

М.М. Ткаченко, А.В. Коцюрuba, О.В. Базілюк, І.В. Гороть, В.Ф. Сагач

Зміни судинної реактивності та реактивних форм кисню за умов постійного перебування мишей у зоні відчуження

На препаратах аорти мишей ліній C57BL/6 і BALB/c, які народилися і постійно перебували за умов чорнобильської зони відчуження різної тривалості (6 і 18 міс) вивчали особливості змін судинної реактивності та вмісту реактивних форм кисню і стабільних метаболітів оксиду азоту (NO). Показано, що за цих умов порушуються ендотелійзалежні реакції розслаблення гладеньких м'язів (ГМ) грудної аорти на дію ацетилхоліну. Більшому пошкодженню ендотелійзалежних реакцій розслаблення ГМ грудної аорти за цих умов відповідають менший рівень синтезу NO й окисного аргіназного метаболізму аргініну. Зниження синтезу NO за умов постійної дії низьких доз радіації зумовлюється підвищенням генерації реактивних форм кисню, а саме супероксидного та гідроксильного радикалів, основним джерелом утворення яких можуть бути мітохондрії. За умов постійної дії низьких доз радіації більшому пошкодженню ендотелійзалежних реакцій відповідають менший рівень нітрозилування білків і генерації OH-радикала.

Ключові слова: аорта, ендотелій, зона відчуження, низькі дози радіації, оксид азоту, реактивні форми кисню, реактивні форми азоту, сечова кислота, судинна реактивність.

ВСТУП

Ендотелій – складний і багатофункціональний орган, який не просто утворює бар'єр між кров'ю та гладенькими м'язами (ГМ) судин, але діє і як модулятор функцій судин. Він є важливою ланкою формування та регуляції судинного тонуусу завдяки синтезу і вивільненню вазоактивних речовин. Ендотелій є найбільш радіочутливим елементом судинної стінки [2, 4, 6, 11, 15]. Одним з основних медіаторів судинної реактивності є оксид азоту (NO), який синтезується з L-аргініну трьома основними ізоформами NO-синтази (NOS) : двома конститутивними – нейрональною (nNOS), ендотеліальною (eNOS) і індукбельною (iNOS) [4, 13, 17]. Після відкриття системи NO стало зрозуміло, що не лише реактивні форми кисню (РФК: $\cdot\text{O}_2^-$, $\cdot\text{OH}$, стабільний H_2O_2 тощо), але і реактивні

форми азоту (РФА: $\cdot\text{NO}$, $\cdot\text{NO}_2$, ONOO^- , стабільні NO_2^- і NO_3^- тощо) можуть чинити вазоактивну (вазопротекторну, вазотоксичну, вазоконстрикторну чи вазодилаторну) дію в серцево-судинній системі [7, 8, 14, 18, 20]. Щодо ролі активних метаболітів кисню, то домінуюча концепція про виключно токсичну дію, останнім часом трансформувалася у їх токсичну дію при генерації у дозах, що перевищують фізіологічні, тоді як щодо останніх все очевидніше домінує думка, що вони виконують більш регуляторну, сигнальну функцію в серцево-судинній системі, в тому числі і щодо регуляції синтезу РФК і РФА. Ми вивчили певні біохімічні показники, що дають змогу оцінювати інтенсивність утворення як РФК, так і РФА у різних за радіочутливістю ліній мишей за умов постійного перебування у зоні відчуження

© М.М. Ткаченко, А.В. Коцюрuba, О.В. Базілюк, І.В. Гороть, В.Ф. Сагач

(за хронічної дії низьких доз внутрішнього і зовнішнього β/γ -опромінення).

Мета нашої роботи полягала у дослідженні особливостей ендотелійзалежного механізму судинної регуляції і метаболізму ендогенних рівнів реактивних форм кисню та азоту в аорті мишей ліній C57BL/6 і BALB/c залежно від різної тривалості перебування у зоні відчуження.

МЕТОДИКА

Дослідження проведено на мишах масою 20–22 г відносно радіочутливої лінії C57BL/6 і радіочутливої лінії BALB/c, які народилися і протягом усього свого життя перебували за умов зони відчуження (тварини знаходилися у віварії Інституту проблем безпеки атомних електростанцій НАН України, лабораторія експериментальної радіобіології і засобів радіозахисту, м. Чорнобиль). Контролем були 6- і 18-місячні тварини, що народилися і прожили своє життя за умов київського віварію за природного радіоактивного фону. Досліди проводилися у 2006–2008 р.

Миші лінії C57BL/6 характеризуються середньою чутливістю до радіації: для самців ЛД 50/30 – 6,5 Гр, для самиць – 6,7 Гр. Миші лінії BALB/c чутливі до дії радіації: для самців ЛД 50/30 < 5,7 Гр, для самиць – 5,85 Гр [1]. Тварини цих ліній використовуються практично у всіх медичних і біологічних дослідженнях, які проводяться на лінійних мишах, а також як еталон для порівняння з особливостями інших інбредних ліній у галузі екології та радіобіології [1]. Радіоактивне забруднення навколишнього середовища після аварії на Чорнобильській АЕС викликало підвищення рівня радіації на значних територіях України, особливо в зоні відчуження навколо станції. Тому проводили дослідження кормів, які використовувалися для годування тварин, на радіоактивне забруднення. Встановлено, що цей показник (за β -ак-

тивними радіонуклідами) для зерна, що постійно використовується в середньому був – 1,550 Бк/кг. Зовнішній фон у місці розташування тварин становив 23–30 мкР/год. Згідно з даними звіту ДСНПП “Екоцентр” (1998) про радіаційну ситуацію в зоні відчуження, на основі картографічної зйомки території м. Чорнобиля по розподілу ^{90}Sr , ^{137}Cs , $^{238-240}\text{Pu}$, ^{241}Am у шару ґрунту 0–5 см від поверхні виявлено три зони з аномально високими рівнями вмісту вказаних радіонуклідів. Територія віварію потрапляє до центру однієї з таких зон. На ній вміст радіонуклідів $^{238-240}\text{Pu}$ коливається від 2 до 3 кБк/м², ^{241}Am від 4 до 6,6 кБк/м², ^{90}Sr від 100 до 180 кБк/м², ^{137}Cs від 200 до 510 кБк/м². Співвідношення вказаних радіонуклідів є наступним: ^{90}Sr – 30 %, ^{137}Cs – 68 %, ^{241}Am – 0,3 %, $^{238-240}\text{Pu}$ – 0,3 % [5].

Після декапітації у мишей вилучали грудну аорту. Далі її ретельно препарували під мікроскопом і нарізали на сегменти з урахуванням циркулярної орієнтації її гладеньком’язового шару (під кутом приблизно 45°). Ширина такого кільцевого сегменту не перевищувала 1 мм, маса становила 0,5–0,7 мг. Препарати поміщали в проточну термостатовану (35–36° С) камеру, яка була заповнена буферним розчином Кребса такого складу (ммоль/л): NaCl – 133,0; KCl – 4,7; NaHCO₃ – 16,3; NaH₂PO₄ – 1,38; CaCl₂ – 2,5; MgCl₂ – 1,05; глюкоза – 7,8; тріс – 10,0; рН 7,4. У камері препарат піддавали пасивному розтягненню силою 1,6–1,8 мН і витримували в такому стані 30–60 хв. Скорочувальну активність ГМ грудного відділу аорти реєстрували за допомогою механоелектричного перетворювача 6MX1C у режимі, що наближався до ізометричного. Активацію ГМ здійснювали додаванням до буферного розчину норадреналіну (НА, 2·10⁻⁵ моль/л, “Sigma”, США). Сталий рівень цього скорочення (“плато”) приймали за 100 %. Від нього проводили розрахунки змін амплітуди

розслаблення ГМ (відсотки) на ендотелій-залежний (ацетилхолін йодид, 10^{-5} моль/л, "Sigma", США) і ендотелійнезалежний (нітропрурид натрію, 10^{-4} моль/л, "Sigma", США) агоністи.

У гомогенаті аорти дорослих (6 міс) і старих мишей (18 міс) ліній C57BL/6 і BALB/c визначали швидкість генерації активних метаболітів кисню: супероксидного радикала ($\cdot O_2^-$) і гідроксильного радикала (OH^\cdot), а також вміст пероксиду водню (H_2O_2), стабільних метаболітів оксиду азоту [нітрит – (NO_2^-) і нітрат – (NO_3^-)-аніонів], низькомолекулярних (НМНТ) і високомолекулярних (ВМНТ) нітрозотіолів, низькомолекулярних антиоксидантів (сечова кислота, сечовина), продуктів неферментативного (дієнові кон'югати – ДК, малоновий діальдегід – МДА) і ферментативного окиснення ліпідів (тромбоксан $B_2 - TxB_2$, лейкотриєн – LTC_4).

Визначення вмісту H_2O_2 . Проби (100–250 мкг білка) додавали в кварцеву кювету (1 см), що містила 2 мл 0,1 М розчину КJ, надлишок лактопероксидази (50 нмоль) у 0,05 М фосфатному буфері (рН 7,33). Фіксували швидкі зміни екстинції проб при 353 нм. Вміст H_2O_2 виражали в пікомолях на 1 мг білка проби, використовуючи коефіцієнт молярної екстинції $\epsilon = 26000$ моль $^{-1} \cdot$ см $^{-1}$.

Визначення швидкості утворення супероксидного радикала. Генерацію $\cdot O_2^-$ в пробах оцінювали за окисненням цитохрому с у 10 ммоль тріс-буфері (рН 7,4), фіксуючи зміни екстинції при 550 нм після інкубації сумішей при 37° С протягом 30 хв. Вміст $\cdot O_2^-$, генерованого пробами під час інкубації, визначали, використовуючи коефіцієнт молярної екстинції $\epsilon = 21000$ моль $^{-1} \cdot$ см $^{-1}$.

Визначення швидкості утворення ОН-радикала. Готували інкубаційну суміш [20 ммоль дезоксирибози, 1 ммоль H_2O_2 , 20 ммоль натрій-фосфатного буфера, рН 7,4 і проба (100–250 мкг білка)]. Інкубували суміш 30 хв при 37° С після чого добавляли

0,5 мл 1%-го розчину тіобарбітурової кислоти в 50 ммоль NaOH і 0,5 мл 2,8%-го розчину трихлороцтової кислоти. Отриману суміш витримували 20 хв на киплячій водяній бані, охолоджували і визначали вміст МДА визначенням величини екстинції при 532 нм. Вміст ОН-радикала, що генерувався при цьому за 30 хв інкубації, виражали в умовних одиницях: $\Delta E \cdot 10^2$ за 30 хв на 1 мг білка проби.

Визначення вмісту NO_2^- , низькомолекулярних і високомолекулярних нітрозотіолів (НМНТ, ВМНТ). Спочатку досліджували за класичним методом Гріна, використовуючи реактив Гріса, сумарний вміст NO_2^- у гомогенаті аорти (вільний NO_2^- і NO_2^- , що утворюється при гідролізі НМНТ і ВМНТ). Аліквоту гомогенату гідролізували компонентом реактиву Гріна, що містить Hg^{2+} протягом 18 год, потім отримували безбілкові проби, осаджуючи білок хлорною кислотою в кінцевій концентрації 0,5 моль/л. Після центрифугування в надосадовій рідині визначали сумарний вміст NO_2^- , додаючи другий компонент реактиву Гріна. Отримували значення A_1 ($A_1 =$ вільний $NO_2^- +$ ВМНТ + НМНТ).

Визначення вмісту НМНТ. У безбілкових аліквотах гомогенатів аорти (осадження білків 0,5 моль/л $HClO_4$) визначали вміст NO_2^- , використовуючи реактив Гріна з Hg^{2+} для гідролізу НМНТ. Отримували значення A_2 ($A_2 =$ вільний $NO_2^- +$ НМНТ).

Визначення вмісту вільного NO_2^- . У безбілкових аліквотах гомогенатів аорти за допомогою реактиву Гріна без Hg^{2+} визначали значення A_3 ($A_3 =$ вільний NO_2^-). Після цього визначали вміст НМНТ і ВМНТ: вміст НМНТ = $A_2 - A_1$; вміст ВМНТ = $A_3 - A_2$.

Визначення вмісту NO_3^- . Вміст NO_3^- визначали бруциновим методом у безбілкових аліквотах гомогенату аорти спектрофотометрично [8].

Визначення вмісту сечової кислоти і сечовини. Концентрацію сечової кислоти і

сечовини визначали колориметричними реакціями у безбілкових розчинах гомогенатів аорти за допомогою відповідних стандартних наборів реактивів фірма “Філісит Діагностика” (Дніпропетровськ).

Визначення вмісту МДА. До 0,5 мл гомогенату аорти додавали 0,5 мл 1%-го розчину тіобарбітурової кислоти в 50 ммоль NaOH і 0,5 мл 2,8%-го розчину трихлороцтової кислоти. Отриману суміш витримували 20 хв на киплячій водяній бані, охолоджували і визначали величину екстинції при 532 нм.

Визначення вмісту ДК. Вміст ДК визначали спектрофотометрично за поглинанням при 232 нм гептанових екстрактів проб методом Гаврилова та співавт.[3].

Визначення вмісту тромбоксану B_2 (TxB_2) і лейкотриєну C_4 (LTC_4). Ейкозаноїди TxB_2 і LTC_4 визначали за допомогою RIA-методу, використовуючи стандартні добірки реактивів фірми “Amersham” (Англія).

Визначення вмісту білка. Вміст загального білка в пробах визначали загальноживим методом Бредфорд, використовуючи барвник Cumassi G-250 (“Ferak”, Німеччина) [5, 6, 8].

Результати обробляли методом варіаційної статистики з використанням програмного забезпечення Origin 7 (“Microcal Software, Inc.”, США).

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Агоніст мускаринових рецепторів ацетилхолін завжди викликає розслаблення ГМ судин людини і багатьох тварин за умов цілісного ендотелію [4, 13, 14, 17]. За нашими результатами на ізольованих кільцевих препаратах грудної аорти 6-місячних мишей лінії C57BL/6 контрольної групи амплітуда його становила $45,3 \% \pm 5,1 \%$, а мишей лінії BALB/c – $41,0 \% \pm 4,3 \%$ від заданого рівня активації. У 18-місячних тварин ліній C57BL/6 і BALB/c контрольної групи амплітуда розслаблення ГМ аорти становила $21,1 \pm 4,0$ і $15,5 \% \pm 4,1 \%$ відповідно від заданого рівня активації (рис. 1). Це розслаблення зумовлено дією NO, що синтезується ендотелієм. Після вилучення ендотелію воно зникає або замість нього реєструється скорочення ГМ. Різні нітросполуки також відомі як вазодилататори. Розслаблення ГМ аорти 6-місячних мишей лінії C57BL/6 на нітропрурид натрію становило $100,8 \% \pm 10,1 \%$, мишей лінії BALB/c – $109,5 \% \pm 9,3 \%$, а 18-місячні тварини – $90,8 \pm 6,3$ і $92,0 \% \pm 7,5 \%$ відповідно від заданого рівня активації і навіть після механічної деендотелізації препаратів не зазнає змін [5]. Тобто реакція ГМ аорти на дію ацетилхоліну є залежною від збереження структурної та функціональної

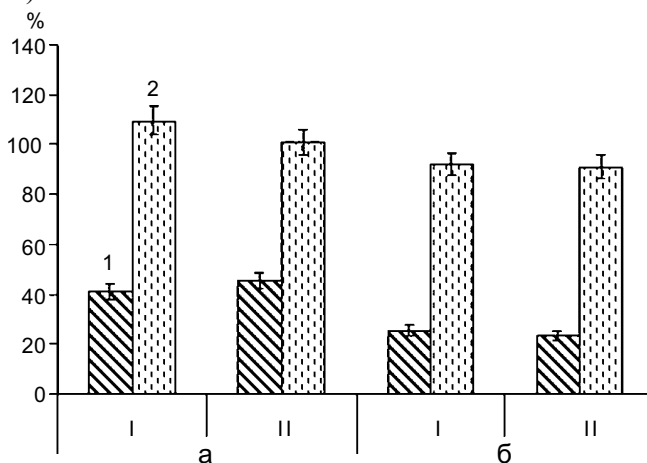


Рис. 1. Амплітуда розслаблення гладеньких м’язів грудної аорти 6- (а) та 18-місячних (б) мишей ліній BALB/c (I) і C57BL/6 (II) контрольної групи на дію йодиду ацетилхоліну (10^{-5} моль/л, 1) та нітропрусиду натрію (10^{-4} моль/л, 2) від заданого рівня активації

організації ендотелію, а на нітропрусид натрію – незалежною. Ці загальноприйняті положення були використані нами для тестування функціональної активності ендотелію і ГМ аорти мишей. Слід відзначити, що ми не спостерігали між тваринами одного віку, але різних ліній статистично

достовірних відмінностей як між фізіологічними реакціями ГМ аорти на ацетилхолін і нітропрусид натрію, так і досліджуваними біохімічними показниками (див. рис.1, табл. 1).

На ізольованих кільцевих препаратах грудної аорти 6-місячних тварин відносно

Таблиця 1. Особливості короткотривалої (6 міс) і довготривалої (18 міс) дії низьких доз радіації на визначені біохімічні показники, що характеризують окисний метаболізм в аорті мишей різних за радіочутливістю ліній (M ± m; n = 10)

Показник	Тривалість перебування у зоні відчуження	Миші лінії BALB/c	Миші лінії C57BL/6
Швидкість генерації O ₂ , ум.од.	контроль 1	1,91 ± 0,25	-
	контроль 2	2,46 ± 0,34	-
	6 міс	4,71 ± 0,61 *	18,3 ± 1,6 *.*.*
	18 міс	16,54 ± 1,43 *.*.*	16,6 ± 2,4 *
Швидкість генерації OH, ум.од.	контроль 1	0,36 ± 0,04	-
	контроль 2	0,46 ± 0,07	-
	6 міс	2,73 ± 0,52 *	1,09 ± 0,21 *.*.*
	18 міс	2,38 ± 0,39 *	5,33 ± 0,79 *.*.*.*
Вміст H ₂ O ₂ , пмоль/мг білка	контроль 1	7,82 ± 0,95	-
	контроль 2	6,23 ± 1,55	-
	6 міс	13,8 ± 1,2 *	11,9 ± 2,1
	18 міс	13,61 ± 2,01 *	13,7 ± 1,8 *
Вміст сечової кислоти, нмоль/мг білка	контроль 1	0,91 ± 0,11	-
	контроль 2	1,25 ± 0,18	-
	6 міс	5,47 ± 0,71 *	2,86 ± 0,37 *.*.*
	18 міс	2,06 ± 0,28 *.*.*	2,57 ± 0,35 *
Вміст лейкотриєну, пмоль/мг білка	контроль 1	2,58 ± 0,42	-
	контроль 2	4,05 ± 1,25	-
	6 міс	6,71 ± 1,13 *	10,1 ± 2,6 *
	18 міс	9,41 ± 1,65 *	3,12 ± 0,73 *.*.*.*
Вміст тромбоксану B ₂ , пмоль/мг білка	контроль 1	2,11 ± 0,32	-
	контроль 2	3,56 ± 0,74	-
	6 міс	5,92 ± 1,36 *	11,1 ± 2,1 *.*.*
	18 міс	13,11 ± 2,43 *.*.*	4,66 ± 0,51 *.*.*.*
Вміст ДК, нг/мг білка	контроль 1	7,63 ± 0,95	-
	контроль 2	11,80 ± 1,36	-
	6 міс	27,82 ± 3,58 *	13,6 ± 3,2 **
	18 міс	11,9 ± 0,76 **	23,5 ± 6,7 *.*.*.*
Вміст МДА, нмоль/мг білка	контроль 1	5,24 ± 0,92	-
	контроль 2	8,10 ± 1,25	-
	6 міс	25,76 ± 2,42 *	12,9 ± 1,2 *.*.*
	18 міс	33,41 ± 5,61 *	8,37 ± 1,09 *.*.*.*

У табл. 1-4: *різниця достовірна (P<0,05) відносно значення в контролі 1;

** різниця достовірна (P<0,05) відносно значення в групах 6-місячних тварин;

*** різниця достовірна (P<0,05) відносно значення у мишей лінії BALB/c.

радіочутливих мишей із зони відчуження ацетилхолін у концентрації 10^{-5} моль/л (n=10) викликав розвиток трьох типів реакцій преактивованих норадреналіном ГМ: 1) у 6

дослідах (60 %) рееструвалося стійке скорочення ГМ амплітудою від 17 до 83 % ($35,3\% \pm 3,1\%$); 2) в одному досліді (10 %) спостерігалось розслаблення ГМ, амплі-

Таблиця 2. Короткочасна (6 міс) і довготривала (18 міс) дія низьких доз радіації на розраховані біохімічні показники, що характеризують окисний метаболізм в аорті мишей різних ліній (M ± m; n = 10)

Показник	Тривалість перебування у зоні відчуження	Миші лінії BALB/c	Миші лінії C57BL/6
Відношення ТхВ ₂ / LTC ₄ , ум.од.	контроль 1	0,82 ± 0,05	-
	контроль 2	0,88 ± 0,06	-
	6 міс	0,88 ± 0,07	1,1 ± 0,09
	18 міс	1,39 ± 0,11	1,49 ± 0,13
Відношення МДА/(ТхВ ₂ і LTC ₄), од.	контроль 1	1,12 ± 0,08	-
	контроль 2	1,06 ± 0,07	-
	6 міс	2,04 ± 0,26*	0,61 ± 0,09****
	18 міс	1,48 ± 0,18	1,08 ± 0,13
Частка О ₂ в сумі (О ₂ і ОН), %	контроль 1	84,14 ± 14,28	-
	контроль 2	83,96 ± 13,89	-
	6 міс	63,31 ± 10,07	94,38 ± 19,51
	18 міс	87,4 ± 15,22	75,7 ± 18,02
Частка ОН у сумі (О ₂ і ОН), %	контроль 1	15,86 ± 2,84	-
	контроль 2	16,04 ± 1,95	-
	6 міс	36,69 ± 6,51*	5,62 ± 0,71 ****
	18 міс	12,6 ± 2,18**	24,3 ± 3,96 *****
Частка ДК у сумі (ДК і МДА), %	контроль 1	59,28 ± 8,19	-
	контроль 2	59,30 ± 8,43	-
	6 міс	51,92 ± 7,95	51,32 ± 6,02
	18 міс	26,26 ± 3,66 ***	73,74 ± 9,18 ***
Частка МДА у сумі (ДК і МДА), %	контроль 1	40,72 ± 6,14	-
	контроль 2	40,70 ± 5,68	-
	6 міс	48,08 ± 7,12	48,68 ± 9,22
	18 міс	73,74 ± 11,56*	26,26 ± 5,1**
Частка LTC ₄ у сумі (LTC ₄ і ТхВ ₂), %	контроль 1	55,01 ± 10,64	-
	контроль 2	53,22 ± 7,08	-
	6 міс	53,12 ± 8,12	47,64 ± 7,43
	18 міс	41,79 ± 6,95	40,1 ± 5,36
Частка ТхВ ₂ у сумі (LTC ₄ і ТхВ ₂), %	контроль 1	44,99 ± 6,54	-
	контроль 2	46,78 ± 5,83	-
	6 міс	46,86 ± 8,12	52,36 ± 8,82
	18 міс	58,21 ± 9,08	59,9 ± 7,95
Частка ейкозаноїдів (LTC ₄ і ТхВ ₂), пмоль/мг білка	контроль 1	4,69 ± 0,74	-
	контроль 2	7,61 ± 1,99	-
	6 міс	12,63 ± 2,49*	21,2 ± 4,7****
	18 міс	22,52 ± 4,08***	7,78 ± 1,24****
Сума продуктів ПОЛ (ДК і МДА), ум.од.	контроль 1	12,87 ± 1,87	-
	контроль 2	19,90 ± 2,61	-
	6 міс	53,58 ± 6,0 *	26,50 ± 4,4 ***
	18 міс	45,31 ± 6,37*	31,87 ± 7,79

туда якого не перевищувала 20 % від рівня їх активації; 3) у 3 дослідах (30 %) ніяких змін тонічного напруження ГМ на цей агоніст не відбувалося (рис. 2).

На донор NO нітропрусид натрію (n=9) ГМ грудної аорти також реагували по-різному: 1) у 5 дослідах (56 %) розвивалося типове розслаблення ГМ, амплітуда якого варіювала від 26 до 105 %, а в середньому вона становила $55,9 \pm 4,2$ %; 2) у 2 дослідах (22 %) реєструвалося скорочення амплітудою від 20 до 25 %; 3) у 2 дослідах (22 %) змін тонічного напруження ГМ на цей агоніст не виявлено (див. рис. 2).

Дослідження на 18-місячних мишах із зони відчуження показали, що ГМ ізольованих кільцевих препаратах грудної аорти на дію ацетилхоліну в концентрації 10^{-5} моль/л (n=8) реагують також неоднозначно, а саме: 1) у 2 дослідах (25 %) реєструвалося збільшення тонічного напруження

ГМ амплітудою 25-30 % і тривалістю 6 хв з наступним відновленням заданого рівня їх активації; 2) в одному досліді тонічне напруження ГМ збільшувалося майже на 40 % і змінювалося їх розслабленням амплітудою майже 30 %; 3) у 3 дослідах (38 %) ацетилхолін викликав транзиторне, що тривало 1–4 хв, розслаблення ГМ, після чого заданий рівень їх активації відновлювався; 4) у 2 дослідах (25 %) змін тонічного напруження ГМ на досліджуваній агоніст взагалі не відбувалося (див. рис.1).

На нітропрусид натрію ГМ грудної аорти у 100 % дослідів (n=8) реагували розслабленням. Амплітуда його сягала в окремих дослідах від 42 до 111 %, а в середньому становила $79,7 \pm 5,0$ % (див. рис. 2).

Раніше нами було показано, що у дорослих і старих мишей лінії BALB/c, які постійно перебували у зоні відчуження,

Таблиця 3. Короткочасна (6 міс) і довготривала (18 міс) дія низьких доз радіації на визначені біохімічні показники, що характеризують систему синтезу оксиду азоту в аорті мишей різних ліній (M ± m; n = 10)

Показник	Тривалість перебування у зоні відчуження	Миші лінії BALB/c	Миші лінії C57BL/6
Вміст NO ₂ , пмоль/мг білка	контроль 1	190,84 ± 22,52	-
	контроль 2	105,2 ± 18,3**	-
	6 міс	54,57 ± 5,9 *	32,94 ± 8,07 *
	18 міс	54,48 ± 4,84 *	90,3 ± 5,9*****
Вміст NO ₃ , нмоль/мг білка	контроль 1	9,73 ± 1,42	-
	контроль 2	11,51 ± 1,56	-
	6 міс	10,21 ± 2,01	11,5 ± 0,5
	18 міс	9,11 ± 1,31	14,6 ± 2,7
Вміст низькомолекулярних нітрозотіолів, пмоль/мг білка	контроль 1	114,5 ± 16,4	-
	контроль 2	82,25 ± 11,93	-
	6 міс	62,2 ± 13,8 *	30,6 ± 3,8 *****
	18 міс	74,9 ± 11,6	41,6 ± 6,2 *
Вміст високомолекулярних нітрозотіолів, пмоль/мг білка	контроль 1	1527,1 ± 179,1	-
	контроль 2	1726,4 ± 161,3	-
	6 міс	2300,2 ± 454,5	1300,6 ± 298,1
	18 міс	6129,1 ± 1462,1 ***	9527,5 ± 399,8***
Вміст сечовини, нмоль/мг білка	контроль 1	12,0 ± 1,5	-
	контроль 2	36,8 ± 4,5**	-
	6 міс	40,44 ± 1,56 *	33,24 ± 5,04 *
	18 міс	16,68 ± 1,92***	48,84 ± 9,84 *****

взагалі відсутні ендотелійзалежні реакції розслаблення ГМ грудної аорти на йодид ацетилхоліну, що свідчить про ушкодження ендотеліальної функції. Водночас ендотелійнезалежні реакції розслаблення ГМ на нітропрурид натрію у дорослих мишей цієї лінії ушкоджені частково, а у старих відтворюються у всіх дослідах [5].

Таким чином, внаслідок постійної дії низьких доз радіації ендотелійзалежне, а саме NO-залежне, розслаблення ГМ аорти порушується у мишей різних ліній неоднаково залежно від тривалості дії радіації.

У табл. 1 представлено значення досліджених біохімічних показників, що характеризують окисний метаболізм у тварин контрольної та дослідної груп, а у табл. 2 – співвідношення між цими показниками, що характеризують зміни окисного метаболізму в аорті за умов коротко- (6 міс) та довготривалої (18 міс) дії низьких доз радіації.

Результати, представлені в табл. 1 і 2 вказують на те, що за тривалої дії низьких доз радіації спостерігається значна активація генерації РФК в ендотеліальних і гладеньком'язових клітинах аорти (як O_2^- , так і ОН-радикалів). Основним джерелом РФК швидше за все можуть бути мітохондрії, позаяк підвищення генерації O_2^-

значно перевищують рівні підвищення пулів основних немітохондріальних оксидаз – ксантинооксидази (маркер – вміст сечової кислоти) і ліпідних оксидаз – ліпооксигенази (маркер – вміст $LTС_4$) і циклооксигенази (маркер – вміст TxB_2).

Швидкість генерації O_2^- (в мітохондріях) синхронно змінюється із рівнем пошкодження NO-залежного розслаблення аорти [5]. Так, у мишей лінії C57BL/6 він становив $958 \% \pm 84 \%$ відносно контрольних значень, тоді як у мишей лінії BALB/c лише $247 \% \pm 32 \%$ через 6 міс перебування у зоні відчуження, а через 18 міс рівні генерації O_2^- були однаково високими у мишей обох ліній 675 ± 97 і $671 \% \pm 58 \%$ відповідно щодо відповідного контролю (див. табл. 1).

Пули стабільного H_2O_2 були підвищеними (на 218–220 %) відносно контролю у мишей обох ліній лише протягом тривалого перебування у зоні відчуження (18 міс).

Рівні генерації ОН-радикала за дії радіаційного фактора були високими у мишей обох ліній, але вища ступінь пошкодження ендотелію аорти супроводжувалася не вищими, а, навпаки, нижчими значеннями цього показника. Так, через 6 міс швидкість генерації ОН-радикала у мишей

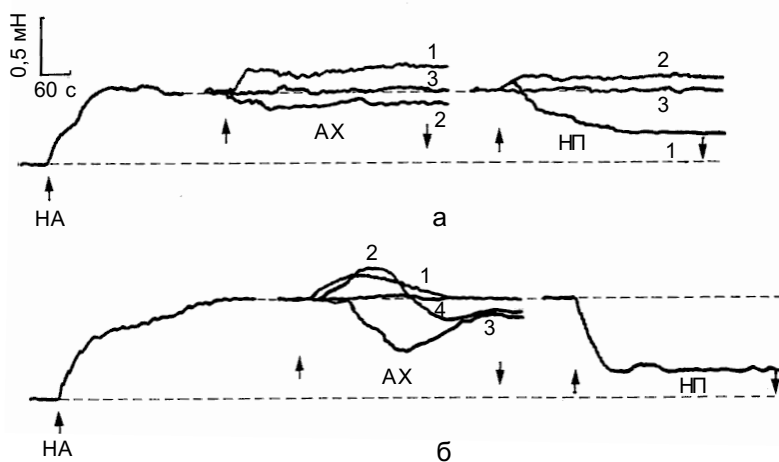


Рис. 2. Ендотелійзалежні (йодид ацетилхоліну – АХ, 10^{-5} моль/л) і ендотелійнезалежні (нітропрурид натрію – НП, 10^{-4} моль/л) скорочувальні реакції преактивованих норадреналіном ($2 \cdot 10^{-5}$ моль/л) ГМ ізольованих препаратів грудної аорти 6- (а) та 18-місячних (б) мишей лінії C57BL/6 із зони відчуження. Стрілками показано початок і кінець впливу досліджуваних агоністів: 1, 2, 3 – різні типи реакцій гладеньких м'язів на них. Розрив між кривими відповідає 10 хв

лінії C57BL/6 з більшими рівнями пошкодження становили $303 \% \pm 58 \%$ відносно контролю, тоді у менш пошкодженому ендотелії аорти мишей лінії BALB/c – $758 \% \pm 144 \%$. Через 18 міс ці рівні становили відповідно 1159 ± 172 і $517 \% \pm 85 \%$, причому у мишей BALB/c з меншим рівнем генерації OH^\cdot -радикала відмічали більшу ступінь пошкодження ендотелію (див. табл. 1).

У табл. 3 представлено значення біохімічних показників, що характеризують синтез активних метаболітів оксиду азоту (РФА) в аорті мишей різного віку та за різною тривалістю дії низьких доз радіації у зоні відчуження, а в табл. 4 – показників, що характеризують вікові особливості функціонування системи синтезу NO в

контролі та за умов дії низьких доз радіації.

Окисний метаболізм L-аргініну (генерація РФА) в зоні відчуження за умов тривалої дії низьких доз радіації теж був підвищений, але меншою мірою, ніж генерація РФК. При цьому достовірно підвищувалися лише пули нітрозильованих білків (ВМНТ) – максимально ($552 \% \pm 23 \%$) через 18 міс у мишей лінії C57BL/6, тоді як у мишей радіочутливої лінії BALB/c нітрозильованих білків було дещо менше ($355 \% \pm 84 \%$ від рівня контролю), при цьому пошкодження ендотелію у них, навпаки, було вищим. Аналогічно, у мишей лінії C57BL/6 через 6 міс пули нітрозильованих білків були достовірно меншими ($85 \% \pm 19 \%$) від таких у лінії BALB/c ($151 \% \pm 30 \%$), при цьому ступінь пошкодження

Таблиця 4. Короткочасна (6 міс) і довготривала (18 міс) дія низьких доз радіації на розраховані біохімічні показники, що характеризують систему синтезу оксиду азоту в аорті мишей різних ліній (M ± m; n = 10)

Показник	Тривалість перебування у зоні відчуження	Миші лінії BALB/c	Миші лінії C57BL/6
Частка NO_2^- у сумі (NO_2^- і NO_3^-), %	контроль 1	$1,92 \pm 0,15$	-
	контроль 2	$0,91 \pm 0,11^{**}$	-
	6 міс	$0,53 \pm 0,08^*$	$0,29 \pm 0,04^{****}$
	18 міс	$0,59 \pm 0,07$	$0,61 \pm 0,09^{**}$
Частка NO_2^- у сумі (NO_2^- і НМНТ і ВМНТ), %	контроль 1	$10,41 \pm 1,13$	-
	контроль 2	$5,76 \pm 0,42^{**}$	-
	6 міс	$6,14 \pm 0,76^*$	$2,33 \pm 0,17^{****}$
	18 міс	$0,87 \pm 0,15^{***}$	$0,93 \pm 0,15^{***}$
Частка НМНТ у сумі (NO_2^- і НМНТ і ВМНТ), %	контроль 1	$6,25 \pm 0,47$	-
	контроль 2	$4,51 \pm 0,36$	-
	6 міс	$2,47 \pm 0,36^*$	$5,70 \pm 0,42^{***}$
	18 міс	$1,2 \pm 0,17^{***}$	$0,43 \pm 0,06^{*****}$
Частка ВМНТ у сумі (NO_2^- і НМНТ і ВМНТ), %	контроль 1	$83,33 \pm 7,19$	-
	контроль 2	$94,66 \pm 15,24$	-
	6 міс	$91,39 \pm 15,08$	$92,0 \pm 15,21$
	18 міс	$97,93 \pm 6,39$	$98,63 \pm 9,6$
Сума нітрозотіолів (НМНТ і ВМНТ), пмоль/мг білка	контроль 1	$1641,6 \pm 195,5$	-
	контроль 2	$1808,7 \pm 173,2$	-
	6 міс	$2362,4 \pm 468,3$	$1331,2 \pm 301,9$
	18 міс	$6204,0 \pm 1473,7^{***}$	$9569,1 \pm 405,8^{***}$
Індекс оксигенації, ум.од.	контроль 1	$8,75 \pm 1,30$	-
	контроль 2	$2,18 \pm 0,12^{**}$	-
	6 міс	$0,38 \pm 0,07^*$	$0,23 \pm 0,04^*$
	18 міс	$0,51 \pm 0,09^*$	$0,47 \pm 0,09^{***}$

ендотелію у них, навпаки, був більшим (табл. 3). Отже, більшому пошкодженню ендотелій-залежних реакцій відповідає реципрокно менше нітрозилування білків, аналогічно як і менший рівень генерації OH -радикала.

Істотніші пошкодження ендотелію за дії радіації зумовлюються також більш значним зниженням пулів NO_2^- і нітрозильованого глутатіону і цистеїну (НМНТ) [5]. Враховуючи той факт, що основним місцем синтезу NO , як і O_2^- , є мітохондрії [16, 18], можна припускати порушення цього процесу за дії радіації.

Цікаво, що спостерігається певна синхронна залежність між рівнем пошкодження ендотелію та пулами сечовини, основним джерелом синтезу якої в аорті є мітохондріальна аргіназа II, що конкурує з NO -синтазами за спільний субстрат – L -аргінін [10, 18]. В цьому разі, вочевидь, конкуренція теж може бути, але ми спостерігали синхронне зниження пулів і NO_2^- (маркер – утворення NO), і сечовини (маркер активності аргінази). Так, при більш значному пошкодженні ендотелію (через 6 міс у мишей лінії C57BL/6) спостерігали і суттєвіше пригнічення утворення NO_2^- (в основному спонтанно при окисненні NO) і менше підвищення пулів сечовини (всього на 277 ± 42 щодо $337 \% \pm 33 \%$ у мишей лінії BALB/c) з меншим пошкодженням ендотелію. Такі самі закономірності спостерігали і за тривалої дії радіаційного чинника (через 18 міс) – при більшому пошкодженні ендотелію у мишей лінії BALB/c спостерігали і менші пули NO_2^- (52 ± 5 щодо $86 \% \pm 6 \%$). Отже, можна зробити припущення, що більшому рівню пошкодження ендотелію за умов тривалої дії низьких доз радіації відповідає менший рівень генерації NO [при цьому окисний метаболізм L -аргініну спрямований на утворення не NO , а пероксинітриду (ONOO^-) за умов окисного стресу при одночасній генерації значних кількостей і NO , і O_2^-] і менший рівень неокисного аргіназного метаболізму аргініну, про що свідчать пули сечовини.

Враховуючи, що як окисний процес генерації NO/ONOO^- , так і неокисний процес утворення сечовини відбувається в основному в мітохондріях ендотеліальних і гладеньком'язових клітин аорти [9, 12, 16], можна зробити припущення, що вазотоксична дія низьких доз радіації зумовлюється саме порушенням мітохондріального гомеостазу, а тобто – підвищенням генерації в них O_2^- і OH -радикалів і, меншою мірою, утворенням ONOO^- , одночасно із пригніченням утворення в них NO і низькомолекулярних нітрозотіолів (в основному нітрозоглутатіону) [19].

Відмічено синхронну залежність між рівнями генерації OH -радикала, активністю аргіназного метаболізму L -аргініну і пошкодженням ендотелію. Позаяк відомо, що OH -радикал є одним із активаторів аргінази, меншим рівням генерації OH -радикала відповідають менші пули сечовини (а, отже, і активності аргінази), що супроводжується більш значним пошкодженням ендотелію [16]. Враховуючи цей факт, а також більш значне зниження пулів NO_2^- при вищих рівнях пошкодження ендотелію, можна зробити припущення про активацію низькими дозами радіації процесу апоптозу в ендотеліальних клітинах, причому апоптозу в його класичному мітохондрійзалежному варіанті, опосередкованому (ініційованому) відкриванням мітохондріальної пори її індукторами – РФК [18], а також зменшенням оксигенації L -аргініну за цих умов (табл. 4). Відомо, що відкриття пори пригнічується NO , але стимулюється ONOO^- , а також, що потужним інгібітором пори є γ -аміномасляна кислота (ГАМК), яка синтезується у мітохондріях із продуктів аргіназного шляху – як із глутамату, так і путресцину, що утворюються із орнітину.

Отже, отримані результати передбачають можливість проапоптичної дії низьких доз радіації (за умов тривалої їх дії), внаслідок чого спостерігається практично повне знищення ендотелію, а отже і ендотелій-залежного розслаблення. Біохімічними

причинами проапоптичної дії низьких доз радіації може бути, з одного боку, стимуляція генерації РФК і ONOO^- в мітохондріях (індуктори відкриття пори і ініціатори апоптозу), а з іншого – пригнічення утворення NO і ГАМК (інгібітори відкриття пори).

ВИСНОВКИ

1. За короткочасного (6 міс) та тривалого (18 міс) впливу низьких доз радіації на мишей двох різних радіочутливих ліній, які постійно перебували у зоні відчуження, порушуються ендотеліозалежні реакції розслаблення ГМ грудної аорти на дію ацетилхоліну.

2. Більшому пошкодженню ендотеліозалежних реакцій розслаблення ГМ грудної аорти за цих умов відповідають менший рівень синтезу NO і окисного аргіназного метаболізму аргініну.

3. Зниження синтезу NO за умов постійної дії низьких доз радіації зумовлюється підвищенням генерації реактивних форм кисню, а саме супероксидного і гідроксильного радикалів, основним джерелом утворення яких можуть бути мітохондрії.

4. За умов постійної дії низьких доз радіації більшому пошкодженню ендотеліозалежних реакцій відповідає менше нітрозилування білків, аналогічно як і менший рівень генерації OH-радикала.

М.Н. Ткаченко, А.В. Коцюрuba, О.В. Базілюк, І.В. Гороть, В.Ф. Сагач

ИЗМЕНЕНИЯ СОСУДИСТОЙ РЕАКТИВНОСТИ И РЕАКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА В УСЛОВИЯХ ПОСТОЯННОГО ПРЕБЫВАНИЯ МЫШЕЙ В ЗОНЕ ОТЧУЖДЕНИЯ

На препаратах аорты мышей линий C57BL/6 и BALB/c, которые родились и постоянно находились в условиях Чернобыльской зоны отчуждения различной продолжительности (6 и 18 мес) изучали особенности изменений сосудистой реактивности и содержания реактивных форм кислорода и стабильных метаболитов оксида азота (NO). Показано, что при этих условиях нарушаются эндотелийзависимые реакции расслабления гладких мышц

грудной аорты на действия ацетилхолина. Большому повреждению эндотелийзависимых реакций расслабления гладких мышц грудной аорты в этих условиях отвечает меньше уровень синтеза NO и окислительного аргиназного метаболизма аргинина. Снижение синтеза NO в условиях постоянного действия низких доз радиации обусловлено повышением генерации реактивных форм кислорода, а именно супероксидного и гидроксильного радикалов, основным источником образования которых могут быть митохондрии. В условиях постоянного действия низких доз радиации большому повреждению эндотелийзависимых реакций отвечает меньшее нитрозилирование белков, аналогично, как и меньший уровень генерации OH-радикала.

Ключевые слова: аорта, эндотелий, зона отчуждения, низкие дозы радиации, оксид азота, реактивные формы кислорода, реактивные формы азота, мочева кислота, сосудистая реактивность.

M.N. Tkachenko, A.V. Kotsjuruba, O.V. Bazilyuk, I.V. Gorot, V.F. Sagach

CHANGES OF VASCULAR REACTIVITY AND REACTIVE FORMS OF OXYGEN IN CONDITIONS OF VARYING DURATION OF PERMANENT STAY IN THE ALIENATION ZONE

Peculiarities of changes in the vascular reactivity and in the content of reactive forms of oxygen and stable metabolites of nitric oxide (NO) were studied in the aorta preparations of C57BL/6 and BALB/c mice of the two age groups (6 and 18 mo.), which were born and permanently kept in the Chernobyl alienation zone. The results obtained showed a disturbance of acetylcholine-induced endothelium-dependent reactions of relaxation of smooth muscles of the thoracic aorta. A lower level of NO synthesis and lower level of oxidative arginase metabolism of arginine corresponded to a higher degree of damage of endothelium-dependent reactions of relaxation of the thoracic aorta smooth muscles. A decrease of NO synthesis in conditions of permanent effects of low doses of radiation was conditioned by an increase of generation of reactive forms of oxygen, namely, superoxide and hydroxyl radicals, which might be formed in mitochondria. In conditions of permanent effects of low doses of radiation a lesser level of protein nitrosothilation, same as lesser one of generation of OH-radical, corresponded to a higher level of damage of endothelium-dependent reactions.

Key words: aorta, Chernobyl alienation zone, endothelium, nitric oxide, low doses of radiation, reactive forms of oxygen, reactive forms of nitric, uric acid, vascular reactivity

*O.O. Bogomoletz National Medical University, Kyiv;
O.O. Bogomoletz Institute of Physiology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;
A.V. Palladin Institute of Biochemistry NAS Ukraine, Kyiv*

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Бландова З.К., Душкин В.А., Малашенко А.М., Шмидт Е.Ф. Линии лабораторных животных для медико-биологических исследований. – М.: Наука, 1983. – 189 с.
2. Воробьёв Е.И., Степанов Р.П. Ионизирующие излучения и кровеносные сосуды. – М.: Энергоатомиздат, 1985. – 296 с.
3. Гаврилов В.Б., Гаврилова А.Р., Хмара Н.Ф. Измерение диеновых конъюгатов в плазме крови по УФ-поглощению гептановых и изопропанольных экстрактов // Лаб. дело. – 1988. - № 2. – С. 60–64.
4. Мойбенко О.О., Сагач В.Ф., Ткаченко М.М., Коркушко О.В., Безруков В.В., Кульчицкий О.К., Стефанов О.В., Соловйов А.І., Мала Л.Т., Фролькіс В.В. Фундаментальні механізми дії оксиду азоту на серцево-судинну систему як основи патогенетичного лікування її захворювань // Фізіол. журн. – 2004. – **50**, № 1. – С. 11–30.
5. Ткаченко М.М., Сагач В.Ф., Базілюк О.В., Коцюрuba А.В., Поперека Г.М., Степаненко Л.Г., Сенюк О.Ф. Вікові особливості змін скорочувальних судинних реакцій і вміст вільних радикалів кисню та метаболітів оксиду азоту у мишей лінії BALB/c за умов перебування у зоні відчуження // Там само. – 2005. – **51**, № 3. – С. 32–41.
6. Ткаченко М.Н., Коцюрuba А.В., Базілюк О.В., Таланов С.А., Поперека Г.М., Сенюк О.Ф., Сагач В.Ф. Сосудистая реактивность и метаболизм реактивных форм кислорода и азота при действии низких доз радиации // Рад. биология. Радиоэкология. – 2009. – **49**, № 4. – С. 462–472.
7. Фролькіс В.В., Безруков В.В., Кульчицкий О.К. Старение и экспериментальная патология сердечно-сосудистой системы. – К.: Наук. думка, 1994. – 248 с.
8. Basaga H.S. Biochemical aspects of free radicals // Cell. Biol. – 1990. – **68**, № 5. – P. 989–998.
9. Beckman J.S., Beckman T.W., Chen J., Marshall P.A., Freeman B.A. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1990. – **87**, № 7. – P. 1620–1624.
10. Durante W., Johnson F.K., Johnson A.J. Arginase: a critical regulator of nitric oxide synthesis and vascular function // Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. – 2007. – **34**, № 9. – P. 906–911.
11. Gajdusek C.M., Onoda K., London S., Johnson M., Morrison R., Mayberg M.R. Early molecular changes in irradiated aortic endothelium // J. Cell Physiol. – 2001. – **188**, № 1. – P. 8–23.
12. Honston M., Chumley P., Radi R., Rubbo H., Freeman B.A. Xanthine oxidase reaction with nitric oxide and peroxynitrite // Arch. Biochem. Biophys. – 1998. – **355**, № 1. – P. 1–8.
13. Ignarro L.J., Cirino G., Casini A., Napoli C. Nitric oxide as a signaling molecule in the vascular system: an overview // J. Cardiovasc. Pharmacol. – 1999. – **34**, № 6. – P. 879–886.
14. Kano Y., Tanabe T., Nagasawa J., Mizuta T. Effect of age on rat responses to acetylcholine and nitric oxide donor (NOC-18) // Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol. – 2000. – **107**, № 3–4. – P. 331–334.
15. Kantak S.S., Diglio C.A., Onoda J.M. Low dose radiation-induced endothelial cell retraction // Int. J. Radiat. Biol. – 1993. – **64**, № 3. – P. 319–328.
16. Korge P., Ping P., Weiss J.N. Reactive oxygen species production in energized cardiac mitochondria during hypoxia/reoxygenation: Modulation by nitric oxide // Circ. Res. – 2008. – **103**. – P. 873–880.
17. Marin J., Rodrigues-Martinez M.A. Age-related changes in vascular responses // Exp. Gerontol. – 1999. – **34**. – P. 503–512.
18. Mori M. Regulation of nitric oxide synthesis and apoptosis by arginase and arginine recycling // J. Nutr. – 2007. – **137**, June – P.1616S–1620S.
19. Singh R.J., Hogg N., Goss S.P., Antholine W.E., Kalyanaraman B. Mechanism of superoxide dismutase/H₂O₂ – mediated nitric oxide release from S-nitrosoglutathione // Arch. Biochem. Biophys. – 1999. – **372**, № 1. – P. 8–15.
20. Tarpey M.M., Fridovich I. Methods of detection of vascular reactive species: nitric oxide, superoxide, hydrogen peroxide, and peroxynitrite // Circ. Res. – 2001. – **89**. – P. 224–236.

Нац. мед. ун-т ім. О.О. Богомольця, Київ;

Ін-т фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ;

Ін-т біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України, Київ

Матеріал надійшов до редакції 16.03.2010