого препарата при радиотерапии в качестве радиопротектора.

### **СПИСОК НАУЧНЫХ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**

1. Плаферон ЛБ как протектор радиационно-индуцированного изменения показателей липидного обмена и степени деформабельности эритроцитов крыс. Georgian Medical News №2 (119). Февраль, 2005, с. 61-64 (соавт. М.В.Касрашвили, Н.Г.Тхилава, А.Т.Павлиашвили, В.И.Бахуташвили).
2. Эффективность Плаферона ЛБ при  $\gamma$ -радиотерапии. Georgian Medical News №7-8 (124-125). Июль-Август, 2005, с. 75-79 (соавт. М.Б.Папава, И.Т.Датунашвили, Т.В.Саникидзе, В.И.Бахуташвили).
3. Плаферон ЛБ как протектор радио-индуцированного повреждения. Georgian Medical News №12 (129). Декабрь, 2005, с. 110-113 (соавт. И.В.Датунашвили, М.Г.Мачавариани, М.Г. Энукидзе, А.Т.Павлиашвили).