УДК 611.12.73+616.12-008.331.1+577.152.1:3

**М.М. Ткаченко, В.Ф. Сагач, О.В. Базілюк,
А.В. Коцюруба, Г.М. Поперека, Л.Г. Степаненко, О.Ф. Сенюк**

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

На препаратах аорты мышей линии BALB/c двух возрастных групп (6 и 18 мес), которые родились и на протяжении всей своей жизни находились в условиях Чернобыльской зоны отчуждения изучали особенности изменений эндотелийзависимых и эндотелийнезависимых сосудистых реакций расслабления, а также содержание свободных радикалов кислорода и стабильных метаболитов оксида азота (NO). Показано, что у этих животных отсутствуют эндотелийзависимые реакции расслабления гладких мышц аорты на ацетилхолин и частично повреждены эндотелийнезависимые реакции на нитропруссид натрия. У старых мышей в условиях пребывания в зоне отчуждения почти в 4 раза уменьшилось содержание высокомолекулярных нитрозотиолов, что свидетельствует об истощении депо NO в аорте. Вследствие этого снижения увеличивается часть как нитрит-аниона, так и низкомолекулярных нитрозотиолов в общей сумме эндогенных доноров NO в аорте старых животных. Содержание низкомолекулярных нитрозотиолов уменьшается более чем в 3 раза у старых мышей при действии малых доз радиации. У них также существенно увеличиваются уровни активных форм кислорода – супероксидного и гидроксильного радикалов, тогда как содержание H_2O_2 не изменяется.

ВСТУП

Найбільш радіочутливим елементом судинної стінки є її внутрішній шар – ендотелій, який є важливою ланкою регуляції судинного тонусу завдяки синтезу та вивільненню вазоактивних речовин [2, 3, 9]. Одним з основних медіаторів судинної реактивності є оксид азоту (NO) [4–6, 8, 19].

NO може відігравати двояку роль у пострадіаційних ефектах. З одного боку, його антиоксидантні властивості передбачають виконання ним захисної функції, яка полягає у взаємодії з радіаційно-індукованими радикалами та зменшенні їх кількості, з іншого боку, при підвищенні вмісту NO утворюються продукти метаболізму (такі, як пероксинітрит), що мають високу токсичність та агресивність.

Дисфункція ендотелію за умов старіння та дії радіаційного фактора значною мірою пов'язана з абсолютним або відносним дефіцитом ендотеліального NO, який може бути зумовлений пригніченням експресії NO-синтаз (NOS), зниженням синтезу NO ендотеліальною NOS (eNOS), нестачею субстратів чи коферментів для синтезу NO, інактивацією NO вільними радикалами, синтезом ендогенних інгібіторів NOS, прискореним апоптозом і порушенням електричних реакцій ендотеліальних клітин. Усе це послаблює дію NO та ендотеліальних вазоконстрикторних факторів на судинні гладенькі м'язи (ГМ) [6, 10, 12, 16, 23, 24, 26, 31].

© М.М. Ткаченко, В.Ф. Сагач, О.В. Базілюк, А.В. Коцюруба, Г.М. Поперека, Л.Г. Степаненко, О.Ф. Сенюк

Мета нашої роботи полягала у дослідженні ендотелійзалежних та ендотелійнезалежних скорочувальних реакцій і стан ендогенних рівнів активних метаболітів кисню та азоту в аорті мишей лінії BALB/c при старінні за умов постійного перебування в зоні відчуження.

МЕТОДИКА

Фізіологічні дослідження

Дослідження проведено на препаратах аорти мишей ліній BALB/c, які народилися і протягом усього свого життя перебували за умов зони відчуження (тварини знаходилися у віварії МНТЦ "Укриття" НАН України, лабораторія експериментальної радіобіології і засобів радіозахисту, м. Чорнобиль).

Миші лінії BALB/c [1] чутливі до дії радіації: для самців летальна доза становила 50/30<5,7 Гр, для самок – 5,85 Гр. 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. Встановлено, що цей показник (за β-активними 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, $^{238-240}Pu$, ^{241}Am у шару грунту 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 $^{238–240}Pu$ коливається від 2 до 3 кБк/м^2, ^{241}Am – від 4 до 6,6 кБк/м^2, ^{90}Sr – від 100 до 180 кБк/м^2, ^{137}Cs – від 200 до 510 кБк/м^2. Співвідношення вказаних радіонуклідів є наступним: ^{90}Sr – 30 %, ^{137}Cs – 68 %, ^{241}Am – 0,3 %, $^{238–240}Pu$ – 0,3 %.

Використано мишей-самців масою 20–22 г: I група (контроль) – дорослі тварини (6 міс); II – старі тварини (18 міс). Після декапітації у мишей вилучали грудну аорту, яку ретельно препарували під мікроскопом і нарізали на сегменти з урахуванням циркулярної орієнтації її гладеньком'язового шару (під кутом приблизно 45°). Ширина такого кільцевого сегмента не перевищувала 1 мм, маса – 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, $NaHCO_3$ – 16,3, NaH_2PO_4 – 1,38, $CaCl_2$ – 2,5, $MgCl_2$ – 1,05, глюкоза – 7,8, тріс – 10,0, pH 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 6МХ1С у режимі, що наближався до ізометричного. Активацію ГМ здійснювали додаванням до буферного розчину норадреналіну ($2\cdot10^{-5}$ моль/л, «Sigma», США). Сталий рівень цього скорочення («плато») приймали за 100 %. Від нього проводили розрахунки змін амплітуди розслаблення ГМ (у відсотках) на ендотелійзалежний (ацетилхолін йодид, 10^{-5} моль/л, «Sigma», США) і ендотелійнезалежний (нітропрусид натрію, 10^{-4} моль/л, «Sigma», США) агоністи.

Біохімічні дослідження

У гомогенаті аорти дорослих і старих мишей визначали вміст активних метаболітів кисню: супероксидного радикала ($^{\cdot}O_2^-$), гідроксильного радикала ($^{\cdot}OH^-$), пероксиду водню (H_2O_2), активних метаболітів азоту [(нітрит-аніона (NO_2^-) та нітрат-аніона (NO_3^-)].

Визначення вмісту H_2O_2. Аліквоти проб (100–250 мкг білка) додавали в кварцеву кювету (1 см), що містила 2 мл розчину 0,1 моль KJ, надлишку лактопероксидази (50 нмоль) у 0,05 моль фосфатному буфері

(pH 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 є = 26000 моль$^{-1}$ см$^{-1}$.

Визначення вмісту супероксидного радикала. Вміст $\cdot O_2^-$ в пробах визначали за окисненням цитохрому С у 10 ммоль трісбуфері (pH 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 є = 21000 моль$^{-1}$ см$^{-1}$.

Визначення вмісту ОН-радикала. Готували інкубаційну суміш [20 ммоль дезоксирибози, 1 ммоль H_2O_2, 20 ммоль натрій-фосфатного буфера, pH 7,4 і проба (100–250 мкг білка)]. Інкубували суміш 30 хв при 37° С після чого 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. 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 [9, 14].

Визначення вмісту NO_2^-, низькомолекулярних і високомолекулярних нітрозотіолів (НМНТ, ВМНТ). Спочатку досліджували за класичним методом Гріна [7], використовуючи реактив Гріса, сумарний вміст нітрит-аніона у гомогенаті аорти (вільний NO_2^- + NO_2^-, що утворюється при гідролізі НМНТ і ВМНТ). Аліквоту гомогенату гідролізували компонентом реактиву Гріна, що містить катіон Hg^{2+} протягом 18 год, потім отримували безбілкові проби, осаджуючи білок хлорною кислотою в кінцевій концентрації 0,5 моль/л $HClO_4$. 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 катіоном Hg^{2+} для гідролізу НМНТ. Отримували значення A_2 (A_2 = вільний NO_2^- + НМНТ).

Визначання вмісту вільного NO_2^-. У безбілкових аліквотах гомогенатів аорти за допомогою реактиву Гріна без катіонів 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 нітрат-аніона (NO_3^-) визначали в безбілкових аліквотах гомогенату аорти спектрофотометричним методом у нашій модифікації, де замість запропонованого авторами стрихніну ми використовували його гідроксильоване похідне – бруцин, що дозволило значно підвищити чутливість методу [7, 14].

Визначення вмісту сечової кислоти. Вміст сечової кислоти визначали за допомогою стандартної добірки реактивів вітчизняного виробництва (фірма "Філісит Діагностика", Дніпропетровськ).

Визначення вмісту тромбоксану B_2 (TxB_2) і лейкотрієну 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 загальновживаним методом Бредфорда, використовуючи барвник Cumassi G-250.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Нині вже добре відомо, що агоніст мускаринових рецепторів ацетилхолін завжди викликає розслаблення ГМ судин людини і багатьох тварин за умов цілісного ендотелію. За нашими результатами, наприклад, у щурів амплітуда його дорівнює 65,0 % ± 3,5 % від заданого рівня активації. Це розслаблення зумовлено дією NO, що синтезується ендотеліем. Після вилучення

ендотелію воно зникає або замість нього реєструється скорочення ГМ. Різні нітросполуки також відомі як вазодилататори. Так, згідно з нашими даними, розслаблення ГМ аорти щурів на нітропрусид натрію становить 77,0 % ± 4,5 % і навіть після деендотелізації препаратів не зазнає змін [10]. Тобто, реакція ГМ аорти на ацетилхолін є такою, що залежить від збереження структурної і функціональної організації ендотелію, а на нітропрусид – не залежить. Тому ці загальноприйняті положення були використані нами для тестування функціональної активності ендотелію та ГМ судин мишей.

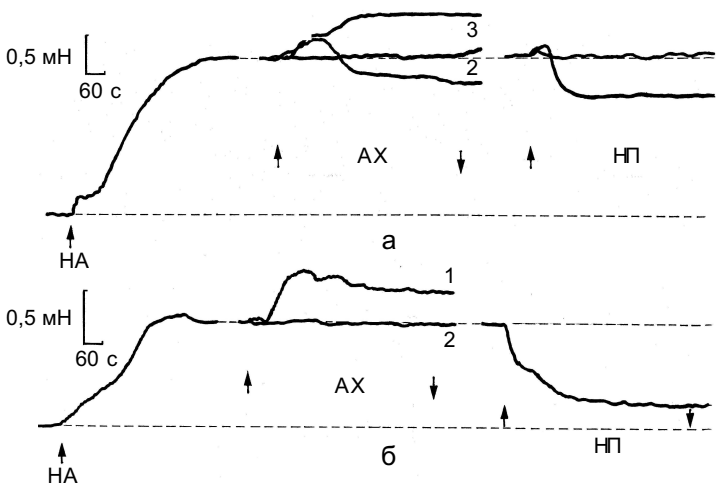
Було проведено дві серії експериментів.

І серія дослідів: 6-місячні миші. Дослідження проведено на ізольованих кільцевих препаратах грудної аорти 6 дорослих мишей лінії BALB/c (n=11). Встановлено, що притаманне різним судинам людини та більшості тварин залежне від ендотелію і NO-індуковане розслаблення ГМ на ацетилхолін у дорослих білих мишей з зони відчуження відсутнє зовсім. Замість нього було виявлено декілька типів реакцій ГМ аорти (рисунок): 1) у 4-х дослідах (36 %) протягом всього періоду впливу ацетилхоліну (8–10 хв) спостерігалося стійке скорочення ГМ амплітудою, в середньому 37,0 % ± 2,5 %; 2) в одному досліді (9 %) це скорочення ГМ, амплітудою вдвічі меншою ніж у попередньому випадку, утримувалося тільки перші 3 хв впливу ацетилхоліну (тобто було транзиторним) після чого формувалося розслаблення амплітудою 16 %; 3) у 6-ти дослідах (55 %) змін тонічного напруження ГМ на ацетилхолін взагалі не було.

Ендотелійнезалежний агоніст – донор NO нітропрусид натрію (n=11) у 8 дослідах (73 %) викликав розслаблення преактивованих норадреналіном ГМ грудної аорти амплітудою, в середньому 36,4 % ± 5,2 %. Воно було стійким, тобто утримувалося весь період (10 хв) впливу нітросполуки. В 3-х дослідах зміни тонічного напруження ГМ на цей агоніст були відсутні (див. рисунок).

Слід зазначити, що виявлені ушкодження ацетилхолінових і нітропрусидіндукованих реакцій були не тільки у різних мишей, а часто навіть на різних препаратах однієї і тієї ж тварини.

ІІ серія дослідів: 18-місячні миші. Дослідження проведено на ізольованих кільцевих препаратах грудної аорти 5-ти старих мишей лінії BALB/c. Встановлено, що ендотелійзалежного розслаблення ГМ



Ендотелійзалежні (ацетилхолін йодид, АХ, 10^{-5} моль/л) і ендотелійнезалежні (нітропрусид натрію, НП, 10^{-4} моль/л) скорочувальні реакції преактивованих норадреналіном (НА, $2 \cdot 10^{-5}$ моль/л) гладеньких м'язів ізольованих препаратів грудної аорти дорослих (а) та старих (б) мишей лінії BALB/c. Стрілками позначено початок і кінець впливу досліджуваних агоністів. 1,2,3 – різні типи реакцій гладеньких м'язів на них. Розрив між кривими відповідає 10 хв

на ацетилхолін у концентрації 10^{-5} моль/л (n=7) ні в одному досліді взагалі не виникало. У 86 % дослідів реєструвалося виключно стійке скорочення ГМ амплітудою від 25 до 90 % від сталого рівня їх активації. В середньому воно становило 48,3 % ± 3,7 %. Тільки в одному досліді ніяких змін тонічного напруження ГМ на ацетилхолін не відбувалося (див. рисунок).

Перфузія досліджуваних препаратів розчином, що містив донор NO нітропрусид натрію (n=7), в 100 % призводила до розслаблення ГМ грудної аорти, амплітуда якого в середньому дорівнювала 70,7 % ± 2,1 % (див. рисунок). У поодиноких дослідах вона могла коливатися від 20 до 80 %.

Аналіз отриманих результатів вказує на те, що у дорослих і старих мишей лінії BALB/c із зони відчуження ендотелійзалежні реакції розслаблення ГМ грудної аорти на ацетилхолін взагалі відсутні. Замість них реєструються такі реакції, що виникають при ушкодженні ендотелію. Тобто, незалежно від віку мишей, утримування їх в зоні відчуження спричиняє певні порушення в ендотелії судин. Подібні зміни, за нашими даними, відбуваються, наприклад, при гіпертензії, атеросклерозі, старості, внаслідок впливу малих доз радіації тощо [5–11]. Вони зумовлені різними морфофункціональними змінами в ендотелії. Цілком можливо, що за час перебування в зоні відчуження аерозольно, з їжею та водою миші досліджуваних груп отримували і накопичували певні дози опромінення. Вважається, що на ранніх етапах опромінення саме ендотелій є безпосередньою його мішенню. Серед імовірних причин виявлених нами змін ендотелійзалежних судинних реакцій у мишей можна виділити такі. Ендотелій може ушкоджуватися механічно тому, що при радіації збільшується в'язкість крові і, відповідно, напруга зсуву. За таких умов може активуватися перекисне окиснення ліпідів і пригнічуватися власний антиоксидантний захист. Певно змінюється синтетична функція ендотелію, виникає дисбаланс між ендотеліальними факторами різного знаку дії – виникає дефіцит вазодилататорних (NO, простациклін) або надлишок вазоконстрикторних (ендотеліни, тромбоцитактивуючий фактор, ангіотензін II, тромбоксан A_2 тощо) факторів. Цілком можливі ушкодження механізмів трансендотеліального переносу на гладеньком'язові клітини різних речовин, а також зміни їх чутливості до ендотеліальних факторів. Через збільшення в'язкості мембран при радіації можуть ушкоджуватися М-холінорецептори, зменшуватись активність мембранозв'язаних ферментів, а також проникність мембран.

Разом з тим прямі (без участі ендотелію) реакції розслаблення ГМ на донор NO нітропрусид натрію у дорослих мишей ушкоджені тільки частково (в 27 % дослідах). У реалізації цієї реакції беруть участь сульфгідрильні групи – SH. Виснаження останніх усувається різними тіолами (цистеїн, глутатіон тощо). Вважають, що після радіаційного впливу запаси тіолів можуть зменшуватися тому, що вони самі є потужними акцепторами вільних радикалів. Отже, попри все, у ГМ аорти дорослих мишей здатність до розслаблення зберігається. У старих мишей ендотелійнезалежні реакції відтворюються в 100 % дослідів з амплітудою майже вдвічі більшою, ніж у дорослих мишей.

Таким чином, у дорослих і старих мишей лінії BALB/c з Чорнобильської зони відчуження взагалі відсутні ендотелійзалежні реакції розслаблення ГМ грудної аорти на ацетилхолін, що свідчить про ушкодження ендотеліальної функції. Ендотелійнезалежні реакції розслаблення ГМ на нітропрусид натрію у дорослих мишей ушкоджені частково, а у старих відтворюються у всіх дослідах з амплітудою вдвічі більшою, ніж у дорослих мишей.

Виявлена вікова «потенціація» амплітуди і частоти відтворення прямих NO-індукованих реакцій ГМ грудної аорти старих білих мишей на нітросполуки, пов'язана,

певно, з поки що невідомими «радіаційними» змінами біохімічного гомеостазу серцево-судинної системи. Різний ступінь ушкодження ендотелійзалежних реакцій розслаблення ГМ грудної аорти у дорослих мишей лінії BALB/c є наслідком неоднакової їх чутливості до отриманого опромінення під час перебування в зоні відчуження.

Дослідження вмісту вільних радикалів кисню та стабільних метаболітів оксиду азоту в аорті у мишей ліній BALB/c віком 6 і 18 міс

Супероксидний радикал ($^{\cdot}O_2^-$) генерується: а) ксантиноксидазою (ксантин + O_2 → сечова кислота + $^{\cdot}O_2^-$); б) NO-синтазою (разом з NO за умов недостатньої забезпеченості L-аргініном (L-аргінін + $2O_2$ → цитрулін + NO + $^{\cdot}O_2^-$); в) ліпоксигеназою при окисненні вільної арахідонової кислоти (АК) (АК + O_2 → лейкотриєн A_4 + $^{\cdot}O_2^-$); г) циклооксигеназою при окисненні АК (АК + O_2 → PbH_2 + $^{\cdot}O_2^-$) та багатьма іншими ферментами, а також у мітохондріях.

У старих мишей ліній BALB/c значно підвищується вміст сечової кислоти і TxB_2 (продукту циклооксигеназного шляху окиснення АК), але не LTC_4 (продукту ліпоксигеназного шляху окиснення АК) (табл. 1). Як відомо [18, 28, 30], сечова кислота утворюється в ксантиноксидазній реакції одночасно з супероксидним аніоном (гіпоксантин + O_2 → ксантин + $^{\cdot}O_2^-$; ксантин + O_2 → сечова кислота + $^{\cdot}O_2^-$).

Сечова кислота, з одного боку, є пасткою для пероксинітриту через утворення сполуки, яка може бути довготривалим циркулюючим донором NO, а з іншого боку – є інгібітором ксантиноксидази, тобто антиоксидантом, що пригнічує утворення $^{\cdot}O_2^-$. Проте у великих кількостях він може утворюватися за умов дії ліпоксигенази (АК + O_2 → LTC_4 + $^{\cdot}O_2^-$), циклооксигенази (АК + O_2 → TxB_2 + $^{\cdot}O_2^-$), а також NO-синтази.

Таким чином, генерація $^{\cdot}O_2^-$ у старих мишей лінії BALB/c за умов постійної дії низьких доз радіації в зоні відчуження посилюється (табл. 2) в основному внаслідок підвищення активності ксантиноксидази і циклооксигенази, але не NO-синтази, оскільки вміст стабільних метаболітів NO при цьому знижується (табл. 4, 5).

Токсична дія $^{\cdot}O_2^-$ обумовлюється:

а) утворенням $^{\cdot}OH$-радикала в реакціях Хабер–Вайса [14]:

$2^{\cdot}O_2^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$

$^{\cdot}O_2^- + Fe^{3+} \rightarrow O_2 + Fe^{2+}$

$Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow {}^{\cdot}OH + OH^- + Fe^{3+}$.

б) утворенням $^{\cdot}OH$-радикала та діоксиду азоту ($^{\cdot}NO_2$) при розпаді пероксинітриту (ONOOH) при наявності протонів:

$^{\cdot}O_2^- + NO \rightarrow ONOO^- + H^+ \rightarrow ONOOH \rightarrow {}^{\cdot}NO_2 + {}^{\cdot}OH$ [15].

Обидва ці процеси (а та б) інтенсифікуються при старінні, про що свідчить значне підвищення швидкості генерації не лише $^{\cdot}O_2^-$, але і, особливо, $^{\cdot}OH$-радикала, як це видно з табл. 2. $^{\cdot}OH$-радикал утворюється також при радіолізі води за умов дії радіації.

"Оксидативний парадокс", що спостерігається у старих мишей за постійної дії малих доз радіації (значне підвищення генерації ініціатора ПОЛ – $^{\cdot}OH$-радикала і незначне посилення самого процесу ПОЛ) вказує, що основним місцем реалізації токсичної дії $^{\cdot}OH$-радикала є не ініціація ПОЛ, а пошкодження нуклеїнових кислот і білків (утворення окиснених метаболітів у складі полімерів, наприклад гідрокситирозину у

Таблиця 1. Вміст продуктів ферментативного окиснення ліпідів і пуринів в аорті мишей різного віку за умов постійної дії малих доз радіації (M ± m; n=10)

Група тварин	Сечова кислота, нмоль/мг білка	Тромбоксан B_2, пмоль/мг білка	Лейкотриєн C_4 пмоль/мг білка
Дорослі миші	5,42 ± 0,70	5,92 ± 1,36	6,70 ± 1,13
Старі миші	20,61 ± 2,82***	13,10 ± 2,43*	9,42 ± 1,65

Примітка. Тут і в табл. 2–6 *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001.

Таблиця 2. Продукція вільних радикалів кисню в аорті мишей різного віку за умов постійної дії малих доз радіації (M ± m; n=10)

Група тварин	$^{\cdot}O_2^-$, нмоль·хв$^{-1}$·мг$^{-1}$ білка	H_2O_2, пмоль/мг білка	$^{\cdot}OH$ $\Delta E \cdot 10^3$ за 60 хв/мг білка
Дорослі миші	4,71 ± 0,6	13,8 ± 1,2	2,73 ± 0,52
Старі миші	16,5 ± 1,43**	13,6 ± 2,0	23,80 ± 3,88***

складі білків, чи 8-гідроксигуаніну у складі РНК чи ДНК). Ще одним шляхом утилізації $^{\cdot}OH$-радикала у старих мишей може бути перетворення його на гідроксиланіон ($^{\cdot}OH^-$) для нейтралізації надлишкових протонів (H^+), які генеруються в цих умовах при взаємодії з пероксинітрит-аніоном:

$$^{\cdot}OH + ONOO^- \rightarrow {}^{\cdot}NO + O_2 + OH^-.$$

Оксид азоту, що звільнюється при цьому, взаємодіє не з O_2 з наступним утворенням NO_2^-, а з O_2^-, який інтенсивно генерується у старих тварин у різних ферментативних реакціях, з утворенням ще однієї молекули пероксинітрит-аніона, що може в свою чергу знов реагувати з $^{\cdot}OH$-радикалом для його нейтралізації і перетворення в OH^--аніон. Отже, при дії низьких доз радіації у старих мишей може функціонувати не описаний досі циклічний протекторний механізм мета якого є знешкодження токсичної дії ОН-радикала за допомогою NO.

Таким чином, у старих мишей за умов дії малих доз радіації у зоні відчуження протягом тривалого часу в аорті відбувається посилення генерації гідроксильного радикала ($^{\cdot}OH^-$), який, швидше за все, утилізується в процесах окиснення білків і нуклеїнових кислот, що викликає дисфункцію ендотелію. Ще однією причиною ендотеліальної дисфункції за цих умов може бути посилена утилізація NO не для активації розчинної гуанілатциклази і утворення цГМФ, а для "нейтралізації" супероксидного радикала ($^{\cdot}O_2^-$), який утворюється в надлишкових кількостях за дії різних ферментативних процесів.

Вміст пулів $^{\cdot}O_2^-$ і H_2O_2 в аорті регулюють ферменти антиоксидантного захисту – супероксиддисмутаза, що каталізує утворення H_2O_2 із $^{\cdot}O_2^-$ і каталаза, що каталізує розпад H_2O_2 на O_2 і H_2O [14].

У загальній сумі активних метаболітів кисню ($^{\cdot}O_2^-$, H_2O_2, $^{\cdot}OH$) частка H_2O_2 у старих мишей знижується більше ніж удвічі, тоді як частка $^{\cdot}OH$-радикала, навпаки, збільшується майже в 4 рази. Частка $^{\cdot}O_2^-$ залишається без змін (табл. 3). Ці результати вказують на те, що у старих мишей за умов дії малих доз радіації в зоні відчуження: а) інтенсифікується неферментативне перетворення H_2O_2 в $^{\cdot}OH$-радикал у реакціях Хабер–Вайса; б) можлива інтенсифікація утворення пероксинітритної кислоти і її розпаду з утворенням $^{\cdot}OH$-радикала ($^{\cdot}O_2^- + NO \rightarrow ONOOH \rightarrow {}^{\cdot}NO_2 + {}^{\cdot}OH$).

Оксид азоту утворюється як при окисненні L-аргініну за умов дії NO-синтаз (L-аргінін + O_2 → цитрулін + NO), так і при відновленні (ферментативному за дії нітрат- і нітритредуктаз активності ксантиноксидази, а також неферметативному при наявності NADH, аскорбінової кислоти та багатьох інших сполук) окиснених стабільних

Таблиця 3. Частка (%) вільних радикалів кисню в аорті мишей різного віку за умов постійної дії малих доз радіації (M ± m; n=10)

Група тварин	Сума вільних радикалів	$^{\cdot}O_2^-$	H_2O_2	$^{\cdot}OH$
Дорослі миші	21,24 ± 2,32	22,2 ± 2,9	64,0 ± 5,7	12,8 ± 2,5
Старі миші	53,90 ± 7,31*	30,6 ± 2,6	25,2 ± 4,8*	44,2 ± 7,2**

Таблиця 4. Вміст стабільних метаболітів NO в аорті мишей різного віку за умов постійної дії малих доз радіації (M ± m; n=10)

Група тварин	NO_2^-, пмоль/мг білка	Нітрозотіоли, пмоль/мг білка		NO_3^-, нмоль/мг білка
		низькомолекулярні	високомолекулярні	
Дорослі миші	54,6 ± 1,6	62,2 ± 3,8	2300,2 ± 464,5	10,2 ± 2,0
Старі миші	54,5 ± 4,8	74,9 ± 11,6	612,9 ± 146,2**	9,1 ± 1,3

метаболітів NO ($NO_3^- \rightarrow NO_2^- \rightarrow NO$). Крім того, NO може утворюватися при взаємодії $^{\cdot}OH$-радикала з пероксинітритом [12] і остання реакція особливо актуальна для ситуації, коли обидві ці сполуки інтенсивно утворюються, як і в нашому випадку за хронічної дії малих доз радіації у старих мишей:

$$^{\cdot}OH + ONOO^- \rightarrow {}^{\cdot}NO + O_2 + OH^-.$$

Важливість цієї реакції полягає в тому, що NO, який в ній утворюється (окремий шлях, незалежний ні від активності NO-синтази, ні від редуктазної активності ксантиноксидази) за умов оксидативного стресу, що відбувається за умов старіння і дії радіації буде взаємодіяти не з киснем, утворюючи нітрит-аніон ($NO + O_2 \rightarrow N_2O_3 + H_2O \rightarrow 2NO_2^- + 2H^+$), а утворювати той же нітрит-аніон, але через взаємодію з діоксидом азоту, тим самим нейтралізуючи його токсичну дію за ініціацією ПОЛ, а також окисного пошкодження білків і нуклеїнових кислот:

$$^{\cdot}NO + {}^{\cdot}NO_2 \rightarrow N_2O_3 + H_2O \rightarrow 2NO_2^- + 2H^+.$$

Таким чином, вільнорадикальні продукти розпаду пероксинітриту ($^{\cdot}OH$ і $^{\cdot}NO_2$) у кінці кінців утворюють як $^{\cdot}NO$, так і його стабільний метаболіт – нітрит-аніон (NO_2^-). При розпаді пероксинітриту може утворюватися також нітрат-аніон (NO_3^-) [27]:

$$^{\cdot}NO + {}^{\cdot}O_2^- \rightarrow ONOO^- + H^+ \rightarrow ONOOH \rightleftarrows HNO_3 \rightarrow H^+ + NO_3^-.$$

Отже, узагальнюючи, можна сказати, що одним із шляхів утилізації $^{\cdot}O_2^-$ в аорті мишей є утворення як стабільних метаболітів NO (NO_2^- і NO_3^-), так і вільних радикалів – оксиду азоту ($^{\cdot}NO$), гідроксильного радикала ($^{\cdot}OH$) і діоксиду азоту ($^{\cdot}NO_2$). Як $^{\cdot}NO_2$, так і $^{\cdot}OH$ є ініціаторами ПОЛ, ранніми продуктами якого є дієнові кон'югати, а кінцевим – малоновий діальдегід. При старінні незначно збільшується лише вміст дієнових кон'югатів (табл. 6).

Таблиця 5. Частка (%) ендогенних донорів NO в аорті мишей різного віку за умов постійної дії малих доз радіації (M ± m; n=10)

Група тварин	Сума донорів NO	NO_2^-	Нітрозотіоли	
			низькомолекулярні	високомолекулярні
Дорослі миші	2417,0 ± 468,3	2,2 ± 0,3	2,6 ± 0,3	95,2 ± 19,2
Старі миші	742,3 ± 162,6**	7,3 ± 0,9**	10,1 ± 1,6**	82,6 ± 14,9

Як NO_2^-, так і низько- та високомолекулярні тіоли є ендогенними донорами для синтезу $^{\cdot}NO$ в аорті – NO_2^- внаслідок його відновлення з ксантиноксидазою [17, 25], а нітрозотіоли – внаслідок процесу декомпозиції (звільнення NO). Останній процес також каталізується ксантиноксидазою,

Таблиця 6. Вміст продуктів неферментативного перекисного окиснення ліпідів у аорті мишей різного віку за умов постійної дії малих доз радіації (M ± m; n=10)

Група тварин	Дієнові кон'югати, нг/мг білка	Малоновий діальдегід, нмоль/мг білка
Дорослі миші	27,82 ± 3,58	25,76 ± 2,42
Старі миші	48,98 ± 7,64*	33,41 ± 5,61*

супероксиддисмутазою і $\cdot O_2^-$ [13, 20, 21, 29].

Ми оцінили зміни пулів НМНТ і ВМНТ в аорті за умов постійної дії малих доз радіації у зоні відчуження у старих мишей лінії BALB/c (див. табл. 4) і встановили значне зниження вмісту лише ВМНТ, що супроводжується збільшенням частки вільного NO_2^- і НМНТ (див. табл. 5).

Отже, не виключено, що зниження вмісту ВМНТ (нітрозилювання за SH-групами білків) відбувається внаслідок декомпозиції білкових нітрозотіолів (звільнення NO) за умов підвищеної генерації супероксидного аніона й активації ксантиноксидази, адже останні здатні прискорювати цей процес [13, 20, 21, 22, 29].

ВИСНОВКИ

1. У дорослих (6 міс) і старих (18 міс) мишей лінії BALB/c, які постійно перебували в зоні відчуження, взагалі відсутні ендотелійзалежні реакції розслаблення ГМ грудної аорти на ацетилхолін йодид, що свідчить про ушкодження ендотеліальної функції. Ендотелійнезалежні реакції розслаблення ГМ на нітропрусид натрію у дорослих мишей ушкоджені частково, а у старих відтворюються у всіх дослідах з амплітудою вдвічі більшою, ніж у дорослих мишей.

2. У старих мишей за умов перебування в зоні відчуження значно (майже в 4 рази) зменшується вміст ВМНТ в аорті, що свідчить про значне виснаження депо NO в аорті.

3. Внаслідок зниження вмісту ВМНТ збільшується (більше ніж утричі) частка як нітрит-аніону, так і НМНТ у загальній сумі ендогених донорів NO в аорті старих мишей. Остання знижується більше ніж в 3 рази у старих мишей за умов постійної дії малих доз радіації.

4. У старих мишей значно збільшується вміст активних радикалів кисню (супероксидного та гідроксильного), тоді як вміст їх стабільного метаболіту – H_2O_2 – не змінюються. В аорті генерація $\cdot O_2^-$ збільшується в ксантиноксигеназній реакції ($\cdot O_2$ + ксантин > $\cdot O_2^-$ + сечова кислота) і в циклооксигеназній (АК + $O_2 \rightarrow \cdot O_2^- + PGH_2 \rightarrow TxB_2$), але не в ліпоксигеназній реакції (АК + $O_2 \rightarrow O_2^- + LTA_4 \rightarrow LTC_4$).

Роботу виконано при частковій підтримці Державного Фонду фундаментальних досліджень України (договір № Ф7/372-2001).

M.N. Tkachenko, V.F. Sagach, O.V. Baziljuk, A.V. Kotsuruba, G.M. Popereka, L.G. Stepanenko, O.F. Senjuk

AGE-RELATED PECULIARITIES OF CONTRACTILE VASCULAR REACTIONS AND THE CONTENT OF FREE RADICALS OF OXYGEN AND METABOLITES OF NITRIC OXIDE IN BALB/c MICE IN CONDITIONS OF ALIENATION ZONE

Peculiarities of changes of the endothelium-dependent and endothelium-independent vascular reactions of relaxation, and the content of oxygen free radicals and stable metabolites of nitric oxide (NO) were studied in the aorta preparations of BALB/c mice of the two age groups (6 and 18 months), which were born and lived in the Chernobyl alienation zone. The results obtained showed no endothelium-dependent reactions of aortal smooth muscles relaxation to acetylcholine and only partially impaired endothelium-independent reactions to sodium nitroprusside in animals of both age groups. There was a significant decrease in the content of high-molecular nitrosothiols (HMNT) in old animals, which may signify a depletion of NO depot in the aorta. A decrease of HMNT levels induced an increase of the shares of anion nitrite and low-molecular nitrosothiols (LMNT) in the total amount of endogenous donors of NO in the aorta of old animals. Exposure of old animals to low doses of radiation resulted in an over 3-fold increase of LMNT. In old mice the levels of oxygen active forms, superoxide and hydroxyl radicals increase, while the level of H_2O_2 remained unchanged.

A.A.Bogomolets Institute of Physiology, National Academy of Science of Ukraine, Kyiv, Ukraine
A.A.Bogomolets National Medical University, Kyiv, Ukraine
A.V. Palladin Institute of Biochemistry, National Academy of Science of Ukraine, Kyiv, Ukraine
Institute for Safety of Atomic Power Stations, National Academy of Science of Ukraine, Kyiv, Ukraine

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Бландова З.К., Душкин В.А., Малашенко А.Н. и др. Линии лабораторных животных для медико-биологических исследований. – М.: Наука, 1983. – 180 с.
2. Воробьёв Е.И., Степанов Р.П. Ионизирующие излучения и кровеносные сосуды. – М.: Энергоатомиздат, 1985. – 296 с.

3. Лобанок Л.М., Лукша Н.П. Влияние гипоксии и аноксии на эндотелий-зависимые дилататорные реакции аорты крыс, подвергнутых воздействию низкоинтенсивных γ-излучений // Радиац. биология. Радиоэкология. – 2002. – **42**, № 2. – С. 498–502.
4. Капелько В.И. Регуляторная роль кислородных радикалов в миокардиальных клетках // Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. – 2004. – 90, № 6. – С. 681–692.
5. 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.
6. Мойбенко О.О., Сагач В.Ф., Ткаченко М.М. та ін. Фундаментальні механізми дії оксиду азоту на серцево-судинну систему як основи патогенетичного лікування її захворювань // Там само. – 2004. – **50**, № 1. – С. 11–30.
7. Сагач В.Ф., Базілюк О.В., Коцюруба А.В., Буханевіч О.М. Порушення ендотелій-залежних реакцій, аргіназного та NO-синтазного шляхів обміну L-аргініну при артеріальній гіпертензії // Там само. – 2000. – **46**, № 3. – С. 3–13.
8. Ткаченко М.М. Оксид азоту та судинна регуляція // Журн. АМН України. – 1997. – **3**, № 2. – С. 241–254.
9. Ткаченко М.Н., Сагач В.Ф. Влияние малых доз радиации на сократительные ответы сосудистых гладких мышц при растяжении // Биофизика. – 1997. – **42**, вып. 3. – С. 729–732.
10. Ткаченко М.М., Сагач В.Ф., Коцюруба А.В. та ін. Ендотелійзалежні скорочувальні реакції гладеньких м'язів і вміст вільних радикалів кисню у щурів за умов старіння // Фізіол. журн. – 2002. – **48**, № 4. – С. 3–13.
11. Фролькис В.В., Базилюк О.В., Сыкало Н.В. Роль эндотелия в возрастных изменениях реакций сосудов к действию физиологически активных веществ и гипоксии // Пробл. старения и долголетия. – 1993. – **3**, № 2. – С. 83–90.
12. Фролькис В.В., Безруков В.В., Кульчицкий О.К. Старение и экспериментальная патология сердечно-сосудистой системы. – К.: Наук. думка, 1994. – 248 с.
13. Aleryani S., Milo E., Rose Y., Kostka P. Superoxide-mediate decomposition of biological S-nitrosothiols // J. Biol. Chem. – 1998. – **273**, № 11. – P. 6041–6045.
14. Basaga H.S. Biochemical aspects of free radicals // Cell. Biol. – 1990. – **68**, № 5. – P. 989–998.
15. Beckman J.S., Beckman J.W., Chen J. et al Apparent hydroxyl radical production by peroxinitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1990. – **87**, № 7. – P. 1620–1624.
16. Gajdusek C., Onoda K., London S. et al. Early molecular changes in irradiated aortic endothelium // J. Cell Physiol. – 2001. – **188**, № 1. – P. 8–23.
17. Godber B.L, Doel J.J., Sapkota G.P. et al. Reduction of nitrite to nitric oxide catalyzed by xanthine oxidoreductase // J. Biol. Chem. – 2000. – **275**, № 11. – P. 7757–7763.
18. Honston M., Chumley P., Radi R. et al. Xanthine oxidase reaction with nitric oxide and peroxynitrite // Arch. Biochem. and Biophys. – 1998. – **355**, № 1. – P. 1–8.
19. 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.
20. Jourd'honil D., Mai C.J., Laroux F.S. et al. The reaction of S-nitrosogluthathione with superoxide // Biochem. and Biophys. Res. Commun. – 1998. – **244**, № 2. – P. 525–530.
21. Jourd honil D., Laroux F.S., Miles A.M. et al Effect of superoxide dismutase on the stability of S-nitrosothiols // Arch. Biochem. and Biophys. – 1999. – **361**, № 2. – P. 323–330.
22. Jrujillo M., Alvarez M.N., Peluffo G. et al. Xanthine oxidase – mediated decomposition of S-nitrosothiols // J. Biol. Chem. – 1998. – 273, № **14**. – P. 7828–7834.
23. 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.
24. 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.
25. Lee C.I., Lin X., Zweier J.L. Regulation of xanthine oxidase by nitric oxide and peroxynitrite // J. Biol. Chem. – 2000. – **275**, № 3. – P. 9369–9376.
26. Marin J., Rodrigues-Martinez M.A. Age-related changes in vascular responses // Exp. Gerontol. – 1999. – **34**. – P. 503–512.
27. Pfiffer S., Gorren A.C.F., Schmidt K. et al. Metabolic fate of peroxynitrite in aqueous solution. Reaction with nitric oxide and pH-dependent decomposition to nitrite and oxygen in 2:1 stoichiometry // J. Biol. Chem. – 1997. – **272**, № 6. – P. 3465–3470.
28. Radi R., Jan S., Prodanov E. et al. Inhibition of xanthine oxidase by uric acid and its influence on superoxide radical production // Biochem. Biophys. Acta. – 1992. – **1122**, № 1. – P. 178–182.
29. Singh R.J., Hogg N., Goss S.P. et al. Mechanism of superoxide dismutase/H_2O_2 – mediated nitric oxude release from S-nitrosoglutathione // Arch. Biochem. and Biophys. – 1999. – **372**, № 1. – P. 8–15.
30. Smith R.C., Lawing L. Antioxidant activity of uric acid 3-N-ribosyluric acid with unsaturated fatty acid // Ibid. – **223**, № 1. – P. 166–172.
31. Toprakci M., Ozmen D., Mutaf I. et al. Age-associated changes in nitric oxide metabolites nitrite and nitrate // Int. J. Clin. Lab. Res. – 2000. – **30**, № 2. – P. 83–85.

Ін-т фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ;
Нац. мед. ун-т ім. О.О. Богомольця, Київ;
Ін-т біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України, Київ;
Ін-т проблем безпеки атом. електростанцій НАН України, Чорнобиль

Матеріал надійшов до редакції 15.04.2005