

УДК 574.2 + 577.121 + 539.1.047
© 2013

ФУНКЦИОНАЛЬНО-МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ МИОКАРДА МАЛОЙ ЛЕСНОЙ МЫШИ (*APODEMUS URALENSIS*) В ЗОНЕ ВОСТОЧНО-УРАЛЬСКОГО РАДИОАКТИВНОГО СЛЕДА

Н.А. Орехова, М.В. Модоров

Россия, г. Екатеринбург, Институт экологии растений и животных УрО РАН

Установлены изменения биохимических показателей (концентрация общих липидов, белка, ДНК и РНК, активность сукцинатдегидрогеназы, глюкозофосфатизомеразы и каталазы, уровень ПОЛ) в миокарде малой лесной мыши (*Apodemus uralensis*), обитающей на территории Восточно-Уральского радиоактивного следа. Функционально-метаболические сдвиги характеризуются снижением уровня катаболизма липидов, митохондриального окисления и антиоксидантной защиты, активацией анаэробной гликолитической системы, белок-синтезирующего и генетического аппаратов. Полученные данные свидетельствуют о низкой эффективности энергопродукции в клетках и позволяют говорить о развитии компенсаторной гипертрофии миокарда как механизма поддержания сократительной функции. Наблюдаемые эффекты соответствуют стадии длительной (устойчивой) адаптации миокарда к неблагоприятным факторам среды обитания, что не исключает возможность перехода в стадию декомпенсации и развития патологии.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: ВУРС, МАЛАЯ ЛЕСНАЯ МЫШЬ, МИОКАРД, ФУНКЦИОНАЛЬНО-МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ СДВИГИ

Осенью 1957 г. в результате аварии на ПО "Маяк" в окружающую среду попало 74 ПБк радиоактивных отходов, образовав Восточно-Уральский радиоактивный след – ВУРС. Данная работа является пилотным исследованием функционально-метаболических характеристик миокарда мелких млекопитающих ВУРСа и является частью комплексной работы по изучению эколого-биохимических параметров животных из зон радиоактивного загрязнения [1, 2].

С позиции классической радиобиологии [3] волокна сердечной мышцы высокорезистентны к облучению по причине низкой митотической активности кардиомиоцитов (КМЦ). Считается, что большинство повреждающих эффектов на миокард обусловлено воздействием излучения на эндотелий кровеносных сосудов, нарушением гемодинамики и проницаемости коронарных сосудов, ведущих к структурно-функциональным дефектам

КМЦ. Летальные эффекты обнаруживаются при облучении сердца в дозе 100 Гр и более [4]. Экспериментальных данных о влиянии радионуклидов на структуру и функции миокарда крайне мало, резкие нарушения отмечены при воздействии ¹³⁷Cs, даже в области малых доз (10⁻⁶–10⁻³ Гр), ввиду способности к аккумуляции этого радионуклида в КМЦ [5, 6]. Современная оценка реактивных свойств миокарда у животных из зон радиоактивного загрязнения убеждает в высокой чувствительности КМЦ и рассматривает их изменения как опосредованные эффекты облучения, во многом сходные с механизмами реализации стресс-реакции и процессами старения организма [2, 7].

Цель работы – анализ функционально-метаболических изменений миокарда у малой лесной мыши (*Apodemus uralensis* Pall., 1811), обитающей на территории ВУРСа.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Животных отлавливали на территории Южного Урала в июле-августе 2011 г. с использованием живоловушек. Импактный участок расположен на юго-западном берегу оз. Урускуль (55°49' с.ш., 60°53' в.д.) в 20 км от эпицентра Кыштымской аварии [8]. Плотность загрязнения почвенного покрова по ^{90}Sr , как основному дозобразующему радионуклиду, составляет $7,4 \cdot 10^5$ – $3,7 \cdot 10^6$ Бк/м² [9]. Удельная активность ^{90}Sr в бедренных костях зверьков, отловленных на этом участке в 2009 г., варьировала от 12 до 170 Бк/г [10], что существенно выше значений (до 1 Бк/г), отмеченных для животных с территорий, расположенных вне зоны ВУРСа [11]. В качестве контроля использовали зверьков из Курганской области, добытых на участках с фоновыми для Урала уровнями радиоактивного загрязнения, а именно в окрестностях села Звериноголовское (54°26' с.ш., 64°44' в.д.) и деревни Успенка (54°47' с.ш., 66°27' в.д.).

В анализ включены сеголетки малой лесной мыши как участвующие в размножении (ВУРС – 12 особей; контроль – 11 особей), так и не созревшие особи, вес которых превышал 10 г (ВУРС – 56 особей; контроль – 13 особей). Выделение группировок зверьков проводили на основании анализа генеративной и зубной систем [12]. В течение 15 мин после смерти животного миокард очищали от крови, взвешивали и замораживали в жидком азоте; по возвращении в лабораторию и до проведения биохимического анализа орган хранили в кельвинаторе при температуре –80 °С.

Проводили количественное определение общих липидов, белка и нуклеиновых кислот (ДНК, РНК), анализировали активность трех ферментов – сукцинатдегидрогеназы (СДГ, КФ 1.3.99.1), глюкозофосфатизомеразы (ГФИ, КФ 5.3.1.9) и каталазы (КФ. 1.11.1.6). О перекисном окислении липидов (ПОЛ) судили на основании концентрации вторичных продуктов ПОЛ – ТБК-активных продуктов (ТБК-АП).

Орган гомогенизировали в трис-НСI (0,025 моль/л) буферном растворе (рН=7,4), содержащем 0,175 моль/л хлорида калия [13]. Из приготовленного гомогената извлекали нуклеиновые кислоты (РНК и ДНК) путем щелочного

(0,6 моль/л КОН) и кислотного гидролизом (0,5 моль/л НСIО₄) [14], а также липиды с помощью смеси (2:1) этанол:петролейный эфир [15]. Количественный анализ проводили колориметрическими и спектрометрическими методами по качественной реакции: общих липидов – с фосфованилиновым реагентом [16]; белка – с органическим красителем кумасси бриллиантовый голубой G250 [17]; РНК и ДНК – с дифениламином [18]; ТБК-АП – с тиобарбитуровой кислотой [13]. Активность ферментов регистрировали по стандартным методикам с использованием сукцината натрия и 2,3,5-трифенилтетразолхлорида – для определения СДГ [19], глюкозо-6-фосфата и резорцина – для определения ГФИ [20]; раствора Н₂О₂ и молибдата аммония – для определения каталазы [21].

При статистической обработке данных применяли критерий Краскела-Уоллиса.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Животные из зоны ВУРСа статистически значимо ($p < 0,05$) отличаются от контрольных зверьков практически по всем проанализированным параметрам (табл.). У мышей с импактной территории выше активность ГФИ, концентрация белка, общих липидов, РНК и ДНК, тогда как активность каталазы и СДГ у этих животных снижена. Продукция ПОЛ (ТБК-АП) статистически значимо выше в миокарде размножающихся сеголеток и имеет тенденцию к повышению у не созревших зверьков.

Комплекс изменений показателей у животных из зоны ВУРСа свидетельствует о единообразии сдвигов биохимических параметров миокарда у размножающихся и не созревших сеголеток и позволяет предположить развитие компенсаторной гипертрофии миокарда за счет роста численности клеток, их плоидности и белок-синтезирующей активности. Гипертрофия направлена на поддержание сократительной функции миокарда из-за низкой эффективности энергопродукции в клетках. Вероятная схема процесса приведена на рисунке. Ниже представлена последовательность событий, которая, по-нашему мнению, ведет к возникновению компенсаторной гипертрофии миокарда.

Концентрация общих липидов и отношение липиды/белок. У животных ВУРСа увеличена концентрация липидов (таблица), а также отношение липиды/белок в ткани (у незрелых зверьков: $p=0,009$; у размножающихся сеголеток: $p=0,065$). Такая ситуация может возникнуть при увеличении в клетках уровня лабильных (свободных) жиров, не входящих в состав липопротеидных комплексов внутриклеточных структур и накапливающихся в цитоплазме в виде липидных капель. В сердце при нормальной физиологии липиды не накапливаются в качестве "резервов", непрерывно расходуясь на синтез макроэргов и обеспечивая более чем на 70 % сократительную активность клеток [22]. Формирующаяся "избыточность" лабильных жиров является результатом ограничения их катаболизма и участия в энергообеспечении КМЦ.

Активность СДГ. Вследствие ограниченного притока продуктов катаболизма липидов в виде ацетил-S-CoA в цикл трикарбоновых кислот (ЦТК) снижается активность СДГ. Учитывая локализацию СДГ на внутренней мембране митохондрий, мы вправе связать наблюдаемое падение активности СДГ также и со снижением содержания митохондрий в саркоплазме КМЦ. Дeterгентный эффект на мембраны митохондрий могут оказывать накапливающиеся ацилы жирных кислот, неиспользованные в метаболических циклах [23]. Поскольку 90 % АТФ в нормально функционирующем сердце производится за счет аэробного (митохондриального) окисления [24], то наблюдаемое снижение липидного катаболизма и активности ключевого фермента ЦТК будет детерминировать состояние дефицита энергии в миокарде животных из зоны ВУРСа.

Концентрация ТБК-АП и активность каталазы. Несмотря на снижение уровня аэробного синтеза АТФ, участвующего в индукции ПОЛ [25], концентрация ТБК-АП не уменьшается и даже имеет тенденцию превышения контрольного уровня. К числу факторов, способствующих росту продукции ПОЛ, следует отнести снижение антиоксидантной (АО) защиты, в частности активности каталазы. Ей отводится ведущая роль в защите клеток и субклеточных структур от токсического действия H_2O_2 [26]. Формирующаяся в радиоактивной

среде обитания буферная емкость АО-систем, видимо, недостаточна для поддержания процессов ПОЛ на исходном уровне, что будет создавать предпосылки для прогресса дисбаланса ПОЛ-АО и, как следствие, развития свободно-радикального повреждения КМЦ и структурно-функциональных нарушений в митохондриях.

Активность ГФИ у животных ВУРСа повышена. Это свидетельствует об увеличении использования углеводов в энергетическом обмене. По-видимому, данное увеличение носит компенсаторный характер и связано со снижением катаболизма липидов.

Возрастание активности ГФИ на фоне более низкой, чем в контроле, активности СДГ свидетельствует об ограничении аэробной стадии окисления глюкозы в цикле ЦТК и возрастающей значимости анаэробного расщепления глюкозы в системе энергообеспечения миокарда. Подобная закономерность была отмечена ранее при анализе биоэнергетических процессов в миокарде полевок-экономок, обитающих в биогеоценозах с повышенным уровнем естественной радиоактивности [2].

Несмотря на низкую эффективность анаэробного гликолиза в производстве макроэргов (две молекулы АТФ, тогда как при аэробном окислении глюкозы – 38), именно этот метаболический цикл начинает играть ведущую роль в механизмах ответной реакции миокарда на действие внешних (абиотических и биотических) и внутренних стресс-факторов [27]. Это обусловлено возможностью гликолиза на этапах превращения Г6ф → фосфоглицерат быть поставщиком исходных субстратов для синтеза белков и нуклеотидов [28] и, как следствие, способствовать развитию компенсаторной гипертрофии миокарда, направленной на поддержание сократительной функции в условиях низкоэнергетического сдвига. Учитывая это обстоятельство, можно полагать, что активация ГФИ в миокарде животных ВУРСа явилась метаболической предпосылкой наблюдаемого увеличения в ткани концентрации белка и ДНК.

Концентрация ДНК, белка и отношение ДНК/белок. Гипертрофия миокарда млекопитающих может быть обусловлена как ростом численности клеток, так и увеличением размеров КМЦ за счет полиплоидии и/или возрастанием массы цитоплазматических структур [29–31].

У животных ВУРСа концентрация белка и ДНК в органе увеличивается, что указывает на рост численности клеток. Увеличение отношения ДНК/белок, характеризующее рост плоидности КМЦ [30], наблюдается в группировке размножающихся сеголеток ($p=0,049$) при слабо выраженных сдвигах у не созревших зверьков ($p=0,187$).

Считается, что способность клеток к реактивному синтезу ДНК и митотическому делению характерна только для раннего постнатального онтогенеза [29]. Для лабораторных мышей показано, что в период 3–4 недели после рождения устанавливаются окончательные значения в содержании двуядерных КМЦ (90 % от объема миоцитарной популяции) и полностью редуцируются завершённые митозы [31]. Календарный возраст изучаемых нами зверьков (1–4 месяца; точная диагностика невозможна) предполагает на момент анализа приобретение миокардом уже дефинитивного строения, т.е. превалирование в клеточной популяции высокодифференцированных постмитотических полиплоидных миоцитов. Поэтому, их более высокая численность и плоидность могли сформироваться на ВУРСе и ранее, как адаптивная модификация онтогенеза миокарда под влиянием неблагоприятного фактора среды обитания. Считается, что клетки миокарда с избыточным, чем в норме, геномом обладают большим резервом для последующего цитоплазматического роста и, следовательно, имеют преимущество в условиях патологических и физиологических нагрузок [29].

Концентрация РНК, отношение РНК/белок и РНК/ДНК. Более выраженное увеличение концентрации РНК, по сравнению с изменениями в содержании белка и ДНК, приводит к росту отношений, как РНК/белок (у незревших зверьков: $p=0,005$; у размножающихся сеголеток: $p=0,002$), так и РНК/ДНК ($p=0,020$ и $p=0,001$, соответственно). Это свидетельствует о более высокой плотности распределения молекул РНК в единице белковой массы и на матрице ДНК, что позволяет говорить о более высокой мощности развития белок-синтезирующей системы в КМЦ у животных ВУРСа. Считается, что уровень развития этой системы отражает степень функциональной зрелости миоцитов и дефи-

нитивности их внутриклеточной организации [31]. Поэтому, выявленные сдвиги следует считать проявлением у животных ВУРСа последующей во времени (после гиперплазии) стадии развития компенсаторной гипертрофии. Несмотря на рост концентрации белка, низкие активности СДГ и каталазы в ткани говорят об отсутствии синтеза этих ферментных белков, ответственных за окислительный синтез АТФ и нейтрализацию активированных кислородных метаболитов. Преимущественно в процессе гипертрофии увеличивается популяция ферментов гликолиза (в частности ГФИ) и, видимо, миофибриллярных (сократительных) белков.

Нарушение объемного соотношения миофибриллярного и митохондриального аппаратов, как результата несбалансированного синтеза структурных и ферментных белков, является отражением второй стадии компенсаторной гипертрофии миокарда, являющейся длительной (устойчивой) адаптацией к повреждающему воздействию неблагоприятных факторов [27, 32, 33]. При усилении патологических нагрузок может наступить и третья стадия декомпенсации, характеризующаяся снижением белок-синтезирующей способности КМЦ, нарушением обновления внутриклеточных структур и гибелью клеток [27, 34].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Для животных из зоны ВУРСа (не созревшие и размножающиеся сеголетки) характерен однонаправленный тип изменений биохимических показателей миокарда. Ограничение участия липидов в энергообеспечении кардиомиоцитов, избыточное накопление в них лабильных жиров, снижение уровня митохондриального окисления и антиоксидантной защиты, инициация ПОЛ отражают состояние дефицита энергии в миокарде и развитие функциональных дефектов. Механизмы их устранения проявляются в виде компенсаторной активации анаэробной гликолитической системы, увеличении численности клеток и их гипертрофии за счет плоидности генома и мощности развития белок-синтезирующего аппарата. Наблюдаемые эффекты соответствуют стадии длительной (устойчивой) адаптации миокарда к неблагоприятным факторам среды обитания, что не

исключает возможность перехода в стадию декомпенсации и развития патологии.

Работа выполнена при поддержке Программы ориентированных фундаментальных исследований между Институтами УрО РАН и госкорпорациями РФ (проект № 12-4-002-ЯЦ).

ЛИТЕРАТУРА

1. Устинова А.А., Рябинин В.Е. Метаболические изменения в клетках печени лесных мышей (*Apodemus sylvaticus* L.), обитающих на территории Восточно-Уральского радиоактивного следа // Радиационная биология. Радиэкология. – 2005. – Т. 45. – № 3. – С. 346–350.
2. Кудяшева А.Г., Шишкина Л.Н., Шевченко О.Г. и др. Биохимические механизмы радиационного поражения природных популяций мышевидных грызунов. – СПб: Наука, 1997. – 152 с.
3. Ярмоненко С.П. Радиобиология человека и животных. – М.: Высш. шк., 1977. – 368 с.
4. Casarett C. Radiation Histopathology. V. 1. – CRC Press Boca Raton, 1980. – 160 p.
5. Гризук А.И., Матюхина Т.Г., Коваль А.Н. и др. Характеристика митохондрий и ультраструктура миокарда крыс в условиях продолжительной инкорпорации радионуклидов ¹³⁷Cs // Авиакосмическая и экол. медицина. – 2002. – № 4. – С. 50–54.
6. Кузнецова Т.Г., Мальцева Н.Г., Туманов Э.В. Компенсаторно-приспособительные реакции миокарда на инкорпорированные радионуклиды и гипокинегию // Морфология. – 2009. – Т. 135. – № 5. – С. 46–49.
7. Буланова К.Я., Лобанок Л.М., Конопля Е.Ф. Радиация и Чернобыль: кардиомиоциты и регуляция их функций – Гомель: РНУП "Институт радиологии", 2008. – 130 с.
8. Позолотина В.Н., Молчанова И.В., Караваева Е.В. и др. Современное состояние наземных экосистем Восточно-Уральского радиоактивного следа: уровни загрязнения, биол. эффекты. – Екатеринбург: Гошицкий, 2008. – 204 с.
9. Климова Т.И., Глаголев А.Р., Гусева Е.И. Атлас геоэкологических карт на территорию зоны наблюдения ФГУП "ПО "Маяк". – М.: Озерск, 2007. – 106 с.
10. Модоров М.В. Опыт использования различных методов учета мелких млекопитающих, обитающих в зонах техногенных нарушений // Экология от южных гор до северных морей. – Екатеринбург: Гошицкий, 2010. – С. 119–122.
11. Стариченко В.И. Стронций-90 в костной ткани мелких млекопитающих на территории Восточно-Уральского радиоактивного следа (ВУРС) // Радиоактивность и радиоактивные элементы в среде обитания человека: материалы II междунар. конф. / Отв. ред. Л.И. Рихванов. – Томск: Тандем-Арт, 2004. – С. 576–579.
12. Колчева Н.Е. Стертость зубов как критерий возраста малой лесной мыши при анализе возрастной структуры популяции // Вестник Оренбургского государственного университета. – 2009. – Спецвыпуск. – С. 77–80.
13. Стальная И.Д., Гаришвили Т.Г. Метод определения малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты // Современные методы в биохимии / Под ред. В.Н. Ореховича. – М.: Медицина, 1977. – С. 66–68.
14. Трудолобова М.Г. Количественное определение РНК и ДНК в субклеточных фракциях клеток животных // Современные методы в биохимии / Под ред. В.Н. Ореховича. – М.: Медицина, 1977. – С. 313–316.
15. Асатиани В.С. Методы биохимических исследований. – М.: Медгиз, 1956. – 461 с.
16. Fletcher M.J. A colorimetric method for estimating serum triglycerides // J. Clin. Chim. Acta. – 1968. – V. 22. – No. 3. – P. 393–397.
17. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principal of protein-dye binding // Anal. Biochem. – 1976. – V. 72. – P. 248–254.
18. Токарева М.И., Селезнева И.С. Биохимия. В 3-х ч. Ч. 2. – Екатеринбург: ГОУ ВПО УГТУ–УПИ, 2005. – С. 23.
19. Kun E., Abood L.G. Colorimetric estimation of succinic dehydrogenase by tryphenyl tetrazoliumchloride // Science. – 1949. – V. 109. – No. 2824. – P. 144–146.
20. Коровкин Б.Ф. Ферменты в диагностике инфаркта миокарда. – Л.: Медицина, 1965. – 128 с.
21. Королук М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Г. и др. Метод определения активности каталазы // Лаборатор. дело. – 1988. – № 1. – С. 16–19.
22. Weiss R.G., Chacko V.P., Gerstenblith G. Fatty acid regulation of glucose metabolism in the

- intact beating rat heart assessed by carbon-13 NMR spectroscopy the critical role of dehydrogenase // *J. Mol. Cell. Cardiol.* – 1989. – V. 21. – P. 469–478.
23. Скулачев В.П. Биоэнергетика. Мембранные преобразователи энергии. – М.: Высш. шк., 1989. – 271 с.
24. Harris D.A., Das A.M. Control of mitochondrial ATP synthesis in the heart // *Biochem J.* – 1991. – V. 280. – P. 561–560.
25. Lenaz G. Role of mitochondria in oxidative stress and aging // *Biochem. Biophys. Acta.* – 1998. – V. 1366. – No. 1–2. – P. 53–67.
26. Eaton J.W. Catalases and peroxidases and glutathione and hydrogen peroxide: Mysteries of the bestiary // *J. Lab. Clin. Med.* – 1991. – V. 118. – No. 1. – P. 3–4.
27. Меерсон Ф.З. Адаптация, стресс и профилактика. – М.: Наука, 1981. – 278 с.
28. Guppy M., Greiner E., Brand K. The role of the Crabtree effect and an endogenous fuel in the energy metabolism of resting and proliferating thymocytes // *Eur. J. Biochem.* – 1993. – V. 212. – No. 1. – P. 95–99.
29. Бродский В.Я., Урываева И.В. Клеточная полиплоидия. Пролиферация и дифференцировка. – М.: Наука, 1981. – 217 с.
30. Анацкая О.В., Виноградов А.Е. Полиплоидия: значение для функции кардиомиоцитов и потенциала работы сердца // *Цитология.* – 2004. – Т. 46. – № 2. – С. 105–113.
31. Шпонька И.С. Гистогенетические процессы в развивающемся миокарде млекопитающих. – Днепропетровск: Изд-во "Пороги", 1996. – 228 с.
32. Yu Z., Zhang L. Effect of simulated weightlessness on ultrastructures and oxygen supply and consumption of myocardium in rats // *Space Med. Med. Eng.* – 1996. – V. 9. – № 4. – P. 261–266.
33. Лушникова Е.Л., Непомнящих Л.М., Мажбич Б.И. Количественный ультраструктурный анализ кардиомиоцитов крыс при длительном пребывании в условиях высокогорья // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* – 1994. – Т. 117. – № 6. – С. 661–665.
34. Непомнящих Л.М. Морфогенез важнейших патологических процессов в сердце. – Новосибирск: Наука СО, 1991. – 349 с.