DOI:10.33266/1024-6177-2023-68-5-5-10

С.А. Абдуллаев^{1,4}, Д.В. Салеева¹, М.В. Душенко^{1,2}, Н.Ф. Раева¹, А.И. Абдуллаева¹, Г.Д. Засухина^{1,3}, А.Н. Осипов^{1,2}

ЗАЩИТНЫЕ СВОЙСТВА СОЕДИНЕНИЯ АИКАР *IN VIVO* ПРИ РАДИАЦИОННОМ ВОЗДЕЙСТВИИ

¹ Федеральный медицинский биофизический центр им. А.И. Бурназяна ФМБА России, Москва ² Федеральный исследовательский центр химической физики им. Н.Н. Семенова РАН, Москва

³ Институт общей генетики имени Н.И. Вавилова РАН, Москва

⁴Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино

Контактное лицо: Серажутдин Абдуллаевич Абдуллаев, e-mail: saabdullaev@gmail.com

РЕФЕРАТ

<u>Цель</u>: Исследовать влияние 5-аминоимидазол-4-карбоксамид-рибозы (АИКАР) на выживаемость и на долю полихроматофильных эритроцитов (ПХЭ) костного мозга с микроядрами (МЯ) облученных мышей, а также на пострадиационную экскрецию с мочой внеклеточной ядерной ДНК (вк-яДНК) и митохондриальной ДНК (вк-мтДНК) у крыс.

<u>Материал и методы</u>: В исследовании использовались самцы мышей линии *Balb/c* 2-х месячного возраста и самцы крыс линии *Fisher-344* 3-месячного возраста. Для определения выживаемости мышей облучение рентгеновским излучением проводили в дозе 8 Гр, а для анализа доли ПХЭ с МЯ в клетках костного мозга – в дозе 2 Гр. Крыс подвергали облучению рентгеновским излучением в дозе 5 Гр. АИКАР вводили животным внутрибрюшинно 400 мг/кг на вес тела. Препарат вводили за 30 мин до и через 20 мин после облучения животных. Анализы содержания фрагментов вк-мтДНК и вк-яДНК проводили методом ПЦР в режиме реального времени. <u>Результаты</u>: Результаты исследования показали, что введение АИКАР вызывает статистически значимое повышение выживаемости облучения в летальной дозе. Введение АИКАР до облучения с получения в летальной дозе. Введение АИКАР до облучения с мочой фрагментов вк-яДНК и вк-яДНК у крыс после облучения.

<u>Заключение:</u> Результаты исследований показывают, что соединение АИКАР действует как радиомитигаторный эффектор и способствует активной экскреции ДНК поврежденных клеток из тканей животных в пострадиационный период.

Ключевые слова: рентгеновское излучение, соединение АИКАР, выживаемость, микроядра, внеклеточная ДНК в моче, крысы, мыши

Для цитирования: Абдуллаев С.А., Салеева Д.В., Душенко М.В., Раева Н.Ф., Абдуллаева А.И., Засухина Г.Д., Осипов А.Н. Защитные свойства соединения АИКАР *in vivo* при радиационном воздействии // Медицинская радиология и радиационная безопасность. 2023. Т. 68. № 5. С. 5–10. DOI:10.33266/1024-6177-2023-68-5-5-10

DOI:10.33266/1024-6177-2023-68-5-5-10

S.A. Abdullaev^{1, 4}, D.V. Saleeva¹, M.V. Dushenko^{1, 2}, N.F. Raeva¹, A.I. Abdullaeva¹, G.D. Zasukhina^{1, 3}, A.N. Osipov^{1, 2}

Protective Properties of Compound AICAR in Vivo Exposed to Radiation

¹A.I. Burnazyan Federal Medical Biophysical Center, Moscow, Russia

²N.N. Semenov Federal Research Center for Chemical Physics, Moscow, Russia

³ N.I. Vavilov Institute of General Genetics, Moscow, Russia

⁴ Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Pushchino, Russia

Contact person: S.A. Abdullaev, e-mail: saabdullaev@gmail.com

ABSTRACT

<u>Purpose:</u> To study the effect of 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide (AICAR) on the survival rate of mice and proportion of polychromatophilic erythrocytes (PCE) in the bone marrow cells with micronuclei (MN), as well as post-irradiation urinary excretion of cell-free nuclear DNA (cf-nDNA) and mitochondrial DNA (cf-mtDNA) in rats.

<u>Material and methods</u>: Male *Balb/c* mice aged 2 months and *Fisher-344* male rats aged 3 months were used. To determine the survival rate of mice, X-irradiation was performed at a dose of 8 Gy, and to analysis the proportion of PCE in the bone marrow cells with MN, at a dose of 2 Gy. Rats were X-irradiated at a dose of 5 Gy. AICAR was administered to animals intraperitoneally at a dose of 400 mg/kg. The drug was administered 30 min before and 20 min after irradiation of the animals. The DNA content was measured by real-time PCR.

<u>Results:</u> The results of the study showed that the introduction of AICAR causes a statistically significant increase in the survival rate of irradiated animals. The greatest effect was shown in the group of mice treated with AICAR 20 min after their irradiation at a lethal dose. The introduction of AICAR before irradiation reduces the proportion of PCE with MN by 30 %, and after irradiation – by 70 %, in comparison to the control. AICAR promoted enhanced urinary excretion of cf-nDNA and cf-mtDNA fragments in rats after irradiation.

<u>Conclusion</u>: The results show that AICAR acts as a radiomitigation effector and promotes active DNA excretion of damaged cell from animal tissues in the post-radiation period.

Keywords: X-rays, AICAR, survival rate, micronuclei, cell-free DNA in the urine, rats, mice

For citation: Abdullaev SA, Saleeva DV, Dushenko MV, Raeva NF, Abdullaeva AI, Zasukhina GD, Osipov AN. Protective Properties of Compound AICAR *in Vivo* Exposed to Radiation. Medical Radiology and Radiation Safety. 2023;68(5):5–10. (In Russian). DOI:10.33266/1024-6177-2023-68-5-5-10

Введение

Поиски путей модификации радиочувствительности являются важнейшей фундаментальной проблемой с позиции как снижения последствий воздействия ионизирующих излучений (ИИ) на организм, так и повышения эффективности радиотерапии опухолей. Как известно, радиочувствительность живых организмов в значительной мере определяется активностью эндогенных защитных и репарационных систем. Эффективность функционирования репарационных систем зависит не только от их полноценности, но и от количества индуцируемых повреждений ДНК, их сложности, а также энергообеспеченности развития ответа на повреждение ДНК [1]. Активность систем репарации в клетках млекопитающих контролируется продуктами около 150 генов и множеством некодирующих РНК [2, 3]. В ответ на образование критических повреждений ДНК (двунитевые разрывы (ДР), сшивки ДНК-белок и ДНК-ДНК, кластерные повреждения) в клетках происходит активация и запуск целого каскада многочисленных молекулярно-биохимических процессов. Эти процессы включают в себя конформационные изменения хроматина с участием четырех АТФ-зависимых белковых комплексов ремоделирования, посттрансляционную модификацию гистонов (фосфорилирование, метилирование, ацетилирование, убиквитилирование, сумоилирование и поли-АДФ-рибозилирование) [4, 5]. Активируются различные системы репарации ДНК с участием индуцибельных ферментов, происходят изменения экспрессии более 2000 генов, в том числе, системы контроля точек клеточного цикла (checkpoint) [6–10].

Процесс репарации только одного ДР ДНК требует около 10 тыс. молекул АТФ [11, 12]. Отметим, что только при воздействии редкоионизирующего излучения в дозе 1 Гр в ДНК клетки млекопитающего могут образоваться до 40 ДР. Другим чрезмерно энергозатратным процессом в облученных клетках млекопитающих является поли-АДФ-рибозилирование множества белков посредством поли(АДФ-рибозил)-полимераз (ПАРП). В облученных клетках ПАРП, связываясь в течение 15-30 с с поврежденными участками ДНК, расщепляет субстрат (НАД+) с высвобождением АДФ-рибозы. Последняя, соединяясь с хроматиновыми белками-мишенями, создает на них огромные разветвленные цепочки поли-АДФ-рибозы [13]. При увеличении повреждений ДНК только активации ПАРП могут приводить клетки к гибели в результате их энергетического истощения [14, 15], поскольку на образование одной молекулы НАД+ расходуется четыре молекулы АТФ. АТФ требуется также для реализации программ гибели клеток, «не подлежащих» восстановлению (апоптоза, аутофагии, партанатоза и т.д.). Однако следует иметь в виду, что эти огромные потребности в АТФ возникают в клетках, у которых митохондрии (основной поставщик энергии) подверглись структурно-функциональным нарушениям с возникновением их дисфункций [16].

Из изложенного ясно, что в клетках облученного организма возникают повышенные потребности в энергообеспечении, без которых развитие ответа на повреждения ДНК и функционирования систем репарации ДНК и других восстановительных процессов невозможно.

Известно, что ключевую роль в поддержании энергетического гомеостаза в облученных малыми и сублетальными дозами ИИ клетках играет 5'-АМФ-активируемая протеинкиназа (АМФК). АМФК является полисубъединичным (гетеротримерным) комплексом – главным регулятором клеточного и системного энергетического гомеостаза. Усиленный расход АТФ способствует резкому увеличению соотношения АМФ/АТФ, которое приводит к активации АМФК [17–19]. Таким образом, увеличение концентрации АМФ указывает на энергетическое истощение клетки и является сигналом для активации АМФК. Активированная АМФК вызывает каскад внутриклеточных событий, прежде всего, усиление биогенеза митохондрий, аутофагии, и стимулирует производство энергии.

В ряде исследований показано, что дополнительной активации АМФК и митохондриального биогенеза в клетках удается достичь с помощью фармакологических соединений разного класса [20, 21]. Среди них значительный интерес представляет 5-аминоимидазол-4-карбоксамид-рибоза (АИКАР), аналог АМФ, который транспортируется в клетки и широко используется в экспериментах. Несмотря на то, что молекулярные механизмы действия АИКАР остаются не до конца изучены, известно, что это соединение обладает противовоспалительными, антиоксидантными и антиканцерогенными свойствами [22, 23].

Поэтому в настоящей работе было исследовано влияние соединения АИКАР на выживаемость мышей и долю полихроматофильных эритроцитов (ПХЭ) костного мозга с микроядрами (МЯ) облученных мышей, а также пострадиационную экскрецию с мочой внеклеточной ядерной ДНК (вк-яДНК) и митохондриальной ДНК (вкмтДНК) у крыс.

Материал и методы

В исследовании использованы самцы мышей линии Balb/c 2-х месячного возраста и массой 22-25 г, а также самцы крыс линии Fisher-344 3-месячного возраста и массой 140-150 г, полученных из питомника лабораторных животных «Столбовая», рп Столбовая, р-н Чеховский, Московская область. Все эксперименты с животными проводили в соответствии с Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных и других научных целях, Директивой 2010/63/EU. В ходе эксперимента животные находились в стандартных условиях вивария ФМБЦ им. А.И. Бурназяна. Животных содержали в поликарбонатных клетках на установке ИВК (индивидуальная вентиляция клеток) с подачей стерильного воздуха (Фармбиолайн, Финляндия). Животные были акклиматизированы в течение 1 недели до начала экспериментов. Мышей и крыс кормили стандартным гранулированным кормом для лабораторных животных (ООО «Мест», Москва) для мышей и крыс ad libitum, со свободным доступом к чистой питьевой воде и были размещены по три крысы и по пять мышей в клетках при стандартном 12-часовом цикле свет/темнота при температуре 22 ± 2 °C и при влажности 45 ± 5 %.

Облучение животных проводили в ФМБЦ им. А.И. Бурназяна на рентгеновской биологической установке РУСТ-М1 при напряжении 200 кВ, токе на трубке 2,5 мА, фильтре алюминиевом 1,5 мм. Мощность дозы рентгеновского облучения – 1 Гр/мин.

Мышей (по 5 особей вместе) и крыс (по 3 особи вместе) подвергали облучению в пластиковых контейнерах.

При этом для исследования выживаемости мышей облучение проводили в дозе 8 Гр, а для анализа доли ПХЭ костного мозга с МЯ – в дозе 2 Гр. Крыс подвергали облучению в дозе 5 Гр.

АИКАР (5-аминоимидазол-4-карбоксамид-рибоза) (Merck, Darmstadt, Германия) вводили животным внутрибрюшинно по 400 мг/кг массы тела. Препарат вводили за 30 мин до и через 20 мин после облучения.

Мышей наблюдали в течение 30 дней после облучения, и количество выживших мышей проверялось ежедневно в одно и то же время. Кривые выживания были получены для 30 животных на каждую кривую в каждом независимом эксперименте.

Цитогенетический анализ по определению доли ПХЭ костного мозга с МЯ проводили как было описано ранее [24]. Для проведения анализа мышей облучали в дозе 2 Гр и АИКАР вводили, как указано выше, внутрибрюшинно за 30 мин до и через 20 мин после облучения. В качестве контроля использовали необлученных мышей без введения и с введением АИКАР. Мышей умерщвляли путем цервикальной дислокации через 28 ч после облучения (образцы из контрольной группы также отбирали через 28 ч после введения АИКАР). Красный костный мозг бедренной кости вымывали с помощью фетальной сыворотки крупного рогатого скота. Суспензию центрифугировали в течение 7 мин при 1000 об/мин. После центрифугирования надосадочную жидкость удаляли и клетки повторно ресуспендировали в оставшейся сыворотке. Далее изготовляли мазки по стандартной методике, затем фиксировали их метанолом и проводили окрашивание по Романовскому-Гимзе. От каждой мыши были подготовлены по четыре слайда и, в общей сложности, были подсчитаны около 2000 ПХЭ. Подсчет ПХЭ с МЯ на слайдах осуществляли с помощью светового микроскопа с использованием иммерсионного масла при увеличении х1000.

Сбор мочи у необлученных и облученных крыс с введением АИКАР и без него проводили через 6, 12, 24, 72 ч с момента облучения. Сбор мочи также проводился у этих же крыс до их облучения и до введения им АИКАР (контрольные сборы мочи).

Сбор мочи у крыс проводили индивидуально в специальных метаболических клетках (Hatteras Instruments, США), снабженных стеклянными контейнерами. На дно контейнера вносили 0,5 мл раствора 0,1 М ЭДТА (рН 8,0) и покрывали слоем парафинового масла. Во всех случаях, сбор мочи у каждой крысы проводили в вечернее время, начиная с 18.00 ч при 22 ± 2 °C в течение 5,5-6,0 ч до достижения 5,0 мл объема жидкости в контейнере. Образцы мочи центрифугировали (5000 об/ мин, 10 мин), и супернатант переносили в другую пробирку и замораживали при -20 °C в течение 20-24 ч до начала выделения ДНК. Замороженные образцы мочи перед выделением общей ДНК (мтДНК и яДНК), оттаивали при комнатной температуре, а затем помещали на лед. ДНК выделяли с использованием специальных наборов (Wizard Plus Minipreps DNA Purification System, Promega, США) в соответствии с инструкциями изготовителя. Каждый образец ДНК растворяли в 0,1 мл дистиллированной воды, дополнительно очищенной на миллипоре Ку. Количественное содержание ДНК определяли по реакции с реагентом PicoGreen согласно протоколу производителя (Molecular Probes, Eugene, США) с регистрацией флуоресценции на приборе Tecan Infinite 200 (Austria).

Содержание яДНК и мтДНК определяли методом ПЦР в реальном времени с использованием технологии TaqMan на приборе Prism 7500 (Applied Biosystems,

США). Изменение относительного количества копий мтДНК определяли соотношением между числом копий митохондриального гена *р*РНК и гена GAPDH ядерной ДНК в одной и той же пробирке. Эффективность реакции ПЦР для амплификации яДНК и мтДНК измеряли с использованием стандартных кривых, используя серии разведений с 20, 10, 5, 2, 1, и 0,1 нг общей ДНК печени крыс на реакцию. В качестве основы для количественного анализа числа копий яДНК и мтДНК использовали пороговое значение цикла (Ct). Анализы ПЦР проводили в трех повторностях для каждого образца ДНК. Для амплификации гена 16S pPHK (73 п.о.) мтДНК использовали следующие праймеры: forward-5'-AAT GGT TCG TTT GTT CAA CGA TT-3'; reverse 5'-AGA AAC CGA ССТ GGA TTG CTC-3'; и зонд-R6G-AAG TCC TAC GTG АТС ТGA GTT-RHQ1. Для амплификации гена GAPDH (80 п.н.) яДНК, были использованы следующие праймеры: forward-5'-TGG CCT CCA AGG AGT AAG AAA C-3'; reverse 5'-GGC TCT CTC CTT GCT CTC AGT ATC-3'; и зонд-FAM-CTG GAC CAC CCA GCC CAG CAA-RTQ1. Праймеры и зонды для мтДНК и яДНК были выбраны с использованием базы данных BLAST (http://blast.ncbi. nlm.nih.gov/Blast.cgi), по последовательностям, не допускающих ко-амплификации NUMT-псевдогенов в яДНК. Циклы ПЦР были следующими: 5 мин при 95 °C с последующими 40 циклами (95 °С в течение 30 с, отжиг и удлинение при 60 °С в течение 1 мин).

Статистические различия в экспериментах на выживание между группами мышей сравнивались по методу Каплана–Майера. Различия между данными, полученными до и после обработки крыс, анализировали с помощью теста Манна–Уитни U или непарного t-критерия Стьюдента. Данные представлены в виде средней величины (для 8 животных) и стандартной погрешности среднего значения (\pm SEM). Значение p < 0,05 считалось статистически значимым.

Результаты

На рис. 1 представлены результаты определения пострадиационной выживаемости мышей, облученных рентгеновскими фотонами в летальной дозе (8 Гр). Эти данные показывают, что в группе контрольных мышей, которые получали питьевую воду, средняя продолжительность жизни составила 6 сут, а максимальное время дожития 11 сут. Однако в группах при введении АИКАР мышам за 30 мин до облучения, а также в группах при введении препарата через 20 мин после их облучения, было зарегистрировано достоверное повышение выживаемости этих животных. Наибольшая выживаемость была в группе мышей, получавших АИКАР через 20 мин после их облучения в летальной дозе. Так, на 11-й день после облучения (8 Гр) была 100 % смертность в облученной группе мышей, в то время как в группе мышей, которым вводили АИКАР после облучения, 50 % мышей выживали. В этой группе 35 % мышей выжили на 30-ый день после их облучения.

Анализ доли ПХЭ с МЯ в клетках костного мозга мышей, которым вводили АИКАР до и после их облучения рентгеновскими квантами показал в целом коррелирующие с их выживаемостью результаты (рис. 2). Продемонстрировано, что при введении АИКАР мышам после их облучения отмечается снижение доли ПХЭ с МЯ в клетках костного мозга на 70 %, а при введении до облучения – на 30 % по сравнению с мышами, облученными без введения препарата. Эти данные, как и результаты по определению выживаемости облученных мышей, указывают, что АИКАР действует как пострадиационный митигаторный эффектор. Наличие циркулирующей внеклеточной ДНК (вк-ДНК) в биологических жидкостях млекопитающих, таких как кровь и моча, обусловлено постоянно реализуемой клеточной гибелью в тканях.

На рис. 3 представлены анализы по изменению содержания вк-ДНК в моче у необлученных крыс в разные сроки после введения им АИКАР. Видно, что АИ-КАР вызывает увеличение содержания вк-ДНК в моче крыс. Этот повышенный уровень более выражен для вк-мтДНК и сохраняется в течение 12 ч после введения АИКАР. Статистически значимое повышение вк-яДНК регистрируется только к первому сроку (6 ч) анализов после введения АИКАР. Таким образом, введение АИ-КАР здоровым (необлученным) крысам способствует повышенной экскреции с мочой фрагментов вк-ДНК.

Результаты анализов содержания вк-яДНК и вкмтДНК в моче крыс, собранные (через 6, 12, 24, 72 ч) после их облучения и введения АИКАР (сразу после облучения), представлены на рис. 4. Данные показали, что содержание фрагментов вк-яДНК и вк-мтДНК в моче облученных крыс достоверно повышалось в зависимости от времени сбора мочи после облучения и введения АИКАР. Повышенный уровень содержания вк-яДНК и вк-мтДНК в моче крыс сохранялся в течение 6, 12, 24 ч после их облучения и введения АИКАР. Однако к 72 ч после облучения и введения АИКАР содержание вк-ДНК в моче снижалось до уровня контрольных (необлученных) животных. Больше всего в этих анализах регистрировалось увеличение фрагментов вк-мтДНК в моче облученных крыс, получавших АИКАР. Появление фрагментов вк-ДНК может происходить не только по механизму апоптоза, но и с вовлечением других механизмов клеточной гибели. Известно также, что вк-ДНК в биологических жидкостях зачастую содержится в составе внеклеточных микровезикулярных структур экзосом, апоптотических телец и др. Тем не менее, повышенная экскреция фрагментов вк-мтДНК (по сравнению с вк-яДНК) в моче облученных крыс, получавших АИКАР, скорее всего, является результатом селективного удаления дефектных митохондрий посредством митофагии.

Таким образом, введение АИКАР облученным животным способствует усилению экскреции вк-яДНК и вк-мтДНК с мочой.

Обсуждение

В настоящее время АИКАР рассматривается как метаболический модулятор, точный механизм действия которого в значительной степени остается еще не ясным [25]. Согласно полученным результатам, внутрибрюшинное введение АИКАР мышам до их рентгеновского облучения оказывало менее выраженный радиопротекторный эффект, как по тестам выживаемости, так и по анализу доли ПХЭ с МЯ в клетках костного мозга. Однако АИКАР при введении мышам после их облучения способствует более выраженному повышению выживаемости этих животных, а также снижению доли ПХЭ с МЯ в клетках костного мозга мышей (рис. 1 и 2). Способность АИКАР повышать выживаемость облученных мышей и снижать долю ПХЭ с МЯ в клетках костного мозга, при введении его после облучения животных, указывает, что данное соединение действует как радиомитигатор.

В ряде исследований показано, что при воздействии ИИ на клетки эукариот *in vitro* и при облучении животных в митохондриях, в результате нарушения системы цепи переноса электронов, происходит отсроченная пострадиационная повышенная генерация активных форм



Рис. 1. Влияние АИКАР на выживаемость мышей при введении за 30 мин до и через 20 мин после рентгеновского облучения в дозе 8 Гр





Рис. 2. Доля полихроматофильных эритроцитов (ПХЭ) с микроядрами (МЯ) в клетках костного мозга облученных мышей при введении АИКАР. 1 – контроль; 2 – после введения АИКАР; 3–2 Гр; 4–2 Гр + АИКАР через 20 мин после облучения; 5 – АИКАР за 30 минут до облучения + 2 Гр. Данные представлены в виде средней величины (для 8 животных) и стандартной погрешности среднего значения (± SEM). Статистическая значимость была установлена на уровне $\rho < 0,05$ (**), $\rho < 0,01$ (**), $\rho < 0,05$ считалось статистически значимым различием

Fig. 2. Frequency of micronucleated polychromatic erythrocytes (MNPCE) of bone marrow of irradiated mice administered AICAR. 1 – control; 2 – after AICAR administration; 3–2 Gy; 4–2 Gy + AICAR after 20 min; 5 – AICAR + 2 Gy after 30 min. The data are presented as mean \pm SEM (n = 8). Statistical significance was set at $\rho < 0.05$ (*), $\rho < 0.01$ (**), $\rho < 0.05$ was considered statistically significant

кислорода (АФК), которые вызывают повреждения ядерного генома [26, 27]. Повышенную генерацию АФК в митохондриях облученных клеток можно наблюдать в течение длительного времени. Эти данные предполагают, что воздействие радиации вызывает митохондриальную дисфункцию, которая приводит к пролонгированному производству АФК и снижению синтеза АТФ [28].

Таким образом, поврежденные митохондрии становятся индукторами окислительного стресса, сохраняющегося на длительный пострадиационный период. Ранее было показано, что АИКАР способен снижать окислительный стресс в клетках [29]. АИКАР способствует выживанию нейронов и сохранению зрительной функции, стабилизируя уровни АТФ [30].

С другой стороны, снижение генерации АФК, вызываемое АИКАР, сопровождается также снижением повреждений ДНК, включая накопление двунитевых разрывов ДНК и мутаций [31].

Таким образом, АИКАР в клетках организма животных, облученных ионизирующей радиацией, по всей видимости, действует аналогично митохондриальнонаправленным соединениям, подавляющим пострадиационную генерацию АФК, способствующим снижению повреждений ядерного генома и повышению выживаемости животных.

Однако анализы по определению фрагментов вк-яДНК и вк-мтДНК в моче крыс, которые характеризуют активность клеточной гибели в тканях облученных животных, вопреки ожиданиям, дали иные результаты.

Если АИКАР оказывает радиомитигаторный эффект как по выживаемости мышей, так и по снижению доли ПХЭ с МЯ в клетках костного мозга, то можно было ожидать снижения экскреции вк-ДНК, как результат снижения клеточной гибели в тканях облученных животных. Однако, наоборот, было показано, что при введении АИ-КАР животным после их облучения регистрируется повышенная экскреция фрагментов вк-яДНК и вк-мтДНК с мочой (рис. 4). Причем введение АИКАР необлученным (контрольным) крысам также приводит к небольшому, но статистически значимому увеличению вк-ДНК в их моче. Особенно это проявляется по вк-мтДНК (рис. 3). Наблюдаемое увеличение вк-ДНК в моче крыс после введения АИКАР вряд ли обусловлено дополнительным усилением радиационно-индуцированной клеточной гибелью, поскольку в данных условиях наблюдалось, что АИКАР способствует повышению выживаемости и снижению доли ПХЭ с МЯ в клетках костного мозга облученных мышей.

В настоящее время известно, что АИКАР не только блокирует повышенную генерацию АФК в поврежденных митохондриях, но и способствует активации АМФК [32, 33].

Важнейшей причиной активации АМФК в облученных клетках может являться увеличение содержания АМФ и уменьшение пула молекул АТФ в результате ее расхода и нарушения ее синтеза в митохондриях клеток облученных животных [34]. Можно предполагать, что АИКАР, активируя АМФК, стимулирует биогенез митохондрий посредством ко-активаторов PGC-1α [35], сопровождаемый удалением посредством митофагии поврежденных или нефункциональных органелл, для восстановления здоровой популяции митохондрий в клетках [36]. Наблюдаемое увеличение вк-ДНК в моче, возможно, сопряжено с элиминацией поврежденных клеток посредством аутофагических механизмов. Повышенный уровень мтДНК явно обусловлен активацией митофагии [37]. АИКАР, возможно, активирует удаление из тканей больше поврежденных клеток, которые могут являться потенциальными для злокачественной трансформации или развития иной патологии.

Заключение

Результаты исследований свидетельствуют, что препарат АИКАР проявляет выраженный радиозащитный эффект, однако для выяснения механизмов его действия требуется проведение дополнительных исследований.



Рис. 3. Содержание вк-ДНК выделенной из образцов мочи необлученных крыс, собранных до введения АИКАР и через 6, 12, 24, 72 ч после введения АИКАР, (100%, контроль – К, до введения АИКАР). А – вк-яДНК; Б – вк-мтДНК. Данные представлены в виде средней величины (для 8 животных) и стандартной погрешности среднего значения (± SEM). Статистическая значимость была установлена на уровне $\rho < 0,05$ (*), $\rho < 0,01$ (**), $\rho < 0,05$ считалось статистически значимым различием

Fig. 3. Content of cf-DNA extracted from the samples of the urine of nonirradiated rats, collected prior to administration of AICAR and after 6, 12, 24, 72 h following administration of AICAR (100%, C-control, prior to AICAR administration). The data are presented as mean \pm SEM (n = 8). Statistical significance was set at $\rho < 0.05$ (*), $\rho < 0.01$ (**), $\rho < 0.05$ was considered statistically significant



Рис. 4. Содержание фрагментов вк-ДНК в моче крыс при введении АИКАР сразу после облучения (сбор мочи через 6, 12, 24, 72 ч после облучения). А – вк-яДНК; Б – вк-мтДНК. Данные представлены в виде средней величины (для 8 животных) и стандартной погрешности среднего значения (± SEM), *ρ* <0,05 (*) считалось статистически значимым различием

Fig. 4. Quantity of cf-DNA in the urine of rats which were administered AICAR immediately after irradiation (urine collection 6, 12, 24, 72 h following irradiation). A – cf-nDNA, B – cf-mtDNA. The data are presented as mean \pm SEM (n = 8), $\rho < 0.05$ (*) was considered statistically significant

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ / REFERENCES

- Jackson S.P., Bartek J. The DNA-Damage Response in Human Biology and Disease. Nature. 2009;461;7267:1071-1078. doi: 10.1038/ nature08467.
- Iyama T., Wilson D.M., 3rd. DNA Repair Mechanisms in Dividing and Non-Dividing Cells. DNA Repair (Amst). 2013;12;8:620-636. doi: 10.1016/j.dnarep.2013.04.015.
- Wan G., Liu Y., Han C., Zhang X., Lu X. Noncoding RNAs in DNA Repair and Genome Integrity. Antioxid Redox Signal. 2014;20;4:655-677. doi: 10.1089/ars.2013.5514.
- Clapier C.R., Cairns B.R. The Biology of Chromatin Remodeling Complexes. Annu. Rev. Biochem. 2009;78:273-304. doi: 10.1146/annurev.biochem.77.062706.153223.
- House N.C., Koch M.R., Freudenreich C.H. Chromatin Modifications and DNA Repair: Beyond Double-Strand Breaks. Front. Genet. 2014;5:296. doi: 10.3389/fgene.2014.00296.
 Christmann M., Kaina B. Transcriptional Regulation of Human DNA
- Christmann M., Kaina B. Transcriptional Regulation of Human DNA Repair Genes Following Genotoxic Stress: Trigger Mechanisms, Inducible Responses and Genotoxic Adaptation. Nucleic Acids Res. 2013;41;18:8403-8420. doi: 10.1093/nar/gkt635.
- Ding L.H., Shingyoji M., Chen F., Hwang J.J., Burma S., Lee C., et al. Gene Expression Profiles of Normal Human Fibroblasts after Exposure to Ionizing Radiation: A Comparative Study of Low and High Doses. Radiat. Res. 2005;164;1:17-26. doi: 10.1667/rr3354.
- Finn K., Lowndes N.F., Grenon M. Eukaryotic DNA Damage Checkpoint Activation in Response to Double-Strand Breaks. Cell. Mol. Life Sci. 2012;69;9:1447-1473. doi: 10.1007/s00018-011-0875-3.
- Lim S., Kaldis P. Cdks, Cyclins and CKIs: Roles Beyond Cell Cycle Regulation. Development. 2013;140;15:3079-3093. doi: 10.1242/ dev.091744.
- Nosel I., Vaurijoux A., Barquinero J.F., Gruel G. Characterization of Gene Expression Profiles at Low and Very Low Doses of Ionizing Radiation. DNA Repair (Amst). 2013;12;7:508-517. doi: 10.1016/j. dnarep.2013.04.021.
- Bonner W.M., Redon C.E., Dickey J.S., Nakamura A.J., Sedelnikova O.A., Solier S., et al. GammaH2AX and Cancer. Nat. Rev. Cancer. 2008;8;12:957-967. doi: 10.1038/nrc2523.
- Hoeijmakers J.H. DNA Damage, Aging, and Cancer. N. Engl. J. Med. 2009;361;15:1475-1485. doi: 10.1056/NEJMra0804615.
- Caldecott K.W. Protein ADP-Ribosylation and the Cellular Response to DNA Strand Breaks. DNA Repair (Amst). 2014;19:108-113. doi: 10.1016/j.dnarep.2014.03.021.
- Andrabi S.A., Umanah G.K., Chang C., Stevens D.A., Karuppagounder S.S., Gagne J.P., et al. Poly(ADP-ribose) Polymerase-Dependent Energy Depletion Occurs Through Inhibition of Glycolysis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2014;111;28:10209-10214. doi: 10.1073/ pnas.1405158111.
- David K.K., Andrabi S.A., Dawson T.M., Dawson V.L. Parthanatos, a Messenger of Death. Front. Biosci. (Landmark Ed). 2009;14;3:1116-1128. doi: 10.2741/3297.
- 16. Газиев А.И. пути сохранения целостности митохондриальной днк и функций митохондрий в клетках, подвергшихся воздействию ионизирующей радиации // Радиационная биология. Радиоэкология. 2013. Т.53, № 2. С. 117-136. doi: 10.7868/s0869803113020045. [Gaziev A.I. Pathways for Maintenance of Mitochondrial DNA Integrity and Mitochondrial Functions in Cells Exposed to Ionizing Radiation. *Radiatsionnaya Biologiya. Radioekologiya* = Radiation Biology. Radioecology. 2013;53;2:117-136. doi: 10.7868/s0869803113020045. (In Russ.)].
- Hardie D.G. AMP-Activated Protein Kinase: Maintaining Energy Homeostasis at the Cellular and Whole-Body Levels. Annu. Rev. Nutr. 2014;34:31-55. doi: 10.1146/annurev-nutr-071812-161148.
- Oakhill J.S., Steel R., Chen Z.P., Scott J.W., Ling N., Tam S., et al. AMPK Is a Direct Adenylate Charge-Regulated Protein Kinase. Science. 2011;332;6036:1433-1435. doi: 10.1126/science.1200094.
- Wang Z., Liu P., Chen Q., Deng S., Liu X., Situ H., et al. Targeting AMPK Signaling Pathway to Overcome Drug Resistance for Cancer Therapy. Curr. Drug. Targets. 2016;17;8:853-864. doi: 10.2174/13894 50116666150316223655.

- Kim H.J., Kim Y.J., Seong J.K. AMP-Activated Protein Kinase Activation in Skeletal Muscle Modulates Exercise-Induced Uncoupled Protein 1 Expression in Brown Adipocyte in Mouse Model. J. Physiol. 2022;600;10:2359-2376. doi: 10.1113/JP282999.
- Si W., Xie Y., Dong J., Wang C., Zhang F., Yue J., et al. AMPK Activation Enhances Neutrophil's Fungicidal Activity in Vitro and Improves the Clinical Outcome of Fusarium Solani Keratitis in Vivo. Curr. Eye Res. 2022;47;8:1131-1143. doi: 10.1080/02713683.2022.2078494.
- Tripathi V., Jaiswal P., Assaiya A., Kumar J., Parmar H.S. Anti-Cancer Effects of 5-Aminoimidazole-4-Carboxamide-1-beta-D-Ribofuranoside (AICAR) on Triple-negative Breast Cancer (TNBC) Cells: Mitochondrial Modulation as an Underlying Mechanism. Curr. Cancer Drug. Targets. 2022;22;3:245-256. doi: 10.2174/15680096226662202 07101212.
- Wu Y., Duan X., Gao Z., Yang N., Xue F. AICAR Attenuates Postoperative Abdominal Adhesion Formation by Inhibiting Oxidative Stress and Promoting Mesothelial Cell Repair. PLoS One. 2022;17;9:e0272928. doi: 10.1371/journal.pone.0272928.
- Schmid W. The Micronucleus Test. Mutat. Res. 1975;31;1:9-15. doi: 10.1016/0165-1161(75)90058-8.
- Visnjic D., Lalic H., Dembitz V., Tomic B., Smoljo T. AICAr, a Widely Used AMPK Activator with Important AMPK-Independent Effects: A Systematic Review. Cells. 2021;10;5. doi: 10.3390/cells10051095.
- Kobashigawa S., Kashino G., Suzuki K., Yamashita S., Mori H. Ionizing Radiation-Induced Cell Death is Partly Caused by Increase of Mitochondrial Reactive Oxygen Species in Normal Human Fibroblast Cells. Radiat. Res. 2015;183;4:455-464. doi: 10.1667/RR13772.1.
 Zhang B., Davidson M.M., Zhou H., Wang C., Walker W.F., Hei
- Zhang B., Davidson M.M., Zhou H., Wang C., Walker W.F., Hei T.K. Cytoplasmic Irradiation Results in Mitochondrial Dysfunction and DRP1-Dependent Mitochondrial Fission. Cancer Res. 2013;73;22:6700-6710. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-13-1411.
- Azzam E.I., Jay-Gerin J.P., Pain D. Ionizing Radiation-Induced Metabolic Oxidative Stress and Prolonged Cell Injury. Cancer Lett. 2012;327;1-2:48-60. doi: 10.1016/j.canlet.2011.12.012.
- Kawashima H., Ozawa Y., Toda E., Homma K., Osada H., Narimatsu T., et al. Neuroprotective and Vision-Protective Effect of Preserving ATP Levels by AMPK Activator. FASEB J. 2020;34;4:5016-5026. doi: 10.1096/fj.201902387RR.
- Habib S.L., Yadav A., Kidane D., Weiss R.H., Liang S. Novel Protective Mechanism of Reducing Renal Cell Damage in Diabetes: Activation AMPK by AICAR Increased NRF2/OGG1 Proteins and Reduced Oxidative DNA Damage. Cell. Cycle. 2016;15;22:3048-3059. doi: 10.1080/15384101.2016.1231259
- Krishnan U.A., Viswanathan P., Venkataraman A.C. AMPK Activation by AICAR Reduces Diet Induced Fatty Liver in C57BL/6 Mice. Tissue Cell. 2023;82:102054. doi: 10.1016/j.tice.2023.102054.
- Pyla R., Hartney T.J., Segar L. AIČAR Promotes Endothelium-Independent Vasorelaxation by Activating AMP-Activated Protein Kinase Via Increased ZMP and Decreased ATP/ADP Ratio in Aortic Smooth Muscle. J. Basic. Clin. Physiol. Pharmacol. 2022;33;6:759-768. doi: 10.1515/jbcpp-2021-0308.
- Sanli T., Steinberg G.R., Singh G., Tsakiridis T. AMP-Activated Protein Kinase (AMPK) Beyond Metabolism: A Novel Genomic Stress Sensor Participating in the DNA Damage Response Pathway. Cancer Biol. Ther. 2014;15;2:156-169. doi: 10.4161/cbt.26726.
- Hinkle J.S., Rivera C.N., Vaughan R.A. AICAR Stimulates Mitochondrial Biogenesis and BCAA Catabolic Enzyme Expression in C2C12 Myotubes. Biochimie. 2022;195:77-85. doi: 10.1016/j.biochi.2021.11.004.
- Dombi E., Mortiboys H., Poulton J. Modulating Mitophagy in Mitochondrial Disease. Curr. Med. Chem. 2018;25;40:5597-5612. doi: 10.2 174/0929867324666170616101741.
- Yamano K., Matsuda N., Tanaka K. The Ubiquitin Signal and Autophagy: an Orchestrated Dance Leading to Mitochondrial Degradation. EMBO Rep. 2016;17;3:300-316. doi: 10.15252/embr.201541486.
- Tripathi A., Scaini G., Barichello T., Quevedo J., Pillai A. Mitophagy in Depression: Pathophysiology and Treatment Targets. Mitochondrion. 2021;61:1-10. doi: 10.1016/j.mito.2021.08.016.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. Финансирование. Работа выполнена по теме ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна «Технология-3» (госзадание №123011300105-3). Участие авторов. Статья подготовлена с равным участием авторов. Поступила: 20.04.2023. Принята к публикации: 27.05.2023.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest. **Financing.** The work was carried out on the topic of the A.I. Burnazyan Federal State Budgetary Research Center «Technology-3» (state task No. 123011300105-3).

Contribution. Article was prepared with equal participation of the authors. **Article received:** 20.04.2023. Accepted for publication: 27.05.2023.