



УДК 663.253+577.346: 577.152.141:612.1

ПРИРОДНИЙ ПОЛІФЕНОЛЬНИЙ КОМПЛЕКС ІЗ ВИНОГРАДНОГО ВИНА МАЄ ПРОТЕКТОРНИЙ ВПЛИВ ЗА УМОВ РАДІОІНДУКОВАНОГО НІТРАТИВНОГО СТРЕСУ В АОРТІ ЩУРІВ

М. Сабадашка, Н. Сибірна

Львівський національний університет імені Івана Франка
вул. Грушевського, 4, Львів 79005, Україна
e-mail: m.sabadashka@meta.ua

У роботі досліджено систему L-аргінін/NO, продуктом якої є оксид азоту, що утворюється в NO-синтазній реакції та є важливою сигнальною молекулою в широкому ряді фізіологічних клітинних відповідей, у тому числі вазодилатації та регуляції тонуусу судин. Нами визначено активність NO-синтази, сумарний вміст стабільних метаболітів оксиду азоту (нітрит- і нітрат-аніонів) та вміст 3'-нітротирозин-модифікованих протеїнів у аорті щурів за дії іонізуючого випромінювання дозою 30 сГр та за споживання концентрату природного поліфенольного комплексу, отриманого упарюванням червоного виноградного вина. З'ясовано, що після опромінення вміст 3'-нітротирозин-модифікованих протеїнів знижується на 24 та 72 години, тоді як активність NO-синтази та вміст нітритів і нітратів зростають на 72 та 168 годин порівняно з контролем. Даний ефект малої дози іонізуючого випромінювання нівелюється введенням *per os* концентрату природного поліфенольного комплексу виноградного вина, який спричиняє зниження всіх досліджуваних показників на 72 та 168 годин. Отже, нами вперше проаналізовано розвиток нітративного стресу у тканинах аорти щурів за дії дози радіації, близької до природного радіаційного фону, й експериментально доведено можливість корекції таких змін природним поліфенольним комплексом виноградного вина.

Ключові слова: малі дози радіації, концентрат поліфенольного комплексу вина, оксид азоту, NO-синтаза, 3'-нітротирозин-модифіковані протеїни.

ВСТУП

Вплив малих доз іонізуючої радіації на живі організми є актуальною проблемою у зв'язку з підвищенням радіаційного забруднення природного середовища. Аварії на ядерних електростанціях є не єдиною загрозою для екосистем загалом і людства зокрема. Ще небезпечнішим і постійним є техногенне забруднення середовища через використання іонізуючого випромінювання у промисловості й медицині [10, 27]. Унаслідок опромінення у клітинах інтенсифікується утворення активних форм кисню (АФО) та нітрогену (АФН), що є пусковим механізмом розвитку оксидативно-нітративного стресу [30, 31].

Надмірне продукування оксиду азоту (NO) у клітинах ендотелію та порушення його метаболізму відмічено у разі багатьох захворювань, у тому числі при атеросклерозі, гіпертензії, а також після дії радіації як у високих, так і у малих дозах [16].

Відомо, що NO бере участь у регуляції радіочутливості клітин, оскільки може індукувати зупинку клітинного циклу після опромінення, що в подальшому призведе до незворотної зупинки росту і смерті клітини. Однак набагато більше уваги сьогодні дослідники приділяють ролі пероксинітриту (ONOO⁻), який утворюється у реакції NO зі супероксид-аніон радикалом (O₂⁻). ONOO⁻ є потужним прооксидантом і цитотоксином, призводить до ушкодження клітин і клітинної смерті, взаємодіючи з ліпідами, ДНК і протеїнами у реакціях окиснення, нітрування та нітрозилування [16, 28, 36, 40]. Унаслідок інтенсифікації реакцій нітрування протеїнів за тирозиновими залишками за різних патологічних станів у тканинах судин накопичуються значні кількості 3-нітротирозину, що спричиняє порушення ендотелій-залежної вазодилатації та зміни у шляхах трансдукції сигналів у клітинах судин [28]. Оскільки АФН важко детектувати *in vivo* у зв'язку з їхньою високою реактивністю, нітротирозин вважають найкращим біомаркером утворення ONOO⁻ [3].

Протягом останніх років зростає інтерес як науковців, так і громадськості до впливу на організм вина, зокрема його поліфенолів. Численні дослідження свідчать про зниження ризику розвитку порушень серцево-судинної системи за умов споживання поліфенолів виноградного вина [5, 12, 38]. Поліфенольні сполуки винограду вважаються перспективними радіопротекторними сполуками. Захист від дії радіації забезпечується здатністю поліфенолів виступати молекулами-донорами гідрогену і в такий спосіб знешкоджувати АФО й АФН. Хелатування іонів металів поліфенолами пригнічує здатність металів генерувати вільні радикали [5, 18, 19]. Найпотужнішими антиоксидантами є катехіни, епікатехіни, кверцитин і ресвератрол із виноградного вина [12]. Однак вплив поліфенолів червоного виноградного вина, зокрема отриманого з нього концентрованого препарату природного поліфенольного комплексу (концентрат ПК), на розвиток нітративного стресу за дії малих доз радіації вивчений недостатньо.

Метою роботи було дослідити зміни у L-аргінін/NO залежному метаболічному шляху протягом раннього пострадіаційного періоду після рентгенівського опромінення щурів у дозі 30 сГр і можливість корекції таких змін природним поліфенольним комплексом виноградного вина.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Дослідження проводили на білих безпородних щурах масою 180–200 г. Усі процедури з піддослідними тваринами проводили згідно зі “Загальними принципами роботи на тваринах”, затвердженими І Національним конгресом з біоетики (Київ, Україна, 2001) та з положеннями “Європейської конвенції із захисту хребетних тварин, які використовуються в експериментальних та інших наукових цілях” (Страсбург, Франція, 1986). Тварини перебували у стаціонарних умовах віварію із забезпеченням вільного доступу до їжі та води.

Піддослідні щури були поділені на чотири групи: перша – контрольні тварини (К), n = 20; друга – тварини, які споживали з питною водою концентрат ПК (К+ПК), n = 14; третя – щури, яких піддавали опроміненню (О), n = 24; четверта – тварини, які за 10 днів до початку і впродовж семи діб експерименту після опромінення споживали з питною водою концентрат ПК (О+ПК), n = 24.

Концентрат ПК отримували упарюванням червоного виноградного вина на роторному випарювачі Laborota 4001 (Німеччина). Масова концентрація фенольних сполук у досліджуваному препараті становила 59 г/л, зокрема, полімерних сполук – 40 г/л, мономерів – 19 г/л. Основні компоненти представлені кафтаровою, каутаровою та галовою кислотами, кверцитином і катехінами. Препарат вводили з питною водою з розрахунку щодобової дози препарату в перерахунку на концентрацію поліфенольних сполук 12,5 мг на 1 кг маси тіла, що відповідає теоретичній середній концентрації поліфенолів, яка міститься у 300 мл червоного вина (добова норма для людини масою тіла 70 кг). Загальний вміст поліфенолів був стандартизований у вині й отриманому препараті за галовою кислотою еквівалентно з використанням реактиву Фоліна–Чокальтеу [33].

Щурів піддавали загальному одноразовому опроміненню в дозі 0,3 Гр на установці РУМ-17 з такими параметрами: шкірно-фокусна відстань 95 см, напруга 130 кВ, сила струму 10 мА, фільтри Cu 0,5 мм та Al 1,0 мм, потужність дози – 8,3 МГр \times с⁻¹. Дозу опромінення контролювали клінічним дозиметром типу 27012 (Otto Shön, Німеччина).

На 24, 48, 72 та 168 годину після дії радіації щурів ефірним наркозом вводили в хірургічну стадію, проводили декапітацію тварин і забір зразків. Виділені тканини аорти одразу ж заморожували при -70°C .

У супернатанті, отриманому після центрифугування протягом 15 хвилин при 20 000 об./хв гомогенату тканини аорти в гіпотонічному 50 мМ Na-K фосфатному буфері (pH 7,4) (5 мг тканини/100 мкл буферу) визначали вміст нітритів і нітратів [18]. Активність NO-синтази (NOS) визначали модифікованим мікропланшетним методом [6]. Концентрацію білка визначали згідно з загальноприйнятим методом Лоурі [21].

Вміст 3'-нітротирозин-модифікованих протеїнів визначали методом Вестерн блотингу з використанням моноклональних антитіл до 3-нітротирозину (N5538, Sigma, США) [37].

Статистична обробка результатів дослідження здійснювалася за допомогою програми Microsoft Office Excel. Достовірною вважали різницю при показах вірогідності $p \geq 0,95$ (рівень значимості $P < 0,05$).

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ І ЇХНЕ ОБГОВОРЕННЯ

NO є важливим і унікальним медіатором багатьох фізіологічних функцій та патологічних процесів. NO генерується у разі окиснення L-аргініну до L-цитруліну ензимами родини синтаз оксиду азоту (NO-синтаза, NOS; L-аргінін, NADPH: кисень оксидоредуктаза; [EC 1.14.13.39]) [14]. За фізіологічних умов пул NO у судинах забезпечується функціонуванням ендотеліальної ізоформи NOS (eNOS). Базальний рівень NO необхідний для підтримання тону судин, регуляції адгезії лейкоцитів до клітин ендотелію та процесів зсідання крові [9, 11]. У клітинах судин значно меншою мірою експресуються гени нейрональної та індукційної ізоформ NOS (nNOS та iNOS) [4, 9].

Дія іонізуючого випромінювання не викликає змін активності NOS на ранніх термінах експерименту, а на 168 годину цей показник характеризується максимальними значеннями – є вищим від контролю в 1,3 разу ($P < 0,05$; $n = 5-6$) (див.таблицю). Відомо, що базальний рівень NO в організмі є низьким і визначається активацією конститутивних Ca^{2+} -залежних ізоформ NOS (nNOS та eNOS). І, навпаки, експресія

iNOS призводить до продукції NO у великих кількостях [14, 25]. Зважаючи на це, можна припустити, що зростання активності ензиму в даних досліджуваних умовах зумовлене надекспресією, в основному, його індукційної ізоформи. Адже відомо, що у відповідь на опромінення активується полі(АДФ-рибозо)полімераза для відновлення пошкоджень ДНК, а це веде до активації ядерного фактора NF- κ B з подальшою індукцією синтезу NO ензимом iNOS [2]. Іонізуюче випромінювання може активувати eNOS шляхом активації кальмодулін-залежної протеїнкінази II, яка опосередковує фосфорилування eNOS за залишком серину в 1179 положенні. У цьому разі опромінення не змінює експресію генів, які кодують цю ізоформу ензиму [29].

Вміст стабільних метаболітів оксиду нітрогену й активність NO-синтази у тканинах аорти щурів за умов дії іонізуючого випромінювання в дозі 30 сГр та на фоні споживання природного поліфенольного комплексу виноградного вина ($M \pm m$, $n = 6-11$)

The content of stable NO metabolites and the activity of NO-synthase in the aortic tissues of rats under irradiation in 30 cGy dose and consumption of natural polyphenolic complex of grape wine. Data are mean \pm S.E.M, $n = 6-11$

Умови експерименту	Сумарний вміст метаболітів оксиду Нітрогену, нмоль/мкг білка	Нітрит-аніон, нмоль/мкг білка	Нітрат-аніон, нмоль/мкг білка	Активність NO-синтази, нмоль NO ₂ ⁻ /хв×мкг білка
24 год				
К	14,58±0,73	4,30±0,54	10,28±1,07	0,057±0,001
К + П	17,09±2,82	7,59±0,68**	9,76±2,56	0,044±0,003**
О	17,41±2,36	9,40±1,27#	9,13±1,15	0,054±0,008
О + П	15,69±0,79	7,57±1,50	10,76±0,86	0,046±0,006
48 год				
К	16,25±1,36	4,99±0,50	11,27±0,93	0,054±0,002
К + П	11,93±0,91*	6,55±1,57	5,37±1,43*	0,050±0,002
О	12,72±1,43	6,00±1,67	6,72±1,75	0,051±0,0004
О + П	17,62±3,08	6,94±1,54	10,67±1,46	0,065±0,012§
72 год				
К	18,69±4,24	6,08±1,61	12,61±0,25	0,068±0,014
К+П	14,97±4,24	10,04±2,24*	4,93±0,62	0,066±0,007
О	45,84±7,29#	10,19±1,35#	34,91±3,63#	0,082±0,006
О + П	26,66±3,01	11,46±0,81	15,20±3,64§	0,074±0,006
168 год				
К	16,15±2,08	5,49±0,89	10,66±1,38	0,066±0,013
К + П	15,48±1,53	7,18±1,75	8,30±1,24	0,069±0,011
О	39,65±2,09#	14,40±2,61#	25,25±2,21##	0,089±0,010#
О + П	28,48±3,99§	9,42±1,62§	19,06±3,10§	0,070±0,005§

Примітка: *, ** – відмінність між показниками контрольної групи (К) та контрольної групи за введення концентрату природного поліфенольного комплексу винограду (К+ПК) вірогідна ($P < 0,05$ та $P < 0,01$, відповідно); #, ## – відмінність між показниками контрольної групи (К) та групи опромінених тварин (О) вірогідна ($P < 0,05$ та $P < 0,01$, відповідно); § – відмінність між показниками групи опромінених тварин (О) та групи, якій вводили концентрат природного поліфенольного комплексу винограду на фоні опромінення (О+ПК) вірогідна ($P < 0,05$).

Comment: *, ** – difference between control (C) and control with PC consumption (C+PC) ($P < 0.05$ and $P < 0.01$, respectively); #, ## – difference between control (C) and control with PC consumption (C+PC) ($P < 0.05$ and $P < 0.01$, respectively); §, §§ – difference between irradiation (R) and PC consumption against the background of irradiation (R+PC) ($P < 0.05$ and $P < 0.01$, respectively).

Унаслідок зростання активності NOS підвищеним був сумарний вміст стабільних метаболітів NO (нітритів і нітратів) у 2,5 разу ($P < 0,05$; $n = 5-6$) на 168 годину після впливу іонізуючого випромінювання у дозі 30 сГр в аорті щурів.

У разі різних патологічних процесів інтенсифікуються процеси утворення NO, незалежні від NOS. Даний метаболіт може напродукуватися після активації клітинних ксантиноксидаз та нітрит- і нітратредуктаз, при цьому вміст NO_2^- та NO_3^- знижується, адже вони стають джерелом NO [20, 22]. Іншими молекулами-донорами NO є S-нітрозильовані протеїни, зокрема нітрозотіоли [15]. За цього механізму вивільнений NO за короткий період часу окиснюється до NO_2^- та NO_3^- [7]. Імовірно, саме вивільнення NO з депо стало причиною зростання вмісту NO_2^- у 2,2 разу ($P < 0,01$; $n = 5-6$) вже на 24 годину та в 1,8 разу ($P < 0,05$; $n = 5-6$) на 72 годину. Рівень NO_2^- зростав також у 2,6 разу ($P < 0,05$; $n = 5-6$) на 168 годину. Вміст NO_3^- на ранніх термінах експерименту мав тенденцію до зниження, однак на 72 та 168 годину після опромінення даний показник зростав у 2,8 ($P < 0,05$; $n = 5-6$) та 2,4 разу ($P < 0,01$; $n = 5-6$), відповідно, порівняно з показниками тварин контрольної групи (див. таблицю).

У разі сумарної дії концентрату ПК і малої дози радіації активність NOS має коливну тенденцію до змін: зростає в 1,3 разу ($P < 0,05$; $n = 6$) на 48 годину порівняно з опроміненням і знижується до контрольних значень на 168 годину в тканині аорти піддослідних тварин (див. таблицю). Деякі автори описують здатність катехінів, антоціанінів, кверцитину й інших поліфенолів вина активувати eNOS фосфорилуванням, опосередкованим активацією Src/PI 3'-кінази/Akt сигнального шляху. Цей механізм є залежним від внутрішньоклітинної генерації АФО. Також поліфеноли здатні швидко активувати eNOS, змінюючи експресію її генів у ендотеліальних клітинах, імовірно, зв'язуванням з елементом антиоксидантної відповіді (antioxidant response element, ARE) промотора гена eNOS [1, 8, 32]. У цьому разі поліфеноли, катехіни й антоціаніни насамперед інгібують iNOS пригніченням зв'язування фактора NF- κ B з промотором генів, які кодують відповідну ізоформу NOS [13, 23, 35, 39]. Можна припустити, що споживання концентрату ПК опроміненими тваринами стимулює активацію eNOS на ранніх термінах експерименту, тоді як механізми інгібування поліфенолами інших ізоформ є більш тривалими і мають місце лише на 168 годину експерименту.

Відповідно до зниження активності NOS на 168 годину за споживання концентрату ПК на фоні опромінення зменшується сумарний вміст стабільних метаболітів NO порівняно з опроміненням. При цьому вміст NO_2^- знижується в 1,5 разу ($P < 0,05$; $n = 6$) лише на 168 годину, а вміст NO_3^- – в 2,3 разу ($P < 0,05$; $n = 6$) на 72 годину та в 1,3 разу ($P < 0,05$; $n = 6$) на 168 годину порівняно з показниками опромінених тварин (див. таблицю).

За фізіологічних умов кількість утвореного ONOO⁻ є низькою і оксидативні пошкодження ним клітинних структур мінімізовані ендогенною системою антиоксидантного захисту. Навіть незначне зростання утворення ONOO⁻ призводить до модифікацій біомолекул: ДНК, фосфоліпідів, до складу яких входять ненасичені жирні кислоти, а також тирозинових залишків протеїнів [28, 36]. Досить довго нітрування протеїнів розглядалось як незворотна модифікація. Проте сьогодні доведено, що ця посттрансляційна модифікація є зворотним процесом і каталізується ензимом денітразою, однак механізм денітрування досі ще не є достеменно зрозумілим [17].

Нітрування протеїнів виконує сигнальну роль у судинах тварин або впливаючи на процеси фосфорилування/дефосфорилування, або безпосередньо, завдяки

нітруванню/денітруванню [26]. Також, як свідчать результати численних експериментів, надлишкове нітрування залишків тирозину вважається індикатором нітративного стресу і є підставою для втрати функцій модифікованими протеїнами та в подальшому до деградації їх у протеосомах [34].

У результаті проведених досліджень методом Вестерн-блот аналізу було відмічено зниження вмісту 3'-нітротирозин-модифікованих протеїнів на 24 і 72 годину після опромінення на 22 та на 31 %, відповідно, а на 168 годину після дії радіаційного чинника нами було відмічено тенденцію до зростання цього показника порівняно з контролем (рис. 1, В–Ж). За умов споживання піддослідними тваринами концентрату ПК на фоні іонізуючого опромінення відмічено зниження вмісту 3'-нітротирозин-модифікованих протеїнів на 48 годину експерименту на 20 %, зростання їхнього вмісту на 72 годину на 20 % та подальше зниження на 168 годину на 39 % порівняно із показниками опромінених тварин (рис. 1, В–Ж). Варто зазначити, що рівень 3-нітротирозину був нижчим від контрольних значень упродовж усього експерименту за даних умов.

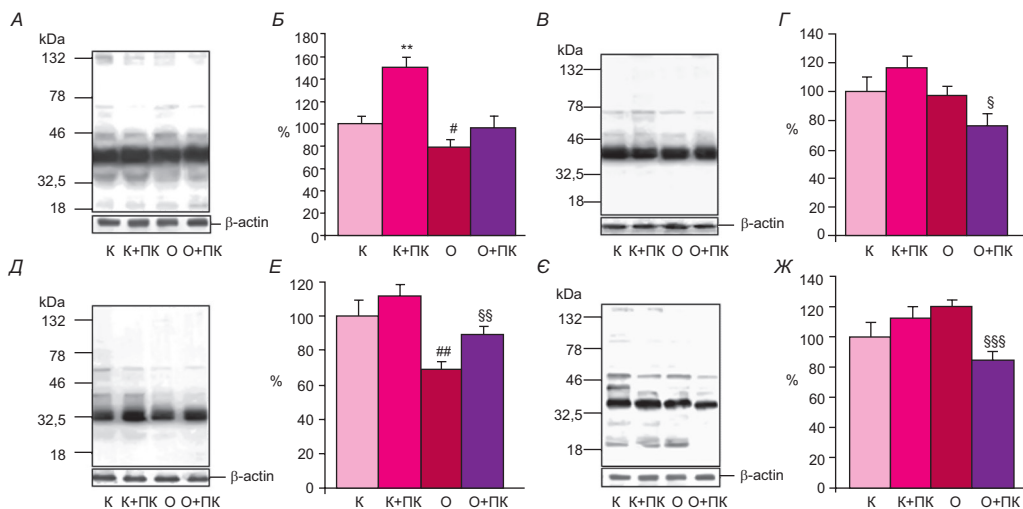


Рис. 1. Вестерн-блот аналіз нітротирозинмодифікованих протеїнів лізатів тканин аорти за впливу опромінення в дозі 30 сГр та дії концентрату природного поліфенольного комплексу винограду: А – 24, В – 48, Д – 72 та Е – 168 годин після опромінення; Б, Г, Е, Ж – вміст нітротирозин-модифікованих протеїнів у відсотках (контроль прийнято за 100 %), відповідно.

Примітка: ** – відмінність між показниками контрольної групи (К) та контрольної групи за введення препарату природного поліфенольного комплексу винограду (К + ПК) вірогідна ($P < 0,01$); #, ## – відмінність між показниками контрольної групи (К) та групи опромінених тварин (О) вірогідна ($P < 0,05$ та $P < 0,01$, відповідно); §, §§, §§§ – відмінність між показниками групи опромінених тварин (О) та групи, якій вводили препарат природного поліфенольного комплексу винограду на фоні опромінення (О + ПК) вірогідна ($P < 0,05$, $P < 0,01$ та $P < 0,001$, відповідно)

Fig. 1. Western blot analysis of 3'-nitrotyrosine-modified proteins in aortic tissues under irradiation in 30 cGy dose and consumption of concentrate of natural polyphenolic complex of grape wine: А – 24, В – 48, Д – 72 and Е – 168 hours after irradiation; Б, Г, Е, Ж – total nitrotyrosine content is shown in percent (control is taken as 100 %), respectively.

Comments: ** – difference between control (C) and control with PC consumption (C + PC) ($P < 0.01$); #, ## – difference between control (C) and irradiation (R) ($P < 0.05$ and $P < 0.01$, respectively); §, §§, §§§ – difference between irradiation (R) and PC consumption against the background of irradiation (R + PC) ($P < 0.05$, $P < 0.01$ and $P < 0.001$, respectively)

Такі зміни, ймовірно, зумовлені індукуванням поліфенолами винограду клітинних адаптаційних реакцій вже на 48, 72 та 168 годину після опромінення. Такий ефект може бути обумовлений здатністю поліфенольних сполук винограду, завдяки особливостям хімічної структури, знешкоджувати NO, ONOO⁻ та інші АФН. Окрім того, отримані нами результати свідчать, що поступове зниження вмісту 3'-нітротирозин-модифікованих протеїнів є тканинно-специфічною реакцією, характерною для аорти. Зважаючи на особливості функціонального статусу цієї тканини, можна припустити, що за впливу поліфенольних сполук винограду NO меншою мірою взаємодіє зі супероксид-аніоном для утворення ONOO⁻, а більшою мірою залучається у реалізацію фізіологічних функцій, в тому числі у процес вазодилатації, що має місце після споживання вина та його поліфенольного комплексу.

ВИСНОВОК

Першою реакцією на ушкоджуючі фактори, зокрема на дію малої дози випромінювання, є активація NO-синтази з подальшим підвищенням продукції NO у судинах, що відображається у виявленому нами зростанні вмісту його стабільних метаболітів (нітритів і нітратів) на 72 та 168 годину після опромінення. Введення тваринам концентрату ПК нівелює радіоіндуковане порушення стану системи L-аргінін/NO, зокрема, пригнічує продукування NO ензимом NOS.

Особливим є реагування тканин аорти на розвиток радіоіндукованого оксидативно-нітративного стресу, що відображається у зниженні рівня нітротирозиновмісних протеїнів після опромінення у дозі 0,3 Гр. За умов споживання концентрату ПК на фоні опромінення цей показник залишався дещо нижчим від контрольних значень упродовж усього експерименту в цій судині, що, можливо, пов'язано з інтенсивним залученням NO у трансдукцію сигналу в клітинах аорти.

Отже, нами з'ясовано, що позитивна терапевтична дія поліфенольного комплексу виноградного вина за дії малих доз іонізуючого випромінювання полягає у модифікації L-аргінін/NO залежного метаболічного шляху.

1. *Alhosin M., Anselm E., Rashid S. et al.* Redox-Sensitive Up-Regulation of eNOS by Purple Grape Juice in Endothelial Cells: Role of PI3-Kinase/Akt, p38 MAPK, JNK, FoxO1 and FoxO3a. **PLOS ONE**, 2013; 8(3): e57883.
2. *Babicova A., Havlinova Z., Pejchal J. et al.* Early changes in L-arginine-nitric oxide metabolic pathways in response to the whole-body gamma irradiation of rats. **International Journal of Radiation Biology**, 2011; 87(10): 1067–1073.
3. *Beckman J.S., Koppenol W.H.* Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and the ugly. **Am. J. Physiol. Cell Physiol**, 1996. 271: C1424–C1437.
4. *Boger R.H.* The pharmacodynamics of L-arginine. **J. Nutr**, 2007; 137: 1650–1655.
5. *Das S., Santani D.D., Dhalla N.S.* Experimental evidence for the cardioprotective effects of red wine. **Exp. Clin. Cardiol**, 2007; 12(1): 5–10.
6. *Dawson J., Knowles R.G.* A Microtiter-Plate Assay of Human NOS Isoforms. **Methods in Molecular Biology**, 1998; 100: 237–242.
7. *Dede S., Deger Y., Kahraman T., Kilicalp D.* Effects of X-Ray Radiation on Oxidation Products of Nitric Oxide in Rabbits Treated with Antioxidant Compounds. **Turk. J. Biochem**, 2009; 34(1): 15–18.
8. *Dohadwala M.M., Vita J.A.* Grapes and Cardiovascular Disease. **American Society for Nutrition. Supplement: Grapes and Health**, 2009: 1788S–1793S.
9. *Dudzinski D.M., Igarashi J., Greif D., Michel T.* The regulation and pharmacology of endothelial nitric oxide synthase. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol**, 2006; 46: 235–76.

10. Ermakova O.V. **Modern aspects of radiobiological safety**. Collection of scientific papers: Ed. by Afonin A.A. Bryansk: Publisher "Italic", 2011: 67–176. (In Russian).
11. Förstermann U. Nitric oxide and oxidative stress in vascular disease. **Pflugers Arch**, 2010; 459(6):923–939.
12. Guilford J.M., Pezzuto J.M. Wine and Health: A Review. **Am. J. Enol. Vitic**, 2011; 62:4: 471–486.
13. Habauzit V., Morand C. Evidence for a protective effect of polyphenols-containing foods on cardiovascular health: an update for clinicians. **Ther. Adv. Chronic Dis**, 2012; 3(2): 87–106.
14. Herrero P., Laforest R., Shoghi K. et al. Feasibility and Dosimetry Studies for ¹⁸F–NOS as a Potential PET Radiopharmaceutical for Inducible Nitric Oxide Synthase in Humans. **J. Nucl. Med**, 2012; 53: 994–1001.
15. Hess D.T., Matsumoto A., Kim S.O. et al. Protein S-nitrosylation: purview and parameters. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol**, 2005; 6(2): 150–166.
16. Kagota S., Tada Y., Nejime N. et al. Chronic Production of Peroxynitrite in the Vascular Wall Impairs Vasorelaxation Function in SHR/NDmcr-cp Rats, an Animal Model of Metabolic Syndrome. **J. Pharmacol. Sci**, 2009; 109: 556–564.
17. Kamisaki Y., Wada K., Bian K. et al. An activity in rat tissues that modifies nitrotyrosine-containing proteins. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 1998; 95(20): 11584–11589.
18. Kondrashov A., Vrankova S., Dovinova I. et al. The Effects of New Alibernet Red Wine Extract on Nitric Oxide and Reactive Oxygen Species Production in Spontaneously Hypertensive Rats. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, 2012; 2012, Article ID 806285: 8 p.
19. Kulcicki V., Vlad P. F., Duca Gh., Lupascu T. Investigation of Grape Seed Proanthocyanidins. Achievements and Perspectives. **Chem. J. of Moldova. General, Industrial and Ecological Chem**, 2007; 2(1): 36–50.
20. Li H., Cui H., Kundu T.K. et al. Nitric Oxide Production from Nitrite Occurs Primarily in Tissues Not in the Blood. **Critical Role of Xanthine Oxidase and Aldehyde Oxidase**. **The Journal of Biological Chemistry**, 2008; 283(26): 17855–17863.
21. Lowri O.H., Rosenbraugh M.J., Pori A.L. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Biol. Chem**, 1951; 193(1): 265–275.
22. Lundberg J.O., Carlstro M., Larsen F.J., Weitzberg E. Roles of dietary inorganic nitrate in cardiovascular health and disease. **Cardiovascular Research**, 2011; 89: 525–532.
23. Meskin M.S., Bidlack W.R., Davies A.J. et al. **Phytochemicals mechanisms of action**. Florida. CRC Press LLC, 2004. 206 pp.
24. Miranda K.M., Espey M.G., Wink D.A. A Rapid, Simple Spectrophotometric Method for Simultaneous Detection of Nitrate and Nitrite. **Nitric. Oxide: Biol. and Chem**, 2001; 5(1): 62–71.
25. Moibenko A.A., Sagach V.F., Tkachenko M.N. et al. Study into Basic Mechanisms of the Effect of Nitric Oxide on Cardiovascular System as a Basis for Pathogenetic Treatment of Related Diseases. **Physiol. J**, 2004; 50(1): 11–30. (In Ukrainian).
26. Monteneiro H.P., Arai R.J., Travassos L. Protein Tyrosine Phosphorylation and Protein Tyrosine Nitration in Redox Signaling. **Antioxid. Redox Signal**, 2008; 10: 843–890.
27. Mughal S.K., Myazin A.E., Zhavoronkov L.P. et al. The Dose and Dose-Rate Effects of Paternal Irradiation on Transgenerational Instability in Mice: A Radiotherapy Connection. **PLoS ONE**, 2012; 7(7): e41300.
28. Pacher P., Beckman J.S., Liaudet L. Nitric Oxide and Peroxynitrite in Health and Disease. **Physiol. Rev**, 2007; 87(1): 315–424.
29. Park J.H., Lee S., Cho D.H. et al. Far-infrared radiation acutely increases nitric oxide production by increasing Ca⁽²⁺⁾ mobilization and Ca⁽²⁺⁾/calmodulin-dependent protein kinase II-mediated phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase at serine 1179. **Biochem. Biophys. Res. Commun**, 2013; 436(4): 601–606.
30. Rao B.S.S., Shanbhoge R., Upadhya D. et al. Antioxidant, anticlastogenic and radioprotective effect of *Coleus aromaticus* on Chinese hamster fibroblast cells (V79) exposed to gamma radiation. **Mutagenesis**, 2006; 21(4): 237–242.

31. Rao B.S.S., Shanbhoge R., Upadhy D. et al. Vanguard of Paradigm Shift in Radiation Biology: Radiation-Induced Adaptive and Bystander Responses. **J. Radiat. Res**, 2007; 48: 97–106.
32. Rattmann Y.D., Anselm E., Kim J.-H. et al. Natural Product Extract of *Dicksonia sellowiana* Induces Endothelium-Dependent Relaxations by a Redox-Sensitive Src- and Akt-Dependent Activation of eNOS in Porcine Coronary Arteries. **J. Vasc. Res**, 2012; 49: 284–298.
33. Singleton V.L., Orthofer R., Lamuela-Raventys R.M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. **Methods in Enzymology**, 1999; 299: 152–178.
34. Souza J.M., Choi I., Chen Q. et al. Proteolytic degradation of tyrosine nitrated proteins. **Arch. Biochem. Biophys**, 2000; 380(2): 360–366.
35. Sutherland B.A., Rahman R.M.A., Appleton I. Mechanisms of action of green tea catechins, with a focus on ischemia-induced neurodegeneration. **J. of Nutritional Biochemistry**, 2006; 17: 291–306.
36. Szabo C., Ischiropoulos H., Radi R. Peroxynitrite: biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics. **Nature Reviews. Drug Discovery**, 2007; 6: 662–680.
37. Towbin H., Staehelin T., Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. 1979. **Biotechnology**, 1992; 24: 145–149.
38. Van Golde P.H., Van der Westelaken M., Boumac B.N., Van de Wiela A. Characteristics of piraltin, a polyphenol concentrate, produced by freeze-drying of red wine. **Life Sciences**, 2004; 74: 1159–1166.
39. Wallace T.C. Anthocyanins in Cardiovascular Disease. **Adv. Nutr**, 2011; 2: 1–7.
40. Yeo W.-S., Lee S.J., Lee J.R., Kim K.P. Nitrosative protein tyrosine modifications: biochemistry and functional significance. **BMB Reports**, 2008: 194–203.

NATURAL POLYPHENOLIC COMPLEX OF GRAPE WINE SHOWS PROTECTIVE EFFECT ON RADIOINDUCED NITRATIVE STRESS IN RAT AORTA

M. Sabadashka, N. Sybirna

*Ivan Franko National University of Lviv, 4, Hrushevskiyi St., Lviv 79005, Ukraine
e-mail: m.sabadashka@meta.ua*

We investigated L-arginine/NO system, whose key molecule is nitric oxide generated in the NO-synthase reaction. Nitric oxide is an important signaling molecule in a wide range of physiological responses including vasodilatation and regulation of vascular tone. We determined NO-synthase activity, the total content of NO stable metabolites (nitrite- and nitrate-anions) and the content of 3'-nitrotyrosine-modified proteins in rats' aorta under irradiation in a dose 30 cGy with and without consumption of concentrate of natural grape wine polyphenolic complex. It was shown that the content of 3'-nitrotyrosine-modified proteins decreased in 24 and in 72 hrs after irradiation, when the NO-synthase activity and the contents of nitrite and nitrate increased in 72 and in 168 hrs compared to control. This effect is leveled by the *per os* introduction of concentrate of natural polyphenolic complex of grape wine. Investigated concentrate caused a decrease of all studied parameters. Thus, we firstly analyzed the development of nitrative stress in rats' aortic tissues caused by the action of radiation in a dose close to the natural background radiation. The ability of grape wine polyphenols to adjust the radioinduced nitrative stress was experimentally demonstrated.

Keywords: low doses of radiation, concentrate of wine polyphenolic complex, nitric oxide, NO-synthase, 3'-nitrotyrosine-modified proteins.

ПРИРОДНЫЙ ПОЛИФЕНОЛЬНЫЙ КОМПЛЕКС ИЗ ВИНОГРАДНОГО ВИНА ИМЕЕТ ПРОТЕКТОРНОЕ ВЛИЯНИЕ ПРИ РАДИОИНДУЦИРОВАННОМ НИТРАТИВНОМ СТРЕССЕ В АОРТЕ КРЫС

М. Сабадашка, Н. Сибирная

*Львовский национальный университет имени Ивана Франко
ул. Грушевского, 4, Львов 79005, Украина
e-mail: m.sabadashka@meta.ua*

В работе исследована система L-аргинин/NO, продуктом которой является оксид азота, образующийся в NO-синтазной реакции и являющийся важной сигнальной молекулой в широком ряде физиологических клеточных ответов, в том числе при вазодилатации и регуляции тонуса сосудов. Нами определена активность NO-синтазы, суммарное содержание стабильных метаболитов оксида азота (нитрит- и нитрат-анионов) и содержание 3'-нитротирозин-модифицированных протеинов в аорте крыс при действии ионизирующего излучения дозой 30 сГр и при потреблении концентрата природного полифенольного комплекса, полученного упариванием красного виноградного вина. Выяснено, что после облучения содержание 3'-нитротирозин модифицированных протеинов снижается на 24 и 72 час, тогда как активность NO-синтазы и содержание нитритов и нитратов увеличиваются на 72 и 168 час по сравнению с контролем. Данный эффект малой дозы ионизирующего излучения нивелируется введением *per os* концентрата природного полифенольного комплекса виноградного вина, который вызывает снижение всех изучаемых показателей на 72 и 168 час. Таким образом, нами впервые проанализировано развитие нитративного стресса в тканях аорты крыс при действии дозы радиации, близкой к естественному радиационному фону, и экспериментально доказана возможность коррекции таких изменений естественным полифенольным комплексом виноградного вина.

Ключевые слова: низкие дозы радиации, концентрат полифенольного комплекса вина, оксид азота, NO-синтаза, 3'-нитротирозин-модифицированные протеины.

Одержано: 13.12.2013