

## Участь ксантиноксидазної системи в розвитку оксидативного стресу за дії променевого чинника

Н. Г. Ракша, Т. Р. Андрійчук, М. Є. Кучеренко

Київський національний університет ім. Тараса Шевченка  
Вул. Володимирська, 64, Київ, 01033, Україна

kng@mail.univ.kiev.ua

---

*Встановлено, що дія іонізуючого випромінювання в дозі 1,0 Гр викликає активацію прооксидантного ферменту ксантиноксидази у лімфоцитах селезінки, що супроводжується зростанням швидкості утворення супероксидних аніон-радикалів і свідчить про участь ксантиноксидазної системи в індукованій радіацією загибелі клітин. Виявлено підвищення ступеня окиснювальної модифікації білків у спленоцитах через 3 год після тотального опромінення щурів.*

---

*Ключові слова: іонізуюче випромінювання, ксантиноксидаза, аніон-радикали, оксидативний стрес, окиснювальна модифікація білків.*

---

Вступ. Провідною ланкою під час індукції програмованої загибелі, обумовленої дією променевого чинника, можна вважати розвиток у клітинах оксидативного стресу [1]. У процесі нормальної життєдіяльності в організмі тварин підтримується певне співвідношення між активністю компонентів антиоксидантної системи, які забезпечують необхідну стаціонарну концентрацію вільних радикалів, та реакціями, пов'язаними з продукуванням даних метаболітів. Відомо, що дія іонізуючого випромінювання призводить до істотного порушення антирадикального захисту внаслідок зсуву рівноваги у прооксидантно-антиоксидантній системі в бік надмірного генерування активних кисневих метаболітів (АКМ) при паралельному виснаженні ендогенних ферментативних систем і пулу низькомолекулярних антиоксидантів (стан оксидативного стресу). За цих умов відбувається активація критичних для підтримання клітинного гомеостазу процесів, а саме — пероксидного окиснення ліпідів, окиснювальної модифікації білків і нуклеїнових кислот, що є результатом різкого підвищення рівня АКМ

як за рахунок безпосереднього їхнього утворення під час радіолізу води, так і опосередковано, через зростання рівня метаболічного генерування. Незважаючи на очевидний взаємозв'язок оксидативного стресу з програмованою клітинною загибеллю — апоптозом, остаточно не з'ясованими залишаються не лише механізми, які обумовлюють таку метаболічну ситуацію, а й роль конкретних радикалів у процесі самознищення клітин. Більш того, йде активний пошук відповіді на питання, чим є оксидативний стрес — наслідком чи індуктором функціональних змін, які супроводжують процеси програмованої клітинної загибелі.

Відомо, що одним із джерел АКМ, зокрема, супероксидних аніон-радикалів, є ксантиноксидазна реакція. Надлишок  $O_2$  безпосередньо, а також через утворення високореакційноздатних радикалів  $OH\cdot$  і синглетного кисню сприяє ініціації та розгалуженню ланцюгових вільнорадикальних реакцій у клітинах. Незважаючи на важливість ксантиноксидазної/ксантиндегідрогеназної системи, даних щодо її участі у механізмі реалізації пошкоджувального ефекту іонізуючої радіації недостатньо. Враховуючи роль ксантиноксидази у продукуванні вільних

радикалів, доцільним було оцінити внесок даної ферментної системи у розвиток індукованої радіацією загибелі лімфоїдних клітин.

**Матеріали і методи.** Досліди проводили на нелінійних щурах-самцях масою 150—170 г. Одно-разове тотальне опромінення тварин здійснювали на рентгенівській установці РУМ-17 у дозі 1,0 Гр за умов: фільтри 0,5 мм Cu та 1 мм Al, шкірно-фокусна відстань 50 см, напруга 200 кВ, сила струму 5 мА, потужність дози 0,17 Гр/хв. Тварин декапітували через 3 год після дії променевого чинника. Лімфоїдні клітини селезінки виділяли за загальноприйнятим методом [2]. Ксантинооксидазну активність визначали за накопиченням сечової кислоти [3]. Про зміни внутрішньоклітинного рівня гіпоксантину і ксантину робили висновок за включенням ізотопної мітки  $C^{14}$ -аденозину (питома радіоактивність 43 мКі/ммоль) у фонд досліджуваних сполук [4]. Швидкість генерування супероксидних аніон-радикалів визначали, як у роботі [5], за окисненням спінового уловлювача гідроксиламіну-2,2,6,6-тетраметил-4-оксипіперидину до відповідного стабільного нітросильного радикала, який реєстрували методом електронного парамагнітного резонансу за температури 20 °С у спеціальних кварцових кюветах товщиною 0,5 мм без парамагнетиків. Ступінь окиснювальної модифікації білків оцінювали за накопиченням у клітинах 2,4-динітрофенілгідразонів, як у роботі [6]. Статистичну обробку одержаних результатів здійснювали за програмою Microsoft Excel, використовуючи метод статистичного аналізу та критерій Стьюдента.

**Результати і обговорення.** На сьогодні загальновідомим прооксидантним ферментом є ксантинооксидаза, яка у клітинах представлена двома відмінними за своїми акцепторними властивостями формами — ксантиндегідрогеназою (КсД), для якої кінцевим акцептором електронів виступає НАД<sup>+</sup>, та ксантинооксидазою (КсО), коли функцію акцепції електронів виконує молекулярний кисень. Прояв дегідрогеназної або оксидазної активності залежить від умов середовища і визначається конформацією молекули ферменту, у якій важлива роль належить співвідношенню окиснених і відновлених тіолових груп, а також наявності в одній із субодиниць ферменту поліпептидного фрагмента з молекулярною масою 20 кДа [7, 8]. За сучасними уявленнями, при дії іонізуючого випромінювання КсД через низку проміжних станів трансформується в КсО, функціонування якої пов'язано з

Таблиця 1

Ксантинооксидазна активність та загальна радіоактивність фракцій гіпоксантину і ксантину в лімфоїдних клітинах селезінки щурів ( $M \pm m$ ;  $n = 5$ )

Показник	Ксантинооксидазна активність, нмоль сечової кислоти на $10^8$ кл за 1 хв	Загальна радіоактивність, імп/хв на $10^7$ кл	
		Гіпоксантин	Ксантин
Контроль	$60 \pm 5$	$970 \pm 84$	$820 \pm 78$
1,0 Гр	$71 \pm 8^*$	$1389 \pm 130^*$	$1312 \pm 102^*$

\*Різниця з контролем достовірна ( $p < 0,05$ ).

одноелектронним відновленням кисню з утворенням супероксидних аніон-радикалів.

Згідно з результатами, представленими у табл. 1, дія радіації призводить до активації оксидазної форми ферменту. Так, через 3 год після опромінення тварин у дозі 1,0 Гр в лімфоїдних клітинах селезінки спостерігається статистично вірогідне зростання КсО активності в 1,2 разу порівняно із значенням контролю.

Оскільки КсО є одним з кінцевих ферментів пуринового обміну у ссавців, її активність тісно пов'язана з інтенсивністю перетворення пуринів. Як відомо, індуковане радіацією порушення метаболізму пуринів супроводжується посиленням деградації аденілових нуклеотидів.

На нашу думку, вірогідною причиною підвищення активності КсО (поряд із частковим протезом ферменту та окисненням реакційноздатних сульфгідрильних груп [9]) може бути акумуляція у клітинах продуктів розпаду пуринів — гіпоксантину і ксантину — специфічних субстратів для ферменту. Так, у ході проведених досліджень виявлено підвищення загальної радіоактивності фракцій гіпоксантину і ксантину клітин селезінки відповідно на 40 та 60 %, що вказує на післяпроменево порушення метаболізму пуринів, зокрема, активацію катаболічної ланки перетворення аденілових нуклеотидів.

Одержані нами дані підтверджуються результатами електронного парамагнітного резонансу (табл. 2), згідно з якими через 3 год після тотального опромінення щурів у досліджуваній дозі (1,0 Гр) в спленоцитах спостерігається зростання швидкості генерування  $O_2^-$  у 1,3 разу, що, враховуючи широкий спектр дії супероксидних радикалів, зокрема, їхню здатність ініціювати вільнорадикальні ланцюгові реакції, обумовлює появу патобіохі-

Таблиця 2  
Швидкість генерування супероксидних аніон-радикалів та ступінь окиснювальної модифікації білків у спленоцитах щурів ( $M \pm m$ ;  $n = 5$ )

Показник	O <sub>2</sub> <sup>-</sup> , нмоль на 10 <sup>7</sup> кл за 1 хв	Ступінь окиснювальної модифікації білків, нмоль 2,4-динітрофенілгідрозонів на 10 <sup>7</sup> кл
Контроль	0,5 ± 0,02	4,2 ± 0,02
1,0 Гр	0,65 ± 0,04	5,0 ± 0,5*

\*Різниця з контролем достовірна ( $p < 0,05$ ).

мічних механізмів посилення та реалізації радіаційного ураження критичних клітинних структур. Так, збільшення внутрішньоклітинної концентрації вільних радикалів активує фосфоліпазу A<sub>2</sub>, що в свою чергу призводить до порушення ліпідного складу, індукції неспецифічної проникності мітохондріальних мембран та надходження у цитоплазму протеолітичних ферментів. У роботі [10] постулюється вивільнення з міжмембранного простору мітохондрій протеази, яка, каталізуючи відщеплення від ксантиноксидази поліпептидного фрагмента, сприяє необоротній конверсії дегідрогеназної активності в оксидазну. Подібне положення частково підтверджено в роботі [11], де продемонстровано значне зростання ксантиноксидазної активності при внесенні до інкубаційного середовища фракцій, збагачених ядрами і мітохондріями.

Останніми роками значну увагу дослідників приділено вивченню ролі активних кисневих метаболітів у процесах метаболізму білків як за нормальних умов, так і за різних патологічних станів. Посилене генерування АКМ під час розвитку оксидативного стресу спричинює не лише активацію процесів пероксидного окиснення ліпідів і порушення структурної цілісності нуклеїнових кислот, а й окиснювальну деструкцію білкових молекул, що призводить до зміни конформації і, отже, функціонування як розчинних, так і зв'язаних з мембраною ферментних комплексів, рецепторів, іонних каналів і супроводжується глибокими змінами клітинного метаболізму [12, 13]. Збільшення внутрішньоклітинного вмісту окиснених білків (в деяких випадках до 50—70 % всього клітинного білка) можна розглядати як ранній критерій ураження тканин вільними радикалами.

У зв'язку з цим на наступному етапі ми оцінювали ступінь окиснювальної модифікації біл-

кових молекул під час розвитку індукованої радіацією інтерфазної загибелі лімфоцитів селезінки.

Нашими експериментальними дослідженнями показано, що в спленоцитах щурів, опромінених у дозі 1,0 Гр, спостерігається статистично достовірне зростання вмісту фенілгідрозонів, яке становить 122 % від значення контролю. Одержані дані узгоджуються з результатами роботи [14], де авторами виявлено інтенсифікацію процесів окиснювальної деструкції білків у клітинах радіочутливих органів у відповідь на дію іонізуючого випромінювання (табл. 2).

Внутрішньоклітинний вміст модифікованих внаслідок окиснювання білків, з одного боку, залежить від інтенсивності генерування АКМ і, отже, від факторів, що провокують їхнє утворення, а з іншого, — визначається функціональною активністю ендogenous антиоксидантів, тобто обумовлений буферною ємністю прооксидантно-антиоксидантної системи. Як відомо, зростання рівня АКМ у клітинах поряд з іншими ефектами супроводжується руйнуванням і основних антиоксидантних (АО) ферментів, виходячи з чого можна припустити, що підвищення рівня окиснювальної модифікації білків частково зумовлене накопиченням у клітинах інактивованих у процесі каталізу АО ферментів. Поряд з модифікацією білків за участі кисневих метаболітів існує так званий неокиснювальний шлях утворення карбонільних похідних, який полягає у модифікації молекули білка альдегідами. Так, в експериментах авторів [15] продемонстровано, що інкубація білків з різним альдегідами, у тому числі МДА, концентраційно залежним чином індукує зростання ступеня модифікації білкових молекул. А оскільки дія іонізуючої радіації призводить до накопичення у клітинах продуктів пероксидації ліпідів, можна припустити, що відмічене нами підвищення рівня окиснювальної модифікації білків у спленоцитах опромінених щурів частково зумовлене саме неокиснювальним механізмом формування карбонільних похідних.

Таким чином, за дії рентгенівського випромінювання у лімфоцитах селезінки відбуваються незворотні порушення в системі контролю оксидантно-антиоксидантного клітинного гомеостазу, які виявляються у стимуляції активності прооксидантного ферменту ксантиноксидази і супроводжуються зростанням швидкості генерування супероксидних радикалів та ступеня окиснювальної модифікації білків.

N.G. Raksha, T. R. Andriychuk, M. E. Kucherenko

Participation of xanthinoxidase system in oxidative stress development at radiation action

#### Summary

It has been established, that ionizing radiation of 1.0 Gy dose causes the activation of prooxidant enzyme xanthinoxidase in spleen lymphocytes that is accompanied by enhanced formation of superoxidase anion-radicals and testifies to the participation of xanthinoxidase system in radiation induced cell death. The increase of oxidative modification of proteins in splenocytes of the rat in three hours after total X-irradiation was shown.

Key words: ionizing radiation, xanthinoxidase, anion-radicals, oxidative stress, oxidative modification of proteins.

Н. Г. Ракша, Т. Р. Андриичук, М. Е. Кучеренко

Участие ксантиноксидазной системы в развитии оксидативного стресса при действии лучевого фактора

#### Резюме

Установлено, что действие ионизирующего излучения в дозе 1,0 Гр вызывает активацию прооксидантного фермента ксантиноксидазы в лимфоцитах селезенки, что сопровождается повышением скорости образования супероксидных анион-радикалов и свидетельствует об участии ксантиноксидазной системы в индуцированной радиацией гибели клеток. Показано увеличение степени окислительной модификации белков в спленоцитах через 3 ч после тотального облучения крыс.

Ключевые слова: ионизирующее излучение, ксантиноксидаза, анион-радикалы, оксидативный стресс, окислительная модификация белков.

#### ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

1. Buttke T. M., Sandstrom P. A. Oxidative stress as a mediator of apoptosis // Immunol. Today.—1994.—15.—P. 7—10.
2. Хант С. Выделение лимфоцитов и вспомогательных клеток // Лимфоциты: Методы.—М.: Мир, 1990.—395 с.
3. Кишко Т. О., Дмитренко Н. П. Роль ксантиноксидазной и ксантиндегидрогеназной систем в апоптозе тимоцитов, индуцированном папаверином // Укр. біохім. журн.—2000.—73, № 3.—С. 95—104.
4. Головацкий И. Д., Петличная Л. И., Лашкай А. Ф. Поглощение и превращение [8-<sup>14</sup>C]-аденозина и 2',3'-О-

изопрониладенозина клетками и гомогенатами клеток гепатомы Зайделя // Укр. біохім. журн.—1989.—61, № 2.—С. 64—69.

5. Вартамян Л. С., Гуревич С. М. NADH- и NADPH-зависимое образование супероксидных радикалов в ядрах печени // Биохимия.—1989.—54, № 6.—С. 1020—1025.
6. Oliver C. N., Ahn B. W., Moerman E. J. Age-related changes in oxidized proteins // J. Biol. Chem.—1987.—262.—P. 5488—5491.
7. Шелепина Е. П., Антонов В. Г., Кожемякин Л. А. Молекулярный механизм трансформации активности ксантиноксидазы под действием субстрата // Биохимия.—1990.—55, № 9.—С. 1707—1712.
8. Roy P. S., McCord J. M. Ischemia-induced conversion of xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase // Fed. Proc.—1982.—41.—P. 767—769.
9. Ryan M. G., Balendran A., Harrison R. Xanthine oxidoreductase: dehydrogenase to oxidase conversion // Biochem. Soc. Trans.—1997.—25.—P. 530—534.
10. Saksela M., Lapatto R., Raivio K. O. Irreversible conversion of xanthine dehydrogenase into xanthine oxidase by a mitochondrial protease // FEBS Lett.—1999.—443.—P. 117—120.
11. Кишко Т. О. Роль ксантиноксидазно-ксантиндегидрогеназной системы в механізмі дії ксенобіотиків: Автореф. дис. ... канд. біол. наук.—Київ, 2002.—20 с.
12. Davies K. J. A. Protein damage and degradation by oxygen radicals. I. General aspects // J. Biol. Chem.—1987.—262.—P. 9895—9901.
13. Levine R. L. Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging, and disease // Free Radical Biol. and Med.—2002.—32.—P. 790—796.
14. Pleshakova O. V., Kutsyi M. P., Sukharev S. A. Study of protein carbonyls in subcellular fractions isolated from liver and spleen of old and gamma-irradiated rats // Mech. Ageing Develop.—1998.—103.—P. 45—55.
15. Burcham P. C., Kuhan Y. T. Introduction of carbonyl groups into proteins by the lipid peroxidation product, malondialdehyde // Biochem. and Biophys. Res. Commun.—1996.—220.—P. 996—1001.

УДК 612.015.11-001.28  
Надійшла до редакції 15.04.05