

## ВМІСТ МЕТАБОЛІТІВ ОКСИДУ АЗОТУ В ЛІМФОЦИТАХ ЩУРІВ ЗА ДІЇ НИЗЬКОІНТЕНСИВНОГО РЕНТГЕНІВСЬКОГО ОПРОМІНЕННЯ

*І.В. Чорна, канд. біол. наук;*

*І.Ю. Висоцький, д-р. мед. наук, професор*

*Медичний інститут Сумського державного університету, м. Суми*

*У статті представлені результати досліджень впливу рентгенівського опромінення на вміст стабільних продуктів метаболізму оксиду азоту в лімфоцитах периферичної крові білих щурів протягом 30-добового рентгенівського опромінення та у період після припинення дії чинника. Отримані дані свідчать про зростання вмісту нітритів та нітратів на 10-ту, 20-ту та 30-ту добу опромінення (сумарна доза 10, 20 та 30 сГр відповідно), а також на 20-ту та 30-ту добу післядії.*

**Ключові слова:** *малі дози радіації, лімфоцити периферичної крові, нітрити, нітрати.*

*В статье представлены результаты исследований влияния рентгеновского облучения на содержание стабильных продуктов метаболизма оксида азота в лимфоцитах периферической крови белых крыс на протяжении 30-суточного рентгеновского облучения и в период после прекращения действия фактора. Полученные результаты свидетельствуют об увеличении содержания нитритов и нитратов на 10-е, 20-е и 30-е сутки облучения (суммарная доза 10, 20 и 30 сГр соответственно), а также на 20-е и 30-е сутки последействия.*

**Ключевые слова:** *малые дозы радиации, лимфоциты периферической крови, нитриты, нитраты.*

### ВСТУП

Променева терапія цілеспрямовано застосовує іонізуючу радіацію для лікування пухлинних та непухлинних захворювань. Однак ефективність радіотерапії обмежується рядом ускладнень, пов'язаних із пошкодженням радіочутливих (кровотворна, імунна системи, різні типи епітелію, органи репродуктивної системи та ін.) та радіонечутливих органів. Із метою вивчення механізмів радіаційного ураження та природи пострадіаційних процесів проведено велику кількість досліджень на фізико-хімічному та молекулярному рівнях, однак у літературі наявні досить суперечливі дані щодо ефекту низьких доз радіації на живі організми. Залежно від виду та потужності випромінювання, дози, часу, що минув після опромінення, радіочутливості клітин характер порушень може бути різноспрямованим [1].

Відомо, що етапи радіаційного пошкодження тісно пов'язані з перебігом вільнорадикальних реакцій. У процесі радіоіндукованого пошкодження провідна роль належить оксидативному пошкодженню біологічних мембран, що здійснюється за допомогою реактивних форм кисню, які генеруються під дією іонізуючого опромінення. У багатьох дослідженнях було показано, що під час опромінення інтенсифікується процес перекисного окиснення ліпідів, знижується активність антиоксидантних ферментів [2, 3].

У патогенезі радіаційного пошкодження особливе значення має оксид азоту (NO), який належить до активних метаболітів кисню [4, 5]. Однак у літературі наявні лише дані стосовно впливу високих доз радіації на продукцію цього вільного радикала. NO – це біологічно активна молекула, яка належить до найважливіших біологічних медіаторів, що регулює систему імунітету, тонус судин і гладких м'язів внутрішніх органів, виявляє антитромботичну та дезагрегаційну дію,

визначає процеси синтезу білка клітинами. NO синтезується в організмі людини й тварин із L-аргініну за допомогою різних ізоформ NO-синтаз (КФ 1.14.13.39, NOS) – ферментів, що виявляються в лімфоцитах, нейтрофільних гранулоцитах, тромбоцитах, макрофагах і фібробластах, тучних клітинах, ендотелії та міоцитах судин, нейронах і гепатоцитах. За характером дії, фізіологічними властивостями та тканинною локалізацією розрізняють два типи NO-синтаз: I тип – конститутивні ( $\text{Ca}^{2+}$  та кальмодулінзалежні), до яких відносять нейрональну та ендотеліальну форми ферменту, II тип – індукцйбельна (цитокінзалежна) NO-синтаза, до якої належить макрофагальна форма ферменту. Активація конститутивної NO-синтази призводить до синтезу незначної кількості NO (нмолі) протягом кількох хвилин. Під впливом імуногенних та прозапальних стимулів різні типи клітин продукують значно більшу кількість NO (мкмолі) протягом кількох годин за рахунок активації індукцйбельної форми ферменту, що зумовлює токсичні ефекти [6, 7, 8]. Про утилізацію утвореного NO певною мірою свідчать інші метаболіти нітрогену, у тому числі нітрити та нітрати.

З'ясування молекулярних і клітинних механізмів дії низькоінтенсивного іонізуючого випромінювання на імунокомпетентні клітини є актуальним завданням, скерованим на розроблення радіотерапевтичних засобів лікування, і становить особливий науково-практичний інтерес для України, частина території якої зазнала суттєвого негативного впливу наслідків аварії на Чорнобильській атомній станції.

#### МЕТА РОБОТИ

Дослідити вплив хронічного рентгенівського опромінювання у щодобовій дозі 1 сГр впродовж 30 діб та після його припинення на вміст нітритів і нітратів у лімфоцитах периферичної крові білих щурів.

#### МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Досліди проводили на білих безпородних щурах-самках масою тіла 150-180 г, яких утримували у стандартних умовах віварію. У дослідженнях використано 54 тварини, яких було поділено на три групи: 1-ша – інтактні тварини (контроль), 2-га – тварини, яких упродовж 30 діб опромінювали у щодобовій дозі 1 сГр на апараті РУМ-17 (шкірно-фокусна відстань – 178 см, напруга – 140 кВ, сила струму – 4 мА, потужність дози –  $0,067 \text{ мГр}\cdot\text{с}^{-1}$  із використанням фільтрів Cu (0,5 мм) та Al (1 мм)). Щурів 2-ї групи обстежували на 10-ту, 20-ту та 30-ту доби опромінювання (сумарна доза становила відповідно 10, 20 та 30 сГр). Дозу опромінювання контролювали клінічним дозиметром типу 27012 (Otto Shon, Німеччина). Тварин 3-ї групи використовували для досліджень на 10-ту, 20-ту та 30-ту добу після припинення 30-добового опромінювання.

Для дослідження використовували лізати лімфоцитів з периферичної крові тварин, попередньо виділені у градієнті густини фікол-триомбразу (густина суміші повинна бути в межах 1,076-1,078) [1]. Вміст лімфоцитів становив 10 млн кл./мл. Кількість клітин підраховували під інвертованим мікроскопом у цитометричній камері Фукса-Розенталя. Вміст нітрит-аніона ( $\text{NO}_2^-$ ) та нітрат-аніона ( $\text{NO}_3^-$ ) у лізатах лімфоцитів визначали колориметричним методом із використанням реактиву Грісса [9]. Концентрацію білка в зразках визначали спектрофотометрично загальноприйнятим методом Лоурі.

Варіаційно-статистичне опрацювання отриманих результатів проводили з використанням критерію Стьюдента за допомогою комп'ютерної програми Microsoft Excel.

## РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

NO – вільний радикал, індукований іонізуючим опроміненням. У результаті швидкого переходу в організмі в нітрити (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) та нітрати (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) NO має короткий період напівжиття (5-30 с), що пояснює складність виявлення його в біологічних рідинах [6, 10]. Тому визначення кінцевих метаболітів NO, а саме: нітритів і нітратів, дає уявлення про рівень цього вільного радикала в організмі.

Імунна система відіграє важливу роль у підтриманні гомеостазу та цілісності органів і тканин організму. Водночас імунокомпетентні клітини за дії іонізуючої радіації генерують активні форми кисню, зумовлюючи оксидативний стрес. Зміни в системі імунітету, які індуковані радіацією і створюють передумови для розвитку автоінфекційних та аутоімунних процесів, призводять до зниження кількості імунокомпетентних клітин, передусім лімфоцитів [11]. Оскільки для мембран цих клітин характерний високий вміст фосфоліпідів, поліненасичених жирних кислот, то однією з причин масової загибелі лімфоцитів після опромінення високими дозами радіації може бути пошкодження клітинних мембран [2, 11].

У результаті проведених досліджень виявлено зміну вмісту нітритів і нітратів у лімфоцитах дослідних щурів (табл. 1).

Встановлено, що концентрація нітритів у лімфоцитах в умовах фізіологічної норми набагато нижча, ніж концентрація нітратів, що узгоджується з наявними літературними даними [12].

Таблиця 1 – Вміст нітритів і нітратів у лімфоцитах щурів (нмоль/мг білка) за дії рентгенівського випромінювання

Умови досліджу	Нітрити	Сума нітритів і нітратів	Нітрати
Контроль	1,48±0,14	13,99±0,68	12,51±1,06
10 сГр	2,98±0,11***	40,44±1,22***	37,46±4,33***
20 сГр	1,85±0,37	34,26±4,31***	32,41±6,58**
30 сГр	1,23±0,19	28,13±3,17***	26,90±5,23*
10-та доба після опромінення	1,39±0,16	14,15±0,50	12,76±0,89
20-та доба після опромінення	2,56±0,10***	15,82±0,41*	13,26±1,15
30-та доба після опромінення	2,74±0,05***	17,62±0,32***	14,88±0,55

Примітка. Різниця вірогідна щодо контролю  
\* -  $p < 0,05$ ; \*\* -  $p < 0,01$ ; \*\*\* -  $p < 0,001$

Аналіз отриманих нами результатів свідчить про підвищення сумарного рівня нітритів та нітратів у лімфоцитах щурів на 289 %, 245 % та 201 % після опромінення в сумарній дозі 10, 20 та 30 сГр, відповідно. Причому на 10-ту добу дії радіації достовірно підвищувався вміст окремо як нітритів, так і нітратів, тоді як на 20-ту і 30-ту доби – лише нітратів. Це поєднується з активацією прооксидантних показників у цих клітинах, зокрема, з підвищенням вмісту малонового діальдегіду, який є одним із кінцевих продуктів перекисного окиснення ліпідів [2], а також із пригніченням активності антиоксидантних ферментів у лімфоцитах щурів, що спостерігається на 10-ту, 20-ту та 30-ту доби опромінення [3]. Із літературних джерел відомо, що за хронічного рентгенівського опромінення у щодобовій дозі 1 сГр у плазмі крові щурів підвищується концентрація вільного L-аргініну та інтенсифікується окисний шлях його метаболізму, що експериментально підтверджується

підвищенням активності NOS на тлі одночасного зниження активності аргінази в лейкоцитах [13].

Таким чином, поясненням збільшення кінцевих метаболітів NO у лімфоцитах може бути посилення експресії індукбельної NO-синтази в цих клітинах, що виникає в результаті активації прозапальних цитокінів та оксидативного стресу [4, 5, 14]. У літературі є дані про дозозалежне підвищення концентрації нітратів у сироватці крові мишей після опромінення високими дозами радіації (19,6-31,5 Гр). Дія ж селективного інгібітора індукбельної NO-синтази призводила до пригнічення підвищення NO після опромінення [5]. Нітрат-аніон є найбільш окисненим стабільним метаболітом NO, а також субстратом нітратредуктази для ресинтезу NO. Враховуючи той факт, що нітрат-аніон утворюється при метаболізмі пероксинітриту одночасно з вільними радикалами кисню та азоту, підвищення його вмісту за дії радіації свідчить не лише про активацію генерації NO ізоферментом iNOS, але також про активацію окисного метаболізму — підвищення генерації супероксидного аніона [15].

Виявлено зниження до норми вмісту як нітратів, так і нітритів у лімфоцитах щурів на 10-ту добу після припинення опромінення та підвищення сумарного рівня метаболітів NO на 20-ту та 30-ту доби після дії за рахунок підвищення частки нітритів у сумарному пулі окиснених стабільних метаболітів NO досліджуваних клітин.

При радіаційному пошкодженні оксид азоту може виконувати подвійну роль: радіозахисну та радіотоксичну, що зумовлено його високою реактивністю. Радіопротекторна роль NO забезпечується антиоксидантними властивостями цієї молекули (дія NO як скавенджера кисневих радикалів) [16], а в основі радіоіндукованого пошкодження лежить перетворення NO у цитотоксичний пероксинітрит (OONO<sup>-</sup>) при взаємодії з супероксид-аніоном (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) в умовах окиснювального стресу [5, 17]. Пероксинітрит є сильним окисником, здатним окиснювати SH- та NH<sub>2</sub>-групи білків, а також взаємодіяти з іонами металів з утворенням ферум-нітрозильних комплексів [11]. Встановлено, що інгібітори NO попереджують розвиток індукованого радіацією апоптозу шляхом пригнічення низхідних каспаз, зменшення ступеня пошкодження мітохондрій та шляхом пригнічення активації p53 [18]. Малі концентрації NO можуть спричинити цитопротекторну дію. Акумуляція ж значної кількості активних форм кисню ініціює трансформацію ефектів NO із захисних у цитотоксичні [11]. Серед біологічних реакцій, що проходять за участю NO, слід також відмітити пошкодження ДНК, що відбувається шляхом різних механізмів, у тому числі: нітрозильного дезамінування, розриву ланцюгів ДНК та окиснювального пошкодження, індукованого пероксинітритом [5].

Небезпека хронічної дії радіації в низьких дозах полягає у тому, що вона зумовлює лабілізацію геному, знижуючи стабільність ДНК через виникнення конформаційних перебудов у молекулах, а також підвищуючи імовірність генетичних ушкоджень за повторної дії, на відміну від високих доз опромінення, які за повторного впливу стимулюють адаптивну відповідь організму [19]. Таким чином, низькі дози радіації, отримані протягом тривалого часу, спричиняють значні зміни в пулах стабільних метаболітів NO, а індуковані опроміненням вільнорадикальні ланцюгові процеси можуть призводити до пошкодження мембранних структур, порушення клітинного метаболізму та розладу окиснювального гомеостазу.

## ВИСНОВКИ

На основі літературних даних та аналізу результатів нашого дослідження можна зазначити, що:

1 В основі механізму радіаційного пошкодження лежать надмірне утворення вільних радикалів оксигену та зміни активності системи антиоксидантного захисту.

2 Виявлене нами підвищення рівня нітритів та нітратів як при дії низькоінтенсивного рентгенівського опромінення, так і в період післядії свідчить про те, що система оксиду азоту бере активну участь у відповіді імунікомпетентних клітин на вплив низьких доз іонізуючої радіації.

3 Прояв цитозахисних та цитотоксичних властивостей NO при радіаційному пошкодженні залежить від інтенсивності оксидативного стресу і від потенціалу антиоксидантного захисту організму.

4 Вивчення та оцінка стану оксиду азоту та його метаболітів є досить перспективними у визначенні їх ролі в патогенезі радіоіндукованого оксиген-нітрогенного стресу та розробленні шляхів корекції виявлених змін.

## SUMMARY

### THE CONTENT OF NITRIC OXIDE METABOLITES IN LYMPHOCYTES OF RATS IN CASE OF LOW-INTENSITY IONIZING RADIATION

*I.V. Chorna, I.Yu. Vysotsky*

*Medical Institute of Sumy State University, Sumy*

*Results of the research of X-radiation effect on the content of stable products of nitric oxide metabolism in peripheral blood lymphocytes of white rats are stated in the article under the conditions of daily irradiation during 30 days and after ceasing of X-ray radiation influence. The received results testify increasing nitrites and nitrates content after 10, 20 and 30 days of irradiation (at accumulated dose of 10, 20 and 30 sGy, respectively) and on the 20th and 30th days after ceasing of radiation action.*

*Key words: low doses of ionizing radiation, lymphocytes of peripheral blood, nitrites, nitrates.*

## СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Дослідження інтенсивності пероксидного окиснення ліпідів системи крові щурів за умов низькоінтенсивного опромінення / Г.Я. Клевета, Я.П. Чайка, Л.О. Дацюк, У.В. Старанко // Біологія тварин. – 2006. – Т. 8, № 1-2. – С. 135-139.
2. Окиснювальна модифікація ліпідів і білків за дії низькоінтенсивного рентгенівського опромінення / Н. Климишин, Л. Старикович, Г. Клевета [та ін.] // Вісник Львів. ун-ту. Серія Біологічна. – 2007. – Вип. 45. – С. 63-70.
3. Оцінка стану глутатионової системи в імунікомпетентних клітинах крові за дії низькоінтенсивного опромінення / Г.Я. Клевета, Л.О. Дацюк, У.В. Старанко [та ін.] // Медична хімія. – 2006. – Т. 8, № 3. – С. 76-78.
4. Nitric oxide voltammetric measurements in the rat brain after gamma irradiation / P. Lestaevel, D. Clarenson, A. Gharib [et al.] // Radiat. Res. – 2003. – V. 160, № 6. – P. 631-636.
5. The role of nitric oxide in radiation damage / S. Ohta, S. Matsuda, M. Gunji, A. Kamogawa // Biol. Pharmacol. Bull. – 2007. – V. 30, № 6. – P. 1102-1107.
6. Effects of X-ray radiation on oxidation products of nitric oxide in rabbits treated with antioxidant compounds / S. Dede, Y. Deger, T. Kahraman, D. Kiliçalp // Turk. J. Biochem. – 2009. – V. 34, № 1. – P. 15-18.
7. Кравченко Н.А. Регуляция экспрессии эндотелиальной NO-синтазы и дисфункция сосудистого эндотелия при сердечно-сосудистой патологии / Н.А. Кравченко, Н.В. Ярмыш // Цитология и генетика. – 2008. – Т. 42, № 4. – С. 69-80.
8. Сапаций А.Л. Метаболічні особливості оксиду азоту у формуванні ендотеліальної дисфункції за серцево-судинних захворювань / А.Л. Сапаций, І.Г. Купновицька // Ліки України. – 2008. – Т. 122, № 6. – С. 82-86.
9. Кіселик І.О. Особливості визначення нітратів та нітритів в периферичній крові у хворих на вірусні гепатити та при синдромі жовтяниці іншої етіології / І.О. Кіселик, М.Д. Луцик, Л.Ю. Шевченко // Лабораторна діагностика. – 2001. – № 3. – С. 43-45.
10. Ванин А.Ф. Оксид азота – регулятор клеточного метаболизма / А.Ф. Ванин // Соросовский образовательный журнал. – 2001. – Т. 7, № 11. – С. 7-12.
11. Сахно Т. О. Вплив іонізуючої радіації на імунікомпетентні клітини / Т.О. Сахно, Т.І. Давидова, А.А. Чумак // Укр. радіолог. журн. – 1997. – Т. 5, № 1. – С. 87-89.
12. Цикл оксида азота как механизм стабилизации содержания NO и продуктов его превращения в организме млекопитающих / В.П. Реутов, Е.Г. Сорокина, А.И. Гоженко [и др.] // Актуальные проблемы транспортной медицины. – 2008. – Т. 11, № 1. – С. 89-112.

13. Перетятко Ю.В. Особливості аргіназного та NO-синтазного шляхів метаболізму L-аргініну в лейкоцитах периферичної крові щурів за хронічного рентгенівського опромінення / Ю.В. Перетятко, Н.О. Сибірна // Укр. біохім. журн. – 2009. – Т. 81, № 2. – С. 40-48.
14. Korraa S.S. Gamma irradiation effects on the activity and expression of nitric oxide synthase enzyme on human polymorphonuclear leucocytes (PMNs) in vitro / Soheir S. Korraa, Nagi A. Iskandar, Ola El Diwany // Arab. J. Biotech. – 2002. – V. 5, № 2. – P. 185-192.
15. Вплив малих доз радіації на судинну реактивність та окисний метаболізм кисню і азоту в серцево-судинній системі / М.М. Ткаченко, В.Ф. Сагач, А.В. Коцюрба [та ін.] // Журн. АМН України. – 2007. – Т. 13, № 1. – С. 20-32.
16. Early neuroprotective effect of nitric oxide in developing rat brain irradiated in utero / P. Gisone, A.D. Boveris, D. Dubner [et al.] // Neurotoxicology. – 2003. – V. 24, № 2. – P. 245-253.
17. The role of nitric oxide in paraquat-induced oxidative stress in rat striatum / M. Djukic, M.C. Jovanovic, M. Ninkovic [et al.] // Ann. Agric. Environ. Med. – 2007. – № 14. – P. 247-252.
18. Nitric oxide protects thymocytes from  $\gamma$ -irradiation-induced apoptosis in correlation with inhibition of p53 upregulation and mitochondrial damage / Yue Chen, Ala Stanford, Richard L. Simmons [et al.] // Cellular Immunology. – 2001. – V. 214, № 1. – P. 72-80.
19. Кострюкова Н.К. Биологические эффекты малых доз ионизирующего излучения / Н.К. Кострюкова, В.А. Карпин // Сибир. мед. журн. – 2005. – Т. 50, № 1. – С. 17-23.

*Надійшла до редакції 25 грудня 2009 р.*