

УДК 575.113:543.272.3:616.211-008.4.6-053.2:614.876

Є. І. Степанова✉, І. Є. Колпаков, В. М. Зигало, О. М. Литвинець, В. Г. Кондрашова,
В. Ю. Вдовенко, О. О. Скварська, О. С. Леонович

Державна установа “Національний науковий центр радіаційної медицини Національної академії медичних наук України”, 53, вул. Мельникова, м. Київ, 04050, Україна

ВПЛИВ VNTR (4a/b) ПОЛІМОРФІЗМУ ГЕНА eNOS НА РОЗВИТОК ЕНДОТЕЛІАЛЬНОЇ ДИСФУНКЦІЇ ТА ПОРУШЕНЬ СИСТЕМИ ДИХАННЯ У ДІТЕЙ – МЕШКАНЦІВ РАДІОАКТИВНО ЗАБРУДНЕНИХ ТЕРИТОРІЙ

Мета роботи – дослідити роль поліморфізму генів eNOS у розвитку ендотеліальної дисфункції та функціональних розладів системи дихання у дітей – мешканців радіоактивно забруднених територій.

Матеріали і методи дослідження. Для визначення можливих асоціативних зв'язків поліморфізму у 4-му інтроні гена eNOS з показниками, що характеризують функціональний стан ендотелію та бронхолегеневої системи, проведено обстеження 184 дітей. З них основну групу склали 135 дітей – мешканців радіоактивно забруднених територій, контрольну – 49 дітей, які проживали в “чистих” щодо радіоактивного забруднення регіонах і не належали до постраждалих внаслідок Чорнобильської аварії контингентів. Проводили молекулярно-генетичне дослідження з визначенням поліморфізму в 4-му інтроні гена eNOS. Дослідження вентиляційної спроможності легенів оцінювали за допомогою методу пневмотахографії. Для реєстрації ендотеліозалежної реакції судинного русла на зміни умов кровопостачання використовували термографічний спосіб. Визначення рівнів азотистих сполук NO²⁻ та NO³⁻ проводили за стандартною методикою з використанням реактиву Грісса. Рівень інкорпорованого ¹³⁷Cs в організмі визначали за допомогою лічильника випромінювання людини Скриннер-3М виробництва Інституту екології людини.

Результати. Діти основної групи за частотою поліморфних 4a/b генотипів та алелів 4a і 4b гена eNOS не відрізнялися від контролю та даних літератури. У дітей основної групи з генотипом 4a/4b у порівнянні з дітьми, які мали генотип 4b/4b, відмічалася збільшення тривалості відновлення кровообігу до вихідного рівня після оклюзійної проби; спостерігалася зниження вмісту нітриту в сироватці крові; зменшення інтегральних показників еластичності і розтяжності легеневої тканини, прохідності дихальних шляхів; у 1,5 раза частіше реєструвалися ознаки бронхоспазму. Ці несприятливі ефекти були асоційовані з наявністю у генотипі алелю 4a, ознак ендотеліальної дисфункції та рівнем інкорпорованого ¹³⁷Cs.

Висновки. Більш виразні зміни ендотеліозалежної реакції судин на оклюзію та вірогідне зниження рівня нітриту в сироватці крові у носіїв алелю 4a, особливо у дітей, які проживають у несприятливих екологічних умовах, надає підстави віднести їх до групи ризику з розвитку ендотеліальної дисфункції, а порушення функції легенів розглядати як один з її проявів.

Ключові слова: діти, Чорнобильська катастрофа, радіоактивно забруднені території, поліморфізм гена eNOS, ендотеліальна дисфункція, оксид азоту, система дихання.

Проблеми радіаційної медицини та радіобіології. 2015. Вип. 20. С. 432–444.

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

Ye. I. Stepanova✉, I. Ye. Kolpakov, V. M. Zyhalo, O. M. Lytvynets, V. H. Kondrashova, V. Yu. Vdovenko, O. O. Skvars'ka, O. S. Leonovych

State Institution "National Research Center for Radiation Medicine of National Academy of Medical Sciences of Ukraine", Melnikova str., 53, Kyiv, 04050, Ukraine

Influence of *eNOS* gene *4a/b* VNTR polymorphism on development of endothelial dysfunction and respiratory system disorders in children – residents of radioactively contaminated areas

Objective is to study the role of *eNOS* gene polymorphism in the development of endothelial dysfunction and functional disorders of the respiratory system in children – residents of radioactively contaminated areas.

Materials and methods. Total of 184 children were examined to determine the possible associative links between *eNOS* gene intron 4m polymorphism and indices characterizing the functional state of the endothelium and the bronchopulmonary system. Of them the main group of children consisted of 135 children-residents of radioactively contaminated areas, the control group – of 49 healthy children who lived in "clean" regions by the radioactive contamination and were not belonging to victims of the Chernobyl accident contingents. The molecular genetic study determining the *eNOS* gene intron 4 polymorphism was performed. An examination of lung ventilation capacity was evaluated using the pneumotachography method. The thermographic method was used for registering the endothelium dependent reaction of the vascular bed to changes in blood supply conditions. The levels of nitrogen compounds (NO^{2-} and NO^{3-}) were determined by the standard method using Hrisss reagent. The level of body incorporated ^{137}Cs was determined using human radiation counter Skrynner 3M (Institute of Human Ecology).

Results. Children of the main group did not differ from that of control and literature data by the frequency of genotypes *4a/b* and *eNOS* gene allele polymorphism. An increase in the duration of circulation restoration up to the initial level after occlusion test was noted in children of the main group with genotype *4a/4b* comparing to children with genotype *4b/4b*; a decrease in the nitrite content was observed in blood serum. The integral indices of elasticity and tensility of the lung tissue, respiratory permeability were decreased; the signs of bronchospasm were recorded 1.5 times more often. These adverse effects were associated with the presence of genotype allele *4a*, the signs of endothelial dysfunction and the level of the incorporated ^{137}Cs .

Conclusions. More pronounced changes in vascular endothelial reaction to occlusion and the significant decrease of serum nitrite level in allele *4a* carriers, especially in children who live in adverse ecological conditions, give the right to include them into the risk group for the development of endothelial dysfunction, and to consider pulmonary dysfunction as one of its manifestations.

Key words: children, the Chernobyl disaster, radioactively contaminated areas, *eNOS* gene polymorphism, endothelial dysfunction, nitric oxide, the respiratory system.

Problems of radiation medicine and radiobiology. 2015;20:432-444.

ВСТУП

Роботами багатьох авторів доведено, що одним з найбільш несприятливих наслідків Чорнобильської катастрофи є значне погіршення здоров'я постраждалого дитячого населення [1, 2]. Спостерігається скорочення чисельності практично здорових дітей та підвищення показників захворюваності майже за всіма класами хвороб, серед яких провідне місце посідають захворювання органів дихання [3, 4]. Проте, незважаючи на пильну увагу до проблеми, патофізіологічні механізми функціональних розладів з наступною трансформацією їх у хронічні неспецифічні хвороби органів дихання у дітей – мешканців забруднених територій залишаються остаточно нез'ясованими [5].

INTRODUCTION

Significant health deterioration of the exposed child population is one of the unfavourable consequences of the Chernobyl disaster that is demonstrated by the work of many authors [1, 2]. There is a decrease in the number of practically healthy children and an increase in morbidity indices by all the classes of diseases, among which the leading place is occupied by respiratory ones [3, 4]. However, despite the intent attention to this problem, the pathophysiological mechanisms of functional disorders with subsequent their transformation into chronic nonspecific respiratory diseases in children – residents of contaminated areas are remained completely unclear [5].

Дослідження останніх десятиріч показали, що у формуванні мультифакторіальної патології, в тому числі бронхолегеневої системи, важливу роль відіграє спадкова схильність до тих чи інших захворювань, реалізації яких сприяють несприятливі чинники навколишнього середовища [6]. При цьому особливу увагу приділяють поліморфізму певних генів, що контролюють метаболізм оксиду азоту, який бере участь в регуляції багатьох фізіологічних та патофізіологічних процесів [7].

У регуляції продукції оксиду азоту ендотеліальними клітинами важлива роль належить ендотеліальній NO-синтазі (*eNOS*). Пригнічення її активності призводить до порушення синтезу оксиду азоту з L-аргініну [8]. На теперішній час описані поліморфні варіанти гена *eNOS* у різних ділянках гена, в тому числі, у 4-му інтроні *eNOS* – *4a/b* VNTR-поліморфізм. Вплив алелю *4a* пов'язують з порушенням експресії гена *eNOS*, що обумовлює зменшення виробітку NO. Наявність алелю *4a* в генотипі розглядають як чинник ризику з розвитку бронхолегеневої та серцево-судинної патології [9]. Існують літературні дані про більш високу радіочутливість носіїв алелю *4a* гена *eNOS* [10].

Проте у дітей, які мешкають за умов тривалого надходження ^{137}Cs до організму, такі дослідження не проводилися. У зв'язку з цим, дослідження метаболізму оксиду азоту і *4a/b* поліморфізму гена *eNOS* є важливим для визначення механізмів несприятливих ефектів Чорнобильської катастрофи у дітей – мешканців радіоактивно забруднених територій та з'ясування взаємодії чинників навколишнього середовища і генетичної компоненти у їх реалізації.

МЕТА

Визначити вплив *4a/b* VNTR-поліморфізму гена *eNOS* на метаболізм оксиду азоту, розвиток ендотеліальної дисфункції та функціональних порушень у системі дихання у дітей, які мешкають за умов тривалого надходження ^{137}Cs до організму.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Для встановлення можливих асоціативних зв'язків поліморфізму у 4-му інтроні гена *eNOS* з показниками, що характеризують функціональний стан ендотелію та бронхолегеневої системи, проведено обстеження 184 дітей. З них до основної групи увійшли 135 дітей – мешканців радіоактивно забруднених територій, до контрольної – 49 дітей, які проживали в “чистих” щодо радіоактивного забруднення регіонах

Genetic predisposition to certain diseases, the implementation of which contribute to adverse environmental factors plays an important role in the formation of multifactorial pathology, including bronchopulmonary system that was demonstrated by the studies of recent decades [6]. The particular attention is paid to polymorphism of certain genes controlling nitric oxide metabolism, that is involved in the regulation of many physiological and pathophysiological processes [7].

Endothelial NO synthase (*eNOS*) is of a key role in regulation of nitric oxide production by endothelial cells. Inhibition of its activity leads to the distruction of the nitric oxide synthesis from L-arginine [8]. Nowadays the *eNOS* gene polymorphism variants, including in *eNOS* intron 4 – *4a/b* VNTR polymorphism are described in different fields. Effect of allele *4a* is associated with *eNOS* gene expression disorder, that is depended on a decrease in the NO production. The presence of genotype allele *4a* is considered as a risk factor for the development of bronchopulmonary and cardiovascular pathology [9]. There are published literature data on higher radiosensitivity of *eNOS* gene *4a* allele carriers [10].

However, such studies have been not conducted in children living under the prolonged incorporation of ^{137}Cs . In this regard, the study of nitric oxide metabolism and *eNOS* *4a/b* gene polymorphism is important to determine the mechanisms of adverse effects of the Chernobyl disaster in children – residents of radioactively contaminated areas and to elucidate the interaction of environmental factors and genetic component in their realization.

OBJECTIVE

To determine the influence of *eNOS* gene *4a/b* VNTR polymorphism on the nitric oxide metabolism, development of endothelial dysfunction and functional disorders in the respiratory system in children living under the prolonged ^{137}Cs incorporation.

MATERIALS AND METHODS

A total of 184 children were examined to establish possible associative links between *eNOS* gene intron 4 polymorphism and the indices characterizing functional state of endothelium and bronchopulmonary system. Of them, 135 children – residents from the radioactively contaminated territories were included into the main group, and 49 children who lived in “clean” i.e. uncontaminated regions

і не належали до постраждалих внаслідок Чорнобильської аварії контингентів.

Для визначення поліморфізму в 4-му інтроні гена *eNOS* виділяли геномну ДНК із замороженої крові, яка містила антикоагулянт – ЕДТА, з використанням комерційного набору “DiatonDNAPrep100” (ЛПБ “Неоген”, Україна). Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР) проводилася за протоколом [11] з використанням ліофілізованих комерційних наборів реагентів фірми “Ізоген” (РФ). Специфічні для поліморфних варіантів олігонуклеотидні праймери синтезовано фірмою “Metabion” (Німеччина):

(F) 5'-AGGCCSTATGGTAGTGCCTTT-3';

(R) 5'-TCTCTTAGTGCTGTGGTCAT-3'.

Генотипування проводили методом алель-специфічного 5'-нуклеазного аналізу на приладі AppliedBiosystems 2700 (Великобританія).

Детекцію продуктів алель-специфічної ампліфікації проводили методом горизонтального електрофору в 2 % агарозному гелі “Fermentas” (Литва).

Візуалізацію результатів здійснювали в ультрафіолетовому світлі за допомогою автоматичної системи відеочитування Vi-Tran в транслюмінаторі “Біоком” (РФ). Довжини отриманих при ампліфікації фрагментів аналізували шляхом порівняння з маркерною ДНК “Fermentas” (Литва). При комбінації алелів формувались три генотипи: *4a4a* (393 п.н.); *4a4b* (393 п.н., 420 п.н.); *4b4b* (420 п.н.).

Для реєстрації ендотелізалежної реакції судинного русла на зміни умов кровопостачання використовували термографічний спосіб. Для цього застосовували Індикатор ендотеліальної реактивності ІЕР-3 вітчизняного виробництва (ДП “НОРТ”).

Відповідно до результатів термографічного дослідження для кожного пацієнта на міліметровому папері креслили криву постоклюзійної гіперемії, за якою визначили ряд показників [12].

Дослідження вентиляційної спроможності легенів проводили методом пневмотахографії за даними аналізу петлі “потік-об’єм” на пневмотахографі автоматизованому ПТА-1 вітчизняного виробництва (ДП “ПОЙСК”). Визначали форсовану життєву ємність легенів (ФЖЄЛ); пікову об’ємну швидкість видиху (ПОШвид); максимальні об’ємні швидкості видиху відповідно до рівнів 25, 50 і 75 % ФЖЄЛ – МОШ₂₅, МОШ₅₀, МОШ₇₅; об’єм форсованого видиху за першу секунду (ОФВ1). Аналіз показників проводили у відсотках від належних. Належні величини показників, а також їх співвідношення з вимірними, розраховувалися автоматично залежно від статі, віку та зросту обстежуваного мікропроцесо-

and not belonged to contingents of the Chernobyl accident survivors – into the control group.

Genomic DNA was isolated from the frozen blood containing an anticoagulant – EDTA, using commercial kit of “DiatonDNAPrep100” (firm “Neogen”), Ukraine to determine the *eNOS* gene intron 4 polymorphism. Polymerase chain reaction (PCR) was carried out by the protocol [11] using lyophilized commercial kits of reagents (firm “Izohen”, Russia). Oligonucleotide primers specific for polymorphic variants were synthesized by the firm “Metabion”, Germany:

(F) 5'-AGGCCSTATGGTAGTGCCTTT-3';

(R) 5'-TCTCTTAGTGCTGTGGTCAT-3'.

Genotyping was performed by the method of allele-specific 5'-nuclease analysis with apparatus AppliedBiosystems 2700, UK.

Detection of allele-specific amplification products was performed by horizontal electrophoresis in 2 % agarose gel (firm “Fermentas”, Lithuania).

The visualization of results was performed in ultraviolet light using automatic video reading system Vi-Tran in transilluminator “Biocom”, Russia. The lengths of the fragments obtained in amplification were analyzed by comparison with marker DNA (firm “Fermentas”, Lithuania) Three genotypes were formed in allele combination of: *4a4a* (393 p.n.); *4a4b* (393 p.n., 420 p.n.); *4b4b* (420 p.n.).

The thermographic method was used for registering the endothelium dependent reaction of the vascular bed to changes in blood supply conditions. An indicator of endothelial reactivity ІЕР-3 of domestic production (firm “Nort”) was used for this.

A curve of postocclusion hyperemia by which some indices were identified was drawn on paper for each patient according to the results of thermographic study [12].

Examination of lung ventilation capacity was performed by pneumotachography method according to the analysis of “flow-volume” loop by automated pneumotachograph ПТА-1 of domestic production (firm “Poisk”). Forced vital capacity (FVC) of the lung; peak expiratory flow (PEF); maximal expiratory flow volume (MEFV) according to 25, 50 and 75 % FVC – MEF₂₅, MEF₅₀, MEF₇₅; forced expiratory volume in the first second (FEV1) were determined. An analysis of the indices was carried out by the percentage from that supported. Supported values of the indices and their correlation with measures, were calculated automatically depending on sex, age, and subject height by the microprocessor device

ром приладу ПТА-1 згідно з рівняннями регресії [13]. Межі фізіологічних коливань, помірних та виразних патологічних змін визначали відповідно до критеріїв [13].

Для виявлення бронхіальної гіперреактивності (прихованого і неприхованого бронхоспазму) використовували фармакологічну інгаляційну пробу із сальбутамолу сульфатом. Показники вентиляційної спроможності легенів реєстрували до і через 4–5 хв після двох інгаляційних доз дозованого аерозолу сальбутамолу сульфату (одна доза містить 100 мкг). Критерієм позитивності проби вважали приріст показників бронхіальної прохідності (МОШ₂₅; МОШ₅₀; МОШ₇₅) на 12 і більше відсотків у порівнянні з вихідними величинами [13].

Дослідження рівнів азотистих сполук (NO²⁻ та NO³⁻) проводили за стандартною методикою з використанням реактиву Грісса. Відновлення нітрату до нітриту проводили металічним цинком в розчині оцтової кислоти. Іони NO²⁻ виявляли діазореакцією з реактивом Грісса з подальшим колориметричним визначенням азосполуки рожевого кольору.

Розрахунок кількості нітрат-іонів проводили за різницею сумарної кількості нітрат- і нітрит-іонів та кількості нітрит-іонів. Кількість нітриту та нітрату розраховували в мкмоль/л за калібрувальним графіком згідно з методикою визначення [14].

Вміст ¹³⁷Cs в організмі дітей визначали за допомогою лічильника випромінювання людини Скриннер-3М. Рівень інкорпорованого цезію коливався від 269 до 7253 Бк.

Для статистичної обробки отриманих даних використовували програмне забезпечення Microsoft® Excel 2013, StatSoft, Inc. (2011). STATISTICA (data analysis software system), version 10 www.statsoft.com та SAS® 9.3 Foundation for Microsoft® Windows® (2013).

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

За результатами досліджень встановлено, що в основній групі генотип *4a/b* виявлявся у 34 (33,7 %) дітей, генотип *4b/4b* – у 67 (66,3 %) дітей, а в контрольній групі він зустрічався, відповідно, – у 12 (24,5 %) та у 34 (69,4 %) дітей. У 3 (6,1 %) дітей контрольної групи реєструвався генотип *4a/4a* (табл. 1).

Як видно з таблиці 1, діти основної та контрольної груп за частотою генотипів *4a/4b* та *4b/4b* не відрізнялися, $p > 0,05$. Що стосується генотипу *4a/4a*, то для визначення його частоти необхідним є більший об'єм вибірки, оскільки цей генотип у європейської популяції зустрічається зрідка [15]. Не відмічено статистично значущої різниці в частоті та

ПТА-1 according to regression equations [13]. The limits of physiological fluctuations, the moderate and distinct pathological changes were determined in accordance with the criteria [13].

Pharmacological inhalation test with salbutamol sulphate was used to identify bronchial hyperresponsiveness (latent and unlatent bronchospasm). The indices of lung ventilation capacity were recorded before and in 4–5 minutes after two doses of inhaled salbutamol sulphate aerosol (one dose contains 100 micrograms). An increase in indices of bronchial permeability (MEF₂₅; MEF₅₀; MEF₇₅) by 12 percent and more compared with baseline values was considered a criterion for sample positivity [13].

Studies of the levels of nitrogen compounds (NO²⁻ and NO³⁻) were conducted in accordance with the standard method using Hriiss reagent. Restoration of nitrate to nitrite was carried out by metallic zinc in a solution of acetic acid. NO²⁻ ions were revealed by dinitrogen reaction with Hriiss reagent followed by colorimetric determination of pink colour nitrogen compound.

The calculation of nitrate ion number was carried out by a difference of total number of nitrate and nitrite ions and the number of nitrite ions. The quantity of nitrite and nitrate was calculated in mmol/l by calibration graph according to the method of definition [14].

Content of ¹³⁷Cs in children body was determined using human radiation counter-Skrynner 3M. Level of incorporated ¹³⁷Cs ranged from 269 to 7253 Bq.

Microsoft® Excel 2013, StatSoft, Inc. (2011), STATISTICA (data analysis of software system), version 10 www.statsoft.com and SAS® 9.3 Foundation for Microsoft® Windows® (2013) were used for statistical data processing.

RESULTS AND DISCUSSION

Genotype *4a/4b* was detected in 34 (33.7 %) children of main group, genotype *4b/4b* – in 67 (66.3 %) children and – in 12 (24.5 %), and in 34 (69.4 %) children of the control group respectively. Genotype *4a/4a* was registered in 3 (6.1 %) children of the control group (Table 1).

As shown in Table 1, children of the main and control groups were not differed by the frequency of genotypes *4a/4b* and *4b/4b*, $p > 0.05$. For determine genotype *4a/4a* frequency the larger subject selection is required because this genotype is seldom occurred in European populations [15]. Statistically significant differences in allele fre-

Таблиця 1

Розподіл дітей основної та контрольної груп за частотою 4a/b генотипів та алелів 4a і 4b гена eNOS, абс. (%)

Table 1

Distribution of children in the main and control groups by the frequency of genotypes 4a/b and eNOS gene 4a and 4b alleles, abs. (%)

Показник / index	Група / group		p
	основна / main, n = 101	контрольна / control, n = 49	
Генотип / genotype 4a/4a	–	3 (6,1)	
Генотип / genotype 4a/4b	34 (33,7)	12 (24,5)	> 0,05
Генотип / genotype 4b/4b	67 (66,3)	34 (69,4)	> 0,05
Алель / allele 4a	34 (16,8)	18 (18,4)	> 0,05
Алель / allele 4b	168 (83,2)	80 (81,6)	> 0,05

співвідношенні алелів 4a і 4b в основній і контрольній групах, яке складало відповідно 0,202 та 0,225 (p > 0,05).

Ми перевірили відповідність співвідношення частот алелів і генотипів поліморфних варіантів 4a/b гена eNOS закону Харді-Вайнберга. Різниця між очікуваними і спостережуваними частотами генотипів виявилася статистично незначущою.

Для визначення особливостей ендотелійзалежної реакції судин у дітей – мешканців радіоактивно забруднених територій та дітей контрольної групи з поліморфними генотипами 4a/b гена eNOS досліджена тривалість періоду відновлення термографічного показника кровообігу (ТПв) до вихідного рівня після оклюзійної проби (табл. 2). За даними деяких авторів [12, 16, 17], саме цей показник вважається найбільш інформативним для оцінки секреторної активності ендотеліальних клітин відносно продукції вазодилітаторних речовин.

Результати, представлені в таблиці 2, вказують на те, що у дітей основної групи при генотипі 4a/4b відмічалася збільшення тривалості відновлення кровообігу до вихідного рівня після оклюзійної проби (3,67 ± 0,25) хв у порівнянні з дітьми, які мали генотип 4b/4b (3,00 ± 0,21) хв, p < 0,05. За даними кореляційного аналізу частоти генотипів та алелів 4a і 4b в основній і контрольній групах, що представили, 0,202 і 0,225 (p > 0,05) відповідно, не спостерігалися.

Correlation of allele and genotype of eNOS gene variants 4a/b polymorphism frequencies to the Hardy-Weinberg law was checked. The difference between the expected and observed genotypical frequencies was statistically insignificant.

Duration of renewal period for thermographic index (TI) of circulation up to the initial level after occlusion test was studied to determine the characteristics of endothelium-dependent reactions in children – residents of radioactively contaminated areas and in children of the control group with eNOS gene genotype 4a/b polymorphism (Table 2). According to data of some authors [12, 16, 17], this index is considered as the most informative for the evaluation of endothelial cell secretory activity in respect to the production of vasodilatory substances.

Results, presented in Table 2, indicate that the prolongation of circulation restoration to the initial level after the occlusion test (3.67 ± 0.25 min) in the main study group was noted compared to children with genotype 4b/4b (3.00 ± 0.21) min, p < 0.05. According to the data of correlation analysis a direct

Таблиця 2

Показник тривалості відновлення кровообігу до вихідного рівня після оклюзійної проби у дітей основної та контрольної груп при поліморфних 4a/4b генотипах гена eNOS (X ± m)

Table 2

Index of circulatory restoration duration to the initial level after occlusion test in children of the main and control groups in eNOS gene genotype 4a/4b polymorphism (X ± m)

Група / group	Показник ТПв, хв / CRd indices (min)		p
	4a/4b генотип / genotype	4b/4b генотип / genotype	
Main	3.67 ± 0.25	3.00 ± 0,21	< 0,05
Control	2.34 ± 0.23	2.04 ± 0,22	> 0,05

ляційного аналізу виявлено прямий кореляційний зв'язок між носійством алелю *4a* та тривалістю відновлення кровообігу до вихідного рівня після оклюзійної проби (ТПв), $r = 0,35491$ ($p < 0,008$).

Аналогічна тенденція спостерігалася і у дітей контрольної групи, проте статистично значущого рівня вона не досягала.

Слід також відмітити, що у дітей – мешканців радіоактивно забруднених територій відмічалася подовження показника ТПв у порівнянні з дітьми контрольної групи, як при генотипі *4b/4b* – ($3,00 \pm 0,21$) та ($2,04 \pm 0,22$) хв, ($p < 0,05$), так і при генотипі *4a/4b* – ($3,67 \pm 0,25$) та ($2,34 \pm 0,23$) хв, ($p < 0,05$). При цьому тривалість періоду відновлення кровообігу до вихідного рівня після оклюзійної проби була асоційована з вмістом інкорпорованого ^{137}Cs , ($r = 0,4147$, $p < 0,05$).

Виходячи з отриманих даних, до групи ризику з розвитку ендотеліальної дисфункції можна віднести дітей-носіїв алелю *4a* гена *eNOS*, особливо при додатковому впливі несприятливих умов навколишнього середовища.

Серед стабільних метаболітів оксиду азоту найбільш інформативним показником NO-синтазної активності ендотелію є рівень нітриту у сироватці крові, зниження якого вказує на пригнічення активності *eNOS* [18, 19].

Дослідження вмісту нітриту показало, що у дітей основної групи з генотипом *4a/4b* він був нижче ($5,53 \pm 0,26$) мкмоль/л у порівнянні з дітьми, які мали генотип *4b/4b* ($6,99 \pm 0,38$) мкмоль/л, $p < 0,01$.

Подібні тенденції спостерігалися і у дітей контрольної групи. Так, при *4a/4b* генотипі вміст нітриту складав ($8,87 \pm 0,81$) мкмоль/л, тоді як у носіїв алелю *a* – ($7,11 \pm 1,10$) мкмоль/л. Проте статистично значущого рівня різниці цих показників не досягала, $p > 0,05$.

Що стосується рівня нітрату та суми метаболітів NO (нітрит + нітрат), то у дітей як з генотипом *4a/4b*, так і з генотипом *4b/4b*, статистичних відмінностей не встановлено.

Отримані нами дані можна пояснити, спираючись на результати досліджень ряду авторів. Так, за даними [18–22], відносне зниження рівня нітриту є проявом зниження активності ендотеліальної NO-синтази (*eNOS*). При цьому вирівнювання відносно контролю сумарних показників метаболізму NO за рахунок нітрату пов'язують з посиленням ПОЛ та підвищенням активності індукбельної NO-синтази (*iNOS*).

В експериментальних роботах [19, 20], присвячених визначенню ключових механізмів, задіяних в ре-

correlation between allele *4a* carriers and prolongation of circulatory restoration to the initial level after occlusion test (OT), $r = 0.35491$ ($p < 0.008$) was revealed.

The similar tendency was observed in children of the control group, but statistically significant level was not reached.

It should also be noted that elongation of TI was revealed in children-residents of radioactively contaminated areas comparing to children of the control group with genotype *4b/4b* – (3.00 ± 0.21) min and (2.04 ± 0.22) min, ($p < 0.05$) and with genotype *4a/4b* – (3.67 ± 0.25) min and (2.34 ± 0.23) min ($p < 0.05$). The duration of the circulatory restorative period up to the initial level after occlusion test was associated with the content of incorporated ^{137}Cs , ($r = 0.4147$, $p < 0.05$).

Based on the data obtained, children-carriers of *eNOS* allele *4a* gene, especially with the additional effect of disadvantaged environment can be included into the risk group by the development of endothelial dysfunction.

The most informative index of endothelial NO-synthase activity is the level of nitrite in the blood serum, which decrease is the indicator of *eNOS* inhibition activity among the stable metabolites of nitric oxide [18, 19].

Study of nitrite content revealed its decrease (5.53 ± 0.26) mkmol/l in children of the main group with genotype *4a/4b* compared to children with genotype *4b/4b* (6.99 ± 0.38) mcmol/l, $p < 0.01$.

Similar tendencies were observed in children of the control group. Thus, the nitrite content consisted of ($8,87 \pm 0,81$) mkmol/l in the genotype *4a/4b*, while in allele *a* carriers – ($7,11 \pm 1,10$) mcmol/l. However, the difference of these indices did not reach the statistically significant level, $p > 0.05$.

Statistical differences were not established in children with both genotype *4a/4b* and genotype *4b/4b* as for the nitrite level and sum of NO (nitrite + nitrate) metabolites.

Data obtained can be explained based on the results of several studies, namely [18–22] i.e. relative decrease of nitrite level is a manifestation of decreased endothelial NO-synthase (*eNOS*) activity. This levelling relatively to the control of total parameters of NO metabolism due to nitrate is associated with increased lipid peroxidation and increased activity of inducible NO-synthase (*iNOS*).

In experimental studies [19, 20] devoted to the definition of the key mechanisms involved in the

гуляції NO-системи за умов впливу малих доз радіації, відмічається таке:

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, залежно від терміну дії та дози, може мати місце як Ca^{2+} -залежна, так і Ca^{2+} -незалежна регуляція активності *eNOS*.

Автори [19, 20] наводять біохімічні механізми, що можуть зумовити такі зміни експресії та 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 підсилувачем 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*.

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 , отже, гіперекспресія *eNOS* за радіаційного впливу може мати за причину окисний стрес, як і у випадку з *iNOS*. На відміну від *iNOS*, активність *eNOS* залежить не лише від рівня її експресії, а здійснюється за рахунок активації Ca^{2+} чи фосфорилування білка ферменту різними протеїнкіназами [20, 21].

Як показали експериментальні дослідження [20, 21], біохімічним механізмом пошкоджуючої дії малих доз радіації на систему оксиду азоту є зниження конститутивного синтезу NO ізоферментом *eNOS*, на що вказують низькі рівні нітрит-аніону в біосередовищах та тканинах як при отриманні одноразової низької дози іонізуючого випромінювання, так і при тривалому перебуванні в умовах підвищеного радіаційного фону.

regulation of NO-system under the effect of small radiation doses, the following is observed.

Under physiological conditions the main way of body NO synthesis is constitutive NO synthesis under the action of Ca^{2+} -dependent endothelial NO-synthase (*eNOS*) isoform, whereas in pathology it is inducible NO synthesis by Ca^{2+} -independent inducible NO synthase (*iNOS*) isoform. The *iNOS* overexpression occurs in response to irradiation, whereas *eNOS* activity, on the contrary, is decreased despite the increased level of intracellular calcium, which is one of its activators. Consequently, Ca^{2+} -dependent as well as Ca^{2+} -independent regulation of *eNOS* activity can occur under the radiation effect, depending on the duration of action and dose.

Biochemical pathways that can cause such changes in expression and activity of various NOS isoforms under the radiation effect, are suggested [19, 20]. Namely the *iNOS* expression is induced by cytokines and steroid hormones. Expression is low under normal conditions, but under oxidative stress, which is a common response of cells to the action of pathological factors, including radiation, the level of *iNOS* expression can be significantly increased. Under these conditions, O_2^- generation, which is a very powerful amplifier of *iNOS* expression, is increased. As is generally known, the O_2^- generation is increased by different oxidases under radiation impact, including the low dose. Thus, oxidative stress that occurs under chronic low-dose radiation can be a principal cause of *iNOS* overexpression.

The *eNOS* expression is started by various peptide hormones, including angiotensin II, insulin, hypoxia and other factors. Enhanced expression occurs at higher H_2O_2 level. A significant increase in H_2O_2 level takes place under radiation effect, therefore *eNOS* overexpression can be caused by oxidative stress, as in the case of *iNOS* under radiation effect. In contrast to *iNOS*, *eNOS* activity is dependent not only on the level of its expression, but is occurred owing to Ca^{2+} activation or phosphorylation of enzyme protein by different protein kinases [20, 21].

As was shown by experimental studies [20, 21], the biochemical mechanism damaging effect of small radiation doses on the nitric oxide system is a decrease of constitutive NO synthesis by *eNOS* isoenzyme, that was demonstrated by low levels of nitrite anion in the biological environment and the tissues in a single low ionizing radiation, as well as in prolonged being under elevated radiation background.

На підставі проведених досліджень автори [21, 22] прийшли до загального висновку, який полягає в 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 O_2^- та NO, зв'язуючись, можуть призводити до утворення токсичного $ONOO^-$. Доказом цього є низькі рівні нітриту, які виникають 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.

Таким чином, 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 [21, 22]. На думку авторів цих робіт, подібні зміни є характерними для наслідків впливу малих доз іонізуючого випромінювання на організм.

Відомо, що зниження продукції оксиду азоту ендотеліальними клітинами супроводжується порушеннями функції дихальної системи з розвитком бронхоспазму [14, 23]. Враховуючи більш тривалий період відновлення кровообігу після оклюзії та нижчий рівень нітриту у носіїв алелю *4a*, ми вважали за доцільне проаналізувати частоту порушень вентиляційної спроможності легенів у дітей з поліморфними *4a/b* генотипами гена ендотеліальної синтази оксиду азоту.

Середні показники вентиляційної спроможності легенів як при генотипі *4a/4b*, так і генотипі *4b/4b* в основній та контрольній групах, перебували в межах фізіологічних коливань [13]. Проте у дітей основної групи при генотипі *4a/4b* визначалося зменшення показника еластичності і розтяжності легеневої тканини – співвідношення форсованої життєвої ємності легенів з належною (ФЖЄЛ/НФЖЄЛ) в порівнянні з дітьми, які мали генотип *4b/4b*, відповідно, – $(90,5 \pm 2,1)$ і $(96,7 \pm 1,8)$ %, $p < 0,05$; мало місце також зниження інтегрального показника прохідності дихальних шляхів – співвідношення об'єму форсованого видиху за першу секунду з належним $ОФV_1/НОФV_1$, відповідно, – $(93,3 \pm 2,8)$ і $(100,8 \pm 2,1)$ %, $p < 0,05$. За даними кореляційного

On the basis of some studies, the authors [21, 22] came to the general conclusion, that low doses of radiation received during long time, cause the significant changes in the pools of stable NO metabolites, which can be a cause of disorders in some NO-dependent physiological functions. A significant nitrite decrease under these conditions can result in oxidative stress. High levels of simultaneous O_2^- and NO generations, in a case of binding, can lead to the formation of toxic $ONOO^-$. An argument of this are The low nitrite levels spontaneously occurred in the presence of molecular oxygen against a background of increased or control levels of nitrate, which is mainly formed by the peroxynitrite degradation that is at a high level of superoxide anion are an confirmation of this.

Thus, the nitrite decreased level was revealed in children-residents of radioactively contaminated areas by our studies of pools of stable NO metabolites against a background of significantly undifferent levels of nitrate and total index of NO metabolites from that of control, which is consistent with experimental work [21, 22]. Such changes are specific for the consequences of low dose ionizing radiation effect on the body according to data of these authors.

It is known that the decrease in nitric oxide production by the endothelial cells is accompanied by respiratory dysfunction with the bronchospasm development [14, 23]. Taking into account a longer period of circulatory restoration after occlusion and lower nitrite level in allele *4a* carriers, we decided that will be advisable to analyze the frequency of lung ventilation capacity disorders in children with endothelial nitric oxide synthase gene genotype *4a/b* polymorphism.

Average indices of lung ventilation capacity in genotype *4a/4b*, as well as in genotype *4b/4b* of the main and control groups were within ranges of physiological variations [13]. However, the decrease in elasticity and extensibility indices of the lung tissue – the ratio of forced vital capacity of the lungs with proper (FEV/IFEV) was detected in children of the main group in the genotype *4a/4b* compared to children with genotype *4b/4b* – (90.5 ± 2.1) % and (96.7 ± 1.8) %, $p < 0.05$, respectively; the integral index of respiratory permeability – the ratio of forced expiratory volume for the first second with proper $FEV_1/IFEV_1$ was also decreased – (93.3 ± 2.8) % and (100.8 ± 2.1) %, $p < 0.05$, respectively. The feed-back between the allele *4a* carrier

аналізу виявлено зворотний кореляційний зв'язок між носійством алелю *4a* та величиною показника ФЖЄЛ/НФЖЄЛ, $r = -0,2590$ ($p < 0,05$) і показника ОФВ₁/НОФВ₁, $r = -0,2627$ ($p < 0,05$). Аналогічна тенденція спостерігалася і у дітей контрольної групи, проте статистичної значущості вона не досягала.

Слід зазначити, що у дітей – мешканців радіоактивно забруднених територій спостерігалася тенденція до зниження показників вентиляційної спроможності легенів у порівнянні з дітьми контрольної групи, як при генотипі *4a/4b*, так і при генотипі *4b/4b*.

Отримані результати свідчать про те, що ознаки прихованого бронхоспазму виявлялися у 66,70 % дітей з *4a/4b* генотипом і у 44,12 % дітей з *4b/4b* генотипом ($p < 0,05$), тобто бронхіальна гіперреактивність у носіїв алелю *4a* зустрічалися в 1,5 раза частіше, ніж у дітей з *4b/4b* генотипом.

Патофізіологічні механізми виявлених функціональних змін у системі дихання можна розглядати з наступних позицій. За даними [23, 24], у дітей з бронхіальною обструкцією значно знижене, у порівнянні зі здоровими дітьми того ж віку, утворення NO, що узгоджується з експериментальними та клінічними даними, які свідчать про виражений бронхолітичний ефект NO у легенях [23]. Автори вважають, що нестача NO сприяє підвищенню тону-су гладеньких м'язів бронхів та їх звуженню при обструктивних захворюваннях легенів (бронхіальна астма, рецидивуючий бронхіт). За думкою [24], в основі дефіциту NO при цих захворюваннях можливо лежить збиткове утворення ендогенних інгібіторів NO-синтази.

Про патогенетичне значення дефіциту NO при бронхіальній астмі та інших обструктивних бронхолегеневих захворюваннях свідчить той факт, що інгаляції низьких концентрацій NO дають сприятливий терапевтичний ефект стосовно усунення бронхоспазму та легеневої гіпертензії [25].

За даними [23, 26], у дітей з рецидивуючим обструктивним бронхітом та бронхіальною астмою виявлена наявність ендотеліальної дисфункції, проявами якої є низький рівень нітриту, пов'язаний з пригніченням ендотеліальної NO-синтази (*eNOS*), і підвищення рівня нітрату, обумовлене патологічною активністю індукцибельної NO-синтази (*iNOS*).

На сучасному етапі рівень нітриту в крові розцінюється як предиктор активності ендотеліальної *eNOS*. Його зниження вказує на пригнічення *eNOS* [23].

and the size of FEV₁/IFEV₁ index, $r = -0.2590$ ($p < 0.05$) and of FEV₁/IFEV₁ indices, $r = -0.2627$ ($p < 0.05$) was revealed according to the data of correlation analysis. A similar tendency was also observed in children of the control group, but without reaching the statistical significance.

It should be noted that the tendency to decrease of pulmonary ventilation capacity indices were observed in genotype *4a/4b*, as well as in genotype *4b/4b* in the children-residents of radioactively contaminated areas compared to children of control group.

Received results indicate that the signs of latent bronchospasm were detected in 66.70 % children with genotype *4a/4b*, and in 44.12 % children with genotype *4b/4b* ($p < 0.05$), i.e. 1.5 times more often bronchial hyperresponsiveness was noted in allele *4a* carriers than in children with genotype *4b/4b*.

Pathophysiological mechanisms of identified functional changes in pulmonary system can be examined from following positions. NO formation is significantly decreased in children with bronchial obstruction compared with healthy children of the same age [23, 24,], that is consistent with experimental and clinical data indicating a pronounced bronchodilator effect of NO in the lungs [23]. The authors consider that NO deficiency contributes to the increased tone of bronchial smooth muscles and their constriction in obstructive lung diseases (bronchial asthma, recurrent bronchitis). According to other authors [24] the possible damaged formation of endogenous NO-synthase inhibitors can be the basis of NO deficiency in these diseases.

Concerning the pathogenetic importance of NO deficiency in bronchial asthma and other obstructive bronchopulmonary diseases is evidenced by the fact that inhalations of low NO concentrations give favorable therapeutic effect for bronchospasm removal and pulmonary hypertension [25].

According to some data [23, 26], the presence of endothelial dysfunction manifested by the low nitrite level that is associated with endothelial NO-synthase (*eNOS*) inhibition and increased nitrate level caused by abnormal activity of inducible NO-synthase (*iNOS*) were revealed in children with recurring obstructive bronchitis and bronchial asthma.

At present stage the nitrite level in the blood is considered as a predictor of endothelial *eNOS* activity. *eNOS* inhibition is explained by its decrease [23].

Таким чином, результати досліджень вентиляційної спроможності легенів визначили у дітей – мешканців радіоактивно забруднених територій зниження інтегральних показників вентиляційної спроможності легенів, високу частоту прихованої бронхіальної обструкції, що може знайти часткове пояснення у зазначеній вище специфіці змін рівнів стабільних метаболітів оксиду азоту і відповідній NO-синтазній активності.

Отже, результати проведених досліджень вказують на те, що дітей-носіїв алелю *4a* можна віднести до групи ризику з розвитку ендотеліальної дисфункції, особливо при проживанні в екологічно несприятливих умовах, а функціональні порушення системи дихання розглядати як одні з її проявів.

ВИСНОВКИ

1. Групи дітей – мешканців радіоактивно забруднених територій і дітей, які проживають в “чистих” щодо радіоактивного забруднення регіонах (контрольна група), за частотою генотипів *4a/4b* та *4b/4b* і алелів *4a* та *4b* гена *eNOS* достовірно не відрізнялися.
2. У дітей – мешканців радіоактивно забруднених територій з генотипом *4a/4b* у порівнянні з дітьми, які мали генотип *4b/4b*, відмічалася збільшення термографічного показника тривалості періоду відновлення кровообігу до вихідного рівня після оклюзійної проби; спостерігалася зниження вмісту нітриту в сироватці крові; зменшення інтегральних показників бронхіальної прохідності та еластичності легеневої тканини; у 1,5 раза частіше реєструвалися ознаки прихованого бронхоспазму. У дітей контрольної групи визначалися аналогічні тенденції, проте вони були менш виразними, ніж у дітей – мешканців радіоактивно забруднених територій.
3. Зміни ендотелійзалежної реакції судин на оклюзійну пробу (затримка відновлення кровообігу) та зниження рівня нітриту у сироватці крові у носіїв алелю *4a*, особливо у дітей, які проживають за умов тривалого надходження ¹³⁷Cs до організму, надає підстави віднести їх до групи ризику з розвитку ендотеліальної дисфункції, а функціональні порушення системи дихання розглядати як одні з її проявів.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Health effects of the Chernobyl accident – a Quarter of Century Aftermath / eds A. Serdiuk, V. Bebeshko, D. Bazyka, S. Yamashita. – Kyiv : DIA, 2011. – 694 p.
2. Медицинские последствия аварии на Чернобыльской атомной станции (монография в 3 книгах). Кн. 2. Клинические аспекты Чернобыль-

Thus, a decrease of the integral indices of lung ventilation capacity, high incidence of latent bronchial obstruction, which can be partially explained by the above specifics of the changes in the levels of stable nitric oxide metabolites and appropriate NO-synthase activity were determined by the results of lung ventilation capacity studies in children – residents of radioactively contaminated areas.

Thus, obtained results indicate that children-allele *4a* carriers can be attributed to the risk group for the endothelial dysfunction, especially when they are living in ecologically unfavorable conditions, and functional disorders of the respiratory system can be considered as one of its manifestations.

CONCLUSIONS

1. Groups of children – residents of radioactively contaminated areas, and children living in “clean” by radioactively contaminated regions (control group) were not significantly different by the frequency of *eNOS* gene genotypes *4a/4b* and *4b/4b* and allele *4a* and *4b*.
2. Increase in thermographic index of the restoration circulatory period duration to the initial level after occlusion test was noted in children – residents of radioactively contaminated areas with genotype *4a/4b* compared with children with genotype *4b/4b*; the nitrite level in blood serum was decreased; the decreased integral indices of bronchial permeability and elasticity of the lung tissue were observed; the signs of latent bronchospasm were recorded 1.5 times more frequently. The similar tendencies were noted in children of the control group but they were less pronounced than in children – residents of radioactively contaminated areas.
3. Changes in vascular endothelium dependent reaction to occlusion test (delay in restoration of blood circulation) and nitrite level decrease in blood serum of allele *4a* carriers, especially in children with prolonged incorporation of ¹³⁷Cs, gives reason to include them into risk group for the endothelial dysfunction development and functional disorders of the respiratory system to consider as one of its manifestations.

REFERENCES

1. Serdiuk A, Bebeshko V, Bazyka D, Yamashita S, editors. Health effects of the Chernobyl accident - a quarter of century aftermath. Kyiv: DIA; 2011. 694 p.
2. [Medical consequences of the accident at the Chernobyl nuclear power plant] (monograph in 3 books). Book 2. Bebeshko VH,

- ской катастрофы / под. ред. В. Г. Бебешко, А. Н. Коваленко. – К. : “МЕ-ДЭКОЛ” МНИЦ БИО-ЭКОС, 1999. – С. 5–6.
3. Stepanova E. Medical consequences of the Chernobyl disaster in the exposed pediatric population / E. Stepanova // Health effects of the Chernobyl accident – a Quarter of Century Aftermath / eds A. Serdiuk, V. Bebeshko, D. Bazyka, S. Yamashita. – Kyiv : DIA, 2011. – P. 551–552.
 4. Functional state of the respiratory and immune system in children-residents of the radioactive contaminated territories / I. Ye. Kolpakov, V. N. Vdovenko, Y. I. Stepanova [et al.] // Лікарська справа (Врачебное дело). – 2011. – № 1-2. – С. 21–29.
 5. P-288: Continuous low-dose post-natal radiation exposure and non-cancer effects / V. Vdovenko, Y. Stepanova, I. Kolpakov, V. Kondrashova // Epidemiology. – 2012. – Vol. 23, Iss. 5S. – P. 692.
 6. Effects of long-term low-level radiation exposure after the Chernobyl catastrophe on immunoglobulins in children residing in contaminated areas: prospective and cross-sectional studies / D. M. McMahon, V. Y. Vdovenko, W. Karmaus [et al.] // Environ. Health. – 2014. – Vol. 13(1). – P. 36.
 7. Степанова Е. И. Роль полиморфизма генов NO-синтаз в патогенезе мультифакториальных заболеваний / Е. И. Степанова, О. С. Скварська // Лікарська справа. – 2014. – № 5-6. – С. 47–55.
 8. Бондарь Т. Н. Система L-аргинин /оксид азота и иммунитет / Т. Н. Бондарь // Экспериментальна і клінічна медицина. – 2009. – № 3. – С. 4–8.
 9. eNOS gene intron 4 a/b VNTR polymorphism is a risk factor for coronary artery disease in Southern Turkey / S. Matyar, G. Attila, E. Acarturk [et al.] // Clin. Chim. Acta. – 2005. – Vol. 354 (1-2). – P. 153–158.
 10. Гончарова И. А. Изменчивость гипервариабельных участков генома человека при воздействии хронического гамма-облучения и индивидуальная радиочувствительность : автореф дис. ... канд. мед. наук: 03.00.04 / Гончарова Инна Александровна ; ГОУ ВПО “Томский государственный медицинский университет Росздрави”. – Томск, 2002. – 26 с.
 11. Miyahara K. Cloning and structural characterization of the human endothelial nitric-oxide-synthase gene / K. Miyahara, T. Kawamoto, K. Sase // Eur. J. Biochem. – 1994. – Vol. 1 (223). – P. 719–726.
 12. Березовський В. Я. Реактивна гіперемія, як показник якості функціонування ендотелію / В. Я. Березовський, О. Д. Динник, І. Г. Літовка // Медична гідрологія та реабілітація. – 2006. – Т. 6, № 1. – С. 4–11.
 13. Савельев Б.П. Функциональные параметры системы дыхания у детей и подростков : руководство для врачей / Б. П. Савельев, И. С. Ширяева – М. : Медицина, 2001. – 231 с.
 14. 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 // Лікарська справа (Врачебное дело). – 2005. – № 5-6. – С. 36–40.
 15. Wang X. L. Endothelial nitric oxide synthase gene sequence variations and vascular disease / X. L. Wang, J. Wang // Mol. Gen. Metab. – 2000. – Vol. 70. – P. 241–251.
 16. Максимович Н. А. Современные подходы к скрининговой диагностике дисфункции эндотелия у детей с вегетативными расстройствами: Kovalenko AN, editors. [Clinical aspects of the Chernobyl disaster]. K.: “MEDEKOL” MNITS BIO-EKOS; 1999. p. 5-6. Russian.
 3. Stepanova E. Medical consequences of the Chernobyl disaster in the exposed pediatric population. In: Serdiuk A, Bebeshko V, Bazyka D, Yamashita S, editors. Health effects of the Chernobyl accident - a quarter of century aftermath. Kyiv: DIA; 2011. p. 551-2.
 4. Kolpakov IY, Vdovenko VN, Stepanova YI, Bazyka DA, Karmaus WJ, Svendsen ER. Functional state of the respiratory and immune system in children-residents of the radioactively contaminated territories. Lik Sprava. 2011 Jan-Mar;(1-2):21-9.
 5. Vdovenko V, Stepanova Y, Kolpakov I, Kondrashova V. P-288: Continuous low-dose of postnatal radiation exposure and non-cancer effects. Epidemiology. 2012 Sept;23(5S):S-692.
 6. McMahon DM, Vdovenko VY, Karmaus W, Kondrashova V, Svendsen E, Litvinetz OM, et al. Effects of long-term low-level radiation exposure after the Chernobyl catastrophe on immunoglobulins in children residing in contaminated areas: prospective and cross-sectional studies. Environ Health. 2014 May 10;13(1):36. doi: 10.1186/1476-069X-13-36.
 7. Stepanova Yel, Skvarska OS. [The role of NO-synthase gene polymorphism in the pathogenesis of multifactorial diseases]. Lik Sprava. 2014;(5-6):47-55. Russian.
 8. Bondar TN. [L-arginin/nitrogen oxide system and immunity]. Experimentalna i Clinichna Medytsyna. 2009;(3):4-8. Russian.
 9. Matyar S, Attila G, Acarturk E, Akpınar O, Inal T. eNOS gene intron 4 a/b VNTR polymorphism is a risk factor for coronary artery disease in Southern Turkey. Clin Chim Acta. 2005;354(1-2):153-8.
 10. Goncharova IA. [Change in hypervariable part of the human genome under effect of chronic gamma irradiation and individual radiosensitivity]. [The dissertation abstract of candidate of medical science]. Tomsk (RU): GOU VPO “Tomskii gosudarstvennii meditsinskii universitet Roszdrama”; 2002. 26 p. Russian.
 11. Miyahara K, Kawamoto T, Sase K. Cloning and structural characterization of the human endothelial nitric-oxide-synthase gene. Eur J Biochem. 1994;1(223):719-26.
 12. Berezovsky VYa, Dynnyk OD, Litovka IH. [Reactive hyperemia, as an indicator of qualitative endothelium function]. Medychna Hydrologia i Reabilitatsia. 2006;6(1):4-11. Ukrainian.
 13. Saveliev BP, Shiryayeva IS. [Functional parameters of respiratory system in children and adolescents: guidance for doctors]. Moskva: Meditsina, 2001. 231 p. Russian.
 14. Pobed'onna HP. [Role of changes in indices of lipid peroxidation, enzyme antioxidant protection and metabolites of nitric oxide in the formation of systemic oxidative stress in patients with exacerbation of bronchial asthma]. Likarska sprava. 2005;(5-6):36-40. Ukrainian.
 15. Wang XL, Wang J. Endothelial nitric oxide synthase gene sequence variations and vascular disease. Mol Genet Metab. 2000 Aug;70(4):241-51.
 16. Maksimovich NA. [Modern approaches to screening diagnosis of endothelial dysfunction in children with vegetative disorders:

- результаты дискриминантного и кластерного анализа / Н. А. Максимович // Профилактическая медицина. – 2011. – № 5. – С. 27–29.
17. Максимович Н. А. Диагностика, коррекция и профилактика дисфункции эндотелия у детей с расстройствами вегетативной нервной системы / Н. А. Максимович. – Гродно : ГрГМУ, 2010. – 212 с. – ISBN978-985-496-652-6.
18. Вікові особливості змін скорочувальних судинних реакцій і вміст вільних радикалів кисню та метаболітів оксиду азоту у мишей лінії BALB/c за умов перебування в зоні відчуження / М. М. Ткаченко, В. Ф. Сагач, О. В. Базілюк [та ін.] // Фізіол. журн. – 2005. – Т. 51, № 3. – С. 32–41.
19. Вплив малих доз радіації на судинну реактивність та окисний метаболізм кисню і азоту в серцево-судинній системі / М. М. Ткаченко, В. В. Яроцький, В. Ф. Сагач [та ін.] // Журн. АМН України. – 2007. – Т. 13, № 1. – С. 20–32.
20. Сосудистая реактивность и метаболизм реактивных форм кислорода и азота при действии низких доз радиации / М. Н. Ткаченко, А. В. Коцюрба, О. В. Базілюк [и др.] // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2009. – Т. 49, № 4. – С. 462–471.
21. Малые дозы рентгеновского излучения активируют NO-синтазную компоненту цикла оксида азота / Н. В. Коробов, Л. В. Сорокина, О. В. Коробова, Л. А. Дацюк // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2003. – Т. 43, № 2. – С. 182–185.
22. NO-зависимый путь модификации клеточной чувствительности к действию гамма- и нейтронного излучения / Н. Я. Гильяно, Г. Н. Бондарев, Л. А. Носкин [и др.] // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2004. – Т. 44, № 4. – С. 62–67.
23. Поляков В. В. Клиническое значение эндотелиальной дисфункции у детей с рецидивирующим обструктивным бронхитом и бронхиальной астмой / В. В. Поляков, А. С. Сенаторова // Міжнародний медичний журнал. – 2012. – Т. 18, № 2. – С. 32–36.
24. Cardiovascular effects of peroxynitrite / R. M. Uppu, B. D. Nossaman, A. J. Greco [et al.] // Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. – 2007. – Vol. 34 (9). – P. 933–937.
25. Абатуров А. Е. Роль монооксида азота в системе неспецифической защиты респираторного тракта / А. Е. Абатуров // Здоровье ребенка. – 2009. – № 1 (16). – С. 130–137.
26. Лисенко Г. І. Ендотеліальна дисфункція та способи її корекції в практиці лікаря загальної практики – сімейної медицини / Г. І. Лисенко, О. Б. Яценко // Мистецтво лікування. – 2011. – № 8. – С. 15–20.
- results of discriminative and cluster analysis]. Profylaktycheskaya meditsina. 2011;(5):27-9. Russian.
17. Maksimovich NA. [Diagnosis, correction and prevention of endothelial dysfunction in children with disorders of vegetative nervous system]. Grodno: GrGMU; 2010. 212 p. Russian.
18. Tkachenko MN, Sagach VF, Baziljuk OV, Kotsuruba AV, Popereka GM, Stepanenko LG, et al. [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]. Fisiol Zh. 2005;51(3):32-41. Russian.
19. Tkachenko MN, Yarotskyi W, Sagach VF, Remennyk OI, Popereka GM. [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.
20. Tkachenko MN, Kotsiuruba AV, Baziliuk OV, Talanov SA, Popereka GM, Seniuk OF, et al. [Vascular reactivity and metabolism of the reactive oxygen species and nitrogen in effects of low doses of radiation]. Radiats Biol Radioecol. 2009 Jul-Aug;49(4):462-72. Russian.
21. Korobov VN, Sorokina LV, Korobova OV, Datsiuk LA. [Small doses of X-ray irradiation activate the NO-synthase component of the nitric oxide cycle]. Radiats Biol Radioecol. 2003 Mar-Apr;43(2):182-5. Russian.
22. Gil'iano NIa, Bondarev GN, Noskin LA, Fedortseva RF, Krasotskaia GI. [NO-dependent pathway of the modifying of the cellular sensitivity to gamma- and neutron irradiation]. Radiats Biol Radioecol. 2004 Jan-Feb;44(1):62-7. Russian.
23. Polyakov W, Senatorova AS. [Clinical significance of endothelial dysfunction in children with recurrent obstructive bronchitis and bronchial asthma]. Mizhnarodnyi Medychnyi Zhurnal. 2012;18(2):32-6. Russian.
24. Uppu RM, Nossaman BD, Greco AJ, Fokin A, Murthy SN, Fonseca VA, et al. Cardiovascular effects of peroxynitrite. Clin Exp Pharmacol Physiol. 2007 Sep;34(9):933-7.
25. Abaturon AE. [Role of nitrogen monoxide in the system of non-specific respiratory tract protection]. Zdorovie rebionka. 2009;1(16):130-7. Russian.
26. Lysenko HI, Yashchenko OB. [Endothelial dysfunction and ways of its correction in the practice of a general practitioner - family medicine]. Mystetstvo likuvannia. 2011;(8):15-20. Ukrainian.

Стаття надійшла до редакції 16.08.2015

Received: 16.08.2015