

УДК 57.012.4:616.1:612.014.482

Ткаченко М.М.,
Горь І.В.,
Стеченко Л.О.,
Куфтирева Т.П.,
Поперека Г.М.

УЛЬТРАСТРУКТУРНА ОРГАНІЗАЦІЯ ЕНДОТЕЛІЮ АОРТИ ЗА УМОВ ДІЇ НИЗЬКИХ ДОЗ РАДІАЦІЇ

Національний медичний університет імені О.О. Богомольця

Резюме. Електронно-мікроскопічне дослідження грудного відділу аорти мишей лінії BALB/c показало, що за умов хронічного β -опромінення сумарною дозою 0,43 Зв порушується ультраструктурна організація ендотеліальних клітин. Переважають ендотеліоцити з порушенням структурної організації. Ендотелій не контактує з базальною мембраною на значних відстанях. Стоншені периферійні ділянки нерівномірно видаються у провіт судини, надаючи ендотеліальному вистеленню хвилястого вигляду. Зростає виразність набряку та лізису цитоплазми у порівнянні з контрольними тваринами. Разом з тим, в окремих клітинах спостерігаються скупчення тілець Вейбеля-Паладе, які оточують багаточисельні мікропіноцитозні везикули. Останні інколи відособлюються мембраною, утворюючи мультивезикулярні тільця і, можливо, таким чином виводяться за межі клітини. Ділянки десквамації ендотелію і оголення базальної мембрани набувають найбільшої поширеності в експериментальній групі. Базальна мембрана, як правило, розпушена, деструктурована. Ще однією особливістю ультраструктури аорти мишей лінії BALB/c, які отримали дозу опромінення 0,43 Зв, є наявність ендотеліоцитів з підвищеною електронною щільністю цитоплазми. Це відбувається внаслідок зникнення більшості органел і мікропіноцитозних везикул та накопичення дрібнодисперсного, електроннощільного матеріалу. Такий стан клітини може відповідати початковій стадії апоптозу.

Ключові слова: аорта, ендотелій, мітохондрії, низькі дози радіації, оксид азоту.

Вступ

Проблема впливу низьких доз радіації на організм надзвичайно складна і залишається актуальною і недостатньо вивченою [2, 4, 6]. Після аварії на Чорнобильській АЕС у 1986 р. великі контингенти людей, а також тварин і рослин підпали під тривалу або постійну дію низьких доз іонізуючого опромінення [7, 10, 15]. Патологічні процеси, які є наслідком опромінення, часто супроводжуються порушенням судинного тону. Це, у свою чергу, призводить до розвитку хвороб серця і судин [7, 9, 10]. Ендотелій, де синтезується і вивільняється низка біологічно активних речовин [8, 17, 18], є найбільш радіочутливим елементом судинної стінки [3, 11, 16]. Раніше нами було показано вплив низьких доз радіації на ендотеліязалежний механізм судинної регуляції і окисний метаболізм реактивних форм кисню і азоту в серцево-судинній системі [11–14, 19].

Мета роботи полягала у дослідженні ультраструктурної організації ендотелію аорти мишей лінії BALB/c за умов дії хронічного зовнішнього радіаційного опромінення сумарною дозою 0,43 Зв.

Методика

Електронно-мікроскопічне дослідження ультраструктурної організації ендотелію грудного відділу аорти проводилося на мишах радіочутливої лінії BALB/c [1] масою тіла 20–22 г, яких було розподілено на дві групи: 1 група (контроль) – тварини віком 8–9 міс, які народилися і протягом усього життя перебували в м. Києві; 2 група – тварини, які з трьохмісячного віку протягом 6 міс постійно перебували у клітках з плоскими джерелами іонізуючого опромінення (тварини народилися і протягом усього свого життя знаходилися у лабораторії експериментальної радіобіології і засобів радіозахисту Інституту проблем безпеки атомних електростанцій НАН України, м. Чорнобиль). Накопичена доза зовнішнього опромінення, яку вимірювали приладом МКС-0,1р на висоті 10 см над поверхнею джерела, становила 96,9 мкЗв/год, що відповідало 430,1 мЗв за 187 діб експозиції.

Для експерименту були виготовлені спеціальні плоскі джерела іонізуючого опромінення – іммобілізовані бетоном гарячі час-

тинки з пропаленого ґрунту "рудого лісу", що моделюють іонізуюче опромінення "чорнобильського спектру" низької інтенсивності. Спектр γ -поля опромінення мишей лінії BALB/c, який визначали за допомогою спектрометричної системи *BTI Microspec-2* фірми "*Bubble Technology Industries, Inc.*" (Канада), в основному (біля 90 %) складався з комптоновського випромінювання, ^{137}Cs (7 %), а також інших радіонуклідів [12].

Матеріал після подрібнення фіксували у 1 % розчині чотириокису осмію за Колфільдом на протязі 2 год на холоді, зневоднювали в етанолі зростаючої концентрації, починаючи з 70° до 100° спирту, ацетоні, просочували сумішшю епоксидних смол (аралдит і епон) та заключали в епоксидні смоли за загальноприйнятою методикою [5]. Після полімеризації при температурі 60° С на ультратомах "*Reichard*" (Австрія) і *LKB-III* (Швеція) для прицільної орієнтації виготовлялися напівтонкі зрізи, які забарвлювалися толуїдиновим синім, а потім ультратонкі зрізи. Останні контрастували ураніацетатом і цитратом свинцю, потім їх вивчали під електронним мікроскопом ПЕМ-125К ("*Selmi*", Україна) і фотографували при збільшеннях від 3000 до 20000 разів.

Результати та їх обговорення

Електронномікроскопе дослідження аорти мишей контрольної групи свідчать про наявність суцільного ендотеліального вистелення. Ендотеліоцити мають витягнуту форму і досить великі розміри з чітким поділом на периферійну і ядрові зони. Ядро, як правило, видовжене овальної форми з рівномірною кількістю еу- та гетерохроматину і одним чи декількома ядрцями (рис. 1). В цитоплазмі біля ядра розміщуються органили загального призначення: комплекс Гольджі, зерниста ендоплазматична сітка, клітинний центр, мітохондрії (рис. 1 А, Б). Слід відзначити, що у більшості ендотеліоцитів у цитоплазмі розміщуються тільця Вейбеля-Паладе, які містять біологічно активні речовини, переважно фактор Віллебранда та селектини, які сприяють адгезії до поверхні ендотелію деяких формених елементів крові (рис. 1 Б). Цитоплазма периферійної зони значно стоншена і має мікропіноцитозні пухирці, а на люменальній поверхні плазматичної мембрани розміщені невеликі кавеоли і мікровирости.

Підендотеліальний шар внутрішньої оболонки (*tunica intima*) аорти представлений пухкою волокнистою сполучною тканиною. Кількість останньої незначна і до неї входять колагенові волокна та поодинокі малодиференційовані кліти-

ни. В деяких ділянках внутрішнього вистелення спостерігаються пухирі, які піднімають базальну мембрану епітеліоцитів і, таким чином, відбувається трансендотеліальний перенос речовин (рис. 1, 2). Колагенові волокна іноді утворюють скупчення, куди проникає невелика кількість еластичних волокон.

Розділяє внутрішню і середню оболонки у аорти мишей внутрішня еластична мембрана, яка відрізняється від еластичних мембран середньої оболонки більшою щільністю і меншою кількістю пор. У рівній кількості в середній оболонці присутні гладкі м'язові клітини (рис. 2). Останні орієнтовані косо відносно еластичних мембран. Таке розміщення обумовлене високим тиском та великою швидкістю крові у аорті. Ближче до внутрішньої еластичної мембрани розміщуються темні гладкі міоцити, які мають електроннощільну цитоплазму і, можливо, іншу функціональну спрямованість у порівнянні з клітинами, які розміщені між вікончатими еластичними мембранами. Цитоплазма таких клітин

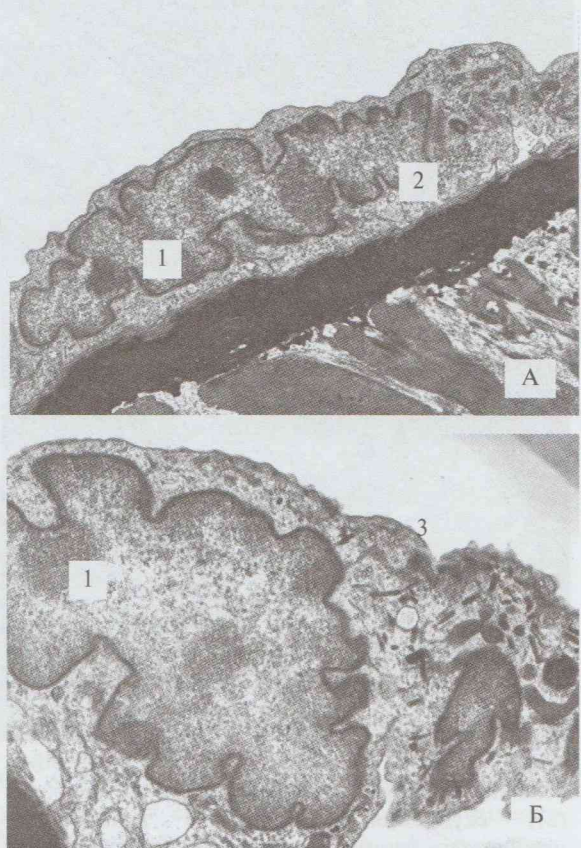


Рис. 1. Внутрішня оболонка аорти інтактних мишей: ядро (1), внутрішня еластична мембрана (2), тільця Вейбеля-Паладе (3). Електронномікроскопічне фото. Зб.: А – 10000; Б – 15000

вміщує велику кількість міофіламентів, практично вони повністю вивіваються її. Невелика кількість мітохондрій розміщується між ними і забезпечує енергією їх скорочення. Трапляються міоцити, у яких є каналці зернистої ендоплазматичної сітки, очевидно, ці клітини спеціалізуються на синтезі колагену та еластину. Ядра цих клітин також витягнутої форми.

У мишей лінії BALB/c, які отримали сумарну дозу опромінення 0,43 Зв, характер та спрямованість змін свідчать про високу ступень і поширеність пошкоджень. Переважають ендотеліоцити з виразними змінами. Ендотелій не контактує з базальною мембраною на значних відстанях (рис. 3 А, Б; 4 А, Б). Стоншені периферійні ділянки нерівномірно видаються у просвіт судини, на-

даючи ендотеліальному вистеленню хвилястого вигляду (рис. 4 Б). Спостерігаються ділянки набряку та лізису цитоплазми (рис. 4 А, Б). Разом з тим, в окремих клітинах відмічаються скупчення тілець Вейбеля–Паладе, які оточують чисельні мікропіноцитозні везикули (рис. 3 А, Б). Останні інколи відособлюються мембраною (рис. 3 А), утворюючи мультивезикулярні тільця і, можливо, так виводяться за межі клітини.

Ще однією особливістю ультраструктури аорти мишей лінії BALB/c, які отримали дозу опромінення 0,43 Зв, є наявність ендотеліоцитів з підвищеною електронною щільністю цитоплазми. Це відбувається внаслідок зменшення кількості органел та мікропіноцитозних везикул і накопичення дрібнодисперсного, електроннощіль-

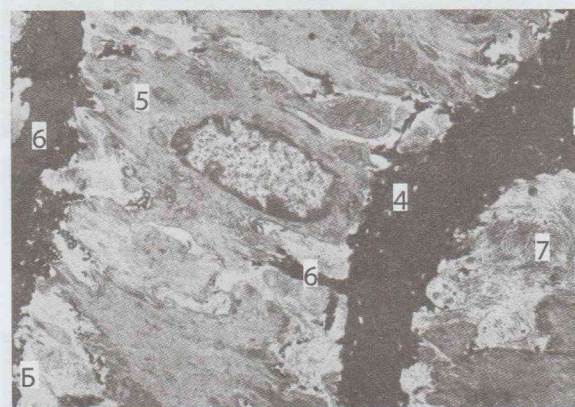
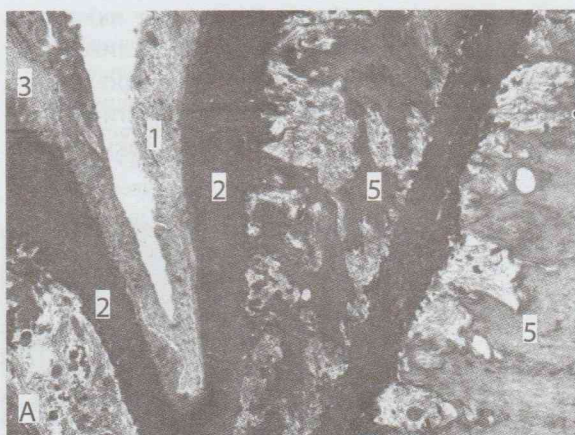


Рис. 2. Внутрішня оболонка та частина середньої оболонки аорти інтактних мишей: периферійна зона ендотелію (1), внутрішня еластична мембрана (2), скупчення колагенових волокон у підендотеліальному шарі (3), пори (4) в еластичних мембранах, гладкі м'язові клітини (5), еластика (6), колагенові волокна (7). Електронномікроскопічне фото. Зб.: А – 14000; Б – 10000

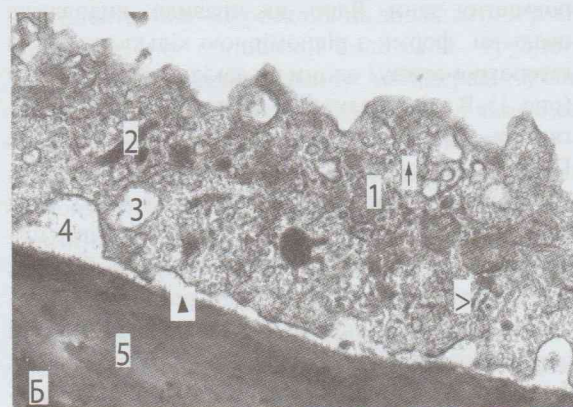
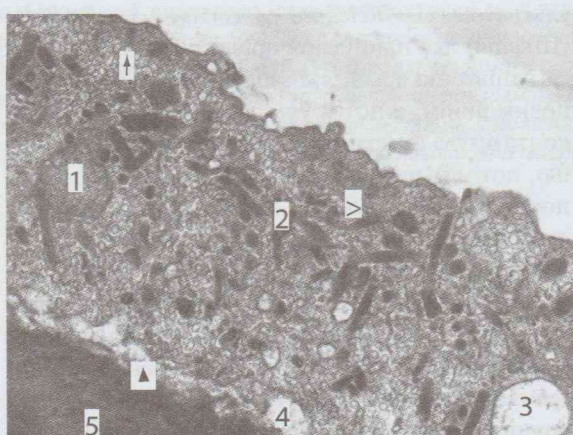


Рис. 3. Аорта мишей лінії BALB/c після хронічного γ -опромінення сумарною дозою 0,43 Зв: мітохондрії (1), каналці ендоплазматичної сітки (>), тільця Вейбеля-Паладе (2), мікропіноцитозні везикули (\blacktriangle), вакуолі (3) в ендотеліоцитах, базальна мембрана (\blacktriangle), локальні розширення підендотеліального простору (4), внутрішня еластична мембрана (5). Електронномікроскопічне фото. Зб.: А – 29 300; Б – 29 300

ного матеріалу (рис. 6). Такий стан клітини може відповідати початковій стадії апоптозу.

Ділянки десквамації ендотелію і оголення базальної мембрани (рис. 5 А, Б) набувають поширеності в експериментальній групі. Базальна мембрана, як правило, розпушена, деструктурована (рис. 3 А, Б; 4 А, Б; 5 А, Б). За звичай, в зоні десквамації ендотелію гладком'язові клітини гіпертрофовані. Ядра таких клітин мають глибокі інвагінації та транскрипційно неактивний гетерохроматин. В цитоплазмі більшості клітин переважають міофіламенти, що розміщені хаотично, при цьому не виявляються щільні тільця, які є місцями прикріплення тонких актинових міофіламентів та проміжних філаментів. В зоні плазматичної мембрани щільні тільця спостеріга-

ються не так часто, як у контрольних тварин. Порушення скоротливого апарату, можливо, зумовлено недостатністю енергетичного забезпечення цих клітин, в результаті зменшення кількості мітохондрій у порівнянні з контрольними тваринами, просвітлення їх матриксу та деструкції крист. (рис. 4 А, 5 А).

Раніше нами показано, що у мишей лінії BALB/c, які за наслідками опромінення отримали сумарну дозу 0,43 Зв, порушуються не тільки залежні (на ацетилхолін йодид), але і незалежні (на нітропрурид натрію) від ендотелію вазодилаторні реакції. Це свідчить про функціональні ушкодження скорочувального апарату судин і значно збільшує ризик розвитку вазоспастичних реакцій [12, 19]. Більшому рівню пошкодження

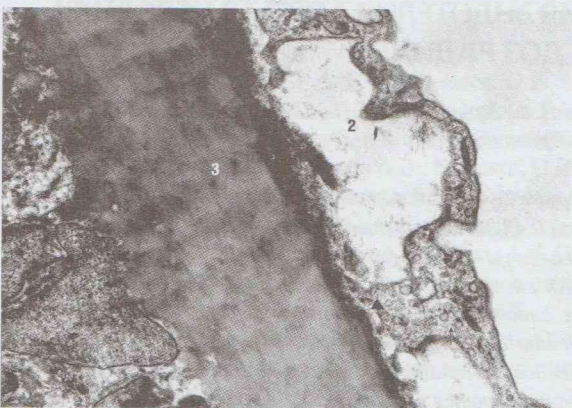


Рис. 4. Аорта мишей лінії BALB/c після хронічного γ -опромінення сумарною дозою 0,43 Зв: ендотеліоцит з електроннопросвітленою цитоплазмою (1), мікропіноцитозні везикули (\blacktriangle) в ендотеліоциті, базальна мембрана (\blacktriangle), локальні розширення підендотеліального простору (2), внутрішня еластична мембрана (3). Електронномікроскопічне фото. Зб.: А – 27 000; Б – 80 000

Рис. 5. Аорта мишей лінії BALB/c після хронічного γ -опромінення сумарною дозою 0,43 Зв: ділянки "оголошення" базальної мембрани (Δ), базальна мембрана (\blacktriangle), внутрішня еластична мембрана (1). Електронномікроскопічне фото. Зб.: А – 14 900; Б – 18 500

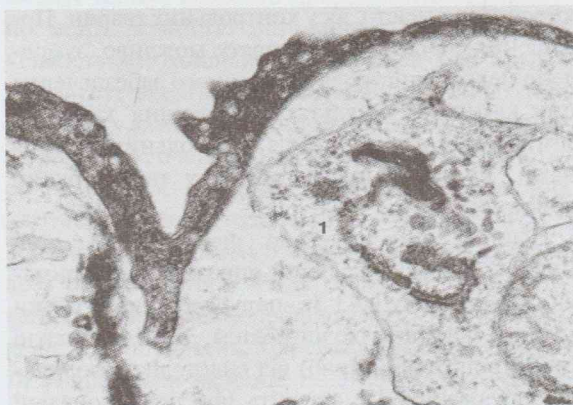


Рис. 6. Аорта мишей лінії BALB/c після хронічного γ -опромінення сумарною дозою 0,43 Зв; ендотеліоцит з електронноушільненою цитоплазмою (1). Електронномікроскопічне фото. Зб.: 40 000

ендотелійзалежних реакцій розслаблення гладеньких м'язів аорти за умов дії низьких доз радіації відповідає менший рівень синтезу оксиду азоту (NO) і менший рівень окисного аргіназного метаболізму аргініну. Зниження синтезу NO за цих умов обумовлюється підвищенням генерації реактивних форм кисню, а саме супероксидного ($\cdot\text{O}_2^-$) і гідроксильного ($\cdot\text{OH}$) радикалів, основним джерелом утворення, яких можуть бути мітохондрії. Більшому рівню пошкодження ендотелію за умов тривалої дії низьких доз радіації відповідає менший рівень генерації NO [при цьо-

му окисний метаболізм L-аргініну спрямований на утворення не NO, а пероксинітриду (ONOO^-) за умов окисного стресу при одночасній генерації значних кількостей і NO, і $\cdot\text{O}_2^-$] і менший рівень неокисного аргіназного метаболізму аргініну, про що свідчать пули сечовини. За умов постійної дії низьких доз радіації більшому рівню пошкодження ендотелійзалежних реакцій відповідає менший рівень нітрозилування білків, аналогічно, як і менший рівень генерації OH-радикала.

Отримані нами дані передбачають можливість проапоптичної дії низьких доз радіації (за умов тривалої її дії), внаслідок чого спостерігається практично повне знищення ендотелію, а отже і ендотелійзалежного розслаблення. Біохімічними причинами проапоптичної дії низьких доз радіації може бути, з одного боку, стимуляція генерації реактивних форм кисню і ONOO^- в мітохондріях (індуктори відкриття пори і ініціатори апоптозу), а з іншого – пригнічення утворення NO і ГАМК (інгібітори відкриття пори).

Висновки

Таким чином, проведене електронномікроскопічне дослідження ультраструктурної організації аорти показало, що за умов тривалої дії низьких доз радіації найбільш уразливим є ендотелій. Підтверджує це і пригнічення ендотелійзалежних реакцій аортальних смужок на ацетилхолін, і порушення метаболізму реактивних форм кисню і стабільних метаболітів азоту.

УЛЬТРАСТРУКТУРНА ОРГАНІЗАЦІЯ ЕНДОТЕЛІЯ АОРТИ В УМОВАХ ДІЯ ВІСЬКИХ ДОЗ РАДІАЦІЇ

Ткаченко М.Н., Гороть І.В., Стеченко Л.А., Куфтырева Т.П., Поперека Г.М.
Національний медичний університет імені А.А.Богомольця

Резюме. Електронно-мікроскопічне дослідження грудного відділу аорти мишей лінії BALB/c показало, що в умовах хронічного γ -облучення сумарною дозою 0,43 Зв порушується ультраструктурна організація ендотеліальних кліток. Преобладають ендотеліоцити з порушенням структурної організації. Ендотелій не контактує з базальною мембраною на значительних відстанях. Утончені периферическі частки нерівномірно видаються в просвіт судова, надаючи ендотеліальній вистилке хвилястий вид. Ріст вираженості отека і лизиса цитоплазми по сравнению з контрольными тваринами. Вместе с тем, в некоторых клетках наблюдаются скопления телец Вейбеля-Паладе, которые окружают многочисленные микроиноцитозные везикулы. Последние иногда отграничиваются мембраной, образуя мультивезикулярные тельца, и, возможно, таким образом выводятся за пределы клетки. Участки десквамации эндотелия и оголения базальной мембраны наиболее выражены в экспериментальной группе. Базальная мембрана, как правило, распушена, деструктурирована. Еще одной особенностью ультраструктуры аорты мишей линии BALB/c, которые получили дозу облучения 0,43 Зв, является наличие ендотеліоцитів з підвищеною електронною щільністю цитоплазми. Это происходит вследствие исчезновения большинства органелл и микроиноцитозных везикул и накопления мелкодисперсного, электронноплотного материала. Такое состояние клетки может соответствовать начальной стадии апоптоза.

Ключевые слова: аорта, ендотелій, мітохондрії, низькі дози радіації, оксид азота.

ULTRASTRUCTURAL ORGANIZATION OF THE AORTIC ENDOTHELIUM IN CONDITIONS OF THE EFFECTS OF LOW DOSES OF RADIATION

*Tkachenko M.N., Gorot I.V., Stechenko L.A., Kuftyreva T.P., Popereka G.M.
O.O. Bohomolets National Medical University*

Abstract. *The results of electron microscopic study of the thoracic aorta of BALB/c mice showed a disturbance of ultrastructural organization of endothelial cells in conditions of chronic γ -irradiation with a summary dose of 0.43 Sv. Prevailing were the endotheliocytes with a disturbed structural organization. Endothelium has no contacts with a basement membrane over considerable distances. The refined peripheral areas are unevenly protruded in the vessel's lumen, giving the endothelial lining a wavy shape. Expressiveness of edema and lysis of cytoplasm increases compared to control animals. At the same time, in some cells there are accumulations of Weibel-Palade bodies that surround numerous micropinocytous vesicles. Generally, a basement membrane is loose, destructured. A presence of endotheliocytes with the increased electronic density of cytoplasm is another peculiar feature of ultrastructure of aorta of BALB/c mice, which were irradiated with a dose of 0.43 Sv. This results from a disappearance of most of organelles and micropinocytous vesicles and accumulation of highly dispersed, electron dense material. Such condition of the cell might correspond to the initial stage of apoptosis.*

Key words: *aorta, endothelium, mitochondria, low doses of radiation, nitric oxide.*

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Бландова З.К., Душкин В.А., Малашенко А.Н. и др. Линии лабораторных животных для медико-биологических исследований. - М.: Наука, 1983. - 180 с.
2. Бурлакова Е.Б., Голошапов А.Н., Горбунова Н.В. и др. Особенности биологического действия "малых" доз радиации // Радиационная биология. Радиоэкология. - 1996. - Т. 36, № 4. - С. 610-631.
3. Воробьев Е.И., Степанов Р.П. Ионизирующие излучения и кровеносные сосуды. - М.: Энергоатомиздат, 1985. - 296 с.
4. Готлиб В.Я., Пелевина И.И., Конопля Е.Ф. и др. Некоторые аспекты биологического действия малых доз радиации // Радиационная биология. Радиоэкология. - 1991. - Т. 31, № 3. - С. 318-325.
5. Карупу В.Я. Электронная микроскопия. - К.: Вища школа, 1984. - 208 с.
6. Котеров А.Н. Малые дозы и малые мощности доз ионизирующей радиации: регламентация диапазонов, критерии их формирования и реалии XXI века // Мед. радиол. и рад. безопасность. - 2009. - Т. 54, № 3. - С. 5-26.
7. Медичні наслідки Чорнобильської катастрофи: 1986-2011. За ред. А.М. Сердюка, В.Г. Бебешка, Д.А. Базики. - Тернопіль: ТДМУ, "Укрмедкнига", 2011. - 1092 с.
8. Мойбенко О.О., Сагач В.Ф., Ткаченко М.М. та ін. Фундаментальні механізми дії оксиду азоту на серцево-судинну систему як основи патогенетичного лікування її захворювань // Фізіол. журн. - 2004. - Т. 50, № 1. - С. 11-30.
9. Москальов Ю.И. Отдалённые последствия ионизирующих излучений. - М.: Медицина, 1991. - 464 с.
10. Пелевина И.И., Готлиб В.Я., Конрадов А.А. 20 лет изучения последствий Чернобыльской аварии - это много или мало для оценки их характера и масштабов? // Радиационная биология. Радиоэкология. - 2006. - Т. 46, № 2. - С. 240-247.
11. Ткаченко М.М., Сагач В.Ф., Базілюк О.В. та ін. Вікові особливості змін скорочувальних судинних реакцій і вміст вільних радикалів кисню та метаболітів оксиду азоту у мишей лінії BALB/c за умов перебування у зоні відчуження // Фізіол. журнал. - 2005. - Т. 51, № 3. - С. 32-41.
12. Ткаченко М.Н., Коцюруба А.В., Базілюк О.В. и др. Сосудистая реактивность и метаболизм реактивных форм кислорода и азота при действии низких доз радиации // Радиационная биология. Радиоэкология. - 2009. - Т. 49, № 4. - С. 462-472.
13. Ткаченко М.М., Коцюруба А.В., Гороть І.В. Особливості метаболізму реактивних форм кисню та азоту у мишей різних радіочутливих ліній за умов перебування у зоні відчуження // Наук. вісник НМУ імені О.О. Богомольця. - 2009. - № 4 (26). - С. 64-68.
14. Ткаченко М.М., Коцюруба А.В., Базілюк О.В., Гороть І.В., Сагач В.Ф. Зміни судинної реактивності та реактивних форм кисню за умов постійного перебування мишей у зоні відчуження // Фізіол. журнал. - 2010. - Т. 56, № 4. - С. 47-58.
15. Чернобыльская катастрофа / Гл. ред. В.Г. Баряхтар. - К.: Наук. думка, 1995. - 560 с.
16. Kantak S.S., Diglio C.A., Onoda J.M. Low dose radiation-induced endothelial cell retraction // Int. J. Radiat. Biol. - 1993. - Vol. 64, № 3. - P. 319-328.
17. Korge P., Ping P., Weiss J.N. Reactive oxygen species production in energized cardiac mitochondria during hypoxia/reoxygenation. Modulation by nitric oxide // Circ. Res. - 2008. - Vol. 103, № 8. - P. 873-880.
18. Schulz R., Triggle C.R. Role of NO in vascular smooth muscle and cardiac muscle function // TIPS. - 1994. - Vol. 15, N 7.
19. Tkachenko M.N., Kotsjuruba A.V., Bazilyuk O.V., Gorot I.V., Remennik O.I., Sagach V.F. Vascular reactivity and metabolism of the reactive forms of oxygen and nitrogen: effects of low doses of radiation // Int. J. of Low Radiation. - 2011. - Vol. 8, № 2. - P. 107-121.