

Активация вільнорадикальних процесів як фактор порушення скорочувальної активності судинної стінки під дією іонізуючої радіації

Изучено действие ионизирующего облучения источником ^{137}Cs (1, 2 и 4 Гр) на активность свободнорадикальных процессов в плазме, форменных элементах крови и ткани стенки аорты и на характер сократительных сосудистых реакций кольцевых сегментов грудной части аорты и сонной артерии кролика. Показано, что уже на 7-е сутки после облучения (1 Гр) параллельно с ослаблением защитных антиоксидантных механизмов возникает тенденция к уменьшению эндотелийзависимых и эндотелийнезависимых дилататорных и увеличению констрикторных реакций сосудистой стенки. С увеличением дозы ионизирующего облучения до 2 и 4 Гр наблюдалось значительное ослабление эндотелийзависимых дилататорных реакций, уменьшение расслабления гладкомышечных клеток на прямое действие нитроглицерина и повышение чувствительности сосудистых препаратов к констрикторным влияниям на фоне нарастания активации свободнорадикальных процессов. Уже в начальный период последействия ионизирующего облучения развиваются изменения функциональных свойств сосудистой стенки, причем радиационное поражение затрагивает эндотелиоциты и гладкомышечные клетки сосудов. Наличие четкой корреляции изменений реактивности сосудистой стенки и состояния свободнорадикальных процессов позволяет предположить ведущую роль последних как фактора нарушений функциональных свойств сосудов при действии ионизирующей радиации.

Вступ

Радіаційні ураження навіть малими дозами можуть спричинити серйозні метаболічні розлади в організмі. Одним із основних показників порушення життєдіяльності є зміна інтенсивності вільнорадикального окислення, що може викликати порушення функціональної активності біомембран або навіть їх структурної цілості. Клінічні спостереження свідчать, що після іонізуючого опромінення організму радіаційні ушкодження торкаються всіх ланок серцево-судинної системи та її регуляторного апарату [2]. Проте, до цього часу майже зовсім немає відомостей про зв'язки вільнорадикального окислення зі змінами реактивності судинної стінки (включаючи регуляторні властивості ендотелію), що значною мірою обумовлюють функціональний стан системи кровообігу.

Відомо, що реактивність судинної стінки в основному визначається високими секреторними властивостями ендотелію та його здатністю у відповідь на дію фізіологічно активних речовин продукувати хімічні фактори, які розслаблюють або тонізують гладком'язеві клітини судин. До таких факторів належить і так званий ендотелійзалежний фактор розслаблення, під впливом якого значно обмежується базальний тонус судин і значно пригнічуються констрикторні реакції [7, 9]. Пошкодження або патологічні зміни ендотелію призводять до суттєвих порушень реактивності судинної стінки [3, 7]. Численні морфологічні дослідження показали, що іонізуюча радіація проявляє виражену дію на клітини ендотелію, призводячи до структурно-функціональних змін, або навіть до порушення цілості ендотеліального шару [2, 11]. В той же час практично немає даних про зв'язок радіаційного

ушкодження ендотелію зі зміною реактивності судинної стінки та активністю вільнорадикальних процесів за умов іонізуючого опромінювання, а також відомостей про вплив радіації на модулюючі властивості ендотелію. Саме це визначило мету наших досліджень.

Методика

Експерименти провадилися на дорослих кроликах 4 груп (по 5 тварин в кожній групі). Перша група була контрольною, тварин інших груп піддавали одноразовому загальному іонізуючому опромінюванню джерелом ^{137}Cs (1, 2 та 4 Гр, потужність дози — 0,307 Гр/хв). Досліди провадили на 7-у добу після опромінювання, оскільки приблизно в цей час спостерігалися найбільш виражені зміни показників умовнорефлекторної поведінки тварин [1]. Об'єктом дослідження були кільцеві сегменти грудної частини аорти та сонної артерії кролика. Скорочувальну активність судинних сегментів реєстрували в ізометричному режимі. Препарати перфузували термостатованим та оксигенованим стандартним розчином Кребса. Скорочувальну активність судинного препарату тестували за допомогою ряду фармакологічних речовин (норадреналіну, хлористого калію, ацетилхоліну, нітрогліцерину, ізопреналіну, А-23187), які діють на різні структури судинної стінки. Тестуючі речовини використовували в концентрації 10^{-5} моль/л, крім А-23187, який використовували в концентрації 10^{-6} моль/л та хлористого калію — 60 ммоль/л. Активність вільнорадикальних процесів у плазмі, формених елементах крові та тканинній стінці аорти визначали за допомогою стандартної методики хемілюмінесценції на хемілюмінометрі ХЛМ 1Ц-01 [5]. Отримані результати обробляли статистично з використанням критерію t Стюдента.

Результати та їх обговорення

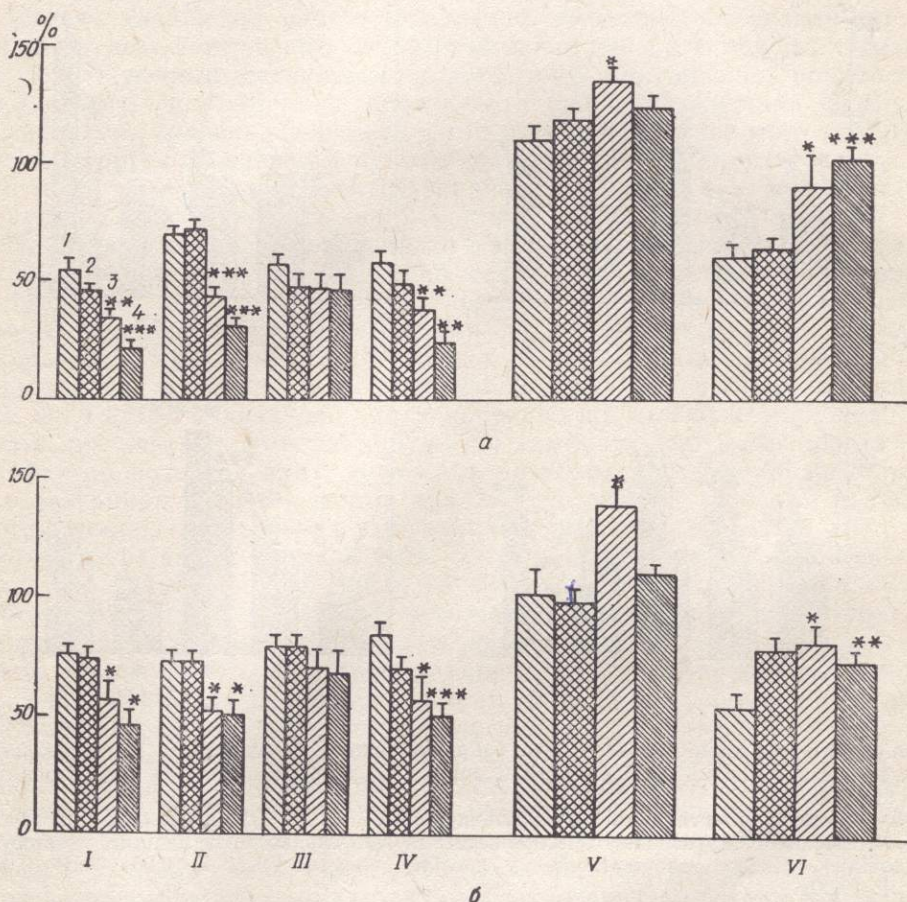
Враховуючи, що судинні кільцеві сегменти аорти та сонної артерії в вихідному стані мають слабо виражений базальний тонус [7], дослідження ділататорних реакцій провадили на фоні попереднього скорочення судинних гладком'язевих клітин, викликаного фенілефріном (10^{-6} моль/л) — агоністом α_1 -адренорецепторів. Всі наведені нижче судинні реакції нормовані відносно визваної дією фенілефрину констрикторної реакції, яку приймали за 100 %, і виражені у відсотках. Така процедура здається правомочною, оскільки, як показали наші попередні дослідження, амплітуда фенілефрінового скорочення достовірно не змінюється при іонізуючому опромінюванні тварин аж до дози 4 Гр.

Отримані результати свідчать про те, що вже на 7-у добу після опромінювання дозою 1 Гр виникає достатньо стійка тенденція до порушення функціонального стану судинного ендотелію, яка проявляється в зменшенні ендотелійзалежного розслаблення у відповідь на ацетилхолін та А-23187 в аорті і сонній артерії (мал. 1, а, б). Реакція ж судинної стінки у відповідь на нітрогліцерин, який має пряму ендотелійнезалежну вазоділататорну дію на м'язеві клітини, істотно не змінювалася. Розслаблення м'язових препаратів аорти і сонної артерії, викликане ізопреналіном, також достовірно не змінювалося (див. мал. 1, а, б). Не відмічено й істотних змін скорочувальності судинної стінки при констрикторних впливах (див. мал. 1, а, б), що вказує на незмінність чутливості рецепторного (реакція на норадреналін) і скорочувального (реакція на гіперкалієвий розчин) апаратів гладком'язевих судинних клітин за цих умов.

Проте вже за такої дози зареєстровані значні порушення балансу між активністю про- й антиоксидантних систем. Відмічено істотний приріст спонтанної хемілюмінесценції в плазмі крові (в середньому на 50 %) та, особливо, у стінці аорти (на 90 %), що свідчить про значне нагромадження в них вільнорадикальних сполук (мал. 2, а, б). В усіх вивчених об'єктах спостерігалось значне достовірне наростання макси-

мальної інтенсивності індукованої хемілюмінесценції (на 63 % — в сироватці крові, на 105 % — в еритроцитах та на 79 % — у стінці аорти), що вказує на накопичення або зростання біодоступності субстрату перекисного окислення, найімовірніше гідроперекисів ліпідів (див. мал. 2, а — г).

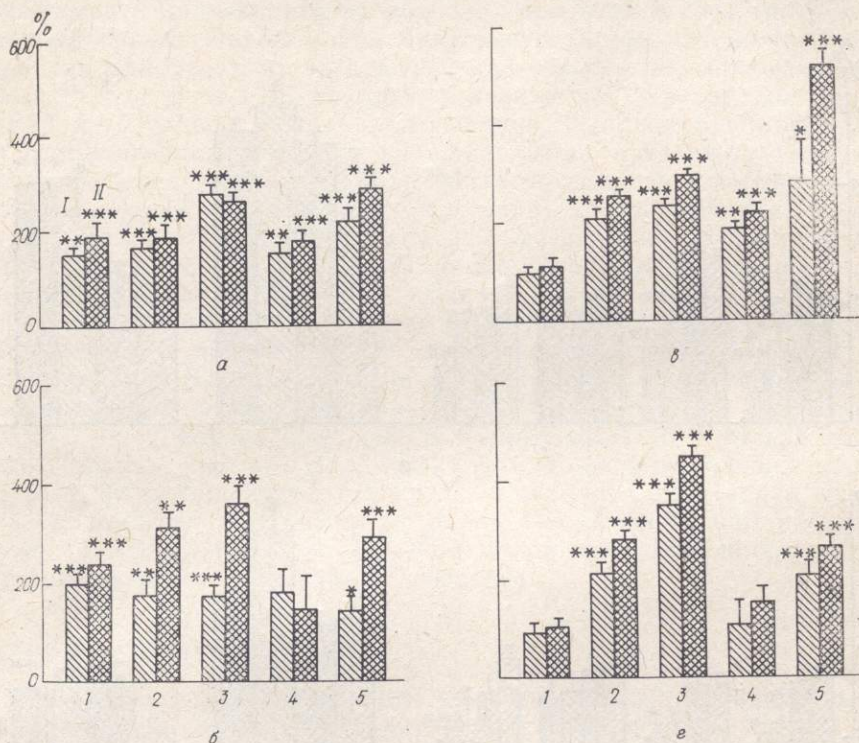
Швидкість падіння індукованої хемілюмінесценції значно зростала (на 50 % — у плазмі крові, на 80 % — у тромбоцитах, на 12 % — в



Мал. 1. Вплив ацетилхоліну (I), нітрогліцерину (II), ізопреналіну (III), А-23287 (IV), а також норадреналіну (V) і гіперкалієвого розчину (VI, 60 ммоль/л) на відносну інтенсивність судинних реакцій (% норми) сегмента аорти (а) та сонної артерії (б), кролика в нормі (I) і під впливом іонізуючого опромінювання (2, 3, 4 — 1, 2, 4 Гр відповідно). Число спостережень у кожному досліді складає 14. За 100% прийняте скорочення, викликане дією фенілефрину. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

еритроцитах та на 36 % у стінці аорти), й міра приросту досить чітко корелювала з наростанням максимуму індукованого світіння (див. мал. 2, а — г). Це дозволяло оцінювати збільшення швидкості інактивації перекисного окислення не як наслідок підвищення потужності антиоксидантних систем, а як результат їхньої активації великою кількістю вільних радикалів. В результаті, незважаючи на велику швидкість падіння інтенсивності викликаного хемілюмінесценції, мінімальне її значення залишалося достовірно значно підвищеним (на 180 % — у плазмі крові, на 130 % — у тромбоцитах, на 250 % — в еритроцитах та 78 % — у стінці аорти). Поєднання цих змін призводило до того, що світлосума значно збільшувалася, перевищуючи нормальні значення викликаного хемілюмінесценції на 120 % — у плазмі крові, на 180 % — у тромбоцитах, на 105 % — в еритроцитах та на 43 % — у стінці аорти (див. мал. 2, а — г).

Із збільшенням дози опромінювання зміни скорочувальної активності судинної стінки для ендотелійзалежних ділататорних впливів наростали майже лінійно та набували достовірності. Так, розслаблення судинних препаратів тварин, опроміненних дозами 2 та 4 Гр, у відповідь на дію ацетилхоліну та А-23187 було зменшено в аорті і сонній артерії (див. мал. 1, а, б). Разом з тим ділататорні реакції аорти та сонної артерії на ізопреналін за цих умов трохи зменшувалися, однак,



Мал. 2. Вплив радіації (I, II — 1 та 4 Гр відповідно) на активність вільнорадикальних процесів у плазмі крові (а), стінці аорти (б), у тромбоцитах (в) та еритроцитах (г) кролика :

I—5 — відносна інтенсивність (% норми, прийнятої за 100 %) спонтанної, максимальної, мінімальної індукованої хемілюмінесценції та швидкості її падіння, світлосуми відповідно. Число спостережень у досліді складає 10. * $P < 0,05$; ** $P < 0,001$; *** $P < 0,001$.

як і в разі опромінювання дозою 1 Гр, зміни реактивності судинної стінки не були достовірними. При опромінюванні дозами 2 та 4 Гр розслаблення судинних препаратів, викликане нітрогліцерином, ставало достовірно меншим (див. мал. 1, а, б), що свідчить про пошкодження м'язових клітин, яке починається при таких дозах.

При підвищених дозах опромінювання зміни активності вільнорадикальних процесів прогресували. В середньому на 90 % збільшилася спонтанна хемілюмінесценція плазми крові та на 140 % — тканини стінки аорти, з'явилася тенденція до наростання спонтанного світіння в тромбоцитах та еритроцитах. До 80 % зверх нормального значення збільшився пік індукованої хемілюмінесценції в плазмі крові, до 150 % — у тромбоцитах, до 180 % — в еритроцитах та до 218 % — у тканині стінки аорти. Спостерігалось також і прогресуюче збільшення швидкості падіння індукованої хемілюмінесценції (на 75 % — у плазмі крові, на 115 % — у тромбоцитах, на 55 % — в еритроцитах). Подібна реакція не спостерігалася в тканині стінки аорти, що свідчить про виражене виснаження її антиоксидантних можливостей. Мінімальне значення хемілюмінесценції та світлосума також збільшувалися у всіх тканинах, що свідчить про значне переважання потужності прооксидантних систем над антиоксидантними (див. мал. 2, а — г).

Внаслідок, мабуть, значної біодоступності основного субстрату перекисного окислення — ненасичених жирних кислот — плазма крові являється основною мішенню для дії радіації, і в ній перш за все відбувається виснаження систем антиоксидантного захисту та зростання базального рівня вільнорадикальних продуктів. Менш зрозуміла причина раннього залучення судинної стінки в вільнорадикальне окислення навіть при відносно малих дозах опромінювання; можливо, це є наслідком слабкості антиоксидантного захисту її тканини.

Істотне зменшення ендотеліязалежних ділататорних реакцій при збільшенні дози іонізуючого опромінювання може бути пов'язане, мабуть, із слідуючими механізмами променевого ушкодження: порушенням здатності ендотеліоцитів продукувати ендотеліязалежний фактор розслаблення, модифікацією механізмів передачі модулюючого впливу цього фактору, пригніченням чутливості рецепторного апарату ендотеліоцитів до стимулюючих агентів, зниженням чутливості м'язевих клітин судин до ендотеліязалежного фактору розслаблення.

Припускаючи, що нітропрепарати і ендотеліязалежний фактор розслаблення мають загальний кінцевий механізм дії — активацію розчинної ізоформи мембранної гуанілатциклази, найімовірнішим здається останній механізм, оскільки не залежне від ендотелію розслаблення у відповідь на нітрогліцерин зменшується зі збільшенням дози фактично паралельно зі зменшенням ендотеліязалежних реакцій на ацетилхолін та А-23187. Однак слід мати на увазі, що кількісне порівняння ефектів цих речовин дозволяє оцінювати здатність ендотелію продукувати фактор розслаблення і чутливість до нього м'язевих клітин тільки за звичайних умов. Ця форма аналізу стає некоректною при радіаційному впливі, оскільки для здійснення прямої розслаблюючої дії органічних нітратів на гладком'язеві клітини необхідна участь білків, що містять сульфгідрильні групи. Їх виснаження при довготривалому застосуванні нітропрепаратів і пояснює виникаючу при цьому толерантність, та остання може бути усунена цистеїном, глутатіоном та іншими тіолами [10]. Після радіаційного впливу внутрішньоклітинні запаси тіолів швидко виснажуються, так як вони є сильними акцепторами вільних радикалів [4], і тому пригнічення ділататорної дії нітрогліцерину не можна розглядати як показник порушеної реактивності судинної стінки. Більш того, про збереження здатності судин до розслаблення, викликаного активацією рецепторів, свідчать результати тестування ізопреналіном, вираженість ефекту якого практично не змінювалася у опроміненіх тварин. Це дозволяє зробити висновок, що іонізуюче опромінювання призводить до виражених порушень функціональних властивостей судин за рахунок змін, що розвиваються головним чином або в ендотелію, або в механізмах передачі його модулюючої дії на м'язеві клітини, тоді як скорочувальні властивості гладких м'язів, здається, не підпадають під радіаційний вплив. Ці зміни в ендотелію є наслідком активації в ньому вільнорадикальних процесів і впливу продуктів перекисного окислення ліпідів з боку крові та її формених елементів.

При опромінюванні тварин дозами 2 та 4 Гр констрикторні судинні реакції, на відміну від ділататорних, значно зростали. Істотно збільшувалося скорочення судинних препаратів аорти і сонної артерії у відповідь на дію гіперкалієвого розчину та норадреналіну (див. мал. 1, а, б). Однією з причин підвищення чутливості судинної стінки до констрикторних впливів за умов високих доз іонізуючого опромінювання може бути пригнічення спонтанного звільнення ендотеліязалежного фактору розслаблення або послаблення його впливу [6]. Крім того, збільшення скорочення у відповідь на підвищену концентрацію калію може бути пов'язане зі зменшенням чутливості гладком'язевих клітин до фактору, що виділяється при деполяризації гіперкалієвим розчином мембрани ендотеліоцитів, однак слід зауважити, що таке значне збільшення калієвого скорочення важко пояснити дією тільки цих двох факторів. Посилення ефективності впливу норадреналіну на судинну стінку де-

якою мірою може бути пов'язане з послабленням ендотеліязалежної частини реакції, обумовленої активацією α_2 -адренорецепторів ендотеліоцитів [12].

Необхідно підкреслити, що вже при дозі опромінювання 4 Гр, як можна бачити на мал. 1, а, б, відбувається достовірне по відношенню до дози 2 Гр зменшення констрикторної норадреналінової реакції. Можливо, що за таких умов радіаційне ураження пригнічуюче діє на рецепторний апарат гладком'язевих клітин кровоносних судин.

І, нарешті, звертає на себе увагу той факт, що в залежності від типу судин (грудна аорта чи сонна артерія) виявляється різна міра пригнічення ендотеліязалежних ділататорних реакцій за умов іонізуючого опромінювання. Так, у сегментах сонної артерії вона була меншою, ніж у сегментах грудної аорти. Можливо, це пов'язано з різною вираженістю функціональної активності ендотеліоцитів судинної стінки двох типів судин [8].

Таким чином, отримані результати свідчать про те, що вже на 7-у добу після опромінення розвиваються зміни функціональних властивостей судинної стінки, які корелюють з підвищенням активності вільнорадикальних процесів, причому радіаційне ураження торкається ендотеліоцитів і гладком'язевих судинних клітин. Ці зміни за рядом показників мають характер тенденції при «малій» дозі (1 Гр) та набувають істотної виразності та достовірності при більш значних дозах.

*S. M. Tishkin, V. M. Taranenko, M. I. Rudnev, G. S. Voronkov,
G. I. Plyushch, I. M. Isaechkina, L. M. Popova, V. V. Bratus*

ACTIVATION OF FREE-RADICAL PROCESSES AS A FACTOR OF IONIZING RADIATION-INDUCED ALTERATIONS IN CONTRACTILE ACTIVITY OF A VASCULAR WALL

The influence of ionizing irradiation (1, 2 and 4 Gy ^{137}Cs) on both the activity of free-radical processes in plasma, formed elements and aorta wall as well as on the character of contractile vascular reactions of isolated rings of thoracic aorta and carotid artery in rabbits has been studied. The experiments were carried out on the 7th day after the whole-body irradiation. The results indicate that simultaneously with the weakening of antioxidant mechanisms both endothelium-dependent and endothelium-independent vascular wall relaxation slightly decreases after 1 Gy exposure. Noradrenaline and KCl-induced contraction is shown to increase. However, these changes are not statistically significant. Irradiation in dose of 2 and 4 Gy considerably decreases endothelium-dependent relaxation. Nitroglycerine-induced relaxation greatly diminishes, KCl- and noradrenaline-induced constriction considerably increases in these conditions. The level of activation of free-radical processes considerably increases too. Thus, already on the 7th day after irradiation significant changes in reactivity of vascular wall are developed. Radiation injures both endothelium and vascular smooth muscle cells. The free-radical processes seem to be the main cause of radiation vascular damage, so there is a pronounced correlation between the changes of vascular contractile properties and the degree of activation of these processes.

Ukrainian Research Institute
of Cardiology, Kiev

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Варецкий В. В., Руднев М. И., Дегтярь В. Н., Решодько Т. Л. Комбинированное воздействие гамма- и СВЧ-излучений на условнорефлекторное поведение крыс // Радиобиология. — 1991. — 31, вып. 2. — С. 246—251.
2. Воробьев В. И., Степанов Р. П. Ионизирующее излучение и кровеносные сосуды. — Москва: Энергоатомиздат, 1985. — 296 с.
3. Затеищikov Д. А. Патогенез вазоспастической стенокардии: роль атеросклероза и эндотелия // Бюл. ВКНЦ АМН СССР. — 1987. — 10, № 2. — С. 120—126.
4. Поливода Б. И., Конев В. В., Попов Г. А. Биофизические аспекты радиационного поражения биомембран. — Москва: Энергоиздат, 1990. — 160 с.
5. Серкиз Я. И., Чеботарев Е. Е., Барабой В. А. и др. Хемилюминесценция крови в экспериментальной и клинической онкологии. — Киев: Наук. думка, 1984. — 184 с.