

Міністерство освіти і науки України  
Львівський національний університет імені Івана Франка

на правах рукопису

САБАДАШКА МАРІЯ ВОЛОДИМИРІВНА

УДК 663.253+577.346:577.152.141+612.015.11:611(018.5+132)+616.61

ДІЯ КОНЦЕНТРАТУ ПОЛІФЕНОЛЬНОГО КОМПЛЕКСУ З  
ВИНОГРАДНОГО ВИНА ЗА РАДІОІНДУКОВАНОГО ОКСИДАТИВНО-  
НІТРАТИВНОГО СТРЕСУ

03.00.04 – біохімія

Дисертація  
на здобуття наукового ступеня  
кандидата біологічних наук

Науковий керівник:  
доктор біологічних наук, професор  
Сибірна Наталія Олександрівна

Львів–2014

## ЗМІСТ

<b>ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ</b>	6
<b>ВСТУП</b>	7
<b>РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ</b>	14
1.1. Вплив іонізуючого випромінювання на живі організми	14
1.1.1. Шляхи реалізації ушкоджень, індукованих дією малих доз іонізуючого випромінювання	16
1.2. Радіоіндукований оксидативно-нітративний стрес	18
1.2.1. Надпродукція АФО та АФН після дії малих доз іонізуючого випромінювання	19
1.2.2. Роль оксиду нітрогену в розвитку радіоіндукованих порушень	20
1.2.2.1. Внутрішньоклітинний синтез та метаболізм оксиду нітрогену	20
1.2.2.2. NO-залежна відповідь клітин на дію іонізуючого випромінювання	24
1.2.2.3. Нітрування протеїнів за залишками тирозину як індикатор нітративного стресу	26
1.2.3. Інтенсифікація процесів пероксидного окиснення ліпідів за дії радіації	29
1.3. Функціонування системи антиоксидантного захисту у нормі та за умов опромінення	31
1.4. Сучасні підходи та принципи радіопротекції	35
1.4.1. Протекторна дія поліфенольних сполук з виноградних вин у разі розвитку радіоіндукованих уражень	36
<b>РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ</b>	44
2.1. Умови проведення досліджень	44
2.2. Характеристика об'єкту досліджень	44

2.3. Отримання концентрату природного поліфенольного комплексу з виноградного вина	45
2.4. Опромінення піддослідних тварин	46
2.5. Забір крові та зразків тканин	47
2.6. Виділення лейкоцитів	47
2.7. Підрахунок кількості лейкоцитів у камері Горяєва	47
2.8. Отримання лізатів лейкоцитів та зразків тканин	48
2.9. Визначення концентрації протеїну за методом Лоурі	48
2.10. Методи дослідження стану системи L-аргінін/оксид нітрогену	49
2.10.1. Визначення сумарної активності NO-синтази	49
2.10.2. Визначення вмісту нітрит-аніонів	49
2.10.3. Визначення вмісту нітрат-аніонів	50
2.11. Визначення вмісту 3'-нітротироzinу	50
2.11.1. Лізис лейкоцитів та зразків тканин для електрофоретичного розділення протеїнів	50
2.11.2. Електрофорез протеїнів у поліакриламідному гелі	51
2.11.3. Імоноблотинг протеїнів	51
2.12. Методи дослідження активності ензимів антиоксидантної системи захисту	52
2.12.1. Визначення активності супероксиддисмутази	52
2.12.2. Визначення активності каталази	53
2.12.3. Визначення активності глутатіонпероксидази	54
2.12.4. Визначення активності глутатіонредуктази	55
2.13. Визначення вмісту ТБК-позитивних продуктів	56
2.14. Статистична обробка результатів	56
<b>РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ</b>	<b>58</b>
3.1. Дослідження ефекту введення концентрату природного поліфенольного комплексу з виноградного вина на стан системи L-аргінін / оксид нітрогену за дії малих доз іонізуючого	

випромінювання	58
3.1.1. Вплив концентрату природного поліфенольного комплексу з виноградного вина на активність NO-синтази та вміст стабільних метаболітів оксиду нітрогену у периферичній крові щурів за опромінення у дозах 10 та 30 сГр.	58
3.1.2. Активність NO-синтази та вміст стабільних метаболітів оксиду нітрогену у лейкоцитах щурів за споживання концентрату природного поліфенольного комплексу та дії випромінювання у дозах 10 та 30 сГр.	65
3.1.3. Вплив поліфенольного комплексу з виноградного вина на активність NO-синтази та вміст стабільних метаболітів оксиду нітрогену у тканинах аорти щурів за дії іонізуючого випромінювання у дозах 10 та 30 сГр.	70
3.1.4. Активність NO-синтази та вміст стабільних метаболітів оксиду нітрогену в корковому шарі нирки щурів за умов опромінення у дозах 10 та 30 сГр та за споживання концентрату поліфенольного комплексу	75
3.2. Вплив поліфенолів з виноградного вина на рівень 3'-нітротирозин-модифікованих протеїнів за дії малих доз іонізуючого випромінювання	81
3.2.1. Накопичення 3'-нітротирозин-модифікованих протеїнів у лейкоцитах щурів за дії іонізуючого випромінювання у дозах 10 та 30 сГр та за умов споживання концентрату поліфенольного комплексу з виноградного вина	81
3.2.2. Протекторний ефект концентрату поліфенольного комплексу за нітративного стресу, індукованого дією іонізуючого випромінювання у дозах 10 та 30 сГр у тканинах аорти щурів	85
3.2.3 Роль природного поліфенольного комплексу вина у запобіганні накопиченню 3'-нітротирозин-модифікованих	

протеїнів у нирках щурів за опромінення у дозах 10 та 30 сГр	88
3.3. Вплив концентрату поліфенольного комплексу вина на вміст продуктів пероксидного окиснення ліпідів та на ензиматичну ланку системи антиоксидантного захисту за дії малих доз іонізуючого випромінювання	92
3.3.1. Вплив концентрату природного поліфенольного комплексу вина на стан ензиматичної системи антиоксидантного захисту та вміст продуктів пероксидного окиснення ліпідів у периферичній крові щурів при дії іонізуючого випромінювання у дозах 10 та 30 сГр	92
3.3.2. Антиоксидантний ефект концентрату природного поліфенольного комплексу з виноградного вина у лейкоцитах щурів за умов опромінення у дозах 10 та 30 сГр	98
3.3.3. Основні біохімічні показники системи антиоксидантного захисту та інтенсивність процесів пероксидації ліпідів у тканинах аорти щурів за опромінення у дозах 10 та 30 сГр та споживання концентрату поліфенольного комплексу вина	102
3.3.4. Вплив концентрату природного поліфенольного комплексу з виноградного вина на вміст продуктів пероксидного окиснення ліпідів та активність ключових ензимів системи антиоксидантного захисту у корковому шарі нирки щурів за дії іонізуючого випромінювання у дозах 10 та 30 сГр	107
<b>РОЗДІЛ 4. АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ</b>	112
<b>ВИСНОВКИ</b>	133
<b>СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ</b>	135

**ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ**

- ВН<sub>4</sub> – (6R)-5,6,7,8-тетрагідро-L- біоптерин
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – пероксид гідрогену
- HO<sub>2</sub>• – гідропероксил-радикал
- МАРК – мітоген-активуючі протеїнові кінази
- NO – оксид нітрогену
- NOS –NO-синтаза
- OH• – гідроксил-радикал
- ONOO<sup>-</sup> – пероксинітрит
- АФН – активні форми нітрогену
- АФО – активні форми кисигену
- ГПО – глутатіонпероксидаза
- ГР – глутатіонредуктаза
- ЗФР – забуферений фізіологічний розчин
- КАТ – каталаза
- Концентрат ПК –концентрат природного поліфенольного комплексу
- ЛПЕ – лінійна передача енергії
- ЛПНЩ – ліпопротеїни низької щільності
- ЛПС – ліпополісахариди
- НАДФН – нікотинамідаденіндинуклеотидфосфат
- O<sub>2</sub><sup>•-</sup> – супероксид-аніон радикал
- ПОЛ – пероксидне окиснення ліпідів
- СОД – супероксиддисмутаза
- ТБК – тіобарбітурова кислота
- ТХО – трихлороцтова кислота
- ФМН – флавінмононуклеотид

## ВСТУП

### Актуальність теми

Іонізуюче випромінювання ушкоджує клітини, ініціюючи збудження та іонізацію біомолекул, внаслідок прямого впливу або через реакції радіолізу води з подальшим утворенням активних форм кисню (АФО). Результатом цих подій є розвиток оксидативного стресу, що супроводжується неконтрольною генерацією АФО, надмірною ліпопероксидацією та порушенням функціонування ензимів системи антиоксидантного захисту [12, 21, 131]. Після опромінення у клітинах інтенсифікується утворення оксиду нітрогену (NO) та активних форм нітрогену (АФН) [42, 72, 186, 187]. Відомо, що NO бере участь у регуляції радіочутливості клітин, оскільки може індукувати зупинку клітинного циклу після дії радіації, що в подальшому призведе до пригнічення росту та смерті клітини [147, 209, 229]. Крім цього, за умов опромінення NO вступає в реакцію з супероксид-аніон радикалом ( $O_2^{\cdot-}$ ), у результаті якої утворюється пероксинітрит ( $ONOO^-$ ).  $ONOO^-$  є потужним прооксидантом та цитотоксином, адже значно посилює деструкцію клітинних структур шляхом модифікації протеїнів, зокрема за залишками тирозину, ушкодження ДНК, індукцію пероксидного окиснення ліпідів, порушення у внутрішньоклітинній сигналізації, призводячи до поглиблення оксидативно-нітративного стресу [32, 72, 86, 93, 97, 131, 141, 170, 195, 214].

Найбільш інтенсивне підвищення утворення АФО та АФН після дії радіації характерне для таких органів як печінка, легені, нирки, кишківник, серце, головний та кістковий мозок [56, 118, 170, 190, 191, 213, 217]. Крім того, після дії малих доз іонізуючого випромінювання вже через кілька годин змінюється популяційний склад імунокомпетентних клітин та розвивається запальна реакція, що характеризується активацією лейкоцитів у судинах організму [144, 154, 159]. Опромінені лейкоцити синтезують великі кількості не лише АФО і АФН, але і молекул міжклітинного сигналювання (зокрема, цитокінів) [93]. Виникнення запальних процесів значно ускладнює перебіг

оксидативно-нітративного стресу, і, тим самим, посилює ушкодження організму. В такому випадку патологічні зміни відбуваються і у клітинах, які вважаються радіорезистентними, тобто характеризуються низькою мітотичною активністю та у нормі не здатні до великої кількості поділів, зокрема у клітинах м'язів, сполучної тканини, ендотелію судин та нирок ссавців. Зважаючи на все це, надзвичайно актуальним є пошук нових сполук і препаратів, здатних запобігти розвитку радіоіндукованого оксидативно-нітративного стресу.

Протягом останніх років зростає інтерес науковців та громадськості до впливу на організм вина. Виноградне вино містить велику кількість біологічно активних речовин, необхідних для організму людини, зокрема поліфенольні сполуки. Для отримання вина розчавлені грона винограду поміщають у чани та зброджують. При бродінні майже всі фенольні речовини кісточок і шкірки ягід екстрагуються із сировини. Важливим є також те, що фенольні сполуки у процесі виготовлення вина зазнають структурних змін, утворюють комплекси. Кахетинські вина, збагачені фенольними комплексними сполуками, зокрема танінами, зброджують у присутності гребенів винограду [5]. Це забезпечує появу унікального набору поживних фенольних сполук, представлених у винах, отриманих за кахетинською технологією, в тому числі червоного вина марки Каберне-Совіньйон, виготовленого в Національному інституті винограду і вина «Магарач».

Особливість хімічної будови фенольних груп обумовлює здатність нейтралізувати електрон вільних радикалів і формувати відносно стабільні феноксильні радикали, що дозволяє віднести поліфеноли до потужних радіопротекторів, оскільки таким чином ці сполуки припиняють радіоіндуковані ланцюгові окиснювальні реакції у клітинах [141, 171, 212, 215]. Найпотужнішими антиоксидантами вважаються катехіни, епікатехіни, кверцитин та ресвератрол із виноградного вина [86]. Хоча протизапальна, імуномодулююча, антиоксидантна та детоксикаційна дії поліфенолів червоного вина виявлена як *in vitro*, так і *in vivo* [215, 77, 165, 168], проте вплив поліфенолів виноградного вина на розвиток оксидативно-нітративного стресу за дії малих доз радіації є вивчений недостатньо.



## **Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами**

Дисертаційна робота виконана на кафедрі біохімії біологічного факультету Львівського національного університету імені Івана Франка згідно плану науково-дослідної роботи кафедри за темою «Протекторний ефект природного поліфенольного комплексу винограду за умов радіоіндукованого оксидативно-нітративного стресу» (№ держреєстрації 0112U001261) та згідно угоди про творчу та науково-технічну співпрацю між кафедрою біохімії біологічного факультету та Національним інститутом винограду та вина «Магарач» (Ялта, Україна), підписаної у 2009 р.

Робота була підтримана індивідуальним грантом від Західно-Українського Біомедичного Центру (West-Ukrainian BioMedical Research Center – WUBMRC) за темою «Radioprotective Effects of Natural Polyphenolic Complexes of Crimean Grape Wine at Oxidative/Nitrative Stress Associated With Low Doses of Ionizing Radiation» (2012–2013 pp.).

## **Мета та завдання досліджень**

Метою роботи було дослідження біохімічних ефектів дії концентрату природного поліфенольного комплексу з виноградного вина за умов оксидативно-нітративного стресу, спричиненого малими дозами іонізуючого випромінювання.

Для досягнення поставленої мети необхідно було вирішити наступні завдання:

1. Дослідити вплив концентрату природного поліфенольного комплексу з виноградного вина (концентрат ПК) на систему L-аргінін/NO, визначивши активність NO-синтази (NOS) і вміст стабільних метаболітів оксиду нітрогену – нітритів ( $\text{NO}_2^-$ ) та нітратів ( $\text{NO}_3^-$ ), – у периферичній крові, лейкоцитах, аорті і нирці у нормі та за умов опромінювання;

2. Проаналізувати здатність концентрату ПК впливати на процес посттрансляційного утворення 3'-нітротирозин-модифікованих протеїнів у імунокомпетентних клітинах периферичної крові, тканинах аорти та нирки щурів у нормі та за впливу іонізуючого випромінювання;

3. Вивчити вплив концентрату ПК на стан ензиматичної системи антиоксидантного захисту у нормі та за дії рентгенівського випромінювання шляхом визначення активності супероксиддисмутази (СОД), каталази (КАТ), глутатіонпероксидази (ГПО), глутатіонредуктази (ГР) та вмісту ТБК-позитивних продуктів (ТБК-ПП) у периферичній крові, лейкоцитах, тканинах аорти та корковому шарі нирки щурів;

4. З'ясувати динаміку змін досліджуваних показників на 24, 48, 72 та 168 години після дії рентгенівського випромінювання у дозах 10 та 30 сГр.

**Об'єкт дослідження:** молекулярні механізми розвитку та корекції оксидативно-нітративного стресу у периферичній крові, лейкоцитах, тканинах аорти та коркового шару нирки за дії малих доз іонізуючого випромінювання та при введенні концентрату ПК.

**Предмет дослідження:** вміст 3'-нітротирозин-модифікованих протеїнів, стан системи L-аргінін/NO й активність ензиматичної ланки системи антиоксидантного захисту в периферичній крові, лейкоцитах, тканинах аорти і корковому шарі нирки здорових тварин і опромінених щурів та за споживання концентрату ПК.

**Методи дослідження:** біохімічні (визначення активності ензимів, вмісту ТБК-ПП та стабільних метаболітів NO), молекулярно-біологічні (метод вестерн-блот аналізу протеїнів), цитологічні (світлової мікроскопії), статистичні (метод варіаційної статистики із використанням критерію Стьюдента).

### **Наукова новизна одержаних результатів**

Вибір об'єктів досліджень дозволив оцінити функціональний стан системи крові, серцево-судинної та видільної систем піддослідних тварин у разі введенні концентрату ПК та за дії малих доз іонізуючого випромінювання. Вперше досліджено вплив загального одноразового опромінення у дозах 10 та 30 сГр на стан системи L-аргінін/NO та ензиматичної ланки системи антиоксидантного захисту у периферичній крові, лейкоцитах, аорті та нирці щурів. Встановлено, що внаслідок опромінення розбалансовується

функціонування системи антиоксидантного захисту, що відображається в коливних змінах активностей досліджуваних антиоксидантних ензимів та накопиченні ТБК-ПП. Різною напрямлені зміни активності NOS були зафіксовані у різні терміни експерименту після дії обох доз іонізуючого випромінювання. При цьому, як за опромінення дозою 10 сГр, так і дозою 30 сГр у лейкоцитах, аорті та нирці відмічено накопичення стабільних метаболітів NO та 3'-нітритрозин-модифікованих протеїнів.

Для корекції таких радіоіндукованих порушень нами вперше використано концентрат ПК, методика виготовлення та стабілізації якого, була розроблена при виконанні роботи. Продемонстровано потужні антиоксидантні властивості поліфенольного комплексу з червоного виноградного вина, що відображається у зниженні вмісту ТБК-ПП. Крім того, показано коригуючий ефект концентрату ПК щодо порушень функціонального стану антиоксидантних ензимів, активності NOS та, відповідно, продукції нітритів і нітратів, спричинених дією малих доз іонізуючого випромінювання. Виявлено здатність концентрату ПК запобігати надмірній модифікації протеїнів нітруванням за залишками тирозину в усіх досліджуваних тканинах. При аналізі вмісту 3'-нітритрозин-модифікованих протеїнів встановлене його зниження до меж норми за умов споживання концентрату ПК у лейкоцитах на всі терміни експерименту та у корковому шарі нирки на третю та сьому доби після впливу обох доз іонізуючого випромінювання. Для тканин аорти вперше показане зниження вмісту 3'-нітритрозин-модифікованих протеїнів нижче контрольних значень за умов споживання концентрату ПК на фоні опромінення впродовж усього експерименту, що є характерною тканино-специфічною реакцією.

Отримані результати досліджень розвивають сучасні уявлення про характер і закономірності ураження організму малими дозами іонізуючого випромінювання як на клітинному, так і на молекулярному рівнях. Вперше встановлено, що споживання концентрату ПК попереджає виникнення радіоіндукованих порушень та запобігає розвитку оксидативно-нітративного

стресу в імунокомпетентних клітинах, тканинах аорти та у корковому шарі нирки.

### **Практичне значення одержаних результатів**

Розроблено спосіб отримання та стабілізації концентрату червоного виноградного вина, збагаченого поліфенольними сполуками, які у своїй сукупності є унікальним природним поліфенольним комплексом.

Поліфеноли за умов їхнього введення *per os* проявляли антиоксидантні властивості, стимулювали функціонування ензимів системи антиоксидантного захисту, коригували активність NOS, вміст нітритів і нітратів та впливали на вміст 3'-нітротирозин-модифікованих протеїнів. Одержані результати досліджень свідчать, що поліфенольні сполуки з виноградного вина є перспективними радіопротекторами, тому доцільно вести пошук і розробку нових фармакологічних препаратів на їхній основі, спрямованих на нормалізацію стану всього організму та попередження ускладнень, які виникають після дії малих доз іонізуючого випромінювання.

Одержані експериментальні дані та теоретичні узагальнення використовуються на кафедрі біохімії біологічного факультету Львівського національного університету імені Івана Франка під час викладання спецкурсів «Основи функціональної біохімії» та «Радіаційна біохімія».

### **Особистий внесок здобувача**

Дисертант самостійно зібрала та опрацювала літературу за темою кандидатської дисертації, виконала експериментальну частину роботи, провела статистичне опрацювання отриманих результатів досліджень. Аналіз, інтерпретацію та узагальнення результатів роботи, а також формулювання основних положень, які виносяться на захист, і висновків по цій дисертаційній роботі, було проведено спільно з науковим керівником – доктором біологічних наук, професором Н. О. Сибірною. Участь співробітників науково-дослідної лабораторії при кафедрі біохімії Львівського національного університету імені Івана Франка відзначене у спільних публікаціях.

### **Апробація результатів дисертації**

Основні положення дисертації були представлені на VIII, IX та X Міжнародних наукових конференціях студентів і аспірантів “Молодь та поступ біології” (Львів, 2012, 2013, 2014), 3-му з’їзді Українського товариства клітинної біології з міжнародним представництвом (Ялта, 2012), конференції молодих вчених, присвяченій 20-річчю Національної академії медичних наук України (Київ, 2013), VII Львівсько-Люблінській конференції “Сучасні аспекти експериментальної та клінічної біохімії” (VII Lviv-Lublin conference of Experimental and Clinical Biochemistry, Львів, 2013), конференції молодих учених “Актуальні проблеми біохімії та біотехнології” (Київ, 2013), 38-му конгресі Федерації європейських біохімічних товариств (The 38<sup>th</sup> FEBS Congress “Mechanism in Biology”, Санкт-Петербург, Російська Федерація, 2013), а також на наукових семінарах кафедри біохімії біологічного факультету, щорічних звітних наукових конференціях біологічного факультету Львівського національного університету імені Івана Франка та на засіданні біохімічної комісії Наукового товариства імені Тараса Шевченка.

### **Публікації**

За темою дисертації опубліковано 5 статей у фахових наукових журналах та 8 тез доповідей на міжнародних та вітчизняних наукових конференціях, з’їздах і конгресах.

### **Структура та обсяг дисертації**

Дисертація містить такі розділи: вступ, огляд літератури, матеріали та методи досліджень, результати досліджень, аналіз та узагальнення результатів досліджень, висновки та список використаних джерел. Дисертацію викладено на 160 сторінках друкованого тексту і проілюстровано 26 рисунками та 20 таблицями. Список літератури включає 239 найменувань.

## РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

### 1.1. Вплив іонізуючого випромінювання на живі організми

Іонізуюче випромінювання – найкраще вивчена область широкого спектру електромагнітних випромінювань, які зустрічаються в природі чи генеруються штучними джерелами, створеними в результаті діяльності людини [12]. До іонізуючого відносять альфа-, бета-, гамма- та рентгенівське випромінювання. Характерною особливістю цих видів випромінювань є здатність утворення іонів внаслідок взаємодії з речовиною, або, у випадку, якщо енергія кванта випромінювання, яка передається атому чи молекулі, менша від потенціалу іонізації речовини, що опромінюється, то має місце лише їхнє збудження [32, 184, 95].

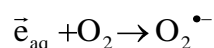
Після впливу іонізуючого випромінювання завдяки абсорбції енергії та руйнування хімічних зв'язків у молекулах у надмірних кількостях утворюються високо реактивні вільні радикали. Саме вільні радикали відіграють головну роль у розвитку та проявах радіаційних ефектів як у окремих тканинах, так і в організмі в цілому, адже реагують з багатьма молекулами та продукують вторинні ДНК і ліпідні радикали. Ланцюгові реакції зі залученням молекул ліпідів відіграють ключову роль в ушкодженнях клітинної мембрани [12, 184].

Випромінювання хвильової та корпускулярної природи впливачі на клітину призводять до продукування вільних радикалів двома шляхами: через пряму та опосередковану дії [12, 184, 95, 102]. Коли енергія іонізуючого випромінювання передається макромолекулам, то такий механізм носить назву «прямий ефект» радіації. [12, 184]. Умовно процес реалізації прямих ефектів опромінення можна поділити на три стадії. На першій (фізичній) стадії енергія випромінювання передається речовині, її молекули збуджуються та іонізуються. Наступна, фізико-хімічна, стадія складається з каскаду реакцій, наслідком яких є перерозподіл надлишкової енергії між збудженими

молекулами. Опромінені молекули, які є у збудженому стані, мають велику кількість можливостей для подальших перетворень, в результаті яких утворюються різноманітні продукти: іони, радикали. Тому навіть у речовині, що складається лише з одного типу молекул, після опромінення генеруються іони і радикали з широким спектром хімічних властивостей. На третій, або хімічній, стадії іони та радикали взаємодіють один з одним та зі сусідніми молекулами, спричиняючи різноманітні структурні пошкодження [12].

У випадку, коли біомолекула була уражена активними реакційноздатними продуктами, які з'явилися після поглинання енергії випромінювання мікрооточенням цієї молекули (наприклад, полярними та неполярними розчинниками), то говорять про опосередковану (непряму) дію радіації [12, 102]. Оскільки вода є домінуючою молекулою в складі живих організмів, вона абсорбує більшу частину енергії іонізуючого випромінювання. Після опромінення молекула води піддається серії хімічних змін, які об'єднують у процес «радіолізу». Продуктами цих перетворень є гідратований електрон ( $\bar{e}_{aq}$ ), атом гідрогену ( $H^\bullet$ ) і гідроксил-радикал ( $OH^\bullet$ ), які також залучаються у пошкодження біологічних систем [184].

Гідроксильний радикал має неспарений електрон, завдяки чому є сильним окисником. Він здатний дифундувати на короткі відстані та реагувати з критичними молекулами-мішенями, внаслідок чого утворюються інші радикали та вторинний електрон, який взаємодіє з молекулою води, і далі генерувати радикали  $OH^\bullet$  та  $H^\bullet$ . Внаслідок таких послідовних реакцій вивільняються електрони з багатьох молекул води ( $\bar{e}_{aq}$ ), які за умов високої оксигенації середовища перетворюються у іони сильного окисника, попередника пероксиду гідрогену,  $O_2^{\bullet-}$  [184]:



Кількість та спектр вільних радикалів, які утворюються внаслідок радіолізу води, залежить від значення рН середовища та величини показника лінійної передачі енергії (ЛПЕ) випромінювання [184]. Ці радикали ініціюють

реакції за участю біомолекул, зокрема, дисоціацію, відщеплення атома гідрогену та ряд інших, в результаті яких утворюються розчинні органічні радикали. Вільні радикали органічних молекул піддаються внутрішньомолекулярним перебудовам реагуючи між собою та з іншими молекулами, що стає причиною формування у клітині стабільних структурних пошкоджень [12]. Відомо, що за дії випромінювання з низьким значенням ЛПЕ (рентгенівське випромінювання та гамма-промені) пошкодження макромолекул розвиваються шляхом непрямого ураження з утворенням вільних радикалів. АФО, зокрема  $O_2^{\cdot-}$  та  $OH^{\cdot}$  мають широкий спектр ефектів, адже вони здатні окиснювати компоненти біологічних мембран й активувати внутрішньоклітинні сигнальні шляхи [101, 172].

**1.1.1. Шляхи реалізації ушкоджень, індукованих дією малих доз іонізуючого випромінювання.** Протягом багатьох десятиліть дослідники у сфері радіобіології працюють над дослідженням ризику для здоров'я людини малих доз радіації. Свідченням цього є факт, що шість доповідей комітету BEIR (Biological Effects of Ionizing Radiation, Біологічні ефекти іонізуючої радіації) присвячені висвітленню цієї проблеми. Сьогодні існує дві гіпотези щодо потенційних ушкоджень малими дозами іонізуючого випромінювання. Згідно з першою гіпотезою, яку підтримують більшість радіобіологів і генетиків, не існує дози опромінення, яку можна вважати повністю безпечною, а вплив випромінювання завжди супроводжується певним рівнем ризику. Прихильники другої гіпотези припускають, що ушкодження внаслідок опромінення в діагностичних цілях, тобто в дозах приблизно 10 сГр, не можуть бути виявлені та, імовірно, не виникають [58, 65, 81, 136, 158, 180, 205].

Вченими досі чітко не визначено, які дози слід вважати малими. Найчастіше під малими розуміють дози, які на один-два порядки перевищують значення дози опромінення, що зумовлені природним радіаційним фоном. Оскільки природний радіаційний фон характеризується потужностями доз близько 0,1–0,4 сГр/рік, то малі дози за умов одноразового опромінення



становлять 1–40 сГр. Це відповідає рекомендаціям Наукового комітету з дії атомної радіації (WNA) [89]. За визначенням Наукового комітету ООН з дії атомної радіації (UNSCEAR) малі дози опромінення становлять 0,2 Гр для іонізуючого випромінювання з низьким значенням ЛПЕ й 0,05 Гр – із високим ЛПЕ [220].

Існують також підходи до визначення малих доз, які базуються на мікродозиметричних дослідженнях. Згідно з такою класифікацією малою можна вважати дозу, при якій у мішені (ядрі чи клітині) відбувається не більше однієї радіаційної події, тобто одноразовий прохід іонізуючого випромінювання через мішень [2, 8]. Загалом, малою можна вважати величину дози, за умови дії якої починає проявлятися радіобіологічний ефект нелетального характеру [211].

Цитотоксичність малих доз випромінювання найчастіше пов'язують із надпродукцією АФО та АФН [101]. За 10–13 с після опромінення у клітинах спостерігається сплеск утворення  $O_2^{\bullet -}$ , який ушкоджує ДНК та протеїни, в тому числі, дихального ланцюга мітохондрій. Теоретичні розрахунки свідчать, що АФО, зокрема  $O_2^{\bullet -}$  та продукт його дисмутації пероксид гідрогену ( $H_2O_2$ ), утворюються навіть при опроміненні 1–2 Грей у цілях медичної діагностики, однак їхні кількості є незначними. Існує велика кількість робіт, в яких описано зміни метаболізму мітохондрій, порушення синтезу АТФ [51, 176] та показано тимчасове нерегульоване відкриття пор мітохондріальної мембрани. Зміни проникності мембрани мітохондрій є причиною транспорту  $Ca^{2+}$  у матрикс та подальшої активації мітохондріальної NOS. Надсинтезований оксид нітрогену інгібує дихальний ланцюг та опосередковує генерування великих кількостей  $O_2^{\bullet -}$  та, в подальшому, – утворення високореакційно здатного  $ONOO^-$  [234]. Власне  $ONOO^-$  вважається оксидантом номер один та є ключовим ефектором у формуванні радіоіндукованих пошкоджень, адже призводить до розвитку оксидативно-нітративного стресу.

## 1.2. Радіоіндукований оксидативно-нітративний стрес

Події, які відбуваються під час латентного періоду між опроміненням та появою пошкоджень є недостеменно зрозумілим не зважаючи на старання вчених протягом більш ніж століття. У 1906 році Бергоньє і Трібондо запропонували закон, який стверджує, що іонізуюче випромінювання викликає більше ушкоджень у клітинах, які швидко діляться [53]. Це пояснює появу «гострої відповіді» після радіаційного ураження у кістковому мозку, слизовій оболонці шлунково-кишкового тракту та у ракових клітинах через їхню загибель за механізмом апоптозу. Однак закон Бергоньє-Трібондо не пояснює пізні реакції тканин, яке характерне для нирки, легені, головного мозку. Пізніше було показано, що такі відтерміновані пошкодження спричинені наявністю специфічних «агентів» – АФО та АФН, які продукуються після опромінення [163]. Отже, вплив радіації викликає одно- та дволанцюгові розриви ДНК і подальший розвиток латентного періоду. Ушкодження тканин судин, порушення проліферації клітин, функціонування системи ренін-ангіотензин, поява хронічного оксидативно-нітративного стресу, гіпоксії та запалення вважаються механізмами пізнього променевого ураження [62].

Порушення обміну речовин і енергії, накопичення активних агентів, що ушкоджують або ініціюють пошкодження клітин, призводячи до розвитку різноманітних патологічних станів, називають окиснювальним, або оксидативним стресом. Його причина – окиснення вільними радикалами жирних кислот, так зване пероксидне окиснення ліпідів (ПОЛ), протеїнів, поряд зі зниженням клітинної антиоксидантної здатності [56, 98, 189, 201]. Цікавим є те, що такі зміни виникають як у опромінених клітинах, так і в їх потомства. Оксидативний стрес може також «передаватися» від клітин-мішеней до сусідніх неопромінених клітин через активацію радіацією специфічних міжклітинних механізмів трансдукції сигналу [102, 148, 149, 200].

В патогенезі ушкодження іонізуючим випромінюванням важливу роль відіграє NO. При радіаційному ураженні NO виконує подвійну роль:

радіозахисну і радіотоксичну. Радіопротекторна роль NO забезпечується антиоксидантними властивостями цієї молекули [92], а в основі радіоіндукованого ушкодження лежить біологічна деградація NO до цитотоксичного пероксинітриту в умовах радіоіндукованого оксидативного стресу [23].

**1.2.1. Надпродукція АФО та АФН після дії малих доз іонізуючого випромінювання.** Біологічні системи часто піддаються впливу АФО та АФН, які утворюються екзогенно як поллютанти у атмосфері (фотохімічний смог, озон, пестициди, ксенобіотики), при дії ультрафіолетового, рентгенівського чи  $\gamma$ -випромінювання, та ендогенно, як побічні продукти реакцій мітохондріального ланцюга транспорту електронів, оксидазних метал-каталізованих реакцій; як продукти метаболізму аргініну чи продукуються нейтрофілами або макрофагами за умов запалення, фагоцитарних оксидативних сплесків та пероксисомального витоку [56, 80, 98, 201, 221, 225, 235].

У ендогенних метаболічних реакціях аеробні клітини продукують такі АФО, як супероксидний аніон-радикал ( $O_2^{\cdot-}$ ), гідроксил- ( $OH\cdot$ ) і гідропероксил-радикали ( $HO_2\cdot$ ), пероксид гідрогену ( $H_2O_2$ ), синглетний кисень ( $O_2^{\cdot}$ ) та органічні пероксиди як нормальні продукти процесів біологічного відновлення молекулярного кисню [87]. За умов гіпоксії мітохондріальний дихальний ланцюг також продукує NO, з якого утворюються інші АФН [56, 178, 189].

Завдяки своїй високій реакційній здатності АФО та АФН формують каскад реакцій перетворень однієї активної форми у іншу, а також можуть генерувати інші активні метаболіти, в тому числі, альдегіди – малоновий диальдегід та 4-гідроксिनоненал, індукуючи надмірну пероксидацію ліпідів. Протеїни, ліпіди, вуглеводи та нуклеїнові кислоти є мішенями оксидативної атаки, відомо, що модифікація цих молекул поглиблює радіоіндукований оксидативно-нітративний стрес [56, 60, 189, 221, 235].

Утворення вільних радикалів залежить від типу випромінювання і хоча спектр АФО та АФН, які синтезуються після дії радіації, аналогічний до того, який характерний для звичайних метаболічних процесів, існують відмінності в їхньому розподілі у клітині. За фізіологічних умов АФО та АФН виконують роль сигнальних молекул, які регулюють біохімічні клітинні процеси, тоді як їхній надлишок, характерний у післярадіаційний період, є токсичним [57].

Цікаво, що математичні моделі, розроблені для вимірювання здатності випромінювання індукувати оксидативний стрес, в області величин доз забруднення виявленого у Чорнобилі, вказують, що малі дози іонізуючого випромінювання індукують продукування лише невеликих кількостей АФО, які не впливають на концентрації антиоксидантів у клітинах [204]. Тим не менш, за останні 15 років показано, що невелика локальна модифікація спектру АФО може викликати зміну внутрішньоклітинних сигнальних каскадів [82, 90, 181].

### **1.2.2. Роль оксиду нітрогену в розвитку радіоіндукованих порушень**

#### **1.2.2.1. Внутрішньоклітинний синтез та метаболізм оксиду нітрогену.**

Монооксид нітрогену (NO) – вільнорадикальний газ з часом напівжиття в біологічних об'єктах 5-10 с, безперервно утворюється в різних клітинах людини і тварин. Через низьку молекулярну масу і високу ліпофільність NO володіє високою дифузійною спроможністю, що дає цій молекулі змогу виступати як внутрішньоклітинний та міжклітинний месенджер або як цитотоксична молекула [93, 97, 140, 160]. NO бере участь у реалізації багатьох фізіологічних функцій, в тому числі вазодилатації, регулюванні судинного тону, процесів агрегації та адгезії тромбоцитів, передачі сигналу у нейронах, за регулювання імунного захисту та регулювання клітинного дихання [14, 170, 228].

*In vivo* NO синтезується з амінокислоти L-аргініну та молекулярного кисню в реакції, що каталізується ензимами родини NO-синтаз (NOS; L-

аргінін, NADPH: кисень оксидоредуктаза; EC 1.14.13.39) [125, 140]. Для функціонування цих ензимів необхідна ціла низка кофакторів – нікотинамідаденіндинуклеотидфосфат (НАДФН), флавінаденіндинуклеотид (ФАД), флавінмононуклеотид (ФМН), (6R)-5,6,7,8-тетрагідро-L-біоптерин (ВН<sub>4</sub>), протопорфірин ІХ (гем) та кальмодулін (СаМ) [14, 34, 97].

Всі ензими родини NOS є гомодимерами, у їх структурі розрізняють оксигеназний та редуктазний домени. Молекулярна маса мономера коливається в межах від 110 до 160 кДа, залежно від особливостей ізоформ. N-кінцевий оксигеназний домен кожного мономера містить сайти зв'язування простетичної гемової групи, ВН<sub>4</sub> і L-аргініну. Через сайт розпізнавання СаМ оксигеназний домен зв'язаний з редуктазним, який на С-кінці містить сайти зв'язування ФАД, ФМН і НАДФН (рис. 1.1) [34, 97].

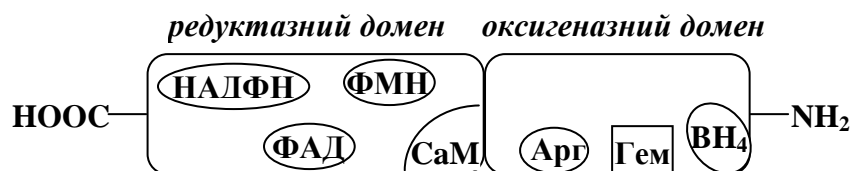


Рис. 1.1. Схематичне зображення структури мономера ензимів родини NO-синтаз [36].

NOS каталізує двостадійне окиснення L-аргініну з перенесенням п'яти електронів, через N-гідрокси-L-аргінін до цитруліну та NO. На першому етапі відбувається дво-електронне окиснення L-аргініну до N-гідрокси-L-аргініну з використанням двох відновних еквівалентів – НАДФН (рис. 1.2). При цьому ВН<sub>4</sub> перетворюється на ВН<sub>3</sub>, виконуючи роль прямого донора електронів для гемової групи. Друга стадія реакції, каталізованої NOS, полягає в трьо-електронному аеробному окисненні N-гідрокси-L-аргініну до NO і цитруліну, з використанням лише одного НАДФН. Протягом каталітичного циклу електрони один за одним переносяться на гемову групу. Електрони з НАДФН переносяться до окиснених форм ФМН чи ФАД і тут «зберігаються» [97]. Для синтезу NO необхідне повторення каталітичного циклу двічі [86].

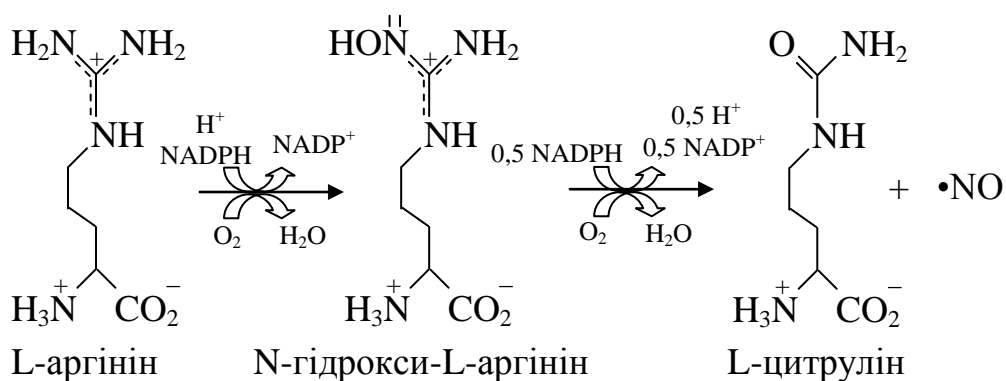


Рис. 1.2. Реакція окиснення L-аргініну до цитруліну та NO [97].

Продуктування NO відбувається за наявності у клітинах L-аргініну, O<sub>2</sub>, НАДФН та ВН<sub>4</sub>, проте у разі відсутності або нестачі L-аргініну чи ВН<sub>4</sub> NOS генерує супероксид-аніон разом із NO [23, 125, 140, 150, 199].

Таблиця 1.1

Гени ізоформ NOS людини [34]

Ізоформи NOS	Структура та розмір гена	Хромосомна локалізація	Кількість амінокислот (АК) та молекулярна маса протеїну
nNOS	29 екзонів, 28 інтронів, комплексна структурна організація, локус у регіоні з > 200 kbp	12q24.2–12q24.3, 12 хромосома	1535 АК, 161 кДа
iNOS	26 екзонів, 25 інтронів, 37 kbp	17cen–q11.2, 17 хромосома	1153АК, 131 кДа
eNOS	26 екзонів, 25 інтронів, 21-22 kbp	7q35–7q36, 7 хромосома	1203 АК, 133 кДа

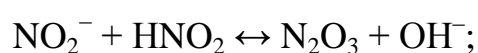
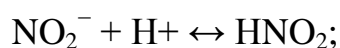
Було ідентифіковано три абсолютно різні ізоформи NOS, які кодуються різними генами (табл. 1.1), характеризуються різною локалізацією в клітині, регулюванням, каталітичними властивостями та чутливістю до дії інгібіторів. Існує загальноприйнята номенклатура ізоформ NOS: нейрональна NOS (nNOS, або NOSI), індукцйбельна NOS (iNOS, або NOSII) та ендотеліальна NOS (eNOS, або NOSIII) [105, 150, 170]. Розрізняють також конститутивні (cNOS) та індукцйбельну NOS (iNOS). Ферменти першої групи (nNOS та eNOS) завжди наявні в організмі. Зазначимо, тільки у нейрональних клітинах NOS є

цитозольним білком, в інших тканинах конститутивні ізоформи є мембранозв'язаними. У разі активації ці ензими сприяють вивільненню невеликої кількості NO, що вимірюється пікомолями, у відповідь на рецепторну та фізичну стимуляцію. Конститутивні ізоформи NOS функціонують у  $\text{Ca}^{2+}$ -залежний спосіб. Ці ензими активуються фосфорилуванням за кількома залишками серину, треоніну або тирозину, наприклад, найбільше змін у функціонуванні eNOS відмічено у разі фосфорилування серину 1177 (активація), треоніну 495 (інгібування) [86, 231].

Після впливу на будь-які клітини цілої низки факторів (бактеріального ліпополісахариду, інтерферону  $\gamma$ , фактору некрозу пухлин  $\alpha$ , інтерлейкіну-1 $\beta$ , ендотоксинів та інших) активується цитозольна iNOS [14]. Не зважаючи на те, що молекула цієї ізоформи NOS містить нековалентно зв'язаний кальмодулін, вона каталізує утворення NO у  $\text{Ca}^{2+}$ -незалежний спосіб. Її активація супроводжується підвищенням транскрипції генів. Кількість NO, що утворюється під впливом iNOS, може коливатися і досягає наномолей, а продукція NO зберігається тривалий період часу [105, 120, 231].

У клітинах існує кілька варіантів сплайсингу та посттрансляційних модифікацій ізоформ NOS і, як вважається, окремі модифікації спричиняють утворення ще однієї мітохондріальної NOS (mtNOS) [37]. Цей ізозим експресується конститутивно, його молекула закорена у внутрішній мембрані мітохондрій та каталізує реакцію аналогічно як iNOS [18].

Існує також незалежний від NOS шлях синтезу NO: нітрати і нітрити можуть безпосередньо відновлюватися до оксиду нітрогену за присутності ксантиноксидази або протеїнів, які володіють нітрит- чи нітрат-редуктазою активністю (наприклад, гемові протеїни) [26, 91, 111, 134, 140, 141, 166, 170]. Нітрити можуть додатково піддаватися диспропорціонуванню з утворенням NO. Такий механізм утворення NO спостерігається у разі патологічних станів, для яких характерним є зниження рН середовища [26, 140, 166, 223]:





Основний шлях метаболізму NO – реакція з гемопротейнами. Клітинні ефекти оксиду нітрогену реалізуються за рахунок зв'язування з гемовмісним ферментом гуанілатциклазою, NO також реагує з оксигемоглобіном еритроцитів утворюючи метгемоглобін. Внаслідок цього NO перетворюється в іон нітриту ( $\text{NO}_2^-$ ), а за наявності гемового  $\text{Fe}^{2+}$   $\text{NO}_2^-$  – у більш стабільний іон нітрату ( $\text{NO}_3^-$ ). У клітинах кліренс NO може відбуватися також шляхом його спонтанного швидкого окиснення киснем до  $\text{NO}_2^-$  і  $\text{NO}_3^-$  [8, 14, 73, 91, 134, 140]. Нітрати, безсумнівно, є основним кінцевим продуктом окиснення NO і рівні цього метаболіта в крові та тканинах перевищують вміст нітриту принаймні на два порядки ( $\text{mM NO}_3^-$  проти  $\text{nM NO}_2^-$ ) [140, 142].

Другий шлях – утворення нітрозотіолів і динітрозольних комплексів негемового заліза, які представляють депо-форму NO [8, 26]. S-нітрозотіоли генеруються в клітинах у разі взаємодії нітрит-аніонів з SH-групами багатьох пртеїнів та низькомолекулярних сполук, наприклад, трипептиду глутатіону [2]. S-нітрозотіоли окрім ролі донорів NO можуть брати участь в реакціях транснаїтрузування з утворенням нових S-нітрозотіолів. Реакції S-нітрузування критичних залишків цистеїну залучені у регулювання функцій пртеїнів за допомогою механізмів, аналогічних до реакції фосфорилування [140].

Реакція NO та супероксид-аніону ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) з подальшим утворенням пероксинітриту ( $\text{OONO}^-$ ) і гідроксилрадикалу ( $\text{OH}\cdot$ ) – це ще один шлях метаболізму NO. За патологічних умов NO може також перетворюватися в інші АФН (нітроніум ( $\text{NO}^+$ ), нітроксил-аніон ( $\text{NO}^-$ )). Ці сполуки є високореакційними вільними радикалами, які виявляють деструктивні властивості щодо біомолекул, зокрема пртеїнів та ліпідів [8, 14].

**1.2.2.2. NO-залежна відповідь клітин на дію іонізуючого випромінювання.** Роль NO і АФН у радіаційній відповіді залишається не до кінця зрозумілою. Існують повідомлення про підвищення зростання активності NOS після впливу іонізуючого випромінювання у печінці, легені,



нирці, кишечнику, серці, головному та кістковому мозку після опромінення [93, 96, 170]. Продукція NO інтенсифікується інтерфероном  $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ) або ліпополісахаридами (ЛПС) у макрофагах, які були опромінені [155].

NO здатний стимулювати внутрішньоклітинні сигнали шляхом активації протеїнкіназ або реагуючи з АФО та іонами металів. Основними мішенями NO у клітинах є протеїнкінази, фосфатази та фактори транскрипції, які у активному чи алостеричному центрах містять SH-групи чи іони металів. Поряд із модуляцією активності кіназ NO активує гуанілатциклазу, більш того він здатний регулювати активність різних членів надродини мітоген-активуєчі протеїнові кіназ (МАРК), зокрема p38 та JNK/SAPK [119].

NO може стимулювати пероксидне окиснення ліпідів, при цьому за певних умов він є посередником захисних реакцій в мембранах, адже інгібує  $O_2^{\bullet-}$ - та  $OONO^-$ -індуковане ПОЛ. Механізми, залучені в пригнічення ПОЛ оксидом нітрогену можуть бути наступні: вловлювання радикалів пероксидів ліпідів, регулювання активності ензимів – циклооксигенази, ліпоксигенази і цитохрому P-450 [192].

Однак, ключовим елементом формування контрастної ролі оксиду нітрогену у разі фізіологічних та патологічних умов є пероксинітрит [49, 52, 93, 170, 214]. Вважається, що сайти утворення  $OONO^-$  просторово пов'язані з джерелами  $O_2^{\bullet-}$  (наприклад, НАД(Ф)Н-оксидазами плазматичної мембрани, комплексами мітохондріального дихання) оскільки NO є більш стабільним та здатним до дифузії вільним радикалом порівняно з  $O_2^{\bullet-}$ . У специфічних компартментах клітини *in vivo* продукується 50–100 мкМ  $OONO^-$  за хвилину. Зважаючи на короткий період напівжиття  $OONO^-$  за фізіологічних значень рН (приблизно  $10^{-3}$  сек) та його здатність перетинати клітинну мембрану шляхом транспорту аніонними каналами вважається, що утворений пероксинітрит одразу ж реагує зі сусідніми молекулами на відстані приблизно 5–20 мкм [214]. При цьому з більшістю біомолекул він реагує з доволі низькою швидкістю та високою селективністю [49, 170].

Пероксинітрит здатний окиснювати аскорбінову кислоту, тіоли, модифікувати протеїни (нітруванням), ліпіди (окисненням і нітруванням) та нуклеїнові кислоти (окисненням та нітруванням), розкласти вуглеводи [93, 214]. NO та  $\text{OONO}^-$  спричиняють швидке зниження споживання кисню інгібуючи комплекси I та IV мітохондріального ланцюга транспорту електронів. NO зворотно інгібує мітохондріальне дихання конкуруючи з киснем за сайт зв'язування в комплексі I, тоді як  $\text{OONO}^-$  пригнічує транспорт електронів на комплексі I та, меншою мірою, на комплексі IV шляхом незворотних окисних модифікацій [52].

Мітохондрії відіграють важливу роль у процесі пероксинітрит-опосередкованої клітинної смерті. Вплив високих концентрацій переоксинітрит-аніону часто призводить до швидкої загибелі клітин за механізмом некрозу внаслідок порушення енергетичного обміну. З іншого боку, більш низькі концентрації  $\text{OONO}^-$  призводять до повільної, запрограмованої смерті клітин по типу апоптозу. Відомо, що пероксинітрит може стимулювати вивільнення з мітохондрій фактора, індукуючого апоптоз (AIF), який ініціює фрагментацію ДНК і, при цьому, активація каспаз може не відбуватися [239]. Важливим є той факт, що низькі рівні  $\text{OONO}^-$ , які постійно утворюються за фізіологічних умов толеруються клітиною, адже можуть детоксикуватися тіол-залежними антиоксидантними системами, а дисфункції клітин або їхня загибель виникають після стійкого підвищення продукції цього цитотоксину у кількостях, які не можуть бути нейтралізовані [214].

Хоча здебільшого пероксинітриту приписують токсичні ефекти, але його біологічна роль залишається незрозумілою: можливо він приймає участь в регуляції активності протеїнів через їх нітрування та в індукції апоптозу, в основному через активацію фосфорилуванням JNK кінази [49, 156, 183].

**1.2.2.3. Нітрування протеїнів за залишками тирозину як індикатор нітративного стресу.** Залишки амінокислот тирозину та цистеїну є високо чутливими до окиснення АФН [206]. Нітрування протеїнів за залишками

тироzinу – ковалентна модифікація, що виникає в результаті приєднання нітро-групи ( $\bullet\text{NO}_2$ ), до гідроксильної групи ароматичного кільця тирозину. Нітрування тирозину призводить до зміни структури та функцій протеїнів, у результаті цієї модифікації утворюються антигенні епітопи, змінюється каталітична активність ензимів, організація цитоскелету, а також порушується клітинна сигнальна трансдукція. У зв'язку з цим нітрування протеїнів розглядається як центральний аспект пероксинітрит-опосередкованої цитотоксичності та вважається найкращим маркером нітративного стресу [2, 161, 170, 208, 233].

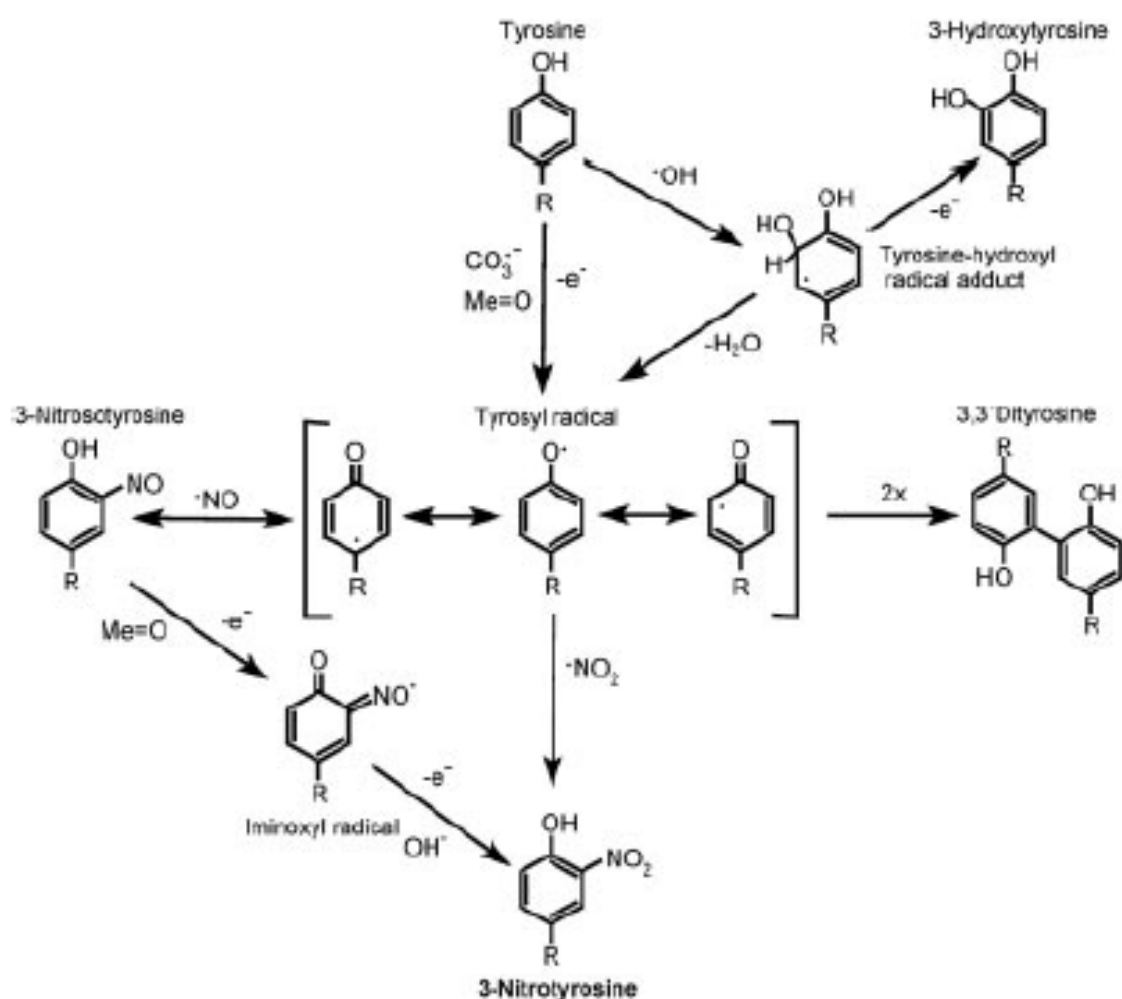


Рис. 1.3. Реакції нітрування тирозину [183].

Тирозин не реагує безпосередньо з пероксинітритом: радикали, які беруть участь у реакції, можуть утворюватися після гомолізу  $\text{OONO}^-$  ( $\bullet\text{HO}$  і  $\bullet\text{NO}_2$ ) або в результаті реакції між цією сполукою та  $\text{CO}_2$  ( $\bullet\text{CO}_3^-$  і  $\bullet\text{NO}_2$ ) [156,

170, 183, 218]. Нітрування також посилюється у разі присутності металів зі змінною валентністю за рахунок утворення вторинних радикалів та  $\bullet\text{NO}_2$ . Спочатку від залишку тирозину відщеплюється атом гідрогену з утворенням тирозил-радикал, який швидко реагує з  $\bullet\text{NO}_2$  та, як наслідок, продукує 3-нітро-L-тирозин (рис. 1.3) [48, 50, 63, 110, 122, 156, 170, 183]. Далі може відбуватися вторинна реакція сполучення двох тирозилових радикалів, продуктом якої є дитирозин [48, 50, 110, 170, 183].

Нітрування протеїнів за нормальних умов відбувається у всіх тканинах організму людини та тварин [37]. Роль нітрування протеїнів у фізіології клітини є не до кінця зрозумілою. Причиною цього є невизначеність долі таких модифікованих протеїнів. Вчені припускають, що нітровані протеїни або деградують або можуть піддаватися ферментативному «денітруванню» [37, 109, 161], хоча доказів наявності процесу "денітрації" в природних умовах існує дуже мало [110, 196]. Камісакі та співавтори показали, що нітрогрупа тирозину може бути неензиматично відновлена до ніротирозину, ця реакція залежна від гема і тіолових білків [114]. Відновлення до амінотирозину, імовірно, сприяє подальшому видаленню модифікації нітроредуктазами, існування яких підтверджено *in vitro* [161].

Нітрування протеїнів може бути однією з реакцій, залучених у клітинні механізми трансдукції сигналу [110, 161, 196]. Наприклад, у судинах тварин нітрування протеїнів виконує сигнальну роль або впливаючи на процеси фосфорилування / дефосфорилування, або безпосередньо завдяки нітруванню/денітруванню. За умов неглибокого метаболічного стресу існує баланс між тирозиновим нітруванням / денітруванням та фосфорилуванням / дефосфорилуванням і відбувається трансдукція сигналів, а за умов глибокого оксидативно-нітративного стресу нітрування протеїнів переважає над денітруванням, внаслідок чого утворюються агрегати нітрованих протеїнів, які в подальшому деградують у протеасомах [161].

Надмірні кількості 3'-ніротирозину накопичуються при старінні, після впливу іонізуючого випромінювання та у разі численних захворювань, які

супроводжуються розвитком запалення, накопиченням АФО і NO, – серцево-судинних, нейтродегенеративних, цукрового діабету, онкологічних, синдрому набутого імунодефіциту (СНІДу) та септичного шоку [37, 122, 129, 156, 193, 233]. Патогенез цих захворювань пов'язаний зі змінами у залучених у сигнальну трансдукцію реакцій фосфорилування тирозину [177], мітохондріальною дисфункцією, викликаною нітруванням протеїнів [64, 219].

**1.2.3. Інтенсифікація процесів пероксидного окиснення ліпідів за дії радіації.** Біологічні мембрани можуть піддаватися інтенсивній окисній неферментативній деградації, оскільки ненасичені жирні кислоти (ліноленова, арахідонова та інші) фосфоліпідів надзвичайно чутливі до окиснення [12]. Такі реакції об'єднують у процес пероксидації ліпідів. Тобто, пероксидація ліпідів – це пошкодження ліпідів, які містять велику кількість карбон-карбонових подвійних зв'язків [74].

Активація ПОЛ призводить до виходу з мембрани ліпідів, які піддаються швидкому окисненню, поряд зі збільшенням кількості резистентних до окиснення ліпідів. Це в свою чергу сповільнює реакції ПОЛ і повертає цей процес до норми за фізіологічних умов. Зміни швидкості ПОЛ впливають на структурні характеристики біологічних мембран – знижують їхню плинність, модифікують мембранний потенціал, а також впливають на активність інтегральних протеїнів – ензимів, каналоутворюючих протеїнів та рецепторів [12, 74]. Як наслідок, мембрана перестає виконувати свою найбільш важливу бар'єрну функцію [74].

Первинними ініціаторами неферментивних ланцюгових процесів ПОЛ у клітині є електрони, доновані  $Fe^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ , семіхінонами; а сигнально-пусковими продуктами є  $O_2^{\cdot-}$ ,  $H_2O_2$ ,  $OH\cdot$ ,  $\cdot NO$ , інші АФО та АФН [12, 60].

При окиснювальному розпаді ліпідних гідропероксидів утворюються високолабільні продукти ПОЛ – жирнокислотні фрагменти, які містять пероксидні, епоксидні, альдегідні і кетонні групи, кон'юговані дієни, альдегіди (малоновий диальдегід), акролеїн, вуглеводні (пентан, етан) та інші продукти

(табл. 1.2), вміст яких у клітині є відносно високим, час існування – доволі значний, і це створює умови для окиснення ними практично будь-яких макромолекул в клітині [12, 60, 98].

Надмірне утворення продуктів ПОЛ призводить до накопичення пероксидів ліпідів. Пероксидні радикали реагують з молекулами жирних кислот, продукуючи високотоксичні гідроперокси (LOOH) та новий вільний радикал. Цей процес, протікаючи лавиноподібно, може спричинити швидке руйнування клітинних структур. В основі патогенезу багатьох захворювань лежить порушення рівноваги між процесами утворення та нейтралізації продуктів ПОЛ [12, 74, 98].

Таблиця 1.2

## Вміст і деякі характеристики продуктів ПОЛ [3]

	Вміст в клітині (в нормі), моль/л	Період напівжиття в секундах при 37 °С	Властивості
алкоксил-радикал (LO <sup>•</sup> )	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-6</sup>	ініціація ланцюгової реакції ПОЛ
пероксил-радикал (LO <sub>2</sub> <sup>•</sup> )	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-2</sup>	ініціація ланцюгової реакції ПОЛ
молекулярні продукти ПОЛ (LOOH, LO <sub>2</sub> , R-LO)	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-2</sup> – 1	висока здатність до дифузії і оксидазної модифікації

При дії іонізуючого випромінювання у клітинах зростає рівень гідропероксидів та утворених ними кінцевих продуктів ПОЛ внаслідок інтенсифікації ланцюгового процесу багатократного накопичення кінцевих продуктів спостерігається їх надлишок, який токсично впливає на клітину [12, 98]. Показано, що після опромінення у клітині, яка вступила на шлях апоптозу активуються ензими, що сприяють полегшенню неензиматичного ПОЛ. Наприклад, підвищується активність естераз, які розщеплюють ефірні зв'язки компонентів мембран, вивільняються ненасичені жирні кислоти, які піддаються окисненню та продукують LOOH [74].

### 1.3. Функціонування системи антиоксидантного захисту у нормі та за умов опромінення

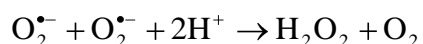
В аеробних організмів кисень необхідний для ефективного продукування енергії, але як це не парадоксально, стає причиною хронічного токсичного стресу в клітинах. Таким чином, повинні існувати захисні механізми для видалення токсичних побічних продуктів метаболізму кисню. Захист від оксидативного пошкодження, опосередкованого вільними радикалами, у всіх організмах каталізується великою кількістю різноманітних систем антиоксидантного захисту, які або запобігають утворенню АФО та АФН, або конвертують більш реактивні метаболіти в менш активні чи повністю інактивують їх. Ці антиоксидантні системи захисту відіграють ключову роль у виживанні прокаріотичних й еукаріотичних організмів [135].

Антиоксидантні механізми можуть бути ензиматичними (практично завжди внутрішньоклітинні) і неензиматичними (як внутрішньоклітинні, так і позаклітинні) [60]. Такі антиоксидантні системи включають в себе ряд ферментів: основних – супероксиддисмутази, каталази, глутатіонпероксидази, редуктази, глутатіон-S-трансферази; і ряд інших тіол-специфічних ензимів, метіонінсульфоксидредуктази та тіоредоксинредуктази. Кілька метал-зв'язуючих протеїнів, зокрема церулоплазмін, феритин і трансферин, також залучені в антиоксидантний захист поряд із метаболітами і кофакторами (НАДФ<sup>+</sup>, НАДФН, НАД<sup>+</sup>, НАДН, ліпоева кислота, сечова кислота, білірубін, глутатіон), деякими компонентами продуктів харчування (вітамін С і Е) та металами (Mg<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>) [60, 75, 98].

Центральними у антиоксидантному захисті організму є ензими СОД, ГПО, КАТ [40]. Ядерний транскрипційний фактор Nrf2 є головним регулятором експресії генів цих антиоксидантних ензимів [108].

Супероксиддисмутази (СОД, супероксид: супероксид – оксидоредуктаза; ЕС 1.15.1.1) – унікальна родина металопропротеїнів, що каталізують реакцію

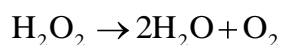
дисмутації – взаємодії двох супероксидних аніон-радикалів, перетворюючи  $O_2^{\bullet-}$  в менш токсичний пероксид гідрогену та кисень [52, 56, 107, 135, 203].



Фізіологічна роль СОД полягає в участі у метаболізмі кисню в клітинах та захисті від прямого і непрямого пошкодження вільними радикалами, утвореними у реакціях перетворення кисню. Розрізняють чотири ізоформи СОД залежно від металу-кофактору та їх локалізації у клітині. Манган-залежна СОД (MnСОД) – тетрамер, локалізується в матриксі мітохондрій всіх аеробів, її молекулярна маса 86-88 кДа; мідь/цинк-залежна СОД (Cu/ZnСОД, СОД1) в основному присутня в цитоплазмі еукаріотичних клітин, ідентифікується також в ядрі, цей білок є гомодимером з молекулярною масою 32,5 кДа; ферум-залежна СОД (FeСОД) переважає в цитозолі, хлоропластах або мітохондріях прокаріотів [56, 135, 203] та екстрацелюлярна Cu/ZnСОД (ЕССОД) – ізоформ із найбільшою молекулою (135 кДа) серед усіх протеїнів цієї родини, знайдена в екстрацелюлярних рідинах або в складі мембран ссавців [107]. Порівняння амінокислотної послідовності СОД з клітин різних організмів вказує на високу ступінь консервативності структури. Крім того, СОД характеризується надзвичайною структурною стабільністю і є одним з найбільш термостабільних глобулярних білків.

Пероксид гідрогену, який утворився в супероксиддисмутаційній реакції далі деградує під дією каталази, пероксиредоксинів та глутатіонпероксидаз [203]. ГПО має більшу афінність щодо  $H_2O_2$  при його низьких концентраціях (1 мкМ), ніж КАТ, проте здатна конвертувати лише 8 % від загального об'єму  $H_2O_2$  в клітині, що свідчить про провідну роль КАТ у руйнуванні  $H_2O_2$  [11].

Каталаза (гідроген пероксид: гідроген пероксид – оксидоредуктаза; ЕС 1.11.1.6) – тетрамерний гемвмісний протеїн, який розщеплює пероксид гідрогену ( $H_2O_2$ ) до води та молекулярного кисню:



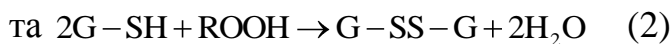
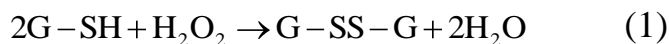
Цей ензим є хромопротеїном з молекулярною масою 250 кДа, його простетична група представлена окисненим гемом. КАТ забезпечує



перетворення 44 000 молекул  $\text{H}_2\text{O}_2$  за секунду. Ця реакція не потребує затрат енергії, але є залежною від відновлюючого потенціалу пари  $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$  [45].

У клітинах каталаза локалізована в пероксисомах, в яких знаходяться і ензими, що продукують необхідний для реалізації нормальної життєдіяльності організму пероксид гідрогену, зокрема, для реалізації неспецифічного імунного захисту. Мітохондрії і ендоплазматичний ретикулум містять мало молекул КАТ. Таким чином, внутрішньоклітинний  $\text{H}_2\text{O}_2$  не елімінується, якщо не дифундує в пероксисому [56, 135].

Глутатіонпероксидаза (ГПО, глутатіон: гідроген пероксид – оксидоредуктаза; ЕС 1.11.1.9) перетворює пероксид гідрогену, гідропероксиди вільних та етерифікованих жирних кислот, гідропероксиди фосфоліпідів, нуклеотидів, нуклеїнових кислот і, ймовірно, протеїнів в нетоксичні молекули до того, як вони почнуть генерувати вільні радикали, відновлюючи їх із окисненням глутатіону:



ГПО – тетрамерний глікопротеїн з молекулярною масою приблизно 80 кДа, кожна субодиниця містить 1 атом селену в складі селеноцистеїну, що, в значній мірі, й забезпечує антиоксидантні властивості ензиму.

Ферменти цієї родини є у цитоплазмі у мілімолярних кількостях, а також присутні у матриксі мітохондрій [135]. У людини було ідентифіковано вісім ізоформ ГПО. ГПО1 є найбільш поширеним ізозимом, локалізований він у цитоплазмі. Субстратом реакції, яку він каталізує є пероксид гідрогену. ГПО4 також експресується практично у всіх клітинах ссавців, але на більш низькому рівні, руйнує гідропероксиди ліпідів. ГПО2 та ГПО3 є позаклітинними ензимами, експресуються в кишечнику та плазмі, відповідно [164].

Окиснений глутатіон, який утворюється під дією ГПО, відразу ж відновлюється флавіновою глутатіонредуктазою за рахунок НАД(Ф)Н, і тому рівновага реакцій 1 та 2 практично повністю зміщена вправо [135].

Глутатіонредуктаза (ГР, глутатіон: НАД<sup>+</sup> – оксидоредуктаза; ЕС 1.6.4.2) – флавіновий ензим, функцією якого є підтримка високої внутрішньоклітинної концентрації відновленого глутатіону (GSH). ГР є гомодимером з молекулярною масою 105 кДа, кожна субодиниця на одному кінці містить одну молекулу ФАД, а на іншому – НАДФН-зв'язуючі ділянки. ГР каталізує зворотнє НАД(Ф)Н-залежне відновлення дисульфідного зв'язку окисненого глутатіону (G-SS-G) з утворенням двох молекул GSH:



Найвища активність ГР відмічена у еритроцитах, нирках, дещо нижча – печінці, мозку та в м'язах [135].

Опромінення призводить до виснаження ендogenous антиоксидантних ресурсів [121] та, як наслідок, до розвитку хронічних захворювань [83]. Використання екзогенних антиоксидантів в лікуванні променевої хвороби та інших захворювань, пов'язаних з оксидативним стресом (наприклад, хвороба Крона, ревматоїдний артрит, остеоартрит) є доволі поширеним [79]. Адже показано, що СОД захищає інші ензими, мітохондрії, мембрани, мікросоми, ДНК неопромінених клітин ссавців; його протизапальні властивості було виявлено задовго до того, як було ідентифіковано ензиматичні функції протеїну [40]. Хоча захисна роль антиоксидантів полягає в унеможливленні залучення АФО в прогресування захворювань [230], доза та час їхнього впливу може мати різні наслідки. Наприклад,  $\text{O}_2^{\cdot-}$  ініціює та термінує вільнорадикальні ланцюгові реакції, що призводять до пероксидного окиснення ліпідів [153]. Таким чином, залежно від вмісту в клітині СОД може не полегшувати радіаційне ураження, а, навпаки, посилювати токсичні ефекти [40].

Малі дози радіації з низьким значенням ЛПЕ активують антиоксидантний захист (наприклад, підвищують рівень глутатіону активуючи експресію генів  $\gamma$ -глумалілцистеїн-синтетази) [70, 115, 123]. З іншого боку, випромінювання з високою ЛПЕ викликають розвиток оксидативного стресу в опромінених та сусідніх неопромінених клітинах [41]. У потомстві таких

неопромінених клітин оксидативний стрес пов'язаний зі зниженням активності MnCOD, Cu/ZnCOD, КАТ та ГПО [57].

#### **1.4. Сучасні підходи та принципи радіопротекції**

Минуло більш ніж півстоліття з того часу, як були відкриті перші хімічні сполуки, які зменшують ушкоджуючу дію іонізуючого випромінювання. Сьогодні розробка методів захисту проводиться для індивідуальної профілактики з використанням радіопротекторів, що захищають організм від зовнішнього опромінення, яке викликає гостре променеве ураження; використанням засобів, які підвищують радіорезистентність, зокрема в медицині при променевої терапії; використанням харчових добавок і препаратів, що підвищують стійкість біологічних об'єктів за хронічного опромінення; виведення радіонуклідів із організму [13].

Новий період в радіобіологічних дослідженнях, пов'язаний з проблемами радіоекологічної кризи, диктує нові підходи до розробки методів хімічного захисту від ефектів іонізуючого випромінювання. До пошуку традиційних радіопротекторів додалося вивчення природних харчових продуктів і препаратів – адаптогенів, здатних не викликаючи побічної дії на організм, знижувати або попереджувати ефекти низькоінтенсивного випромінювання у поєднанні з іншими екстремальними природними і техногенними факторами [13, 90].

Після накопичення багатого фактичного матеріалу по вивченню променевої патології вчені звернулися до ідей древньої народної медицини: допомогти організму мобілізувати, посилити утворення власних захисних ресурсів. Радіопротекторні агенти повинні проявляти хоча б одну з таких властивостей: антиоксидантну, протизапальну або імуномодулюючу активність, інгібувати NOS [3]. Відомо, що поліфеноли рослинного походження володіють всіма переліченими властивостями. Крім цього,

більшість фенольних сполук нейтралізують АФО та АФН, надмірні кількості яких надсинтезуються у клітинах після опромінення [234].

**1.4.1. Протекторна дія поліфенольних сполук з виноградних вин у разі розвитку радіоіндукованих уражень.** Фенольні сполуки – вторинні метаболіти рослин є ефективними протекторними агентами. Вони знайдені в листяній частині та плодах, таких як яблука, цитрусові, винограді, горіхах, овочах, у зернових, зеленому і чорному чаї, зернах кави, прополісі. Більшість фенолів відповідають за колір листя, плодів і квітів рослин [33, 90, 106, 132, 143, 151, 165, 171, 182, 212].

В останні десятиліття фенольним сполукам науковці та громадськість приділяють велику увагу. Причиною цього є відкриття «французького парадоксу», найбільш популярне пояснення якого полягає у позитивному впливі щоденного споживання червоних вин, багатих на фенольні сполуки [76, 132]. Найкращі фахівці у результаті масштабних досліджень, які охопили майже 300 тисяч осіб, дійшли однозначного висновку: при вживанні щоденно 150-400 мл сухого червоного вина виникає достовірне зниження ризику серцево-судинних та неврологічних патологій, цукрового діабету, багатьох типів онкологічних захворювань та порушень функціонування шлунково-кишкового тракту. Ці позитивні ефекти пов'язують із дією поліфенолів виноградного вина. Крім того, поліфенольні сполуки володіють протипроменевим ефектом – виводять радіонукліди з організму [99].

Фармакологічні, медичні та біохімічні властивості фенолів широко досліджуються. Показано їхні антиоксидантні, вазодилатуючі, антионкологічні, протизапальні, імуностимулюючі, протиалергічні, противірусні й естрогенні ефекти, вони інгібують фосфоліпазу А<sub>2</sub>, циклооксигеназу, ліпоксигеназу, глутатіонредуктазу і ксантиноксидазу, хелатують іони металів [33, 44, 68, 90, 132, 212, 226]. *In vitro* поліфеноли вина скавенджерують вільні радикали, зокрема супероксидний аніон-радикал, гідроксил-радикал, а також інгібують реакції ПОЛ [44, 68, 76, 224].

Дослідження проведені *in vivo* є менш переконливі, деякі з них свідчать про вплив вина на антиоксидантну систему клітин крові та на процеси окиснення ліпопротеїнів низької щільності (ЛПНЩ) [76, 100, 222]. У клітинах, інкубованих з фенолами, індукується експресія генів, що кодують протеїни, які залучені в антиоксидантну детоксикацію. Ці гени регулюються специфічним енхансером – елементом антиоксидантної відповіді (antioxidant response element, ARE). Поліфеноли червоного вина можуть змінювати активність NOS через вплив на концентрацію  $Ca^{2+}$  в клітині та фосфорилування ключових протеїнів шляху фосфатидилінозитил-3' кінрази/Akt за умов короткотривалої інкубації з клітинами. У випадку довготривалої інкубації ці сполуки змінюють активність NOS регулюючи експресію генів конститутивних ізоформ цього ензиму NOS [35, 44, 76, 169].

Більшість поліфенолів за допомогою пасивного транспорту всмоктуються у кишечник, інтенсивно метаболізують в товстому і тонкому кишечнику та печінці, де вони перетворюються на метаболіти з більш високою антиоксидантною та естрогенною активністю. У плазмі крові виявлено поліфеноли у сульфатованій, глюкурваній та метильованій формах. Більш того, дуже велика частина поліфенолів піддаються гідролізу та деградації під дією мікрофлори кишечника до простих фенольних сполук [44, 100, 132, 165, 226]. Метаболіти поліфенолів циркулюють в крові у зв'язаному з протеїнами вигляді, зокрема з альбуміном, який відіграє важливу роль у регулюванні біологічної доступності поліфенолів. Афінність поліфенолів до альбуміну змінюється залежно від їхньої хімічної структури. Зв'язування з альбуміном визначає швидкість доставки метаболітів до клітин і тканин чи їхнього виведення. Накопичення поліфенолів в тканинах є найбільш важливим етапом метаболізму поліфенолів, тому що так зберігається необхідна для ефективної реалізації біологічних ефектів концентрація цих сполук. Поліфеноли легко проникають у тканини, особливо в кишечник та печінку. Екскреція поліфенолів та їх похідних відбувається з сечею і жовчю. При цьому, кон'юговані метаболіти великого розміру, імовірно, виводяться з жовчю, в

той час як малі кон'югати, такі як моносультат, переважно – з сечею. Кількість метаболітів, що виводиться з сечею корелює з максимальною концентрацією в плазмі [171]. В таблиці 1.3 наведено основні дані про метаболізм в організмі людини та тварин поліфенолів, представлених у червоному виноградному вині.

До фенольних відносять більше 8000 природних сполук, молекула яких містить фенол (ароматичне кільце з принаймні однією гідроксильною групою). Класифікують їх на поліфеноли та прості феноли, залежно від кількості фенольних кілець. До простих фенолів належать фенольні кислоти. Група поліфенолів, тобто тих фенолів у складі яких є мінімум два фенольних кільця, включає флавоноїди, стільбени та таніни (містять три або більше фенольних кілець) [33, 90, 132, 171, 212, 226].

Таблиця 1.3

Дані про метаболізм фенолів виноградного вина [55, 145]

	Максимальна концентрація у плазмі, мкмоль/л		Час досягнення максимальної концентрації, год	Час напівжиття до елімінації, год
	людини	тварин		
<b>Флавоноїди</b>				
Флаван-3-оли: (-)-епікатехіни, (+)-катехіни	0,02–0,08	0,15–35,0	0,5–2,5	1,1–4,1
Флавоноли: кверцитин	0,51–3,8	0,18–0,24	0,5–2,9	10,9–28,0
Антоціаніни	0,01–0,05		0,7–4,0	
<b>Стільбени</b>				
ресвератрол	0,02–0,45	1,1–2,6		
<b>Фенольні кислоти</b>				
Гідрокисбензойні кислоти: галова кислота	0,17–0,18	1,03–2,75	1,3–1,5	1,1–1,5
Гідроксицинамінові кислоти: ферулова кислота, кофейна кислота	0,08–0,09	1,68	0,7–2,0	

Флавоноїди – це велика група низькомолекулярних поліфенольних сполук. За ступенем окиснення піранозного кільця, гідроксилювання ядра та замісника при третьому атомі карбону флавоноїди поділяють на підкласи: флаволи, ізофлаволи, флаванолі (катехіни), флавонолі, флаванолі, антоціаніни та проантоціанідіни [33, 132, 171].

Вважається, що флавоноїди володіють вазодилатуючим ефектом, викликаючи релаксацію гладких м'язів судин, що, ймовірно, опосередкована інгібуванням протеїнкінази С або зниженням поглинання  $Ca^{2+}$  клітинами [132].

Флаван-3-оли, зокрема (-)-епікатехіни, (+)-катехіни, галати та продукти їхнього метилювання, декарбоксілювання і дегідроксилювання, а також кверцитин (3,5,7,3',4'-пентагідроксифлавонол) активують ензими системи антиоксидантного захисту. При цьому кверцитин є ефективним у більш низьких концентраціях (5 – 20  $\mu$ М) ніж катехіни (500  $\mu$ М – 1 мМ) [29, 116].

Катехіни впливають і на апоптоз клітин через зміну експресії анти- або проапоптичних генів. Епікатехіни інгібують апоптоз активацією генів протеїнів родини Bcl та пригнічення активності каспази-6 та експресії генів Bax, Bad та Mdm2. Також ці сполуки забезпечують виживання клітин, активуючи протеїнкіназу С. Варто зазначити, що у низьких дозах флаван-3-оли мають антиапоптичний ефект, а у високих (50–500 мМ) – виступають промоторами загибелі клітин за механізмом апоптозу [210].

Катехіни скавенджерують NO та пероксинітрит, пригнічують активність нейрональної та індукцбельної NOS інгібуючи зв'язування нуклеарного фактора NF- $\kappa$ B з промотором генів цієї ізоформи NOS [100, 210].

Антоціаніни виноградного вина (мальвідин, дельфінідин, пеонідин, петунідин та ціанідин) найчастіше ідентифікують у глікозильованій формі. Доволі довго вважалося, що це єдиний шлях метаболізму антоціанінів, проте нещодавно було ідентифіковано глюкуроніди та сульфати цих поліфенолів [145]. Концентрація антоціанінів у плазмі крові є надто малою для вловлювання АФО та АФН, але вони є потужними радіопротекторами, оскільки здатні впливати на вміст NO та його стабільних метаболітів. За

споживання 16-500  $\mu\text{M}$  антоціанінів продукування NO знижується більше ніж на 50 %, головню завдяки інгібуванню iNOS. При цьому, антоціаніни не проявляють цитотоксичності [151].

Як і інші флавоноїди, антоціани і антоціанідіни володіють антиоксидантними властивостями. Антоціани реалізують антиоксидантні властивості через здатність виступати донорами електронів або переносити атом гідрогену гідроксильних груп до вільних радикалів [182]. Ці поліфеноли проявляють протизапальну активність шляхом інгібування NF- $\kappa\beta$  – транскрипційного фактора, чутливого до умов оксидативного стресу. Вміст кількох NF- $\kappa\beta$  –залежних хемокінів, цитокінів та медіаторів запальної відповіді знижується у плазмі та моноцитах здорових людей після споживання антоціанінів [175, 227].

У рослинах синтезуються також інші феноли – нефлавоноїди (фенольні кислоти, таніни і стильбени), що наявні також у винограді та вині.

Фенольні кислоти – феноли, до складу яких входить одина функціональна група карбонової кислоти. Виділять дві групи фенольних кислот – гідроксицинамінові (р-кумарова, кавова, ферулова, кафтарова, каутарова і кумарова кислоти) та гідроксибензойні (галова кислота) [33, 100, 132, 171].

Галова кислота (3,4,5-тригідроксибензойна кислота) – поліфенол, який найкраще абсорбується, – проявляє різні біологічні властивості [59, 145]. Галова кислота та її похідні (некон'юговані та кон'юговані 4-О-метилгалові кислоти, 2-О-метилгалова кислота, пірогалол, 4-О-метилпірогалол, рецинол) у дозо-залежний спосіб інгібують тирозинові кінази, впливають на вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$  у цитоплазму та продукування вільних радикалів і, таким чином, модифікують клітинні сигнальні шляхи [139, 143]. Галова кислота та (-)-епікатехіни інгібують утворення оксиду нітрогену пригніченням утворення мРНК iNOS в імунокомпетентних клітинах [175].



Гідроксициннамінові кислоти викликають зростання активності клітинних антиоксидантних ензимів (СОД, КАТ, ГПО та ГР) шляхом активації транскрипції їхніх генів [179, 236].

До родини стилібенів відносять ресвератрол, птеростилібен та піцеатанол, для яких характерна наявність подвійного зв'язку, що з'єднує фенольні кільця [132, 171]. Ресвератрол володіє протиінфекційною, антиоксидантною, кардіопротекторною, антипроліферативною та проапоптотичною активностями. Цей фенол індукує апоптоз, активуючи сигнальні шляхи, опосередковані фосфорилуванням протеїнів р53, протеїнкінази С, MAPK або ж через рецептор смерті Fas/CD95/APO-1 [61]. Крім того, відомо, що ресвератрол володіє радіопротекторним ефектом, адже істотно знижує частоту хромосомних аберацій у мишей, опромінених  $\gamma$ -випромінюванням у дозі 3 Гр [90].

Полімерні сполуки – таніни, – поділяють на дві групи (конденсовані та гідролізовані). Конденсовані таніни є полімерними флавоноїдами, а гідролізовані таніни включають полімери галової кислоти – галотанніни, і подібні за структурою етерифіковані сполуки [132]. Ці рослинні поліфеноли є потужними антиоксидантами, що захищають від пошкоджень вільними радикалами, продукція яких викликана впливом ультрафіолетового випромінювання, та, як наслідок, знижують ризик розвитку раку шкіри і передчасного старіння [212].

Надзвичайно багатий фенолами виноград. 10 % загальних фенольних сполук виноградної ягоди міститься в м'якоті, 60–65 % – в кісточках, 20–35 % в шкірці. Вміст фенольних сполук у винограді залежить від сорту рослини, кліматичних та інших географічних умов, а також ступеня зрілості [179]. Ці корисні компоненти зберігаються й у напоях, отриманих з винограду.

Сік виготовляють шляхом подрібнення та пресування ягоди, однак він містить не весь спектр фенольних сполук винограду, оскільки технологія його виготовлення не дозволяє екстрагувати всі поліфеноли зі шкірки та кісточок. Показано, що виноградний сік і червоне вино мають подібні ефекти на

серцево-судинну систему. Ці обидва продукти пригнічують оксидативний стрес, впливають на імунну відповідь та процес згортання крові, змінюючи функціональний стан лейкоцитів та тромбоцитів, а також підвищують рівень антиоксидантів – поліфенолів у периферичній крові. Але оскільки у виноградному соці є на 50 % менше поліфенолів порівняно з однаковим об'ємом вина, то для того щоб досягти того ж ефекту потрібно споживати у два рази більше соку [84].

При виробництві виноградного вина майже 63 % усіх фенольних речовин виноградних кісточок і шкірки ягід переходять у вино, тому за умови дотримання оптимальної дози споживання його можна вважати одним із найефективніших природних ліків. Важливим є також той факт, що у процесі отримання суслу (бродіння) та дозрівання вина фенольні сполуки зазнають структурних змін, що визначає характеристики напою. Найбільш інтенсивно при дозріванні вина протікають реакції полімеризації та окиснення катехинів. Продукти цих реакцій надають приємного смаку і золотисто-коричневого забарвлення різної інтенсивності, завдяки чому витримані вина легко відрізнити від молодих. Ще одна група речовин, які екстрагуються у вино під час бродіння – проціанідини, – містяться в основному у виноградних кісточках, тому вони практично відсутні у виноградному соці. Спочатку в суслі міститься незначна кількість проціанідинів, оскільки ці речовини починають екстрагуватися з кісточок під час бродіння, коли вміст спирту становить 6 %. У міру того, як концентрація алкоголю зростає впродовж бродіння, проціанідини екстрагуються у вино. Молоде вино, багате проціанідинами має терпкий смак. У процесі витримки проціанідини вступають в реакцію один з одним і утворюють більш довгі полімери – конденсовані таніни. Коли вино старіє, ці ланцюжки стають дуже довгими і важко розчинними, тому випадають в осад [55, 146]. Оскільки виноградна шкірка і кісточка плавають на поверхні, тому чим частіше їх опускають у суслу, що бродить, тим краще відбувається процес вилучення проціанідинів [55].

Завдяки особливостям виготовлення, червоні вина багатші на поліфеноли, ніж білі, тому їхнє споживання викликає різні ефекти. Причиною цього є відмінності у кількості та якісному складі поліфенолів у різних сортах виноградних вин. Також вирішальну роль відіграє біодоступність фенольних сполук [44, 224]. До прикладу, дані про абсорбцію кверцитину та кінетику його диспропорціювання вказують, що келих червоного вина є значно біднішим джерелом даної сполуки ніж чашка чорного чаю та цибуля [71]. Тому, доцільним є концентрування фенольних сполук виноградного вина, оскільки це дозволить отримати необхідну корисну кількість спожитих фенолів та зменшити вживання вина.

Зважаючи на все вищесказане, дослідження впливу фенольних сполук з виноградного вина, зокрема концентрованого його препарату, на ключові біохімічні показники, які характеризують оксидативно-нітративний стрес, індукований малими дозами іонізуючого випромінювання, є надзвичайно актуальним. Такі дослідження можуть стати основою для отримання нових терапевтичних та превентивних засобів, спрямованих на попередження, послаблення чи позитивного коригування уражень організмів радіацією.

## РОЗДІЛ 2. МАТЕРАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

### 2.1. Умови проведення досліджень

Дослідження проводили на безпородних білих щурах-самках масою 180–220 г. Тварини перебували у стаціонарних умовах віварію зі забезпеченням вільного доступу до їжі та води. Всі процедури з піддослідними тваринами проводилися згідно зі “Загальними принципами роботи на тваринах”, затвердженими I Національним конгресом по біоетиці (Київ, Україна, 2001) та з положеннями “Європейської конвенції по захисту хребетних тварин, які використовуються в експериментальних та інших наукових цілях” (Страсбург, Франція, 1986).

Піддослідні щури були поділені на шість груп: перша – контрольні тварини (далі – К); друга – тварини, які споживали з питною водою концентрат ПК (далі – К+ПК); третя та четверта – щури, яких піддавали одноразовому опроміненню в дозах 10 та 30 сГр, відповідно (О); п’ята та шоста – тварини, яких на фоні споживання концентрату ПК піддавали опроміненню у дозах 10 та 30 сГр, відповідно (О+ПК).

Тварини споживали концентрат ПК з питною водою з розрахунку щодобової дози у перерахунку на вміст поліфенольних сполук – 12,5 мг на 1 кг маси тіла, що відповідає теоретичній середній концентрації поліфенолів, яка міститься у 300 мл червоного вина (добова норма для людини масою тіла 70 кг) за 10 діб до та впродовж семи діб експерименту після опромінення.

### 2.2. Характеристика об’єкту досліджень

Об’єктом досліджень були біохімічні показники, що характеризують оксидативно-нітративний стрес у периферичній крові, лейкоцитах, тканинах аорти та корковому шарі нирки при введенні концентрату ПК та за дії малих доз іонізуючого випромінювання.

### 2.3. Отримання концентрату природного поліфенольного комплексу з виноградного вина

Червоне виноградне вино Каберне сорту “Совіньйон” було надане в рамках договору про співпрацю Національним інститутом винограду і вина “Магарач” (Ялта, АР Крим).

Таблиця 2.1

Якісний склад і масова концентрація (мг/л) фенольних сполук у зразках сухого червоного виноградного вина та його концентрованого препарату

	вино	концентрат ПК
галова кислота	42,0	641,5
(+)-D-катехін	10,4	117,6
(-)-епікатехін	16,5	200,2
бузкова кислота	9,9	133,1
кафтарова кислота	47,9	656,7
каутарова кислота	45,1	627,8
п-кумарова кислота	0,4	7,8
кверцитин-3-О-глікозид	16,9	291,7
кверцитин	9,5	219,4
дельфінідин-3,5-О-диглікозид	0,3	0,8
ціанідин-3,5-О-диглікозид	0,6	4,2
петунідин-3,5-О-диглікозид	1,7	6,8
дельфінідин-3-О-глікозид	1,0	7,6
пеонідин-3,5-О-глікозид	3,6	11,8
мальвідин-3,5-О-диглікозид	9,0	40,9
ціанідин-3-О-глікозид	0,3	2,4
петунідин-3-О-глікозид	1,3	10,0
пеонідин-3-О-глікозид	0,9	5,9
мальвідин-3-О-глікозид	7,2	47,1
дельфінідин-3-О-(6'-ацетил-глікозид)	2,6	38,9
ціанідин-3-О-(6'-ацетил-глікозид)	0,3	4,3
петунідин-3-О-(6'-ацетил-глікозид)	0,2	3,5
дельфінідин-3-О-(6'-п-кумароїл-глікозид)	0,5	3,9
пеонідин-3-О-(6'-ацетил-глікозид)	0,5	8,9
мальвідин-3-О-(6'-ацетил-глікозид)	0,4	4,3
ціанідин-3-О-(6'-п-кумароїл-глікозид)	—	1,4
петунідин-3-О-(6'-п-кумароїл-глікозид)	0,3	6,6
пеонідин-3-О-(6'-п-кумароїл-глікозид)	0,1	1,1
мальвідин-3-О-(6'-п-кумароїл-глікозид)	0,8	11,7

Концентрат ПК отримували упарюванням 600 мл червоного вина на роторному випарювачі Laborota 4001 («Heidolph», Німеччина) при температурі 40°C та тиску 0,8-0,9 кг/см<sup>2</sup>.

Отриманий концентрат об'ємом 30 мл витримували протягом тижня у холодильнику при температурі +4°C для випадання в осад нерозчинних у водному розчині поліфенольних сполук. Надосадову рідину відбирали (розчин 1), а до осаду, який випав вносили 20 мл 70% водного розчину етилового спирту (отриманого під час упарювання вина) для екстракції поліфенольних сполук. Через 12 годин рідку фракцію збирали в окремий посуд (розчин 2), а твердий залишок відкидали. Внаслідок об'єднання розчинів 1 і 2 одержали препарат об'ємом 50 мл [19].

Загальний вміст поліфенолів був стандартизований у вині та отриманому концентраті за галовою кислотою еквівалентно з використанням реактиву Фоліна-Чокальтеу [202].

Масова концентрація фенольних сполук у досліджуваному препараті становила 59 г/л, зокрема, полімерних сполук – 40 г/л, мономерів – 19 г/л. Якісний та кількісний склад концентрату ПК визначали методом високоефективної рідинної хроматографії. Основні компоненти представлені кафтаровою, каутарова та галовою кислотами, кверцитином та катехінами (табл. 2.1) [22].

#### **2.4. Опромінення піддослідних тварин**

Щурів піддавали загальному одноразовому опроміненню в дозах 10 та 30 сГр на установці РУМ-17 з такими параметрами: шкірно-фокусна відстань 95 см, напруга 130 кВ, сила струму 10 мА, фільтри Cu 0,5 мм та Al 1,0 мм, потужність дози – 8,3 мГр·с<sup>-1</sup>.

Дозу опромінення контролювали клінічним дозиметром типу 27012 (Otto Shön, Німеччина).

## 2.5. Забір крові та зразків тканин

На 24, 48, 72 та 168 години після дії радіації щурів ефірним наркозом вводили в хірургічну стадію. Забір зразків проводили після декапітації тварин.

Відбирали висхідну, дугу аорти та її грудну частину, корковий шар правої нирки. Виділені тканини та лейкоцити одразу ж заморожували при  $-70^{\circ}\text{C}$ .

Кров збирали у фарфорові чашки. Як антикоагулянт використовували гепарин (кінцеве розведення гепарин : цільна кров = 1:100).

## 2.6. Виділення лейкоцитів [15]

Готували розчин фікол-тріомбасту змішуванням 9,677 г фіколу (Picolle-400, "Farmacia", Швеція), 122,5 мл дистильованої води та 20 мл 76% тріомбасту ("Фармон", Україна) для отримання суміші густиною 1,076-1,078 г/см<sup>3</sup>.

У центрифужну пробірку вносили суміш фікол-тріомбасту, на яку обережно нашаровували 5-7 мл крові, розведеної забуференим фізіологічним розчином (ЗФР, рН 7,4, складом 8,5 г NaCl; 0,22 г KCl; 1,071 г Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,2 г KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>). Центрифугували 30 хвилин при 1000 об./хв. Після центрифугування з пробірки вибирали лейкоцити, клітини двічі відмивали у ЗФР впродовж 5 хв при 1500 об./хв. Надосадову рідину відбирали, отримані лімфоцити розводили у ЗФР.

## 2.7. Підрахунок кількості лейкоцитів у камері Горяєва [25]

До 20 мкл розчину 0,05% метиленового зеленого, приготовленого на 3% оцтовій кислоті (CH<sub>3</sub>COOH лізує еритроцити, а метиленовий синій фарбує ядра лейкоцитів), додавали 20 мкл суспензії лейкоцитів, суміш ретельно перемішували. Заповнювали нею камеру Горяєва, залишали її на 1–2 хв в

горизонтальному положенні для осідання лейкоцитів. Лейкоцити підраховували в двадцяти великих квадратах.

Розрахунок кількості лейкоцитів проводили за формулою:

$$X_{\text{заг}} = \frac{\text{кількість клітин}}{\text{кількість малих квадратів} \cdot 2(\text{розведення}) \cdot 0,250(V_{\text{кола}})},$$

де  $X$  – концентрація клітин, млн./мл.

## 2.8. Отримання лізатів лейкоцитів та зразків тканин

Гомогенізацію заморожених тканин аорти та коркового шару нирки для визначення активності ензимів антиоксидантної системи проводили на льодяній бані при 4°C за допомогою ручного гомогенізатора Поттера-Ельвейема у присутності гіпотонічного 50 мМ Na-K фосфатного буферу (рН 7,4) з розрахунку 10 мг тканин нирки або 5 мг тканин аорти у 100 мкл буферу, 10 мкл цільної периферичної крові лізували додаванням 90 мкл буферу та 10 млн лейкоцитів – у 600 мкл буферу. Досліджувані показники визначали у супернатанті, отриманому після центрифугування лізатів протягом 15 хв при 14 000 об./хв.

Активність NOS визначали у лізатах, приготованих за аналогічною схемою після додавання до зразків буферу лізису, складом 0,05 М Трис-НСІ (рН 7,4), 0,25 М сахароза, 0,001 М ЕДТА, до якого безпосередньо перед додаванням вносили інгібітори протеїназ – 0,5 мкМ апротинін (A1153, Sigma, США), 0,5 мкМ пепстатин (P5318, Sigma, США) та 10 мкМ фенілметилсульфоніл флуорид (PMSF, P7626, Sigma, США). Проводили інкубацію протягом 30 хвилин при 4°C після чого центрифугували 30 хвилин при 14000 об./хв [69].

## 2.9. Визначення концентрації протеїну за методом Лоурі

Концентрацію білка визначали згідно зі загальноприйнятим методом Лоурі [137].



Результат виражали у мкг протеїну на 1 мкл.

## 2.10. Методи дослідження стану системи L-аргінін/оксид нітрогену

**2.10.1. Визначення сумарної активності NO-синтази.** Для визначення сумарної активності NOS до відібраного супернатанту з лізатів додавали 10 мМ HEPES буфер, що містив 1 М  $MgCl_2$ , 1 М  $CaCl_2$ , 3 мМ L-аргінін та 250 мМ НАДФН+ $H^+$ . Як контроль використовували проби, що містили повну субстратну суміш та дистильовану воду. Після 30 хвилинної інкубації зразків при 37°C зупиняли реакцію додаванням 96% етилового спирту в пропорції 1:2. Центрифугували 20 хвилин при 3000 об./хв для осадження протеїнів (20°C). В епендорфівські пробірки вносили по 100 мкл супернатанту та 100 мкл реактиву Гріса (який складається з рівних частин 0,05 % розчину N-(1-Нафтил)етилендіамін дигідрохлориду і 1% розчину сульфаніламід у 5% HCl). Інкубували 30 хвилин при 37°C, після чого переносили зразки у мікропланшети. Вимірювали світлопоглинання при  $\lambda=540$  нм на планшетному рідері (Epoch, Biotek, США).

Сумарну активність ензиму визначали за різницею утворення нітритів з мінімальною кількістю кофакторів для наближення активності ензиму до вихідного рівня активності в досліджуваних зразках [69]. Активність NOS у пробі виражали в нмолях новоутвореного  $NO_2^-$  за 1 хв на 1 мкг протеїну.

**2.10.2. Визначення вмісту нітрит-аніонів.** Вміст нітрит-аніону ( $NO_2^-$ ) визначали в зразках лізатів клітин з використанням реактиву Гріса. Метод полягає у визначенні інтенсивності забарвлення комплексу солі діазонію, утвореного у результаті реакції  $NO_2^-$  з сульфаніламідом та N(1-нафтил)-етилендіаміном у кислому середовищі.

Депротеїнізацію проводили додаванням до зразків 96% етанолу з наступним центрифугуванням при 3000 об./хв протягом 20 хвилин. У лунки планшети вносили 100 мкл отриманого супернатанту та аналогічний об'єм

реактиву Гріса. Абсорбцію вимірювали при  $\lambda=540$  нм на планшетному рідері (Epoch, Biotek, США) після преінкубації при температурі  $37^{\circ}\text{C}$  протягом 30 хв. Контролем слугували проби, які замість зразка містили 100 мкл дистильованої води. Результат розраховували за калібрувальним графіком, який будували з використанням стандартних розчинів нітриту натрію [157].

**2.10.3. Визначення вмісту нітрат-аніонів.** Концентрацію нітрат-аніону ( $\text{NO}_3^-$ ) визначали за різницею між сумарним вмістом стабільних метаболітів оксиду нітрогену та вмістом  $\text{NO}_2^-$ .

Депротейнізацію зразків проводили за схемою, описаною у п. 2.10.2.

Для визначення сумарного вмісту метаболітів NO проводили відновлення нітратів до нітритів, як відновник використовували ванадій (III) хлорид ( $\text{VCl}_3$ ). У лунки планшети вносили 100 мкл супернатанту, додавали однаковий об'єм  $\text{VCl}_3$ , а також швидко вносили 100 мкл реактиву Гріса. Вміст лунки інкубували 30 хв при температурі  $37^{\circ}\text{C}$ . Абсорбцію вимірювали при  $\lambda=540$  нм на планшетному рідері (Epoch, Biotek, США), у якості контролю використовували проби, які замість зразка містили 100 мкл дистильованої води. Результат розраховували за калібрувальним графіком, який будували із використанням стандартних розчинів нітрату натрію [157].

## **2.11. Визначення вмісту 3'-нітротироzinу**

**2.11.1. Лізис лейкоцитів та зразків тканин для електрофоретичного розділення протеїнів [77, 127].** Для отримання лізатів 2,5 млн лейкоцитів або 10 мг тканин нирки або 5 мг тканин аорти розсуспендовували у 100 мкл буферу RIPA (50 mM Tris-HCl (pH 7,2); 1% Triton X-100; 1% деоксихолат натрію; 0,1% SDS; 158 mM NaCl; 1 mM EGTA), який містив інгібітори протеаз/пептидаз: пепстатин (20 мкг/мл), апротинін (20 мкг/мл) та PMSF (1 mM). Суспензію витримували при температурі  $4^{\circ}\text{C}$  протягом 20 хв після чого центрифугували 15 хв при 12 000 об./хв і температурі  $4^{\circ}\text{C}$ . Супернатант відбирали та прогрівали

при 95°C протягом 5 хв у буфері Леммлі (62,5 мМ трис-НСІ (рН 6,8), 1 мМ ЕДТА, 2% SDS, 5% β-меркаптоетанол, 10% гліцерин, 0,4% бромфеноловий синій).

**2.11.2. Електрофорез протеїнів у поліакриламідному гелі [77, 127].** Протеїни (50 мкг) розділяли електрофоретично у блоках 10% поліакриламідного гелю у присутності додецилсульфату натрію (SDS) у буферній системі Леммлі.

Для приготування гелю використовували такі реактиви:

1. Розчин мономерів «АА»: 30% акриламід та 0,8% метиленбісакриламід;
2. Буфер «А» для розділяючого гелю: 0,375 М трис-НСІ, рН 8,8;
3. Буфер «Б» для концентруючого гелю: 0,125 М трис-НСІ, рН 6,8;
4. 10% персульфат амонію (APS).
5. 10% додецилсульфату натрію (SDS)
6. Буфер для електрофорезу (0,025 М трис-НСІ, рН 8,3, 0,192 М гліцин, 0,1% SDS).

В установку для електрофорезу, у простір між двома скляними пластинами вносили 10%-вий розділяючий (3,28 мл H<sub>2</sub>O; 2,64 мл «АА»; 2 мл «А»; 0,8 мл SDS; 0,4 мл APS; 0,04 мл TEMED) та 4%-вий концентруючий (1,83 мл H<sub>2</sub>O; 0,39 мл «АА»; 0,75 мл «Б»; 0,3 мл SDS; 0,3 мл APS; 0,03 мл TEMED) гелі. В електрофоретичну установку заливали буфер для електрофорезу.

Електрофорез проводили протягом 2,5 год при силі струму 15 мА, напрузі 200 В та потужності 50 Вт на одну пластину. При переході проб з концентруючого гелю у розділяючий, силу струму збільшували до 25 мА на одну пластину. Для визначення молекулярної маси протеїнів, бенди яких проявилися, використовували протеїнові стандарти (SDS7B2, «Sigma», США)

**2.11.3. Імоноблотинг протеїнів.** Отримані розділені протеїни переносили на нітроцелюлозну мембрану під дією електричного поля з наступною обробкою отриманих блотів антитілами Перенесення проводили

протягом 2 год при силі струму 250 мА, в буфері, що містив 25 мМ трис-НСІ (рН 8,3), 20% метанол та 192 мМ гліцин [216]. Вільні центри зв'язування на мембрані блокували протягом 12 год при 4°C 2% розчином BSA в ЗФР (137 мМ NaCl, 2,7 мМ KCl, 4,3 мМ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,7 мМ KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, (рН 7,3)) з 0,05% твін-20.

Згідно до поставленої мети мембрану інкубували з першими антитілами (моноклональні антитіла до 3-нітротирозину, N5538, Sigma, США), розведеними у 10 000 раз у блокуючому буфері, протягом 2 год з наступним промиванням буфером для блокування (5 разів по 3 хв). Як другі антитіла використовували анти-мишачі IgG (AP308P, Millipore, США), кон'юговані з пероксидазою хрому, в розведенні у 1000 у блокуючому буфері. Інкубацію з другими антитілами проводили протягом 1 год, після чого мембрану відмивали ЗФР/0,1% твін-20 (5 разів по 3 хв). Імунореактивні смуги на блотах виявляли за допомогою набору реактивів для посиленої хемілюмінесценції (Millipore, США). Час експонування мембран на рентгенівській плівці залежав від інтенсивності хемілюмінесценції і тривав у середньому 5–15 хв. Плівку проявляли у стандартному фенідон-гідрохіноновому проявнику та фіксували кислим фіксажем. Денситометричний аналіз результатів вестерн-блотингу здійснювали з використанням програми GelPro 3.1.

Для контролю ідентичності вмісту протеїнів у всіх пробах, мембрану відмивали від антитіл буфером для відмивки (ЗФР/0,1% твін-20) та, в подальшому, блокуючим буфером. Після цього її інкубували з першими анти-β-актиновими антитілами (Sigma, США), другими антитілами та проводили експозицію отриманих блотів на рентгенівську плівку.

## **2.12. Методи дослідження активності ензимів антиоксидантної системи захисту**

**2.12.1. Визначення активності супероксиддисмутази [31].** Активність СОД визначали у тритон X-100 розчинній фракції зразків, отриманій після

додавання до них 200 мкл інкубаційної суміші (39 мМ ЕДТА-Na, 114 мМ нітротетразолій синій (мета форма), 54 мМ феназинметасульфат у 0,15 М фосфатному буфері (рН=7,8)) 10 мкл розчину НАДН в буфері Тріс-ЕДТА (рН 8,0). В холосту пробу замість супернатанту додавали буфер лізису. Реакцію проводили при температурі 24–25°C. Через 10 хв вимірювали екстинкцію при 540 нм.

Активність ензиму визначали за відсотком блокування продукції нітроформазау з нітросинього тетразолію за формулою:

$$\% \text{ блокування} = \frac{E_{\text{х.пр.}} - E_{\text{д.пр.}}}{E_{\text{х.пр.}}} \times 100\% , \text{ де}$$

$E_{\text{х.пр.}}$  та  $E_{\text{д.пр.}}$  – екстинкція холостої та дослідної проб, відповідно.

Супероксиддисмугазну активність виражали в умовних одиницях блокування реакції утворення нітроформазау на 1 мг білка. Отримані значення переводили відповідно до значень калібрувальної кривої у Міжнародні одиниці (МО, U).

**2.12.2. Визначення активності каталази [10].** Активність КАТ визначали після додавання до 100 мкл лізату 2 мл 0,03% розчину  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Через 10 хв реакцію зупиняли внесенням 1 мл 0,25 н  $\text{H}_2\text{SO}_4$  та 1 мл розчину молібдату амонію. Готували також холосту пробу, яка містила 2 мл  $\text{H}_2\text{O}_2$  та 1 мл розчину 4% молібдату амонію, приготованого на 0,025 н  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Через 10 хв у цю пробу вносили 1 мл 0,25 н  $\text{H}_2\text{SO}_4$  та 100 мкл лізату.

Проби осаджували центрифугуванням впродовж 10 хв при 10 000 об./хв. Інтенсивність забарвлення проб, основою якого є кількість утвореного комплексу  $\text{H}_2\text{O}_2$  з молібдатом амонію, визначали спектрофотометруванням при довжині хвилі 410 нм.

Активність каталази розраховували за формулою:

$$A = \frac{\Delta E \cdot V \cdot n}{\varepsilon \cdot C \cdot t \cdot \alpha \cdot l} \text{ (мкмоль } \text{H}_2\text{O}_2 \text{ за 1 хв. на 1 мг білка), де}$$

$\Delta E$  – різниця екстинкції холостої та дослідної проб;

- $V$  – об'єм реакційної суміші в кюветі;  
 $n$  – розведення вихідного екстракту;  
 $\varepsilon$  – мілімолярний коефіцієнт екстинкції комплексу  $H_2O_2$  з молібдатом амонію при  $\lambda=410$  нм, рівний  $22,2 \text{ см}^2/\text{мкмоль}$ ;  
 $C$  – концентрація протеїну, мг/мл;  
 $t$  – час реакції (10 хв.);  
 $\alpha$  – об'єм зразка, мл;  
 $l$  – довжина оптичного шляху, см.

**2.12.3. Визначення активності глутатіонпероксидази [17].** Для визначення активності ГПО 100 мкл зразка інкубували при  $37^\circ\text{C}$  протягом 10 хвилин з 830 мкл 0,1 М буферу трис-НСІ (рН 8,5), який містив 6мМ ЕДТА, 12мМ азиду натрію ( $\text{NaN}_3$ ) і 4,8мМ GSH. Після цього до проб додавали 70 мкл 20 мМ гідропероксиду трет-бутилу та інкубували протягом 5 хв. Реакцію зупиняли внесенням 20% розчином трихлороцтової кислоти (ТХО). Проби центрифугували при 10 000 об./хв протягом 10 хв. Контрольну пробу отримували шляхом додаванням всіх компонентів, але депротейнівзацію проводили без преінкубації лізату з трис-НСІ буфером.

До 20 мкл супернатанту додавали аналогічний об'єм реактиву Еллмана (0,01М розчин 5,5'-дитіобіс-2-нітробензойної кислоти на метанолі) та 2 мл 0,1 М буферу трис-НСІ (рН 8,5), інкубували 5 хв., після чого вимірювали світлопропускання при  $\lambda=412$  нм.

Глутатіонпероксидазну активність розраховували за формулою:

$$A = \frac{\Delta E \cdot a \cdot b}{\varepsilon \cdot V_{\text{ліз}} \cdot V_{\text{super}} \cdot C \cdot t \cdot l}, \text{ де}$$

$\Delta E$  – різниця екстинкції холостої та дослідної проб;

$a$  – об'єм проби;

$b$  – об'єм реакційної суміші (після додавання реактиву Еллмана);

$V_{\text{ліз}}$  – об'єм зразка (100 мкл);

$V_{\text{super}}$  – об'єм супернатанту (20 мкл);

$\varepsilon$  – мілімолярний коефіцієнт екстинкції тіонітрофенільного аніона (11,4 см<sup>2</sup>/мкмоль);

$t$  – час преінкубації;

$l$  – довжина оптичного шляху;

Отримані результати виражали в нмоль GSH за 1 хв на 1 мг білка.

**2.12.4. Визначення активності глутатіонредуктази [94].** Визначення активності ГР проводили при температурі 37°C, реакцію запускали додаванням 50 мкл лізату відповідного зразка до 2 мл інкубаційного середовища (0,01М К, Na-фосфатний буфер (рН 7,4), 0,008 М окислений глутатіон на 0,01н NaOH та 0,002М НАДФН на 1% NaHCO<sub>3</sub>).

Розрахунок активності ензиму проводили за зменшенням вмісту НАДФН, яке фіксували спектрофотометрично при  $\lambda=340$  нм протягом 10 хв

Ензиматичну активність розраховували за формулою:

$$A = \frac{\Delta E \cdot V}{\varepsilon \cdot C \cdot t \cdot \alpha \cdot l}, \text{ де}$$

$\Delta E$  – різниця екстинкції за час реакції;

$V$  – об'єм інкубаційного середовища, мл;

$\varepsilon$  – мілімолярний коефіцієнт екстинкції для НАДФН, що дорівнює 6,22 см<sup>2</sup>/мкмоль;

$t$  – час реакції, хв.;

$C$  – концентрація протеїну, мг/мл;

$\alpha$  – об'єм лізату, який вносили у кювету;

$l$  – довжина оптичного шляху.

Активність ГР виражали в нмоль за 1 хв на 1 мг білка.

### 2.13. Визначення вмісту ТБК-позитивних продуктів [27]

До лізату додавали 10мМ К, Na-фосфатний буфер на 125мМ КСІ (рН 7,4) та 1мМ КМnO<sub>4</sub>. У цій пробі індукували ПОЛ внесенням 500 мл 10мМ FeSO<sub>4</sub> двічі з інтервалом 10 хв. Через 5 хв зупиняли реакцію додаванням 1 мл 20% ТХО та центрифугували. До 1 мл супернатанту додавали 250 мкл 1н НСІ та 500 мкл 0,7 мМ тіобарбітурової кислоти (ТБК) та інкубували на водяній бані при температурі 100°С протягом 20 хвилин. Опісля пробу охолоджували та вносили 3 мл бутанолу, ретельно перемішували та центрифугували 10 хв при 1500 об./хв

Світлопропускання проби вимірювали при  $\lambda=532$  нм у верхньому бутаноловому шарі, вміст ТБК-ПП розраховували за наступною формулою:

$$[\text{ТБК - позитивні продукти}] = \frac{E \cdot V_1 \cdot V_2}{\varepsilon \cdot V_3 \cdot C}, \text{ де}$$

$E$  – екстинкція проби;

$V_1$  – об'єм бутанолу;

$V_2$  – об'єм проби;

$V_3$  – об'єм отриманого супернатанту;

$\varepsilon$  – мілімолярний коефіцієнт екстинкції комплексу малонового диальдегіду з ТБК (156 см<sup>2</sup>/мкмоль);

$C$  – концентрація протеїну, мг/мл.

Отримані результати виражали в нмоль на 1 мг протеїну.

### 2.14. Статистична обробка результатів

Статистична обробка результатів дослідження здійснювалася з допомогою програми Microsoft Excel. Обчислення основних статистичних показників проводили за безпосередніми кількісними даними, отриманими в



результаті досліджень (середнє арифметичне значення –  $M$ ; стандартна похибка середнього арифметичного –  $m$ ).

Для оцінки вірогідності різниці між статистичними характеристиками двох альтернативних сукупностей даних обчислювали коефіцієнт Стюдента. Вірогідною вважали різницю при показах вірогідності  $p \geq 0,95$  (рівень значимості  $P < 0,05$ ), знайдену після обчислення  $t$  за таблицею  $t$ -розподілу Стюдента.

## **РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ**

### **3.1. Дослідження ефекту введення концентрату природного поліфенольного комплексу з виноградного вина на стан системи L-аргінін / оксид нітрогену за дії малих доз іонізуючого випромінювання**

Ризики ушкоджуючої дії малих доз іонізуючого випромінювання зазвичай оцінюють екстраполюючи дані про вплив високих доз радіації з використанням лінійної безпорогової моделі «доза-ефект». Однак дедалі частіше з'являються повідомлення про те, що такий спосіб оцінки не забезпечує передбачення та пояснення відповіді живих організмів, в тому числі організму людини, на дію малих доз випромінювання.

За низькоінтенсивного опромінення активуються специфічні клітинні механізми, що забезпечують розвиток адаптивної відповіді, радіоіндукованих опосередкованих ефектів, гіперчутливості до опромінення та геномної нестабільності, які пов'язані зі залученням неопромінених молекул [148]. Причиною цього є швидка активація навіть малими дозами радіації цитоплазматичних реакцій, наслідком протікання яких є надпродукція АФО та АФН. Вважається, що АФО є вихідними агентами, утвореними внаслідок іонізаційних подій, вони є ініціаторами, а АФН є ефекторами активації цитозольних шляхів передачі сигналу у відповідь на опромінення [156]. Адже внаслідок дії радіації виникає внутрішньоклітинний сигнал, результатом якого є активація полі(АДФ-рибозо)-полімерази для відновлення радіоіндукованих пошкоджень ДНК та, в подальшому, активація ядерного фактора NFκB. Внаслідок цього у клітині активується експресія генів індукцибельної NOS і, відповідно, інтенсифікується синтез NO [174].

**3.1.1. Вплив концентрату природного поліфенольного комплексу з виноградного вина на активність NO-синтази та вміст стабільних метаболітів оксиду нітрогену у периферичній крові щурів за опромінення**

у дозах 10 та 30 сГр. Оксид нітрогену є важливим біологічним месенджером, наявним у клітинах усіх ссавців, де залучений в низку внутрішньоклітинних та міжклітинних сигнальних шляхів. NO виконує різноманітні фізіологічні регуляторні функції в організмі, оскільки може підвищувати або знижувати функціональну активність адренергічних синапсів, і, відповідно, впливати на адренергічну іннервацію органів дихальної, сечостатевої, м'язової, судинної й інших систем організму. Відомо, що NO активує гуанілатциклазу – ензим, який каталізує синтез одного з вторинних месенджерів – цГМФ. Цей посередник знижує рівень  $Ca^{2+}$  у клітині, що, у свою чергу, спричиняє пригнічення активності кальційзалежних ізоформ NOS [12].

За умов споживання контрольними тваринами концентрату ПК активність NO-синтази зростала в 1,75 раза порівняно з контролем (рис. 3.1).

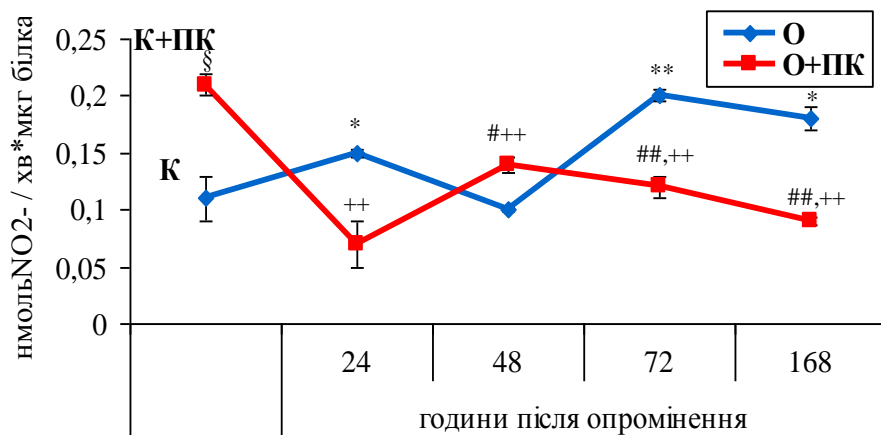


Рис. 3.1. Активність NO-синтази у периферичній крові щурів за дії іонізуючого випромінювання у дозі 10 сГр та за введення концентрату природного поліфенольного комплексу з виноградного вина. ( $M \pm m$ ,  $n = 6-10$ ).

\*, \*\* – відмінність між показниками контрольної групи (К) та опроміненням (О) вірогідна ( $P < 0,05$ ;  $P < 0,01$ ); § – відмінність між показниками контрольної групи (К) та контрольної групи за введення концентрату ПК (К+ПК) вірогідна ( $P < 0,05$ ); #, ## – відмінність між показниками групи опромінених тварин (О) та групи, якій вводили концентрат ПК на фоні опромінення (О+ПК) вірогідна ( $P < 0,05$ ;  $P < 0,01$ ); †† – відмінність між показниками контрольної групи за введення концентрату ПК (К+ПК) та групи, якій вводили концентрат ПК на фоні опромінення (О+ПК) вірогідна ( $P < 0,01$ ).

Нами встановлено зростання активності NOS в 1,4 раза на 24 годину, в 1,8 раза на 72 годину та в 1,6 раза на 168 годину після опромінення тварин у дозі 10 сГр порівняно з контролем (рис. 3.1).

Введення досліджуваного концентрату тваринам, яких піддавали дії іонізуючого випромінювання у дозі 10 сГр, спричиняло зростання NO-синтазної активності в 1,4 рази на 48 годину, але викликало зниження цього показника в 1,7 і 2 рази на 72 та 168 години, відповідно, порівняно з показниками опромінених тварин (рис. 3.1).

Велика кількість досліджень свідчать про підвищене утворення NO в різних органах після опромінення [6, 20, 72, 93, 147, 168]. В організмі NO окиснюється до нітрит- та нітрат-аніонів протягом дуже короткого періоду часу, що ускладнює визначення концентрації NO та інших АФН. Тому, крім оцінки активності NOS, хорошим маркером вмісту NO є кількість його стабільних метаболітів –  $\text{NO}_2^-$  та  $\text{NO}_3^-$ . У периферичній крові  $\text{NO}_2^-$  і  $\text{NO}_3^-$  продукуються з нітроген монооксиду, а зміни їхнього вмісту відображають флуктуації продукції NO [42, 72].

Споживання концентрату ПК викликало зниження вмісту стабільних метаболітів NO у контрольних тварин на 8 % на 48 годину та на 20 % на 168 годину експерименту. При цьому вміст нітрит-аніону змін не зазнавав, а вміст нітрат-аніону знижувався на 21 % на 168 годину порівняно з контролем (табл. 3.1).

Опромінення піддослідних тварин у дозі 10 сГр призводило до зростання сумарного вмісту стабільних метаболітів NO на 8 % на 24 годину та на 11 % на 168 годину порівняно з контролем. Вміст нітрит-аніону знижувався на 48 % на 24 годину, на 25 % на 48 годину, на 41 % на 72 годину та на 30 % на 168 годину, а вміст нітрат-аніону зростав на 13 % на 24 годину порівняно з контролем (табл. 3.1).

За дії 10 сГр іонізуючого випромінювання на фоні введення *per os* концентрату ПК нами було відмічене зниження сумарного вмісту стабільних метаболітів NO на 9 % на 48 годину, та на 10 % на 168 годину, порівняно з

показниками тварин, яких піддавали лише дії радіації. На 24, 72 і 168 години після опромінення зростала кількість нітритів у периферичній крові (на 48 %, на 62 % та на 44 %, відповідно), а нітратів знижувалась на 24 та 168 години (на 18 % та на 13 %, відповідно) (табл. 3.1).

Таблиця 3.1

Вміст стабільних метаболітів оксиду нітрогену у периферичній крові щурів за дії іонізуючого випромінювання у дозі 10 сГр та за введення концентрату природного поліфенольного комплексу з виноградного вина  
( $M \pm m$ ,  $n = 6-10$ )

Досліджувані показники Умови експерименту	Сумарний вміст метаболітів оксиду нітрогену (нмоль / мкг протеїну)	Нітрит-аніон (нмоль / мкг протеїну)	Нітрат-аніон (нмоль / мкг протеїну)
<b>24 год</b>			
<b>К</b>	798,78±31,82	63,52±6,74	735,26±18,29
<b>К+ПК</b>	751,27±30,09 <sup>§</sup>	59,03±5,39	692,24±20,46
<b>О</b>	863,82±18,38 <sup>*</sup>	32,75±3,03 <sup>*</sup>	831,07±30,56 <sup>*</sup>
<b>О + ПК</b>	730,28±30,27	48,41±2,32 <sup>#</sup>	681,87±19,37 <sup>#</sup>
<b>48 год</b>			
<b>К</b>	780,95±18,46	58,86±6,82	722,09±20,93
<b>К+ПК</b>	717,49±20,71 <sup>§</sup>	61,47±5,62	656,02±16,73
<b>О</b>	770,75±22,76	44,36±3,46 <sup>*</sup>	726,39±20,62
<b>О + ПК</b>	699,36±10,16 <sup>#,+</sup>	36,84±6,35 <sup>++</sup>	662,52±15,83
<b>72 год</b>			
<b>К</b>	784,02±37,85	61,29±8,53	722,73±9,68
<b>К+ПК</b>	769,40±32,08	63,41±6,82	705,99±18,28
<b>О</b>	787,58±12,82	36,46±4,86 <sup>*</sup>	751,12±18,92
<b>О + ПК</b>	752,71±20,32	59,04±6,91 <sup>#</sup>	693,67±25,89
<b>168 год</b>			
<b>К</b>	802,93±17,40	58,93±8,05	744,00±18,60
<b>К+ПК</b>	643,16±15,38 <sup>§</sup>	54,29±5,78	588,87±18,27 <sup>§</sup>
<b>О</b>	894,28±13,68 <sup>*</sup>	41,16±4,43 <sup>*</sup>	853,12±22,12
<b>О + ПК</b>	800,47±31,81 <sup>#,+</sup>	59,32±8,37 <sup>#</sup>	741,15±20,79 <sup>#,+</sup>

\* – відмінність між показниками контрольної групи (К) та опроміненням (О) вірогідна ( $P < 0,05$ ); § – відмінність між показниками контрольної групи (К) та контрольної групи за введення концентрату ПК (К+ПК) вірогідна ( $P < 0,05$ ); # – відмінність між показниками групи опромінених тварин (О) та групи, якій вводили концентрат ПК на фоні опромінення (О+ПК) вірогідна ( $P < 0,05$ ); + – відмінність між показниками контрольної групи

за введення концентрату ПК (К+ПК) та групи, якій вводили концентрат ПК на фоні опромінення (О+ПК) вірогідна ( $P < 0,05$ ).

Споживання контрольними тваринами концентрату ПК спричиняє зростання активності NOS в 2,5 раза порівняно з контролем (рис. 3.2).

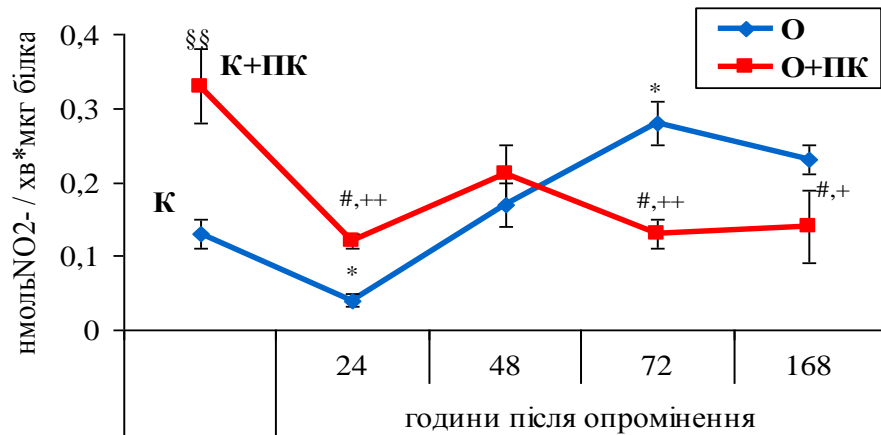


Рис. 3.2. Активність NO-синтази у периферичній крові щурів за дії іонізуючого випромінювання у дозі 30 сГр та за введення концентрату природного поліфенольного комплексу з виноградного вина. ( $M \pm m$ ,  $n = 6-10$ ).

\* – відмінність між показниками контрольної групи (К) та опроміненням (О) вірогідна ( $P < 0,05$ ); §§ – відмінність між показниками контрольної групи (К) та контрольної групи за введення концентрату ПК (К+ПК) вірогідна ( $P < 0,01$ ); # – відмінність між показниками групи опромінених тварин (О) та групи, якій вводили концентрат ПК на фоні опромінення (О+ПК) вірогідна ( $P < 0,05$ ); +, ++ – відмінність між показниками контрольної групи за введення концентрату ПК (К+ПК) та групи, якій вводили концентрат ПК на фоні опромінення (О+ПК) вірогідна ( $P < 0,05$ ;  $P < 0,01$ ).

Відмічено, що на 24 годину після впливу іонізуючого випромінювання у дозі 30 сГр активність NOS знижується у 3,3 раза порівняно з контролем. У подальші терміни спостерігається поступове зростання цього показника і на третю добу він є вищим від контрольних значень у 2,2 раза (рис. 3.2).

Вплив іонізуючого випромінювання у дозі 30 сГр на фоні споживання з питною водою концентрату ПК призводить до підвищення активності NOS на 24 годину після опромінення у 3 рази порівняно з тваринами, яких піддавали лише дії іонізуючого випромінювання. У віддаленіші терміни досліджуваний

показник знижується – у 2,2 і 1,6 рази на 72 та 168 години, у разі введення концентрату на фоні опромінення порівняно з показниками тварин за дії лише випромінювання (рис. 3.2).

Введення інтактним щурам концентрату ПК спричиняло підвищення вмісту нітрит-аніона. Кількість нітрат-аніона, навпаки, знижується на 35 % на 24 та 48 години, на 31 % на 72 годину і на 32 % на 168 годину (табл. 3.2).

Таблиця 3.2

Вміст стабільних метаболітів оксиду нітрогену у периферичній крові щурів за дії іонізуючого випромінювання у дозі 30 сГр та за введення концентрату природного поліфенольного комплексу з виноградного вина

( $M \pm m$ ,  $n = 6-10$ )

Досліджувані показники Умови експерименту	Сумарний вміст метаболітів оксиду нітрогену (нмоль / мкг протеїну)	Нітрит-аніон (нмоль / мкг протеїну)	Нітрат-аніон (нмоль / мкг протеїну)
<b>24 год</b>			
<b>К</b>	778,98±18,47	69,87±10,61	709,11±27,56
<b>К+ПК</b>	540,92±24,83 <sup>§</sup>	83,71±3,92	457,49±16,83 <sup>§§</sup>
<b>О</b>	1146,54±23,36 <sup>*</sup>	18,50±0,79 <sup>*</sup>	1128,03±22,98 <sup>*</sup>
<b>О + ПК</b>	1041,09±22,46 <sup>++</sup>	91,66±11,20 <sup>#</sup>	949,43±33,54 <sup>#,+</sup>
<b>48 год</b>			
<b>К</b>	770,28±20,56	72,81±9,02	697,47±11,04
<b>К+ПК</b>	547,20±19,83 <sup>§§</sup>	90,71±10,18	456,49±18,92 <sup>§</sup>
<b>О</b>	765,34±42,64	32,06±6,83 <sup>*</sup>	733,28±34,27
<b>О + ПК</b>	998,31±37,91 <sup>#,+</sup>	78,16±9,26 <sup>#</sup>	920,14±30,15 <sup>#,+</sup>
<b>72 год</b>			
<b>К</b>	761,82±14,82	68,72±13,17	693,10±17,29
<b>К+ПК</b>	561,80±20,73 <sup>§</sup>	86,82±6,29 <sup>§</sup>	474,98±14,02 <sup>§</sup>
<b>О</b>	603,25±14,11 <sup>*</sup>	94,41±10,40 <sup>*</sup>	508,84±22,54 <sup>*</sup>
<b>О + ПК</b>	1002,58±73,02 <sup>#,+</sup>	83,86±3,98	918,72±73,09 <sup>#,+</sup>
<b>168 год</b>			
<b>К</b>	750,28±31,76	66,64±7,72	683,64±20,89
<b>К+ПК</b>	549,93±28,71 <sup>§</sup>	85,78±9,18	464,15±22,38 <sup>§</sup>
<b>О</b>	1167,83±24,82 <sup>*</sup>	98,56±5,36 <sup>*</sup>	1069,27±20,89 <sup>**</sup>
<b>О + ПК</b>	1103,86±48,75 <sup>+</sup>	80,46±6,47 <sup>#</sup>	1023,4±31,57 <sup>++</sup>

<sup>\*</sup>, <sup>\*\*</sup> – відмінність між показниками контрольної групи (К) та опроміненням (О) вірогідна ( $P < 0,05$ ;  $P < 0,01$ ); <sup>§</sup>, <sup>§§</sup> – відмінність між показниками контрольної групи (К) та контрольної групи за введення концентрату ПК (К+ПК) вірогідна ( $P < 0,05$ ;  $P < 0,01$ ); <sup>#</sup> –

відмінність між показниками групи опромінених тварин (О) та групи, якій вводили концентрат ПК на фоні опромінення (О+ПК) вірогідна ( $P < 0,05$ ); +, ++ – відмінність між показниками контрольної групи за введення концентрату ПК (К+ПК) та групи, якій вводили концентрат ПК на фоні опромінення (О+ПК) вірогідна ( $P < 0,05$ ;  $P < 0,01$ ).

Тенденцію, аналогічну до зміни активності NOS, спостерігали у зміні вмісту нітритів у периферичній крові щурів за умов дії іонізуючого випромінювання. На 24 годину після опромінення вміст цього метаболіту на 74 % рази нижчий порівняно з контролем. На 48 годину після дії іонізуючої радіації досліджуваний показник зростає і на 72 годину він є вищим від контрольних значень на 37 % та на 168 годину – на 48 % (табл. 3.2). Отже, однакові тенденції зміни активності NOS та вмісту нітрит-аніона за дії малих доз іонізуючого випромінювання свідчать про те, що пул NO та його метаболітів в умовах експерименту є повністю залежним від функціонування цього ензиму. Вміст нітрат-аніона зростає більш ніж на 59 % на 24 годину після опромінення. На 72 годину цей показник знижується на 27 % та зростає на 168 годину на 56 % порівняно з показниками групи інтактних тварин (табл. 3.2).

Зниження сумарного вмісту стабільних метаболітів NO на 72 годину експерименту після опромінення (на 21 %) порівняно з контролем може свідчити про інтенсифікацію за радіаційного впливу процесів утворення АФН з NO, який продукується у NO-синтазній реакції на ранніх етапах експерименту (табл. 3.2).

Нами було відмічено, що вміст нітритів зростає на 24 та 48 години (на 395 % та 35 %, відповідно) і знижується на 18 % на 168 годину після опромінення за умов введення концентрату ПК, порівняно з показниками опромінених тварин (табл. 3.2).

Споживання концентрату ПК спричиняє зниження рівня нітратів на 16 % на 24 годину після дії рентгенівського випромінювання та підвищення цього показника на 25 % та 81 % на 48 і 72 години, відповідно, порівняно зі вмістом



досліджуваного метаболіту у зазначені терміни за дії лише іонізуючої радіації (табл. 3.2).

**3.1.2. Активність NO-синтази та вміст стабільних метаболітів оксиду нітрогену у лейкоцитах щурів за споживання концентрату природного поліфенольного комплексу та дії випромінювання у дозах 10 та 30 сГр.** Радіоіндуковані ефекти у клітинах імунної системи є об'єктом досліджень радіобіологів вже протягом багатьох десятиліть. За дії середніх та високих доз випромінювання розвивається явище імуносупресії, малі дози, в більшості випадків, спричиняють імуностимуляцію у ранній пострадіаційний період [152]. Відомо, що запальний процес, який розвивається після дії іонізуючого випромінювання, опосередковує ушкоджуючу дію радіації. Але малі та низькоінтенсивні дози можуть мати протизапальні ефекти. Причиною такої різнонапрямленої дії малих та великих доз радіації є різні ефекти на фагоцитоз, продукцію антигенів, цитокінів та АФО і активність NOS, зокрема її індукцибельної ізоформи, та продукування NO [194].

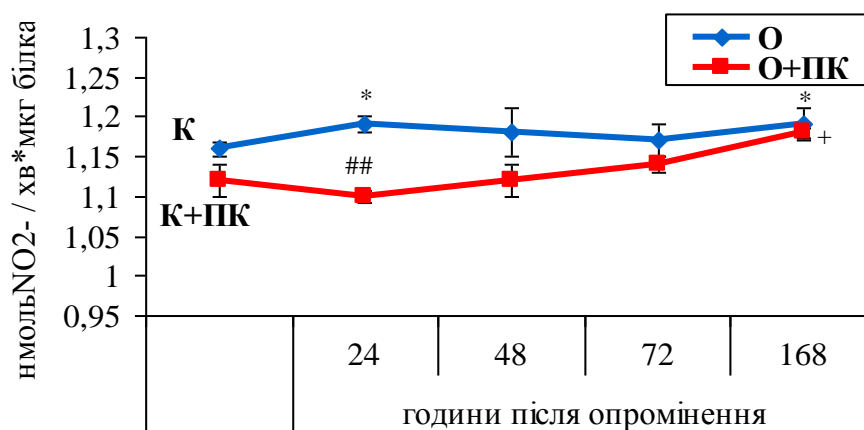


Рис. 3.3. Активність NO-синтази у лейкоцитах щурів за дії іонізуючого випромінювання у дозі 10 сГр та за введення концентрату природного поліфенольного комплексу з виноградного вина.

\* – відмінність між показниками контрольної групи (К) та опроміненням (О) вірогідна ( $P < 0,05$ ); ## - відмінність між показниками групи опромінених тварин (О) та групи, якій вводили концентрат ПК на фоні опромінення (О+ПК) вірогідна ( $P < 0,01$ ); + –

відмінність між показниками контрольної групи за введення концентрату ПК (К+ПК) та групи, якій вводили концентрат ПК на фоні опромінення (О+ПК) вірогідна ( $P < 0,05$ ).

Споживання концентрату ПК за впливу іонізуючого випромінювання дозою 10 сГр спричиняло зниження активності NOS в лейкоцитах щурів, порівняно з опроміненням (рис. 3.3).

Таблиця 3.3

Вміст стабільних метаболітів оксиду нітрогену у лейкоцитах щурів за дії іонізуючого випромінювання у дозі 10 сГр та за введення концентрату природного поліфенольного комплексу з виноградного вина

( $M \pm m$ ,  $n = 6-10$ )

Досліджувані показники Умови експерименту	Сумарний вміст метаболітів оксиду нітрогену (нмоль / мкг протеїну)	Нітрит-аніон (нмоль / мкг протеїну)	Нітрат-аніон (нмоль / мкг протеїну)
<b>24 год</b>			
<b>К</b>	58,46±2,34	9,57±2,05	48,89±1,17
<b>К+ПК</b>	49,39±1,03 <sup>§</sup>	11,82±1,62	37,57±0,94 <sup>§§</sup>
<b>О</b>	67,41±2,38 <sup>*</sup>	10,34±2,01	57,07±3,03 <sup>*</sup>
<b>О + ПК</b>	59,47±1,28 <sup>#,+</sup>	9,99±1,63	49,48±1,85 <sup>#,++</sup>
<b>48 год</b>			
<b>К</b>	62,01±1,83	10,31±1,54	51,70±1,28
<b>К+ПК</b>	51,69±1,58 <sup>§</sup>	9,28±2,03	42,41±0,62
<b>О</b>	63,15±0,84	12,34±1,18	50,81±1,83
<b>О + ПК</b>	59,61±1,38 <sup>#,+</sup>	10,13±0,89	49,68±1,82 <sup>+</sup>
<b>72 год</b>			
<b>К</b>	66,38±1,64	10,43±2,01	55,95±1,94
<b>К+ПК</b>	51,78±3,78 <sup>§</sup>	9,85±0,75	41,93±0,94 <sup>§</sup>
<b>О</b>	69,31±1,23	14,06±1,62 <sup>*</sup>	55,25±2,17
<b>О + ПК</b>	61,64±2,31 <sup>#,+</sup>	9,64±1,83 <sup>#</sup>	51,75±1,74 <sup>+</sup>
<b>168 год</b>			
<b>К</b>	60,93±1,56	8,97±1,64	51,96±1,73
<b>К+ПК</b>	55,26±1,67	9,41±1,75	45,85±1,83 <sup>§§</sup>
<b>О</b>	61,64±1,78	11,75±0,84 <sup>*</sup>	49,89±2,03
<b>О + ПК</b>	60,27±0,72	9,02±1,89	51,25±1,52 <sup>+</sup>

\* – відмінність між показниками контрольної групи (К) та опроміненням (О) вірогідна ( $P < 0,05$ ); §, §§ – відмінність між показниками контрольної групи (К) та контрольної групи за введення концентрату ПК (К+ПК) вірогідна ( $P < 0,05$ ;  $P < 0,01$ ); # –

відмінність між показниками групи опромінених тварин (О) та групи, якій вводили концентрат ПК на фоні опромінення (О+ПК) вірогідна ( $P < 0,05$ ); +, ++ – відмінність між показниками контрольної групи за введення концентрату ПК (К+ПК) та групи, якій вводили концентрат ПК на фоні опромінення (О+ПК) вірогідна ( $P < 0,05$ ;  $P < 0,01$ ).

Також ми дослідили вміст стабільних метаболітів оксиду нітрогену в лейкоцитах периферичної крові щурів. Введення концентрату ПК інтактним тваринам спричиняло зниження сумарного вмісту метаболітів NO на перші три доби експерименту та вмісту нітратів на 24 годину (на 23 %), 72 годину (25 %) та на 168 годину (12 %) порівняно з контрольними показниками (табл. 3.3).

Було відмічено, що після дії іонізуючого випромінювання дозою 10 сГр вміст стабільних метаболітів NO зростав на 24 годину на 15 %, головню завдяки зростанню вмісту нітрат-аніону (на 17 %), а на більш віддалені терміни експерименту зростав вміст нітрит-аніону – на 35 % на 72 годину та на 30 % на 168 годину порівняно з контролем (табл. 3.3).

У разі споживання концентрату ПК опроміненими щурами рівень нітрит-аніону знижувався на 31 % на 72 годину, а рівень нітрат-аніону – на 13 % на 24 годину (табл. 3.3).

При введенні концентрату ПК контрольним тваринам активність NOS у лейкоцитах периферичної крові знижувалася у 1,4 раза (рис. 3.4).

При дослідженні впливу іонізуючого випромінювання дозою 30 сГр на стан системи L-аргінін/NO у лейкоцитах було відмічено наступні зміни: на 24 годину експерименту активність NOS знижувалася у 1,2 раза порівняно з контролем. В подальші терміни спостерігалось зростання даного показника в 1,3 раза на 48 годину, в 1,7 раза на 72 годину та в 1,2 раза на 168 годину (рис. 3.4).

Відмічено зростання активності NOS у лейкоцитах щурів, яким на фоні дії 30 сГр іонізуючого випромінювання вводили поліфенольний комплекс, на 24 годину в 1,3 рази та зниження в 1,1 рази на другу, в 2 рази на третю та в 1,3 рази на сьому доби, порівняно з показниками групи опромінених тварин (рис. 3.4).

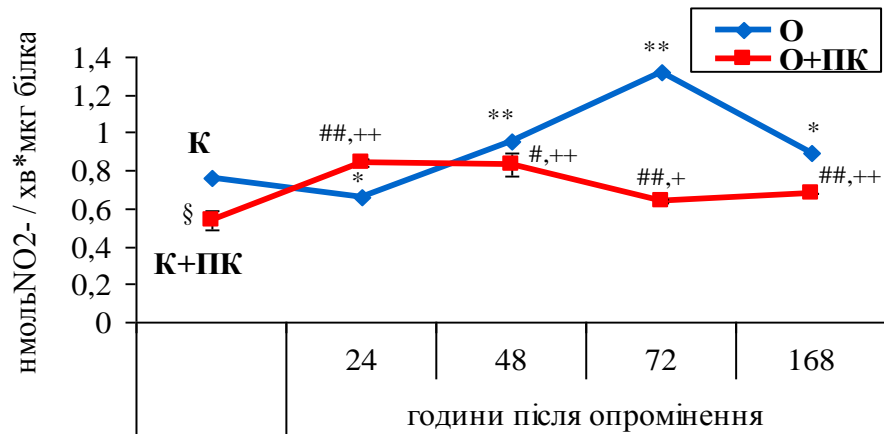


Рис. 3.4. Активність NO-синтази в лейкоцитах щурів за дії іонізуючого випромінювання у дозі 30 сГр та за введення концентрату природного поліфенольного комплексу з виноградного вина.

\*, \*\* – відмінність між показниками контрольної групи (К) та опроміненням (О) вірогідна ( $P < 0,05$ ;  $P < 0,01$ ); § – відмінність між показниками контрольної групи (К) та контрольної групи за введення концентрату ПК (К+ПК) вірогідна ( $P < 0,05$ ); #, ## – відмінність між показниками групи опромінених тварин (О) та групи, якій вводили концентрат ПК на фоні опромінення (О+ПК) вірогідна ( $P < 0,05$ ;  $P < 0,01$ ); +, ++ – відмінність між показниками контрольної групи за введення концентрату ПК (К+ПК) та групи, якій вводили концентрат ПК на фоні опромінення (О+ПК) вірогідна ( $P < 0,05$ ;  $P < 0,01$ ).

Споживання концентрату ПК контрольними тваринами викликало зниження вмісту  $\text{NO}_3^-$  у лейкоцитах на 36 % як на 24, так і на 72 години та зростання на 70 % на 168 годину експерименту. Сумарний вміст метаболітів NO знижувався на першу добу на 20 % та зростав на 34 % на 168 годину порівняно з контролем (табл. 3.4).

Після опромінення у дозі 30 сГр показано зниження вмісту  $\text{NO}_2^-$  на 24 годину на 43 %, тоді як на 48 годину досліджуваний показник зростав на 51 % та на 72 годину на 88 % порівняно з контролем. Вміст  $\text{NO}_3^-$  після опромінення зростав на 29 % на 24 годину, на 57 % на 48 годину, на 65 % на 72 годину та на 36 % на 168 годину порівняно з контролем (табл. 3.4). Також на другу та третю доби після опромінення зростав сумарний вміст метаболітів NO на 55 % та 70 %, відповідно (табл. 3.4).

Таблиця 3.4

Вміст стабільних метаболітів оксиду нітрогену у лейкоцитах щурів за дії іонізуючого випромінювання у дозі 30 сГр та за введення концентрату природного поліфенольного комплексу з виноградного вина

( $M \pm m$ ,  $n = 6-10$ )

Досліджувані показники Умови експерименту	Сумарний вміст метаболітів оксиду нітрогену (нмоль / мкг протеїну)	Нітрит-аніон (нмоль / мкг протеїну)	Нітрат-аніон (нмоль / мкг протеїну)
<b>24 год</b>			
<b>К</b>	33,57±1,07	10,38±1,47	23,19±1,84
<b>К+ПК</b>	26,98±1,35 <sup>§</sup>	12,26±1,05	14,72±1,82 <sup>§§</sup>
<b>О</b>	35,75±1,18	5,92±1,08*	29,83±1,29*
<b>О + ПК</b>	41,51±1,85 <sup>#,++</sup>	9,76±1,33 <sup>#</sup>	31,75±2,23 <sup>+</sup>
<b>48 год</b>			
<b>К</b>	27,87±1,49	6,04±1,65	21,83±1,37
<b>К+ПК</b>	34,52±3,17	7,36±0,78	27,16±2,02
<b>О</b>	43,28±2,07**	9,10±0,96*	34,18±1,82**
<b>О + ПК</b>	51,19±1,67 <sup>+</sup>	8,95±1,86	42,24±1,12 <sup>##,++</sup>
<b>72 год</b>			
<b>К</b>	32,24±2,31	7,37±1,92	24,87±3,28
<b>К+ПК</b>	25,27±2,94	9,36±2,30	15,90±1,73 <sup>§</sup>
<b>О</b>	54,85±2,22**	13,83±1,13*	41,03±2,82**
<b>О + ПК</b>	53,42±1,65 <sup>++</sup>	9,29±2,03	44,12±2,13 <sup>++</sup>
<b>168 год</b>			
<b>К</b>	28,16±4,56	11,32±2,74	16,84±1,61
<b>К+ПК</b>	37,72±1,67*	9,12±1,68	28,60±2,64 <sup>§</sup>
<b>О</b>	32,04±0,99	9,17±1,18	22,87±1,73*
<b>О + ПК</b>	34,16±2,73	10,55±1,83	23,61±0,92

\*, \*\* – відмінність між показниками контрольної групи (К) та опроміненням (О) вірогідна ( $P < 0,05$ ;  $P < 0,01$ ); §, §§ – відмінність між показниками контрольної групи (К) та контрольної групи за введення концентрату ПК (К+ПК) вірогідна ( $P < 0,05$ ;  $P < 0,01$ ); #, ## – відмінність між показниками групи опромінених тварин (О) та групи, якій вводили концентрат ПК на фоні опромінення (О+ПК) вірогідна ( $P < 0,05$ ;  $P < 0,01$ ); +, ++ – відмінність між показниками контрольної групи за введення концентрату ПК (К+ПК) та групи, якій вводили концентрат ПК на фоні опромінення (О+ПК) вірогідна ( $P < 0,05$ ;  $P < 0,01$ ).

За умов споживання концентрату ПК на 24 годину після опромінення сумарний вміст стабільних метаболітів NO зростав на 17 %, тоді як вміст  $\text{NO}_2^-$  – на 37 %. Зростання вмісту  $\text{NO}_3^-$  на 37 % було виявлено лише на 48 годину в порівнянні з показниками опромінених тварин (табл. 3.4).

**3.1.3. Вплив поліфенольного комплексу з виноградного вина на активність NO-синтази та вміст стабільних метаболітів оксиду нітрогену у тканинах аорти щурів за дії іонізуючого випромінювання у дозах 10 та 30 сГр.** Ураження судинного ендотелію є причиною розвитку радіоіндукованих порушень у серцево-судинній системі, адже саме клітини ендотелію відіграють ключову роль в регуляції тону судин, тромбозу та запалення. Одним із факторів, які забезпечують ці функції інтими судин є оксид азоту, який продукується ендотеліальною NOS [43].

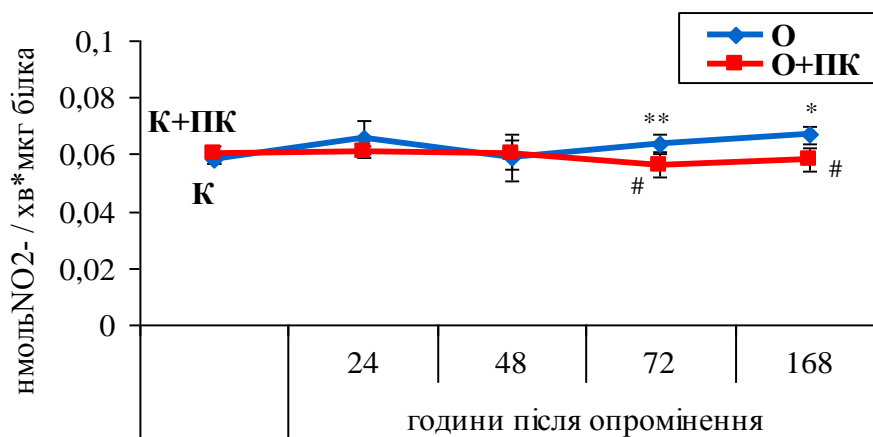


Рис. 3.5. Активність NO-синтази у тканинах аорти щурів за дії іонізуючого випромінювання у дозі 10 сГр та за введення концентрату природного поліфенольного комплексу з виноградного вина.

\*, \*\* – відмінність між показниками контрольної групи (К) та опроміненням (О) вірогідна ( $P < 0,05$ ;  $P < 0,01$ ); # – відмінність між показниками групи опромінених тварин (О) та групи, якій вводили концентрат ПК на фоні опромінення (О+ПК) вірогідна ( $P < 0,05$ ).

Дія іонізуючого випромінювання у дозі 10 сГр призводить до зростання активності NOS в 1,1 та 1,2 рази на третю та сьому доби експерименту у

порівнянні з контролем. Введення щурам досліджуваного концентрату викликає зниження цього показника на 72 та 168 години до контрольних значень (рис. 3.5).

Як уже згадувалося, за фізіологічних умов пул NO у судинах забезпечується функціонуванням ендотеліальної ізоформи NOS. Базальний рівень NO необхідний для підтримання тону судин, регуляції адгезії лейкоцитів до клітин ендотелію та процесів зсідання крові [78, 85]. У клітинах судин значно меншою мірою експресуються гени нейрональної та індукцибельної ізоформ NOS (nNOS та iNOS) [54, 78].

Надмірне продукування NO у клітинах ендотелію та порушення його метаболізму відмічене у разі багатьох захворювань, у тому числі при атеросклерозі, гіпертензії, а також після дії радіації як і високих, так і у малих дозах [113].

Концентрат ПК викликає у контрольних тварин зростання вмісту  $\text{NO}_2^-$  на 42 % на 72 годину порівняно з контрольними показниками. Вміст  $\text{NO}_3^-$  знижувався на 21 % на 24 годину, на 23 % на 48 годину та на 26 % на 72 годину (табл. 3.5).

Після впливу іонізуючого випромінювання у дозі 10 сГр ми спостерігали зростання сумарного вмісту стабільних метаболітів NO на другу добу на 27 %, на третю добу на 54 % та на сьому добу на 79 % в аорті щурів порівняно з контролем. Вміст  $\text{NO}_2^-$  зростав на 84 % на 48 годину, на 82 % на 72 годину та на 117 % на 168 годину, а вміст  $\text{NO}_3^-$  зростав на третю добу після опромінення на 35 % і на сьому добу був вищим від контролю на 138 % (табл. 3.5).

Споживання концентрату ПК на фоні опромінення викликає зниження сумарного вмісту NO на 19 % на 48 годину, на 18 % на 72 годину та на 26 % на 168 годину експерименту, порівняно із показниками тварин, яких піддавали дії лише іонізуючого випромінювання (табл. 3.5). Вміст  $\text{NO}_2^-$  також знижувався на 11 % на 24 годину, на 26 % на 48 та 168 годину в тварин, які були опромінені у дозі 10 сГр та споживали концентрат ПК. На ранніх термінах експерименту вміст нітрат-аніону змін не зазнавав, а на третю та сьому доби був нижчим від показників опромінених щурів (на 37 % на 72 годину та на 50 % на 168 годину) (табл. 3.5).

Таблиця 3.5

Вміст стабільних метаболітів оксиду нітрогену у тканинах аорти щурів за дії іонізуючого випромінювання у дозі 10 сГр та введення концентрату природного поліфенольного комплексу з виноградного вина

( $M \pm m$ ,  $n = 6-10$ )

Досліджувані показники Умови експерименту	Сумарний вміст метаболітів оксиду нітрогену (нмоль / мкг протеїну)	Нітрит-аніон (нмоль / мкг протеїну)	Нітрат-аніон (нмоль / мкг протеїну)
<b>24 год</b>			
<b>К</b>	15,24±1,82	4,08±0,98	11,16±0,53
<b>К+ПК</b>	14,28±1,28	5,48±0,45	8,80±0,24 <sup>§</sup>
<b>О</b>	18,83±2,16	7,24±1,78	11,59±1,44
<b>О + ПК</b>	17,24±1,46	6,47±1,04 <sup>#</sup>	10,77±1,15 <sup>#</sup>
<b>48 год</b>			
<b>К</b>	15,46±1,07	5,15±0,48	10,31±1,29
<b>К+ПК</b>	12,91±1,46	4,99±0,74	7,92±0,57 <sup>§</sup>
<b>О</b>	19,62±1,43 <sup>*</sup>	9,49±1,63 <sup>*</sup>	10,13±0,38
<b>О + ПК</b>	15,89±0,85 <sup>#</sup>	6,78±1,41 <sup>#</sup>	9,11±0,77 <sup>#</sup>
<b>72 год</b>			
<b>К</b>	14,67±1,54	5,74±0,45	8,93±0,54
<b>К+ПК</b>	14,79±2,48	8,15±1,14 <sup>§</sup>	6,64±0,27 <sup>§</sup>
<b>О</b>	22,54±2,35 <sup>**</sup>	10,45±0,41 <sup>**</sup>	12,09±1,26 <sup>*</sup>
<b>О + ПК</b>	18,48±1,21 <sup>#,+</sup>	10,82±1,30	7,66±1,41 <sup>#</sup>
<b>168 год</b>			
<b>К</b>	16,21±1,48	5,05±0,17	11,16±1,43
<b>К+ПК</b>	17,48±1,25	4,67±0,62	12,81±0,60
<b>О</b>	28,97±2,40 <sup>**</sup>	10,98±1,27 <sup>**</sup>	26,57±1,49 <sup>**</sup>
<b>О + ПК</b>	21,43±1,05 <sup>#,+</sup>	8,09±0,05 <sup>#,+</sup>	13,34±1,36 <sup>#</sup>

<sup>\*</sup>, <sup>\*\*</sup> – відмінність між показниками контрольної групи (К) та опроміненням (О) вірогідна ( $P < 0,05$ ;  $P < 0,01$ ); <sup>§</sup> – відмінність між показниками контрольної групи (К) та контрольної групи за введення концентрату ПК (К+ПК) вірогідна ( $P < 0,05$ ); <sup>#</sup> – відмінність між показниками групи опромінених тварин (О) та групи, якій вводили концентрат ПК на фоні опромінення (О+ПК) вірогідна ( $P < 0,05$ ); <sup>+</sup> – відмінність між показниками контрольної групи за введення концентрату ПК (К+ПК) та групи, якій вводили концентрат ПК на фоні опромінення (О+ПК) вірогідна ( $P < 0,05$ ).

Дія іонізуючого випромінювання дозою 30 сГр не викликає змін в активності NOS на ранніх термінах експерименту, а на третю та сьому доби



цей показник характеризується максимальними значеннями і є вищим від контролю в 1,7 та 1,9 раза, відповідно (рис. 3.6).

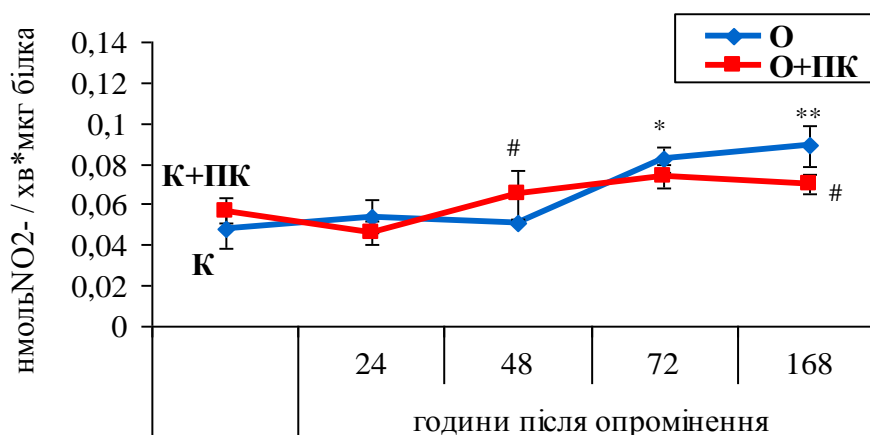


Рис. 3.6. Активність NO-синтази у тканинах аорти щурів за дії іонізуючого випромінювання у дозі 30 сГр та за введення концентрату природного поліфенольного комплексу з виноградного вина.

\*, \*\* – відмінність між показниками контрольної групи (К) та опроміненням (О) вірогідна ( $P < 0,05$ ;  $P < 0,01$ ); # – відмінність між показниками групи опромінених тварин (О) та групи, якій вводили концентрат ПК на фоні опромінення (О+ПК) вірогідна ( $P < 0,05$ ).

У разі сумарної дії концентрату ПК і 30 сГр радіації активність NOS має коливну тенденцію до змін: зростає у 1,3 раза на 48 годину порівняно з опроміненням і знижується до контрольних значень на 168 годину в тканині аорти піддослідних тварин (табл. 3.6).

Показано зростання вмісту NO<sub>2</sub><sup>-</sup> у тканинах аорти контрольних щурів, які споживали концентрат ПК, на 77 % на першу та на 65 % на третю доби експерименту порівняно з контролем (табл. 3.6). При цьому знижувався вміст NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (на 53 % на 48 годину) та, як наслідок, сумарного вмісту метаболітів NO (на 27 % на 48 годину) у порівнянні з показниками інтактних тварин (табл. 3.6).

Унаслідок зростання активності ензиму підвищеним був сумарний вміст стабільних метаболітів NO (нітритів та нітратів) на 145 % на 72 годину та на 146 % на 168 годину після впливу іонізуючого випромінювання у дозі 30 сГр в аорті щурів. Вміст NO<sub>2</sub><sup>-</sup> зростав на 119 % на 24 годину, на 168 % на 72 годину та на 162 % на 168 годину. Вміст NO<sub>3</sub><sup>-</sup> на ранніх термінах експерименту мав

тенденцію до зниження, однак, на третю та сьому доби після опромінення даний показник зростав на 177 % та 137 %, відповідно, порівняно з показниками тварин контрольної групи (табл. 3.6).

Таблиця 3.6

Вміст стабільних метаболітів оксиду нітрогену у тканинах аорти щурів за дії іонізуючого випромінювання у дозі 30 сГр та введення концентрату природного поліфенольного комплексу з виноградного вина

( $M \pm m$ ,  $n = 6-11$ )

Досліджувані показники Умови експерименту	Сумарний вміст метаболітів оксиду нітрогену (нмоль / мкг протеїну)	Нітрит-аніон (нмоль / мкг протеїну)	Нітрат-аніон (нмоль / мкг протеїну)
<b>24 год</b>			
<b>К</b>	14,58±0,73	4,30±0,54	10,28±1,07
<b>К+ПК</b>	17,09±2,82	7,59±0,68 <sup>§§</sup>	9,76±2,56
<b>О</b>	17,41±2,36	9,40±1,27 <sup>*</sup>	9,13±1,15
<b>О + ПК</b>	15,69±0,79	7,57±1,50	10,76±0,86
<b>48 год</b>			
<b>К</b>	16,25±1,36	4,99±0,50	11,27±0,93
<b>К+ПК</b>	11,93±0,91 <sup>§</sup>	6,55±1,57	5,37±1,43 <sup>§</sup>
<b>О</b>	12,72±1,43	6,00±1,67	6,72±1,75
<b>О + ПК</b>	17,62±3,08	6,94±1,54	10,67±1,46 <sup>+</sup>
<b>72 год</b>			
<b>К</b>	18,69±4,24	6,08±1,61	12,61±0,25
<b>К+ПК</b>	14,97±4,24	10,04±2,24 <sup>§</sup>	4,93±0,62
<b>О</b>	45,84±7,29 <sup>*</sup>	10,19±1,35 <sup>*</sup>	34,91±3,63 <sup>*</sup>
<b>О + ПК</b>	26,66±3,01 <sup>+</sup>	11,46±0,81	15,20±3,64 <sup>#,++</sup>
<b>168 год</b>			
<b>К</b>	16,15±2,08	5,49±0,89	10,66±1,38
<b>К+ПК</b>	15,48±1,53	7,18±1,75	8,30±1,24
<b>О</b>	39,65±2,09 <sup>**</sup>	14,40±2,61 <sup>*</sup>	25,25±2,21 <sup>**</sup>
<b>О + ПК</b>	28,48±3,99 <sup>#,++</sup>	9,42±1,62 <sup>#</sup>	19,06±3,10 <sup>#,++</sup>

<sup>\*</sup>, <sup>\*\*</sup> – відмінність між показниками контрольної групи (К) та опроміненням (О) вірогідна ( $P < 0,05$ ;  $P < 0,01$ ); <sup>§</sup>, <sup>§§</sup> – відмінність між показниками контрольної групи (К) та контрольної групи за введення концентрату ПК (К+ПК) вірогідна ( $P < 0,05$ ;  $P < 0,01$ ); <sup>#</sup> – відмінність між показниками групи опромінених тварин (О) та групи, якій вводили концентрату ПК на фоні опромінення (О+ПК) вірогідна ( $P < 0,05$ ); <sup>+</sup>, <sup>++</sup> – відмінність між

показниками контрольної групи за введення концентрату ПК (К+ПК) та групи, якій вводили концентрат ПК на фоні опромінення (О+ПК) вірогідна ( $P < 0,05$ ;  $P < 0,01$ ).

Відповідно до зниження активності NOS на 168 годину за споживання концентрату ПК на фоні опромінення зменшується сумарний вміст стабільних метаболітів NO порівняно з опроміненням (табл. 3.6). При цьому вміст  $\text{NO}_2^-$  знижується на 35 % лише на 168 годину, а вміст  $\text{NO}_3^-$  – на 44 % на 72 годину та на 24 % на 168 годину у порівнянні з показниками опромінених тварин (табл. 3.6).

**3.1.4. Активність NO-синтази та вміст стабільних метаболітів оксиду нітрогену у корковому шарі нирки щурів за умов опромінення у дозах 10 та 30 сГр та за споживання концентрату поліфенольного комплексу.** Опромінені лейкоцити синтезують великі кількості не лише АФО і АФН, але і молекул міжклітинного сигналювання (зокрема, цитокінів) [93]. Відповідно, це викликає незворотні порушення на рівні цілісного організму. Ми досліджували стан системи L-аргінін/NO у тканині нирок, оскільки цей орган забезпечує збереження гомеостазу системи крові шляхом продукції та вивільнення ряду цитокінів, хемокінів, гемопоетичних факторів [112]. Нирки вважають достатньо резистентними до дії випромінювання, однак порушення рівноваги біохімічних реакцій у клітинах даного органу призводить до погіршення стану організму, зокрема у ранній пострадіаційний період [170].

Як і в інших органах та тканинах у нирках оксид нітрогену продукується здебільшого з L-аргініну у NO-синтазній реакції та метаболізує в подальшому до нітритів і нітратів.

У нормі NO бере участь у регуляції ниркового кровотоку через його вазодилатуючу дію на судини та в регулюванні клубочкової фільтрації, впливаючи на коефіцієнт гломерулярної ультрафільтрації [133]. Тому цікавим є дослідження стану системи L-аргінін/NO у нирках опромінених тварин.

За дії 10 сГр іонізуючого випромінювання активність NOS у корковому шарі нирки щурів була вищою від контролю впродовж всього експерименту: в 1,6 раза на 24 годину, в 1,3 раза на 48 годину, в 1,8 раза на 72 годину та в 1,5 раза на 168 годину (рис. 3.7). Споживання тваринами концентрату ПК викликає зниження досліджуваного показника лише на 72 годину в 1,3 раза порівняно з опроміненням (рис. 3.7).

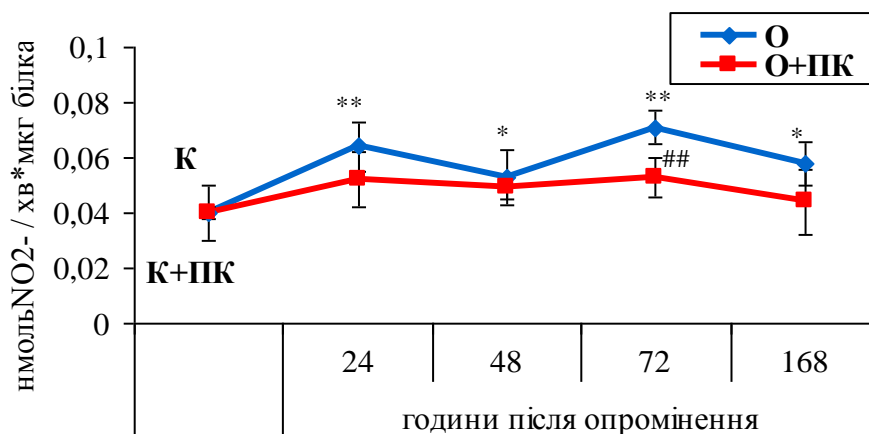


Рис. 3.7. Активність NO-синтази у корковому шарі нирки щурів за дії іонізуючого випромінювання у дозі 10 сГр та за введення концентрату природного поліфенольного комплексу з виноградного вина.

\*, \*\* – відмінність між показниками контрольної групи (К) та опроміненням (О) вірогідна ( $P < 0,05$ ;  $P < 0,01$ ); ## - відмінність між показниками групи опромінених тварин (О) та групи, якій вводили концентрат ПК на фоні опромінення (О+ПК) вірогідна ( $P < 0,01$ ).

Показано, що споживання з питною водою концентрату ПК викликало зростання на 25 % на 168 годину рівня метаболітів NO у корковому шарі нирки контрольних тварин (табл. 3.7).

За радіаційного впливу у дозі 10 сГр виявлено зростання сумарного вмісту стабільних метаболітів оксиду нітрогену у корковому шарі нирки щурів при збільшенні активності NOS на всі терміни експерименту. При цьому вміст  $\text{NO}_3^-$  зростав упродовж всього експерименту (на 139 % на 24 годину, на 44 % на 48 годину, на 87 % на 72 годину та на 189 % на 168 годину). Вміст  $\text{NO}_2^-$  на 24 годину мав тенденцію до зниження, а в подальшому зростав та на 168 годину був на 26 % вищим від контролю (табл. 3.7).

Таблиця 3.7

Вміст стабільних метаболітів оксиду нітрогену у корковому шарі нирки щурів за дії іонізуючого випромінювання у дозі 10 сГр та введення концентрату природного поліфенольного комплексу з виноградного вина

( $M \pm m$ ,  $n = 6-10$ )

Досліджувані показники Умови експерименту	Сумарний вміст метаболітів оксиду нітрогену (нмоль / мкг протеїну)	Нітрит-аніон (нмоль / мкг протеїну)	Нітрат-аніон (нмоль / мкг протеїну)
<b>24 год</b>			
<b>К</b>	15,82±1,83	0,75±0,03	15,07±1,24
<b>К+ПК</b>	14,92±2,04	0,68±0,04	14,24±2,17
<b>О</b>	36,73±2,78 <sup>**</sup>	0,64±0,06 <sup>*</sup>	36,09±2,94 <sup>*</sup>
<b>О + ПК</b>	28,25±1,92 <sup>#,+</sup>	0,65±0,01	27,60±1,68 <sup>#,+</sup>
<b>48 год</b>			
<b>К</b>	19,03±0,98	0,63±0,06	18,40±2,04
<b>К+ПК</b>	20,31±1,37	0,69±0,04	19,62±3,82
<b>О</b>	27,28±2,64 <sup>*</sup>	0,72±0,01 <sup>*</sup>	26,56±0,98 <sup>*</sup>
<b>О + ПК</b>	25,62±1,83	0,69±0,03	24,93±2,05
<b>72 год</b>			
<b>К</b>	17,26±1,93	0,71±0,02	16,55±1,94
<b>К+ПК</b>	17,39±2,41	0,53±0,06 <sup>§</sup>	16,86±2,75
<b>О</b>	31,64±0,85 <sup>**</sup>	0,84±0,06 <sup>*</sup>	30,80±1,95 <sup>**</sup>
<b>О + ПК</b>	27,17±1,53 <sup>#,+</sup>	0,98±0,01 <sup>##,+</sup>	25,64±2,53 <sup>+</sup>
<b>168 год</b>			
<b>К</b>	14,82±2,38	0,70±0,02	13,80±1,32
<b>К+ПК</b>	18,57±0,72 <sup>§</sup>	0,67±0,03	14,40±1,05
<b>О</b>	36,74±1,73 <sup>**</sup>	0,88±0,10 <sup>**</sup>	39,91±1,37 <sup>**</sup>
<b>О + ПК</b>	30,18±1,45 <sup>#</sup>	0,96±0,02	29,22±1,83 <sup>##</sup>

<sup>\*</sup>, <sup>\*\*</sup> – відмінність між показниками контрольної групи (К) та опроміненням (О) вірогідна ( $P < 0,05$ ;  $P < 0,01$ ); <sup>§</sup> – відмінність між показниками контрольної групи (К) та контрольної групи за введення концентрату ПК (К+ПК) вірогідна ( $P < 0,05$ ); <sup>#</sup>, <sup>##</sup> – відмінність між показниками групи опромінених тварин (О) та групи, якій вводили концентрат ПК на фоні опромінення (О+ПК) вірогідна ( $P < 0,05$ ;  $P < 0,01$ ); <sup>+</sup> – відмінність між показниками контрольної групи за введення концентрату ПК (К+ПК) та групи, якій вводили концентрат ПК на фоні опромінення (О+ПК) вірогідна ( $P < 0,05$ ).

При прийомі концентрату ПК та опроміненні дозою 10 сГр вміст стабільних метаболітів оксиду нітрогену знижувався на 23 % на 24 годину, на

14 % на 72 годину та на 18 % на 168 годину порівняно з показниками групи тварин, які були опромінені (табл. 3.7).

Нами відмічено, що після опромінення активність NOS в корковому шарі нирки щурів зростала у 2 рази на 24 і 48 годину, в 2,6 рази на 72 годину та в 1,8 раза на 168 годину порівняно з показниками тварин контрольної групи (рис 3.8).

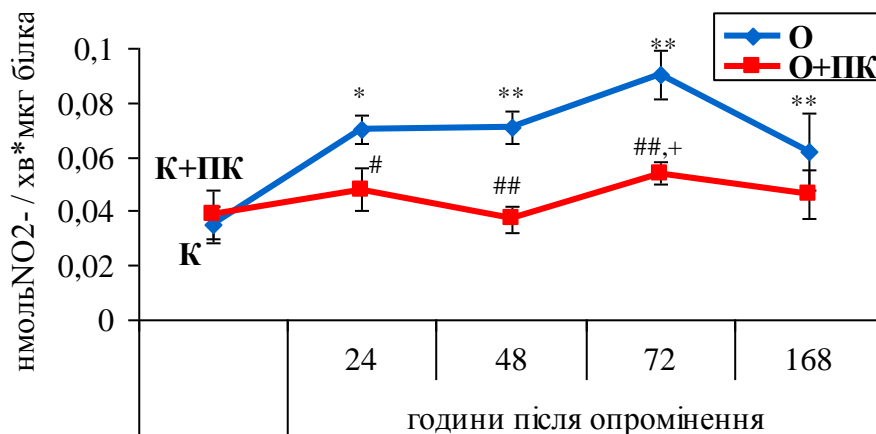


Рис. 3.8. Активність NO-синтази у корковому шарі нирок щурів за дії іонізуючого випромінювання у дозі 30 сГр та за введення концентрату природного поліфенольного комплексу з виноградного вина.

\*, \*\* – відмінність між показниками контрольної групи (К) та опроміненням (О) вірогідна ( $P < 0,05$ ;  $P < 0,01$ ); #, ## – відмінність між показниками групи опроміненних тварин (О) та групи, якій вводили концентрат ПК на фоні опромінення (О+ПК) вірогідна ( $P < 0,05$ ;  $P < 0,01$ ); + – відмінність між показниками контрольної групи за введення концентрату ПК (К+ПК) та групи, якій вводили концентрат ПК на фоні опромінення (О+ПК) вірогідна ( $P < 0,05$ ).

При введенні концентрату ПК та після дії іонізуючого опромінення у дозі 30 сГр активність NOS знижується у 1,5 рази на 24 годину, в 1,9 рази на 48 годину та в 1,7 рази на 72 годину в порівнянні з показниками опроміненних тварин (рис. 3.8).

Таблиця 3.8

Вміст стабільних метаболітів оксиду нітрогену у корковому шарі нирки щурів за дії іонізуючого випромінювання у дозі 30 сГр та введення концентрату природного поліфенольного комплексу з виноградного вина

( $M \pm m$ ,  $n = 6-10$ )

Досліджувані показники Умови експерименту	Сумарний вміст метаболітів оксиду нітрогену (нмоль / мкг протеїну)	Нітрит-аніон (нмоль / мкг протеїну)	Нітрат-аніон (нмоль / мкг протеїну)
<b>24 год</b>			
<b>К</b>	12,37±2,83	0,88±0,04	11,49±2,1
<b>К+ПК</b>	28,45±2,86 <sup>§</sup>	0,47±0,02 <sup>§</sup>	27,98±3,05 <sup>§§</sup>
<b>О</b>	43,09±6,85 <sup>*</sup>	0,35±0,10 <sup>**</sup>	42,74±9,68 <sup>*</sup>
<b>О + ПК</b>	22,75±2,49 <sup>##</sup>	0,71±0,04 <sup>##,+</sup>	22,04±4,90 <sup>#</sup>
<b>48 год</b>			
<b>К</b>	12,85±1,30	0,56±0,11	12,29±2,90
<b>К+ПК</b>	28,42±2,01 <sup>§</sup>	0,92±0,05 <sup>§</sup>	27,50±2,11 <sup>§§</sup>
<b>О</b>	31,50±1,10 <sup>*</sup>	0,76±0,04 <sup>*</sup>	30,74±1,15 <sup>**</sup>
<b>О + ПК</b>	26,77±2,09	0,84±0,07	25,93±2,02 <sup>#</sup>
<b>72 год</b>			
<b>К</b>	18,95±3,85	0,87±0,09	18,08±1,84
<b>К+ПК</b>	29,22±1,89 <sup>§§</sup>	0,88±0,09	28,34±1,83 <sup>§</sup>
<b>О</b>	34,40±3,81 <sup>**</sup>	1,56±0,58	32,84±4,83 <sup>**</sup>
<b>О + ПК</b>	36,08±1,78 <sup>+</sup>	1,07±0,03	35,01±1,81 <sup>++</sup>
<b>168 год</b>			
<b>К</b>	14,52±2,15	0,72±0,04	13,80±1,32
<b>К+ПК</b>	15,24±1,72	0,84±0,06 <sup>§</sup>	14,40±1,05
<b>О</b>	41,24±2,51 <sup>**</sup>	1,33±0,09 <sup>**</sup>	39,91±1,37 <sup>*</sup>
<b>О + ПК</b>	26,15±1,08 <sup>##,++</sup>	0,96±0,10 <sup>#</sup>	25,19±0,46 <sup>##,++</sup>

\*, \*\* – відмінність між показниками контрольної групи (К) та опроміненням (О) вірогідна ( $P < 0,05$ ;  $P < 0,01$ ); §, §§ – відмінність між показниками контрольної групи (К) та контрольної групи за введення концентрату ПК (К+ПК) вірогідна ( $P < 0,05$ ;  $P < 0,01$ ); #, ## – відмінність між показниками групи опромінених тварин (О) та групи, якій вводили концентрат ПК на фоні опромінення (О+ПК) вірогідна ( $P < 0,05$ ;  $P < 0,01$ ); +, ++ – відмінність між показниками контрольної групи за введення концентрату ПК (К+ПК) та групи, якій вводили концентрат ПК на фоні опромінення (О+ПК) вірогідна ( $P < 0,05$ ;  $P < 0,01$ ).

Встановлено, що введення контрольним щурам концентрату ПК зумовлює зростання сумарного вмісту метаболітів NO на 130 % на 24 годину, на 121 % на 48 годину та на 54 % на 72 годину (табл. 3.8) поряд зі збереженням активності NOS на рівні контрольних показників. Вміст досліджуваних метаболітів може зростати за цих експериментальних умов через імовірну активацію незалежних від NOS шляхів синтезу NO, ключовими подіями яких є залучення протеїнів з нітрат- та нітрит-редуктазною активністю, а також клітинних ксантиноксидаз.

Внаслідок підвищення активності NOS за опромінення у дозі 30 сГр на всі терміни експерименту зростав вміст стабільних метаболітів NO: на 248 % на 24 годину, на 145 % на 48 годину, на 82 % на 72 годину та на 184 % на 168 годину. Варто зазначити, що на 24 годину при зростанні вмісту  $\text{NO}_3^-$  на 272 %, вміст  $\text{NO}_2^-$  знижується на 60 % у порівнянні з контролем (табл. 3.8).

При сукупній дії концентрату ПК та 30 сГр іонізуючого випромінювання було відмічено зниження сумарного вмісту метаболітів NO на 47 % на 24 годину та на 37 % на 168 годину, а також  $\text{NO}_3^-$  на 48 % на 24 годину, на 16 % на 48 годину і на 37 % на 168 годину порівняно з показниками тварин, яких піддавали лише дії іонізуючої радіації. Вміст  $\text{NO}_2^-$  на першу добу після опромінення за умов споживання концентрату ПК зростав на 102 % та знижувався на 28 % на 168 годину після опромінення.

Таким чином, за умов опромінення як у дозі 10 сГр, так і у дозі 30 сГр виявлено порушення синтезу оксиду нітрогену у NO-синтазній реакції у периферичній крові, імунокомпетентних клітинах, тканинах аорти та нирок щурів. Як наслідок, зазнає змін пул метаболітів NO – нітритів та нітратів, що може призвести до поглиблення радіоіндукованих уражень. Концентрат ПК пригнічує активність NOS в усіх досліджуваних клітинах та тканинах, модифікуючи радіоіндуковане порушення продукції NO, нітритів та нітратів.



### **3.2. Вплив поліфенолів з виноградного вина на рівень 3'-нітротирозин-модифікованих протеїнів за дії малих доз іонізуючого випромінювання**

NOS є біфункціональним ферментом, адже здатна каталізувати утворення оксиду нітрогену та супероксидного аніон-радикаду. Причиною цього є димерна природа молекули ферменту, в якому дві субодиниці здатні функціонувати незалежно одна від одної. Продувати оксид нітрогену NOS може лише за високої внутрішньоклітинної концентрації  $\text{BH}_4$  та L-аргініну [36].

Зростання активності NOS за умов дії малих доз радіації може стати причиною надмірної продукції як NO, так і  $\text{O}_2^{\cdot-}$ . Продукти NO-синтазної реакції взаємодіють між собою та продукують більш потужний прооксидант та цитотоксин – пероксинітрит. Ця молекула взаємодіє з ліпідами, ДНК і протеїнами, спричиняє їхнє окиснення, нітрування та нітрозилування, а отже призводить до втрати їхніх функцій, що провокує ушкодження клітин і клітинної смерті [113, 170, 214, 233]. Оскільки АФН важко детектувати *in vivo* у зв'язку з їхньою високою реактивністю, нітротирозин вважають найкращим біомаркером утворення  $\text{ONOO}^-$  [48].

**3.2.1. Накопичення 3'-нітротирозин-модифікованих протеїнів у лейкоцитах щурів за дії іонізуючого випромінювання у дозах 10 та 30 сГр та за умов споживання концентрату поліфенольного комплексу з виноградного вина.** За умов споживання контрольними тваринами концентрату ПК на всі терміни дослідження не відмічено достовірних змін вмісту 3'-нітротирозин-модифікованих протеїнів у лізатах лейкоцитів щурів порівняно з контролем (рис. 3.9, рис. 3.10).

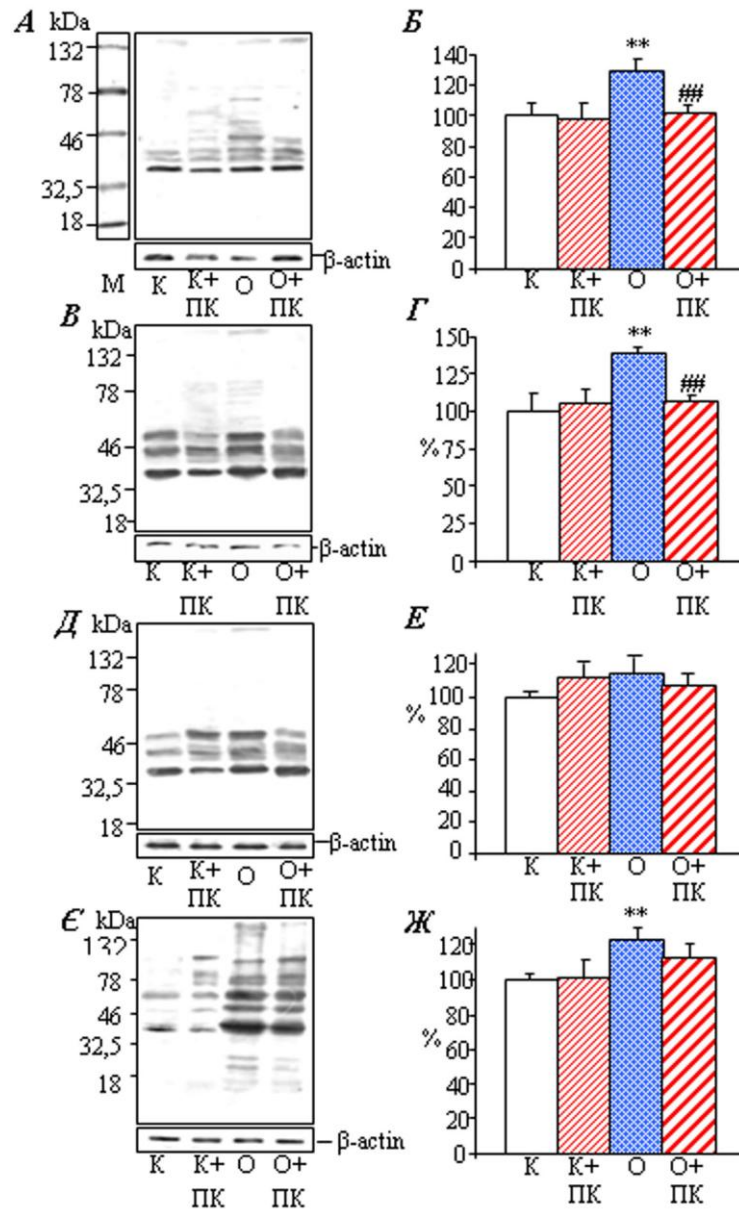


Рис. 3.9. Вестерн-блот аналіз 3'-нітротирозин-модифікованих протеїнів лізатів лейкоцитів на 24 (А), 48 (В), 72 (Д) години та на 7 добу (Е) після опромінення у дозі 10 сГр та за дії концентрату природного поліфенольного комплексу з виноградного вина. Вміст нітротирозин-модифікованих протеїнів у відсотках (контроль прийнято за 100%) (Б), (Г), (Е), (Ж), відповідно. М – маркери молекулярної маси.

\*\* – відмінність між показниками контрольної групи (К) та опроміненням (О) вірогідна ( $P < 0,01$ ); ## - відмінність між показниками групи опромінених тварин (О) та групи, якій вводили концентрат ПК на фоні опромінення (О+ПК) вірогідна ( $P < 0,01$ ).

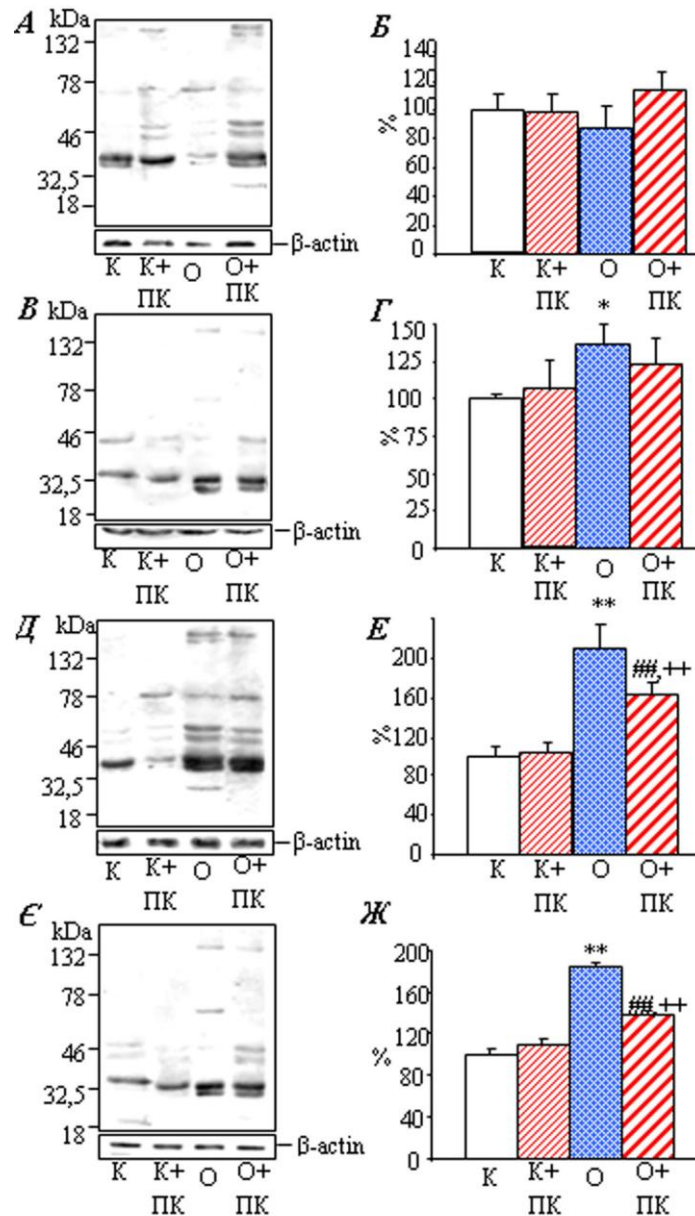


Рис. 3.10. Вестерн-блот аналіз 3'-нітротирозин-модифікованих протеїнів лізатів лейкоцитів на 24 (А), 48 (В), 72 (Д) години та на 7 добу (Є) після опромінення у дозі 30 сГр та за дії концентрату природного поліфенольного комплексу з виноградного вина. Вміст нітротирозин-модифікованих протеїнів у відсотках (контроль прийнято за 100%) (Б), (Г), (Е), (Ж), відповідно.

\*, \*\* – відмінність між показниками контрольної групи (К) та опроміненням (О) вірогідна ( $P < 0,05$ ;  $P < 0,01$ ); ## - відмінність між показниками групи опромінених тварин (О) та групи, якій вводили концентрат ПК на фоні опромінення (О+ПК) вірогідна ( $P < 0,01$ ); ++ – відмінність між показниками контрольної групи за введення концентрату ПК (К+ПК) та групи, якій вводили концентрат ПК на фоні опромінення (О+ПК) вірогідна ( $P < 0,01$ ).

Після опромінення в дозі 10 сГр досліджуваний показник зростав на 29 % 24 годину, на 39 % на 48 годину та на 22 % на 168 годину порівняно з контролем (рис. 3.9 А, Б, В, Г, Є, Ж), що, імовірно, є наслідком ініціації надмірного продукування вмісту АФН та АФО після впливу радіації. Нами виявлено достовірне зниження вмісту протеїнів, модифікованих нітруванням за залишками тирозину, на 28 % на 24 годину та на 32 % на 48 годину після радіаційного впливу у разі введення концентрату ПК порівняно з опроміненням, тобто повернення досліджуваного показника до контрольних значень (рис. 3.9 А, Б, В, Г). Таким чином, споживання тваринами концентрату ПК попереджає наднормове утворення 3'-ніротирозин-модифікованих протеїнів у лейкоцитах периферичної крові щурів після дії рентгенівського випромінювання у дозі 10 сГр.

Як за умов опромінення в дозі 10 сГр, вміст ніротирозину у лізатах лейкоцитів щурів після опромінення в дозі 30 сГр зростав, однак цей показник був значно вищий від контролю – на 37% на 48 годину, на 111% на 72 годину та на 174 % на 168 годину (рис. 3.10 В, Г, Д, Е, Є, Ж). Після опромінення за умов споживання тваринами концентрату ПК на другу добу експерименту відмічено незначне зниження вмісту протеїнів, модифікованих нітруванням за залишками тирозину, а на третю та сьому добу – на 49 % та на 46 %, відповідно, порівняно з досліджуваним показником за опромінення (рис. 3.10 Д, Е, Є, Ж), однак цей показник залишався вищим від контрольних значень.

У лейкоцитах периферичної крові всіх груп тварин було відмічено наявність домінуючого протеїну з молекулярною масою приблизно 40 кДа. Цікавим є те, що після опромінення у дозі 30 сГр з'являється два чітких бенди, що відповідають протеїнам з молекулярною масою 40-45 кДа. Це свідчить про те, що за умов впливу іонізуючого випромінювання модифікуються інші протеїни, ніж у нормі, а концентрат ПК впливаючи на сумарний вміст нітрованих протеїнів не здатний спричинити зміну клітинних мішеней цієї посттрансляційної модифікації.

Отже, інгібуючи активність NOS, концентрат ПК зумовлює зниження індукованої впливом малих доз іонізуючої радіації продукції оксиду нітрогену у лейкоцитах. Це у свою чергу пригнічує утворення пероксинітриту і, у подальшому, опосередковану ним модифікацію протеїнів. Таким чином, пригнічення нітративного стресу в ранній пострадіаційний період є одним із механізмів, що опосередковує позитивний коригуючий вплив поліфенолів виноградного вина на клітини імунної системи за впливу малих доз радіації.

**3.2.2. Протекторний ефект концентрату поліфенольного комплексу за нітративного стресу, індукованого дією іонізуючого випромінювання у дозах 10 та 30 сГр у тканинах аорти щурів.** У результаті проведених досліджень шляхом вестерн-блот аналізу виявлено імунореактивні смуги у лізатах аорти всіх груп тварин. Після опромінення у дозі 10 сГр вміст нітротирозин-модифікованих білків знижувався на 21 % 72 годину та на 19 % на 168 годину порівняно з показниками контрольної групи (рис. 3.11 Д, Е, Є, Ж).

За умов споживання підослідними тваринами концентрату ПК на фоні опромінення дозою 10 сГр відмічено зниження вмісту нітрованих протеїнів на 48 годину експерименту на 37 % порівняно з показниками опромінених тварин (рис. 3.11 В, Г).

Введення концентрату ПК контрольним тваринам спричиняє зростання рівня нітротирозину в тканинах аорти на першу добу експерименту на 40 %, порівняно зі значеннями контрольних щурів (рис. 3.12 В, Г).

Нами було відмічено зниження вмісту 3'-нітротирозин-модифікованих протеїнів на 24 та 72 години після опромінення на 22 % та на 31 %, відповідно, а на сьому добу після дії радіаційного чинника нами було відмічено тенденцію до зростання цього показника у порівнянні з контролем (рис. 3.12 А, Б, Д, Е, Є, Ж).

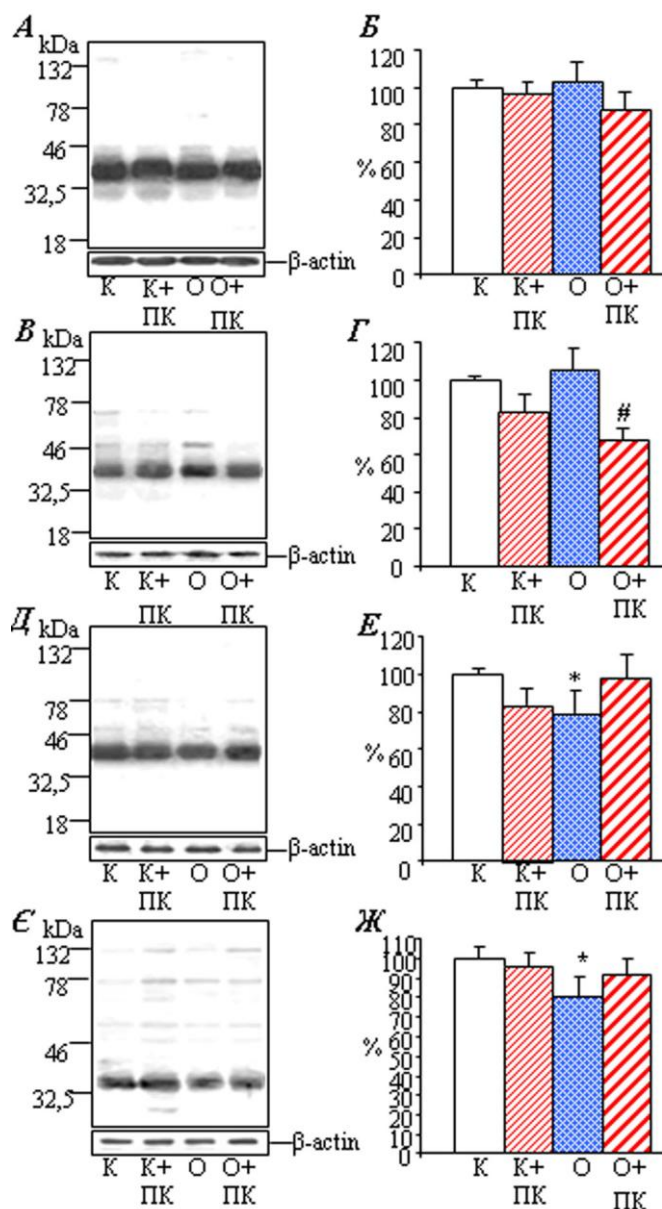


Рис. 3.11. Репрезентативний вестерн-блот аналіз 3'-нітротирозин-модифікованих протеїнів лізатів тканин аорти на 24 (А), 48 (В), 72 (Д) години та на 7 добу (Е) після опромінення у дозі 10 сГр та за дії концентрату природного поліфенольного комплексу з виноградного вина. Вміст нітротирозин-модифікованих протеїнів у відсотках (контроль прийнято за 100%) (Б), (Г), (Е), (Ж), відповідно.

\* – відмінність між показниками контрольної групи (К) та опроміненням (О) вірогідна ( $P < 0,05$ ); # – відмінність між показниками групи опромінених тварин (О) та групи, якій вводили концентрат ПК на фоні опромінення (О+ПК) вірогідна ( $P < 0,05$ ).

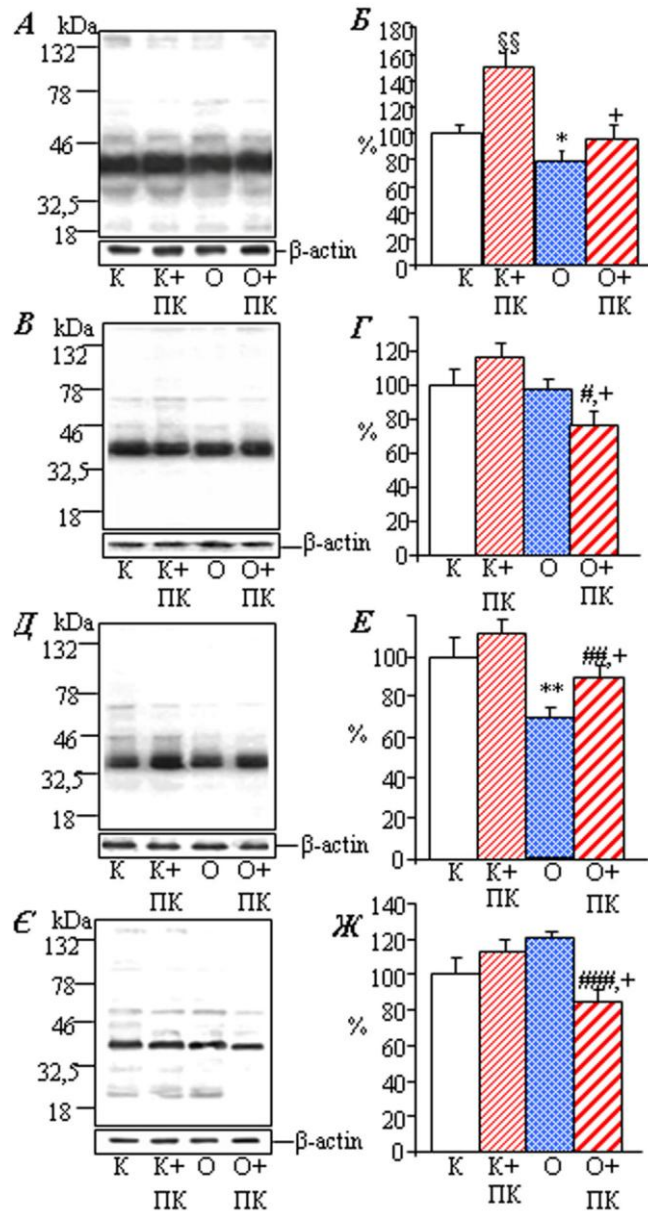


Рис. 3.12. Репрезентативний вестерн-блот аналіз 3'-нітротирозин-модифікованих протеїнів лізатів тканин аорти на 24 (А), 48 (В), 72 (Д) години та на 7 добу (Е) після опромінення у в дозі 30 сГр та за дії концентрату природного поліфенольного комплексу з виноградного вина. Вміст нітротирозин-модифікованих протеїнів у відсотках (контроль прийнято за 100%) (Б), (Г), (Е), (Ж), відповідно.

\*, \*\* – відмінність між показниками контрольної групи (К) та опроміненням (О) вірогідна ( $P < 0,05$ ;  $P < 0,01$ ); §§ – відмінність між показниками контрольної групи (К) та контрольної групи за введення концентрату ПК (К+ПК) вірогідна ( $P < 0,01$ ); #, ##, ### – відмінність між показниками групи опромінених тварин (О) та групи, якій вводили концентрат ПК на фоні опромінення (О+ПК) вірогідна ( $P < 0,05$ ;  $P < 0,01$ ;  $P < 0,001$ ); + –



відмінність між показниками контрольної групи за введення концентрату ПК (К+ПК) та групи, якій вводили концентрат ПК на фоні опромінення (О+ПК) вірогідна ( $P < 0,05$ ).

На відміну від експериментальних даних, отриманих при дослідженні вмісту 3'-нітротирозин-модифікованих протеїнів у лейкоцитах та корковому шарі нирки, показано, що в тканинах аорти цей показник знижувався при опроміненні порівняно з контролем. Відомо, що домінуючою ізоформою NOS у клітинах ендотелію є eNOS, яка синтезує невеликі кількості NO, що одразу ж залучається у реалізацію фізіологічних функцій судин чи окиснюється до  $\text{NO}_2^-$  та  $\text{NO}_3^-$ . Лише у разі активації iNOS значна частина утвореного NO залишається вільною і здатна реагувати з пероксинітридом. Виявлене нами зниження вмісту 3-нітротирозину поряд із зростанням активності NOS на третю та сьому доби (рис. 3.5, рис. 3.6) може бути свідченням того, що за впливу іонізуючого випромінювання у дозах 10 та 30 сГр у аорті активується eNOS, яка синтезує таку кількість NO, що одразу ж елімінується.

За умов споживання підслідними тваринами концентрату ПК на фоні опромінення дозою 30 сГр відмічено зниження вмісту 3'-нітротирозин-модифікованих протеїнів на 48 годину експерименту на 20 %, зростання їхнього вмісту на 72 годину на 20 % та наступне зниження на 168 годину на 36 % порівняно із показниками опромінених тварин (рис. 3.12 В, Г, Д, Е, Є, Ж). Варто зазначити, що рівень 3'-нітротирозину був нижчим від контрольних значень упродовж всього експерименту за цих умов.

**3.2.3 Роль природного поліфенольного комплексу вина у запобіганні накопиченню 3'-нітротирозин-модифікованих протеїнів у нирках щурів за опромінення у дозах 10 та 30 сГр.** Методом вестерн-блот аналізу встановлено зростання вмісту 3'-нітротирозин-модифікованих протеїнів після дії іонізуючого випромінювання у дозі 10 сГр на 28 % на 48 годину та на 16 % на 168 годину (рис. 3.13 В, Г, Є, Ж), тоді як за впливу концентрату ПК не



виявлено суттєвих змін досліджуваного показника ні у контрольній групі тварин, ні у тварин опромінених цією ж дозою радіації.

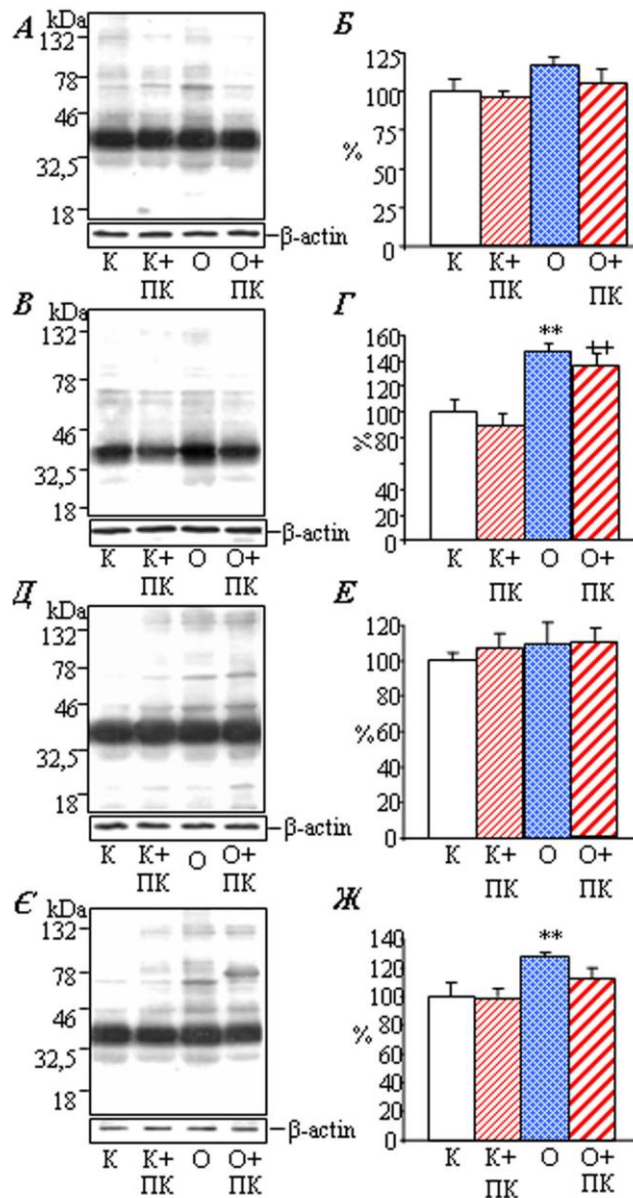


Рис. 3.13. Репрезентативний вестерн-блот аналіз 3'-нітротирозин-модифікованих протеїнів лізатів нирки на 24 (А), 48 (В), 72 (Д) години та на 7 добу (Е) після опромінення у дозі 10 сГр та дії концентрату природного поліфенольного комплексу з виноградного вина. Вміст нітротирозин-модифікованих протеїнів у відсотках (контроль прийнято за 100%) (Б), (Г), (Е), (Ж), відповідно.

\*\* – відмінність між показниками контрольної групи (К) та опроміненням (О) вірогідна ( $P < 0,01$ ); ++ – відмінність між показниками контрольної групи за введення

концентрату ПК (К+ПК) та групи, якій вводили концентрат ПК на фоні опромінення (О+ПК) вірогідна ( $P<0,01$ ).

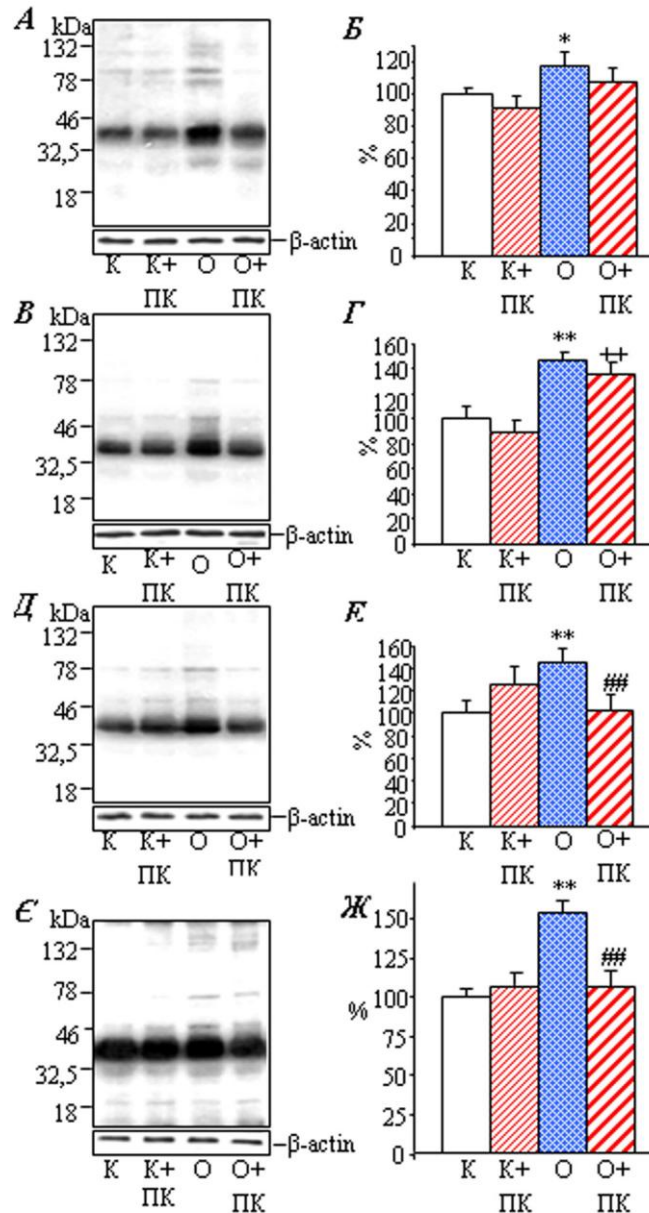


Рис. 3.14. Репрезентативний вестерн-блот аналіз 3'-нітротирозин-модифікованих протеїнів лізатів нирки на 24 (А), 48 (В), 72 (Д) години та на 7 добу (Е) після опромінення у дозі 30 сГр та за дії концентрату природного поліфенольного комплексу з виноградного вина. Вміст нітротирозин-модифікованих протеїнів у відсотках (контроль прийнято за 100%) (Б), (Г), (Е), (Ж) відповідно.

\*, \*\* – відмінність між показниками контрольної групи (К) та опроміненням (О) вірогідна ( $P<0,05$ ;  $P<0,01$ ); ## - відмінність між показниками групи опромінених тварин (О) та групи, якій вводили концентрат ПК на фоні опромінення (О+ПК) вірогідна ( $P<0,01$ ); ++ –

відмінність між показниками контрольної групи за введення концентрату ПК (К+ПК) та групи, якій вводили концентрат ПК на фоні опромінення (О+ПК) вірогідна ( $P < 0,01$ ).

Після впливу рентгенівського опромінення у дозі 30 сГр у корковому шарі нирки щурів встановлено зростання вмісту протеїнів, нітрованих залишками тирозину, протягом усього експерименту: на 17,5 % на 24 годину, на 47 % на 48 годину, на 44 % на 72 годину та на 50 % на 168 годину порівняно з показниками групи контрольних тварин (рис. 3.14 А, Б, В, Г, Д, Е, Є, Ж). За введення поліфенольного комплексу показана тенденція до зниження досліджуваного показника на 24 та 48 години після опромінення та встановлено його достовірне зниження на 42 % та 47 % через 72 та 168 годин, відповідно, порівняно з показниками групи опромінених тварин (рис. 3.14 А, Б, В, Г, Д, Е, Є, Ж).

Отримані нами результати свідчать, що у тканинах нирки наявний домінуючий протеїн, що відповідає молекулярній масі 38–45 кДа, представлений у лізатах зразків всіх чотирьох групах тварин. Також показано збільшення після опромінення у дозі 10 сГр вмісту нітрованих протеїнів із молекулярною масою приблизно 80 кДа на 132 % на 24 годину, 94 % на 72 годину та на 158 % на 168 годину експерименту і після опромінення у дозі 30 сГр – на 162 % на 24 годину, на 139 % на 48 годину, на 115 % на 72 годину та 96 % на 168 годину порівняно з контролем. Також зростав вміст нітрованих протеїнів з молекулярною масою приблизно 50 кДа за умов опромінення меншою дозою на 74 % на другу, на 111 % на третю та на 77 % на сьому доби, а після опромінення у дозі 30 сГр – на 26 % на першу, на 94 % на другу, на 101 % на третю і на 125 % на сьому доби експерименту у порівнянні з показниками контрольної групи тварин.

Таким чином, накопичення 3'-нітротирозин-модифікованих протеїнів в лейкоцитах, аорті та нирках свідчить про розвиток нітративного стресу, спричиненого дією малих доз іонізуючого випромінювання. Поліфеноли з виноградного вина пригнічують посттрансляційну модифікацію протеїнів

пероксинітрином і, тим самим, пригнічують розвиток радіоіндукованого нітративного стресу.

### **3.3. Вплив концентрату поліфенольного комплексу вина на вміст продуктів пероксидного окиснення ліпідів та на ензиматичну ланку системи антиоксидантного захисту за дії малих доз іонізуючого випромінювання**

Рівновага окисно-відновних процесів є основою нормального функціонування клітини. Відомо, що іонізуюче випромінювання стимулює зростанням вмісту прооксидантів, в тому числі АФО внаслідок радіолізу води та порушення ензиматичних реакцій (наприклад, дихального ланцюга мітохондрій). Це призводить до активації процесів вільнорадикального окиснення та накопичення стійких цитотоксичних продуктів, які утворюються майже з усіх класів біомолекул [11]. Провідна роль у формуванні радіоіндукованих порушень належить модифікації ліпідів внаслідок їхнього пероксидного окиснення. За фізіологічних умов система реакцій ПОЛ контролюється різноманітним антиоксидантними захисними механізмами. Порушення такого контролю, зокрема за умов опромінення, призводить до інтенсифікації процесів ПОЛ та накопиченню в організмі продуктів ліпопероксидації – високореакційних молекул, які залучаються до ушкоджень клітинних структур [30].

Накопичення АФО та продуктів ПОЛ (які є вторинними АФО) стимулює ензиматичну та неензиматичну антиоксидантну систему захисту. Після впливу іонізуючого випромінювання різних величин доз різною мірою змінюється інтенсивність та ступінь ефективності дії компенсаторних механізмів, перш за все ензиматичних [11, 83].

#### **3.3.1. Вплив концентрату природного поліфенольного комплексу вина на стан ензиматичної системи антиоксидантного захисту та вміст**

продуктів пероксидного окиснення ліпідів у периферичній крові щурів при дії іонізуючого випромінювання у дозах 10 та 30 сГр. Введення концентрату ПК *per os* щурам контрольної групи не призводить до виникнення змін активностей ензимів антиоксидантної системи захисту (рис. 3.15)

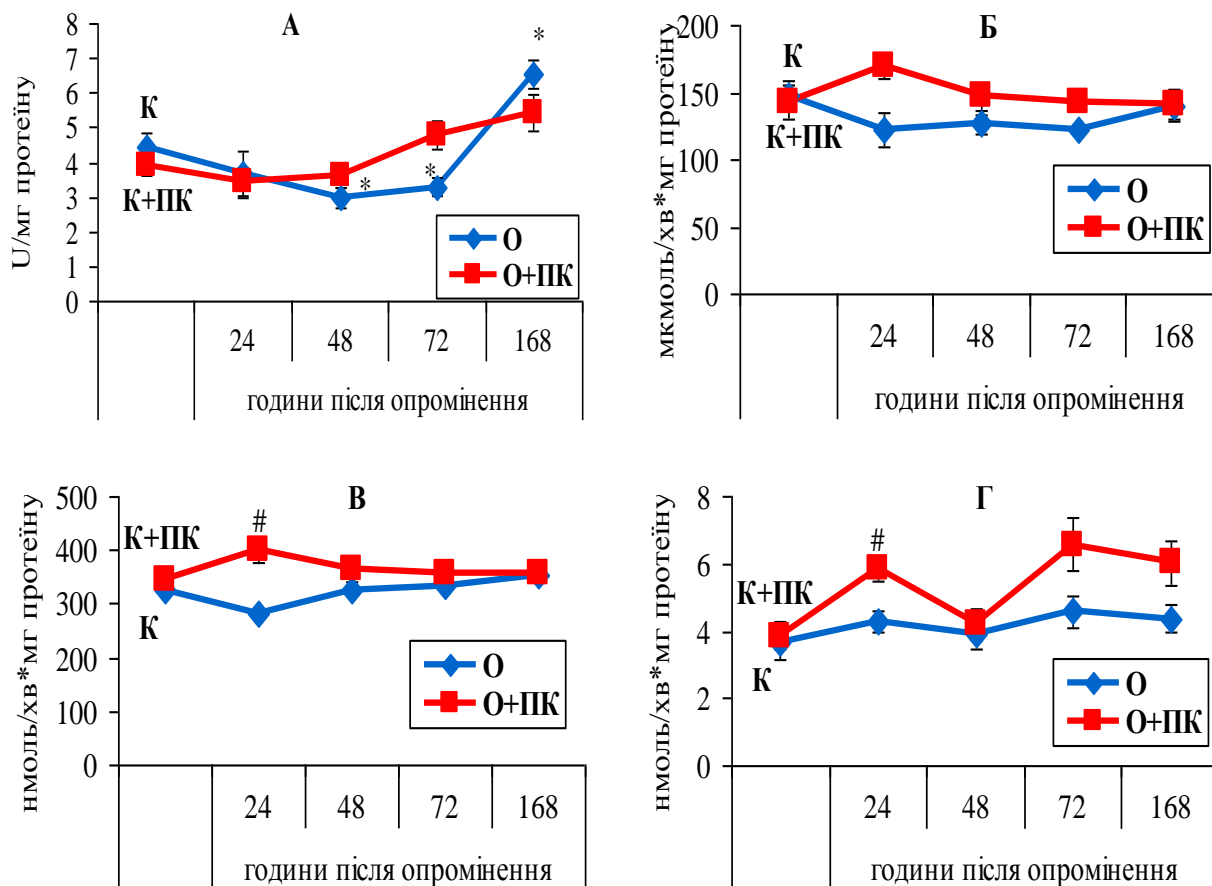


Рис. 3.15. Активність супероксиддисмутази (А), каталази (Б), глутатіонпероксидази (В) і глутатіонредуктази (Г) у периферичній крові за дії іонізуючого випромінювання у дозі 10 сГр та за введення концентрату природного поліфенольного комплексу з виноградного вина.

\* – відмінність між показниками контрольної групи (К) та опроміненням (О) вірогідна ( $P < 0,05$ ); # – відмінність між показниками групи опромінених тварин (О) та групи, якій вводили концентрат ПК на фоні опромінення (О+ПК) вірогідна ( $P < 0,05$ ).

Отримані нами дані свідчать про зниження активності СОД в периферичній крові за дії опромінення у дозі 10 сГр у 1,5 раза на 48 годину і в 1,3 раза на 72 годину та зростання активності ензиму в 1,5 раза на сьому добу експерименту у порівнянні з контролем (рис. 3.15, додаток табл. 3).

Споживання тваринами концентрату ПК на викликало появи достовірних змін активності досліджуваного ензиму як у контрольних, так і в опромінених тварин (рис. 3.15).

Не показано достовірних змін каталазної активності крові за дії рентгенівського опромінення у дозі 10 сГр та на фоні споживання концентрату ПК (рис. 3.15).

Опромінення піддослідних тварин дозою 10 сГр не призводило до достовірних змін активності ГПО у периферичній крові у всі терміни досліджу, однак після аналогічного радіаційного впливу на фоні споживання концентрату ПК виявлено зростання активності ензиму в 1,4 раза на 24 годину у порівнянні з показниками опромінених тварин (рис. 3.15).

Аналогічні зміни були відмічені в активності ГР: цей показник зростав у 1,4 раза лише на 24 годину після дії радіації дозою 10 сГр за споживання концентрату ПК (рис. 3.15).

Більш виражені зміни активностей антиоксидантних ензимів спостерігалися за дії вищої дози опромінення – 30 сГр.

Показано зниження активності СОД в 2,2 раза на 24 годину після опромінення з подальшим зростанням в 2 та 1,8 рази на 72 і 168 години, відповідно, у порівнянні з контролем (рис. 3.16). Після опромінення та введення концентрату ПК відмічено зростання активності в 3,9 раза вже на 24 годину та наступне зниження в 1,8 раза на 72 годину (рис. 3.16), що свідчить про виражену антиоксидантну дію поліфенольного комплексу з виноградного вина уже на третю добу експерименту.

Встановлено зниження активності КАТ в 1,1 та 1,2 рази на 24 та 48 години, відповідно, після рентгенівського опромінення дозою 30 сГр, тоді як після аналогічного радіаційного впливу на фоні введення концентрату ПК активність цього ензиму дещо перевищувала рівень контролю і на 48 годину достовірно зростала порівняно з показниками групи опромінених тварин (рис. 3.16, додаток табл. 3), що корелює зі зростанням активності СОД у цій групі.

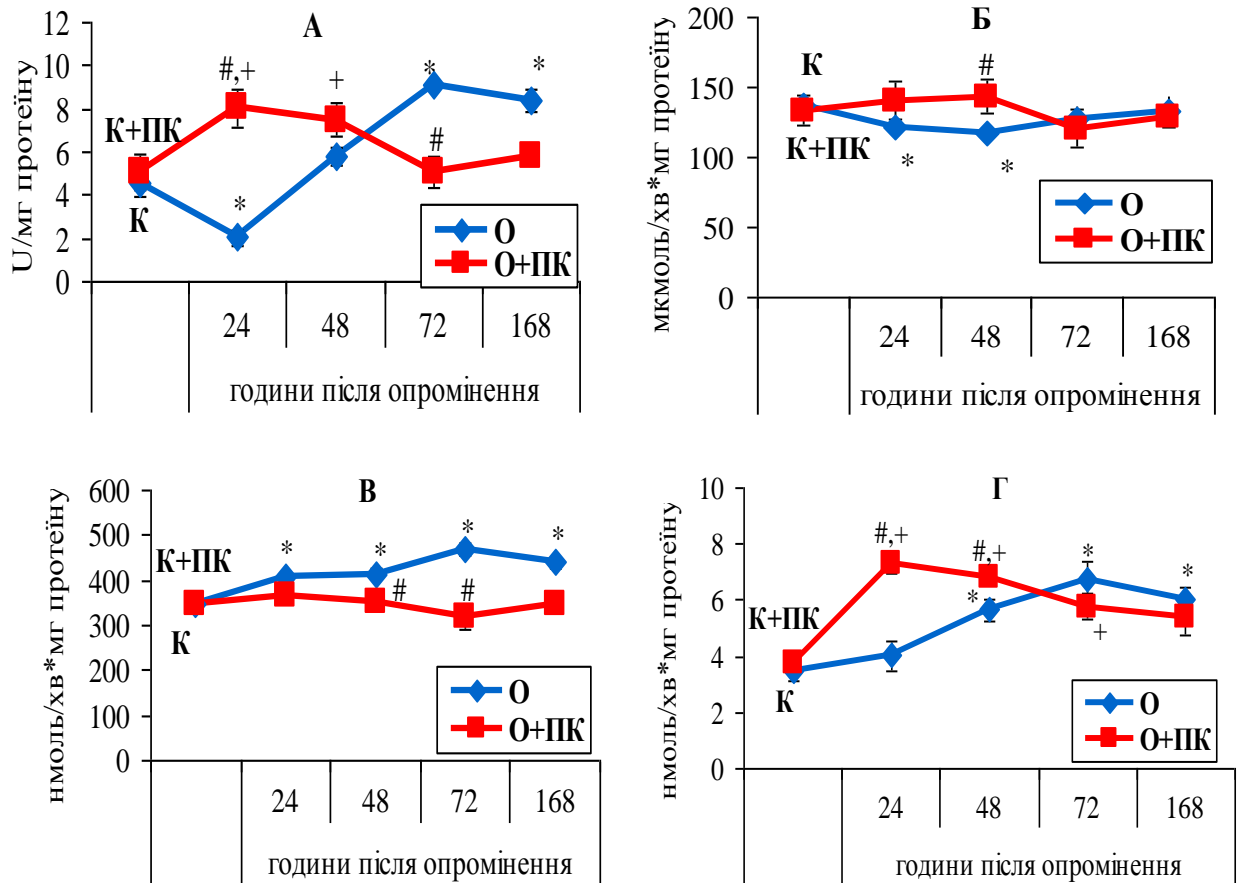


Рис. 3.16. Активність супероксиддисмутази (А), каталази (Б), глутатіонпероксидази (В) і глутатіонредуктази (Г) у периферичній крові за дії іонізуючого випромінювання у дозі 30 сГр та за введення концентрату природного поліфенольного комплексу з виноградного вина.

\* – відмінність між показниками контрольної групи (К) та опроміненням (О) вірогідна ( $P < 0,05$ ); # – відмінність між показниками групи опромінених тварин (О) та групи, якій вводили концентрат ПК на фоні опромінення (О+ПК) вірогідна ( $P < 0,05$ ); + – відмінність між показниками контрольної групи за введення концентрату ПК (К+ПК) та групи, якій вводили концентрат ПК на фоні опромінення (О+ПК) вірогідна ( $P < 0,05$ ).

Активність ГПО зростала у периферичній крові щурів упродовж усього експерименту після опромінення дозою 30 сГр: в 1,2 рази на 24 та 48 години, в 1,4 раза на 72 годину та в 1,3 раза на 168 годину порівняно з контролем (рис. 3.16). Тоді як за умов опромінення на фоні введення концентрату ПК активність ензиму залишалася у межах контролю впродовж усіх термінів експерименту (рис. 3.16).

Таблиця 3.9

Вміст ТБК-позитивних продуктів у периферичній крові щурів за дії іонізуючого випромінювання у дозі 10 сГр та за введення концентрату природного поліфенольного комплексу з виноградного вина

( $M \pm m$ ,  $n = 6-10$ )

Досліджувані показники		ТБК-ПП (нмоль / мл крові)
Умови експерименту		
<b>К</b>		209,94±24,10
<b>К+ПК</b>		226,95±23,78
<b>О</b>	24 год	181,19±10,96
	48 год	267,35±17,96*
	72 год	285,15±21,23*
	168 год	238,16±23,25
<b>О+ПК</b>	24 год	235,39±12,99
	48 год	235,62±29,58
	72 год	218,01±26,95#
	168 год	208,82±9,54

\* – відмінність між показниками контрольної групи (К) та опроміненням (О) вірогідна ( $P < 0,05$ ); # – відмінність між показниками групи опромінених тварин (О) та групи, якій вводили концентрат ПК на фоні опромінення (О+ПК) вірогідна ( $P < 0,05$ ).

Оскільки за радіаційного впливу встановлено підвищення активності ГПО, закономірним є і зростання активності ГР в 1,6 раза на 48 годину, в 2 раза на 72 годину та в 1,8 раза на 168 годину порівняно з контролем, функцією якої є підтримання постійного рівня відновленого глутатіону як кофактора ензиматичної активності ГПО (рис. 3.16). У групі тварин, які зазнавали сукупної дії випромінювання дозою 30 сГр та концентрату ПК активність ГР також зростала в 1,8 раза на 24 годину та в 1,2 раза на 48 годину експерименту, порівняно з показниками опромінених тварин (рис. 3.16).

Інтенсивність окисних процесів оцінювали за вмістом ТБК-позитивних продуктів – кінцевих продуктів пероксидного окиснення ліпідів. Показано, що споживання піддослідними тваринами концентрату ПК не спричиняло зміни досліджуваного показника (табл. 3.9, табл. 3.10)



Таблиця 3.10

Вміст ТБК-позитивних продуктів у периферичній крові щурів за дії іонізуючого випромінювання у дозі 30 сГр та за введення концентрату природного поліфенольного комплексу з виноградного вина

( $M \pm m$ ,  $n = 6-10$ )

Умови експерименту \ Досліджувані показники		ТБК-ПП (нмоль / мл крові)
<b>К</b>		200,44±14,40
<b>К+ПК</b>		222,25±18,44
<b>О</b>	24 год	266,81±10,77*
	48 год	286,32±14,11*
	72 год	301,63±23,27*
	168 год	281,37±20,24*
<b>О+ПК</b>	24 год	167,55±14,83 <sup>#,+</sup>
	48 год	228,50±12,14 <sup>#</sup>
	72 год	213,33±14,58 <sup>#</sup>
	168 год	233,46±18,25

\* – відмінність між показниками контрольної групи (К) та опроміненням (О) вірогідна ( $P < 0,05$ ); # – відмінність між показниками групи опромінених тварин (О) та групи, якій вводили концентрат ПК на фоні опромінення (О+ПК) вірогідна ( $P < 0,05$ ); + – відмінність між показниками контрольної групи за введення концентрату ПК (К+ПК) та групи, якій вводили

За одноразового впливу іонізуючого випромінювання у дозі 10 сГр виявлено підвищений вміст ТБК-ПП (табл. 3.9) в периферичній крові щурів на 27 % на 48 годину та на 36 % на 72 годину в порівнянні з контрольними показниками. Введення концентрату ПК спричиняє зниження досліджуваного показника на 32 % на третю добу досліду порівняно з показниками групи опромінених тварин (табл. 3.9).

Встановлено значне зростання вмісту ТБК-ПП (табл. 3.10) у всі досліджувані терміни за впливу опромінення у дозі 30 сГр, що свідчить про надмірне радіоіндуковане утворення АФО і посилення оксидативних модифікацій ними молекул ліпідів. Вживання концентрату ПК запобігало

нагромадженню продуктів ПОЛ про що свідчить зниження рівня ТБК-ППІ на 40 % на 24 годину, на 50 % на 48 годину, на 29 % на 72 годину та на 44 % на 168 годину (табл. 3.10).

**3.3.2. Антиоксидантний ефект концентрату природного поліфенольного комплексу з виноградного вина у лейкоцитах щурів за умов опромінення у дозах 10 та 30 сГр.** За умов споживання контрольними тваринами концентрату ПК не було показано достовірних змін активностей антиоксидантних ензимів у порівнянні з контролем (рис. 3.17, рис. 3.18).

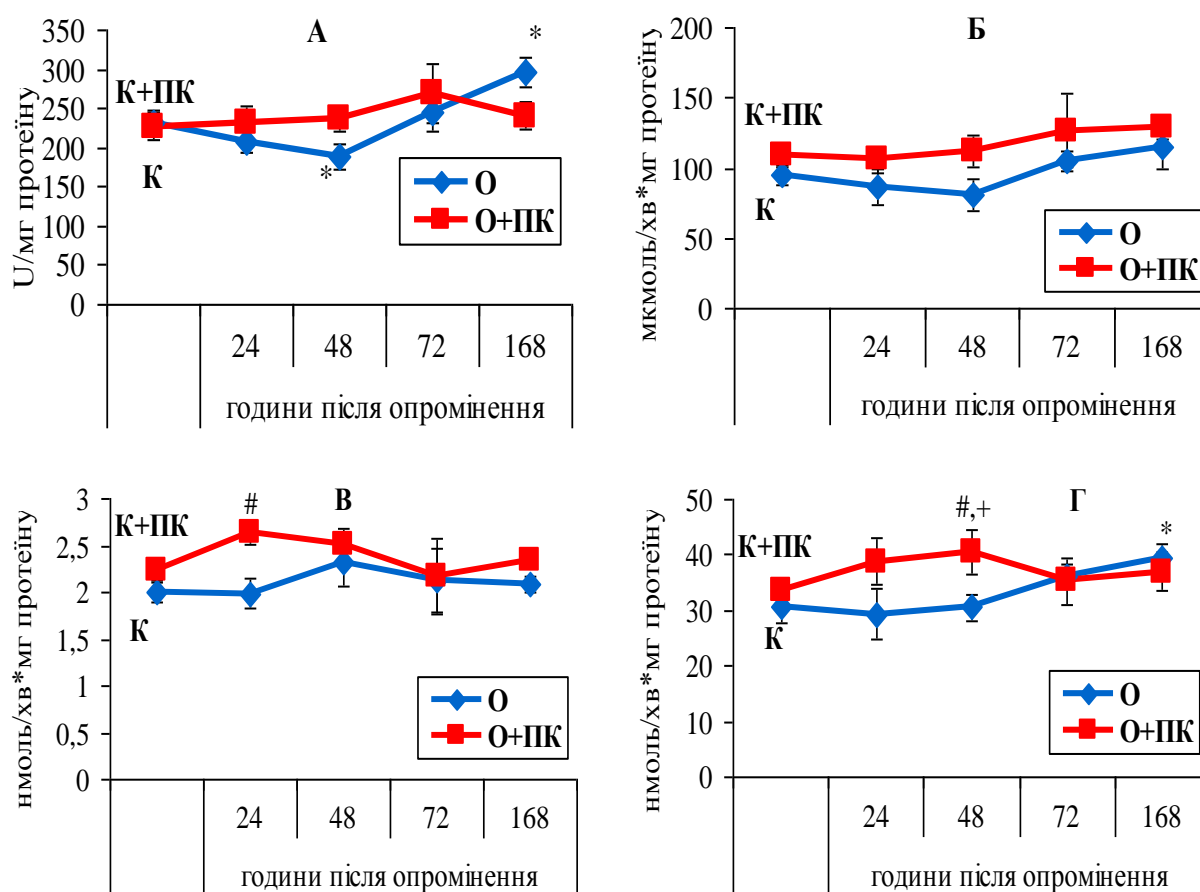


Рис. 3.17. Активність супероксиддисмутази (А), каталази (Б), глутатіонпероксидази (В) і глутатіонредуктази (Г) у лейкоцитах периферичної крові щурів за дії іонізуючого випромінювання у дозі 10 сГр та за введення концентрату природного поліфенольного комплексу з виноградного вина.

\* – відмінність між показниками контрольної групи (К) та опроміненням (О) вірогідна ( $P < 0,05$ ); # – відмінність між показниками групи опромінених тварин (О) та групи,

якій вводили концентрат ПК на фоні опромінення (О+ПК) вірогідна ( $P<0,05$ ); + – відмінність між показниками контрольної групи за введення концентрату ПК (К+ПК) та групи, якій вводили концентрат ПК на фоні опромінення (О+ПК) вірогідна ( $P<0,05$ ).

Дія іонізуючого випромінювання у дозі 10 сГр призводила до зниження активності СОД у 1,2 раза на 48 годину та зростання в 1,3 раза на 168 годину порівняно з контролем (рис. 3.17). Споживання піддослідними тваринами концентрату ПК за дії такої ж дози радіації не викликало достовірних змін активності цього ензиму (рис. 3.17).

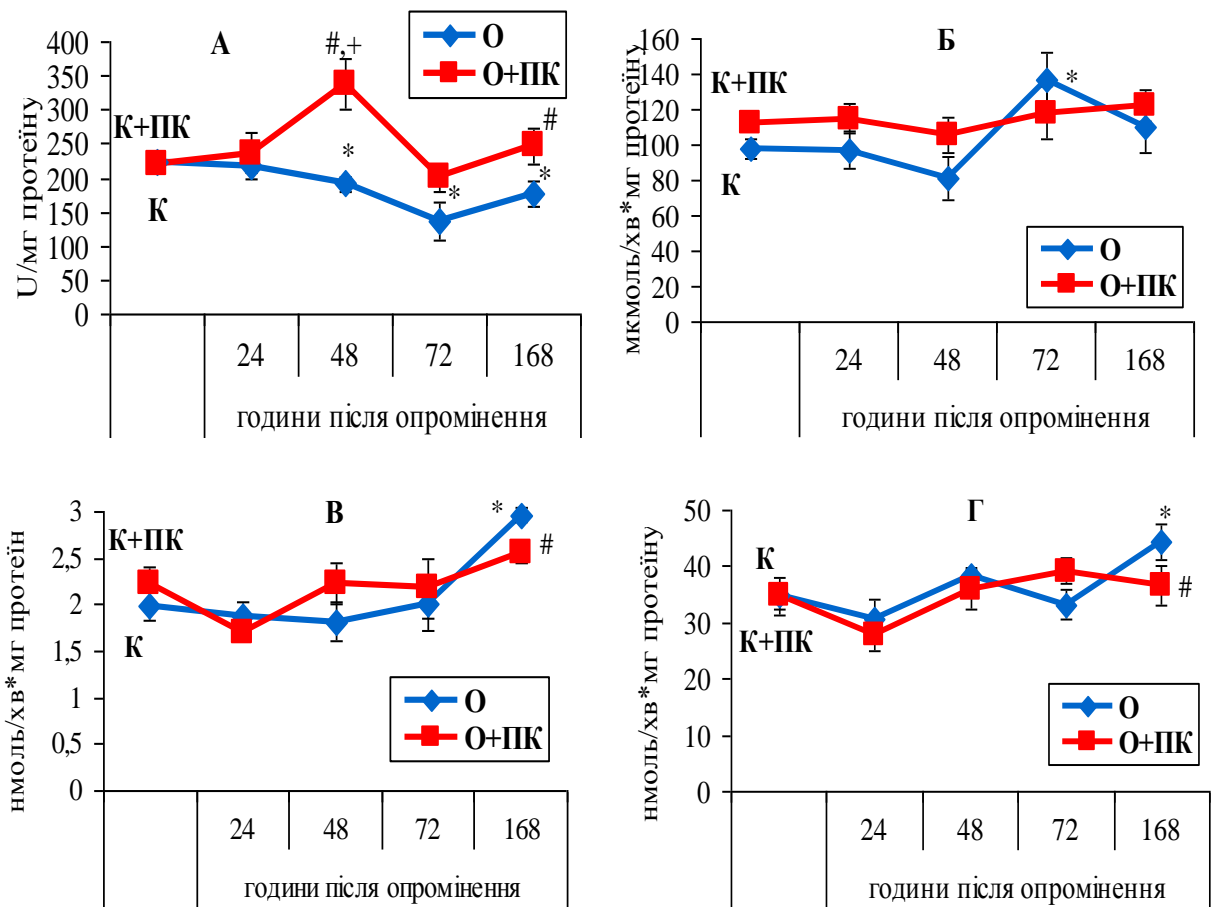


Рис. 3.18. Активність супероксиддисмутази (А), каталази (Б), глутатіонпероксидази (В) і глутатіонредуктази (Г) у лейкоцитах периферичної крові щурів за дії іонізуючого випромінювання у дозі 30 сГр та за введення концентрату природного поліфенольного комплексу з виноградного вина.

\* – відмінність між показниками контрольної групи (К) та опроміненням (О) вірогідна ( $P<0,05$ ); # – відмінність між показниками групи опромінених тварин (О) та групи, якій вводили концентрат ПК на фоні опромінення (О+ПК) вірогідна ( $P<0,05$ ); + – відмінність

між показниками контрольної групи за введення концентрату ПК (К+ПК) та групи, якій вводили концентрат ПК на фоні опромінення (О+ПК) вірогідна ( $P < 0,05$ ).

Після дії одноразового рентгенівського опромінення у дозі 10 сГр зростає активність ГР в 1,3 раза у кінцевий термін експерименту порівняно з контролем. За сукупної дії опромінення та концентрату ПК нами відмічено зростання активності ГПО та ГР в 1,3 раза на першу і другу доби, відповідно в порівнянні з опроміненням (рис. 3.17).

Таблиця 3.11

Вміст ТБК-позитивних продуктів у лейкоцитах периферичної крові щурів за дії іонізуючого випромінювання у дозі 10 сГр та за введення концентрату природного поліфенольного комплексу з виноградного вина  
( $M \pm m, n = 6-10$ )

Умови експерименту		Досліджувані показники	ТБК-ПП (нмоль / млн клітин)
		<b>К</b>	1,18±0,12
		<b>К+ПК</b>	1,04±0,06
<b>О</b>	24 год		1,16±0,19
	48 год		1,89±0,07*
	72 год		1,28±0,10
	168 год		1,26±0,15
<b>О+ПК</b>	24 год		1,32±0,11 <sup>+</sup>
	48 год		1,10±0,08 <sup>#</sup>
	72 год		1,18±0,21
	168 год		1,16±0,11

\* – відмінність між показниками контрольної групи (К) та опроміненням (О) вірогідна ( $P < 0,05$ ); # – відмінність між показниками групи опромінених тварин (О) та групи, якій вводили концентрат ПК на фоні опромінення (О+ПК) вірогідна ( $P < 0,05$ ); + – відмінність між показниками контрольної групи за введення концентрату ПК (К+ПК) та групи, якій вводили концентрат ПК на фоні опромінення (О+ПК) вірогідна ( $P < 0,05$ ).

Нами виявлено зниження активності СОД в 1,2 раза на 48 годину, в 1,6 раза на 72 годину та в 1,3 раза на 168 годину після опромінення у дозі 30 сГр у

порівнянні з контролем, тоді як каталазна активність була вищою від контрольних значень в 1,4 раза на 72 годину дослідження (рис. 3.18). За умов споживання концентрату ПК на фоні опромінення було показано зростання активності СОД в 1,8 раза на 48 годину та в 1,4 раза на 168 годину, порівняно з показниками опромінених щурів, а активність КАТ за таких експериментальних умов змін не зазнавала (рис. 3.18).

Встановлено, що рентгенівське випромінювання в дозі 30 сГр призводить до зростання активності як ГПО так і ГР на 168 годину в 1,5 та 1,3 раза, відповідно порівняно з контролем (рис. 3.18). Споживання концентрату ПК сприяє зниженню активності обох ферментів на сьому добу в 1,2 раза порівняно з показниками тварин опромінених дозою 30 сГр, при цьому активність ГР повертається до рівня контрольних значень (рис. 3.18).

Таблиця 3.12

Вміст ТБК-позитивних продуктів у лейкоцитах периферичної крові щурів за дії іонізуючого випромінювання у дозі 30 сГр та за введення концентрату природного поліфенольного комплексу з виноградного вина

( $M \pm m$ ,  $n = 6-10$ )

Умови експерименту		Досліджувані показники	ТБК-ПП (нмоль / млн клітин)
<b>К</b>			1,12±0,10
<b>К+ПК</b>			1,05±0,09
<b>О</b>	24 год		1,86±0,19*
	48 год		1,20±0,11
	72 год		1,26±0,09
	168 год		1,46±0,16*
<b>О+ПК</b>	24 год		0,94±0,10
	48 год		1,29±0,17
	72 год		0,99±0,10 <sup>#</sup>
	168 год		1,39±0,28

\* – відмінність між показниками контрольної групи (К) та опроміненням (О) вірогідна ( $P < 0,05$ ); # – відмінність між показниками групи опромінених тварин (О) та групи, якій вводили концентрату ПК на фоні опромінення (О+ПК) вірогідна ( $P < 0,05$ ).

Вміст продуктів ПОЛ зростав після опромінення дозою 10 сГр на 60 % на 48 годину, тоді як за аналогічної дози, але при споживанні концентрату ПК цей показник знижувався на 67 % у порівнянні з показниками опромінених тварин (табл. 3.11).

За дії випромінювання дозою 30 сГр вміст ТБК-ПП зростав на 24 годину на 66 % та на 168 годину на 30 % у порівнянні з контрольними показниками (табл. 3.12). У разі радіаційного впливу за споживання концентрату ПК досліджуваній показник упродовж всього експерименту був у межах норми, що свідчить про високі антиоксидантні властивості поліфенольних сполук виноградного вина.

**3.3.3. Основні біохімічні показники системи антиоксидантного захисту та інтенсивність процесів пероксидації ліпідів у тканинах аорти щурів за опромінення у дозах 10 та 30 сГр та споживання концентрату поліфенольного комплексу вина.** У літературі є дані про те, що високі дози радіації (15–60 Гр) викликають розвиток негативного довгострокового ефекту на серцево-судинну систему щурів через морфологічну дегенерацію, пошкодження ендотелію та, як наслідок, летальних наслідків. Причиною радіоіндукованих ушкоджень серцево-судинної системи є розвиток хронічного запалення та оксидативного стресу. Цікавим є дослідження ефектів малих доз радіації на стан серцево-судинної системи та пошук перспективних способів корекції таких порушень [43].

За дії рентгенівського випромінювання в дозі 10 сГр на фоні споживання концентрату ПК виявлено зростання активності КАТ в 1,2 раза на 24 годину експерименту, тоді як за дії лише опромінення зміни активностей КАТ та СОД були недостовірними (рис. 3.19).

Активність ГПО в аорті після дії радіаційного чинника дозою 10 сГр на другу добу знижувалася в 1,2 раза, а на третю добу – навпаки, зростала в 1,1 раза, порівняно з контролдем (рис. 3.19).

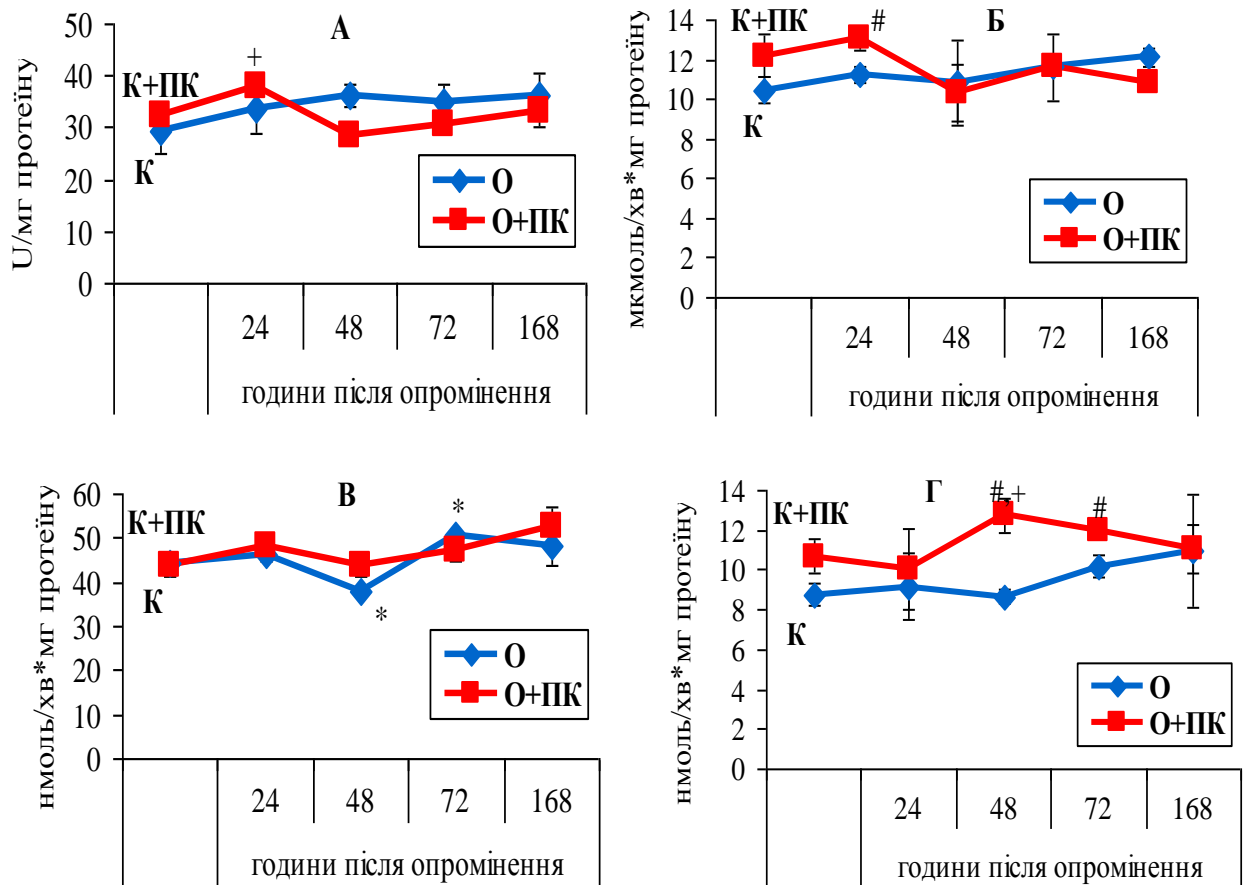


Рис. 3.19. Активність супероксиддисмутази (А), каталази (Б), глутатіонпероксидази (В) і глутатіонредуктази (Г) у тканинах аорти щурів за дії іонізуючого випромінювання у дозі 10 сГр та за введення концентрату природного поліфенольного комплексу з виноградного вина.

\* – відмінність між показниками контрольної групи (К) та опроміненням (О) вірогідна ( $P < 0,05$ ); # – відмінність між показниками групи опромінених тварин (О) та групи, якій вводили концентрат ПК на фоні опромінення (О+ПК) вірогідна ( $P < 0,05$ ); + – відмінність між показниками контрольної групи за введення концентрату ПК (К+ПК) та групи, якій вводили концентрат ПК на фоні опромінення (О+ПК) вірогідна ( $P < 0,05$ ).

Після опромінення у дозі 10 сГр тварин, які вживали концентрат ПК, виявлено зростання активності ГР на 48 та 72 години в 1,5 і 1,2 раза, відповідно, у порівнянні з контрольними показниками (рис. 3.19).

На 48 годину після опромінення дозою 30 сГр спостерігалось зниження активності СОД в 1,5 раза порівняно з контролем, тоді як за умов споживання

концентрату ПК та дії випромінювання цей показник повертався до меж норми, адже зростав у 1,3 раза у порівнянні з опроміненням (рис. 3.20).

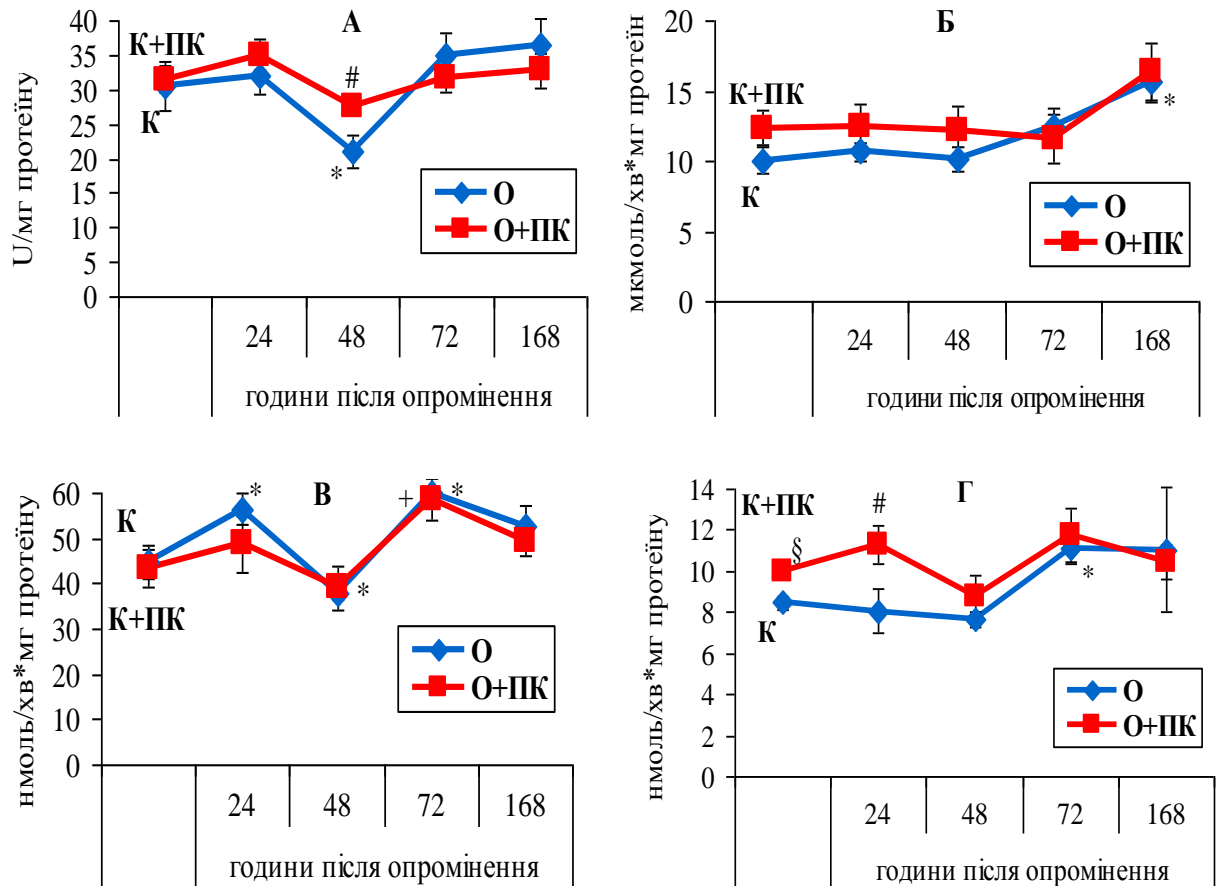


Рис. 3.20. Активність супероксиддисмутази (А), каталази (Б), глутатіонпероксидази (В) і глутатіонредуктази (Г) у тканинах аорти щурів за дії іонізуючого випромінювання у дозі 30 сГр та за введення концентрату природного поліфенольного комплексу з виноградного вина.

\* – відмінність між показниками контрольної групи (К) та опроміненням (О) вірогідна ( $P < 0,05$ ); § – відмінність між показниками контрольної групи (К) та контрольної групи за введення концентрату ПК (К+ПК) вірогідна ( $P < 0,05$ ); # – відмінність між показниками групи опромінених тварин (О) та групи, якій вводили концентрат ПК на фоні опромінення (О+ПК) вірогідна ( $P < 0,05$ ); + – відмінність між показниками контрольної групи за введення концентрату ПК (К+ПК) та групи, якій вводили концентрат ПК на фоні опромінення (О+ПК) вірогідна ( $P < 0,05$ );

Виявлено зростання активності ГПО в 1,3 рази на 24 та 72 години, відповідно, а також зниження в 1,2 раза на 48 годину експерименту (рис. 3.20),



що вказує на часову зміну співвідношення прооксидантних та антиоксидантних агентів і, ймовірно, залучення компенсаторних механізмів на ліквідацію цього дисбалансу.

Споживання контрольними тваринами досліджуваного концентрату ПК викликає зростання активності ГР в 1,2 раза порівняно з контролем (рис. 3.20). Зростання активності ГР після опромінення дозою 30 сГр в тканинах аорти в 1,3 раза виявлено лише на 72 годину досліду, тоді як за опромінення та введення концентрату ПК активність ензиму перевищувала контрольні показники, а на 24 годину була вищою від показників опромінених тварин в 1,4 раза (рис. 3.20).

Таблиця 3.13

Вміст ТБК-позитивних продуктів у тканинах аорти щурів за дії іонізуючого випромінювання у дозі 10 сГр та за введення концентрату природного поліфенольного комплексу з виноградного вина

( $M \pm m$ ,  $n = 6-10$ )

Умови експерименту		Досліджувані показники	ТБК-ПП (нмоль / г тканини)
<b>К</b>			263,42±34,90
<b>К+ПК</b>			280,12±23,42
<b>О</b>	24 год		384,62±16,36*
	48 год		351,14±25,32*
	72 год		344,80±18,54*
	168 год		326,08±19,12
<b>О+ПК</b>	24 год		304,22±26,66 <sup>#</sup>
	48 год		312,14±15,02
	72 год		306,18±28,14
	168 год		296,08±14,10

\* – відмінність між показниками контрольної групи (К) та опроміненням (О) вірогідна ( $P < 0,05$ ); # – відмінність між показниками групи опромінених тварин (О) та групи, якій вводили концентрат ПК на фоні опромінення (О+ПК) вірогідна ( $P < 0,05$ ).

Дія іонізуючої радіації у дозі 10 сГр призводила до підвищення вмісту ТБК-ПП впродовж перших трьох діб у тканинах аорти (на 46 % на 24 годину,

на 33 % на 48 годину та на 31 % на 72 годину), тоді як за дії цієї дози випромінювання на фоні споживання концентрату ПК досліджуваний показник знижувався на 31 % лише на першу добу експерименту порівняно з опроміненням (табл. 3.13).

Таблиця 3.14

Вміст ТБК-позитивних продуктів у тканинах аорти щурів за дії іонізуючого випромінювання у дозі 30 сГр та за введення концентрату природного поліфенольного комплексу з виноградного вина

( $M \pm m$ ,  $n = 6-10$ )

Досліджувані показники		ТБК-ПП (нмоль / г тканини)
Умови експерименту		
<b>К</b>		265,64±43,97
<b>К+ПК</b>		282,02±26,84
<b>О</b>	24 год	404,67±26,86*
	48 год	371,40±21,93*
	72 год	353,84±13,85*
	168 год	318,80±28,40
<b>О+ПК</b>	24 год	323,36±16,86 <sup>#</sup>
	48 год	289,23±19,62 <sup>#</sup>
	72 год	301,54±2,69 <sup>#</sup>
	168 год	309,26±17,12

\* – відмінність між показниками контрольної групи (К) та опроміненням (О) вірогідна ( $P < 0,05$ ); # – відмінність між показниками групи опромінених тварин (О) та групи, якій вводили концентрат ПК на фоні опромінення (О+ПК) вірогідна ( $P < 0,05$ ).

Підвищений рівень продуктів ПОЛ виявлено як після радіаційного впливу дозою 30 сГр (на 52 % на 24 годину, на 40 % на 48 годину та на 33 % на 72 годину), так і за сукупного впливу цієї дози опромінення та концентрату ПК, однак в останньому випадку їхній вміст був значно нижчим порівняно з показниками опромінених тварин (на 31 % на 24 та 48 години і на 20 % на 72 годину) (табл. 3.14).

**3.3.4. Вплив концентрату природного поліфенольного комплексу** виноградного вина на вміст продуктів пероксидного окиснення ліпідів та на активність ключових ензимів системи антиоксидантного захисту у корковому шарі нирки щурів за дії іонізуючого випромінювання у дозах 10 та 30 сГр. Як видно з результатів представлених на рисунках 3.21 дія іонізуючого випромінювання у дозі 10 сГр не призводить до змін активностей антиоксидантних ензимів у корковому шарі нирки щурів. Відмічено, що активність КАТ зростає лише на 24 години в 1,1 раза після опромінення за умов споживання концентрату ПК у порівнянні з показниками опоміненних тварин (рис. 3.21).

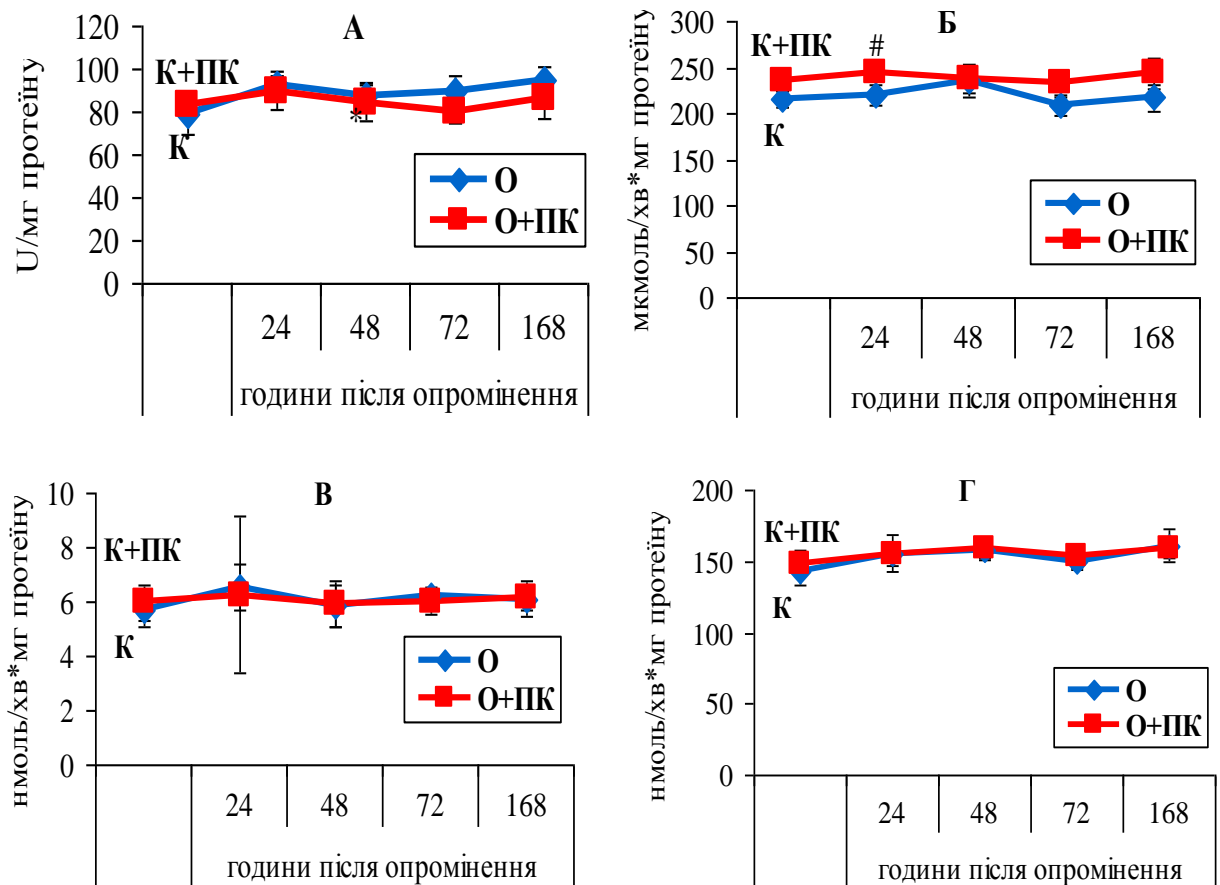


Рис. 3.21. Активність супероксиддисмутази (А), каталази (Б), глутатіонпероксидази (В) і глутатіонредуктази (Г) у корковому шарі нирки щурів за дії іонізуючого випромінювання у дозі 10 сГр та за введення концентрату природного поліфенольного комплексу з виноградного вина.

# – відмінність між показниками групи опромінених тварин (О) та групи, якій вводили концентрат ПК на фоні опромінення (О+ПК) вірогідна ( $P < 0,05$ ).

За дії більш високої дози радіації у тканині нирки виявлено зростання в 1,6 рази активності СОД на 24 годину, зниження в 1,5 раза на 72 годину та наступне зростання в 1,5 раза на 168 експерименту у порівнянні з контролем (рис. 3.22). За опромінення на фоні споживання концентрату ПК спостерігалось зниження активності цього ензиму в 1,5 раза на 24 годину та в 1,3 раза на 168 годину в порівнянні з показниками групи опромінених тварин (рис. 3.22). Очевидно, що зростання генерації супероксид-аніону за радіаційного впливу та посилена його утилізація СОД у ранні терміни експерименту нівелювалося споживанням поліфенольного комплексу.

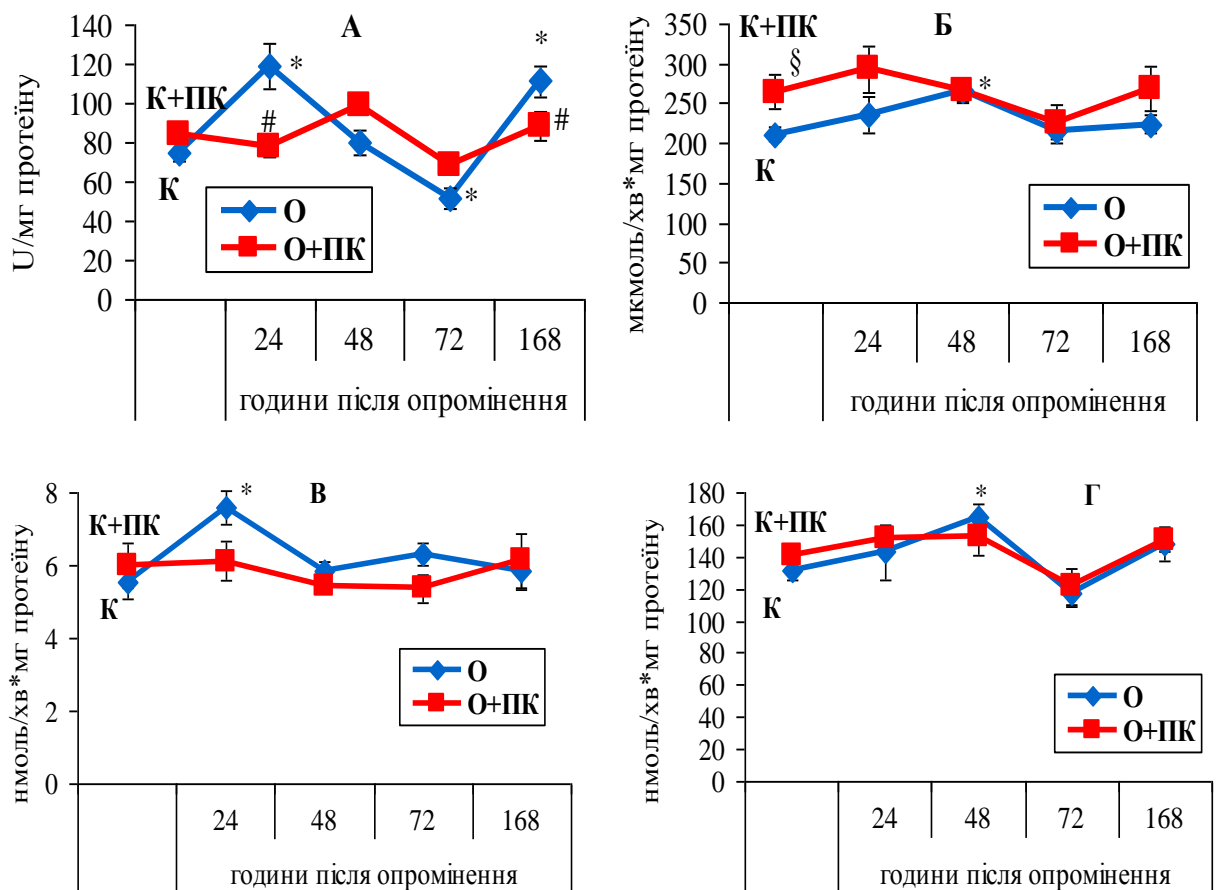


Рис. 3.22. Активність супероксиддисмутази (А), каталази (Б), глутатіонпероксидази (В) і глутатіонредуктази (Г) у корковому шарі нирки щурів за дії іонізуючого випромінювання у дозі 30 сГр та за введення концентрату природного поліфенольного комплексу з виноградного вина.

\* – відмінність між показниками контрольної групи (К) та опроміненням (О) вірогідна ( $P < 0,05$ ); § – відмінність між показниками контрольної групи (К) та контрольної групи за введення концентрату ПК (К+ПК) вірогідна ( $P < 0,05$ ); # – відмінність між показниками групи опромінених тварин (О) та групи, якій вводили концентрат ПК на фоні опромінення (О+ПК) вірогідна ( $P < 0,05$ ).

Опромінення тварин одноразовою дозою 30 сГр призводило до підвищення активності каталази в 1,3 раза на 48 годину експерименту, тоді як введення концентрату ПК не викликало достовірних змін у групі опромінених тварин, але стимулювало каталазну реакцію у контрольних щурів, що відображалось у зростанні активності ензиму в 1,3 раза порівняно з контролем (рис. 3.22).

Таблиця 3.15

Вміст ТБК-позитивних продуктів у нирці щурів за дії іонізуючого випромінювання у дозі 10 сГр та за введення концентрату природного поліфенольного комплексу з виноградного вина  
( $M \pm m$ ,  $n = 6-10$ )

Досліджувані показники		ТБК-ПП (нмоль / г тканини)
Умови експерименту		
<b>К</b>		198,23±11,20
<b>К+ПК</b>		202,04±8,33
<b>О</b>	24 год	221,62±12,11
	48 год	245,22±8,54*
	72 год	251,39±18,31*
	168 год	230,86±13,17*
<b>О+ПК</b>	24 год	214,45±11,82
	48 год	226,41±16,59
	72 год	216,28±7,32
	168 год	213,46±14,35

\* – відмінність між показниками контрольної групи (К) та опроміненням (О) вірогідна ( $P < 0,05$ ).

Виявлено зростання активності ГПО в 1,4 раза на 24 годину після опромінення у дозі 30 сГр у порівнянні з контрольними показниками та активності ГР в 1,3 раза на 48 годину (рис. 3.22). Однак, за опромінення на фоні споживання піддослідними тваринами концентрату ПК активність цих ензимів знаходилася у межах контролю впродовж всього пострадіаційного періоду (рис. 3.22).

Після дії рентгенівського опромінення дозою 10 сГр спостерігалось зростання вмісту ТБК-ПП на 24 % на 48 годину, на 27 % на 72 годину та на 16 % на 168 годину порівняно з контролем (табл. 3.15). Однак у групі тварин, що зазнавали опромінення на фоні споживання концентрату ПК достовірних змін у вмісті цих продуктів виявлено не було (табл. 3.15).

Таблиця 3.16

Вміст ТБК-позитивних продуктів у нирках щурів за дії іонізуючого випромінювання у дозі 30 сГр та за введення концентрату природного поліфенольного комплексу з виноградного вина

( $M \pm m$ ,  $n = 6-10$ )

Досліджувані показники		ТБК-ПП (нмоль / г тканини)
Умови експерименту		
<b>К</b>		171,77±15,97
<b>К+ПК</b>		181,47±9,61
<b>О</b>	24 год	153,46±12,89
	48 год	151,15±8,16
	72 год	338,33±13,16*
	168 год	256,37±14,11*
<b>О+ПК</b>	24 год	142,69±15,69
	48 год	121,15±7,51 <sup>#,+</sup>
	72 год	237,25±15,90 <sup>#,+</sup>
	168 год	208,84±12,20 <sup>#</sup>

\* – відмінність між показниками контрольної групи (К) та опроміненням (О) вірогідна ( $P < 0,05$ ); # – відмінність між показниками групи опромінених тварин (О) та групи, якій вводили концентрат ПК на фоні опромінення (О+ПК) вірогідна ( $P < 0,05$ ); + – відмінність між показниками контрольної групи за введення концентрату ПК (К+ПК) та групи, якій вводили концентрат ПК на фоні опромінення (О+ПК) вірогідна ( $P < 0,05$ ).

Значно вищий рівень ТБК-ПП виявлено після опромінення у дозі 30 сГр ніж за дії меншої дози радіації. Цей показник зростав на 97 % на 72 годину та на 49 % на 168 годину (табл. 3.16). Введення концентрату ПК на фоні опромінення характеризувалося зниженням до рівня ТБК-ПП на 17 % на 48 годину, на 59 % на 72 годину та на 28 % на 168 годину порівняно з опроміненням (табл. 3.16).

Зростання вмісту продуктів пероксидного окиснення ліпідів свідчить про те, що опромінення як у дозі 10 сГр, так і 30 сГр спричиняє розвиток оксидативного стресу. За фізіологічних умов такі негативні наслідки знешкоджуються екзогенними та ендogenous антиоксидантами, але за дії випромінювання порушується злагоджене функціонування ключових ензимів системи антиоксидантного захисту. При цьому вплив різних досліджених нами доз викликає неідентичні зміни, що є ознакою різної інтенсивності порушень біохімічних, а отже і метаболічних процесів у периферичній крові, імунокомпетентних клітинах, тканинах аорти та нирок. Споживання природного поліфенольного комплексу з червоного виноградного вина запобігає порушенню прооксидантно-антиоксидантної рівноваги підвищенням антиоксидантного статусу організму. Як наслідок, вміст продуктів пероксидного окиснення ліпідів не змінюється після опромінення, що свідчить про збалансоване функціонування антиоксидантних ензимів у разі впливу концентрату ПК та про здатність його компонентів вловлювати та знешкоджувати АФО. Такими фенолами, які володіють високою активністю нейтралізували АФО, – галова, кафтарова, каутарова кислоти, кверцитин та (-)-епікатехіни і (+)-катехіни, є домінуючими компоненти у досліджуваному нами концентраті [29, 151, 175, 210, 212].

## РОЗДІЛ 4. АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ

Проблема впливу малих доз іонізуючих випромінювань на живі організми залишається однією з найскладніших і має важливе соціально-економічне значення, оскільки людина в своєму житті постійно піддається опроміненню внаслідок дії радіаційного фону Землі, у процесі професійної діяльності та під час рентгенологічних обстежень та радіотерапевтичного лікування. Клітини, опромінені малими дозами радіації реагують включенням чи виключенням сотні генів, зокрема тих, протеїнові продукти яких відповідають за репарацію пошкоджених хромосом, мембран, усіх уражених біомолекул та пригнічення клітинного стресу. Цікавим є те, що гени, які беруть участь у відповіді на дію малих доз іонізуючої радіації, відрізняються від тих, які активуються після опромінення високими дозами [103]. Тому можна припустити, що зміни біохімічних процесів у клітинах є різними після дії малих та високих доз випромінювання.

Загалом, за дії низькоінтенсивного випромінювання основними факторами ураження систем крові, імунної, серцево-судинної та видільної систем є АФО та АФН, які відіграють вирішальну роль в розвитку оксидативно-нітративного стресу, адже ці молекули опосередковують вільнорадикальне пероксидне окиснення ліпідів, окисну модифікацію білків та пошкодження ДНК в тканинах, уражених іонізуючим випромінюванням. Поєднання оксидативного та нітративного стресу є причиною розвитку багатьох патологій, зокрема нейродегенеративних порушень, атеросклерозу, розвитку хронічного запалення та онкологічних захворювань. Однією з визначальних причин таких ефектів є надпродукція NO, оскільки саме ця молекула є ключовим месенджером багатьох шляхів клітинної та міжклітинної сигналізації при індукції та перебігу процесів запалення і регуляції клітинної проліферації, а продукт його взаємодії з  $O_2^{\cdot-}$  – пероксинітрит проявляє цитотоксичний ефект за радіаційного впливу.



Отримані нами результати свідчать, що за дії іонізуючого випромінювання у організмі щурів порушується функціонування системи L-аргінін/NO, що призводить до виникнення та, в подальшому, поглиблення нітративного стресу.

Відомо, що вплив іонізуючої радіації викликає пошкодження ДНК, у тому числі формування розривів ланцюгів, руйнування азотистих основ і утворення зшивок. Доволі часто це стає причиною індукції апоптозу радіочутливих клітин, одними з яких є лімфоцити [154]. Регуляція процесів виживання клітин чи їхньої загибелі здійснюється через каскад сигнальних реакцій, ключовими подіями яких є активація протеїнових кіназ. NO стимулює радіоіндуковане сигналювання через дві родини протеїнових кіназ – MAPK та PI3'-кінази. Наслідком такої стимуляції є активація протеїну p53 шляхом його фосфорилування. Активація MAPK, PI3'-кінази та протеїнкінази B із подальшою акумуляцією активованого p53 є факторами, які після опромінення викликають пригнічення експресії гену iNOS [93, 147, 190], що, можливо, й зумовлює зниження сумарної активності NOS на першу добу після радіаційного впливу у дозі 30 сГр у лейкоцитах периферичної крові (рис. 3.4).

Причиною відміченого нами збільшення активності NOS на другу та третю доби після опромінення (рис. 3.4) є, ймовірно, активація малими дозами радіації транскрипції гена, який кодує фактор murine double minute 2 (Mdm2). Даний білок є E3 убіквітиною лігазою, функцією якої є опосередкування протеасомної деградації p53 та, у подальшому, підвищення активності iNOS [93, 147, 190]. Також зростання сумарної активності NOS вище рівня контролю може бути спричинене активацією сигнальних шляхів, які контролюють активність iNOS на транскрипційному та посттранскрипційному рівнях [231]. Аналогічний характер змін має активність NOS у периферичній крові щурів опромінених дозою 30 сГр (рис. 3.2).

У менш радіочутливих тканинах нирок за опромінення дозою 30 сГр (рис. 3.8), а також у всіх досліджуваних клітинах і тканинах за дії меншої дози радіації (рис. 3.1, рис. 3.3, рис. 3.5, рис. 3.7) активувався окисний метаболізм L-

аргініну, про що свідчить зростання активності NOS впродовж всього експерименту і, як наслідок, збільшення сумарного вмісту стабільних метаболітів оксиду нітрогену. Відомо, що за патологічних умов, у тому числі у разі дії іонізуючого випромінювання, активність NOS регулюється на транскрипційному рівні. Ендогенні та екзогенні фактори, такі як прозапальні цитокіни, ліпополісахариди, ендотоксини, поява яких зумовлена впливом радіації, є потужними індукторами експресії генів iNOS [42, 120]. Імовірно, саме індукція активності цієї ізоформи ензиму забезпечує підвищення вмісту NO за дії рентгенівського випромінювання.

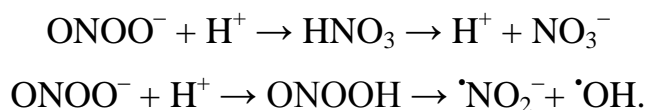
Зростання активності NOS відмічено й у тканинах аорти, але лише на третю та сьому доби (рис. 3.5, рис. 3.6). У клітинах тканин судин ендотеліальна NOS є домінуючою ізоформою цього ензиму та відповідає за продукування NO у тканинах судин [78, 85]. Оскільки відомо, що іонізуюче випромінювання може активувати не тільки індучибельну, але й ендотеліальну ізоформи NOS шляхом активації кальмодулін-залежної протеїнкінази II, яка опосередковує фосфорилування eNOS за залишком серину в 1179 положенні, то можна припустити, що за умов нашого експерименту у аорті синтез NO змінюється саме завдяки зміні активності eNOS [173].

Біоактивність утвореного оксиду нітрогену лімітується його швидким окисненням до нітрит- і нітрат-аніонів, які вважаються непрямими показниками концентрації NO в клітині. Сумарний вміст цих стабільних метаболітів NO зростає практично на всі терміни експерименту в периферичній крові, імунокомпетентних клітинах, аорті та нирці тварин, опромінених малими дозами радіації (табл. 3.1 – 3.8).

За умов загального опромінення щурів у дозі 30 сГр показано аналогічний характер змін вмісту нітрит-аніона (табл. 3.3, табл. 3.4) й активності NOS (рис. 3.2, рис. 3.4) у периферичній крові та лейкоцитах: зниження обох показників на першу добу після опромінення та поступове зростання в наступні терміни експерименту з максимальними значеннями на третю добу. Це може бути

свідченням того, що пул NO та його метаболітів за даних експериментальних умов є повністю узалежненим від функціонування досліджуваного ензиму.

Цікавим є той факт, що на 24 години після опромінення знижується вміст нітритів на фоні достовірного зростання вмісту нітратів у периферичній крові, лейкоцитах і нирках за опромінення дозою 30 сГр (табл. 3.2, табл. 3.4, табл. 3.8) та у крові і нирках щурів – дозою 10сГр (табл. 3.1, табл. 3.7). Як відомо, внаслідок спонтанного окиснення NO при нормальній оксигенації утворюється нітрит-аніон, який далі окиснюється до нітрат-аніону.  $\text{NO}_3^-$  може продукуватися також одночасно з АФО та АФН при деградації пероксинітриду [28, 47, 130, 214]:



За дії малих доз радіації, імовірно, інтенсифікуються обидва шляхи утворення нітрат-аніону, що відображається у підвищенні його вмісту.

Відомо, що NO бере участь у регуляції радіочутливості клітин, оскільки може індукувати зупинку клітинного циклу після опромінення, що в подальшому призведе до незворотної зупинки росту та смерті клітини. Однак набагато більше уваги сьогодні дослідники приділяють ролі пероксинітриду ( $\text{ONOO}^-$ ), який є потужним прооксидантом та цитотоксином, призводить до ушкодження клітин і клітинної смерті, взаємодіючи з ліпідами, ДНК і протеїнами у реакціях окиснення, нітрування та нітросилування [113, 170, 214, 233]. Внаслідок інтенсифікації реакцій нітрування протеїнів за тирозиновими залишками за різних патологічних станів в тканинах судин накопичуються значні кількості 3-нітротирозину, що спричиняє порушення ендотелій-залежної вазодилатації та зміни у шляхах трансдукції сигналів у клітинах судин [170]. Оскільки АФН важко детектувати *in vivo* у зв'язку з їхньою високою реактивністю, нітротирозин вважають найкращим біомаркером утворення  $\text{ONOO}^-$  [48].

І дійсно, після дії радіації дозами 10 та 30 сГр було показано зростання вмісту 3'-нітротирозин-модифікованих протеїнів у імунокомпетентних клітинах та корковому шарі нирки.

На відміну від інших клітин, у лізатах клітин аорти рівень протеїнів, нітрованих за залишками тирозину достовірно знижувався як за опромінення дозою 10 сГр на третю та сьому доби, так і дозою 30 сГр на першу та третю доби. В інші часові терміни експерименту цей показник мав тенденцію до зростання відносно контролю. Це свідчить про порушення не лише прооксидантної-антиоксидантної рівноваги у найбільшій судині організму, але також про порушення механізмів регулювання функціонування каскадів передачі сигналів у клітинах, адже нітрування протеїнів виконує сигнальну роль у судинах тварин перешкоджаючи фосфорилуванню протеїнів або стимулюючи їхнє дефосфорилування, тобто інактивацію, або безпосередньо, завдяки нітруванню/денітруванню [161].

Отримані нами результати, разом зі змінами активності NOS лише на дві останні доби експерименту (рис. 3.3, рис. 3.4), можуть бути свідченням того, що ефект впливу малих доз радіації на тканини аорти дещо відрізняється від ефекту на інші тканини чи клітини організму. Це можливо пов'язано з експресією генів різних ізоформ NOS у лейкоцитах, нирці та аорті.

Відомо, що домінуючою ізоформою у судинах є eNOS, функціонування якої регулюється на транскрипційному, посттранскрипційному та посттрансляційному рівнях. Однією із важливих модифікацій є ко-трансляційне приєднання міристилової групи, що робить можливим закорювання ензиму у клітинній мембрані [78, 185]. Оскільки мембрана є першим бар'єром між клітиною та позаклітинним середовищем, вона першою реагує на дію іонізуючого випромінювання [4], імовірно саме домінування мембранозв'язаної ендотеліальної ізоформи в аорті є причиною особливих ефектів малих доз випромінювання та поліфенолів виноградного вина. Зважаючи на те, що у тканинах аорти NO необхідний для підтримання тону судин, регуляції адгезії лейкоцитів до клітин ендотелію та процесів зсідання

крові [78, 85], можна припустити, що навіть після опромінення першочергово ця молекула залучається на виконання своїх фізіологічних функцій.

Таким чином, нами показано порушення рівноваги системи L-аргінін/NO та розвиток нітративного стресу, індикатором якого є 3'-нітротирозин, після одноразового загального опромінення дозами 10 та 30 сГр, що може стати причиною поглиблення ушкоджень та розвитку різноманітних пострадіаційних синдромів та, імовірно, летальних наслідків.

Прийом медичних препаратів для запобігання радіоіндукованих порушень є одним із найбільш ефективних підходів для захисту та лікування уражень, спричинених дією іонізуючого випромінювання. Існують тисячі повідомлень про сполуки, які є потенційними радіопротекторами, але більшість із них є непридатними для клінічного використання. Існує лише невелика кількість хімічних синтетичних препаратів, які можна вживати до або одразу після опромінення, більшість з яких є сильно токсичними. І навпаки, невелика кількість природних ліків рослинного походження володіють високим рівнем специфічності. Тому існує необхідність пошуку та розробки ефективних засобів захисту проти ушкоджуючої дії радіації. З метою запобігання і корекції радіоіндукованих порушень ми вводили щурам концентрат природного поліфенольного комплексу з червоного виноградного вина. Цей концентрат отримували упарюванням червоного виноградного вина, люб'язно наданого співробітниками інституту винограду і вина «Магарач», отриманого за кахетинською технологією, тобто внаслідок збродження мезги у присутності гребенів виноградних грон. Завдяки цьому отриманий нами продукт містить унікальний набір корисних фенольних сполук, представлених у винограді. Вино, яке піддавали упарюванню містило 3,679 мг/мл фенольних сполук, а концентрація фенолів у отриманому нами концентраті становила 59,180 мг/мл. Це дозволяє зменшити споживання вина, зокрема спирту, наявного у цьому напої, але отримувати необхідну кількість фенольних сполук для попередження радіоіндукованих уражень. Адже поліфенольні сполуки

рослинного походження вважаються перспективними радіопротекторними сполуками. Захист від наслідків дії радіації забезпечується їхньою здатністю виступати молекулами-донорами гідрогену, і, таким чином, скавенджерувати АФО, АФН і продукти ліпопероксидації біомембран [68, 124, 126, 191]. Катехіни та галова кислота здатні хелатувати іони металів і, таким чином, пригнічувати генерування вільних радикалів. Поліфеноли також впливають на шляхи клітинної трансдукції сигналів, модулюють функціонування ендокринної системи, а отже дію гормонів на різноманітні фізіологічні процеси, оскільки ці сполуки реагують з іонами металів та ензиматичними кофакторами [33]. Саме таким чином більшість поліфенольних сполук виноградного вина, в тому числі представлених у досліджуваному нами концентраті, реалізують антиоксидантні та детоксикаційні властивості [126]. Також у літературі є відомості про те, що антоціаніни, зокрема ціанідини та їх глікозиди, *in vitro* пригнічують радіоіндукований апоптоз [88].

Відмічено зростання NO-синтазної активності на 24 годину у периферичній крові та лейкоцитах (рис. 3.2, рис. 3.4) і на 48 годину в аорті (рис. 3.6) за опромінення у дозі 30 сГр, а також у периферичній крові за дії іонізуючого випромінювання дозою 10 сГр (рис. 3.1) порівняно з показниками опромінених тварин без споживання концентрату ПК.

Як зазначено вище, домінуючими складовими досліджуваного концентрату поліфенольного комплексу були кафтарова, каутарова та галова кислоти, кверцетин і катехіни. Із літератури відомо, що поліфенольні сполуки виявляють відмінні ефекти на активність різних ізоформ досліджуваного ензиму: інгібують nNOS та iNOS, а активність eNOS, навпаки, підвищують. У клітинах крові виявлено пригнічення трансляції мРНК iNOS, синтез якої індукований ліпополісахаридами, інтерлейкіном-1 або фактором некрозу пухлин  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) [210, 227]. Катехіни та антоціаніни також інгібують iNOS пригніченням зв'язування фактора NF- $\kappa$ B з промотором генів, які кодують відповідну ізоформу NOS [100, 175, 210, 227] Ці механізми можуть бути

залученими за інгібування поліфенольними сполуками активності NOS, яка є підвищеною після дії малих доз радіації.

Зрівноважується такий вплив на активність NOS за рахунок зростання концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  через вивільнення в цитоплазму із внутрішньоклітинних депо або рецепторзалежним механізмом, ключовою подією якого є зростання активності гуанілатциклази в клітинах. Наслідком цього є підвищення активності eNOS, оскільки ця ізоформа ензиму є кальційзалежною [44]. Низка авторів описують здатність катехінів, антоціанінів, кверцитину та інших поліфенолів вина активувати eNOS фосфорилуванням, опосередкованим активацією Src/PI3'-кіназа/Akt сигнального шляху. Цей механізм є залежним від внутрішньоклітинної генерації АФО. Також поліфеноли здатні швидко активувати eNOS змінюючи експресію її генів у ендотеліальних клітинах, імовірно, зв'язуванням з antioxidant response element (ARE) промотора гена eNOS [35, 76, 188].

На 24 годину експерименту в аорті за опромінення дозою 30 сГр та у периферичній крові за опромінення дозою 10 сГр у більш віддалені терміни експерименту в периферичній крові, лізатах лейкоцитів, тканин аорти та нирок щурів споживання піддослідними тваринами концентрату ПК викликало зниження сумарної активності NOS (рис. 3.1, – 3.8). Зважаючи на це можна припустити, що споживання концентрату ПК опроміненими тваринами стимулює активацію eNOS на першу та другу доби, тоді як механізми інгібування поліфенолами інших ізоформ є тривалішими, і мають місце лише на більш віддалені терміни експерименту.

Пригнічення активності NOS стало причиною зменшення сумарного вмісту стабільних метаболітів NO за дії іонізуючого випромінювання дозою 10 сГр у цільній крові, лейкоцитах, тканинах аорти і нирки та за опромінення у дозі 30 сГр – у аорті та нирці щурів. Окрім того, відомо, що поліфенольні сполуки виноградного вина мають здатність вловлювати та знешкоджувати NO і його метаболіти. Завдяки цьому поліфеноли також можуть запобігати посиленню радіоіндукованого нітративного стресу.

Варто відмітити, що у периферичній крові на першу, третю і сьому доби за опромінення дозою 10 сГр (табл. 3.1), на першу добу за опромінення у дозі 30 сГр (табл. 3.2) та у корковому шарі нирки на третю і сьому доби за дії меншої дози випромінювання (табл. 3.7) і на перші дві доби за дії більшої дози (табл. 3.8) вміст нітратів знижувався, а нітритів – зростав порівняно з показниками опромінених тварин за споживання концентрату ПК. Цілком імовірно, що причиною цього є активація нітратредуктаз, які каталізують відновлення  $\text{NO}_3^-$  до  $\text{NO}_2^-$ , та одночасне сповільнення оберненої реакції окиснення  $\text{NO}_2^-$  до  $\text{NO}_3^-$ .

У лімфоцитах периферичної крові вміст нітритів та нітратів зростав лише на першу добу після опромінення за умов споживання концентрату поліфенольного комплексу з виноградного вина, а в подальші терміни експерименту залишався на рівні показників опромінених тварин (табл. 3.1, табл. 3.2). Таке зростання вмісту метаболітів NO за зниження активності NOS спричинене, імовірно, активацією шляхів утворення NO, незалежних від цього ензиму, зокрема вивільнення з депо внаслідок денітрозилювання тіоловмісних протеїнів чи пептидів [120]. Процес вивільнення NO зі складу нітрозотіолів каталізується ензимами денітрозилазами. Відомо дві найважливіші групи денітрозилаз. Ензимами першої групи каталізують реакції транснаїтрозилювання за участю відновленого глутатіону (GSH) із утворенням S-нітрозоглутатіону (GSNO). Акумуляований GSNO піддається ензиматичному денітрозилюванню за участі GSNO редуктази. Ензимами, які належать до другої групи регулюють процеси посттрансляційної модифікації протеїнів аналогічно як ферменти першої групи, однак субстратом у реакції транснаїтрозилювання в цьому випадку виступає тіоредоксин (Trx), а наступні реакції є залежними від активності Trx редуктази та наявності НАДФН [104, 138, 232].

Як було показано, у клітинах, ушкоджених радіацією, підвищується вміст нітрованих протеїнів через надмірне продукування NO і, як наслідок, – периксинітриду на фоні зростання активності NOS. Сучасні стратегії, спрямовані на лімітування утворення даних цитотоксинів полягають у



використанні різноманітних сполук рослинного походження зі здатністю *in vitro* нейтралізувати АФН, зокрема  $\text{ONOO}^-$ , наприклад, фенольні сполуки винограду та виноградного вина [170]. У наших дослідженнях продемонстровано, що поліфенольні сполуки з виноградного вина пригнічують активність NOS, чим також регулюють інтенсивність процесів нітрування протеїнів, що описано і у літературі [66].

Зниження вмісту 3'-ніротирозин-модифікованих протеїнів у лейкоцитах та корковому шарі нирки щурів може бути обумовлене здатністю поліфенольних сполук винограду, завдяки особливостям хімічної структури, скавенджерувати NO,  $\text{ONOO}^-$  та інші АФН. Найбільш різке зниження вмісту протеїнів, модифікованих за залишками тирозину, на третю та сьому доби після опромінення за споживання поліфенолів вина може бути свідченням того, що ці сполуки активують клітинні сигнальні шляхи, у яких однією з ланок є процес денітрації. Адже сьогодні доведено, що нітрування протеїнів є зворотним процесом, залученим у внутрішньоклітинну передачу сигналу поряд із фосфорилуванням, однак механізм денітрування досі ще не є достеменно зрозумілим [114, 122, 161]; а також показано, що поліфеноли здатні регулювати процес денітрації [67, 167].

У аорті вміст 3-ніротирозину поступово знижувався після споживання концентрату ПК за умов опромінення, що є тканино-специфічною реакцією, характерною для аорти. Зважаючи на особливості функціонального статусу цієї тканини можна припустити, що за впливу поліфенольних сполук винограду NO меншою мірою взаємодіє зі супероксид-аніоном для утворення  $\text{ONOO}^-$ .

Варто наголосити, що тканини аорти, зокрема її ендотелій, є у набагато більшій мірі залежними від функціонування NOS та утворення NO, ніж інші досліджувані нами тканини та клітини. Адже за фізіологічних умов NO залучається у реалізацію процесу вазодилатації, що має місце після споживання вина та його поліфенольного комплексу, інгібування агрегації тромбоцитів, адгезії клітин крові до стінок судин, міграції та проліферації клітин гладеньких м'язів [35]. Зважаючи на особливості функціонального

статусу аорти, високу потребу судин кровоносної системи у наявності постійного пулу NO, можна припустити, що утворена молекула, навіть після опромінення, залучається для здійснення фізіологічних функцій.

Поліфеноли виноградного вина вже за кілька секунд після введення спричиняють ендотелій-залежну NO-опосередковану релаксацію судин, зокрема, аорти [35]. Ряд авторів показали, що стимулюють такі ефекти полімерні феноли, зокрема конденсовані таніни та антоціанідини, а кверцитин опосередковує повільну вазорелаксацію, незалежну від продукції NO [238]. Існує як мінімум два механізми, через які поліфеноли можуть впливати на вивільнення NO: ГМФ-залежна стимуляція NOS чи унеможливлення реакції NO з  $O_2^{\bullet-}$  [197, 237], завдяки високим антиоксидантним властивостям фенолів, представлених у концентраті ПК, які швидко та незворотно реагують з  $O_2^{\bullet-}$  і так пригнічують надмірне утворення ONOO<sup>-</sup>.

Першою реакцією на ушкоджуючі фактори, зокрема на опромінення, є підвищення продукції NO у судинах, лейкоцитах та нирках, що відображається у зростанні вмісту його метаболітів (нітритів та нітратів). Однак такі зміни часто перетворюються із адаптаційного механізму у ланку патогенетичного процесу і є небезпечним ушкоджуючим фактором для організму. Висока активність NOS, надмірне утворення NO та радикалу ONOO<sup>-</sup> відіграють основну роль у реалізації радіоіндукованих пошкоджень організму. Введення тваринам концентрату ПК нівелює радіоіндуковане порушення стану системи L-аргінін/NO, зокрема, пригнічує продукування NO ензимом NOS. Також споживання концентрату ПК дає змогу запобігти накопиченню великих кількостей 3'-нітротирозину, а отже, пригнічує нітративний стрес, викликаний впливом малих доз іонізуючого випромінювання.

Рівень АФО у клітині контролюється ендогенною системою антиоксидантного захисту. Проте, за патологічних умов підвищується їхня продукція і, водночас, порушуються механізми антиоксидантного захисту. Надмірні кількості супероксид-аніону утворюються у разі надстимуляції НАДФ(Н) оксидаз, ензимів родини NOS або процесів, які у нормі продукують

АФО – мітохондріального ланцюга транспорту електронів чи ксантинооксидаз [37, 86].

Біохімічні модифікації, що виникають одразу після опромінення, як вважається, є ключовими у формуванні більшості радіаційних ефектів у клітинах ссавців. Проте, оксидативні зміни можуть розвиватися протягом місяців після дії випромінювання через продовження генерування АФО та АФН [40, 90]. Молекулярні механізми розвитку радіоіндукованих уражень головно пов'язані з ланцюговими реакціями пероксидного окиснення ліпідів, окисненням гідропероксидами протеїнів (наприклад, гістонів) та реакціями окиснення тіолів [156].

Оскільки мембрана є першим бар'єром між клітиною та позаклітинним середовищем, то саме її компоненти розглядаються як мішені іонізуючого випромінювання поряд з молекулами ДНК. Іонізуюче випромінювання обумовлює підвищення пероксидного окиснення ліпідів мембран, що зумовлює утворення пероксидів і перерозподіл вмісту ліпідів у різних тканинах. Ушкодження такого роду накопичуються протягом тривалого часу і не завжди підлягають репарації.

У разі впливу малих доз іонізуючого випромінювання вміст ТБК-позитивних продуктів зростає на всі терміни досліду в периферичній крові, лейкоцитах, тканинах аорти та корковому шарі нирки щурів, що свідчить про розвиток оксидативного стресу за умов експерименту.

Це є причиною порушень функціонування всіх органів та систем опроміненого організму. Відомо, що збільшення рівня АФО відіграє роль у виникненні патологічних змін серцево-судинної системи, адже наслідком посиленого утворення АФО є надмірне утворення окиснених ЛПНЩ. Гідропероксиди ЛПНЩ є джерелом гідроксильних радикалів, що відкривають пори у внутрішній мембрані мітохондрій та ушкоджують ендотелій судинних стінок [207]. За впливу ЛПНЩ відбувається активація тромбоцитів, лейкоцитів, перетворення моноцитів у макрофаги, порушується функція мембран клітин, зокрема провідної системи серця [128].

Однак, найбільш радіочутливими вважаються імунокомпетентні клітини ссавців. Як при локальному, так і при тотальному опроміненні організму, виникають кількісні та якісні зміни в системі імунітету. При цьому, суттєвого впливу за дії іонізуючого випромінювання зазнають навіть недиференційовані лімфоцити периферичної крові [16]. Опромінені лейкоцити синтезують великі кількості не лише АФО і АФН, але і молекул міжклітинного сигналювання (зокрема, цитокінів) [93]. Відповідно, це викликає незворотні порушення на рівні цілісного організму.

Ми досліджували радіоіндуковані зміни у тканинах нирки, оскільки цей орган забезпечує збереження гомеостазу системи крові шляхом продукції та вивільнення ряду цитокінів, хемокінів, гемопоетичних факторів [112]. Нирки вважають достатньо резистентними до дії випромінювання, однак порушення рівноваги біохімічних реакцій у клітинах цього органу призводить до погіршення стану організму, зокрема у ранній пострадіаційний період [170]. Певні особливості тканин нирки, зокрема, надзвичайно висока швидкість метаболічних процесів може визначати характер патологічних змін за опромінення. Наслідком оксидативного стресу може бути зміна структурно-функціональної організації клубочків через вплив АФО та АФН на мезанхіальні й ендотеліальні клітини, оскільки клубочки значно чутливіші до окиснювального стресу, ніж інші сегменти нефрону [191].

Вживання за дії радіації концентрату ПК запобігало накопиченню продуктів ПОЛ, що свідчить про потужні антиоксидантні властивості поліфенольних компонентів червоного виноградного вина, які реагуючи з АФО перетворюють їх у продукти зі значно нижчою реактивністю. Вважається, що найефективніший захист ліпідного бішару здійснюють та поліфеноли, які є більш гідрофобними. Показано, що епікатехінгалат здатний розчинятися в ліпідному бішарі мембрани та є високоефективним протектором у разі надмірної ліпопероксидації [29].

За проксидантно-антиоксидантного дисбалансу, у тому числі спричиненому дією радіації, активуються сигнальні шляхи, які ведуть до

індукції експресії генів ензимів системи антиоксидантного захисту (супероксиддисмутази, каталази, глутатіонпероксидази, хінонредуктази, тіоредоксинредуктази) та відновлення окисно-відновного гомеостазу клітини [149].

Супероксиддисмутазі відводиться визначальна роль у запобіганні розвитку радіоіндукованого оксидативного стресу, оскільки за дії іонізуючих випромінювань виявлена посилена генерація супероксид-аніону в різних тканинах організму [1].

Отримані нами дані свідчать про зростання активності СОД у периферичній крові після опромінення дозою 10 сГр на другу, третю і сьому доби (рис. 3.15) та після опромінення дозою 30 сГр – на третю і сьому доби (рис. 3.16), що є наслідком збільшення кількості субстрату – супероксид-аніону. У лейкоцитах за впливу радіації дозою 10 сГр (рис. 3.17) та у всіх інших досліджуваних тканинах за дії обох доз (рис. 3.18 – 3.22) активність СОД знижувалася що, ймовірно, зумовлено надлишковим утворенням пероксиду гідрогену та гідропероксидів жирних кислот, які за принципом негативного зворотнього зв'язку здатні інгібувати ензим [7, 30].

Введення концентрату ПК за умов опромінення спричиняє нормалізацію активності СОД, що свідчить про виражену антиоксидантну дію поліфенольного комплексу з виноградного вина вже у ранній пострадіаційний період. Відомо, що поліфеноли червоного вина підвищують антиоксидантну ємність плазми та інших тканин організму тварин та людини. Такий ефект пов'язаний зі стимуляцією активності СОД, КАТ і ГПО та зі зростанням вмісту глутатіону як відновленого, так і окисненого [99, 132, 191, 198].

Опромінення дозою 10 сГр не призводить до достовірних змін активностей каталази та глутатіонпероксидази – ензимів, які каталізують знешкодження неограничених і органічних гідропероксидів. Нами встановлено зниження активності КАТ до  $121,73 \pm 4,32$  та  $117,08 \pm 2,83$  мкмоль  $H_2O_2$ /хв • мг протеїну на першу та другу доби, відповідно, у периферичній крові за дії вищої дози випромінювання (рис. 3.16). Відомо, що надмірні кількості супероксид

аніон-радикалу здатні пригнічувати активність каталази [7], що, очевидно, й зумовило зниження активності цього ензиму за дії іонізуючого випромінювання, оскільки активність СОД за цих умов була нижчою від контрольних значень. За радіаційного впливу на фоні введення концентрату ПК активність каталази дещо перевищувала рівень контролю у периферичній крові щурів.

Показане нами зростання активності каталази до  $136,54 \pm 15,29$  мкмоль  $\text{H}_2\text{O}_2/\text{хв} \cdot \text{мг}$  протеїну на третю добу в лейкоцитах (рис. 3.18) та до  $266,83 \pm 13,34$  мкмоль  $\text{H}_2\text{O}_2/\text{хв} \cdot \text{мг}$  протеїну на другу добу в корковому шарі нирки за опромінення дозою 30 сГр (рис. 3.20), можна розглядати як реакцію на інтенсифікацію окисних процесів, спричинену активацією експресії гена каталази внаслідок дії радіації [83, 117].

Знешкодження підвищеного за дії іонізуючих випромінювань рівня пероксиду гідрогену окрім КАТ здійснює і ГПО, спорідненість якої до  $\text{H}_2\text{O}_2$  значно вища ніж у КАТ. ГПО більш ефективно функціонує при низьких концентраціях субстрату, в той час, як у захисті клітин від оксидативного стресу, викликаного високими концентраціями  $\text{H}_2\text{O}_2$ , провідна роль належить КАТ. ГПО, каталізуючи відновлення  $\text{H}_2\text{O}_2$ , не лише інактивує цей метаболіт, але й попереджує нагромадження гідроксил-аніону, запобігаючи утворенню органічних гідропероксидів. Відновлення ензимом ГПО органічних гідропероксидів, особливо ліпідів мембран, знижує пероксидацію та появу вторинних токсичних метаболітів [135].

Опромінення дозою 30 сГр призводило до стійкого зростання активності ГПО у периферичній крові тварин впродовж всього експерименту та на другу добу в нирці, на третю добу в лейкоцитах і на першу й третю доби у аорті (рис. 3.20). Підвищення активності ГПО зумовлено, очевидно, зростанням вмісту пероксиду гідрогену – продукту супероксиддисмутазної реакції, адже спорідненість ензиму до цього субстрату є вищою, ніж у каталази [46]. За умов попереднього споживання концентрату ПК та опромінення дозами 10 та 30 сГр

на фоні введення поліфенольного концентрату активність ГПО залишалась у межах контролю впродовж усього експерименту.

Активність ГР за умов опромінення змінювалася подібно до змін активності ГПО без та за споживання концентрату ПК, що є закономірним, оскільки глутатіонредуктаза підтримує постійний необхідний рівень відновленого глутатіону в усіх клітинах організму.

Більш виражене зростання активності ГР у групі тварин за опромінення на фоні введення концентрату ПК порівняно з показниками групи інтактних тварин, яким вводили концентрат, спричинене, ймовірно, зниженням вмісту відновленого глутатіону. Відомо, що за надмірної продукції АФО продукти окиснення поліфенолів здатні взаємодіяти з тіолами, зокрема з глутатіоном, з утворенням моно- або диглутатіоніл-похідних та зниженням вмісту відновленого глутатіону [38, 39, 162].

Проведені дослідження виявили відмінності в активності антиоксидантних ензимів периферичної крові, лейкоцитах, аорти та нирки за впливу малих доз іонізуючого випромінювання. Зниження рівня ТБК-позитивних продуктів у всіх досліджуваних клітинах і тканинах за радіаційного впливу та введення концентрату ПК свідчить про збалансовану активність антиоксидантних ензимів під впливом поліфенольного комплексу, зростання антиоксидантної ємності клітин різних систем організму за рахунок їхнього насичення поліфенолами та здатність цих сполук виступати ефективним коригуючим фактором при станах, які ведуть до розвитку глибоких змін в організмі за радіоіндукованого оксидативно-нітративного стресу.

На основі одержаних результатів та аналізу наукової літератури ми пропонуємо узагальнюючу схему (рис. 4.1), на якій представлено механізми розвитку радіоіндукованих уражень, пов'язаних з порушенням окисно-відновних процесів у клітинах організму, опроміненого малими дозами радіації, та імовірні мішені впливу компонентів, які є у концентраті з червоного виноградного вина.

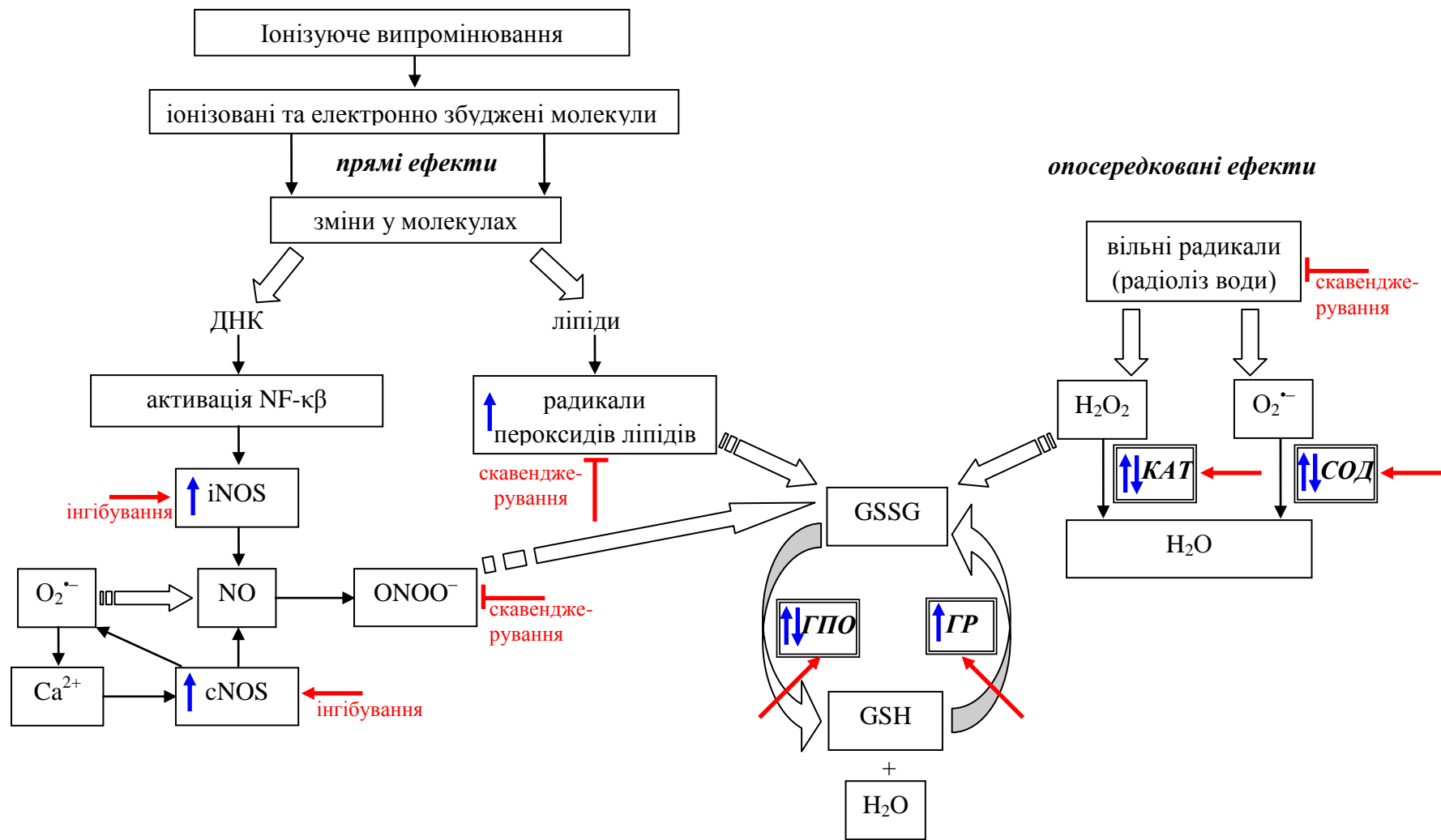


Рис. 4.1. Біохімічні механізми ураження клітин організму малими дозами іонізуючого випромінювання (позначено синіми стрілками) та гіпотетичні мішені впливу концентрату ПК (позначено червоними стрілками).



Нами сформульовано гіпотезу, що виникнення оксидативно-нітративного стресу є одним з визначальних моментів розвитку порушень у ранній пострадіаційний період. Процес виникнення та розвитку оксидативно-нітративного стресу є складним та багатокомпонентним. Після дії іонізуючого випромінювання його першопричинами є прямі та опосередковані ефекти радіації на біомолекули. Абсорбція енергії іонізуючої радіації клітинами призводить до порушення структури атомів біомолекул, а опосередковані ефекти реалізуються через радіоліз води та утворення АФО. У відповідь на ці процеси у клітинах активується ендогенна система антиоксидантного захисту, ключовими ензимами якої є СОД, КАТ та ГПО. Функціонування останнього ензиму узалежене від рівня відновленого глутатіону (GSH), пул якого підтримується ГР. Однак, малі дози іонізуючого випромінювання спричиняють порушення функціонування ензимів системи антиоксидантного захисту, що відображається у різнонапрямлених змінах їхніх активностей і лише активність ГР зростає після опромінення.

При дії іонізуючого випромінювання дозою 30 сГр активності всіх чотирьох ензимів є набагато вищими або нижчими від контролю на різні терміни експерименту, ніж після опромінення дозою 10 сГр.

Дія випромінюванням спричиняє також порушення функцій мітохондрій, що опосередковує ураження ліпідів (активацією процесів пероксидного окиснення), протеїнів (через їхню модифікацію), ядерної та мітохондріальної ДНК. Після ушкодження ядерної ДНК у клітинах активуються механізми, напрямлені на репарацію генетичного матеріалу. Активація полі(АДФ-рибозо)-полімерази та, в подальшому, фактора NF- $\kappa$ B та низки інших транскрипційних факторів здатна значно посилювати експресію багатьох цитокінів, iNOS та інших факторів, наслідком чого буде зростання утворення супероксид-аніону, оксиду нітрогену, виникнення запальних процесів, що буде поглиблювати патологічні радіоіндуковані зміни. Відомо, що надмірні кількості АФО спричиняють порушення трансдукції сигналу у клітинах опроміненого організму. Однією із причин таких змін є порушення внутрішньоклітинної

концентрації  $\text{Ca}^{2+}$ , зростання кількості цього іону активує конститутивні ізоформи NOS, які продукують не тільки оксид азоту, але і у випадку нестачі L-аргініну чи  $\text{BH}_4$ , супероксид-аніон. Надпродуковані внаслідок дії малих доз радіації АФО та АФН здатні взаємодіяти між собою та продукувати ще більш токсичні оксиданти, найбільш потужним із яких вважається пероксинітрит. Цей цитотоксин здатен модифікувати ДНК, ліпіди та протеїни окисненням, нітруванням чи нітрозилуванням. Нами показано зростання рівня протеїнів, модифікованих нітруванням за залишками тирозину, у лейкоцитах периферичної крові та корковому шарі нирки щурів після опромінення у дозах 10 та 30 сГр.

Нітруванню піддається велика кількість протеїнів. З одного боку цей процес залучений у процеси трансдукції сигналу, а з іншого слугує міткою для руйнування молекул у протеасомах, що є небезпечним за умов глибокого оксидативно-нітративного стресу, адже призводить до руйнування клітинних структур та, в подальшому, до загибелі клітини за механізмом апоптозу чи некрозу. Все це призведе до замикання “порочного” кола вад з підсилюючим негативним ефектом, що і було виявлено нами за умов розвитку порушень біохімічних процесів у системі крові, імунній, серцево-судинній та видільній системах. Відповідно, препарати комплексної дії, які гальмуватимуть процес розвитку оксидативно-нітративного стресу будуть дієвими засобами запобігання розвитку радіоіндукованих ускладнень.

Використаний нами концентрат ПК має значний протекторний ефект, як на рівні окремих тканин та органів так і на рівні цілого організму. Встановлено, що концентрат ПК здатен знижувати утворення вільних радикалів та продуктів ліпопероксидації, руйнувати їх або перешкоджати утворенню в клітині. Також поліфенольні сполуки можуть бути використані для зниження рівня АФО завдяки нормалізації активностей антиоксидантних ензимів і таким чином припинення радіоіндукованих ланцюгових окиснювальних реакцій у клітинах. Здатністю впливати на ендогенну антиоксидантну систему володіє велика кількість фенольних сполук, представлених у виноградному вині, зокрема

флаван-3-оли ((-)-епікатехіни, (+)-катехіни, галати та продукти їхнього метилювання, декарбоксілювання і дегідроксилювання), кверцитин, гідроксицинамінові кислоти (кафтарова, каутарова та кумарова кислоти) шляхом активації транскрипції генів відповідних ензимів. Антоціаніни виноградного вина (мальвідин, дельфінідин, пеонідин, петунідин та ціанідин) є потужними радіопротекторами, оскільки здатні впливати на вміст NO та його стабільних метаболітів, головню завдяки інгібуванню iNOS. Катехіни та галова кислота здатні скавенджерувати NO та пероксинітрит, а також пригнічувати активність індукцибельної NOS пригнічуючи утворення мРНК, і при цьому феноли активують ендотеліальну NOS у аорті щурів, впливаючи на вивільнення  $Ca^{2+}$  у цитоплазму.

Отже встановлено, що опромінення дозою 10 сГр призводить до порушення антиоксидантно-прооксидантної рівноваги, змін активностей антиоксидантних ензимів та до дисбалансу системи L-аргінін / оксид нітрогену у периферичній крові, лейкоцитах, тканинах аорти та нирки щурів. Проте, оксидативно-нітративний стрес, що розивається за дії іонізуючого випромінювання дозою 30 сГр є більш глибоким та характеризується більш різкими змінами як показників, які є його маркерами (вміст 3'-нітротирозин-модифікованих протеїнів та ТБК-ПП), рівня метаболітів оксиду нітрогену й активності NOS, так і ензиматичної ланки системи антиоксидантного захисту, що унеможлиблює запобігання ланцюгових патологічних реакцій. Застосування концентрату ПК нівелює радіоіндуковане порушення стану системи L-аргінін/NO, зокрема, пригнічує продукування NO ензимом NOS та системи ендогенного захисту. Також споживання концентрату ПК дає змогу запобігти накопиченню великих кількостей 3'-нітротирозину та ТБК-ПП, що свідчить про пригнічення радіоіндукованого оксидативно-нітративного стресу за впливу поліфенольних сполук з виноградного вина. Отримані нами результати відкривають перспективи використання препаратів, основними діючими речовинами яких є фенольні сполуки, в якості допоміжних засобів комплексної терапії та профілактики розвитку ушкоджень системи крові,

імунної, серцево-судинної та видільної систем, спричинених впливом іонізуючого випромінювання.

## ВИСНОВКИ

Одержані результати розширюють уявлення про біохімічні механізми прояву негативних наслідків ураження малими дозами іонізуючого випромінювання та розширюють арсенал засобів, призначених для запобігання і усунення таких змін. У цій роботі показано коригуючий вплив концентрату природного поліфенольного комплексу з червоного виноградного вина на процес розвитку радіоіндукованого оксидативно-нітративного стресу, що підтверджувалось зміною показників, які характеризують окремі системи організму, у нирці, аорті, лейкоцитах та периферичній крові тварин після опромінення у дозах 10 та 30 сГр.

1. Розроблено метод отримання та стабілізації концентрату, збагаченого поліфенольними сполуками з червоного виноградного вина та експериментально доведено його радіопротекторні властивості.

2. Встановлено, що за дії малих доз іонізуючого випромінювання зростає активність NO-синтази у всіх досліджуваних тканинах і підвищується рівень утворення NO. Про це свідчить зростання сумарного вмісту стабільних метаболітів NO ( $\text{NO}_2^-$  та  $\text{NO}_3^-$ ) як у периферичній крові, так і в імунокомпетентних клітинах, аорті та нирках щурів.

3. Пероральне введення концентрату ПК пригнічує активність NOS та знижує вміст  $\text{NO}_2^-$  та  $\text{NO}_3^-$  у лейкоцитах, аорті та нирці щурів, опромінених малими дозами іонізуючого випромінювання.

4. Показано, що після впливу рентгенівського випромінювання внаслідок інтенсифікації реакцій нітрування тирозинових залишків протеїнів зростає вміст 3'-нітротироzinу у лейкоцитах і корковому шарі нирки щурів, а споживання концентрату ПК опроміненими тваринами призводить до зниження цього показника до меж норми у лейкоцитах та корковому шарі нирки.

5. Виявлено тканиноспецифічність розвитку радіоіндукованого оксидативно-нітративного стресу в тканинах аорти, що відображається у зниженні рівня 3'-нітротироzin-модифікованих протеїнів після опромінення як у дозі 10 сГр, так і

у дозі 30 сГр. У разі споживання концентрату ПК за умов опромінення цей показник залишався значно нижчим від контрольних значень упродовж всього експерименту (на першу, другу, третю та сьому доби) у цій судині.

6. Вплив іонізуючого випромінювання призводить до порушення збалансованої роботи ензиматичної системи антиоксидантного захисту, що відображалося у різнонапрямлених достовірних змінах активностей ензимів цієї системи (СОД, КАТ, ГПО та ГР) у різні терміни експерименту у всіх досліджуваних тканинах за дії обох доз іонізуючого випромінювання. Внаслідок таких радіоіндукованих порушень збільшується вміст ТБК-позитивних продуктів.

7. Вплив концентрату ПК при опроміненні у дозах 10 та 30 сГр призводить до повернення активності ензимів системи антиоксидантного захисту до меж норми, а у разі дії вищої дози радіації показано компенсаторне зростання активності СОД у лейкоцитах, КАТ – у периферичній крові та ГР – у корковому шарі нирки за введення концентрату ПК. Було відмічено достовірне зниження вмісту ТБК-позитивних продуктів за введення концентрату ПК у периферичній крові та в аорті після дії іонізуючого випромінювання у дозі 10 сГр. Цей показник знижувався у всіх досліджуваних тканинах у разі впливу радіації у дозі 30 сГр за споживання тваринами концентрату ПК.

8. Концентрат поліфенольного комплексу, отриманий з червоного виноградного вина рекомендується для запобігання чи корекції патологій, які супроводжуються розвитком оксидативно-нітративного стресу, зокрема індукованих впливом малих доз іонізуючого випромінювання.

**СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ**

1. Барабой В. А. Биоантиоксиданты / В. А. Барабой. – К.: Книга плюс, 2006. – 462 с.
2. Блюм Я. Б. Нітрування тирозину як регуляторна посттрансляційна модифікація протеїнів / Я. Б. Блюм, Ю. А. Красиленко, А. І. Ємець // Укр. біохім. журн. – 2009. – Т. 81, № 5. – С. 5–15.
3. Богданов И. М., Проблема оценки эффектов воздействия «малых» доз ионизирующего излучения / И. М. Богданов, М. А. Сорокина, А. И. Маслюк // Бюллетень сибирской медицины. – 2005. – № 2. – С. 145–151.
4. Войціцький В. М. Структурна організація мембран еритроцитів за дії іонізуючої радіації в надмалих дозах / В. М. Войціцький, С. В. Хижняк, В. В. Жирнов, О. А. Лапоша // Фізика живого. – 2008. – Т. 16, № 2. – С. 58–64.
5. Герасимов М. А. Технология вина / М. А. Герасимов. – М.: Типография Московской картонажной ф-ки, 1959. – 637 с.
6. Дацюк Л. Активність NO-синтази та вміст стабільних метаболітів оксиду азоту у лейкоцитах периферичної крові щурів при введення L-аргініну за умов хронічного рентгенівського опромінення / Л. Дацюк, Ю. Перетятко, У. Старанко, Н. Сибірна // Вісник Львів. ун-ту. Серія біологічна. – 2009. – Вип. 51. – С. 37–42.
7. Дубинина Е. Е. Окислительная модификация белков / Е. Е. Дубинина, И. В. Шугалей // Усп. совр. биол. – 1993. – Т. 113, вып. 1. – С. 71–81.
8. Єфремова У. П. Роль NO-синтазної системи в організмі людини при розвитку патологічних процесів / У. П. Єфремова, Н. Е. Личковська, Р. В. Фафула, З. Д. Воробець // Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія. – 2012. – № 1. – С. 68–73.
9. Ивановский Ю. А. Радиационный гормезис. Благоприятные ли малые дозы ионизирующей радиации? / Ю.А. Ивановский // Вестник

дальневосточного отделения Российской Академии Наук. – 2006, №6. – С. 86–91.

10. Королюк М. А. Метод определения активности каталазы / М. А. Королюк, И. Г. Иванова, И. Г. Майорова [и др.] // Лабораторное дело. – 1988. – № 1. – С. 16–18.

11. Кубашко А. В. Антиоксидантні ензими в механізмах радіоіндукованого окисного стресу (ранній та віддалений періоди після опромінення) / А. В. Кубашко, Л. М. Овсяннікова, А. А. Чумак [та ін.] // Лабораторна діагностика. – 2011. – Т. 4, № 58. – С. 64–71.

12. Кудряшов Ю. Б. Радиационная биофизика (ионизирующие излучения) / Ю. Б. Кудряшов. – М.: Физматлит, 2004. – 448 с.

13. Кудряшов Ю. Б. Химическая защита от лучевого поражения / Ю. Б. Кудряшов // Соросовский образовательный журнал. – 2000. – Т. 6, № 6. – С. 21–26.

14. Лановенко І. І. Оксид азоту – універсальний регулятор клітинних функцій / І. І. Лановенко // Гематологія і переливання крові. Вип. 34 : Матеріали V з'їзду гематологів та трансфузіологів України з міжнародною участю "Підсумки та перспективи розвитку гематології та трансфузіології в Україні", м. Вінниця: [у 2 т.]. – 2008. – Т. 1. – С. 227–234.

15. Лаповець Л. Є. Посібник з лабораторної імунології / Л. Є. Лаповець, Б. Д. Луцик. – Львів. 2002. – 173 с.

16. Любимова Н. Е. Влияние облучения в малых дозах и возраста на радиочувствительность лимфоцитов человека *in vitro* / Н. Е. Любимова, И. Е. Воробцова // Радиационная биология. – 2008. – Т. 48, № 2. – С. 153–159.

17. Моин В. М. Простой и специфический метод определения активности глутатионпероксидазы в эритроцитах / В. М. Моин // Лабораторное дело. – 1986. – № 12. – С. 124–126.

18. Молекулярная биология клетки / [Албертс Б., Брей Д., Льюис Дж. и др.]. Пер. с англ. – М.: Мир, 1994. – 521 с.



19. Пат. U201313977, Україна. Спосіб одержання препарату природного поліфенольного комплексу з виноградного вина / Сибірна Н. О., Дацюк Л. О., Дацюк У. В.; № 90347 (51) МПК. Опубл. 26.05.2014, Бюл. № 10.
20. Перетятко Ю. В. Особливості аргіназного та NO-синтазного шляхів метаболізму L-аргініну в лейкоцитах периферичної крові щурів за хронічного рентгенівського опромінення / Ю. В. Перетятко, Н. О. Сибірна // Укр. біохім. журн. – 2009. – Т. 81, № 2. – С. 40–48.
21. Прохорова А. О. Вплив іонізуючої радіації низької потужності поглиненої дози на систему антиоксидантного захисту в організмі щурів / А. О. Прохорова, Л. І. Степанова, Є. А. Грогуль [та ін.] // Ядерна фізика та енергетика. – 2011. – Т. 12, № 2. – С. 186–191.
22. Сабадашка М. Якісний та кількісний склад поліфенолів у концентраті червоного виноградного вина / М. Сабадашка, А. Гнатуш, Н. Сибірна // Вісник Львівського ун-ту. Серія біологічна. – 2014. – Вип. 65. – С. 77–85.
23. Сагач В. Ф. Пригнічення оксидативного та нітрозативного стресу як механізм кардіо- і вазопротекторної дії екдистерону за умов експериментального цукрового діабету I типу / В. Ф. Сагач, Ю. П. Коркач, А. В. Коцюруба, О. Д. Присяжна // Фізіологічний журнал. – 2008. – Т. 54, № 5. – С. 46–54.
24. Саралидзе М. Плаферон ЛБ, как регулятор оксидативного стресса при радиационном облучении: автореф. дис. на соискание ученой степени канд. медич. наук: спец. 14.00.36 «Аллергология и иммунология» / Майя Саралидзе – Тбилиси, 2006. – 19 с.
25. Сибірна Н. О. Методи дослідження системи крові / Н. О. Сибірна, В. А. Бурда, Я. П. Чайка. – Львів: Видавн. центр Львів. нац. ун-ту, 2006. – 100 с.
26. Сибірна Н. О. Молекулярні механізми депонування оксиду азоту в еритроцитах / Н. О. Сибірна, М. Я. Люта, Н. І. Климишин // Біологічні Студії. – 2010. – Т. 4, №1. – С. 143–160.

27. Тимирбулатов Р. А. Метод повышения интенсивности свободнорадикального окисления липидсодержащих компонентов крови и его диагностическое значение / Р. А. Тимирбулатов, Е. И. Селезнев // Лабораторное дело. – 1981. – № 4. – С. 209–211.

28. Ткаченко М. М. Вплив малих доз радіації на судинну реактивність та окисний метаболізм кисню і азоту в серцево-судинній системі / М. М. Ткаченко, В. Ф. Сагач, А. В. Коцюруба [та ін.] // Журн. АМН України. – 2007. – Т. 13, № 1. – С. 20–32.

29. Флавоноиды: биохимия, биофизика, медицина / [Тараховский Ю. С., Ким Ю. А., Абдрасилов Б. С., Музафаров Е. Н.]. – Пушино: Synchronbook, 2013. – 310 с.

30. Хижняк С. В. Активність ферментів антиоксидантного захисту за дії іонізуючого випромінення та фосфоліпідвмісного препарату / Хижняк С. В., Грищенко В. А., Степанова Л. І. [та ін.] // Фізика живого. – 2008. – Т. 16, № 2. – С. 65–69.

31. Чевари С. Определение антиоксидантных параметров крови и их диагностическое значение в преклонном возрасте / С. Чевари, Т. Д. Андял, Д. Штиренгер // Лабораторное дело. – 1991. – № 10. – С. 9–13.

32. Ярмоленко С. П. Радиобиология человека и животных / С. П. Ярмоленко // Учеб. для биол. спец. вузов. 3-е изд., перераб. и доп. – М.: Высш. шк., 1988. – 424 ст.

33. Afaq F. Polyphenols: Skin Photoprotection and Inhibition of Photocarcinogenesis / F. Afaq, S. K. Katiyar // Mini Rev. Med. Chem. – 2011. – Vol. 11, № 14. P. 1200–1215.

34. Alderton W.K. Nitric oxide synthases : structure, function and inhibition / W. K. Alderton, C. E. Cooper, R. G. Knowles // Biochem. J. – 2001. – Vol. 357. – 593–615.

35. Alhosin M. Redox-Sensitive Up-Regulation of eNOS by Purple Grape Juice in Endothelial Cells: Role of PI3-Kinase/Akt, p38 MAPK, JNK, FoxO1 and

FoxO3a / M. Alhosin, E. Anselm, S. Rashid [et al.] // PLoS ONE. – 2013. – Vol. 8, № 3. – P. e57883.

36. Andrew P. J. Enzymatic function of nitric oxide synthases / P. J. Andrew, B. Mayer // Cardiovascular Research. – 1999. – Vol. 43. – P. 521–531.

37. Aulak K. S. Dynamics of protein nitration in cells and mitochondria / K. S. Aulak, T. Koeck, J. W. Crabb, D. J. Stuehr // Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol. – 2004. – Vol. 286. – P. H30–H38.

38. Awad H. M. Peroxidase-catalyzed formation of quercetin quinone methide-glutathione adducts / H. M. Awad, M. G. Boersma, J. Vervoort, I. M. Rietjens // Arch. Biochem. Biophys. – 2000. – Vol. 378. – P. 224–233.

39. Awad H. M. Quenching of quercetin quinone/quinone methides by different thiolate scavengers: stability and reversibility of conjugate formation / H. M. Awad, M. G. Boersma, S. Boeren [et al.] // Chem. Res. Toxicol. – 2003. – Vol. 16. – P. 822–831.

40. Azzam E. I. Ionizing radiation-induced metabolic oxidative stress and prolonged cell injury / E. I. Azzam, J-P. Jay-Gerin, D. Pain // Cancer Lett. – 2012. – Vol. 327. – P. 48–60.

41. Azzam E. I. Oxidative metabolism modulates signal transduction and micronucleus formation in bystander cells from alpha-particle-irradiated normal human fibroblast cultures / E. I. Azzam, S. M. de Toledo, D. R. Spitz, J. B. Little // Cancer Res. – 2002. – Vol. 62, № 19. – P. 5436–5442.

42. Babicova A. Early changes in L-arginine-nitric oxide metabolic pathways in response to the whole-body gamma irradiation of rats / A. Babicova, Z. Havlinova, J. Pejchal, A. Tichy, M. Rezacova, J. Vavrova, J. Chladek // International Journal of Radiation Biology. – 2011. – Vol. 87, № 10. – P. 1067–1073.

43. Baker J. E. 10 Gy Total Body Irradiation Increases Risk of Coronary Sclerosis, Degeneration of Heart Structure and Function in a Rat Model / J. E. Baker, B. L. Fish, J. Su [et al.] // Int. J. Radiat. Biol. – 2009. – Vol. 85, № 12. – P. 1089–1100.

44. Basli A. Wine Polyphenols: Potential Agents in Neuroprotection / A. Basli, S. Soulet, N. Chaher [et al.] // *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. – 2012. – Vol. 2012, Article ID 805762. – 14 p.
45. Battistuzzi G. Redox properties of heme peroxidases / G. Battistuzzi, M. Bellei, C. A. Bortolotti, M. Sola // *Arch. Biochem. Biophys.* – 2010. – Vol. 500, № 1. – P. 21–36.
46. Baud O. Glutathione peroxidase-catalase cooperativity is required for resistance to hydrogen peroxide by mature rat oligodendrocytes / O. Baud, A. E. Green, J. Li [et al.] // *Neurosci.* – 2004. – Vol. 24, № 7. – P. 1531–1540.
47. Beckman J. S. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide / J. S. Beckman, J. W. Beckman, J. Chen [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1990. – Vol. 87, № 7. – P. 1620–1624.
48. Beckman J. S. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly / J. S. Beckman, W. H. Koppenol // *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* – 1996. – Vol. 271, № 5, Pt 1. – P. C1424–C1437.
49. Beckman J. S.  $\cdot\text{OONO}$ : Rebounding From Nitric Oxide / J. S. Beckman // *Circ. Res.* – 2001. – Vol. 89. – P. 295–297.
50. Beckman J. S. Oxidative damage and tyrosine nitration from peroxynitrite / J. S. Beckman // *Chem. Res. Toxicol.* – 1996. – Vol. 9, № 5 – P. 836–844.
51. Beckman K. D. The free radical theory of aging matures / K. D. Beckman, B. N. Ames // *Physiol. Rev.* – 1998. – Vol. 78. – P. 547–581.
52. Berg R. M. G. Neuro-oxidative-nitrosative stress in sepsis / R. M. G. Berg, K. Moller, D. M Bailey // *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism.* – 2011. – Vol. 31. – P. 1532–1544.
53. Bergonie J. De quelques resultats de la radiotherapie et essai de fixation d'une technique rationnelle / J. Bergonie, L. Tribondeau // *C. R. Acad. Sci.* – 1906. – Vol. 143. – P. 983–985.

54. Böger R. H. The pharmacodynamics of L-arginine / R.H. Böger // *J. Nutr.* – 2007. – Vol. 137, № 6 Suppl. 2. – P. 1650S–1655S.
55. Boto-Ordonez M. Prediction of the wine polyphenol metabolic space: An application of the Phenol-Explorer database / M. Boto-Ordonez, J. A. Rothwell, C. Andres-Lacueva [et al.] // *Mol. Nutr. Food Res.* – 2014. – Vol. 58. – P. 466–477.
56. Brieger K. Reactive oxygen species: from health to disease / K. Brieger, S. Schiavone, F. J. Miller Jr., K.-H. Krause // *Swiss. Med. Wkly.* – 2012. – Vol. 142. – w13659.
57. Buonanno M. Long-term consequences of radiation-induced bystander effects depend on radiation quality and dose and correlate with oxidative stress / M. Buonanno, S. M. de Toledo, D. Pain, E. I. Azzam // *Radiat. Res.* – 2011. – Vol. 175. – P. 405–415.
58. Calabrese E. J. Radiation Hormesis: Origins, History, Scientific Foundations / E. J. Calabrese, L. A. Baldwin // *Hum Exp Toxicol.* – 2000. – Vol. 19. – P. 41–75.
59. Chang S.-S. Gallic Acid Attenuates Platelet Activation and Platelet-Leukocyte Aggregation: Involving Pathways of Akt and GSK3 $\beta$  / S.-S. Chang, V. S. Y. Lee, Y.-L. Tseng [et al.] // *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine.* – 2012. – Vol. 2012, Article ID 683872. – 8 p.
60. Chapple I. L. C. The role of reactive oxygen and antioxidant species in periodontal tissue destruction / I. L. C. Chapple, J. B. Matthews // *Periodontology* 2000. – 2007. – Vol. 43. – P. 160–232.
61. Cimino S. Polyphenols: Key Issues Involved in Chemoprevention of Prostate Cancer / S. Cimino, G. Sortino, V. Favilla [et al.] // *Oxidative Medicine and Cellular Longevity.* – 2012. – Vol. 2012, Article ID 632959. – 8 p.
62. Cohen S. R. Chronic oxidative stress after irradiation: an unproven hypothesis / S. R. Cohen, E. P. Cohen // *Med. Hypotheses.* – 2013. – Vol. 80, № 2. – P. 172–175.
63. Cook S. L. Characterization of Tyrosine Nitration and Cysteine Nitrosylation Modifications by Metastable Atom-Activation Dissociation Mass

Spectrometry / S. L. Cook, G. P. Jackson // *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* – 2011. – Vol. 22. – P. 221–232.

64. Cruthirds D. L. Mitochondrial targets of oxidative stress during renal ischemia/reperfusion / D. L. Cruthirds, L. Novak, K. M. Akhi [et al.] // *Arch. Biochem. Biophys.* – 2003. – Vol. 412, № 1. – P.27–33.

65. Cuttler J. M. Health Effects of Low Level Radiation: When Will We Acknowledge The Reality? / J. M. Cuttler // *Dose-Response.* – 2007. – Vol. 5. – P. 292–298.

66. D'Alessandro T. Polyphenols, Inflammatory Response, and Cancer Prevention: Chlorination of Isoflavones by Human Neutrophils / T. Alessandro, J. Prasain, M. R. Benton [et al.] // *J Nutr.* – 2003. – Vol. 133, № 11, suppl 1. – P. 3773S–3777S.

67. D'Ischia M. Secondary targets of nitrite-derived reactive nitrogen species: nitrosation/nitration pathways, antioxidant defense mechanisms and toxicological implications / M. D'Ischia, A. Napolitano, P. Manini, L. Panzella // *Chem. Res. Toxicol.* – 2001. – Vol. 24, № 12. – P. 2071–2092.

68. Das S. Experimental evidence for the cardioprotective effects of red wine / S. Das, D. D Santani, N. S Dhalla // *Exp. Clin. Cardiol.* – 2007. – Vol. 12, № 1. – P. 5–10.

69. Dawson J. A Microtiter–Plate Assay of Human NOS Isoforms / J. Dawson, R. G. Knowles // *Methods in Molecular biology.* – 1998. – Vol. 100. – P. 237–242.

70. De Toledo S. M. 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.

71. De Vries J. H. Wine is a poor source of bioavailable flavonols in man / J. H. De Vries, P. C. Hollman, I. Van Amersfoort [et al.] // *Journal of Nutrition.* – 2001. – Vol. 131. – P. 745–748.

72. Dede S. Effects of X-Ray Radiation on Oxidation Products of Nitric Oxide in Rabbits Treated with Antioxidant Compounds / S. Dede, Y. Deger, T. Kahraman, D. Kilicalp // *Turk. J. Biochem.* – 2009. – Vol. 34, № 1. – P. 15–18.
73. Dejam A. Erythrocytes are the Major Intravascular Storage Sites of Nitrite in Human Blood / A. Dejam, C. J. Hunter, M. M. Pelletier [et al.] // *Blood.* – 2005. – Vol. 106, № 2. – P. 734–739.
74. Devasagayam T. P. A. Methods for estimating lipid peroxidation: An analysis of merits and demerits / T. P. A. Devasagayam, K. K. Bloor, T. Ramasarma // *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics.* – 2003. – Vol. 40. – P. 300–308.
75. Devine P. J. Roles of Reactive Oxygen Species and Antioxidants in Ovarian Toxicity / P. J. Devine, S. D. Perreault, U. Luderer // *Biology of Reproduction.* – 2012. – Vol. 86, № 2, part 27. – P. 1–10.
76. Dohadwala M. M. Grapes and Cardiovascular Disease / M. M. Dohadwala, J. A. Vita // *J. Nutr.* – Vol. 2009. – Vol. 139. – P. 1788S–1793S.
77. Drel V. R. Protective effects of polyphenolics in red wine on diabetes associated oxidative/nitrative stress in streptozotocin-diabetic rats / V. R. Drel, N. Sybirna // *Cell. Biol. Int.* – 2010. – Vol. 34. – P. 1147–1153.
78. Dudzinski D. M. The regulation and pharmacology of endothelial nitric oxide synthase / D. M. Dudzinski, J. Igarashi, D. Greif, T. Michel // *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* – 2006. – Vol. 46. The regulation and pharmacology of endothelial nitric oxide synthase P. 235–276.
79. Epperly M. W. Antioxidant-chemoprevention diet ameliorates late effects of total-body irradiation and supplements radioprotection by MnSOD-plasmid liposome administration / M. W. Epperly, H. Wang, J. A. Jones [et al.] // *Radiat. Res.* – 2011. – Vol. 175, № 6. – P. 759–765.
80. Esnault M. A. L. Ionizing radiation: Advances in plant response / M. A. L. Esnault, C. Chenal // *Environ. Exp. Bot.* – 2010. – Vol. 68. – P. 231–237.

81. Feinendegen L. E. Evidence for Beneficial Low Level Radiation Effects and Radiation Hormesis / L. E. Feinendegen // *Br. J. Radiol.* – 2005. – Vol. 78. – P. 3–7.
82. Finkel T. Signal transduction by reactive oxygen species / T. Finkel // *J. Cell. Biol.* – 2011. – Vol. 194. – P. 7–55.
83. Focea R. Low dose X –ray effects on catalase activity in animal tissue / R. Focea, C. Nadejde, D. Creanga, T. Luchian // *Journal of Physics: Conference Series.* – 2012. – Vol. 398 012032. – P. 1–6.
84. Folts J. D. Potential health benefits from the flavonoids in grape products on vascular disease // *Adv. Exp. Med. Biol.* – 2002. – Vol. 505. – P. 95–111.
85. Förstermann U. Nitric oxide and oxidative stress in vascular disease / U. Förstermann // *Pflugers Arch.* – 2010. – Vol. 459, № 6. – P. 923–939.
86. Förstermann U. Therapeutic effect of enhancing endothelial nitric oxide synthase (eNOS) expression and preventing eNOS uncoupling / U. Forstermann, H. Li // *British J. of Pharmacology.* – 2011. – Vol. 164. – P. 213–223.
87. Fridovich I. The biology of oxygen radicals / I. Fridovich // *Science.* – 1978. – Vol. 201. – P. 875–880.
88. Galvano F. Bioavailability, antioxidant and biological properties of the natural free-radical scavengers cyanidin and related glycosides / F. Galvano, L. La Fauci, P. Vitaglione [et al.] // *Ann. Ist. Super. Sanita.* – 2007. – Vol. 43, № 4. – P. 382–393.
89. Geoffrey L. Radiation: Doses, Effects, Risks / L. Geoffrey – Ed. United Nations Environment Programme, 1985 – 68 p.
90. Giardi M. T. Preventive or Potential Therapeutic Value of Nutraceuticals against Ionizing Radiation-Induced Oxidative Stress in Exposed Subjects and Frequent Fliers / M. T. Giardi, E. Touloupakis, D. Bertolotto, G. Mascetti // *Int. J. Mol. Sci.* – 2013. – Vol. 14. – P. 17168–17192.



91. Gilchrist M. Inorganic nitrate and nitrite and control of blood pressure / M. Gilchrist, A. C. Shore, N. Benjamin // *Cardiovascular Research*. – 2011. – Vol. 89. – P. 492–498.
92. Gisone P. Early neuroprotective effect of nitric oxide in developing rat brain irradiated in utero / P. Gisone, A. D. Boveris, D. Dubner [et al.] // *Neurotoxicology*. – 2003. – Vol. 24, № 2. – P. 245–253.
93. Gisone P. The Role of Nitric Oxide in the Radiation-induced Effects in the Developing Brain / P. Gisone, D. Dubner, D. L. Rosario [et al.] // *In vivo*. – 2004. – Vol. 18, № 3. – P. 281–292.
94. Goldberg D. M. Glutathione reductase / D. M. Goldberg, R. J. Spooner, H. U. Bergmeyer // *Methods of Enzymatic Analysis*, 3rd ed. – Weinheim: Verlag Chemie. – 1983. – Vol. III. – P. 258–265.
95. Goldman M. Ionizing Radiation and Its Risks / M. Goldman // *West J. Med*. – 1982. – Vol. 137. – P. 540–547.
96. Gorbunov N. Activation of the nitric oxide synthase 2 pathway in the response of bone marrow stromal cells to high doses of ionizing radiation / N. Gorbunov, L. Pogue-Geile, M. W. Epperly [et al.] // *Radiat. Res*. – 2000. – Vol. 154, № 1. – P. 73–86.
97. Groves J. T. Nitric oxide synthase: models and mechanisms / J. T. Groves, C. C-Y. Wang // *Curr. Opin. Chem. Biol*. – 2000. – Vol. 4. – P. 687–695.
98. Grune T. Oxidative Stress and Protein Oxidation / T. Grune, B. Catalgol, T. Jung // *Protein Oxidation and Aging*, First Ed. – John Wiley & Sons, Inc., 2013. – 214 p.
99. Guilford J.M. Wine and Health: A Review / J. M. Guilford, J. M. Pezzuto // *Am. J. Enol. Vitic*. – 2011. – Vol. 62, № 4. – P. 471–486.
100. Habauzit V. Evidence for a protective effect of polyphenols-containing foods on cardiovascular health: an update for clinicians / V. Habauzit, C. Morand // *Ther. Adv. Chronic Dis*. – 2012. – Vol. 3, № 2. – P. 87–106.

101. Hall E. J. Radiobiology for the Radiologist / E. J. Hall, A. J. Giaccia // 6th edn. – Philadelphia, Baltimore, New York: Lippincott Williams & Wilkins, 2006. – 546 p.
102. Hei T. K. Radiation Induced Non-targeted Response: Mechanism and Potential Clinical Implications / T. K. Hei, H. Zhou, Y. Chai [et al.] // Curr. Mol. Pharmacol. – 2011. – Vol. 4, № 2. – P. 96–105.
103. Heller A. Cells Respond Uniquely to Low-Dose Ionizing Radiation / A. Heller // S&TR. – 2003. – P. 13–19.
104. Hernansanz-Agustin P. Nitrosothiols in the Immune System: Signaling and Protection / P. Hernansanz-Agustin, A. Izquierdo-Alvarez, A. Garcia-Ortiz [et al.] // Antioxidants & Redox Signaling. – 2013. – Vol. 18, № 3. – P. 288–308.
105. Herrero P. Feasibility and Dosimetry Studies for <sup>18</sup>F-NOS as a Potential PET Radiopharmaceutical for Inducible Nitric Oxide Synthase in Humans / P. Herrero, R. Laforest, K. Shoghi [et al.] // The Journal of Nuclear Medicine – 2012. – Vol. 53, № 6. – P. 994–1001.
106. Hertog M. G. L. Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of 28 vegetables and 9 fruits commonly consumed in the Netherlands / M. G. L. Hertog, P. C. H. Hollman, M. B. Katan // J. Agric. Food Chem. – 1992. – Vol. 40. – P. 2370–2383.
107. Huang T.-T. Oxidative stress and adult neurogenesis – effects of radiation and superoxide dismutase deficiency / T.-T. Huang, Y. Zou, R. Corniola // Semin. Cell. Dev. Biol. – 2012. – Vol. 23, № 7. – P. 738–744.
108. Hybertson B. M. Oxidative stress in health and disease: the therapeutic potential of Nrf2 activation / B. M. Hybertson, B. Gao, S. K. Bose, J. M. McCord // Molecular Aspects of Medicine. – 2011. – Vol. 32, № 4–6. – P. 234–246.
109. Irie Y. Histone H1.2. is a substrate for denitrase, an activity that reduces nitrotyrosine immunoreactivity in proteins / Y. Irie, M. Saeki, Y. Kamisaki [et al.] // Proc Natl Acad Sci USA. – 2003. – Vol. 100, № 10. – P. 5634–5639.

110. Ischiropoulos H. Biological selectivity and functional aspects of protein tyrosine nitration / H. Ischiropoulos // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2003. – Vol. 305, № 3. – P. 776–783.
111. Jansson E. A. A mammalian functional nitrate reductase that regulates nitrite and nitric oxide homeostasis / E. A Jansson, L. Huang, R. Malkey [et al.] // *Nature Chemical Biology.* – 2008. – Vol. 4, № 7. – P. 411–417.
112. Jelkmann W. Regulation of erythropoietin production / W. Jelkmann // *J. Physiol.* – 2011. – Vol. 589. – P. 1251–1258.
113. Kagota S. Chronic Production of Peroxynitrite in the Vascular Wall Impairs Vasorelaxation Function in SHR/NDmcr–cp Rats, an Animal Model of Metabolic Syndrome / S. Kagota, Y. Tada, N. Nejime N. [et al.] // *J. Pharmacol. Sci.* – 2009. – Vol. 109, № 4. – P. 556–564.
114. Kamisaki Y. An activity in rat tissues that modifies nitrotyrosine-containing proteins / Y. Kamisaki, K. Wada, K. Bian [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1998. – Vol. 95, № 20. – P 11584–11589.
115. Kataoka T. Study of antioxidative effects and anti-inflammatory effects in mice due to low-dose X-irradiation or radon inhalation / T. Kataoka // *Journal of Radiation Research.* – 2013. – Vol. 54. – P. 587–596.
116. Kelly G. S. Quercetin / G. S. Kelly // *Alternative Medicine Review.* – 2011. – Vol. 16, № 2. – P. 172–194.
117. Kensuke O. Activation of antioxidative enzymes induced by low dose-rate whole body  $\gamma$  irradiation: adaptive response in terms of initial DNA damage / O. Kensuke, K. Takao, T. Hiroshi // *Radit. Res.* – 2006. – Vol. 166, № 3. – P. 477–478.
118. Kerr S. Superoxide anion production is increased in a model of genetic hypertension: role of the endothelium / S. Kerr, M. J. Brosman, McIntyre M [et al.] // *Hypertension.* – 1999. – Vol. 33. – P. 1353–1358.
119. Kim H. Nitric oxide modulated the c-Jun N-terminal kinase/stress activated protein kinase activity through activating c-Jun terminal kinase kinase /

H. Kim, J. Shim, P. L. Han, E. J. Choi // *J. Biochem.* – 1997. – Vol. 36, № 44. – P. 13677–13681.

120. Knowles R. G. Nitric oxide synthases in mammals / R. G. Knowles, S. Moncada // *Biochem. J.* – 1994. – Vol. 298. – P. 249–258.

121. Koc M. Melatonin protects rat liver against irradiation-induced oxidative injury / M. Koc, S. Taysi, M. E. Buyukokuroglu, N. Bakan // *J. Radiat. Res.* – 2003. – Vol. 44, № 3. – P. 211–215.

122. Koeck T. Rapid and Selective Oxygen-regulated Protein Tyrosine Denitration and Nitration in Mitochondria / T. Koeck, X. Fu, S. L. Hazen [et al.] // *The Journal of Biological Chemistry.* – 2004. – Vol. 279, № 26. – P. 27257–27262.

123. Kojima S. Elevation of glutathione induced by low-dose gamma rays and its involvement in increased natural killer activity / S. Kojima, H. Ishida, M. Takahashi, K. Yamaoka // *Radiat. Res.* – 2002. – Vol. 157, № 3. – P. 275–280.

124. Kondrashov A. The Effects of New Alibernet Red Wine Extract on Nitric Oxide and Reactive Oxygen Species Production in Spontaneously Hypertensive Rats / A. Kondrashov, S. Vrankova, I. Dovinova [et al.] // *Oxidative Medicine and Cellular Longevity.* – 2012. – Vol. 2012, Article ID 806285. – 8 p.

125. Kotsonis P. Autoinhibition of neuronal nitric oxide synthase : distinct effects of reactive nitrogen and oxygen species on enzyme activity / P. Kotsonis, A. Frey, L. G. Frohlich [et al.] // *Biochem. J.* – 1999. – Vol. 340. – P. 745–752.

126. Kulcitki V. Investigation of Grape Seed Proanthocyanidins. Achievements and Perspectives / V. Kulcitki, P. F. Vlad, Gh. Duca [et al.] // *Chem. J. of Moldova. General, Industrial and Ecological Chem.* – 2007. – Vol. 2, № 1. – P. 36–50.

127. Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 / U. K. Laemmli // *Nature.* – 1970. – Vol. 227, № 5259. – P. 680–684.

128. Lakshmi S. V. Oxidative stress in cardiovascular disease / S. V. Lakshmi, G. Padmaja, P. Kuppusamy, V. K. Kutala // *Ind. J. Biochem. Biophys.* – 2009. – Vol. 46, № 6. – P. 421–440.

129. Leach J. K. Ionizing Radiation-induced, Mitochondria-dependent Generation of Reactive Oxygen/Nitrogen / J. K. Leach, G. Van Tuyle, P.-S. Lin [et al.] // *Cancer. Res.* – 2001. – Vol. 61, № 10. – P. 3894–3901.
130. Lee C. I. Regulation of xanthine oxidase by nitric oxide and peroxynitrite / C. I. Lee, X. Lin, J. L. Zweier // *J. Biol. Chem.* – 2000. – Vol. 275, № 3. – P. 9369–9376.
131. Lee J. Autophagy, mitochondria and oxidative stress: cross-talk and redox signalling / J. Lee, S. Giordano, J. Zhang // *Biochem. J.* – 2012. – Vol. 441. – P. 523–540.
132. Leopoldini M. The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants / M. Leopoldini, N. Russo, M. Toscano // *Food Chemistry* – 2011. – Vol. 125. – P. 288–306.
133. Lessio C. Cyclosporine A and NAC on the inducible nitric oxide synthase expression and nitric oxide synthesis in rat renal artery cultured cells / C. Lessio, F. De Assuncao Silva, M. A. Gloria [et al.] // *Kidney International.* – 2005. – Vol. 68. – P. 2508–2516.
134. Li H. Nitric Oxide Production from Nitrite Occurs Primarily in Tissues Not in the Blood. Critical Role of Xanthine Oxidase and Aldehyde Oxidase // H. Li, H. Cui, T. K. Kundu [et al.] // *The Journal of Biological Chemistry.* – 2008. – Vol. 283, № 26. – P. 17855–17863.
135. Limon-Pacheco J. The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress / J. Limon-Pacheco, M. E. Gonsebatt // *Mutation Research.* – 2009. – Vol. 674. – P. 137–147.
136. Liu S-Z. Nonlinear Dose-Response Relationship in the Immune System Following Exposure to Ionizing Radiation: Mechanisms and Implications / S-Z. Liu // *Nonlinearity in Biology, Toxicology and Medicine.* – 2003. – Vol. 1. – P. 71-92.
137. Lowri O. H. Protein measurement with the Folin phenol reagent / O. H. Lowri, M. J. Rosenbraugh, A. L. Pori // *Biol. Chem.* – 1951. – Vol. 193, № 1. – P. 265–275.

138. Lu C. S-sulfhydration / desulfhydration and S-nitrosylation / denitrosylation: A common paradigm for gasotransmitter signaling by H<sub>2</sub>S and NO / C. Lu, A. Kavalier, E. Lukyanov, S. S. Gross // *Methods*. – 2013. – Vol. 62. – P. 177–181.
139. Lu Z. Structure–activity relationship analysis of antioxidant ability and neuroprotective effect of gallic acid derivatives / Z. Lu, G. Nie, P. S. Belton [et al.] // *Neurochemistry International*. – 2006. – Vol. 48. – P. 263–274.
140. Lundberg J. O. Biology of nitrogen oxides in the gastrointestinal tract / J. O. Lundberg, E. Weitzberg // *Gut*. – 2013. – Vol. 62, № 4. – P. 616–629.
141. Lundberg J. O. Nitrate and nitrite in biology, nutrition and therapeutics / J. O. Lundberg, M. T. Gladwin, A. Ahluwalia [et al.] // *Nat. Chem. Biol.* – 2009. – Vol. 5, № 12. – P. 865–869.
142. Lundberg J. O. Roles of dietary inorganic nitrate in cardiovascular health and disease / J. O. Lundberg, M. Carlstrom, F. J. Larsen, E. Weitzberg // *Cardiovascular Research*. – 2011. – Vol. 89. – P. 525–532.
143. Mahaja N. Effect of gallic acid on alkaline phosphatase and peptidase activities in rat intestine / N. Mahaja, A. Mahmood // *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics*. – 2009. – Vol. 46, № 5. – P. 378–382.
144. Malyzhev V. A. Thymus factors in radiation protection / V. A. Malyzhev, V. A. Sharafan, A. V. Chernyshov [et al.] // *Health effects of Chernobyl accident: Monograph in 4 parts*. Ed. by Vozianov A., Bebeshko V., Bazyka D. – Kyiv: DIA, – 2003. – P. 466–478.
145. Manach C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies / C. Manach, G. Williamson, C. Morand [et al.] // *Am. J. Clin. Nutr.* – 2005. – Vol. 81(suppl). – P. 230S–242S.
146. Mateus N. Grape and Wine Polyphenolic Compositio of Red Vitis Vinifera Varieties Concerning Vineyard Altitude / N. Mateus, S. Proenca, P. Ribeiro [et al.] // *Cienc. Tecnol. Aliment.* – 2001. – Vol. 3, №2. – P. 102–110.

147. Matsumoto H. Nitric Oxide Radicals Choreograph a Radioadaptive Response / H. Matsumoto, A. Takahashi, T. Ohnishi // *Cancer Res.* – 2007. – Vol. 67. – P. 8574–8579.
148. Matsumoto H. Radiation-Induced Adaptive Responses and Bystander Effects / H. Matsumoto, A. Takahashi, T. Ohnishi // *Biological Sciences in Space.* – 2004. – Vol. 18, № 4. – P. 247–254.
149. Matsumoto H. Vanguard of Paradigm Shift in Radiation Biology: Radiation-Induced Adaptive and Bystander Responses / H. Matsumoto, N. Hamada, A. Takahashi, Y. Kobayashi, T. Ohnishi // *J. Radiat. Res.* – 2007. Vol. 48. – P. 97–106.
150. Mayer B. Biosynthesis and action of nitric oxide in mammalian cells / B. Mayer, B. Hemmens // *Trends Biochem. Sci.* – 1997. – Vol. 22, № 12. – P. 477–481.
151. Mazza G. (J.) Anthocyanins and heart health / G. (J.) Mazza // *Ann. Ist. Super. Sanita.* – 2007. – Vol. 43, № 4. – P. 369–374.
152. McBride W. H. A sense of danger from radiation / W. H. McBride, C. S. Chiang, J. L. Olson [et al.] // *Radiat. Res.* – 2004. – Vol. 162, № 1. – P. 1–19.
153. McCord J. M. Superoxide dismutase, lipid peroxidation, and bell-shaped dose response curves / J. M. McCord // *Dose Response.* – 2008. – Vol. 6, № 3. – P. 223–238.
154. McFarland H. I. Regulatory T Cells in c Irradiation-Induced Immune Suppression / H. I. McFarland, M. Puig, L. T. Grajkowska [et al.] // *PLoS ONE.* – 2012. – Vol. 7, № 6. – e39092.
155. McKinney L. C. Ionizing radiation potentiates the induction of nitric oxide synthase by interferon-gamma and/or lipopolysaccharide in murine macrophage lines. Role of tumor necrosis factor alpha / L. C. McKinney, E. M. Aquilla, D. Coffin [et al.] // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* – 2000. – Vol. 899. – P. 61–68.

156. Mikkelsen R. B. Biological chemistry of reactive oxygen and nitrogen and radiation-induced signal transduction mechanisms / R. B Mikkelsen, P. Wardman // *Oncogene*. – 2003. – Vol. 22. – P. 5734–5754.
157. Miranda K. M. A Rapid, Simple Spectrophotometric Method for Simultaneous Detection of Nitrate and Nitrite / K. M. Miranda, M. G. Espey, D. A. Wink // *Nitric Oxide: Biol. and Chem.* – 2001. – Vol. 5, № 1. – P. 62–71.
158. Mitchel R. E. J. Low Doses of Radiation Reduce Risk in Vivo / R. E. J. Mitchel // *Dose-Response*. – 2007. – Vol. 5. – P. 1–10.
159. Mollà M. Radiation-induced intestinal inflammation / M. Mollà, J. Panés // *World J. Gastroenterol.* – 2007. – Vol. 13, № 22. – P. 3043–3046
160. Moncada S. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology / S. Moncada, R. M. J. Palmer, E. A. Higgs // *Pharmacol. Rev.* – 1991. – Vol. 43, № 2. – P. 109–142.
161. Monteiro H. P. Protein Tyrosine Phosphorylation and Protein Tyrosine Nitration in Redox Signaling / H. P. Monteiro, R. J. Arai, L. R. Travassos // *Antioxidants and Redox Signaling*. – 2008. – Vol. 10, № 5. – P. 843–889.
162. Moridani M. Y. Caffeic acid, chlorogenic acid, and dihydrocaffeic acid metabolism: glutathione conjugate formation / M. Y. Moridani, H. Scobie, A. Jamshidzadeh [et al.] // *Drug Metab. Dispos.* – 2001. – Vol. 29. – P. 1432–1439.
163. Moulder J. E. Future strategies for mitigation and treatment of chronic radiation-induced normal tissue injury / J. E. Moulder, E. P. Cohen // *Semin. Radiat. Oncol.* – 2007. – Vol. 17, №2. P. 141–148.
164. Muller F. L. Trends in oxidative aging theories / F. L. Muller, M. S. Lustgarten, Y. Jang [et al.] // *Free Radic. Biol. Med.* – 2007. – Vol. 43, № 4. – P. 477–503.
165. Nichols J. A. Skin photoprotection by natural polyphenols: Anti-inflammatory, anti-oxidant and DNA repair mechanisms / J. A. Nichols, S. K. Katiya // *Arch. Dermatol. Res.* – 2010. – Vol. 302, № 2. – P. 71.



166. Nohl H. Mitochondria recycle nitrite back to the bioregulator nitric monoxide / H. Nohl, K. Staniek, B. Sobhian [et al.] // *Acta Biochimica Polonica*. – 2000. – Vol. 47, № 4. – P. 913–921.
167. Nunes C. Intestinal anti-inflammatory activity of red wine extract: unveiling the mechanisms in colonic epithelial cells / C. Nunes, E. Ferreira, V. Freitas [et al.] // *Food Funct.* – 2013. – Vol. 4, № 3. – P. 373–383.
168. Ohta S. The role of nitric oxide in radiation damage / S. Ohta, S. Matsuda, M. Gunji, A. Kamogawa // *Biol. Pharmacol. Bull.* – 2007. – Vol. 30, № 6. – P. 1102–1107.
169. Opie L. H. The red wine hypothesis: from concepts to protective signalling molecules / L. H. Opie, S. Lecour // *European Heart Journal*. – 2007. – Vol. 28. – P. 1683–1693.
170. Pacher P. Nitric Oxide and Peroxynitrite in Health and Disease / P. Pacher, J. S. Beckman, L. Liaudet // *Physiol. Rev.* – 2007. – Vol. 87, № 1. – P. 315–424.
171. Pandey K. B. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease / K. B. Pandey, S. I. Rizvi // *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. – 2009. – Vol. 2, № 5. – P. 270–278.
172. Panganiban R. A. Mechanisms of Radiation Toxicity in Transformed and Non-Transformed Cells / R.-A. M. Panganiban, A. L. Snow, R. M. Day // *Int. J. Mol. Sci.* – 2013. – Vol. 14. – P. 15931–15958.
173. Park J. H. Far-infrared radiation acutely increases nitric oxide production by increasing  $\text{Ca}^{2+}$  mobilization and  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase II-mediated phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase at serine 1179 / J. H. Park, S. Lee, D. H. Cho // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2013. – Vol. 436, № 4. – P. 601–606.
174. Pautz A. Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase / A. Pautz, J. Art, S. Hahn [et al.] // *Nitric Oxide*. – 2010. – Vol. 23, № 2. – P. 75–93.
175. Phytochemicals mechanisms of action / [Ed. by Meskin M. S., Bidlack W. R., Davies A. J. et al.] – Florida: CRC Press LLC, 2004. – 206 p.

176. Pollycove M. Radiation-induced versus endogenous DNA damage: possible effect of inducible protective responses in mitigating endogenous damage / M. Pollycove, L. E. Feinendegen // *Hum. Exp. Toxicol.* – 2003. – Vol. 22. – P. 290–306.
177. Potoka D. A. Peroxynitrite inhibits enterocyte proliferation and modulates Src kinase activity in vitro / D. A. Potoka, J. S. Upperman, X. Zhang [et al.] // *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* – 2003. – Vol. 285, № 5. – P. G861–869.
178. Poyton R. O. Mitochondrial generation of free radicals and hypoxic signaling / R. O. Poyton, K. A. Ball, P. R. Castello // *Trends Endocrinol. Metab.* – 2009. – Vol. 20. P. 332–340.
179. Pragasam S. J. Antiperoxidative potential of p-coumaric acid, a common dietary phenol, in adjuvant-induced arthritis in rats / S. J. Pragasam, V. Murunikara, E. P. Sabina, M. Rasool // *J. of Chinese Integrative Medicine.* – 2012. – Vol. 10, № 8. – P. 932–938.
180. Prasad K. N. Health risks of low dose ionizing radiation in humans: a review / K. N. Prasad, W. C. Cole, G. M. Hasse // *Exp. Biol. Med. (Maywood).* – 2004. – Vol. 229, № 5. – P. 378–382.
181. Prasad K. N. Pros and cons of antioxidant use during radiation therapy / K. N. Prasad, W. C. Cole, B. Kumar, K. Prasad // *Cancer Treat. Rev.* – 2002. – Vol. 28. – P. 79–91.
182. Prior R. L. Fruits and vegetables in the prevention of cellular oxidative damage / R. L. Prior // *Am J Clin Nutr.* – 2003. – Vol. 78 (suppl). – P. 570S–578S.
183. Radi R. Nitric oxide, oxidants, protein tyrosine nitration / R. Radi // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2004. – Vol. 101, № 12. – P. 4003–4008.
184. Radiation Biology: a Handbook for Teachers and Students / [E. L. J. F. Bohm, J. Hendry, R. Hill, J. et al.] // International Atomic Energy Agency Vienna. – 2010. – Training Course Series № 42. – 166 p.
185. Rafikov R. eNOS activation and NO function: Structural motifs responsible for the posttranslational control of endothelial nitric oxide synthase

activity / R. Rafikov, F. V. Fonseca, S. Kumar [et al.] // *J. Endocrinol.* – 2011. – Vol. 210, № 3. – P. 271–284.

186. Rao B. S. S. Antioxidant, anticlastogenic and radioprotective effect of *Coleus aromaticus* on Chinese hamster fibroblast cells (V79) exposed to gamma radiation / B. S. S. Rao, R. Shanbhoge, D. Upadhyaya [et al.] // *Mutagenesis.* – 2006. – Vol. 21, № 4. – P. 237–242.

187. Rao B.S.S. Vanguards of Paradigm Shift in Radiation Biology: Radiation-Induced Adaptive and Bystander Responses / B. S. S. Rao, R. Shanbhoge, D. Upadhyaya [et al.] // *J. Radiat. Res.* – 2007. – 48. – P. 97–106.

188. Rattmann Y. D. Natural Product Extract of *Dicksonia sellowiana* Induces Endothelium-Dependent Relaxations by a Redox-Sensitive Src- and Akt-Dependent Activation of eNOS in Porcine Coronary Arteries / Y. D. Rattmann, E. Anselm, J-H. Kim [et al.] // *J. Vasc. Res.* – 2012. – Vol. 49. – P. 284–298.

189. Reute S. Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked? / S. Reuter, S. C. Gupta, M. M. Chaturvedi, B. B. Aggarwal // *Free Radic Biol Med.* – 2010. – Vol. 49, № 11. – P. 1603–1616.

190. Roberts R. A. Nitrate and Oxidative Stress in Toxicology and Disease / R. A. Roberts, D. L. Laskin, Ch. V. Smith [et al.] // *Toxicological Sciences.* – 2009. – Vol. 112, № 1. – P. 4–16.

191. Rodrigo R. Oxidative stress and protective effects of polyphenols: comparative studies in human and rodent kidney. A review / R. Rodrigo, C. Bosco // *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* – 2006. – Vol. 142, № 3–4. – P. 317–327.

192. Rubbo H. Nitric oxide reaction with lipid peroxy radicals spares alpha-tocopherol during lipid peroxidation. Greater oxidant protection from the pair nitric oxide/alpha tocopherol than alpha-tocopherol/ascorbate / H. Rubbo, R. Radi, D. Anselmi et al. // *J. Biol. Chem.* – 2000. – Vol. 275, № 15. – P. 10812– 10818.

193. Salvemini D. Superoxide, peroxynitrite and oxidative/nitrate stress in inflammation / D. Salvemini, T. M. Doyle, S. Cuzzocrea / *Biochemical Society Transactions.* – 2006. – Vol. 34, part 5. – P. 965–970.

194. Schae D. Links between Innate Immunity and Normal Tissue Radiobiology / D. Schae, W. H. Mc Bride // *Radiat. Res.* – 2010. – Vol. 173, № 4. – P. 406–417.
195. Schmidt-Ullrich R. K. Signal transduction and cellular radiation responses / R. K. Schmidt-Ullrich, P. Dent, S. Grant [et al.] // *Rad. Res.* – 2000. – Vol. 153. – P. 245–247.
196. Schopfer F. J. NO-dependent protein nitration: a cell signaling event or an oxidative inflammatory response? / F. J. Schopfer, P. R. S. Baker, B. A. Freeman // *Trends Biochem. Sci.* – 2003. – Vol. 28, № 12. – P. 646–654.
197. Schuldt E. Z. Butanolic fraction from *Cuphea carthagenensis* Jacq McBride relaxes rat thoracic aorta through endothelium-dependent and endothelium-independent / E. Z. Schuldt, K. Ckless, M. E. Simas [et al.] // *J. Cardiovasc. Pharmacol.* – 2000. – Vol. 35. – P. 234–239.
198. Serafini M. Alcohol-Free Red Wine Enhances Plasma Antioxidant Capacity in Humans / M. Serafini, G. Maiani, A. Ferro-Luzzi // *J. Nutr.* – 1998. – Vol. 128. – P. 1003–1007.
199. Shah A. M. Inducible nitric oxide synthase and cardiovascular disease / A. M. Shah // *Cardiovascular Research.* – 2000. – Vol. 45. – P. 148–155.
200. Shao C. Targeted cytoplasmic irradiation induces bystander responses / C. Shao, M. Folkard, B. D. Michael, K. M. Prise // *PNAS.* – 2004. – Vol. 101, № 37. – P. 13495–13500.
201. Shiota M. Pro-survival and anti-apoptotic properties of androgen receptor signaling by oxidative stress promote treatment resistance in prostate cancer / M. Shiota, A. Yokomizo, S. Naito // *Endocrine-Related Cancer.* – 2012. – Vol. 19. – P. R243–R253.
202. Singleton V. L. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent / V. L. Singleton, R. Orthofer, R. M. Lamuela-Raventós // *Methods in Enzymology.* – 1999. – Vol. 299. – P. 152–178.

203. Siomek A. NF- $\kappa$ B signaling pathway and free radical impact / A. Siomek // *Acta Biochimica Polonica*. – 2012. – Vol. 59, № 3. – P. 323–331.
204. Smith J. Low dose ionising radiation produces too few ROS to directly affect antioxidant concentrations in cells / J. Smith, N. Willey, J. Hancock // *Biol. Lett.* – 2012. – Vol. 8. – P. 594–597.
205. Sponsler R. Nuclear Shipyard Worker Study (1980–1988): A Large Cohort Exposed to Low-Dose-Rate Gamma Radiation / R. Sponsler, J. R. Cameron // *Int. J. Low Radiation*. – 2005. – Vol. 1. – P. 463–478.
206. Stadtman E. R. Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins / E. R. Stadtman, R. L. Levine // *Amino Acids*. – 2003. – Vol. 25, № 3–4. – P. 207–218.
207. Stocker R. Role of oxidative modifications in atherosclerosis / R. Stocker, G. F. Keaney // *Physiol. Rev.* – 2004. – Vol. 4. – P. 1381–1478.
208. Stojanovic S. Manganese superoxide dismutase (MnSOD) catalyzes NO-dependent tyrosine residue nitration / S. Stojanovic, D. Stanic, M. Nikplić // *J. Serb. Chem. Soc.* – 2005. – Vol. 70, № 4. – P. 601–608.
209. Su X. Nitric Oxide Radical-induced Radioadaptation and Radiosensitization Are G2/M Phase-dependent / X. Su, A. Takahashi, N. Kondo [et al.] // *J. Radiat. Res.* – 2011. – Vol. 52. – P. 609–615.
210. Sutherland B. A. Mechanisms of action of green tea catechins, with a focus on ischemia-induced neurodegeneration / B. A. Sutherland, R. M. A. Rahman, I. Appleton // *J. of Nutritional Biochemistry*. – 2006. – Vol. 17. – P. 291–306.
211. Suzuki K. Low-dose Radiation Exposure and Carcinogenesis / K. Suzuki, Sh. Yamashita // *Jpn. J. Clin. Oncol.* – 2012. – Vol. 42, № 7. – P. 563–568.
212. Svobodova A. Natural phenolics in the prevention of UV-induced skin damage. A review / A. Svobodova, J. Psotova, D. Walterova // *Biomed. Papers*. – 2003. – Vol. 147, № 2. – P. 137–145.
213. Swee A. Oxidative stress in the Dahl hypertensive rats / A. Swee, F. Lacy, F. A. Delano [et al.] // *Hypertension*. – 1997. – Vol. 30. – P. 1628–1633.

214. Szabo C. Peroxynitrite: biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics / C. Szabo, H. Ischiropoulos, R. Radi // *Nat. Rev. Drug. Discov.* – 2007. – Vol. 6, № 8. – P. 662–680.
215. The Importance of In Vivo Metabolism of Polyphenols and Their Biological Actions / [S. Barnes, T. D'Alessandro, M. C. Kirk et al.] // *Phytochemicals. Mech. Action.* – 2004. – P. 51–59.
216. Towbin H. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. 1979 / H. Towbin, T. Staehelin, J. Gordon // *Biotechnology.* – 1992. – Vol. 24. – P. 145–149.
217. Tschudi M. R. Direct in situ measurement of nitric oxide in mesenteric resistance arteries – increased decomposition by superoxide in hypertension / M. R. Tschudi, S. Mesaros, T. F. Lischer [et al.] // *Hypertension.* – 1996. – Vol. 27. – P. 32–35.
218. Turko I. V. Protein nitration in cardiovascular diseases / I. V. Turko, F. Murad // *Pharmacol. Rev.* – 2002. – Vol. 54, № 4. – P. 619–634.
219. Turko I. V. Protein tyrosine nitration in the mitochondria from diabetic mouse heart. Implications to dysfunctional mitochondria in diabetes / I. V. Turko, L. Li, K. S. Aulak [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2003. – Vol. 278, № 36. – P. 33972–33977.
220. United Nations. Biological Mechanisms of Radiation Actions at Low Doses. A white paper to guide the Scientific Committee's future programme of work. / United Nations sales publication: New York, 2012. – 45 p.
221. Valko M. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease / M. Valko, D. Leibfritz, J. Moncola [et al.] // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* – 2007. – Vol. 39. – P. 44–84.
222. Van de Wiel A. Blessings of the grape / A. Van de Wiel, P. H. M. Van Golde, H. C. Hart // *European Journal of Internal Medicine.* – 2001. – Vol. 12. – P. 484–489.

223. Van Faassen E. E. Nitrite as regulator of hypoxic signaling in mammalian physiology / E. E. van Faassen, S. Bahrami, M. Feelisch [et al.] // *Med. Res. Rev.* – 2009. – Vol. 29, № 5. – P. 683–741.

224. Van Goldea P. H. Characteristics of piraltin, a polyphenol concentrate, produced by freeze-drying of red wine / P. H. Van Goldea, M. Van der Westelakenb, B. N. Boumac, A. Van de Wiel // *Life Sciences.* – 2004. – Vol. 74. – P. 1159–1166.

225. Vandenhove H. Life-cycle chronic gamma exposure of *Arabidopsis thaliana* induces growth effects but no discernable effects on oxidative stress pathways / H. Vandenhove, N. Vanhoudt, A. Cuypers [et al.] // *Plant Physiol. Biochem.* – 2010. – Vol. 48. P. 778–786.

226. Vermerris W. *Phenolic Compound Biochemistry* / W. Vermerris, R. Nicholson. – Dordrecht: Springer, 2006. – 285 p. – (Phenolic Compound Biochemistry).

227. Wallace T. C. Anthocyanins in Cardiovascular Disease / T. C. Wallace // *Adv. Nutr.* – 2011. – Vol. 2. – P. 1–7.

228. Wang J. Interaction of Nitric Oxide with Human Heme Oxygenase-1 / J. Wang, S. Lu, P. Moenne-Loccoz [et al.] // *The Journal of Biological Chemistry.* – 2003. – Vol. 278, № 4. – P. 2341–2347.

229. Wang X. Nitric oxide promotes p53 nuclear retention and sensitizes neuroblastoma cells to apoptosis by ionizing radiation / X. Wang, A. Zalcenstein, M. Oren // *Cell Death and Differentiation.* – 2003. – Vol. 10. – P. 468–476.

230. Weydert C. J. Overexpression of manganese or copper-zinc superoxide dismutase inhibits breast cancer growth / C. J. Weydert, T. A. Waugh, J. M. Ritchie [et al.] // *Free Radic. Biol. Med.* – 2006. – Vol. 41, № 2. – P. 226–237.

231. Wink D. A. Nitric oxide and redox mechanisms in the immune response / D. A. Wink, H. B. Hines, R. Y. S. Cheng [et al.] // *Journal of Leukocyte Biology.* – Vol. 89. – P. 873–891.

232. Wu C. Thioredoxin 1-Mediated Post-Translational Modifications: Reduction, Transnitrosylation, Denitrosylation, and Related Proteomics

Methodologies / C. Wu, A. M. Parrott, C. Fu // *Antioxidants & Redox Signaling*. – 2011. – Vol. 15, № 9. – P. 2565–2604.

233. Yeo W.-S. Nitrosative protein tyrosine modifications: biochemistry and functional significance / W.-S. Yeo, S. J. Lee, J. R. Lee, K. P. Kim / *BMB rep.* – 2008. – Vol. 41, № 3. – P. 194–203.

234. Zabbarova I. Targeted Delivery of Radioprotective Agents to Mitochondria / I. Zabbarova, A. Kanai // *Mol. Interv.* – 2008. – Vol. 8, № 6. – P. 294–302.

235. Zaka R. Effects of low chronic doses of ionizing radiation on antioxidant enzymes and G6PDH activities in *Stipa capillata* (Poaceae) / R. Zaka, C. M. Vandecasteele, M. T. Misset // *J. Exp. Bot.* – 2002. – Vol. 53. P. 1979–1987.

236. Zang L.-Y. Effect of antioxidant protection by p-coumaric acid on low-density lipoprotein cholesterol oxidation / L.-Y. Zang, G. Cosma, H. Gardner [et al.] // *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* – 2000. – Vol. 279. – P. C954–C960.

237. Zavillova I. Wine polyphenols increase NO synthase activity in both normotensive and hypertensive rats / I. Zavillova, D. Capokova, O. Pechanova, I. Bernatova // *Physiol. Res.* – 2001. – Vol. 50. – 41 p.

238. Zenebe W. Red Wine Polyphenols Induce Vasorelaxation by Increased Nitric Oxide Bioactivity / W. Zenebe, O. Pechanova, R. Andriantsitohaina // *Physiol. Res.* – 2003. – Vol. 52. – P. 425–432.

239. Zhang X. Intranuclear localization of apoptosisinducing factor (AIF) and large scale DNA fragmentation after traumatic brain injury in rats and in neuronal cultures exposed to peroxynitrite / X. Zhang, J. Chen, S. H. Graham [et al.] // *J. Neurochem.* – 2002. – Vol. 82, № 1. – P. 181–191.