

УДК 661.98+577.115 4:616-053.2:614.876

Є. І. Степанова✉, І. Є. Колпаков, В. Г. Кондрашова, О. М. Литвинець

*Державна установа “Національний науковий центр радіаційної медицини Національної академії медичних наук України”, вул. Мельникова, 53, м. Київ, 04050, Україна***ОКСИД АЗОТУ І ПЕРЕКИСНЕ ОКИСЛЕННЯ ЛІПІДІВ У ДІТЕЙ-МЕШКАНЦІВ РАДІОАКТИВНО ЗАБРУДНЕНИХ ТЕРИТОРІЙ****Мета дослідження:** оцінка системи оксиду азоту за вмістом його стабільних метаболітів в сироватці крові та показниками перекисного окислення ліпідів і антиоксидантного захисту у дітей-мешканців радіоактивно забруднених територій.**Матеріали та методи дослідження.** Обстежені діти шкільного віку – мешканці радіоактивно забруднених територій. Визначення рівнів азотистих сполук ( $\text{NO}^{2-}$  та  $\text{NO}^{3-}$ ) проводили за стандартною методикою з використанням реактиву Грісса. Для визначення ознак окислювального стресу проводили дослідження малонового діальдегіду, каталази, церулоплазміну.**Результати і висновки.** У дітей-мешканців радіоактивно забруднених територій дослідження вмісту метаболітів оксиду азоту в сироватці крові виявило зниження рівня нітритів при відсутності достовірних змін вмісту нітратів і суми метаболітів NO. Активація основного внутрішньоклітинного антиоксиданту каталази при відсутності суттєвих змін основного сироваткового антиоксиданту церулоплазміну не супроводжувалася підвищенням рівня ТБК-активних продуктів перекисного окислення ліпідів – малонового діальдегіду в сироватці крові, що свідчить про достатність компенсаторних можливостей системи антиоксидантного захисту.**Ключові слова:** діти, Чорнобильська катастрофа, радіоактивно забруднені території, оксид азоту, перекисне окислення ліпідів.*Проблеми радіаційної медицини та радіобіології. 2013. Вип. 18. С. 261–269.*

Ye. Stepanova✉, I. Kolpakov, V. Kondrashova, O. Litvinets

*State Institution “National Research Center for Radiation Medicine of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine”, Melnykov str., 53, Kyiv, 04050, Ukraine***Nitric oxide and lipid peroxidation in children-residents of the contaminated territories****Objective.** The nitrogen oxide system assessment by the nitrogen oxide stable metabolites assay both with indices of lipid peroxidation and antioxidant protection of children residing on contaminated territories.**Materials and methods.** Studies were conducted in children, born and residing in areas of contamination. Assay of nitrogenous species ( $\text{NO}^{2-}$  and  $\text{NO}^{3-}$ ) was performed using a standard method with Griss-reagent. Biochemical assay of the malonic dialdehyde, catalase, and ceruloplasmin was applied to reveal the signs of oxidative stress.**Results and conclusions.** The assay of nitric oxide metabolites in the blood serum of children-residents of contaminated territories revealed a reduction of nitrite and no significant changes in the content of both nitrate and total NO metabolites. There was an activation of the intracellular antioxidant catalase with the absence of significant changes in the basic serum ceruloplasmin antioxidant. All that was not accompanied with an increase of serum concentration of malonic dialdehyde i.e. the TBA-active product of lipid peroxidation being indicative to the adequacy of compensatory capacity of antioxidant defense.**Key words:** children, Chernobyl accident, contaminated territories, nitric oxide, lipid peroxidation.*Problems of radiation medicine and radiobiology. 2013;18:261–269.*

✉ Степанова Євгенія Іванівна, e-mail: profstepanova@i.ua

© Степанова Є. І., Колпаков І. Є., Кондрашова В. Г., Литвинець О. М., 2013

Незважаючи на значні зусилля, спрямовані на збереження та відновлення здоров'я дітей, які проживають на територіях, забруднених радіонуклідами, його стан у динаміці після аварійного періоду має стійкі негативні тенденції. Відмічається стійкий тренд зростання показників як загальної захворюваності, так і захворюваності майже за усіма класами хвороб, щорічне скорочення числа практично здорових дітей. Механізми виникнення несприятливих медико-біологічних наслідків Чорнобильської катастрофи недостатньо з'ясовані [1, 2].

Значне місце в цих механізмах з великою вірогідністю займає оксид азоту (NO). Проте вивченню цієї проблеми до теперішнього часу присвячені лише нечисленні експериментальні роботи. Важлива біологічна роль NO, підтверджена низкою досліджень, обумовила зацікавленість цією молекулою у теоретичній та практичній медицині. Встановлено, що роль і функції NO в організмі людини дуже багатогранні. Він являє собою унікальний, за своїм походженням та механізмом дії, вторинний меседжер у більшості клітин організму. Зокрема, оксид азоту бере участь у реалізації багатьох основних фізіологічних функцій, таких як вазодилатація, нейротрансмісія, регуляція тонуусу гладких м'язів, реакції імунної системи тощо [3, 4]. Доведена його роль у патогенезі різноманітних запальних процесів, розвитку артеріальної та легеневої гіпертензії, атеросклерозу, діабетичної ангіопатії, тромбоутворення, а також захворювань нервової, травної систем та патології нирок [4, 5].

Між системою NO та вільнорадикальними процесами, зокрема перекисним окисленням ліпідів, існує тісний взаємозв'язок. Якщо в організмі знижується вироблення основних ферментів-антиоксидантів: каталази та супероксиддисмутази, а утворення активних форм кисню продовжується з наростаючою силою, додатково виробляється NO для зв'язування супероксиддисмутазного радикал-аніону з утворенням токсичного пероксинітриду. Активні форми кисню та продукти ПОЛ викликають порушення проникності клітинних мембран, пошкоджують внутрішньоклітинні органели, порушують метаболізм, що власне і лежить в основі ендогенної інтоксикації. Це, в свою чергу, супроводжується зростанням недостатності антиоксидантної системи. Тому на сучасному рівні наукових знань не активація вільнорадикального окислення, а дисбаланс між рівнем перекисного окислення ліпідів та рівнем антиоксидантного захисту розглядається як одна із основних причин ушкодження клітин і тканин на молекулярному рівні [6].

За фізіологічних умов NO швидко, за лічені секунди, перетворюється у нітрити та нітрати, які легко виво-

Despite significant efforts to preserve and restore the health of children living in contaminated areas, it is characterised with the consistently negative trends. Moreover a steady growth trend is obvious on both general morbidity as the morbidity of almost all classes of diseases, followed by the annual reduction in the number of healthy children. Pathways of the unfavourable biomedical consequences of Chornobyl disaster are still underexplored [1, 2].

The nitric oxide (NO) may reliably have a significant part in these pathways. However only a few experimental works are by now dedicated to the study of this problem. Important biological role of NO confirmed by several studies has lead to concern with it both in academic and clinical medicine. The role and function of NO in the human body are found being rather comprehensive. It is a unique by its origin and mode of action secondary messenger in the most cells of the body. In particular, the nitric oxide is involved in many basic physiological functions such as vasodilatation, neurotransmission, regulation of smooth muscle tone, immune response, etc. [3, 4]. NO has a proven part in the pathogenesis of various inflammatory processes, arterial and pulmonary hypertension, atherosclerosis, diabetic angiopathy, thrombopoiesis, and diseases of the nervous, digestive systems and kidneys [4, 5].

There is a close relationship between the NO system and free radical processes with lipid peroxidation in particular. If the production of major antioxidant enzymes i.e. catalase and superoxide dismutase is decreased whereas the formation of reactive oxygen species increases then the NO is produced additionally to bind the superoxide dismutase radical anion and toxic peroxy-nitrite production. Reactive oxygen species and lipid peroxidation products disrupt the permeability of cell membranes, damage the intracellular organelles, and make metabolic disorders. All this processes underlies of endogenous intoxication. This, in turn, is accompanied by increased antioxidant system failure. Therefore, from the current knowledge the imbalance between the level of lipid peroxidation and level of antioxidant protection is regarded as one of the main causes of damage of cells and tissues in the molecular level but not only the activation of free radical oxidation [6].

Under physiological conditions the NO in a few seconds turns into nitrites and nitrates being easily

дяться з організму. У зв'язку з цим біологічні ефекти NO обмежені областю його утворення. Потім оксид азоту незворотно інактивується реакцією з гемоглобіном у просвіті кровоносної судини та з супероксидним радикалом у стінці кровоносної судини [7].

Тому загальними показниками вмісту NO в організмі є рівні нітритів і нітратів, які досліджуються у сироватці крові методом, що базується на відновленні нітратів до нітритів з визначенням останніх реакцією з реактивом Грісса [8].

В наш час кількісне вимірювання продуктів перекисного окислення ліпідів (ПОЛ) в плазмі крові набуло важливого діагностичного значення, оскільки активація ПОЛ відіграє суттєву роль у розвитку багатьох захворювань, а також у реакціях організму на вплив різноманітних чинників довкілля. За думкою ряду дослідників про інтенсивність ПОЛ доцільно судити за рівнем продуктів ПОЛ (малоновий діальдегід – МДА) [9, 10], що реагують з тіобарбітуровою кислотою (ТБК).

Багатокомпонентний антиоксидантний захист (АОЗ) в організмі забезпечується ензимними антиоксидантними механізмами та ендо- і екзогенними антиоксидантами неферментативної природи, які з ними синергічно взаємодіють. Найбільш важливу роль відіграють ензимні механізми антиоксидантного захисту, що здійснюються групою ферментів: супероксиддисмутазою, каталазою, глутатіонпероксидазою, глутатіонредуктазою, церулоплазміном тощо.

Для оцінки функціонального стану системи антиоксидантного захисту доцільним є визначення основних з цих показників. Зокрема, каталази, що пов'язано з центральною роллю цього ферменту, як основного внутрішньоклітинного антиоксиданту, а також основного позаклітинного антиоксиданту – церулоплазміну [9, 10].

## МЕТА ДОСЛІДЖЕННЯ

Оцінка системи оксиду азоту за вмістом його стабільних метаболітів та показниками перекисного окислення ліпідів і антиоксидантного захисту у дітей-мешканців радіоактивно забруднених територій.

## МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Дослідження стабільних метаболітів оксиду азоту та інтегральних показників перекисного окислення ліпідів і антиоксидантного захисту проведені у 63 дітей шкільного віку (від 10 до 18 років). З них основну групу склали 42 дитини, які народилися та постійно проживають в зонах радіоактивного забруднення. Території проживання дітей основної групи

excreted. In this regard the biological effects of NO are limited to the area of its formation. Then the nitric oxide is irreversibly inactivated by reaction with haemoglobin in a vascular lumen and with superoxide radical in the vascular wall [7].

Therefore the level of nitrites and nitrates assayed in the serum is an integral indicator of NO content in a body. The assay method is based on a principle of nitrate to nitrite recovery with determination of the latter via the Griss reagent application [8].

At present the quantitative assay of lipid peroxidation (LPO) products in plasma has become an important diagnostic value, because the activation of lipid peroxidation plays a significant role in the development of many diseases, as well as in response of organism to the impact of various environmental factors. By the opinion of some researchers the intensity of LPO should be judged in terms of the end product of lipid peroxidation i.e. malonic dialdehyde (MDA) concentration [9, 10].

A multicomponent antioxidant (AD) defence in the organism is provided by the antioxidant enzyme pathways synergistically interacting with endogenous and exogenous non-enzyme antioxidants. Enzymatic pathways of antioxidant defence are of a key role here being represented by a group of enzymes: superoxidodismutase, catalase, glutathioneperoxidase, ceruloplasmin, etc.

To evaluate the functional state of antioxidant defence system it is reasonable to assay some essential indicators of its pathways. Enzym catalase being a major intracellular antioxidant and ceruloplasmin in its turn as a principal extracellular antioxidant are of a particular interest here [9, 10].

## OBJECTIVE

The nitrogen oxide system assessment by the nitrogen oxide stable metabolites assay both with indices of lipid peroxidation and antioxidant protection of children residing on contaminated territories.

## MATERIALS AND METHODS

Assay of stable metabolites of nitric oxide and integral parameters of lipid peroxidation and antioxidant defence system were conducted in 63 children of a school age (10 to 18 years old). The 42 of them born and residing in areas of contamination were enrolled as a main study group. The territory of residence of this study group is attributed to the

належать до 2-ї зони (зона обов'язкового відселення – територія з щільністю забруднення  $^{137}\text{Cs}$  понад 555 кБк/м<sup>2</sup> або  $^{90}\text{Sr}$  понад 111 кБк/м<sup>2</sup>) та 3-ї зони (зона гарантованого добровільного відселення – територія з щільністю забруднення ізотопами  $^{137}\text{Cs}$  від 185 кБк/м<sup>2</sup> до 555 кБк/м<sup>2</sup> або  $^{90}\text{Sr}$  від 5,55 кБк/м<sup>2</sup> до 111 кБк/м<sup>2</sup>).

Контрольна група, порівнянна з основною за віком, статтю та даними клінічного обстеження, складалася з 21 дитини, які проживали в “чистих” щодо радіоактивного забруднення регіонах і не належали до постраждалих внаслідок Чорнобильської аварії контингентів.

Вміст  $^{137}\text{Cs}$  в організмі дітей визначали за допомогою лічильника випромінювання людини Скринер-3М. Рівень інкорпорованого  $^{137}\text{Cs}$  коливався від 269 до 6253 Бк у тілі.

Обстежені діти не мали клінічно вираженої патології органів дихання та патології серцево-судинної системи органічного характеру. Виявлена у них хронічна патологія у стані компенсації була представлена захворюваннями зубів (суб- та декомпенсована форми карієсу), лор-органів (тонзиліти, аденоїдити, фарингіти), травного каналу (гастрити, дуоденіти), та жовчовивідних шляхів (холецистити, холангіти), вегетативною дисфункцією.

Визначення рівнів азотистих сполук ( $\text{NO}^{2-}$  та  $\text{NO}^{3-}$ ) проводили за стандартною методикою з використанням реактиву Грісса. Відновлення нітратів до нітритів проводили металічним цинком в розчині оцтової кислоти. Іони  $\text{NO}^{2-}$  виявляли діазореакцією з реактивом Грісса, з подальшим колориметричним визначенням азоз'єднання рожевого кольору.

Розрахунок кількості нітрат-іонів проводили за різницею сумарної кількості нітрат- і нітрит-іонів та кількості нітрит-іонів. Кількість нітритів та нітратів розраховували в мкмоль/л за калібрувальним графіком згідно з методикою визначення [11].

Для виявлення ознак окислювального стресу та дисбалансу ПОЛ-АОЗ проводили визначення ТБК-активних продуктів ПОЛ; каталази, як основного внутрішньоклітинного антиоксиданту та церулоплазміну, як основного антиоксиданту сироватки крові [12].

Визначення малонового діальдегіду (МДА) проводили за реакцією з тіобарбітуровою кислотою (ТБК) з наступним вимірюванням оптичної щільності на фотоколориметрі порівняно з контрольною пробою при довжинах хвиль 532 та 580 нм [12].

Визначення вмісту церулоплазміну проводили за реакцією окислення р-фенілендіаміну церулоплазміном з наступним вимірюванням оптичної щільності на фотоколориметрі при довжині хвилі 530 нм [12].

2<sup>nd</sup> zone (zone of a mandatory evacuation because of  $^{137}\text{Cs}$  soil contamination density over 555 kBq/m<sup>2</sup> or  $^{90}\text{Sr}$  over 111 kBq/m<sup>2</sup>) and the 3<sup>rd</sup> zone (zone of a guaranteed voluntary resettlement with  $^{137}\text{Cs}$  contamination density from 185 to 555 kBq/m<sup>2</sup> or  $^{90}\text{Sr}$  from 5.55 to 111 kBq/m<sup>2</sup>).

Control group was comparable to the main one in age, sex and according to clinical data. There were enrolled 21 children living in the “clean” from contamination areas and been not attributed to contingents of the Chernobyl accident survivors.

The content of  $^{137}\text{Cs}$  in children was measured by the WBC “Scrinер-3M.” The incorporated  $^{137}\text{Cs}$  level ranged from 269 to 6253 Bq in a whole body.

The examined children had no clinically significant respiratory diseases or organic disorders of cardiovascular system. The diagnosed chronic medical disorders been compensated at a moment were such as dental diseases (several forms of caries), diseases of the upper respiratory tract (tonsillitis, adenoiditis, pharyngitis), gastrointestinal tract (gastritis, duodenitis), biliary tract (cholecystitis, cholangitis), and autonomous dysfunction.

Assay of nitrogenous compounds ( $\text{NO}^{2-}$  and  $\text{NO}^{3-}$ ) was performed using a standard method with Griss reagent. Reduction of nitrate to nitrite was achieved with a metallic zinc application in a solution of acetic acid. The  $\text{NO}^{2-}$  ions were detected via diazo reaction with Griss reagent followed by a calorimetric test for a pink-coloured azocompound.

Quantification of nitrate ions was carried out by the difference of the total amount of nitrate and nitrite ions and the amount of nitrite ions. The amount of nitrite and nitrate was calculated in mmol/L using the calibration schedule according to the manual [11].

Assay of TBA-active LPO products i.e. catalase as a major intracellular antioxidant and ceruloplasmin as a principal extracellular antioxidant were held in a serum to determine the signs of oxidative stress and LPO-AD imbalance [12].

Assay of malonic dialdehyde (MDA) was conducted via reaction with thiobarbituric acid (TBA) followed by an optical density measurement at a photocolorimeter vs. the control sample at a wave length of 532 and 580 nm [12].

Assay of ceruloplasmin was achieved via reaction of p-phenylenediamine oxidation by ceruloplasmin followed by an optical density measurement at a photocolorimeter at a wave length of 530 nm [14].

**Таблиця 1****Вміст метаболітів NO в сироватці крові дітей- мешканців радіоактивно забруднених територій (M±m)****Table 1****Content of the NO metabolites in serum of children living in contaminated areas (M±m)**

Показник Indices	Основна група Main study group	Контрольна група Control group	p
Нітриди, мкмоль/л Nitrites (mmol/L)	6,09±1,67	13,07±1,28	<0,001
Нітрати, мкмоль/л Nitrates (mmol/L)	35,06±2,69	35,82±4,13	>0,05
Сума метаболітів NO (нітриди+нітрати), мкмоль/л Integral NO metabolites i.e. nitrite+nitrate (mmol/L)	41,17±2,96	48,91±5,05	>0,05

Активність каталази в сироватці крові визначали колориметричним методом [10].

Catalase activity in serum was assayed with a colorimetric method [10].

**РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ**

Дослідження вмісту метаболітів NO в сироватці крові показало, що у дітей основної групи в порівнянні з контролем спостерігалось достовірне зниження рівня нітритів ( $6,09 \pm 0,67$  мкмоль/л і  $13,07 \pm 1,28$  мкмоль/л,  $p < 0,001$ ): за відсутності достовірних відмінностей вмісту нітратів ( $35,06 \pm 2,69$  мкмоль/л і  $35,82 \pm 4,13$  мкмоль/л,  $p > 0,05$ ), а також суми метаболітів NO ( $41,17 \pm 2,96$  мкмоль/л і  $48,91 \pm 5,05$  мкмоль/л,  $p > 0,05$ ) (табл. 1).

**RESULTS AND DISCUSSION**

Assay of NO metabolite content in a serum showed a significant reduction of nitrite in children of a main study group vs. the control ( $6.09 \pm 0.67$  mmol/L vs.  $13.07 \pm 1.28$  mmol/L,  $p < 0.001$ ) under no significant difference of nitrate content ( $35.06 \pm 2.69$  mmol/L vs.  $35.82 \pm 4.13$  mmol/L,  $p > 0.05$ ), and the integral NO metabolites ( $41.17 \pm 2.96$  mmol/L vs.  $48.91 \pm 5.05$  mmol/L,  $p < 0.05$ ) (Table 1).

Оцінка показників стану перекисного окислення ліпідів свідчить, що у дітей основної групи в порівнянні з контролем не визначалось достовірних відмінностей вмісту у сироватці крові ТБК-активних продуктів ПОЛ ( $3,07 \pm 0,28$  нмоль/мл і  $3,89 \pm 0,48$  нмоль/мл,  $p > 0,05$ ) (табл. 2).

Review of the lipid peroxidation pattern is indicative of no significant difference in the final product of lipid peroxidation i.e. MDA content in serum of children from the main study group ( $3.07 \pm 0.28$  nmol/mL vs.  $3.89 \pm 0.48$  nmol/mL,  $p > 0.05$ ) (Table 2).

При аналізі стану антиоксидантного захисту відмічалось достовірне підвищення активності каталази у сироватці ( $23,1 \pm 1,9$  мкат/л і  $15,9 \pm 2,0$  мкат/л,  $p < 0,05$ ) та відсутність достовірних відмінностей вмісту церулоплазміну ( $92,10 \pm 8,42$  мг/л і  $92,82 \pm 16,88$  мг/л,  $p > 0,05$ ) (табл. 2)

Analysis of the antioxidant defence status showed a significant increase in serum catalase activity ( $23.1 \pm 1.9$  mcat/L vs.  $15.9 \pm 2.0$  mcat/L,  $p < 0.05$ ) and no significant difference in ceruloplasmin content ( $92.10 \pm 8.42$  mg/L vs.  $92.82 \pm 16.88$  mg/L,  $p > 0.05$ ) (Table 2).

Отримані нами дані можна пояснити, спираючись на результати досліджень ряду авторів. Так, за даними [13–15] відносне зниження рівня нітритів є проявом зниження активності ендотеліальної NO-синтази (eNOS). При цьому вирівнювання в порівнянні з контролем сумарних показників метаболізму NO за рахунок нітратів пов'язують з посиленням ПОЛ та підвищенням активності індукцибельної NO-синтази (iNOS).

The received data can be explained by reference to the research of some authors. Thus, according to [13–15] a relative reduction of nitrite is a manifestation of reduced activity of the endothelial NO-synthase (eNOS). At that the levelling of integral indices of NO metabolism at the expense of nitrates vs. control is considered being due to an increased lipid peroxidation and increased activity of inducible NO-synthase (iNOS).

В експериментальних роботах [14, 15], присвячених визначенню ключових механізмів, задіяних в регуляції NO-системи за умов впливу малих доз радіації, відмічається наступне.

The experimental studies [14, 15] devoted to the key pathways in regulation of the NO-system under the effect of radiation in low doses gave the following data.

**Таблиця 2**

**Характеристика показників стану перекисного окислення ліпідів та антиоксидантного захисту у дітей- мешканців радіоактивно забруднених територій ( $M \pm m$ )**

**Table 2**

**Lipid peroxidation and antioxidant protection indices in children living in contaminated areas ( $M \pm m$ )**

Показник Indices	Основна група Main study group	Контрольна група Control group	p
ТБК-активних продуктів ПОЛ, нмоль/мл TBA-active LPO products (nmol/mL)	3,07±0,28	3,89±0,48	>0,05
Каталаза, мкат/л Catalase (mcat/L)	23,10±1,90	15,90±2,00	<0,05
Церулоплазмін, мг/л Ceruloplasmin (mg/L)	92,10±8,42	92,62±16,88	>0,05

За фізіологічних умов основним шляхом синтезу NO в організмі є конститутивний синтез NO за дії  $Ca^{2+}$ -залежної ендотеліальної ізоформи NO-синтази (eNOS), тоді як за умов патології – індукбельний синтез NO  $Ca^{2+}$ -незалежною індукбельною ізоформою NO синтази (iNOS). Як відповідь на дію радіації має місце гіперекспресія iNOS, тоді як активність eNOS, навпаки, знижується, незважаючи на підвищений рівень внутрішньоклітинного кальцію, що є одним з її активаторів. Отже, за дії радіації в залежності від терміну дії і дози може мати місце як  $Ca^{2+}$ -залежна, так і  $Ca^{2+}$ -незалежна регуляція активності eNOS.

Автори [14, 15] наводять біохімічні механізми, що можуть зумовити такі зміни експресії і активності різних ізоформ NOS за дії радіації, які полягають у наступному. Експресія iNOS індукується цитокінами а також стероїдними гормонами. За нормальних умов рівень експресії iNOS невисокий, але при окисному стресі, що є загальною відповіддю клітин на дію патологічних чинників, у тому числі радіації, рівень експресії iNOS може значно підвищуватися. За цих умов підвищується генерація  $O_2^-$ , який є дуже потужним підсилювачем експресії iNOS. Як відомо, за дії радіації, у тому числі низьких доз, зростає генерація  $O_2^-$  різними оксидазами. Отже, окисний стрес, що виникає за хронічної дії низьких доз радіації, може бути основною причиною гіперекспресії iNOS в кардіоваскулярній системі [14, 15].

Експресія eNOS запускається різними пептидними гормонами, в тому числі ангіотензином II, інсуліном, гіпоксією та іншими факторами, причому посилення експресії відбувається при підвищенні рівня  $H_2O_2$ . За дії радіації має місце значне підвищення рівня  $H_2O_2$  в кардіоваскулярній системі, отже гіперекспресія eNOS за радіаційного впливу може мати за причину окисний стрес, як і у випадку з

Under the physiological conditions a constitutive NO synthesis by the  $Ca^{2+}$ -dependent endothelial isoform of NO-synthase (eNOS) is the main pathway of NO synthesis, whereas under abnormal conditions the inducible NO synthesis by the  $Ca^{2+}$ -independent inducible isoform of NO synthase (iNOS) is the main pathway. The overexpression of iNOS is a response to radiation, whereas the activity of eNOS is at that declining despite elevated levels of intracellular  $Ca^{2+}$  being one of its activators. Consequently, the effects of radiation depending on exposure duration and dose can occur both as a  $Ca^{2+}$ -dependent and  $Ca^{2+}$ -independent eNOS activity regulation.

The authors [14, 15] suggest the probable biochemical pathways of abnormal expression and activity of different isoforms of NOS after the exposure to radiation. Expression of iNOS is induced by cytokines and steroid hormones. Under normal conditions, the level of expression of iNOS is low, but within oxidative stress being a common response of cells to the hazardous factors including radiation the expression of iNOS may significantly increase. It leads to an increased generation of  $O_2^-$  being in its turn a powerful activator of iNOS expression. Radiation even in low doses increase the generation of  $O_2^-$  by several oxidases. Thus, the oxidative stress that occurs under chronic low dose radiation exposure may be a major source of iNOS overexpression in cardiovascular system [14, 15].

Expression of eNOS is triggered by various peptide hormones, including angiotensin II, insulin, and also by hypoxia and other factors, and the increased expression occurs under the excess of  $H_2O_2$ . A significant increase of  $H_2O_2$  content in cardiovascular system occurs under radiation exposure. Hence the oxidative stress after radiation exposure can be the source of eNOS overexpres-

iNOS. На відміну від iNOS активність eNOS залежить не лише від рівня її експресії, а здійснюється за рахунок активації  $\text{Ca}^{2+}$  чи фосфорилуванням білка ферменту різними протеїнкіназами [14, 15].

Як показали експериментальні дослідження [14, 15], біохімічним механізмом пошкоджуючої дії малих доз радіації на систему оксиду азоту було зниження конститутивного синтезу NO ізоферментом eNOS, на що вказують низькі рівні нітрит-аніону в органах серцево-судинної системи, як при отриманні одноразової низької дози іонізуючого випромінювання, так і при тривалому перебуванні в умовах підвищеного радіаційного фону.

На підставі своїх досліджень автори [15] прийшли до загального висновку, який полягає у тому, що низькі дози радіації, отримані протягом тривалого часу, спричиняють значні зміни у пулах стабільних метаболітів NO, що може бути причиною порушень ряду NO-залежних фізіологічних функцій. Значне зниження рівня нітриту за цих умов може призводити до окисного стресу. Високі рівні одночасної генерації  $\text{O}_2^-$  та NO, зв'язуючись, можуть призводити до утворення токсичного  $\text{ONOO}^-$ . Доказом цього є низькі рівні нітриту, що утворюється спонтанно за наявності молекулярного кисню, на фоні або підвищених, або контрольних рівнів нітрату, який в основному утворюється при деградації пероксинітриту, тобто, при високому рівні супероксидного аніону.

Виходячи з вищевикладеного, проведені нами дослідження пулів стабільних метаболітів оксиду азоту виявили у дітей- мешканців радіоактивно забруднених територій зниження рівня нітриту на тлі не відмінних суттєво від контрольних рівнів нітрату та сумарного показника метаболітів NO, що узгоджується з експериментальними роботами [14, 15]. За думкою авторів цих робіт подібні зміни є характерними для наслідків як гострого так і хронічного впливу малих доз іонізуючого випромінювання на організм.

Виявлене при дослідженні стану показників ПОЛ та антиоксидантного захисту підвищення активності каталази може вказувати на компенсаторне напруження функціонування цього внутрішньоклітинного чинника антиоксидантного захисту [9, 10].

Відсутність підвищення ТБК-активних продуктів ПОЛ може в цьому випадку розглядатися як свідчення ефективності антиоксидантного захисту [9, 10].

Зазначені зміни стабільних метаболітів оксиду азоту, показників ПОЛ і антиоксидантного захисту можуть свідчити про наявність передумов для розвитку у дітей- мешканців радіоактивно забруднених територій системного окисного стресу [9, 10].

sion, as in the case of iNOS. Unlike iNOS the eNOS activity depends not only on a level of its expression, but is due to  $\text{Ca}^{2+}$  activation or phosphorylation of protein kinase enzyme [14, 15].

As shown by experimental studies [14, 15] the reduced constitutive NO synthesis by isoenzyme eNOS is a biochemical pathway of the low dose radiation injury. It is suggested by the fact of a low level of nitrite anion in the organs of cardiovascular system both after a single low dose radiation exposure and during a long-term stay in elevated background radiation environment.

The authors [15] came to the conclusion that low doses of radiation received in a long time cause the significant abnormalities in the pools of stable NO metabolites, which can cause disorders of several NO-dependent physiological pathways. Significant reduction of nitrite under these conditions can lead to oxidative stress. High levels of simultaneous  $\text{O}_2^-$  and NO generation being bound may lead to the formation of toxic  $\text{ONOO}^-$ . This is proved by low levels of nitrite produced spontaneously in the presence of molecular oxygen at a background either elevated or control levels of nitrate, which is mainly formed under degradation of peroxyxynitrite, i.e. at high superoxide anion level.

According to results of our research of the stable metabolites pools of nitric oxide a reduced content of nitrite and no significant differences of nitrate and total indices of NO metabolites were identified in children-residents of contaminated areas, which is consistent with experimental work results [14, 15]. In opinion of authors of these papers such abnormalities are specific to the effects of both acute and chronic human exposure to low doses of ionising radiation.

Increased catalase activity revealed in the study of LPO and antioxidant defence system can point to a possible compensatory functional strain of this intracellular antioxidant factor [9, 10].

No increase of TBA-active product of LPO can in this case be considered as an evidence of the effective antioxidant protection [9, 10].

These abnormalities of the stable metabolites of nitric oxide, indices of LPO antioxidant system can be indicative of preconditions for the systemic oxidative stress development of children residing on contaminated territories [9, 10].

## ВИСНОВКИ

1. Дослідження вмісту метаболітів NO в сироватці крові показало, що у дітей- мешканців радіоактивно забруднених територій у порівнянні з контролем спостерігалось достовірне зниження рівня нітритів, тоді як вірогідних відмінностей вмісту нітратів та сумарного показника вмісту метаболітів NO не спостерігалось.
2. Активація основного внутрішньоклітинного антиоксиданту – каталази за відсутності достовірних змін ТБК-активних продуктів ПОЛ свідчить про достатність компенсаторних можливостей антиоксидантної системи у дітей – мешканців радіоактивно забруднених територій з вмістом  $^{137}\text{Cs}$  від 269 до 6253 Бк у тілі.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Романенко А. Ю. Стан здоров'я дітей, які постраждали внаслідок Чорнобильської катастрофи (за даними 20-річних спостережень) / А. Ю. Романенко, Є. І. Степанова // Журн. АМН України. – 2006. – Т. 12, № 2. – С. 296–306.
2. Чернобыльская катастрофа и здоровье детей / Е. И. Степанова, В. Ю. Вдовенко, В. Г. Кондрашова, И. Е. Колпаков // Новая медицина тысячелетия. – 2010. – № 4. – С. 18–22.
3. Ванин А. Ф. Оксид азота в биомедицинских исследованиях / А. Ф. Ванин // Вестн. РАМН. – 2000. – № 4. – С. 3–5.
4. Ивашкин, В. Т. Оксид азота в регуляции функциональной активности физиологических систем / В. Т. Ивашкин, О. М. Драпкина // Рос. журн. гастроэнтерол., гепатол., колопроктол. – 2000. – № 4. – С. 41–43.
5. Дубинина В. Г. Оксид азота и дизрегуляторная патология организма человека / В. Г. Дубинина // Буковинський мед. вісн. – 2005. – Т. 9, № 4. – С. 23–26.
6. Марков Х. М. Роль оксида азота в патогенезе болезней детского возраста / Х. М. Марков // Рос. вестн. перинатол. и педиатр. – 2000. – № 4. – С. 41–47.
7. Ernesto L. Oxidative Stress. Nitric oxide synthase and superoxide dismutase / L. Ernesto, V. Schiffrin // Hypertention. – 2008. – Vol. 51. – P. 31–34.
8. Grand F. Optimization of the measurement of nitrite and nitrate in serum by the Griss reaction / F. Grand, J. Guitton, J. Coudable // Ann. Biol. Clin. (Paris). – 2001. – Vol. 59. – P. 559–565.
9. Победьонна Г. П. Роль змін показників перекисного окислення ліпідів, ферментів антиоксидантного захисту та метаболітів оксиду азоту у формуванні системного окислювального стресу у хворих із загостренням бронхіальної астми / Г. П. Победьонна // Лік. справа (Врач. дело). – 2005. – № 5-6. – С. 36–40.
10. Метод определения активности каталазы / М. А. Королюк, Л. И. Иванова, И. Г. Майорова, В. Е. Токарев // Лаб. дело – 1988. – № 1. – С. 16–19.
11. Пат. 53153 UA, МПК АГ1В 5/00 (2003.01) С 07В 31/00 (2003.01) Спосіб визначення вмісту оксиду азоту в тканині та біологічних рідинах

## CONCLUSIONS

1. Study of the nitric oxide metabolites in serum of children residing on contaminated territories showed a significant reduction of nitrite concentration along with no significant differences of nitrate and of total index of NO metabolites content.
2. Activation of the main intracellular antioxidant catalase along with no significant changes in the content of MDA as final product of lipid peroxidation indicates to a sufficient compensatory capacity of antioxidant system in children-residents of contaminated territories with incorporated  $^{137}\text{Cs}$  level 269 to 6253 Bq.

## REFERENCES

1. Romanenko AE., Stepanova EI. [Health status of children who suffered from Chernobyl accident (20-year observation data)]. Zhurnal Akademii medychnykh nauk Ukrainy. 2006;12(2): 296–306. Ukrainian.
2. Stepanova EI, Vdovenko VY, Kondrashov VG, Kolpakov IYe. [Chernobyl catastrophe and health of children]. Novaia meditsina tysiacheletia. 2010;(4):17–22. Russian.
3. Vanin AF. [Nitric oxide in biomedical research]. Vestn Ross Akad Med Nauk. 2000;(4):3–5. Russian.
4. Ivashkin VT, Drapkina OM. Nitrogen oxide in regulation of physiological systems functional activity. Russian Journal of Gastroenterology, Hepatology, Coloproctology. 2000;(4):41–3. Russian.
5. Dubinin VG. [Nitric oxide and dizregulyatsionnaya pathology of the human body]. Bukovynsky medychny visnyk. 2005;9(4):23–6. Russian.
6. Markov KhM. [The role of nitric oxide in the pathogenesis of childhood illnesses]. Rossiiski vestnik perinatologii i pediatrii. 2000;(4):41–7. Russian.
7. Ernesto L, Schiffrin V. Oxidative Stress. Nitric oxide synthase and superoxide dismutase. Hypertention. 2008;51:31–4.
8. Grand F, Guitton J, Coudable J. Optimization of the measurement of nitrite and nitrate in serum by the Griss reaction. Ann Biol Clin. 2001;59:559–65.
9. Pobedionna GP. [Role of changes in indicators of lipid peroxidation, antioxidant enzymes and metabolites of nitric oxide in the formation of systemic oxidative stress in patients with acute exacerbation of asthma]. Lik Sprava. 2005;(5–6):36–40. Ukrainian.
10. Koroljuk MA, Ivanova LI, Mayorova IG, Tokarev VE. [The method for determining the activity of catalase]. Lab delo. 1988; (1):16–19. Russian.
11. Orlov AA, Komarevtseva IO, Komarevtsev VM, inventor; State Luhansk Medical University, Ministry of Health Ukraine, assignee. [Method of determining the content nitric oxide in tissues and biological fluids]. Ukraine patent 53153 UA, 2003 Feb 15. Ukrainian.



- [Текст] / Орлова О. А., Комаревцева І. О., Комаревцев В. М. ; заявник Луганський держаний медичний університет МОЗ України – № 2002032337; заявл. 25.03.2002; опубл. 15.02.2003, Бюл. №1, 2003 р.
12. Методи оцінки вільнорадикального окислення та стану антиоксидантної системи організму у клінічній практиці : метод. рекомендації / Науковий центр радіаційної медицини АМН України. – К., 2007. – 23 с.
13. Воронина Л. П. Генетические, биохимические и функциональные маркеры состояния вазорегулирующей функции эндотелия / Л. П. Воронина // Сибирск. мед. журн. – 2011. – № 3. – С. 29–31.
14. Сосудистая реактивность и метаболизм реактивных форм кислорода и азота при действии низких доз радиации / М. Н. Ткаченко, А. В. Коцюруба, О. В. Базилук [и др.] // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2009. – Т. 49, № 4. – С. 462–471.
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. Коцюруба [та ін.] // Журн. АМН України. – 2007. – Т. 13, № 1. – С. 20–32.
12. [Methods for evaluation of free radical oxidation and antioxidant system of the organism in clinical practice: methodical recommendations]. Kyiv: Research Center for Radiation Medicine; 2007. 23 p. Ukrainian.
13. Voronin LP. [Genetic, biochemical, and functional vasoregulating markers of the status of endothelial function]. Sibirskii meditsinskii zhurnal. 2011;(3):29–31. Russian.
14. Tkachenko MN, Kotsyuruba AV, Bazilyuk OV., et al. [Vascular reactivity and metabolism of reactive oxygen and nitrogen species by the action of low-dose radiation]. Radiats Biol Radioecol. 2009; 49(4):462–71. Russian.
15. Tkachenko MM, Sagach VF, Kotsyuruba AV, et al. [Effect of low dose radiation on vascular reactivity and oxidative metabolism of oxygen and nitrogen in the cardiovascular system]. Zhurnal Akademii medychnykh nauk Ukrainy. 2007;13(1):20–32. Ukrainian.

Стаття надійшла до редакції 22.08.2013

Received: 22.08.2013