

УДК 546.36:576.353.3]:616.12-008.3-073.96-092.9

Н. А. ГРИЦУК

**МИТОХОНДРИАЛЬНОЕ ОКИСЛЕНИЕ В КАРДИОМИОЦИТАХ
И ЭЛЕКТРОКАРДИОГРАФИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ
У КРЫС ПРИ ИНКОРПОРАЦИИ ^{137}Cs**

Белорусский государственный медицинский университет, Беларусь

(Поступила в редакцию 16.01.2009)

Введение. По официальным данным, за последние годы распространенность заболеваний сердечно-сосудистой системы существенно возросла не только среди ликвидаторов аварии на ЧАЭС, но также среди лиц, включая детей и подростков, проживающих на загрязненных территориях [1-6]. Сохраняются негативные тенденции развития ишемической болезни сердца и других форм сердечно-сосудистой патологии [7, 8].

Не уделяя должного внимания радиационному фактору в возникновении этой патологии, некоторые авторы объясняют указанный рост сердечно-сосудистой заболеваемости среди пострадавшего населения психо-эмоциональным стрессом, вызванным радиофобией [9]. Данное предположение основано на представлениях о радиорезистентности миокарда к внешнему облучению в связи с якобы низкой митотической активностью кардиомиоцитов. Однако результаты экспериментальных данных [10, 11] и клинических наблюдений последних лет [12] не только противоречат этому предположению, но и позволяют выделить отдельную группу радиационно-индуцированных кардиомиопатий [11].

Ранее на экспериментальной модели была показана высокая чувствительность миокарда к внутреннему облучению от инкорпорированного ^{137}Cs [13, 14]. Как основной дозообразующий элемент загрязненных территорий ^{137}Cs является аналогом и антагонистом калия [15], играющего в деятельности миокарда важную функциональную роль. Интенсивный обмен калия в миокарде с его обильным кровоснабжением и оксигенацией обуславливает выраженную опасность накопления ^{137}Cs в митохондриальном компартменте [16-18], который утилизирует практически весь кислород, потребляемый миокардом, и занимает значительную часть его клеточного объема. Если в обычных условиях лишь небольшая часть кислорода превращается в его активные формы (АФК), то при накоплении радионуклида их образование в матриксе митохондрий (Мх) резко возрастает, что вызывает повреждение не только ультраструктуры и функции Мх [13, 14], но и всего мембранного комплекса кардиомиоцитов [19]. Последнее является важнейшим элементом патогенеза метаболической кардиомиопатий [20, 21].

Учитывая изложенное выше, а также тесную сопряженность системы митохондриального дыхания миокарда с его сократительной и электрической функциями [22], есть все основания полагать, что вызванные инкорпорацией ^{137}Cs нарушения митохондриального окисления и ультраструктуры миокарда [13, 14] могут сопровождаться изменением его электрической активности. Этот вопрос остается практически не исследованным, хотя и представляется весьма актуальным, поскольку имеет большое значение для понимания механизмов развития радиационно-индуцированной метаболической кардиомиопатий и ее роли в патогенезе сердечно-сосудистых заболеваний, вызванных радиационными воздействиями.

Цель исследования - оценка состояния митохондриального окисления миокарда и электрокардиографических параметров у животных при инкорпорации ^{137}Cs .

Материалы и методы исследования. Исследования проводили на белых крысах-самцах массой 200-230 г с соблюдением всех требований нормативных актов, принятых в международной практике лабораторного животноводства.

Всех животных содержали на стандартном рационе вивария. Опытной группе животных в течение 7 дней скармливали радиоактивный корм (сушеные белые грибы) до достижения уровня удельной активности радионуклида 170 и 600 Бк/кг, что соответствует расчетной дозе 4 и 15 мкГр. Контрольные животные получали аналогичный чистый корм.

В данной работе описаны результаты изучения митохондриального окисления при инкорпорации ^{137}Cs в 170 Бк/кг (результаты подобных исследований при накоплении радионуклида в 600 Бк/кг, а также процедура проведения исследования описаны в работе [14]).

Скорость дыхания определяли на эндогенных субстратах ($V_{\text{энд}}$), при добавлении 5 мМ сукцината ($V_{\text{як}}$), 5 мМ глутамата ($V_{\text{глу}}$) и 100 мкМ 2,4-динитрофенола - разобшителя окислительного фосфорилирования ($V_{\text{днф}}$). Кроме того, применяли ингибиторный анализ, используя ингибитор I комплекса дыхательной цепи - 1 мМ амитала натрия ($V_{\text{ам}}$) и ингибитор сукцинатдегидрогеназы - 10 мМ малоната натрия ($V_{\text{мал}}$). Скорость поглощения кислорода тканью выражали в нМ кислорода за 1 мин на 1 мг белка исследуемого тканевого препарата. Количество белка определяли биуретовым методом.

Кроме того, рассчитывали величину стимулирующего действия (СД) янтарной кислоты ($\text{СД}_{\text{як}} = V_{\text{як}}/V_{\text{энд}}$) глутамата ($\text{СД}_{\text{глу}} = V_{\text{глу}}/V_{\text{энд}}$), креатина ($\text{СД}_{\text{кре}} = V_{\text{энд}}/V_{\text{глу}}$) и 2,4-динитрофенола ($\text{СД}_{\text{днф}} = V_{\text{днф}}/V_{\text{глу}}$), а также показатели амиталрезистентного дыхания ($\text{АРД} = V_{\text{ам}}/V_{\text{энд}}$) и малонатрезистентного дыхания ($\text{МРД} = V_{\text{мал}}/V_{\text{ам}}$), характеризующие соответственно интенсивность окисления флавопротеидзависимых субстратов и вклад жирных кислот (ЖК) в энергетику исследуемой ткани. Как показала практика, перечисленные выше параметры тканевого дыхания и окислительного фосфорилирования достаточно полно характеризуют состояние энергетического обмена в ткани [13].

До начала и после окончания заорма животным трехкратно проводили электрокардиографию (ЭКГ) (аппарат SCHILLER AT-I, ФРГ) без применения общей анестезии в шести стандартных отведениях: трех двухполюсных стандартных отведениях от конечностей I, II, III и трех однополюсных усиленных от конечностей aVR , aVL , aVF . Для этого животное фиксировали на столе за конечности в положении лежа на животе. Места контакта датчиков с телом животного - тыльные поверхности предплечий и голеней освобождали от волосяного покрова с помощью депиляционного крема Eveline laboratories ($Q-10$). Депилированные поверхности тела животного обрабатывали гелем, накладывали специальные зажимы, на которых фиксировали электроды, и проводили запись ЭКГ. Статистическую обработку результатов производили с помощью пакета статистических программ Statistica 6.0 и электронных таблиц Microsoft Excel 2003. Результаты ЭКГ исследований обрабатывали, используя парный t -тест.

Таблица 1. Показатели тканевого дыхания миокарда крыс при инкорпорации ^{137}Cs ($n = 9$)

Показатель	Тканевое дыхание, нМ O_2 /мин/мг белка	
	в контроле	при уровне инкорпорации 170 Бк/кг
$V_{\text{энд}}$	2,23±0,19	3,48±0,16***
$V_{\text{глу}}$	2,40±0,44	4,72±0,58**
$V_{\text{як}}$	6,40±0,77	7,12±0,71
$V_{\text{кре}}$	3,13±0,62	4,65±0,36**
$V_{\text{днф}}$	2,45±0,28	5,46±0,87**
$\text{СД}_{\text{як}}$	2,09±0,29	1,95±0,28
$\text{СД}_{\text{глу}}$	1,46±0,12	1,49±0,07
$\text{СД}_{\text{кре}}$	1,45±0,07	1,30±0,05*
$\text{СД}_{\text{днф}}$	1,27±0,08	1,320±0,11
АРД	0,60±0,03	0,80±0,07*
МРД	0,40±0,11	0,33±0,12

Примечание. Здесь и в табл. 2 достоверность различий по отношению к контрольной группе: * - $P < 0,05$; ** - $P < 0,01$; *** - $P < 0,005$.

Результаты и их обсуждение. Изучение параметров тканевого дыхания и окислительного фосфорилирования показало, что в опытной группе животных происходит достоверно значимая стимуляция дыхательной активности миокарда на эндогенных субстратах - от 2,23±0,19 в контроле до 3,48 ± 0,16 при уровнях инкорпорации ^{137}Cs 170 Бк/кг (табл. 1).

Достоверная стимуляция дыхательной активности миокарда животных опытной группы наблюдалась также в присутствии глутамата, креатина и разобшителя - 2,4-ДНФ (соответственно до 4,72±0,58, 4,65±0,36 и 5,46±0,87 против 2,40±0,44, 3,13±0,62 и 2,45±0,28 в контроле).

Вместе с тем другой экзогенный субстрат - сукцинат не оказывал такого влияния на дыхательную активность, что объясняется особенностью его метаболизма в миокарде, связанной с высокой восстановленностью компонентов дыхательной цепи Мх кардиомиоцитов за счет интенсивного β -окисления ЖК [23]. Относительно стабильные показатели СД глутамата и сукцината при инкорпорации радионуклида указывают на отсутствие заметных изменений эндогенных пулов этих субстратов. Следует отметить, что изменения параметров митохондриального окисления в миокарде животных с уровнем инкорпорации радионуклида в 600 Бк/кг более выражены, но в целом идентичны описанным ранее [14].

Достоверное снижение $СД_{кре}$ у опытной группы животных до $1,17 \pm 0,03$ против $1,45$ в контроле свидетельствует о нарушении активности креатинфосфокиназы и сопряженных с ней ферментов. Нарушение депонирования макроэргов в форме креатинфосфата может быть вызвано радиационно-индуцированной модификацией фосфолипидного микроокружения фермента, иммобилизованного на мембранах кардиомиоцитов, набуханием Мх [13], изменением ионного состава различных микрокомпарментов кардиомиоцитов и др.

Интересно отметить, что нарушение депонирования и передачи макроэргов в форме креатинфосфата при данном воздействии происходит на фоне относительно интактной системы сопряжения окислительного фосфорилирования, что отличает описанную метаболическую ситуацию от таковой при накоплении радионуклида в 600 Бк/кг, когда в кардиомиоцитах животных, при наличии стабильной активности креатинфосфокиназы, наблюдается разобщение окислительного фосфорилирования [14].

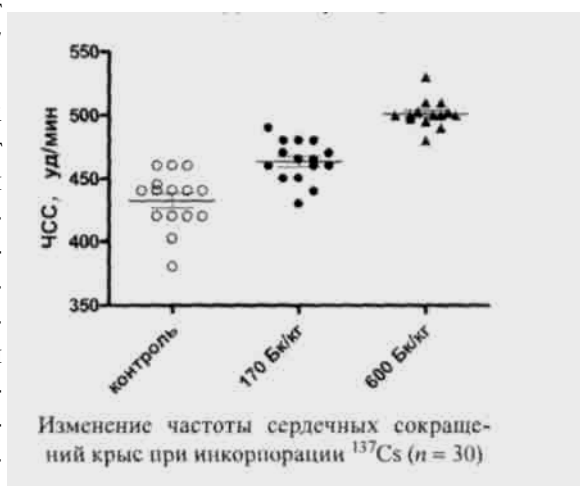
Данные ингибиторного анализа свидетельствуют о том, что у животных опытной группы наблюдается изменение соотношения окисляющихся субстратов. Так, достоверное увеличение АРД до $0,80 \pm 0,07$ против $0,60 \pm 0,03$ в контроле указывает на увеличение окисления в Мх миокарда флавопротеид-зависимых субстратов (сукцината и ЖК). Эти изменения наиболее выражены при увеличении уровня инкорпорации радионуклида до 600 Бк/кг, что проявляется в виде увеличения интенсивности β -окисления ЖК, вызывающих разобщение окислительного фосфорилирования и дополнительно иницирующих в кардиомиоцитах пероксидные реакции [14].

Принимая во внимание ранее представленные данные [13, 14], а также описанные выше изменения метаболических параметров миокарда при инкорпорации ^{137}Cs и учитывая высокую степень зависимости его электрической активности от реакций энергетического обмена, вполне логичным представляется изучение влияния радионуклида на ЭКГ параметры животных.

Изучение электрической активности миокарда показало, что ЭКГ параметры контрольных крыс соответствуют таковым, принятым в научной литературе для интактных животных [24], а их изменения при инкорпорации ^{137}Cs зависят от дозы внутреннего облучения, определяемой продолжительностью поступления, уровнем накопления и длительностью воздействия радионуклида.

При накоплении удельной активности радионуклида 170 Бк/кг частота сердечных сокращений (ЧСС) возрастала от 406 ± 13 в контроле до 435 ± 15 уд/мин, тогда как при более продолжительном поступлении и инкорпорации Cs до 600 Бк/кг этот показатель достоверно увеличивался до 506 ± 27 уд/мин (см. рисунок).

Таким образом, в среднем ЧСС у экспериментальных животных при удельной активности ^{137}Cs в 170 и 600 Бк/кг возрастала соответственно на 34 и 100 уд/мин, или на 7 и 25%. Вполне вероятно, что при этом внутреннее облучение от инкорпорированного радионуклида непосредственно воздействует на аденилатциклазный механизм сердечной мышцы, подобно тому как это происходит при внешнем лучевом воздействии [28]. Вместе с тем нельзя исключить и центральный «симпатический» эффект, обусловленный влиянием радионуклида на высшие вегетативные центры головного мозга, где он может активно накапливаться [25]. В пользу этого предположения свидетель-



Зубец	Контроль	Изменение амплитуды зубцов, мм	
		170 Бк/кг	600 Бк/кг
<i>P</i>	1,1±0,2	1,2±0,1	1,3±0,1
<i>R</i>	4,5±0,1	4,7±0,3	5,4±0,2*
<i>T</i>	2,6±0,2	2,9±0,2	3,5±0,3*

Таблица 2. Изменения амплитуды зубцов *R*, *P*, *T* на ЭКГ крыс ($n = 30$) после инкорпорации ^{137}Cs

данные экспериментальных исследований, а также результаты исследований [26], а также результаты обследования школьников, проживающих в зоне, где прово-

дится периодический радиационный контроль [27]. В результате реализации указанных механизмов возможно усиление влияния симпатической нервной системы на миокард. При более детальном анализе и оценке ЭКГ опытной группы крыс установлено отсутствие изменений времени проведения возбуждения от предсердия к желудочкам, на что указывает стабильная продолжительность интервала *PQ* - надежного интегрального параметра электрической активности миокарда.

Кроме того, остается неизменной и продолжительность фазы реполяризации, поскольку не изменяется другой, наиболее важный и информативный параметр ЭКГ — продолжительность интервала *QT*, интегрально характеризующий длительность электрической систолы и общую стабильность миокарда.

В этих условиях на ЭКГ экспериментальных животных возрастают амплитуды зубцов *R*, *P*, *T*, что свидетельствует об усилении сократительной активности миокарда, вызванной, как уже отмечалось, возможным влиянием на него симпатической нервной системы (табл. 2).

Согласно представленным данным, при инкорпорации ^{137}Cs с удельной активностью 170 и 600 Бк/кг амплитуда зубца *R* увеличивается соответственно на 4 и 20%, зубца *P* - на 9 и 18%, зубца *T* - на 12 и 35% от исходного.

Необходимо подчеркнуть, что представленные результаты ЭКГ исследований хорошо согласуются с ранее описанными данными ЭхоКГ исследований, свидетельствующими об усилении сократительной активности миокарда при данных уровнях инкорпорации радионуклида [14].

Заключение. В ходе исследований установлено наличие высокой чувствительности аэробного энергетического метаболизма миокарда, его электрической активности к действию инкорпорированного ^{137}Cs , обладающего выраженной кардиотропностью, что подтверждает и дополняет полученные ранее данные, согласно которым вызванные действием данного радионуклида метаболические ультраструктурные и функциональные изменения сердечной мышцы соответствуют первой (нейрофункциональной) стадии метаболической кардиомиопатии - стадии адаптивной гиперфункции миокарда [20].

Полученные нами результаты соответствуют представлениям о системной биологии миокарда, согласно которым в норме его метаболизм существует в режиме близкого соответствия спроса и предложения энергии, эффективного сопряжения метаболизма и электрической активности. При экстремальных состояниях, к каковым можно отнести инкорпорацию ^{137}Cs , система выходит на качественно новый динамический режим с нарушением координации между этими процессами и развитием «метаболической фибрилляции», ведущей к гибели кардиомиоцитов и последующему развитию дисфункции и патологии миокарда [28, 29].

Данная работа выполнена в рамках проекта ГПОФИ «Радиация и экосистемы».

Литература

1. Никифоров А. М. Патология отдаленного периода у ликвидаторов последствий аварии на Чернобыльской АЭС. СПб., 2002.
2. Манак Н. А., Русецкая В. Г. // Здоровоохранение. 2003. № 1. С. 55-59.
3. Национальный доклад «20 лет после Чернобыльской катастрофы: последствия в Республике Беларусь» / Под ред. В. Е. Шевчука и В. Л. Тухачевского. Минск. 2006.
4. Капитонова Э. К., Основская Е. Я., Котова О. В. // Радиация и Чернобыль. Ближайшие и отдаленные последствия: сб. науч. ст. Гомель, 2007. Т. 4. С. 86-93.
5. Александрин С. С. // Вестн. Рос. воен-мед. акад. 2008. № 3 (23). Прил. 1. С. 10-13.
6. Vozianov A., Bebesko V., Bazuka D. (eds.). Health effects of Chernobyl accident. Kyiv, 2003.

7. Коваленко А. Н. Пострадиационная эндокринология у участников ликвидации последствий аварии на ЧАЭС. Киев, 1998.
8. Чиркин А. А., Цыкунова И. В., Доценко Э. А., Цыбин А. К. Атеросклероз и радиация. Гомель, 1999.
9. Ярмоненко СП, Вайнсон А. А. // Радиобиология человека и животных. М., 2004.
10. Maulik N., Thirunavukkarasu M. // J. Mol. Cell. Cardiol. 2008. Vol. 44, N 2. P. 219-227.
11. Schneider M. D. // J. Mol. Cell. Cardiol. 2008. Vol. 44, N 2. P. 436-439.
12. Anversa P., Nadal-Ginard B. // Nature. 2002. Vol. 415, N 6868. P. 240-243.
13. Грицук А. И., Вернер А. И., Матюхина Т. Г. и др. // Вестн НАН Беларуси Сер. мед.-биш. наук. 2002. № 2. С. 63-70.
14. Грицук Н. А., Грицук А. И., Конопля Е. Ф. // Вестн НАН Беларуси Сер. мед. наук. 2008. № 2. С. 105-111.
15. Биккулова А. Т., Ишмуратова Г. М. Биоэлементология S-, p-, d-элементов. СПб., 1999.
16. Davis DC, Murphy E., London R. E. // Biochemistry. 1988. Vol. 27, N 10. P. 3547-3551.
17. Shehan B. P., Wellard R. M., Craik D. I, Adam W. R. // J. Magn. Reson. 1995. Vol. 107, N 2. P. 179-185.
18. Schornack P. A., Song S. K., Ling C S. et al. // Am. J. Physiol. 1997. Vol. 272, N 5. Pt 1. P. C1618-C1634.
19. Конопля Е. Ф., Багель И. М., Шафрановская Е. В. // Докл. АН Беларуси. 1996. Т. 40, № 3. С. 86-89.
20. Мутафьян О. А. Кардиомиопатии у детей и подростков. СПб., 2003.
21. Fatkin D. // Physiol. Rev. 2002. Vol. 82. P. 945-980.
22. Saks V, Favier R., Guzun R. et al. // J. Physiol. 2006. Vol. 577. P. 769-777.
22. Stanley W. C, Recchia F. A., Lopaschuk G. D. et al. // Physiol. Rev. 2005. Vol. 85. P. 1093-1129.
23. Gizurarson S., Lorentzon M., Ramunddal T. et al. // Europace. 2007. Vol. 9. P. 411-416.
24. Li Y, Neil J., Askerman J. J. // NMR Biomed. 1995. Vol. 8, N 5. P. 183-189.
25. Дерев'янюк Л. П. Стан гшоталамо-гтофлзарно-наднирково¹ та симпато-адреналово^У систем за умов дп на оргашзм тварин малих доз юшзувального випромшення та коригування виявлених порушень автореф. дис.... д-ра бюл. наук: (03.00.04). Київ, 2007.
26. Киеня А. И., Кириченко О. В., Зайка Э. М. // Физиология человека. 1998. Т. 24, № 5. С. 106-110.
27. Буланова К. Я., Лобанок Л. М., Конопля Е. Ф. Радиация и Чернобыль. Кардиомиоциты и регуляция их функции. Минск, 2008.
28. Drake T. A., Ping P. // J. Lipid Res. 2007. Vol. 48. 1. P. 1-8.

N. A. GRITSUK

MITOCHONDRIAL OXIDATION IN CARDIOMYOCYTES AND RAT ELECTROCARDIOGRAPHIC PARAMETERS AT ¹³⁷Cs INCORPORATION

Gomel State Medical University, Belarus

Summary

The article considers the influence of incorporation of 170 and 600 Bk/kg ¹³⁷Cs on indices of mitochondrial oxidation and electric activity of myocardium of rats. When acted upon by radionuclides, the rat oxygen consumption on endogenous substrates increases in the presence of glutamate, creatine and dinitrophenol, the deposition of creatine phosphate macroergs is disturbed, the uncoupling of oxidative phosphorylation is marked. Electrocardiogram changes are shown in the form of increase in cardiac beat frequency and amplitude of P and T waves. Caused by the incorporation of ¹³⁷Cs the metabolic and functional changes of a myocardium correspond to the first (neurofunctional) stage of metabolic cardiomyopathy.