

Л. І. Маковецька, О. Б. Ганжа, Н. К. Родіонова, М. О. Дружина, В. М. Михайленко

*Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р. Є. Кавецького НАН України, Київ***ДИНАМІКА ВІЛЬНОРАДИКАЛЬНИХ ПРОЦЕСІВ У ТВАРИН ПІСЛЯ ТРИВАЛОГО ВПЛИВУ ОКСИДІВ АЗОТУ ТА ІОНІЗУЮЧОГО ВИПРОМІНЮВАННЯ**

Досліджували вплив оксидів азоту та/або малих доз іонізуючої радіації на перебіг вільнорадикальних процесів у периферичній крові та печінці щурів. Показано, що фракціоноване опромінення викликає тимчасову інтенсифікацію вільнорадикальних процесів у крові тварин, у той час як тривала інгаляція оксидів азоту призводить до більш значних змін. Це свідчить про різні шляхи порушення окисного метаболізму, зумовлених генерацією активних форм кисню (АФК) (у першому випадку), чи активних форм азоту (у другому) у тканинах організму.

Ключові слова: малі дози іонізуючої радіації, оксиди азоту, супероксидний радикал, вільнорадикальні процеси, ферменти антиоксидантного захисту.

Екологічна ситуація в Україні призводить до погіршення стану здоров'я та скорочення тривалості життя жителів різних регіонів. Гострої актуальності набуває дослідження комбінованої дії малих доз іонізуючої радіації (МДІР) та оксидів азоту (ОА) як найпоширеніших антропогенних забруднювачів довкілля, особливо враховуючи той факт, що існує кореляція між ростом забруднення навколишнього середовища канцерогенними факторами фізичної і хімічної природи та збільшенням онкологічного ризику [1, 2]. Сумісна дія фізичних і хімічних мутагенів довкілля може мати специфічний характер та істотно модифікувати/ускладнювати формування патології різного генезу. При цьому розвиток низки патологій реалізується через порушення інтенсивності вільнорадикального окиснення у тканинах живих організмів [3 - 8].

Метою даної роботи є дослідження впливу ОА та МДІР на вільнорадикальний гомеостаз в організмі ссавців.

Матеріали та методи дослідження

При дослідженні використано 60 білих нелінійних щурів-самців масою 120 - 150 г розведення віварію ІЕПОР НАН України. Щури були розділені на чотири експериментальні групи: 1) інтактний контроль; 2) інгаляція ОА; 3) МДІР; 4) комбінована дія ОА та МДІР. Дослідження проведені відповідно до "Загальних принципів роботи на тваринах", схвалених І Національним конгресом з біоетики (Київ, Україна, 2001). Фракціоноване рентгенівське опромінення (0,1 Гр × 10 кожні три доби) тварин здійснювали на апараті РУМ-17: напруга на трубіці 200 кВ, струм 10 мА, фільтр 0,5 мм Cu + 1 мм Al, шкірно-фокусна відстань 50 см, потужність дози опромінення 0,89 Гр/хв; сумарна поглинута доза

становила 1,0 Гр. Інгаляційна затравка щурів ОА проводилась протягом 30 діб у камері об'ємом 100 л, в яку разом з повітрям подавався NO (150 мг/м³ повітря, 14 год на добу, 6 діб на тиждень). Подачу повітря здійснювали зі швидкістю, що забезпечувала в камері 3-разовий газообіг за годину. За комбінованої дії опромінення здійснювали через 2 - 3 год після інгаляції ОА кожні 3 доби.

Дослідження проводили після припинення дії ОА і МДІР на 1-шу, 12-ту та 18-ту доби.

Загальний стан вільнорадикальних процесів окиснення у крові в нормі та після дії зазначених чинників досліджували методом індукованої пероксидом водню хемілюмінесценції (ХЛ) [9] на хемілюмінометрі ХЛМ1Ц-01 з ФЕП-130 у термостатованій кюветі при температурі 25 °С. Аналізували світлосуму реакції (за 5 хв), яка свідчить про прооксидантно-антиоксидантне співвідношення хімічних продуктів у досліджуваній пробі.

Вміст *малонового діальдегіду* (МДА) в периферичній крові та печінці щурів, що свідчить про рівень кінцевих продуктів пероксидного окиснення ліпідів, визначали методом [10].

Рівень *генерації* O₂^{•-} визначали в суспензії клітин печінки ХЛ методом [11] з використанням індикатора люцигеніну, який реагуючи з O₂^{•-} висвічує кванти світла, що і фіксується приладом.

Каталазну активність у периферичній крові та печінці щурів визначали методом [12], а *активність супероксиддисмутази* (СОД) методом [13].

Результати досліджень

У біологічних об'єктах розвиток вільнорадикальних процесів (ВРП) супроводжується ХЛ, рівень якої залежить від функціонального стану різних систем організму. Інтегральний метод

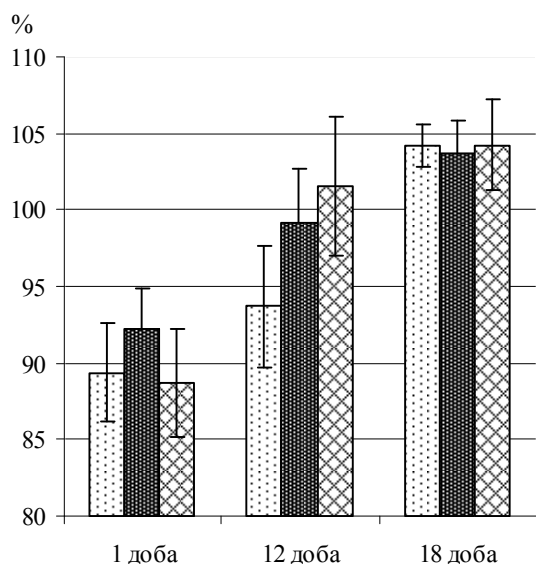
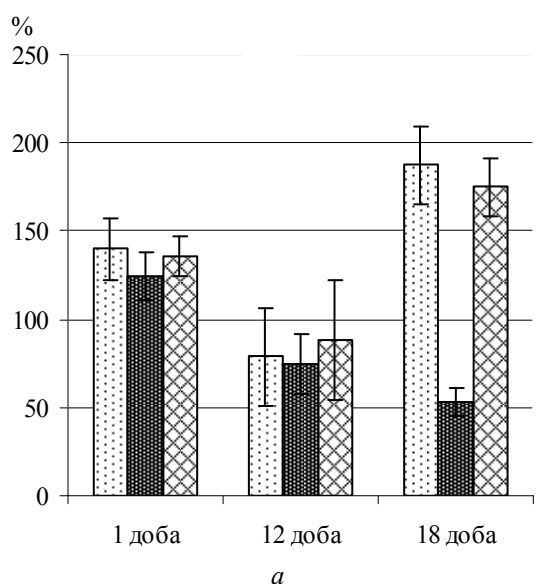


Рис. 1. Світлосума світіння (%) гемолізатів щурів після фракціонованого впливу ОА, МДР і ОА + МДР (100 % – контроль): □ – ОА; ■ – МДР; ▣ – ОА + МДР.



індукованої ХЛ гемолізатів відображає баланс про- і антиоксидантів у системі і дозволяє спостережати за динамікою змін окисного метаболізму за дії різних чинників. Тривала фракціонована дія ОА на 1-шу добу призводить до пригнічення окисних процесів у периферичній крові (рис. 1). У подальшому (12-а, 18-а доба) відмічається їхня поступова нормалізація. Фракціоноване опромінення тварин суттєво не впливає на співвідношення про- і антиоксидантів у периферичній крові. Очевидно, одноразові гострі опромінення (10 сГр) з інтервалом у 3 доби відчутно не порушують окисний метаболізм: індукована радіацією кількість радикальних продуктів (в основному АФК) швидко інактивується присутніми у крові ферментними і неферментними антиоксидантами.

Цим зумовлена і незначна кількість утворення ТБК-активних продуктів у плазмі крові після дії радіації (рис. 2, а).

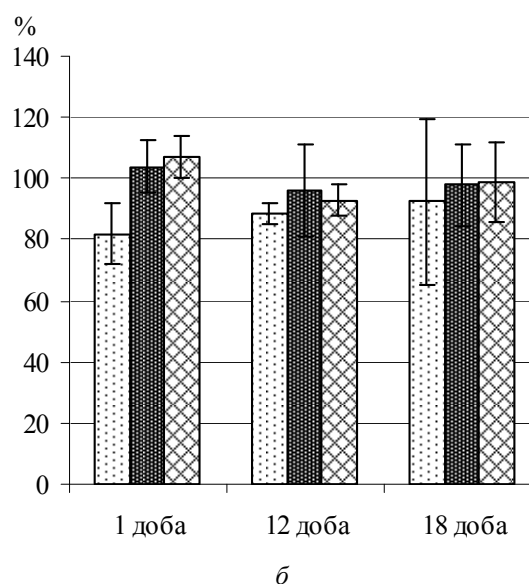


Рис. 2. Рівень ТБК-активних продуктів (%) у периферичній крові (а) та печінці (б) щурів після фракціонованого впливу ОА, МДР і ОА + МДР (100 % – контроль): □ – ОА; ■ – МДР; ▣ – ОА + МДР.

Проявом відтермінованої (12-а, 18-а доба) захисної реакції на фракціоноване опромінення може бути збільшення в периферичній крові кількості еритроцитів з великим вмістом каталази. Тривала дія ОА створює в організмі гіпоксичні умови, внаслідок чого продукти одноелектронного відновлення кисню призводять до збільшення ТБК-активних продуктів. Це свідчить про значне порушення окисних процесів (зривом регуляторних механізмів), що і до 18-ї доби не відновлюються. Тривала фракціонована інгаляція ОА (порівняно з дією малих доз радіації) викликає більш глибокі порушення метаболізму з накопиченням токсичних продуктів. За сумісної дії інтегральний ефект порушень окисного метаболізму зумовлений переважно оксидами азоту.

У печінці дослідних тварин в усі терміни спостереження за дією досліджуваних чинників рівень ТБК-активних продуктів коливається в межах контрольного (див. рис. 2, б). Це свідчить про потужний антиоксидантний потенціал гепатоцитів, у мембранах ендоплазматичного ретикулуму яких функціонує система окисної детоксикації ксенобіотиків.

Беручи до уваги, що супероксид (O_2^-), який утворюється в процесі окисного фосфорилування та окисної детоксикації у гепатоцитах, є індуктором пероксидних процесів, ми вивчали інтенсивність його генерації після дії досліджуваних чинників (рис. 3). Радіація ініціює утворення в тканинах організму надлишку супероксиду [14]. Проте, очевидно, як після кожного сеансу, так і

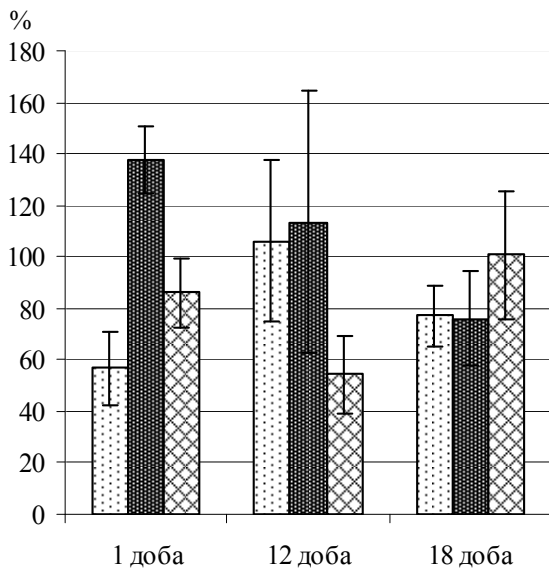


Рис. 3. Інтенсивність генерації супероксидного аніон-радикала (%) у печінці щурів після фракціонованого впливу ОА, МДР та ОА + МДР (100 % – контроль): □ – ОА; ■ – МДР; ▣ – ОА + МДР.

після всього курсу фракціонованого опромінення окисний метаболізм у гепатоцитах швидко відновлюється. З одного боку, це свідчить, що променева інтенсифікація вільнорадикального окиснення швидко “гаситься” ферментативними та неферментативними антиоксидантними системами, що не впливає на подальший перебіг окисних процесів у гепатоцитах. З іншого боку,

такий вплив не спричиняє суттєвих деструктивних змін у гепатоцитах, щоб стимулювати в мітохондріях клітин напрацювання АТФ, необхідного для репаративних процесів.

Курс ОА на 1-шу добу пригнічує метаболізм у печінці щурів. Але вже на 12-ту добу відмічали його нормалізацію. Сумісна фракціонована дія ОА та МДР на значно більший термін уповільнює (гальмує) окисні процеси у гепатоцитах. Їх не відновлення до нормального рівня спостерігали лише на 18-ту добу.

Генерація супероксиду після опромінення зумовлена радіолізом води, у той час як за тривалої дії екзогенного ОА окисний метаболізм загальмований унаслідок зниження парціального тиску кисню в повітрі камери за рахунок збільшення ОА. При цьому екзогенні ОА, взаємодіючи з O_2^- , утворюють агресивний пероксинітрил ($ONOO^-$) [15]. Тобто ми спостерігаємо різні шляхи розвитку вільнорадикальної патології: радіаційний – з генерацією O_2^- та інших радикалів і гіпоксичний – із надлишком екзогенного ОА, що призводить до утворення, головним чином, пероксинітриту [14].

Для з'ясування регуляції окисного метаболізму антиоксидантними ферментними системами після дії досліджуваних чинників визначали активність СОД і каталази у периферичній крові та печінці дослідних щурів.

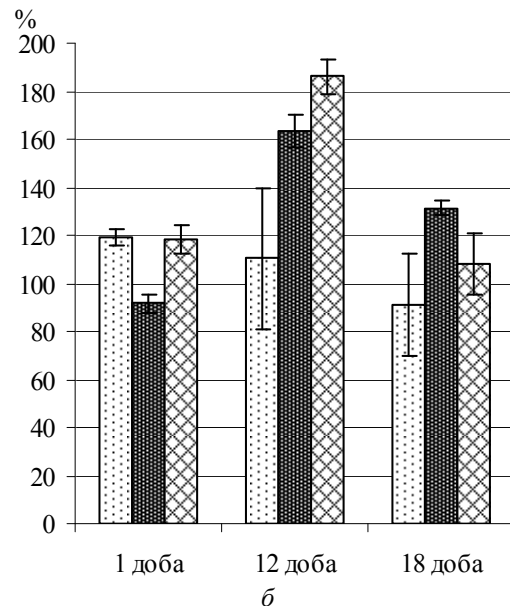
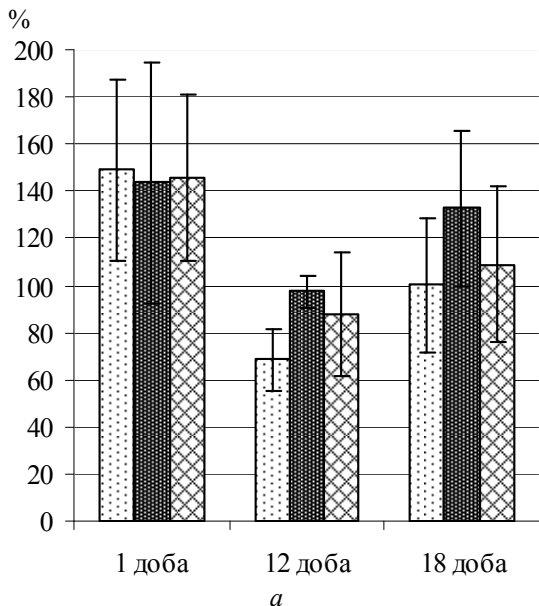
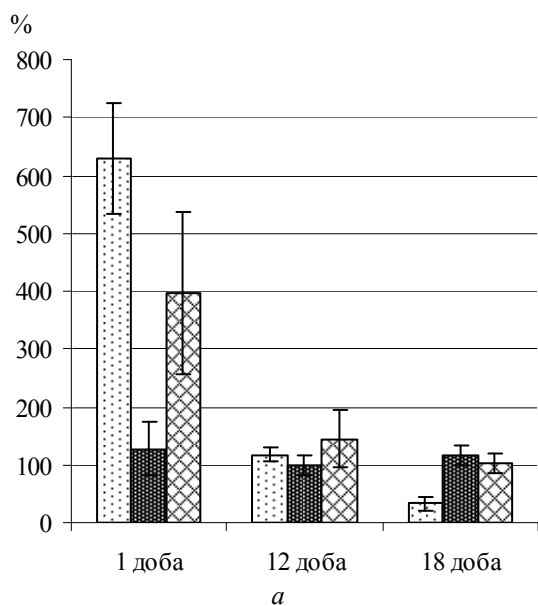


Рис. 4. Активність (%) СОД (а) та каталази (б) у периферичній крові щурів після фракціонованого впливу ОА, МДР і ОА + МДР (100 % – контроль): □ – ОА; ■ – МДР; ▣ – ОА + МДР.

На 1-шу добу після курсового застосування ОА та ОА + МДР відбувалась значна активація супероксиддисмутази у периферичній крові щурів (рис. 4, а). У подальшому, на 12-ту, добу її активність знижувалась з нормалізацією до 18-ї доби.

Після завершення фракціонованого опромінення тварин (1-а доба) активність СОД у периферичній крові також зростала. У наступні терміни спостереження її активність поступово стабілізувалась у межах фізіологічної норми.

Оскільки субстратом для каталази є пероксид водню, здебільшого продукт ферментативної (за допомогою СОД) дисмутації супероксиду, ми порівнювали активності СОД і каталази в крові в процесі відновлення організму після дії досліджуваних чинників. Динаміка каталазної активності (див. рис. 4, б) збігається із змінами активності СОД. Проте спостерігається інерційність напрацювання каталази у відповідь на зміни активності СОД, що зміщує на часовій координаті піки активності каталази відносно СОД.



У гепатоцитах тварин відмічено значне збільшення (1-а доба) активності СОД за дії ОА та сумісної дії ОА і МДР з нормалізацією до 12-ї доби (рис. 5, а). Проте фракціоноване опромінення практично не впливало на активність СОД. Ці процеси відображаються у змінах каталазної активності у печінці (див. рис. 5, б). Для СОД притаманна значна амплітуда змін її активності, але в цілому динаміка має такий же характер, як і при змінах каталазної активності.

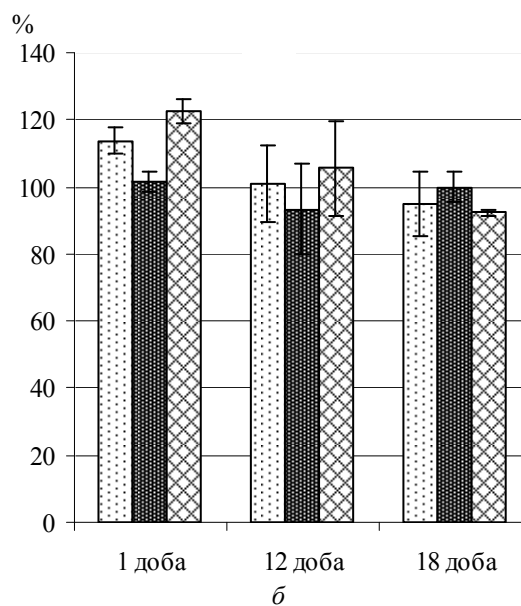


Рис. 5. Активність (%) СОД (а) та каталази (б) у печінці щурів після фракціонованого впливу ОА, МДР і ОА + МДР (100 % – контроль): □ – ОА; ■ – МДР; ▨ – ОА + МДР.

Варто відзначити, що мінімальні зміни активності зазначених ферментів виявлено при фракціонованому опроміненні.

При комбінованій дії (ОА + МДР) ОА створюють у тканинах гіпоксичні умови, що перешкоджає розвитку вільнорадикальних процесів після опромінення. Цим пояснюється зменшення генерації супероксиду завдяки його перехопленню ОА (див. рис. 3, 1-а, 12-а доби). При цьому утворення пероксинітриду може посилювати процес порушення окисного метаболізму, зумовлений активними формами азоту. Отже, розвиток вільнорадикальних реакцій при комбінованій дії зумовлений двома шляхами – з утворенням супероксиду і пероксинітриду. Їхнє співвідношення відображає характер порушень окисно-відновних процесів.

Висновки

Фракціоноване застосування ОА та/або МДР призводить до фазної зміни активності ферментів антиоксидантного захисту – СОД і каталази,

що регулюють інтенсивність ВРП окиснення у тканинах тварин.

Після фракціонованого опромінення тварин відновлення окисного метаболізму в межах фізіологічної норми у периферичній крові відбувається значно повільніше, ніж у печінці, що свідчить як про різну вихідну потужність антиоксидантних ферментів у гепатоцитах та еритроцитах, так і швидкість зміни їхньої активності після опромінення.

Серед досліджуваних показників стану ВРП окиснення визначальними є рівень ТБК-активних продуктів, швидкість генерації супероксиду та каталазна активність.

Розвиток вільнорадикальної патології при дії МДР та ОА зумовлено відповідно радіолізом води чи змінами парціальних тисків кисню та оксидів азоту в організмі тварин, у результаті чого порушення окисного метаболізму йде шляхами переважної генерації у тканинах АФК або активних форм азоту.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Richardson D.B. Cancer risks and radiation // *Occup Environ Med.* - 2009. - Vol. 66. - P. 785 - 786.
2. UNCEAR. Sources, effects and risk of ionizing radiation. - New-York: Unated Nations, 2002. - 647 p.
3. Valko M., Leibfritz D., Moncol J. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* - 2007. - Vol. 39, No 1. - P. 44 - 84.
4. Ortega A.L., Mena S., Estrela J.M. Oxidative and Nitrosative Stress in the Metastatic Microenvironment // *Cancers.* - 2010. - No. 2. - P. 274 - 304.
5. Dhalla N.S., Temsah R.M., Netticadan T. Role of oxidative stress in cardiovascular diseases // *J. Hypertens.* - 2000. - Vol. 18. - P. 655 - 673.
6. Sayre L.M., Smith M.A., Perry G. Chemistry and biochemistry of oxidative stress in neurodegenerative disease // *Curr. Med. Chem.* - 2001. - No. 8. - P. 721 - 738.
7. Dalle-Donne I., Rossi R., Colombo R. et al. Biomarkers of oxidative damage in human disease // *Clin. Chem.* - 2006. - Vol. 52. - P. 601 - 623.
8. Кислородно-перекисный механизм канцерогенеза и модификация ДНК / М. Б. Лю, И. С. Подобед, А. К. Едыгенова, Б. Н. Лю // *Успехи современной биологии.* - 2005. - Т. 125, № 2. - С. 179 - 188.
9. Хемиллюминесценция крови при радиационном воздействии / Я. И. Серкиз, Н. А. Дружина, А. П. Хриенко и др. - К.: Наук. думка, 1989. - 176 с.
10. Львовская Е.А., Волчегоровский И.А., Шемяков С.А. и др. Спектрофотометрическое определение конечных продуктов перекисного окисления липидов // *Вопр. мед. хим.* - 1991. - Т. 37, вып. 4. - С. 92 - 93.
11. Liochev S.I., Fridovich I. Lucigenin (Bis-N-methylacridinium) as a Mediator of Superoxide Anion Production // *Archives of Biochemistry and Biophysics.* - 1997. - Vol. 337, No. 1. - P. 115 - 120.
12. Королюк М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Г. Метод определения активности каталазы // *Лабораторное дело.* - 1988. - № 1. - С. 16 - 19.
13. Чевари С., Андял Т., Иттенгер Я. Определение антиоксидантных параметров крови и их диагностическое значение в пожилом возрасте // *Там же.* - 1991. - № 10. - С. 9 - 13.
14. Дружина М.О., Бурлака А.П., Моисеева Н.П. та ін. Біохімічні порушення та їх корекція в організмі ссавців, які живуть у Чорнобильській зоні відчуження // *Чорнобиль. Зона відчуження.* - К.: Наук. думка, 2001. - С. 521 - 525.
15. Saran M., Michel C., Bors W. Reaction of NO with O₂. Implications for the action of endothelium-derived relaxing factor (EDRF) // *Free Rad. Res. Commun.* - 1990. - Vol. 10. - P. 221 - 222.

Л. И. Маковецкая, Е. Б. Ганжа, Н. К. Родионова, Н. А. Дружина, В. М. Михайленко

**ДИНАМИКА СВОБОДНОРАДИКАЛЬНЫХ ПРОЦЕССОВ У ЖИВОТНЫХ
ПОСЛЕ ДЛИТЕЛЬНОГО ВЛИЯНИЯ ОКСИДОВ АЗОТА И ИОНИЗИРУЮЩЕГО ИЗЛУЧЕНИЯ**

Исследовали влияние оксидов азота и/или малых доз ионизирующей радиации на протекание свободнорадикальных процессов в периферической крови и печени крыс. Показано, что фракционированное облучение вызывает временное нарушение окислительного метаболизма, в то время как длительная ингаляция оксидов азота приводит к более значительным нарушениям. Это свидетельствует о двух разных путях нарушения окислительного метаболизма, обусловленных генерацией активных форм кислорода (в первом случае) или активных форм азота (во втором) в тканях организма.

Ключевые слова: малые дозы ионизирующей радиации, оксиды азота, супероксидный радикал, свободнорадикальные процессы, ферменты антиоксидантной защиты.

L. I. Makovetska, O. B. Ganzha, N. K. Rodionova, M. O. Druzhyna, V. M. Mikhailenko

**DYNAMICS OF FREE-RADICAL PROCESSES IN THE ANIMALS
AFTER PROTRACTED INFLUENCE
OF EXOGENOUS NITRIC OXIDE AND IONIZING RADIATION**

Aim of the investigation was to study the influence of nitric oxide (NO) and low doses of ionizing radiation (LDIR) on free radical processes that occur in various tissues of mammalian organism. Fractionated LDIR irradiation was shown to temporarily disrupt an oxidative metabolism. At same time protracted NO inhalation causes more significant harmful effects. This indicated that there are two pathways of oxidative metabolism disruption caused by generation of reactive oxygen or nitrogen species in tissues of mammalian organism.

Keywords: low doses of ionizing radiation, nitric oxide, superoxide radical, free radical processes, antioxidative enzymes.

Надійшла 10.10.2012

Received 10.10.2012