

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

Н. А. ГРИЦУК<sup>1</sup>, Е. Ф. КОНОПЛЯ<sup>2</sup>, А. И. ГРИЦУК<sup>1</sup>

**ВЛИЯНИЕ ИНКОРПОРАЦИИ <sup>137</sup>Cs  
НА ПОКАЗАТЕЛИ МИТОХОНДРИАЛЬНОГО ОКИСЛЕНИЯ МИОКАРДА  
И ДИНАМИКУ ЭХОКАРДИОГРАФИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ У КРЫС**

<sup>1</sup>Гомельский государственный медицинский университет, Беларусь,

<sup>2</sup>Институт радиобиологии НАН Беларуси, Гомель

(Поступила в редакцию 22.10.2007)

**Введение.** Несмотря на то что после аварии на ЧАЭС прошло более 20 лет, проблема отдаленных медико-биологических последствий этой грандиозной катастрофы все еще остается актуальной. Так, отмечается рост заболеваемости сердечно-сосудистой патологией среди населения, проживающего на загрязненных радионуклидами территориях [1, 2].

Установлено, что малые дозы ионизирующего излучения вызывают повреждение мембран и мембранно-рецепторных комплексов клеток мышечной ткани [3, 4]. В то же время известно, что пероксидное повреждение мембран митохондрий (Мх) кардиомиоцитов является важнейшим патогенетическим механизмом развития таких форм сердечно-сосудистой патологии, как ишемическая болезнь сердца, гипертоническая болезнь и др. [5, 6].

Однако объяснить повреждение миокарда воздействием малых доз внешнего облучения весьма затруднительно, поскольку, согласно мнению представителей классической радиобиологии [7], миокард обладает достаточно высокой радиорезистентностью. Вместе с тем известно [7], что жители загрязненных территорий получают основную лучевую нагрузку за счет внутреннего облучения, главным образом от инкорпорированного <sup>137</sup>Cs.

Ранее было показано [8], что миокард отличается исключительно высокой чувствительностью к воздействию инкорпорированного <sup>137</sup>Cs, который, будучи элементом IА группы периодической таблицы Д. И. Менделеева, по многим физико-химическим характеристикам сходен с калием, играющим в функции миокарда чрезвычайно важную роль. Так, например, его соли хорошо растворимы в воде и биологических жидкостях, относительно легко проникают через биологические мембраны [9]. По этой причине <sup>137</sup>Cs равномерно распределяется по тканям и жидким средам организма [10] и, являясь источником длительного внутреннего облучения, которое характеризуется немонотонной зависимостью доза – эффект [11], вызывает более тяжелые поражения, чем однократное внешнее облучение в той же дозе [12].

При пероральном поступлении в организм <sup>137</sup>Cs перемещается по транспортным путям калия и выступает как его аналог и антагонист, активно накапливаясь в миокарде и в различных компартаментах кардиомиоцитов – цитоплазме, ядре и особенно в митохондриальном матриксе [13].

Мх, обладающие максимальной клеточной концентрацией кислорода, в процессе утилизации его в дыхательной цепи (ДЦ) в норме образуют небольшие количества (2–4%) активных форм кислорода (АФК). Вследствие этого Мх являются центром антиоксидантной защиты клетки, а в критических ситуациях становятся основным источником образования АФК, инициируя апоптоз [19].

Активное накопление <sup>137</sup>Cs в матриксе Мх способствует увеличению образования в нем АФК, вызывает нарушение ультраструктуры Мх и всей системы митохондриального окисления

за счет пероксидного повреждения фосфолипидов и белков мембран, ферментных комплексов ДЦ и матрикса [8].

Вполне вероятно, что низкодозовая радиационная нагрузка, вызванная инкорпорацией  $^{137}\text{Cs}$ , который обладает выраженной кардиотропностью [13], может вызвать развитие метаболических нарушений в сфере энергетического обмена, следствием которых явится изменение сократительной активности миокарда. Анализ литературы свидетельствует о том, что данный аспект проблемы остается мало изученным, хотя несомненно представляет научный и практический интерес.

Цель данной работы – изучение состояния митохондриального окисления и сократительной активности миокарда при пероральном поступлении  $^{137}\text{Cs}$  в организм животных.

**Материалы и методы исследования.** Исследования проводили на белых крысах-самцах массой 200–230 г с соблюдением всех требований Хельсинкской Декларации по гуманному обращению с животными (1975 г., пересмотрена в 1993 г.), Директивы Совета Европейского Сообщества по защите животных, используемых в экспериментальных и других научных целях (1986 г.) и иных нормативных актов, принятых в международной практике лабораторного животноводства.

Всех животных содержали на стандартном рационе вивария. Крысам опытной группы в течение 7 дней скармливали радиоактивный корм (сушеные белые грибы) в дозе 48 кБк/кг до достижения уровня накопления в 600 Бк/кг, что соответствует расчетной дозе 15 мкГр. После забоя животных путем декапитации сердце извлекали, отмывали от крови физиологическим раствором, охлаждали в растворе Хэнкса и продавливали через плунжер с отверстиями диаметром 0,5 мм. В полученных таким образом тканевых препаратах на полярографе ПЛС-1 (Беларусь) в ячейке объемом 2 мл с помощью закрытого платинового электрода Кларка при температуре 30 °С в растворе Хэнкса изучали показатели тканевого дыхания (ТД) и окислительного фосфорилирования (ОФ).

Скорость дыхания определяли на эндогенных субстратах ( $V_{\text{энд}}$ ) при добавлении 5 мМ сукцината ( $V_{\text{як}}$ ), 5 мМ глутамата ( $V_{\text{глу}}$ ), 5 мМ креатина ( $V_{\text{кре}}$ ) и разобшителя ОФ – 100 мкМ 2,4-динитрофенола ( $V_{\text{диф}}$ ). Кроме того, применяли ингибиторный анализ, используя ингибитор I комплекса ДЦ – 1 мМ амитала натрия ( $V_{\text{ам}}$ ) и ингибитор сукцинатдегидрогеназы – 10 мМ малоната натрия ( $V_{\text{мал}}$ ). Скорость поглощения кислорода тканью выражали в нМ  $\text{O}_2/\text{мин} \cdot \text{мг}$  белка исследуемого тканевого препарата. Количество белка определяли биуретовым методом [18].

Наряду с этим рассчитывали величину стимулирующего действия янтарной кислоты ( $\text{СД}_{\text{як}} = V_{\text{як}}/V_{\text{энд}}$ ), глутамата ( $\text{СД}_{\text{глу}} = V_{\text{глу}}/V_{\text{энд}}$ ), креатина ( $\text{СД} = V_{\text{кре}}/V_{\text{глу}}$ ) и 2,4-динитрофенола ( $\text{СД}_{\text{диф}} = V_{\text{диф}}/V_{\text{глу}}$ ), 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 в энергетику исследуемой ткани. Перечисленные выше параметры ТД и ОФ позволяют дать достаточно полную характеристику состоянию энергетического обмена миокарда [8].

Эхокардиографические исследования проводили на аппарате ESAOTE MEGAS GPX с микроконвексным датчиком на 5 мГц по общепринятым методикам до и после накопления установленного количества  $^{137}\text{Cs}$ . При этом применяли одномерную (М-режим) и двухмерную (В-режим) эхокардиографию (рис. 1). Изображение сердца в реальном масштабе времени получали в плоскостях по длинной и короткой оси. В М-режиме исследования желудочков выполняли в трех позициях ультразвукового луча. Все количественные показатели (рис. 2, 3) измеряли не менее чем в трех последовательных сердечных циклах. Полученные данные обрабатывали статистическими методами с использованием непараметрического критерия  $U$ , а также парного  $t$ -теста программы GraphPad Software.

**Результаты и их обсуждение.** Представленные в табл. 1 данные подтверждают ранее полученные результаты [8] о высокой чувствительности митохондриального окисления миокарда к действию сверхмалых количеств инкорпорированного  $^{137}\text{Cs}$  и свидетельствуют об увеличении дыхательной активности миокарда при данном уровне накопления.

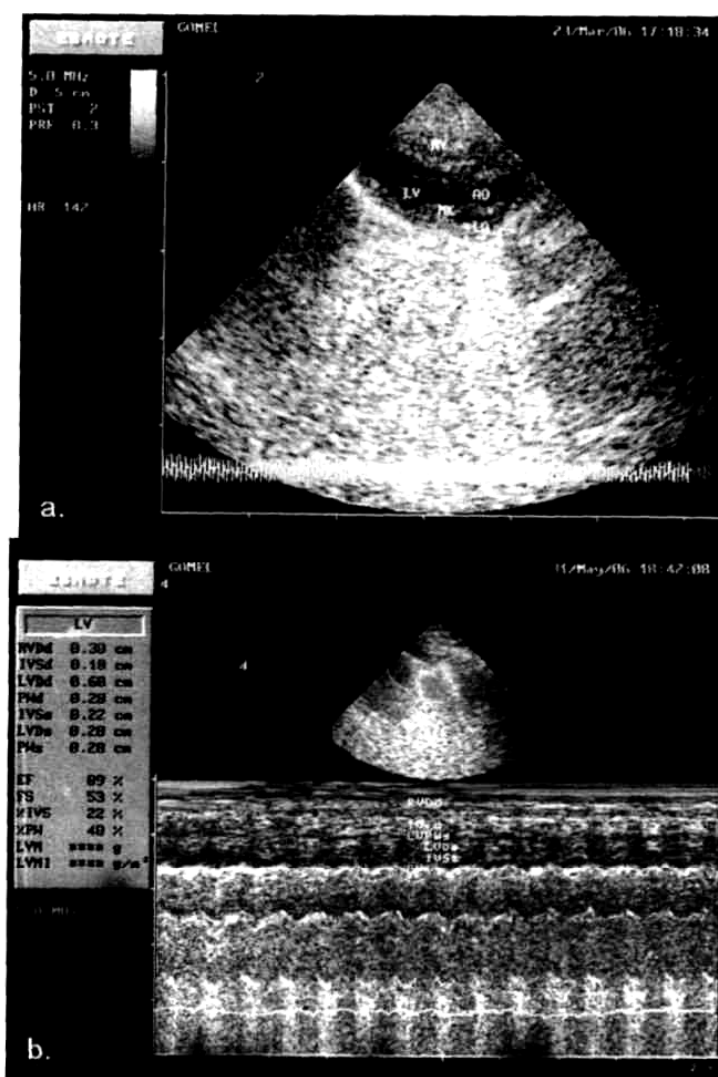


рис. 1. Эхокардиограммы в парастеральной позиции по длинной оси: *a* – в В-режиме, *b* – в В- и М-режимах. АО – аорта, LV – левый желудочек, LA – левое предсердие, МК – митральный клапан, RV – правый желудочек

Таблица 1. Показатели тканевого дыхания миокарда крыс при уровне инкорпорации 600 Бк/кг ( $n=8$ )

Показатель	Тканевое дыхание, нМ O <sub>2</sub> /мин·мг	
	Контроль	Уровень инкорпорации 600 Бк/кг
I <sub>энд</sub>	2.05±0.39	4.40±0.13**
I <sub>як</sub>	5.40±0.60	7.04±0.99
I <sub>глу</sub>	2.43±0.30	4.59±0.25**
I <sub>кре</sub>	2.98±0.59	5.25±0.24**
I <sub>диф</sub>	3.09±0.50	4.06±0.46
СД <sub>як</sub>	2.07±0.57	1.63±0.11
СД <sub>глу</sub>	1.82±0.46	1.14±0.07
СД <sub>кре</sub>	1.45±0.07	1.17±0.03*
СД <sub>диф</sub>	1.76±0.32	0.90±0.04*
АРД	0.88±0.04	0.98±0.03
МРД	0.63±0.06	0.90±0.05*

Примечание. Достоверность различий по отношению к контрольной группе: \* –  $P < 0.05$ ; \*\* –  $P < 0.01$ .

Так, достоверно возростала скорость дыхания кусочков миокарда на эндогенных субстратах (с  $2.05 \pm 0.39$  в контроле до  $4.40 \pm 0.13$  нМ  $O_2$ /мин·мг белка в опытной группе). Стимуляция дыхательной активности миокарда животных опытной группы наблюдается при использовании глутамата (с  $2.43 \pm 0.30$  в контроле до  $4.59 \pm 0.25$  нМ  $O_2$ /мин·мг белка), а также выраженная тенденция роста скорости дыхания в присутствии разобшителя ОФ – 2.4 ДНФ (с  $3.09 \pm 0.50$  в контроле до  $4.06 \pm 0.46$  нМ  $O_2$ /мин·мг белка при данном воздействии).

Изменения дыхательной активности миокарда животных опытной группы при использовании сукцината проявлялись в виде недостоверного увеличения показателя  $V_{як}$  (с  $5.40 \pm 0.60$  в контроле до  $7.04 \pm 0.99$  нМ  $O_2$ /мин·мг белка в опытной группе), что можно объяснить особенностью окисления сукцината в Мх, сердца (ввиду высокой восстановленности компонентов ДЦ Мх сукцинатдегидрогеназа кардиомиоцитов находится в «слегка приторможенном состоянии») [20].

Коэффициент стимулирующего действия сукцината ( $СД_{як}$ ) в группе экспериментальных животных имел выраженную тенденцию к снижению, что наряду с данными ингибиторного анализа (см. ниже) может свидетельствовать, с одной стороны, об увеличении эндогенного пула сукцината Мх, а с другой – о возрастании роли янтарной кислоты в энергетике миокарда животных опытной группы. Вместе с тем показатель  $СД_{глу}$  достоверно снижался (с  $1.82 \pm 0.46$  в контроле до  $1.14 \pm 0.07$ ), что, по нашему мнению, может указывать на увеличение внутримитохондриального пула глутамата – предшественника сукцината и хорошо согласуется с предположением об увеличении роли сукцината в энергетике миокарда животных, подвергнутого кратковременному воздействию  $^{137}Cs$ .

Полученные нами данные о стимуляции дыхательной активности миокарда при инкорпорации  $^{137}Cs$  находятся в соответствии с результатами экспериментов об усилении дыхательной активности различных тканей других биологических объектов при больших дозах внешнего облучения [21].

Принимая во внимание исключительно важную роль креатина в энергетике миокарда, нами предпринята попытка исследовать в условиях данного воздействия состояние креатинфосфокиназной системы миокарда. Полученные результаты об активации дыхания миокарда в присутствии креатина (с  $2.98 \pm 0.59$  в контроле до  $5.25 \pm 0.24$  нМ  $O_2$ /мин·мг белка у животных опытной группы) являются дополнительным свидетельством общей стимуляции дыхательной активности миокарда, вызванной данным воздействием.

Вместе с тем достоверное снижение коэффициента  $СД_{кре}$  (с  $1.45 \pm 0.07$  в контроле до  $1.17 \pm 0.03$  в опытной группе) отражает нарушение структурно-функционального сопряжения креатинфосфокиназы с АТФ-синтетазами миокарда и указывает на угнетение процессов депонирования энергии в форме креатинфосфата, что может быть обусловлено разными причинами – сопутствующим набуханием Мх [8], увеличением содержания в плазме крови и миокарде пероксидных продуктов (табл. 2) и др.

Т а б л и ц а 2. Содержание малонового диальдегида в плазме крови (нМ/л) и миокарде (нМ/г) крыс при инкорпорации  $^{137}Cs$  (n=8)

Группа	Плазма крови	Миокард
Контроль	$192.1 \pm 20.6$	$6.6 \pm 0.4^*$
Животные с уровнем инкорпорации 600 Бк/кг	$291.3 \pm 40.1^*$	$16.0 \pm 0.8^*$

\*  $P < 0.05$ .

Возрастание показателя  $V_{днф}$  миокарда животных опытной группы до  $4.06 \pm 0.46$  против  $3.09 \pm 0.50$  нМ  $O_2$ /мин·мг белка в контроле также является свидетельством усиления дыхательной активности Мх миокарда.

Результаты ингибиторного анализа (см. табл. 1) свидетельствуют о том, что при данном воздействии животных возрастает интенсивность  $\beta$ -окисления жирных кислот, что подтверждается достоверным ростом величины коэффициента МРД (с  $0.63 \pm 0.06$  в контроле до  $0.90 \pm 0.05$  у животных опытной группы) на фоне увеличения показателя АРД.

Увеличение в энергетике миокарда роли жирных кислот, обладающих разобшающей активностью [22], наряду с активацией пероксидных процессов (табл. 2) способствует разобщению системы сопряжения ТД и ОФ Мх кардиомиоцитов, о чем свидетельствует достоверное снижение коэффициента  $СД_{диф}$  (с  $1.76 \pm 0.32$  в контроле до  $0.90 \pm 0.04$  в группе с накоплением  $^{137}Cs$  в количестве 600 Бк/кг). Кроме того, жирные кислоты, выступая в качестве конкурентных ингибиторов, тормозят утилизацию эндогенного сукцината в Мх миокарда [22], способствуя увеличению его пула внутри Мх, о чем свидетельствует тенденция к снижению показателя  $СД_{як}$ .

Разобщение системы сопряжения ТД и ОФ в миокарде при данном воздействии выполняет, как нам представляется, адаптивную функцию, избавляя клетки от излишка АФК [22], генерируемых поступившим  $^{137}Cs$ , и одновременно, в качестве биохимического маркера, может свидетельствовать о запуске ранних (доморфологических) стадий апоптоза [19].

Резюмируя полученные результаты, отметим, что при кратковременном поступлении и незначительном уровне инкорпорации  $^{137}Cs$  в количестве 600 Бк/кг в миокарде животных формируется диссипативный, неэкономный и расточительный тип энергетике, который проявляется в виде резкой стимуляции дыхательной активности кардиомиоцитов на фоне снижения эффективности энергообразования в виде нарушения депонирования макроэргов в форме креатинфосфата и разобщения системы сопряжения ТД и ОФ. Эти изменения сопровождаются увеличением в энергетике миокарда роли эндогенного сукцината и последующей интенсификацией  $\beta$ -окисления жирных кислот.

Принимая во внимание исключительно высокую энергозависимость сократительной функции миокарда, вполне логичным представляется исследование этой его функции у животных, подвергнутых данному воздействию.

Результаты эхокардиографических исследований свидетельствуют о том, что параметры сократительной функции миокарда животных контрольной группы соответствуют таковым, описанным в литературе для лабораторных крыс [23].

В экспериментальной группе животных выявлены эхокардиографические признаки изменения сократительной способности миокарда в виде увеличения фракции выброса (рис. 2, а) и фракции укорочения (рис. 2, б), возрастания систолической экскурсии (рис. 3, а) и фракции систолического утолщения (рис. 3, б) задней стенки левого желудочка. Совокупность обнаруженных изменений можно расценить как признаки нарушения систолической функции левого желудочка по гиперкинетическому типу [23, 25].

Наряду с этим по сравнению с контрольными данными наблюдается увеличение фракции выброса (рис. 2, а) и прирост фракции укорочения (рис. 2, б). Систолическая экскурсия и фракция систолического утолщения в опытной группе животных также возрастают по сравнению с контрольными данными (до инкорпорации).

Описанные эхокардиографические изменения, которые при данном воздействии могут быть обусловлены непосредственным влиянием на миокард радионуклида как радиоактивного элемента, аналога и антагониста калия, а также возникающими при этом выраженными нарушениями энергетического обмена кардиомиоцитов и «кардио-

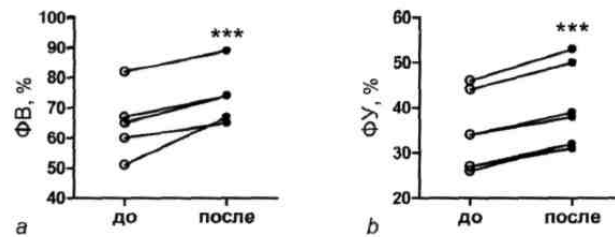


Рис. 2. Фракция выброса (ФВ) (а) и фракция укорочения (ФУ) (б) до и после инкорпорации  $^{137}Cs$  в дозе 600 Бк/кг

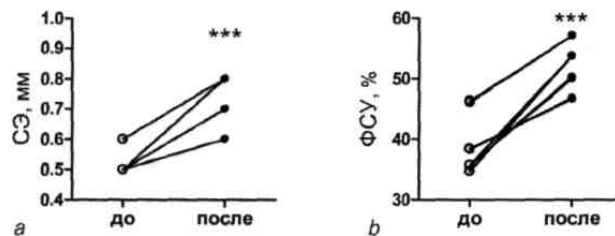


Рис. 3. Систолическая экскурсия (СЭ) (а) и фракция систолического утолщения (ФСУ) (б) до и после инкорпорации  $^{137}Cs$  в дозе 600 Бк/кг. \*\*\* –  $P < 0.001$  (парный  $t$ -тест)

токсическим» действием на миокард жирных кислот (продуктов пероксидного стресса, индуцированного инкорпорацией  $^{137}\text{Cs}$ ), соответствуют, согласно существующим представлениям, первой стадии метаболической кардиомиопатии [24, 25].

Возможное ингибирование калиевых каналов, обусловленное инкорпорацией  $^{137}\text{Cs}$ , а также активация в связи с этим окислительного стресса и накопление АФК в ткани миокарда вызывают повреждение всего мембранного комплекса кардиомиоцитов, в том числе и системы митохондриальных мембран [8]. Повреждение значительной части мембранного комплекса кардиомиоцитов может вызвать нарушение кальциевого гомеостаза и увеличение в саркоплазме кардиомиоцитов концентрации ионов  $\text{Ca}^{2+}$  [6], что влечет за собой стимуляцию сократительной активности миокарда. На начальных этапах это ведет к усилению сократительной функции миокарда, а соответственно, к увеличению фракции выброса, фракции укорочения, возрастанию систолической экскурсии и фракции систолического утолщения задней стенки левого желудочка. Однако возрастание исключительно энергозатратной сократительной функции миокарда на фоне его неэффективной и расточительной энергетики способствует развитию в кардиомиоцитах энергетического дефицита, что является важнейшим патогенетическим элементом в развитии метаболической кардиомиопатии [24, 25], которая наряду с другими факторами риска может способствовать развитию и усугублению сердечно-сосудистой патологии.

**Заключение.** Таким образом, результаты исследований свидетельствуют о высокой чувствительности миокарда к действию малых количеств инкорпорированного  $^{137}\text{Cs}$ , обладающего выраженной кардиотропностью, и подтверждают полученные ранее данные о метаболических и ультраструктурных изменениях в сердечной мышце, вызванных воздействием этого радионуклида. Обнаруженные метаболические изменения в сфере энергетического обмена являются, по нашему мнению, основной причиной нарушения сократительной функции миокарда, выявляемого методом эхокардиографии. Полученные результаты хорошо согласуются с литературными данными и дополняют имеющиеся представления о патогенетических механизмах начальных этапов метаболической кардиомиопатии (миокардиодистрофии), обусловленной инкорпорацией  $^{137}\text{Cs}$ .

Данная работа выполнена благодаря частичной поддержке проекта ГПОФИ «Радиация и экосистемы». Авторы выражают искреннюю благодарность заведующему лабораторией Института цитологии РАН, доктору биологических наук Б. А. Маргулису за предоставленную возможность в проведении эхокардиографических исследований.

## Литература

1. Чиркин А. А. Атеросклероз и радиация. Гомель, 1999.
2. Манак Н. А., Русецкая В. Г. // *Здравоохранение*. 2003. № 1. С. 55–59.
3. Конопля Е. Ф., Багель И. М., Шафрановская Е. В. // *Докл. АН Беларуси*. 1996. Т. 40, № 3. С. 86–89.
4. Конопля Е. Ф., Милютин А. А. // *Актуальные вопросы радиационной гигиены: тез. докл. Всесоюз. конф. М., 1987*. С. 53–54.
5. Ланкин В. З., Тихазе А. К., Беленков Ю. Н. // *Кардиология*. 2000. Т. 40, № 7. С. 48–61.
6. Brookes P. S., Brookes P. S., Yoon Y. et al. // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2004. Vol. 287. P. 817–833.
7. Ярмоненко С. П., Вайнсон А. А. *Радиобиология*. М., 2004.
8. Грицук А. И., Вернер А. И., Матюхина Т. Г. и др. // *Весті НАН Беларусі. Сер. мед.-біял. навук.* 2002. № 2. С. 63–70.
9. Garlid K. D., Paucsek P. // *Biochim. et Biophys. Acta*. 2003. Vol. 1606. P. 23–41.
10. Журавлев В. Ф. Р. // *Вредные химические вещества. Радиоактивные вещества: справ. изд. Л., 1990*.
11. Бурлакова Е. Б., Голощанов А. Н., Жижина Г. П., Конрадов А. А. // *Радиационная биология. Радиэкология*. 1999. Т. 39. С. 26–34.
12. Борисова В. В., Воеводина Т. М., Федорова А. В., Яковлева Н. Г. *Биологические эффекты при длительном поступлении радионуклидов*. М., 1988.
13. Davis D. G., Murphy E., London R. E. // *Biochemistry*. 1988. Vol. 27, N 10. P. 3547–3551.
14. Shehan B. P., Wellard R. M., Adam W. R., Craik D. J. // *Magn. Reson. Med.* 1993. Vol. 30, N 5. P. 573–582.
15. Li Y., Neil J., Ackerman J. J. // *NMR Biomed.* 1995. Vol. 8, N 5. P. 183–189.
16. Shehan B. P., Wellard R. M., Craik D. J., Adam W. R. // *J. Magn. Reson.* 1995. Vol. 107, N 2. P. 179–185.
17. Schornack P. A., Song S. K., Ling C. S. et al. // *Am. J. Physiol.* 1997. Vol. 272, N 5. Pt 1. P. C1618–C1634.
18. Кочетков Г. А. *Практическое руководство по энзимологии*. М., 1980.
19. Скулачев В. П. // *I Северинские чтения: Материалы конф. М., 2000*.