

М. М. Ткаченко, В. Ф. Сагач, А. В. Коцюруба, О. В. Базілюк,
О. М. Буханевич, О. Ф. Мегедь, Л. Г. Степаненко

Ендотелійзалежні скорочувальні реакції судинних гладеньких м'язів і вміст вільних радикалів кисню у щурів за умов старіння

Эндотелийзависимые и эндотелийнезависимые реакции сосудистых гладких мышц исследовались на изолированных препаратах грудного отдела аорты и воротной вены крыс двух возрастных групп – 6-8 мес (контроль) и 24-26 мес (старые животные). Показано, что у старых крыс нарушаются, в первую очередь, эндотелийзависимые сосудистые реакции. Эта возрастная дисфункция эндотелия приводит к угнетению NO-зависимой регуляции сосудистого тонуса. Установлены возрастные изменения состояния плазматической мембраны эритроцитов, используя метод кислотного гемолиза. Определены возрастные изменения содержания активных форм кислорода ($\cdot O_2^-$, H_2O_2 , $\cdot OH$) и азота (NO_2^- , NO_3^-) в миокарде, аорте, плазме крови и эритроцитах взрослых и старых животных.

ВСТУП

Важливим фактором, що визначає вікові особливості діяльності серцево-судинної системи, є зміна тону судин і місцевих судинних реакцій. Функціональні зміни кровообігу за умов старіння створюють передумови для частого розвитку захворювань серцево-судинної системи. Для розуміння механізмів вікових змін судинної системи істотно значення має стан ендотеліальних і гладеньком'язових клітин судинної стінки на різних етапах онтогенезу [9, 11, 24, 25, 30]. В основі більшості сучасних гіпотез про розвиток фізіологічного старіння організму лежить ідея про надлишкову генерацію за цих умов активних форм кисню та азоту. Їх генерація викликає окисний стрес. Наслідком його є глибоке порушення метаболізму клітин, фізико-хімічних і функціональних властивостей їх мембран.

Мета нашої роботи полягала у дослідженні ендотелійзалежної судинної реактивності та ендогенних рівнів активних метаболітів кисню та азоту в клітинах сер-

цево-судинної системи у щурів за умов фізіологічного старіння.

МЕТОДИКА

Фізіологічні дослідження

Дослідження проведено на ізольованих препаратах грудного відділу аорти та воротної вени щурів-самців лінії Вістар - Кіото масою 280 - 380 г. Особливості ендотелійзалежних та ендотелійнезалежних скорочувальних реакцій гладеньких м'язів (ГМ) грудного відділу аорти вивчали на щурах двох вікових груп: 6-8 міс (дорослі щури - контроль) та 24-26 міс (старі щури). Судини нарізали на сегменти завширшки 2-2,5 мм і масою 2-3 мг з урахуванням циркулярної орієнтації їх гладеньком'язового шару. Кільцевий препарат поміщали в проточну термостатовану (35-36°C) камеру, що була заповнена модифікованим 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. Тут

препарат піддавали пасивному розтягненню силою 7-15 мН і витримували в цьому стані 30 - 60 хв. Активацію ГМ досягали додаванням до буферного розчину норадреналіну (НА, "Sigma", США). Скорочувальну активність ГМ аорти реєстрували за допомогою механоелектричного перетворювача 6MX1C у режимі, що наближався до ізометричного. Реєстрували зміни тонічного напруження ГМ на ендотелійзалежний агоніст мускаринових рецепторів ацетилхолін йодид (АХ, "Sigma", США) і ендотелійнезалежний агоніст нітроприсид натрію (НП, "Sigma", США). Вимірювали амплітуду змін тонічного напруження ГМ аорти (у відсотках) від рівня «плато», тобто їх сталого скорочення на НА. Рівень цього скорочення приймали за 100%. Визначали також латентний період (у секундах) розвитку реакції ГМ на агоністи в початковій фазі. Ендотеліальний шар судинного препарату видаляли механічно - легким прокатуванням його по фільтровальному паперу. Після чого його витримували в стані спокою, як правило, 30 хв.

На препаратах ворітної вени вивчали реалізацію залежності довжина - сила ГМ: I група - дорослі тварини - контроль; II - старі тварини; III - дорослі тварини, судинні препарати яких перфузували з додаванням інгібітора NO-синтази метилового ефіру N^ω-нітро-L-аргініну (L-NAME, 10⁻⁵ моль/л; «Sigma», США).

Препарати завдовжки 3-5 мм, товщиною 1-1,5 мм і масою 1-2 мг отримували з ворітної вени печінки тварин після декапітації та розтину черевної порожнини. Судинні смужки вміщували у термостатовану перфузійну камеру об'ємом 1 мл, де їх піддавали початковому пасивному розтягуванню силою 2-2,5 мН протягом 30 хв. Препарати перфузували розчином Кребса при 36,4-37° С. Скорочувальну активність ГМ ворітної вени реєстрували за допомогою механоелектричного перетворювача 6MX1C у режимі, близькому до ізометричного. Смужки ворітної вени дозволено розтягували до 8-14 мН і реєстрували зміну амплітуди фазних скорочень для от-

римання змін залежності довжина - сила ГМ. За допомогою окулярного гвинтового мікрометра МОВ-1-15^x вимірювали довжину смужок. Розраховували довжину м'яза, яка характерна для його максимального скорочення (L_{max}), і жорсткість м'яза, що є співвідношенням приросту скорочувальної сили до змін довжини судинного препарату при його розтягуванні [15].

Результати обробляли методом варіаційної статистики з використанням критерію t Стьюдента. Статистично достовірними вважались значення P < 0,05.

Біохімічні дослідження

В гомогенатах міокарда, аорти, а також в плазмі і еритроцитах крові дорослих щурів віком 6-8 міс і старих щурів віком 24-26 міс визначали вміст активних метаболітів кисню: супероксидного радикала ($\cdot\text{O}_2^-$), гідроксильного радикала ($\cdot\text{OH}$) і пероксиду водню (H₂O₂) та вміст активних метаболітів азоту - стабільних метаболітів оксиду азоту: нітрит-аніона (NO₂⁻) та нітрат-аніона (NO₃⁻). Визначали показники, що характеризують стан плазматичної мембрани клітин - стійкість мембран еритроцитів до кислотного гемолізу (криві гемолізу та індекс стійкості) [7].

Визначення стійкості мембран еритроцитів до кислотного гемолізу. Функційний стан плазматичних мембран еритроцитів оцінювали за допомогою визначення кислотної резистентності еритроцитів кінетичним методом. Суть методу полягає у визначенні динаміки кількості клітин, що гемолізуються під дією слабкої кислоти за певний проміжок часу. Лізис еритроцитів у кислому середовищі включає три основних стадії: проникнення іонів водню (протонів, H⁺) через плазматичну мембрану еритроцитів, протонування гемоглобіну та білків мембрани і, як наслідок останнього, осмотичне руйнування еритроцитів [1]. Цей метод надає можливість оцінити внесок вікових змін у кінетику проходження протона через плазматичну мембрану еритроцитів.

Визначення вмісту H₂O₂. Аліквоти проб (100-250 мкг білка) додавали в кварцеву

кювету (1 см), що містила 2 мл розчину 0,1 моль КJ, надлишок лактопероксидази (50 нмоль) в 0,05 моль фосфатному буфері рН 7,33. Фіксували швидкі зміни екстинції проб при 353 нм. Вміст H_2O_2 виражали в пікомольях на 1 мг білка проби, використовуючи коефіцієнт молярної екстинції $\epsilon = 26000 \text{ моль}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ [17].

Визначення вмісту супероксидного радикала. Вміст $\cdot O_2^-$ у пробах визначали 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 пробамі під час інкубації, визначали, використовуючи коефіцієнт молярної екстинції $\epsilon = 21000 \text{ моль}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ [26].

Визначення вмісту ОН-радикала. Готували інкубаційну суміш (20 ммоль дезоксирибози, 1 ммоль H_2O_2 , 20 ммоль натрійфосфатного буферу, рН 7,4 і проба - 100-250 мкг білка. Інкубували суміш 60 хв при 37° С після чого добавляли 0,5 мл 1 % розчину тіобарбітурувої 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. Вміст ОН-радикала, що генерувався при цьому за 60 хв інкубації, виражали в умовних одиницях $DE \cdot 10^2$ за 60 хв на 1 мг білка проби [14].

Визначення вмісту NO_2^- . Вміст нітританіона (NO_2^-) визначали в безбілкових аліквотах надосадкових після визначення активності NO-синтази або в безбілкових розчинах гомогенатів тканин клітин (вміст білка 20-40 мг/мл) у колориметричній реакції за допомогою реактиву Гріса методом Гріна.

Визначення вмісту NO_3^- . Вміст нітратаніона (NO_3^-) визначали в гомогенатах тканин спектрофотометричним методом у модифікації, де замість стрихніну використовували його гідроксильоване похідне - бруцин, що дозволило підвищити чутливість методу у 100 разів.

Визначення вмісту білка. Вміст загального білка в пробах визначали загальнозжи-

ваним методом Бредфорда, використовуючи барвник Сumassi G-250.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Дослідження показали, що у дорослих щурів ($n=15$) преактивовані НА (10^{-5} моль/л) ГМ грудної аорти після додавання до буферного розчину АХ у концентрації 10^{-6} моль/л завжди відповідали розслабленням (рис.1,а). Амплітуда його в різних експериментах могла коливатися від 50 до 80 %, але в середньому становила $66,3 \% \pm 3,0 \%$. Латентний період розвитку цієї реакції дорівнював $39,3 \text{ с} \pm 4,6 \text{ с}$. Слід зазначити, що розслаблення ГМ відтворювалося лише в тих препаратах аорти, які не мали структурних ушкоджень їх внутрішнього шару - ендотелію. Експериментальне вилучення його змінювало характер реакції. Після цього розслаблення ГМ на АХ, частіше, взагалі не розвивалося, а якщо і було, то з амплітудою в 4-5 разів меншою. В деяких дослідах реєструвалося виключно скорочення ГМ амплітудою 15 %-25 % (див.рис.1,а). Отже, реакція ГМ грудної аорти дорослих щурів віком 6-8 міс на АХ є такою, що залежить від ендотелію.

Встановлено також, що у дорослих щурів НП у концентрації 10^{-4} моль/л завжди викликав розслаблення ГМ грудної аорти амплітудою $87,4 \% \pm 2,4 \%$ і латентним періодом $33,9 \text{ с} \pm 7,2 \text{ с}$ (див.рис.1,а). Деендотелізація препаратів не впливала на характер реакції та показники. Тобто, реакція ГМ грудної аорти дорослих щурів віком 6-8 міс на НП є ендотелійнезалежною (див.рис.1,а).

У старих щурів віком 24-26 міс ($n=14$) реакції ГМ грудної аорти на АХ у досліджуваній концентрації суттєво відрізнялися від таких у дорослих тварин. Тільки у 27 % експериментів зберігалася типова реакція розслаблення судинних м'язів на АХ. Разом з тим, амплітуда її знижувалася майже в 4 рази і в середньому становила $17,4 \% \pm 4,1 \%$. Латентний період збільшувався вдвічі і в середньому був $82,5 \text{ с} \pm 10,0 \text{ с}$ (див.рис.1,б). У більшості експериментів ГМ аорти старих

щурів на АХ реагували стійким підвищенням тонічного напруження, яке за амплітудою перевищувало рівень активації в середньому на $34,4 \% \pm 7,9 \%$. Латентний період реакції становив $79,5 \text{ с} \pm 9,9 \text{ с}$. Цікаво відзначити, що це скорочення ГМ на АХ виявилось ендотелійнезалежним.

На відміну від АХ, не такими радикальними у старих щурів виявилися зміни скорочувальних реакцій ГМ грудної аорти на НП у досліджуваній концентрації. Так, характерне розслаблення ГМ на цю нітросполуку рееструвалося у 100 % експериментів ($n=14$). Його амплітуда практично не змінювалася і в середньому дорівнювала $72,3 \% \pm 9,5 \%$. Хоча, порівняно з дорослими щурами, латентний період збільшувався майже вдвічі і становив $93,4 \text{ с} \pm 10,2 \text{ с}$ (рис.1,б). Після вилучення ендотелію ці реакції зберігалися майже неущкодженними. Тобто, як і у дорослих щурів, вони – ендотелійнезалежні.

Аналіз отриманих результатів свідчить про те, що у щурів віком 24-26 міс реакції ГМ аорти на ендотелійзалежний агоніст мускаринових рецепторів АХ пошкоджуються. За характером і параметрами ці зміни схожі на такі, що мають деендотелізовані препарати тварин віком 6-8 міс. Разом з тим у щурів віком 24-26 міс майже не зазнають змін реакції ГМ аорти на ендотелійнезалежний агоніст нітропрусид натрію. Отже, з віком ГМ аорти не втрачають взагалі свого функціонального призначення - здатності до розслаблення. Порушується тільки той його компонент, який реалізується за участю ендотелію. Таке пригнічення ендотелійзалежних реакцій на холіноміетики і CaCl_2 у щурів віком 22 міс і більше рееструвалося не лише в препаратах аорти, але і в судинах опору тощо. Проте ендотелійнезалежні реакції ГМ на нітросполуку не ушкоджувалися [4, 9, 19, 35]. Цікаво, що подібні ушкодження мали ендотелійнезалежні реакції ГМ на АХ у щурів віком 24-26 міс.

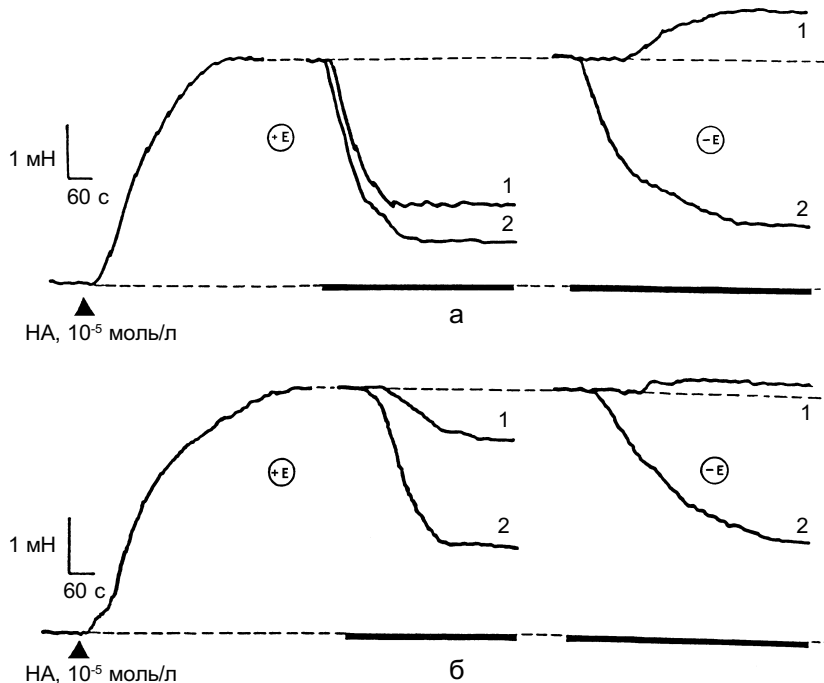


Рис. 1. Вплив ацетилхоліну йодиду (АХ) і нітропрусиду натрію (НП) на скорочувальні реакції гладеньких м'язів (ГМ) ізольованих препаратів грудної аорти щурів віком 6-8 міс (а) та 24-26 міс (б). Стрілкою позначено початок активації ГМ. Темна лінія під кривими відповідає тривалості дії агоністів, переривчаста - напруженню ГМ до (внизу) і після (зверху) їх активації. +Е - реакції препаратів з ендотелієм, -Е - без нього.

телійзалежні дилататорні реакції ГМ різних судин при артеріальній гіпертензії та експериментальній гіперхолестеринемії [5, 13, 32].

Виявлена нами вікова дисфункція ендотелію може бути зумовлена цілою низкою причин. Встановлено, що з віком в ендотелії судин розвиваються структурні uszkodження, збільшується кількість некротичних клітин, виникають симпласти великих ендотеліоцитів, збільшується проникність для білків. На останнє можуть впливати також зміни в екстрацелюлярному матриксі [2, 22]. Разом з цим ушкоджується синтез/чи секреція факторів ендотеліального походження - оксиду азоту і ендотеліального гіперполяризувального фактора [33, 34]. Дефіцит NO виникає в судинах з віком незважаючи на суттєву експресію ендотеліальної NO-синтази. Вважають, що це пов'язано зі збільшенням вмісту пероксинітритів [34].

Ушкодження ендотелійзалежних вазодилаторних реакцій з віком може бути також наслідком змін чутливості холінорецепторів у судинних гладеньком'язових і ендотеліальних клітинах [5]. Деякою мірою це спричинено порушенням балансу між ендотеліальними факторами різного знаку дії.

Порушення ендотеліальної функції можуть бути внаслідок зменшення синтезу NO і, як наслідок, підвищення жорсткості судин, що призводить до підвищення артеріального тиску. Це послужило метою наступного розділу роботи, яка полягала у дослідженні даного припущення на прикладі вивчення жорсткості ГМ при розтягуванні смужок ворітної вени за умов фізіологічного старіння та пригнічення ендотелійзалежного розслаблення.

Додаткове розтягування смужок ворітної вени щурів (при вихідному розтягненні 2 - 2,5 мН) силою 1-14 мН призводило до збільшення амплітуди фазних скорочень і жорсткості ГМ. У контрольній групі L_{max} визначалося при силі розтягування 8 мН. Приріст амплітуди фазних скорочень при цій силі розтягування становив $153,4 \pm 11,2 \%$ відносно вихідного значення. У старих тварин приріст амплітуди сягав максимальних

значень при збільшенні сили розтягування до 6 мН і становив $56,2 \pm 8,1 \%$ відносно вихідного значення, що відповідало L_{max} . Волночас пригнічення NO-синтази за допомогою L-NAME спричинювало істотне зменшення приросту сили скорочень ГМ. Максимальний приріст скорочень при цьому становив лише $20,6 \pm 4,1 \%$ і досягався він при силі розтягування 2 мН.

Таким чином, у тварин II і III груп встановлено зміщення ліворуч максимального приросту амплітуди фазних скорочень при дозованому розтягуванні ГМ. Це свідчить про те, що скорочувальні відповіді ГМ у цих групах щурів відносно контролю відбувалися при менших значеннях сили розтягування. При цьому також зменшувалася відповідь на дозоване розтягування. Подальше збільшення сили розтягування (до 14 мН) викликало зменшення приросту амплітуди фазних скорочень ГМ.

Нахил кривої жорсткості - сила дозованого розтягування ГМ був достовірно більшим у тварин II і III груп порівняно з контролем. Максимальне значення жорсткості ГМ у контролі при силі розтягування 8 мН, що відповідало L_{max} , становило $22,9 \text{ мН} \cdot \text{мг}^{-1} \cdot \text{мм}^{-1} \pm 4,1 \text{ мН} \cdot \text{мг}^{-1} \cdot \text{мм}^{-1}$. У тварин II та III груп при цій же силі розтягування спостерігалось достовірне збільшення жорсткості до $45,3 \pm 7,8$ та $81,5 \text{ мН} \cdot \text{мг}^{-1} \cdot \text{мм}^{-1} \pm 20,9 \text{ мН} \cdot \text{мг}^{-1} \cdot \text{мм}^{-1}$ відповідно.

У разі дії різних агоністів і під впливом механічних факторів ендотелієм вивільняються вазоконстрикторні (ендотелін, лейкотриєни, тромбоцитаривуючий фактор тощо) і вазодилаторні фактори (простациклін, оксид азоту) [3, 8, 9, 18]. Механічні впливи на ендотелій мають прояв при змінах внутрішньосудинного тиску та при ауторегуляторних реакціях у відповідь на розтягування судинної стінки. Ці зміни викликають деформацію цитоскелету ендотеліальних клітин і призводять до вивільнення вазоактивних речовин, які впливають на скорочувальні реакції ГМ. Показано зниження з віком активності ендотеліальної NO-синтази, ферменту, що відпо-

відає за біосинтез оксиду азоту в ендотеліальних клітинах [12], та виявлено метаболічні порушення системи NO, які супроводжуються пригніченням ендотелійзалежних реакцій судин за умов хронічного дефіциту церебрального дофаміну після пошкодження мезостріатної дофамінергічної системи мозку [6].

Таким чином, як свідчать отримані результати, пригнічення системи NO у молодих тварин призводить до змін судинної реактивності, які характерні і для судинних гладеньком'язових препаратів за умов фізіологічного старіння.

Реакції за участю кисню в живій клітині найчастіше відбуваються в активному центрі оксидаз або оксигеназ. У процесі цих реакцій проміжні продукти відновлення кисню не виділяються, а перетворюються до кінцевих стабільних метаболітів. Разом з тим у біологічних системах можуть утворюватися і всі проміжні продукти відновлення молекули кисню: супероксидні радикали, пероксид водню і гідроксильні радикали. Крім активних форм кисню (АФК) у живих організмах утворюються також активні форми азоту (АФА) — оксид азоту (NO[•]) та його стабільні окиснені форми: нітрит-(NO₂⁻) та нітрат-(NO₃⁻) аніони, які можуть впливати на зміну стабільності мембран еритроцитів за умов старіння.

На рис.2 показано кислотні еритрограми та індекс стійкості еритроцитів щурів віком 6-8 та 24-26 міс. Як видно з рисунка, з віком підвищується стійкість мембран еритроцитів щурів до кислотного гемолізу (проникнення протонів в еритроцити). Максимальний гемоліз еритроцитів дорослих щурів відбувався в інтервалі 3-6 хв після його початку, тоді як у старих - в інтервалі 6 - 8,5 хв. Індекс стійкості також достовірно збільшується у старих щурів (358 ± 15 і 533 ± 22 у дорослих і старих щурів відповідно; P<0,001).

Підвищення стійкості плазматичних мембран еритроцитів до кислотного гемолізу передбачає зменшення їхньої деформованості і, тим самим, здатності ефективно доставляти кисень і інші метаболіти до тканин-мішеней.

Швидкість проникнення протона в цитозоль клітин великою мірою залежить від стану окиснення як ліпідних [20], так і білкових [31] компонентів плазматичних мембран і визначається активністю [H⁺]-АТФ і різного типу обмінників [23, 27].

Найбільш відомими ендогенними стабілізаторами гемолізу еритроцитів (в основному досліджено осмотичний гемоліз) є альбумін плазми крові, іони металів K⁺, Na⁺, Mg²⁺ та, особливо, Ca²⁺, що модулюють кана-

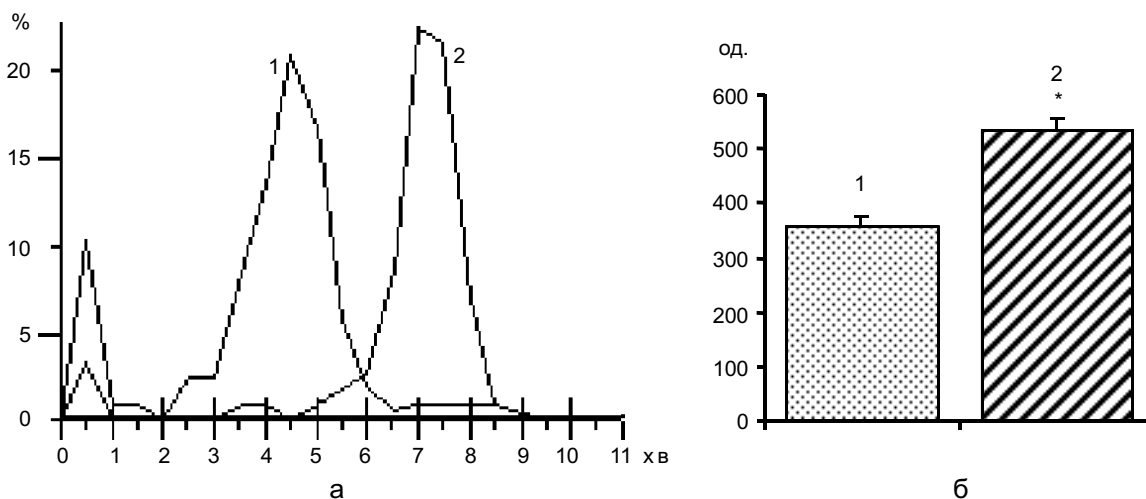


Рис.2. Кислотні еритрограми (а) та індекс стійкості еритроцитів до кислотного гемолізу (б) у щурів різного віку: 1 – 6-8 міс, 2 – 24-26 міс.

ли плазматичної мембрани еритроцитів, в тому числі і протонний канал [10], холестерол, адсорбований на поверхні еритроцитів та поліаміни, що зв'язуються з жирнокислотними залишками фосфоліпідів мембран, тоді як найбільш відомими активаторами ендogenous гемолізу еритроцитів є довогланцюгові жирні кислоти [28] та вільні радикали кисню й азоту [37].

Ми використали модель окисного пошкодження плазматичних мембран еритроцитів АФК та АФА, рівень яких підвищується зі збільшенням віку тварин, для дослідження стабільності мембран еритроцитів. Можливе окисне пошкодження білкових і ліпідних компонентів плазматичної мембрани еритроцитів дійсно могло спостерігатися, оскільки вміст АФК та АФА у самих еритроцитах, як буде показано далі, суттєво збільшувався у старих щурів. В еритроцитах старих тварин значно активувався біосинтез NO, що є активним окисним агентом, особливо гемоглобіну еритроцитів. NO, як і пероксид водню, можливо, відіграє важливу роль у пошкодженні клітин, в тому числі клітин крові, в процесі старіння.

На рис.3, I показано вміст супероксид-аніона в міокарді, аорті, плазмі крові та в еритроцитах щурів залежно від їх віку. У старих щурів вміст супероксид-аніона знижувався в міокарді (див.рис. 3,а) та в еритроцитах (рис. 3, г) і, навпаки, збільшувався в аорті (див.рис. 3,б) та плазмі крові (рис. 3,в). Найбільший приріст вмісту супероксид-аніона (майже в 6 разів) спостерігали в плазмі крові. Всі вищевказані зміни були достовірними.

Основними системами, що генерують супероксид-аніон є комплекс НАДФН-оксидази, ксантинооксидаза та інші оксидази. Для проникнення O_2^- через мембрану необхідна наявність аніонних каналів. Єдиний такий канал поки що встановлений на мембрані еритроцитів. Супероксиддисмутаза перетворює супероксид-аніон у стабільний пероксид водню.

Вміст стабільного метаболіту активного кисню, що ним є H_2O_2 , достовірно збільшувався у всіх досліджених тканинах, причо-

му максимальні рівні (приблизно в 5 разів) підвищення спостерігалися в міокарді (рис. 4,а), плазмі крові та в еритроцитах (див.рис. 3, II). В еритроцитах приріст вмісту H_2O_2 був максимальним.

Пероксид водню відіграє важливу роль у регуляції багатьох фізіологічних процесів. У разі дії каталази H_2O_2 перетворюється в кисень і воду. При наявності металів змінної валентності H_2O_2 неферментативно відновлюється до ОН-радикала.

У процесі старіння спостерігали достовірне підвищення вмісту OH^- у міокарді та в плазмі крові, тоді як в аорті та в еритроцитах вміст гідроксильного радикала не змінювався. В еритроцитах спостерігалось навіть його недостовірне зниження.

ОН-радикал утворюється в реакціях Фентона і Хабера - Вайса, що каталізується іонами металів змінної валентності (Fe^{2+} , Cu^{2+}). Він є нестабільним і надзвичайно агресивним індуктором (ініціатором) перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) у мембранах клітин. Крім ініціації ПОЛ він є агентом, що пошкоджує структуру нуклеїнових кислот, білків і вуглеводів.

Крім вищевказаних реакцій неферментативного перетворення H_2O_2 у ОН-радикал, останній може утворюватися також при взаємодії супероксидного радикала з NO. Пероксинітрит, який при цьому утворюється, надалі при наявності вільних протонів, розпадається з утворенням ОН-радикала та нітрат-аніона.

Нітрит-аніон утворюється при окисненні NO в оксигенованих водних розчинах. Зміни вмісту нітрит-аніона, що є стабільним окисненим метаболітом NO і є одним із чинників АФА в досліджених тканинах у процесі старіння, показано на рис. 4, I. У міокарді старих щурів, а також в аорті та в плазмі крові вміст NO_2^- достовірно знижувалися (максимально в серці). В еритроцитах крові старих щурів, навпаки, спостерігали достовірне підвищення вмісту цього аніона.

Нітрат-аніон утворюється в клітинах неферментативно при розпаді пероксинітри-

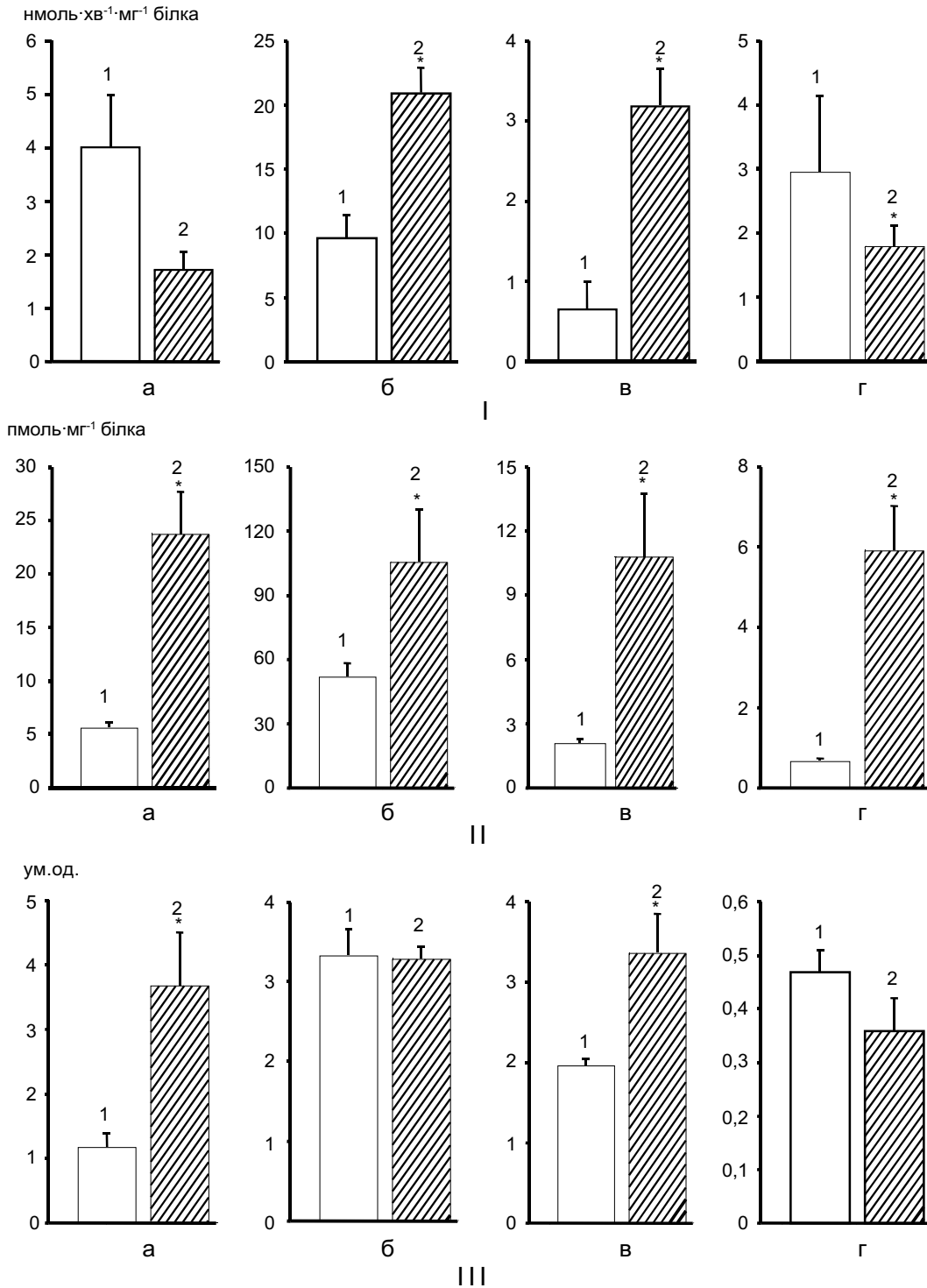


Рис. 3. Зміни вмісту супероксид-аніона ($\text{O}_2^{\cdot-}$) [I], H_2O_2 [II] та гідроксил-радикала ($\text{OH}\cdot$) [III] в міокарді (а), аорті (б), плазмі крові (в) та еритроцитах (г) щурів залежно від їх віку : 1 – 6-8 міс, 2 – 24-26 міс. Ум.од. = $\text{DE} \cdot 102 \cdot 30 \text{ хв}^{-1} \cdot \text{мг}^{-1}$ білка.

ту, а також ферментативно при окисненні NO оксигемоглобіном, оксиміоглобіном, ксантиноксидазою та іншими ферментами. Він є кінцевою формою обміну NO в організмі, може або виводитися з організму з сечею, або служити субстратом для синтезу оксиду азоту в редуктазних реакціях.

Слід зазначити, що вміст нітрат-аніона достовірно знижуються в міокарді, аорті, плазмі крові та в еритроцитах. Максимальне зниження вмісту нітрат-аніона спостерігали в аорті старих щурів (див. рис. 4,II).

Таким чином, у процесі старіння, як правило (за винятком еритроцитів), рівні АФА знижуються. Дані літератури щодо цього питання нечисленні і суперечливі [16, 29, 36]. Головною причиною зниження в клітинах різних органів і в плазмі крові вміст нітрит- і нітрат-аніонів у старих щурів може бути підвищення в них вмісту іонів кальцію, що відбувається при старінні. Добре відомо [21], що саме підвищення вмісту цитозольного кальцію вище від фізіологічних спричиняє пригнічення синтезу оксиду азоту із L-аргініну за дії NO-синтаз.

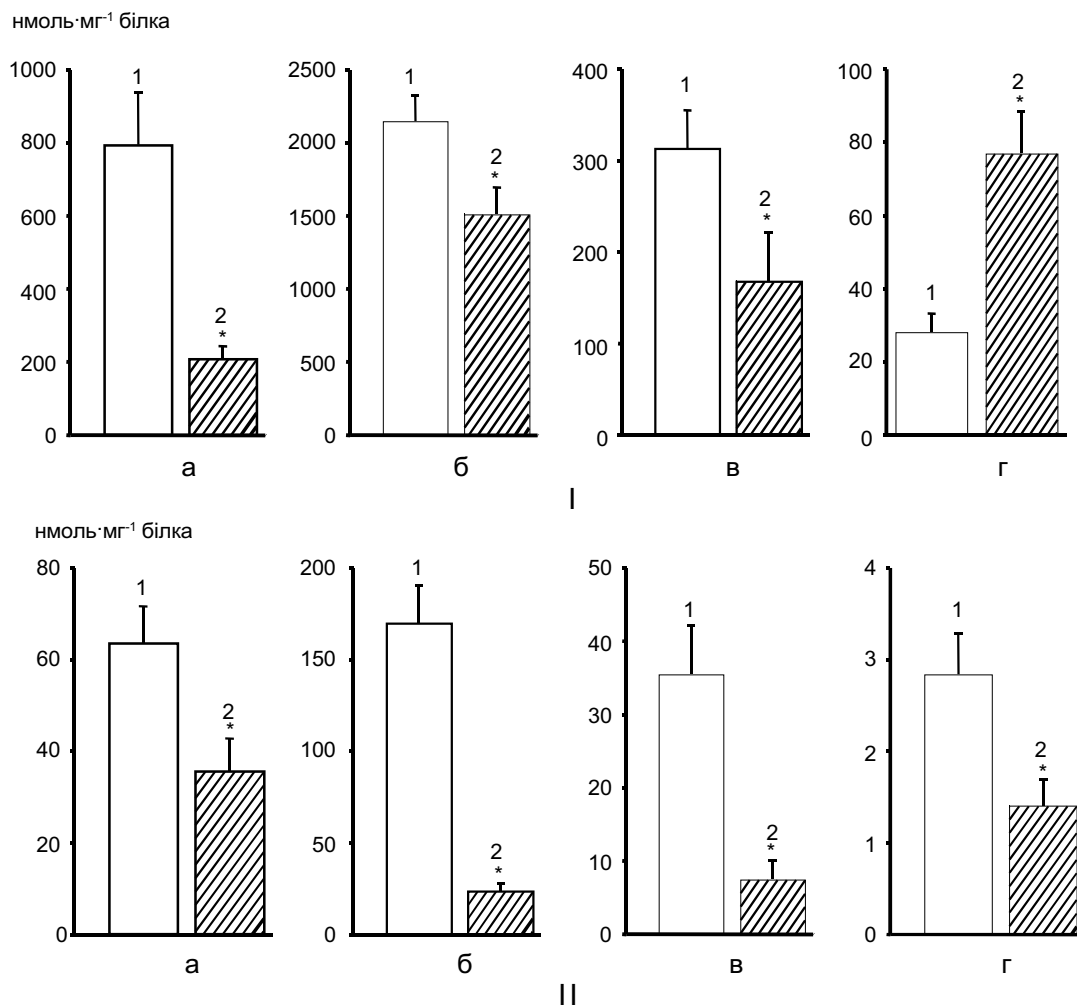


Рис. 4. Зміни вмісту NO_2^- (I) та NO_3^- (II) в міокарді (а), аорті (б), плазмі крові (в) та еритроцитах (г) щурів залежно від їх віку: 1 – 6-8 міс, 2 – 24-26 міс.

ВИСНОВКИ

1. Встановлено, що у старих тварин ушкоджується насамперед ендотелійзалежні судинні реакції. Ця вікова дисфункція ендотелію, що призводить до пригнічення NO-залежної регуляції судинного тону, є реальним фактором ризику вазоспастичних реакцій.

2. Пригнічення системи NO у дорослих тварин спричинює зміни судинної реактивності, що притаманні і судинним препаратам за умов фізіологічного старіння.

3. Визначено, що з віком істотно змінюється вміст активних форм кисню (O_2^- , H_2O_2 , OH^\cdot) та азоту (NO_2^- , NO_3^-) у міокарді, аорті, плазмі крові і еритроцитах щурів, а також стан плазматичної мембрани еритроцитів.

Роботу виконано за підтримки ДФФД України (проект 05.07/00159).

**M.N. Tkachenko, V. F. Sagach,
A.V. Kotsjuruba, O. V. Baziljuk,
A. M. Buchanevich, E.F. Meged,
L. G. Stepanenko**

ENDOTHELIUM-DEPENDENT CONTRACTILE REACTIONS OF VASCULAR SMOOTH MUSCLES AND CONTENT OF FREE RADICALS OF OXYGEN OF RATS IN AGING

Endothelium-dependent and endothelium-independent reactions of vascular smooth muscles were studied in isolated preparations of thoracic part of aorta and portal vein of rats of two age groups – 6-8 mo. (control) and 24-26 mo. (old animals). In old rats the disturbances occurred primarily in endothelium-dependent vascular reactions. This age-related dysfunction of endothelium resulted in inhibition of NO-dependent regulation of vascular tone. Age-related changes in the state of plasmic membranes of erythrocytes were established using a method of acid hemolysis. Age-related changes in the levels of active forms of oxygen (O_2^- , H_2O_2 , OH^\cdot) and nitrogen (NO_2^- , NO_3^-) were determined in the myocardium, aorta, blood plasma and erythrocytes of adult and old animals.

A.A. Bogomoletz Institute of Physiology National Academy of Sciences of Ukraine,

A.A. Bogomoletz National Medical University,

A.V. Palladin Institute of Biochemistry National Academy of Sciences of Ukraine; Kiev

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Заводник И.Б., Пилецкая Т.П. Кислотный лизис эритроцитов человека // Биофизика. - 1997. - **42**, вып. 5. - С. 1106-1112.
2. Копылова Г. В., Кожура И. П. Особенности изменения эндотелия аорты старых кроликов при введении адреналина // Патол. физиология и эксперим. терапия. - 1990. - № 1. - С. 35-36.
3. Мойбенко О.О., Сагач В.Ф., Шаповал Л.М. та ін. Роль ендотелію та біологічно активних речовин ендотеліального походження в регуляції кровообігу і діяльності серця // Фізіол. журн. - 1997. - **43**, № 1-2. - С. 3-18.
4. Сагач В.Ф., Базілюк О.В., Коцюруб А.В., Буханевич О.М. Порушення ендотелійзалежних реакцій, аргіназного та NO-синтазного шляхів обміну L-аргініну при артеріальній гіпертензії // Там само. - 2000. - **46**, № 3. - С. 3-13.
5. Сагач В.Ф., Соловійов А. І., Базілюк О. В. та ін. Ендотелій-залежні судинні реакції у кролів під час тривалої експериментальної гіперхолестеринемії // Там само. - 1994. - **40**, № 2. - С. 73-82.
6. Сагач В.Ф., Ткаченко М.М., Шаповал М.В. Залежність довжина-сила судинних гладеньких м'язів та система оксиду азоту за умов хронічного дефіциту мезостриатного дофаміну // Там само. - 1999. - **45**, № 6. - С. 3-11.
7. Терсков И.А., Гиттельзон И.И. Метод химических (кислотных) эритрограмм // Биофизика. - 1957. - 2, вып. 2. - С. 259-266.
8. Ткаченко М.М. Оксид азоту та судинна регуляція // Журн. АМН України. - 1997. - **3**, № 2. - С. 241-254.
9. Фролькис В.В., Безруков В.В., Кульчицкий О.К. Старение и экспериментальная патология сердечно-сосудистой системы. - К.: Наук. думка, 1994. - 248 с.
10. Anderson D.R., Davis J.L., Carraway K.L. Calcium-promoted changes of the human erythrocyte membrane // J. Biol. Chem. - 1977. - **252**, № 19. - P. 6617-6623.
11. Corman B., Duriez M., Poitevin P. et al. Aminoguanidine prevents age-related arterial stiffening and cardiac hypertrophy // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. - 1998. - **95**, № 3. - P. 1301-1306.
12. Cernadas M.R., Sanchez de M.L., Garcia-Duran M. et al. Expression of constitutive and inducible nitric oxide synthases in the vascular wall of young and aging rats // Circulat. Res. - 1998. - **83**, № 3. - P. 279-286.
13. Chamiot-Clerc P., Renaud J. F., Safar M. E. Pulse pressure, aortic reactivity, and endothelium dysfunction in old hypertensive rats // Hypertension. - 2001. - **37**, № 2. - P. 313-321.
14. Conte D., Narindrasorasa K.S., Sarkar B. In vivo and in vitro iron-replaced zinc finger generates free radicals and causes DNA damage // J. Biol. Chem. - 1996. - **271**, № 9. - P. 5125-5130.

15. Drown D.P., Heistad D. Capacitance of the rabbit portal vein and inferior vena cava // J. Physiol. (London). - 1986. - **381**. - P. 417-425.
16. Hill C. Basal and stimulated NO in control of kidney function in the aging rat // Amer. J. Physiol. - 1997. - **272**, № 6. - P. 1747-1761.
17. Huwiler M., Kohler H. Pseudo-catalytic degradation of hydrogen peroxide in the lactoperoxidase/H₂O₂/iodide system // Eur. J. Biochem. - 1984. - **141**, № 1. - P.69-74.
18. 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.
19. 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.
20. Kellogg E.W., Fridovich I. Liposome oxidation and erythrocyte lysis by enzymically generated superoxide and hydrogen peroxide // J. Biol. Chem.-1977. - **252**, № 19. - P. 6721-6728.
21. Kiemer A.K., Vollmar A.M. Elevation of intracellular calcium levels contributes to the inhibition of NO-production by atrial natriuretic peptide // Immunol. Cell. Biol. - 2001. - **79**, № 1. - P. 11-17.
22. Kunz J. Initial lesions of vascular aging disease (arteriosclerosis) // Gerontology. - 2000. - **46**, № 6. - P. 295-299.
23. Lukacs G.L., Kapus A., Nanda A. et al. Proton conductance of the plasma membrane: properties, regulation and functional role // Amer. J. Physiol. - 1993. - **265**, № 1. - P. C3-14.
24. Marin J., Rodrigues-Martinez M.A. Age-related changes in vascular responses // Exp. Gerontol. - 1999. - **34**. - P. 503-512.
25. Matz R.L., Schott C., Stoclet J.C., Andrian-tsitohaina R. Age-related endothelial dysfunction with respect to nitric oxide, endothelium-derived hyperpolarizing factor and cyclooxygenase products // Physiol. Res. - 2000. - **49**. - P. 11-18.
26. McCord J.M., Fridovich I. A quantitative test for superoxide radicals produced in biological systems // Biochem. J. - 1982. - **203**, № 3. - P. 551-558.
27. Petrov V., Lijnen P. Regulation of human erythrocyte Na⁺/H⁺ exchange by soluble and particulate guanylat cyclase // Amer. J. Physiol. - 1996. - **271**. - P. C1556-1564.
28. Rabszynska M., Csordas A. Chain length-dependent interaction of free fatty acids with the erythrocyte membrane // Life Sci. - 1989. - **44**, № 9. - P. 625-632.
29. Reckelhoff J.F. Age related changes in renal hemodynamics in fetal rats: role of multiple pregnancy and NO // Amer. J. Physiol. - 1997. - **272**, № 6. - P. 1985-1994.
30. Safar M., Duriez M., Corman B., Levy B. Endothelium-dependent changes in arterial diameter in old normotensive rats // Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. - 2001. - **28**, № 5-6. - P. 371-375.
31. Sato Y., Kamo S., Takahashi T., Suzuki Y. Mechanism of free radical - induced hemolysis of human erythrocytes: hemolysis by water-soluble radical initiator // Biochemistry. - 1955. - **34**, № 28. - P. 8940-8949.
32. Soloviev A. I., Stefanov A. V., Bazilyuk O. V., Sagach V. F. Phospholipid vesicles (liposomes) restore endothelium-dependent cholinergic relaxation in thoracic aorta from spontaneously hypertensive rats // J. Hypertension. - 1993. - **11**. - P. 623-627.
33. Toprakci M., Ozmen D., Mutaf I., Turgan N., Parildar Z., Habif S., Bayindir O. Age-associated changes in nitric oxide metabolites nitrite and nitrate // Int. J. Clin. Lab. Res. - 2000. - **30**, № 2. - P. 83-85.
34. Van der Loo B., Labugger R., Skepper J. N., Bachschmid M., Kilo J., Powell J. M. et al. Enhanced peroxynitrite formation is associated with vascular aging // J. Exp. Med. - 2000. - **192**, № 12. - P. 1731-1744.
35. Vargas F., Osuna A., Fernandez-Rivas A. Abnormal renal vascular reactivity to acetylcholine and nitroprusside in aging rats // Gen. Pharmacol. - 1997. - **8**, № 1. - P. 133-137.
36. Vernet D., Bonavera I.I., Swerdloff R.S. et al. Spontaneous expression of iNOS in the hypothalamus and other regions of aging rats // Endocrinology. - 1998. - **139**, № 7. - P. 3254-3261.
37. Wollong T. Prolongation of bleeding time by acute hemolysis in rats: a role for NO // Amer. J. Physiol. - 1997. - **272**, № 6. - P. 2875-2879.

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

Нац. мед. ун-т ім. О.О. Богомольця;

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

Матеріал надійшов до редакції 6.06.2002.