

А.В. Кубашко¹, Л.М. Овсяннікова¹,
А.А. Чумак¹, О.В. Носач¹,
С.М. Альохіна¹, О.С. Ільчук²

АНТИОКСИДАНТНІ ЕНЗИМИ В МЕХАНІЗМАХ РАДІОІНДУКОВАНОГО ОКИСНОГО СТРЕСУ (ранній та віддалений періоди після опромінення)

¹ ДУ "Науковий центр радіаційної медицини
АМН України", м. Київ

² Національний інститут хірургії
та трансплантології імені О.О. Шалімова
АМН України, м. Київ

Збалансованість процесів окислення/відновлення в клітині є одним з ключових в системах енергозабезпечення її життєдіяльності. Вони складають єдину систему підтримки динамічної рівноваги про-/антиоксидантних систем — окисного гомеостазу, стабільність якого забезпечується перш за все адекватною дією ферментних і неферментних антиоксидантних факторів. Іонізуюче випромінення (ІВ) поряд з багатьма екзо- та ендогенними стресовими факторами (хімічне забруднення, гіпер- і гіпоксія, токсичні речовини, запальні реакції) призводить до активації процесів вільнорадикального окислення (ВРО) та накопичення стійких цитотоксичних продуктів на всіх рівнях клітинної організації, які утворюються майже з усіх класів біомолекул. Накопичення окислених форм стимулює антиоксидантну систему (АОС) щодо відповідного реагування перш за все за рахунок компенсаторного збільшення рівня різноманітних антиоксидантів. Насамперед це низькомолекулярні сполуки — пастки радикалів, до яких відносяться вітаміни (А, С, Е, Д та К), біофлавоноїди, низькомолекулярні тіоли — глутатіон відновлений (GSH) та ерготіонеїн, металопротеїни — церулоплазмін, трансферин, феритин, лактоферин, та ін., а також антиоксидантні (АО) ензими — НАД(Ф)Н оксидаза, ендотеліальна NO-синтаза, ксантин оксидаза, мієлопероксидаза (МПО), супероксиддисмутази (СОД), каталази (КАТ), глутатіонпероксидази (ГПО), глутатіонтрансферази (ГТ) та редуктази (ГР), тіоредоксин редуктаза (ТР) та ін. [4, 8].

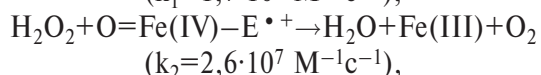
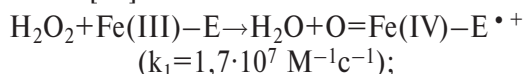
Дія ІВ реалізується насамперед у надлишковому утворенні високотоксичних сполук радикальної природи — вільних радикалів (ВР), кисеньвмісних хімічно активних молекул, до

яких відносяться реактивні форми кисню (РФК) та окислювачі, обумовлюючи тим самим розвиток окисного стресу (ОС) [69]. Їх гіперпродукція спонукає АОС до мобілізації систем контролю та захисту від пошкоджуючої дії цих продуктів. Незважаючи на те, що будь-який стрес-агент викликає однотипну відповідь АОС, специфічність радіаційного впливу полягає у інтенсивності та ступені ефективності дії компенсаторних механізмів, перш за все ензиматичних. Останні є одними з найважливіших у здійсненні АО-контролю в клітині. Їм притаманна висока специфічність, певна органна та клітинна локалізація, а також використання як каталізatori транзитних металів (Cu, Fe, Mn, Zn, Se, Co та ін.), від постачання яких суттєво залежить мобілізація ензиматичної АО відповіді [18].

СОД є представником найбільш важливого рівня клітинного захисту. Дія цього ензиму спрямована на інактивацію ВР у місті їх виникнення, не допускаючи їх подальшої дифузії у клітинному середовищі. Наявність певного транзитного металу в активному сайті визначає різновид та його властивості. Так, Zn^{2+} виконує стабілізуючу функцію, а Cu^{2+} — каталітичну в активному сайті Cu/ZnСОД, Mn^{3+} в активному сайті MnСОД запобігає дезорганізації енергетичних процесів, та робить її більш стійкою до окислювальної дії H_2O_2 на відміну від Zn/CuСОД. Каталіз СОД не потребує участі кофакторів, що визначає незалежність цього ензиму від функціонування інших клітинних структур [70]. O_2^{\bullet} є специфічним субстратом СОД. Взаємодія СОД з цим радикалом залежить від його концентрації, яка визначає напівперіод його існування. Так, у низькій концентрації (0,1 нМ) напівперіод існування O_2^{\bullet} становить 0,05 сек, а при концентрації 0,1 мМ — він сягає 14 годин [27]. NO конкурує з СОД за реакцію з O_2^{\bullet} , яка проходить дещо повільніше ($6,7 \cdot 10^9 M^{-1} \text{сек}^{-1}$). Це відбувається при умовах, коли СОД має недостатню активність, або в разі її відсутності, тоді у надмірній кількості формує з O_2^{\bullet} пероксинітрит [43].

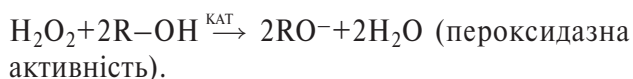
Поряд з СОД в клітині діє КАТ, створюючи єдину координовану ензиматичну пару в механізмах АО-захисту. H_2O_2 , який утворюється після дисмутації O_2^{\bullet} СОД, є субстратом КАТ та Se-ГПО, між якими здійснюється певний розподіл та координація функцій. Se-ГПО має більшу афінність щодо H_2O_2 при його низьких концентраціях ($K_m=1 \text{ мкМ}$), ніж КАТ [44], але вона здатна конвертувати лише 8 % від загального об'єму H_2O_2 в клітині [37], що доказує провідну

роль КАТ у руйнації H_2O_2 , яка відбувається у два етапи [38]:



де: $\text{Fe}-\text{E}$ — гемогрупа поєднана з ензимом в активному центрі, а $\text{Fe(IV)}-\text{E} \cdot^+$ — мезомерна форма $\text{Fe(V)}-\text{E}$ з недоокисленим до п'ятивалентного залізом.

Каталітична потужність КАТ, яка забезпечує швидкість каталізу до 44 тис. молекул H_2O_2 /секунду не потребує енергії активації та суттєво залежить від відновлюючого потенціалу *redox*-пари $\text{Fe}_{3+}/\text{Fe}^{2+}$ та стабільності гемвісних проміжних комплексів [59]. В залежності від концентрації H_2O_2 КАТ може виконувати й пероксидазну функцію, слугуючи донором електрону для низькомолекулярних формальдегідів, мурав'їної кислоти, фенолів, спиртів, повна утилізація яких у цьому випадку не відбувається.



Пероксидазна активність КАТ є істотно нижчою [67] та залежить від температури й рН середовища [34].

В клітинах людини знайдено вісім ізоензимів Se-ГПО, які мають різну субстратну специфічність. Так, Se-ГПО-1, кількість якої є найбільшою домінує, у H_2O_2 метаболізмі, в той час як Se-ГПО-4 руйнує ROOH , а в разі детоксикації LOOH , перешкоджає 12/15-ліпоксигеназною індукованому апоптозу та регулює запалювальну реакцію [32].

Каталітична активність Se-ГПО поєднана з окисленням GSH: $\text{H}_2\text{O}_2 + 2\text{GSH} \rightarrow \text{GSSG} + 2\text{H}_2\text{O}$, відновлення якого відбувається за допомогою ГР. Se-ГПО захищає від окислювальної атаки білки, ліпіди, НАД(Ф)Н, НАДФ-оксидази [63], а також ДНК та РНК [53], вибірково регулює мітохондріальні проапоптогенні білки у внутрішній клітинній мембрані та попереджує пероксидацію кардіоліпіну [45]. Se-ГПО може функціонувати і як пероксинітрид редуктаза, перешкоджаючи окисленню та нітруванню білків ONO_2^- [64]. Активність Se-ГПО залежить від рівня GSH, оскільки він виконує не тільки субстратну роль, але й приймає участь у відновленні розміщених у каталітичному центрі селенових груп та посилюється дією вітамінів С та А, які сприяють засвоєнню селену, його транспорту та утилізації [62].

ГТ активно вступає в реакції з LOOH з високою молекулярною масою, насамперед фосфоліпідів та мононуклеотидів ДНК та бере участь у метаболізмі детоксикації РФК [26].

Антиоксидантний ефект ГТ переважно здійснюється за рахунок впливу на небілкові SH- і S-групи. Складовими компонентами даної системи є GSH та ерготіонейн, основна маса яких зосереджена у еритроцитах [16], а значна частина GSH знаходиться у депонованому стані та зв'язана з різними білками, які містяться в тканинах та сироватці крові. Це дозволяє припустити, що зростання сумарного вмісту небілкових SH-/SS-фракцій в цільній крові може бути обумовлено надмірним вивільненням білкових низькомолекулярних тіолових сполук. Наприклад, в разі ОС відбувається інтенсивне окислення GSH, що призводить до зменшення значення відносної величини співвідношення GSH/GSSG, рівень якого у нормі складає приблизно 9:1. Це дозволяє в цілому оцінити функціональну активність глутатіонової системи в разі ОС [36]. Сприятим змінам рівня цього співвідношення може надмірне утворення тіолових радикалів, насамперед тійльних, $\text{ROS} \cdot$ та $\text{RSSO} \cdot$ радикалів, які формуються зокрема внаслідок дії ONO_2^- та CO_2 [29].

Se-ГПО разом з ГР та субстратом Se-ГПО GSH — складають єдину скоординовану GSH систему. В процесі нейтралізації H_2O_2 та органічних гідропероксидів, функціональна потужність GSH системи (за виключенням H_2O_2 , збільшення якого прямопропорційно активує Se-ГПО) лімітується активністю Se-ГПО ГР, швидкістю надходження НАДФ та вмістом GSH. Se-ГПО з чотирма Se-вмісними кофакторами у вигляді Se-Cys замість сірки, відновлює H_2O_2 до води, а у комплексі з GSH розчіплює, наприклад, етерифіковані ліпідні гідроперекиси до відповідних оксикислот та алкоголів по мірі вивільнення їх фосфоліпазами. [31]. Також, окрім GSH до цих реакцій може залучатися ряд таких відновлювачів як аскорбат, фероцитохром С, тіоредоксин, НАДФ і навіть іони йоду та хлору [6], що підвищує значимість цього ферменту як детоксиканта продуктів ВРО [30].

Відомо, що в момент гострого опромінення організму людини АО-потенціал крові та радіочутливих органів інтенсивно зростає за рахунок збільшення як активності клітинних АО-ензимів, так і вивільнення з внутрішньоклітинних та тканинних депо та перерозподілу жиророзчинних токоферолу, ретинолу, каротиноїдів та водорозчинних — загальних та низькомолекулярних тіолів й аскорбінової кислоти.

Трійка клітинних АО-ензимів: СОД, КАТ, Se-ГПО разом з GSH — формують одну з найбільш ефективних ланок АО-захисту від РФК внаслідок дії ІВ [71]. Так, у перші 48 годин після опромінення у високих діапазонах доз (>1 Гр) відбувається активація цілої низки протеїнів у клітинних ядрах, мітохондріях та цитозолі, які залучаються до енергетичного метаболізму та активують запалювальну реакцію на тлі значної інтенсифікації процесів ВРО. Відбувається включення факторів транскрипції, що сприяє зростанню продукції Zn/CuСОД, КАТ та Se-ГПО [40]. Проте спряженість їх роботи може зазнавати суттєвого порушення залежно від ступеня пошкоджуючої дії опромінення, демонструючи дестабілізацію та навіть повну інактивацію окремих ензимів [19, 24]. Показано, що внаслідок гострого опромінення у діапазоні високих доз та у ранній післяпроменевої період в клітинах крові відбувається різнонаправлена активація нативно скоординованих цих клітинних ензимів [9]. Наприклад, при фракційному гострому опроміненні з сумарною дозою 7 Гр у експериментальних тварин відбувається підвищення активності Zn/CuСОД, в той час як активність КАТ стрімко знижується протягом 3 діб. Це відбувається на тлі пригнічення рівня міжклітинного церулоплазміну (ЦП) та накопичення малонового діальдегіду [14]. При однократному опроміненні щурів у дозі 8 Гр у печінці та крові відбувалось суттєве пригнічення функціонування Se-ГПО, активність якої знижувалась до критично низьких значень. При збільшенні дози опромінення (8–15) Гр тварин дозозалежно збільшується активність Se-ГПО у крові на тлі підвищення вмісту GSH, проте активність Zn/CuСОД і КАТ суттєво знижується. Повна ж інактивація ензимів АОС *in vivo* відбувається лише при опроміненні організму тварин у сублетальних дозах (>15 Гр) [42].

При низькопотужному опроміненні тварин у дозі у діапазоні до 1,0 Гр спряжене функціонування ензимів також порушується. Так, найбільш суттєво змінювалась активність СОД, яка була підвищена впродовж 5 діб після дії ІВ, хоча пік її активності припадав на 2 добу. Проте впродовж цього періоду після опромінення підвищення активності КАТ супроводжувалось пригніченням Se-ГПО, що можливо пов'язано з тим, що висока концентрація H_2O_2 (10^{-1} М) та ROOH (0,05–0,3 мМ), внаслідок радіоіндукованого ВРО, здатна пригнічувати на 50 % активність Se-ГПО [66]. Подібна дискоординація у метаболічних процесах можливо також обумовлена пошко-

дженням геному ще на етапі раннього періоду після опромінення, що передбачає розвиток подальшої недостатності функціонування ензиматичної ланки АОС [20].

Проте при дії хронічного низькопотужного ІВ з сумарними дозами до 30 сГр показано лише коливання активності АО-ензимів еритроцитів крові тварин (Zn/CuСОД, КАТ та Se-ГПО) у супроводі поступового зростання пулу продуктів ліпопероксидації [12].

Для оцінки ефективності ензиматичного АО-захисту внаслідок дії ІВ запропоновані показники рівнів співвідношень активності клітинних ензимів та redox-чутливих небілкових пар. Наприклад, експериментально показано, що зниження абсолютних значень співвідношення GSH/GSSG внаслідок дії ІВ є маркером redox-статусу як тканин різних органів, так і живого організму в цілому. За його рівнем також можна оцінювати активність Se-ГПО, яка суттєво знижується переважно в мітохондріях клітин, що додатково збільшує в них метаболічно обумовлений ендогенний рівень H_2O_2 та суттєво підвищує клітинну радіочутливість в цілому [52]. В клінічних дослідженнях показано, що предиктором розвитку запалювальних реакцій в опромінених органах (6 неділь потому) є зменшення абсолютної величини співвідношення Se-ГПО/Zn/CuСОД у крові хворих на онкологічні захворювання [46].

При дії ІВ *in vitro* ключова ензиматична АО-складова клітин більш вразлива, ніж при дії такої ж самої енергії *in vivo*. Так, при опроміненні культури гепатоцитів щурів у дозах 1–2 Гр на тлі значної активації ліпопероксидації визначалось пошкодження ДНК клітин та значне зниження активності клітинних Zn/CuСОД, КАТ та Se-ГПО на тлі виснаження рівня GSH, зовнішньоклітинного ЦП та вітамінів А, Е, С [49]. Але при опроміненні трансформованих культур клітин, з надмірною експресією Zn/CuСОД, MnСОД та Se-ГПО відповідно, найбільшу радіорезистентність виявила культура тих клітин, у якій продукція MnСОД була збільшена [60]. При опроміненні трансгенних миш з гіперекспресією зовнішньоклітинної СОД у легенях опромінених тварин не спостерігалось ознак радіаційно індукованого ОС, що визначає провідну ензиматичного ланцюгу АОС у радіопротекторних механізмах внаслідок гіперпродукції радіогенних РФК [56].

Ефективність АО-системи за умов радіаційного стрес-фактору визначається не тільки рівнем спряженої відповіді комплексу АО-ензимів,

але і особливостями дозозалежної поведінки окремих її компонентів.

Так, радіопротекторні властивості Zn/CuСОД та MnСОД починають проявлятися у діапазонах доз, що перевищують 0,5 Гр, в той час як при фракціонованому опроміненні з сумарними дозами у межах (0,021–8,000) Гр протягом 485 діб активація як клітинної, так і мітохондріальної СОД не відбувається, натомість спостерігається компенсаторна активація тіосульфат–сульфуртрансферази, що є свідченням різної радіочутливості компонентів ензиматичного АО-захисту [48].

Досить різну активність демонструє КАТ в радіочутливих органах опромінених тварин, а також при опроміненні *in vivo* та *in vitro*. Показано, що суттєве пригнічення її активності відбувається безпосередньо після впливу гострого радіаційного опромінення у дозах 5–9 Гр у крові щурів, а у продовж декілька годин після опромінення її активність знижується до 96 %. Проте її активність не зменшується у тканинах нирок та селезінки експериментальних тварин [17]. Одноразове опромінення фібробластів людини у дозах у діапазоні 1–10 сГр визначається дозозалежною активацією КАТ починаючи з 1 сГр, але на цьому тлі відбувається порушення роботи глутатіонової системи клітин про що свідчить зниження активності Se-ГПО [25]. При субхронічному тотальному опроміненні мишів (30 діб з сумарними дозами в межах 0,4–1,6 Гр) збільшення активності КАТ та експресії її генів відбувається на 23 день від початку опромінення з максимальною активністю цього ензиму у дозі 0,5 Гр. При хронічному впливі ІВ низької інтенсивності з сумарною дозою 0,06–0,54 сГр на організм піддослідних тварин відбувається поступове виснаження каталазного АО-захисту після їх перебування протягом 12, 15, 18, 24 місяців в зоні дії ІВ, що може бути обумовлене як порушеннями синтезу цього білку, так і посттрансляційними змінами його структури [23].

Резервна потужність глутатіонової АОС клітин є достатньою для того, щоб за рахунок активації Se-ГПО і ГР та підвищення внутрішньоклітинного вмісту GSH забезпечити адаптаційну відповідь у ранній період після опромінення у дозі >4,5 Гр, проте є недостатньою для того, щоб у віддалений термін попередити зниження клітинного пулу GSH. Показано, що опромінення у дозах 4,5–8,0 Гр сприяє поступовому зниженню активності Se-ГПО та ГР протягом 5 годин у плазмі крові та тімоцитах щурів на тлі зниження

вмісту GSH [2]. Після п'ятигодинного терміну активність Se-ГПО знижується більш як на 40 % [13]. Проте в умовах хронічного γ -опромінення осіб, які працювали в умовах дії низьких доз (від 100 до 400 мЗв), її активність у крові зазнавала несуттєвих змін, в той час як як Zn/CuСОД активність значно знижувалась [22].

Пригнічення та розбалансування ензиматичної АО-відповіді може відбуватися не тільки в результаті безпосереднього впливу ІВ, а і внаслідок радіаційно індукованої гіперпродукції РФК, посилення металкаталізуючого окислення ензиматичних білків, активації протеолітичних механізмів та нестабільності геному. Так показано, що HO^\bullet , утворений в реакціях Фентона та Габер–Вайса, є найбільш цитотоксичним та здатним до інактивації ензимів за рахунок окислення амінокислотних залишків зокрема тирозину, триптофану, а також активних центрів Se-ГПО, Mn-СОД та ін. [35]. Збільшення продукції O_2^\bullet внаслідок дії комплексу факторів (ІВ, іонів металів та їх хелаторів, токсичних речовин) інактивує [4Fe-4S]-вмісні КАТ, ацетилхолінестеразу, дегідратази та інші ензими, проте поліненасичені ліпіди та ДНК не зазнають ушкоджень цим РФК [28].

Підвищений вміст H_2O_2 також може істотно пригнітити активність ензимів та навіть призвести до повної їх інактивації, як показано в експериментах у випадках з СОД, КАТ, мієлопероксидазою та цитохромом P450 [1].

У механізмах радіоіндукованого ензиматичного ушкодження особлива роль відводиться NO [7]. В присутності O_2 він утворює пероксинитрит (ONO_2^-), який в свою чергу здійснює нітрузування (переважно S-нітрузування) та нітрування, залучаючи до цих процесів у першу чергу тирозин, який є сурогатним маркером NO-залежного пошкодження білків [50]. Наприклад, один із механізмів пошкодження Mn-СОД полягає у ONO_2^- стимульованому нітруванні Tug-34 сайту MnСОД, що в цілому призводить до пригнічення клітинної АО відповідь на дію ІВ [21].

При значній кількості NO утворюються тільки радикали RS^\bullet , а при ковалентному поєднанні з SH-групами — S-нітрозотіоли, які є одними з ключових фігурантів у апоптотичних механізмах. Прикладом цього є формування токсичного GSNO, який утворюється в результаті неспецифічного ушкодження GSH [68]. Модифікуюча роль NO при посередництві ONO_2^- полягає також у реакції останнього з металами в ензиматичних кластерах [4Fe-4S], що сприяє їх інактивації [55]. А при поєднанні дії NO^\bullet та O_2^\bullet нітродіоксид достатньо

швидко перетворюється на нітрат, який у значній кількості викликає окислення залізо-сірчанних ензиматичних центрів, вивільняє Fe^{2+} та утворює іон NO^+ [54].

Металкаталізує окислення ензимів полягає у першу чергу в окисленні Pro, His, Arg, Lys амінокислотних залишків, модифікація яких у складі білкової молекули може призводити до зниження їх ізoeлектричної точки та фрагментації пептидних зв'язків. Знайдено, що чутливими до металкаталізуючого окислення є КАТ, СОД, а також ацетилхолінестераза, алкогольдегідрогеназа, креатинкіназа, піруватдегідрогеназа, лактатдегідрогеназа [41].

Нестабільність геному, що обумовлена радіогенною гіперпродукцією РФК та ВР є пріоритетним фактором у порушенні функціонування ензимів. Наприклад, при триразовому збільшенні рівня H_2O_2 внаслідок радіоіндукованого ОС відмічається хромосомна лабільність, збільшення мутацій та генний поліморфізм, тоді як водночас гіперпродукція O_2^{\bullet} не викликає подібних змін. Причому показано, що H_2O_2 у більшості клітин ссавців викликає пошкодження ДНК (одно-, дволанцюгові розриви) раніше, ніж вдається рееструвати активацію процесів окисної модифікації ліпідів та білків. В цьому разі H_2O_2 виступає в як мутатор фенотипу, який є стабільним для більшості поколінь клітин [47]. Типовим для NO^{\bullet} відносно ДНК є утворення продуктів радіаційного окислення 8-оксо-7,8-дегідро-20-деоксигуанозин (8-ОНdG) та 2,6-диаміно-5-формамідо-4-гідро-ксіпіримідин (2,6-DFHP), в наслідок чого виникають одно-, дволанцюгові розриви з подальшим утворенням димерів тиміну, зшивок ДНК-ДНК та ДНК-білок [61].

Таким чином на тлі радіогенних порушень біомолекулярної системи, посилення процесів ВРО, надмірного вивільнення цитотоксичних продуктів та дестабілізації генного апарату у період гострого опромінення недостатня мобілізація ензиматичної АО-відповіді обумовлює подальший розвиток постпроменевих біохімічних перетворень, які залежать від величини, потужності поглинутої дози, а також від здатності спрацювання репаративних механізмів, що суттєвим чином визначає ступінь прояву радіобіологічних ефектів у віддалені періоди після опромінення. Показано, що передуюча радіаційному ураженню аліментарна недостатність АОС, негативно впливає на радіорезистентність організму, прискорюючи зниження АО-потенціалу, збільшуючи важкість променевих уражень у віддалені періоди після опромінення. Це знайшло підтвердження

при дослідженні зразків клітин крові працівників з незначною недостатністю АОС, які працювали в умовах впливу низькопотужного випромінювання. Показано, що після додаткового опромінення цих зразків активність Zn/CuСОД, MnСОД була більш пригніченою, а механізми енергозабезпечення опромінених клітин суттєво розбалансовані ніж в контрольних зразках [39].

На сьогодні багатьма клінічними та експериментальними дослідженнями підтверджується факт віддалених радіобіологічних ефектів внаслідок функціонування радіоіндукованих тривалих патобіохімічних змін. Високий рівень РФК, інтенсифікація ліпопероксидації, окислювальна модифікація ДНК та протеїнів на тлі в'ялої мобілізації захисно-компенсаторних механізмів та появи нерепарованих компонентів, а також активації прозапальних медіаторів призводить до порушення про-/антиоксидантної рівноваги з накопиченням стабільних цитотоксичних інтермедіатів, що призводить до напруження та поступового вичерпання ензиматичних АО-резервів [3]. Ці зміни асоціюються із пошкодженням мітохондріального матриксу, порушенням окислювального фосфорилування, збільшенням текучості цитоплазматичних та мембран клітинних органел, в першу чергу лізосомальних, піроксисомальних та мітохондріальних, вивільненням ензимів у цитоплазматичний ретикулум та міжклітинний простір. В результаті формується цитозольний ОС, порушення електронтранспортних внутрішньоклітинних взаємозв'язків та посилення процесів окисної модифікації білків та їх катаболізму, що сприяє більш глибокому порушенню координації АО ензиматичної ланки та вичерпання її можливостей в умовах довготривалої напруги [57].

Експериментально підтверджено, що з часом після опромінення, завдяки посиленого вичерпання АО-резервів спостерігається зниження активності СОД, Se-ГПО, ГТ, ГР, вмісту токоферолу й аскорбату та зростання інтенсивності ВРО біомолекулярних структур. На цьому тлі відбувається вторинна активація білокмодифікуючих процесів, що є свідченням радіоіндукованого клітинного ушкодження [33]. У супроводі посилення білокмодифікуючих процесів у віддалені терміни після дії ІВ різної інтенсивності спостерігалась недостатність ензиматичного АО-захисту, наприклад лімфоцитів периферичної крові експериментальних тварин за рахунок розбалансування нативно скоординованих СОД↓, КАТ↑ та Se-ГПО↓, що може бути пояснено відсутністю компенсаторного захисту з боку Se-ГПО та ГР

[10]. Ці ефекти мають суттєву стійкість, оскільки більше як двадцять років потому у периферичній крові ліквідаторів наслідків Чорнобильської катастрофи, опромінених у дозах у широкому діапазоні простежувалось суттєве пригнічення КАТ АО-захисту на відміну від СОД, на тлі білокмодифікуючих ефектів, що пов'язувалось з рівнем отриманої дози [15].

Стійкість ефектів, спричинених дією ІВ поставило задачу щодо пошуків інформативних маркерів для оцінки віддалених метаболічних змін [5]. Так, хронічний радіоіндукований ОС асоціюється з підвищеним рівнем експресії нейрозапалювального маркера — ССР2, маркера ОС при мієлопатії — Нтох-1, індукбельної NOS — в альвеолярному епітелії, окисленого метіоніну — в бронхоальвеолярній рідині [72]. У віддалених строках після опромінення W. Zhao та M.E. Robbins *in vitro* визначили важливість системи ренін-ангіотензину та НАДФН-оксидази, за участю яких відбувається індукція РФК у мікроваскулярних ендотеліальних клітинах протягом тривалого часу після опромінення, що сприяє формуванню віддалених радіоіндукованих ефектів у вигляді реакцій запалення в місцях максимального контакту ІВ з тканиною, обумовлюючи розвиток її дисфункції [73]. Прозапальні медіатори відіграють ключову роль у цих процесах. Показано, що у віддаленому періоді після дії ІВ у дозах, що перевищують 2 Гр відбувається викид плеотропних прозапальних цитокинів (TNF- α , IL-1, IL-6), що сприяє зниженню ефективності ензиматичної ланки АОС за рахунок розбалансування спряженої їх роботи [58]. Нестабільність геному, викликана впливом прозапальних медіаторів, можливо є одним з основних факторів, що пояснює віддалену дискоординацію ензиматичної ланки АОС, оскільки показано, що інтерлейкіни посилюють активність трійки незамінних Zn/CuСОД, КАТ та Se-ГПО з одночасним пригніченням генної експресії Zn/CuСОД, міжклітинної СОД та КАТ. При цьому експресія Se-ГПО та MnСОД генів збільшується, а індукція СОД ензиматичної активності та експресія MnСОД гену суттєво пригнічує рівень NF- κ B, порушуючи тим самим транскриптивні механізми [51].

Формування віддалених цитогенетичних та цитотоксичних ефектів в опроміненому організмі, обумовлених недостатністю ензиматичного АО-захисту сприяє розвитку ерозивно-некротичних процесів в опроміненій тканині. Численними дослідженнями було показано, що радіаційно індукованої дисфункції зазнають тканини цент-

ральної нервової системи, кишечника, нирок, печінки та шкіри, що асоціюється з атрофією, фіброзом або/та некрозом у віддаленому періоді після опромінення [11, 65]. Тому вивчення особливостей ензиматичного АО-захисту у здійсненні радіопротекторних клітинних ефектів дозволить виявити головні точки прикладання радіаційного фактора, а також зрозуміти механізми формування та реалізації патобіохімічних змін на субклітинному, органному та організаційному рівнях.

ЛІТЕРАТУРА

1. Активированные кислородные метаболиты в монооксидных реакциях / В.В. Ляхович, В.А. Вавилин, Н.К. Зенков, Е. Б. Меньщикова // *Бюллетень СО РАМН*. — 2005. — Т. 118, № 4. — С. 7–12.
2. Активність глутатіонзалежної антиоксидантної системи печінки і крові щурів залежно від γ -опромінення та раціону харчування / Ю.В. Нікітченко, В.І. Падалко, В. М. Ткаченко [та ін.] // *Укр. біохім. журнал*. — 2008. — № 6. — С. 66–73.
3. Антиоксидантна система, окисна модифікація білків і ліпідів в розвитку порушень життєдіяльності у віддаленому періоді після Чорнобильської аварії / Л.М. Овсяннікова, А.А. Чумак, О.М. Коваленко [та ін.] // *Мед. наслідки аварії на Чорнобильській атомній станції / за ред. О.Ф. Возіанова, В.Г. Бебешка, Д.А. Базыки*. — К.: ДІА, 2007. — С. 422–436.
4. Барабой В.А. *Биоксиданты*. — К.: Книга плюс, 2006. — 462 с.
5. Бебешко В.Г. *Биологические маркеры ионизирующего излучения* / В.Г. Бебешко, Д.А. Базыка, К.Н. Логановский // *Укр. мед. часопис*. — 2004. — № 1. — С. 11–14.
6. Болдырев А.А. Роль активных форм кислорода в жизнедеятельности нейрона / А.А. Болдырев // *Успехи физиологических наук*. — 2003. — Т. 34, № 3. — С. 21–34.
7. Винк Д.А. Значение химических свойств оксида азота для лечения онкологических заболеваний / Д.А. Винк, И. Водовоз, Дж.А. Кук // *Биохимия*. — 1998. — Т. 63, № 7. — С. 948–957.
8. Владимиров Ю.А. Свободные радикалы и антиоксиданты / Ю.А. Владимиров // *Вестник РАМН*. — 1998. — № 7. — С. 43–50.
9. Влияние γ -излучения и алиментарных факторов на прооксидантно-антиоксидантную систему печени и крови крыс / Ю.В. Никитченко, В.И. Падалко, В.Н. Ткаченко [и др.] // *Радиац. биол. радиоэкол.* — 2008. — Т. 48, № 2. — С. 171–176.
10. Дослідження прогностичної ролі активності ензимів антиоксидантного захисту в окисній модифікації білків після дії низькоінтенсивного іонізуючого випромінювання / Л.С. Старикович, Л.О. Дацюк, У.В. Старанко [та ін.] // *Лаборатор. діагностика*. — 2008. — № 1 (43) — С. 57–60.
11. Зуєва Н. О. Обґрунтування застосування берлітіону для зменшення вираженості проявів метаболічного синдрому — варіанта мультифакторної патології у потерпілих внаслідок аварії на Чорнобильській АЕС / Н.О. Зуєва, А.С. Ефімов // *Укр. мед. часопис*. — 2002. — № 1. — С. 135–138.
12. Клевета Г. Я. Вплив іонізуючої радіації низької інтенсивності та вітаміну Е на систему антиоксидантного захисту тканин із високою проліферативною активністю : автореф. дис. ... канд. біол. наук: спец. 03.00.04 / Г.Я. Клевета. — Львів, 2005. — 16 с.
13. Коваль Т. В. Зміна вмісту глутатіону в тимоцитах щурів за індукції апоптозу під впливом H₂O₂ або радіації / Т.В. Коваль, О.О. Назарова, О. П. Матишевська // *Укр. біохім. журнал*. — 2008 — № 2. — С. 114–119.

14. Костенко А. Г. Воздействие больших доз ионизирующей радиации после повышенного введения фторида натрия в организм на свободнорадикальное окисление и антиоксидантную защиту крови / А.Г. Костенко // *Світ медицини та біології*. — 2006. — № 1. — С. 36–41.
15. Кубашко А. В. Стан про- та антиоксидантної рівноваги у постраждалих внаслідок Чорнобильської катастрофи (віддалений післяваріантний період): автореф. дис. ... канд. біол. наук : спец. 03.00.01/ А.В. Кубашко — К., 2010 — 24 с.
16. Меерсон Ф.З. Патогенез и предупреждение стрессорных и ишемических повреждений сердца/ Ф.З. Меерсон. — М.: Медицина, 1984. — 272 с.
17. Окислительно-восстановительные энзимы в ткани селезенки животных при воздействии рентгеновых лучей / А.Б. Утешев, Ж.К. Макашев, Т.А. Утешев, А.Г. Журнист // *Вестн. НЯЦ РК*. — 2003. — Вып. 3. — С. 188–190.
18. Окислительный стресс при атеросклерозе и диабете / В.З. Ланкин, М.О. Лисина, Н.Е. Арзамасцева [и др.] // *Бюл. эксперим. биологии и медицины*. — 2005. — Т. 139, № 7. — С. 48–51.
19. Оцінка стану глутатіонової системи в імунотентних клітинах крові за дії низькоінтенсивного опромінення / Г.Я. Клевета, Л.О. Дацюк, У.В. Старанко [та ін.] // *Мед. хімія*. — 2006. — № 3. — С. 76–79.
20. Протас О. Ф. Активність антиоксидантних ферментів та рівень вільно радикальних процесів у ядрах клітин нейронів за низьких доз опромінення / О.Ф. Протас // *Биополимеры и клетка*. — 1996. — Т.12, № 3. — С. 47–53.
21. Рафиков Р. Р. Механизм автокаталитического нитрозилования и нитрования аминокислот в составе белков с гидрофобными участками : автореф. дис. ... канд. хим. наук: спец. 03.00.02 / Р.Р. Рафиков. — М., 2005. — 21 с.
22. Роль іонізуючого излучения в развитии гомеостатического дисбаланса / А.Б. Карпов, Р.М. Тахауов, В.В. Удут [и др.] // *Бюл. сиб. медицины*. — 2005. — № 2. — С. 82–88.
23. Сидорик Е.П. Молекулярные механизмы нарушений в клетках при хроническом действии ионизирующего излучения низкой мощности дозы в связи с аварией на ЧАЭС / Е.П. Сидорик, А.П. Бурлака // *Эксперим. онкология* — 2000. — № 4. — С. 179–185.
24. Ткаченко В. Н. Исследование влияния ионизирующей радиации на активность оксидоредуктазных систем : [Электронный ресурс] / В.Н. Ткаченко, В.В. Товстяк. — Режим доступа : <http://www.library.biophys.msu.ru/gettext?Serial=76407>. — Название с экрана.
25. Adaptive responses to low-dose/low-dose-rate gamma rays in normal human fibroblasts: the role of growth architecture and oxidative metabolism / S.M. de Toledo, N. Asaad, P. Venkatachalam [et al.] // *Radiat. Res.* — 2006. — Vol. 166, № 6. — P. 849–857.
26. Antioxidant role of glutathione S-transferases: protection against oxidant toxicity and regulation of stress-mediated apoptosis / R. Sharma, Y. Yang, A. Sharma [et al.] // *Antioxid. Redox.* — 2004. — Vol. 6, № 2. — P. 289–300.
27. *Biochemie und Pathobiochemie* / G. Löffler, P. E. Petrides. — Berlin: Springer, 2006. — 1288 p.
28. *Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation* / R.T. Dean, S. Fu, R. Stocker, M.J. Davies // *Biochem. J.* — 1997. — Vol. 324, Pt. 1. — P. 1–18.
29. Bonini G. M. Carbon dioxide stimulates the production of thiol, sulfinyl, and disulfide radical anion from thiol oxidation by peroxyxynitrite / G.M. Bonini, O. Augusto // *J. Biol. Chem.* — 2001. — Vol. 276, № 13. — P. 9749–9754.
30. Brigelius-Flohé R. Glutathione peroxidases and redox-regulated transcription factors / R. Brigelius-Flohé // *Biol. Chem.* — 2006. — Vol. 387, № 10–11. — P. 1329–1335 (Review).
31. Brigelius-Flohé R. Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases / R. Brigelius-Flohé // *Free Radic. Biol. Med.* — 1999. — Vol. 27, № 9–10. — P. 951–965.
32. *Catalytic mechanisms and specificities of glutathione peroxidases: Variations of a basic scheme* / S. Toppo, L. Flohé, F. Ursin [et al.] // *BBA*. — 2009. — Vol. 1790, № 11. — P. 1489–1500.
33. Cell signaling by protein carbonylation and decarbonylation / C.M. Wong, L. Marcocci, L. Liu, Y.J. Suzuki // *Antioxid. Redox Signal.* — 2010. — Vol. 12, № 3. — P. 393–404.
34. Characterization of the oxidase activity in mammalian catalase / A.M. Vetrano, D.E. Heck, T.M. Mariano [et al.] // *J. Biol. Chem.* — 2005. — Vol. 280, № 42. — P. 35372–35381.
35. Davies M.J. The oxidative environment and protein damage / M.J. Davies // *BBA*. — 2005. — Vol. 1703, № 2. — P. 93–109.
36. Dickinson D.A. Cellular glutathione and thiols metabolism / D.A. Dickinson, H.J. Forman // *Biochem. Pharmacol.* — 2002. — Vol. 64, № 5–6. — P. 1019–1026.
37. Direct evidence for catalase as the predominant H₂O₂-removing enzyme in human erythrocytes / S. Mueller, H.-D. Riedel, W. Stremmel // *Blood*. — 1997. — Vol. 90, № 12. — P. 4973–4978.
38. Diversity of structures and properties among catalases / P. Chelikani, I. Fita, P.C. Loewen // *Cell Mol. Life Sci.* — 2004. — Vol. 61, № 2. — P. 192–208.
39. Durovic B. Influence of occupational exposure to low-dose ionizing radiation on the plasma activity of superoxide dismutase and glutathione level / B. Durovic, V. Spasic-Jokic, B. Durovic // *Vojnosanit. Pregl.* — 2008. — Vol. 65, № 8. — P. 613–618.
40. Effect of ionizing radiation on rat tissue: proteomic and biochemical analysis / E.C. Park, J.B. Yoon, J.S. Seong [et al.] // *Prep. Biochem. Biotechnol.* — 2006. — Vol. 36, № 1. — P. 19–35.
41. Effects of metal-catalyzed oxidation on the formation of advanced oxidation protein products / L. Li, A. Peng, K.Y. Zhu, H. Yu [et al.] // *J. Appl. Toxicol.* — 2008. — Vol. 88, № 10. — P. 674–678.
42. Effects of two different high doses of irradiation on antioxidant system in the liver of guinea pigs / Y. Guney, N. Bukan, A. Dizman [et al.] // *Eksp. Onkol.* — 2004. — Vol. 26, № 1. — P. 71–74.
43. Exogenous superoxide dismutase prevents peroxyxynitrite-induced apoptosis in non-heart-beating donor livers / S.W. Song, R.H. Tolba, K. Yonezawa [et al.] // *Eur. Surg Res.* — 2008. — Vol. 41, № 4. — P. 353–361.
44. A fused selenium-containing protein with both GPx and SOD activities / H. Yu, Y. Ge, Y. Wang [et al.] // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* — 2007. — Vol. 358, № 3. — P. 873–878.
45. Glutathione peroxidase 4 differentially regulates the release of apoptogenic proteins from mitochondria / H. Liang, Q. Ran, Y.C. Jang [et al.] // *Free Radic. Biol. Med.* — 2009. — Vol. 47, № 3. — P. 312–320.
46. High superoxide dismutase and low glutathione peroxidase activities in red blood cells predict susceptibility of lung cancer patients to radiation pneumonitis / E.M. Park, N. Ramnath, G.Y. Yang [et al.] // *Free Radic. Biol. Med.* — 2007. — Vol. 42, № 2. — P. 280–287.
47. Hydrogen peroxide mediates the radiation-induced mutator phenotype in mammalian cells / D. Dayal, S.M. Martin, C.L. Limoli, D.R. Spitz // *Biochem. J.* — 2008. — Vol. 413, № 1. — P. 185–191.
48. Induction of rhodanese, a detoxification enzyme, in livers from mice after long-term irradiation with low-dose-rate gamma-rays / T. Nakajima, K. Taki, B. Wang [et al.] // *J. Radiat. Res. (Tokyo)*. — 2008. — Vol. 49, № 6. — P. 661–666.
49. Influence of ferulic acid on gamma-radiation induced DNA damage, lipid peroxidation and antioxidant status in primary culture of isolated rat hepatocytes / M. Srinivasan, A.R. Sudheer, K.R. Pillai [et al.] // *Toxicology*. — 2006. — Vol. 228, № 2/3. — P. 249–258.
50. Inhibition of protein-tyrosine phosphatases by mild oxidative stresses is dependent on S-nitrosylation // D.M. Barrett, S.M. Black, H. Todor [et al.] // *J. Biol. Chem.* — 2005. — Vol. 280, № 15. — P. 14453–14461.

51. Interleukin-1 beta and interleukin-6 disturb the antioxidant enzyme system in bovine chondrocytes: a possible explanation for oxidative stress generation / M. Mathy-Hartert, L. Hogge, C. Sanchez [et al.] // *Osteoarthritis Cartilage*. — 2008. — Vol. 16, № 7. — P. 756–763.
52. Ionizing radiation-induced, mitochondria-dependent generation of reactive oxygen/nitrogen / J.K. Leach, G.V. Tuyle, P.S. Lin [et al.] // *Cancer Res*. — 2001. — Vol. 61, № 10. — P. 3894–3901.
53. Lampe M.A. Cytochrome P-450 dependent binding of methapyriline to DNA in vitro / M.A. Lampe, R.C. Kammerer // *Carcinogenesis*. — 1997. — Vol. 8, №10. — P.1525–1529.
54. Leon L. Post-translational modifications induced by nitric oxide (NO): implication in cancer cells apoptosis / L. Leon, J.F. Jeannin, A. Bettateb // *Nitric Oxide*. — 2008. — Vol. 19, № 2. — P. 77–83.
55. Mitochondrial aconitase reaction with nitric oxide, S-nitrosoglutathione and peroxynitrite: Mechanisms and relative contributions to aconitase inactivation / V. Tortore, C. Juijano, B. Reeman [et al.] // *Free Radic. Biol. Med.* — 2007. — Vol. 42, № 7. — P. 1075–1088.
56. Overexpression of extracellular superoxide dismutase protects mice from radiation-induced lung injury / S.K. Rang, Z.N. Rabbani, R.J. Folz [et al.] // *Int. J. Radit. Oncol. Biol. Phys.* — 2003. — Vol. 57. — P. 1056–1066.
57. Preston R.J. Radiation biology: concepts for radiation protection / R.J. Preston // *Health Phys.* — 2005. — Vol. 88, № 6. — P. 545–556.
58. Pro-inflammatory cytokines play a key role in the development of radiotherapy-induced gastrointestinal mucositis / Z.Y. Ong, R.J. Gibson, J.M. Bowen [et al.] // *Radiat. Oncol.* — 2010. — Vol. 5. — P. 22.
59. Redox properties of heme peroxidases / G. Battistuzzi, M. Bellei, C.A. Bortolotti, M. Sola // *Arch Biochem Biophys.* — 2010. — Vol. 500, № 1. — P. 21–36.
60. Role of Antioxidant Enzymes on Ionizing Radiation Resistance / J. Sun, Y. Chen, M. Li, Z. Ge // *Free Radic. Biol. Med.* — 1988. — Vol. 24, № 4. — P. 586–593.
61. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence / M. Valko, M. Izakovic, M. Mazur [et al.] // *Mol. Cell. Biochem.* — 2004. — Vol. 266, № 1/2. — P. 37–56.
62. Selenium methylselenocysteine protects human hepatoma HepG2 cells against oxidative stress induced by tert-butyl hydroperoxide / S. Cuello, S. Ramos, R. Mateos [et al.] // *Anal. Bioanal. Chem.* — 2007. — Vol. 387, № 7–8. — P. 2167–2178.
63. Selenium-dependent cellular glutathione peroxidase protects mice against a pro-oxidant-induced oxidation of NADPH, NADH, lipids, and protein / W.-H. Cheng, Y.X. Fu, J.M. Porres [et al.] // *FASEB J.* — 1999. — № 13. — P. 1467–1475.
64. Sies H. Interaction of peroxynitrite with selenoproteins and glutathione peroxidase mimics / H. Sies, G.E. Arteel // *Free Radic Biol Med.* — 2000. — Vol. 28, № 10. — P. 1451–1455.
65. Stone H. B. Modifying normal tissue damage postirradiation. Report of a workshop sponsored by the Radiation Research Program, National Cancer Institute, Bethesda, Maryland, September 6–8, 2000 / H.B. Stone, W.H. McBride, C.N. Coleman // *Radiat. Res.* — 2002. — Vol. 157, № 2. — P. 204–223.
66. Superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in the spontaneously hypertensive rat kidney: effect of antioxidant-rich diet / C.D. Zhan, R.K. Sindhu, J. Pang [et al.] // *J. Hypertens.* — 2004. — Vol. 22, № 10. — P. 2025–2033.
67. Switala J. Diversity of properties among catalases / J. Switala, P.C. Loewen // *Arch Biochem Biophys.* — 2002. — Vol. 401, № 2. — P.145–154.
68. *The Chemistry of S-Centered radicals* / ed. by Z.B. Alfassi. — New-York: G. Wiley & Sons, 1999. — 371 p.
69. Theoretical investigation of the ultrafast dissociation of ionized biomolecules immersed in water: direct and indirect effects / M.P. Gaigeot, P. Lopez-Tarifa, F. Martin [et al.] // *Mutat. Res.* — 2010. — Vol. 704, № 1/3. — P. 45–53.
70. Understanding the association between dietary antioxidants, redox status and disease: is the total antioxidant capacity the right tool? / M. Serafini, D. Del Rio // *Redox Rep.* — 2004. — Vol. 9, № 3. — P. 145–152.
71. Winyard P.G. Oxidative activation of antioxidant defence / P.G. Winyard, C.J. Moody, C. Jacob // *Trends Biochem. Sci.* — 2005. — Vol. 30, № 8. — P. 453–461.
72. Zhao W. Inflammation and chronic oxidative stress in radiation-induced late normal tissue injury: therapeutic implications / W. Zhao, M.E. Robbins // *Curr. Med. Chem.* — 2009. — Vol. 16, № 2. — P. 130–143.
73. Zhao W. Oxidative damage pathways in relation to normal tissue injury / W. Zhao, D.I. Diz, M.E. Robbins // *Br. J. Radiol.* — 2007. — Vol. 80, Spec. № 1. — P. S23–S31.

**АНТИОКСИДАНТНЫЕ ЭНЗИМЫ
В МЕХАНИЗМАХ РАДИОИНДУЦИРОВАННОГО
ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА
(ранний и отдаленный периоды после облучения)**

А.В. Кубашко, Л.М. Овсянникова, А.А. Чумак,
О.В. Носач, С.М. Алехина, О.С. Ильчук

В обзоре описаны функции, уровень активности и эффективность координации ферментатического звена антиоксидантной системы в живом организме в норме и при радиационном воздействии. Показаны особенности нарушений его функционирования в разные периоды после облучения, и связанное с этим развитие отдаленных радиационных эффектов.

**ANTIOXIDANT ENZYMES IN THE MECHANISM
OF RADIOINDUCTION OXIDATIVE STRESS
(early and remote periods after irradiation)**

A.V. Kubashko, L.M. Ovsyannikova, A.A. Chumak,
E.V. Nosach, S.M. Alehina, O.S. Ilchuk

The functions, activity level and enzymatic section of antioxidant system efficiency in normal living organism and after irradiation are described in the review. The particularities and development of remote radiation effects associated with disturbance of enzymatic antioxidant system functioning at different periods after irradiation are shown.