

© Коллектив авторов, 2009  
УДК 612.017.2:612.766:611.127:599.323.4

*Н.Г. Мальцева, Т.Г. Кузнецова и Э.В. Туманов*

## КОМПЕНСАТОРНО-ПРИСПОСОБИТЕЛЬНЫЕ РЕАКЦИИ МИОКАРДА НА ИНКОРПОРИРОВАННЫЕ РАДИОНУКЛИДЫ И ГИПОКИНЕЗИЮ

Кафедра гистологии, цитологии и эмбриологии (зав. — канд. биол. наук Т.Г. Кузнецова) Гомельского государственного медицинского университета, Республика Беларусь

Цель исследования — морфофункциональная оценка миокарда крыс при изолированном и совместном воздействии гипокинезии и инкорпорации  $^{137}\text{Cs}$ . В работе использовали гистологические, морфометрические, цитофотометрические, радиометрические, статистические методы исследования. Приведены гистологические характеристики миокарда крыс при исследуемых воздействиях, показаны различия в механизмах компенсаторного ответа. Установлено, что инкорпорированные радионуклиды вызывают раннюю гибель клеток, тормозящуюся с увеличением срока воздействия, структурные нарушения и гипертрофию оставшихся кардиомиоцитов на фоне сохранения общей массы сердца. Показано, что при сочетанном влиянии радионуклидов цезия и гипокинезии происходит усиление негативных воздействий двух факторов, что в целом вызывает наиболее глубокие деструктивные нарушения в миокарде.

**Ключевые слова:** миокард, инкорпорированные радионуклиды, гипокинезия, морфометрия, адаптация.

Несмотря на многочисленные исследования, проблема длительного воздействия на сердечно-сосудистую систему малых и сверхмалых доз инкорпорированных радионуклидов остается дискуссионной. Накоплены данные, которые противоречат широко распространенным представлениям о высокой радиорезистентности миокарда [2]. Неоднозначна также и оценка реакций миокарда в ответ на сочетанное воздействие инкорпорированных радионуклидов и различных стрессорных факторов. Эта оценка представляет интерес не только с научной, но и с прикладной точки зрения, поскольку она лежит в основе разработки путей профилактики и коррекции сердечно-сосудистых нарушений у населения, проживающего на территории, пострадавшей от аварии на Чернобыльской атомной станции.

Цель настоящей работы — исследование структурных перестроек сердечной мышцы как при изолированном действии на нее инкорпорированных радионуклидов, так и их влиянии в сочетании с гипокинезией.

**Материал и методы.** Исследование проведено на беспородных половозрелых самцах белых крыс, массой 240–280 г, которые были разделены на 3 подопытные группы каждая по 20 особей. 1-я группа (гипокинезия). Крысы на 7 и 30 сут были помещены в специальные клетки-пеналы, моделирующие гипокинезию. Рацион обычный. 2-я группа (инкорпорация  $^{137}\text{Cs}$ ). В течение 7 и 30 сут крысы получали радиоактивные корма (с удельной радиоактивностью  $^{137}\text{Cs}$ , равной 560 кБк/кг). Уровень накопления  $^{137}\text{Cs}$  составил 1300 Бк/кг и 3400 Бк/кг соответственно. 3-я группа (инкорпорация  $^{137}\text{Cs}$  и гипокинезия). Животные 7 и 30 сут находились в клетках-пеналах, моделирующих гипокинезию, и одновременно получали радиоактивные корма. В начале и в конце опытов определяли массу тела крыс. Для проведения эксперимента был выбран  $^{137}\text{Cs}$  как основной дозообразующий радионуклид на постчернобыльском пространстве. Имея

значительное сходство по основным физико-химическим параметрам с калием,  $^{137}\text{Cs}$  способен активно накапливаться в различных компартментах кардиомиоцитов (КМЦ), вызывая значительные морфофункциональные и метаболические изменения клеток сократительного миокарда [10]. Крыс контрольной группы ( $n=10$ ) содержали в стандартных условиях вивария на обычном рационе.

Животных декапитировали на 7-е и 30-е сутки исследования. В работе соблюдали требования Хельсинской декларации по гуманному обращению с животными.

Дозиметрический контроль животных проводили с помощью сцинтилляционного гамма-спектрометра LP 4900 В (Nokia, Финляндия). Для гистологических исследований сердце фиксировали в 10% растворе формальдегида и изготавливали серийные парафиновые срезы (32–35 срезов толщиной 4 мкм) левого желудочка. Срезы окрашивали гематоксилином–эозином и галлоцианином–пикрофуксином. Морфометрические исследования проводили под световым микроскопом Nikon Eclipse E200 (Nikon, Япония) с использованием программно-аппаратурного комплекса «Хромосома», оснащенного компьютерной программой для морфометрического анализа «Морфотест» (Белоруссия). В каждом микропрепарате были сняты не менее четырех полей зрения (ув. 1000, тестовая площадь 414 720 пкс).

Подсчитывали количество ядер КМЦ на единице площади и определяли их оптическую плотность. Удельную площадь соединительной ткани, удельную площадь, занятую КМЦ и их ядрами, оценивали с помощью компьютерной программы в полуавтоматическом режиме. Условную общую численность ядер КМЦ определяли как произведение среднего числа ядер на тестовой площади и массы сердца. Рассчитывали также среднюю площадь одного КМЦ и его ядра. Все площади выражали в условных единицах (пикселях). Полученные результаты обрабатывали при помощи пакета программ «STATISTICA» 6.0.

**Результаты исследования.** Результаты определения весовых показателей и морфометрического анализа представлены в таблице.

У животных 1-й группы отмечено уменьшение средней массы тела на 15% (на 7-е сутки) и на 25%

(на 30-е сутки) по сравнению с данными в начале опыта. Абсолютная масса сердца снижалась по сравнению с контролем соответственно на 7 и 14%, а относительная масса сердца на этом фоне, напротив, возрастала на 9 и 14%.

На 7-е сутки гипокинезии у крыс происходило увеличение удельной площади соединительнотканного компонента на 70%, связанное со значительным интерстициальным отеком миокарда. Наблюдалась гипотрофия КМЦ со снижением их площади на 11% по сравнению с контролем. Гипотрофия КМЦ сопровождалась уменьшением средней площади ядер КМЦ в 1,7 раза и повышением их оптической плотности в 1,36 раза. Отмечалось перераспределение хроматина по всему объему нуклеоплазмы, который приобретал вид неравномерных крупных глыбок.

К 30-м суткам иммобилизации отечность интерстиция уменьшалась. Объем КМЦ восстанавливался, вплоть до выравнивания с показателями контрольной группы. Повышение оптической плотности отмечалось только у 58% ядер КМЦ, оставшаяся ядерная популяция характеризовалась мелкодисперсным распределением хроматина и снижением оптической плотности ядер в 1,4 раза по сравнению с контролем (в таблице показатели оптической плотности указаны для двух ядерных популяций). На 30-сутки обездвиживания было

зарегистрировано снижение условной общей численности ядер КМЦ на 15%.

Масса тела у животных 2-й группы, получавших радиоактивные корма, не изменялась. Незначительное уменьшение абсолютной массы сердца (на 5% по сравнению с контролем) отмечено лишь у крыс с уровнем накопления  $^{137}\text{Cs}$  3400 Бк/кг.

На 7-е сутки эксперимента зарегистрирован интерстициальный отек, сопровождавшийся расширением сосудов микроциркуляторного русла. В отличие от состояния при гипокинезии средняя площадь КМЦ увеличилась на 44% по сравнению с контролем. Гипертрофия клеток сопровождалась пропорциональным увеличением размеров их ядра. Ядра просветлялись, их оптическая плотность снижалась приблизительно в 1,3 раза по сравнению с таковой в контроле.

С возрастанием дозы накопления до 3400 Бк/кг интерстициальный отек и расширение сосудов микроциркуляторного русла становились менее выраженными. Средний размер КМЦ и их ядер несколько снижался, но по сравнению с контролем оставался высоким. Для гипертрофированных ядер КМЦ было характерно мелкодисперсное распределение хроматина, местами с формированием периферийных крупных глыбок. В некоторых КМЦ в околоядерных участках цитоплазмы

**Весовые показатели и параметры структурных компонентов миокарда ( $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$ )**

| Исследованные параметры                 | Контроль    | Гипокинезия  |              | Инкорпорация $^{137}\text{Cs}$ |                | Инкорпорация $^{137}\text{Cs}$ и гипокинезия |              |
|-----------------------------------------|-------------|--------------|--------------|--------------------------------|----------------|----------------------------------------------|--------------|
|                                         |             | 7 сут        | 30 сут       | 7 сут                          | 30 сут         | 7 сут                                        | 30 сут       |
| Масса тела, г:                          |             |              |              |                                |                |                                              |              |
| в начале опыта                          | 272±10      | 274±10       | 269±9        | 271±11                         | 270±13         | 270±9                                        | 268±9        |
| в конце опыта                           | 280±13      | 234±8**      | 207±8**      | 270±9                          | 265±10         | 250±11**                                     | 200±7**      |
| Абсолютная масса сердца, мг             | 1140±43     | 1060±47*     | 980±42*      | 1120±44                        | 1080±45*       | 1080±52*                                     | 990±46*      |
| Относительная масса сердца, мг/г        | 4,16±0,19   | 4,52±0,20*   | 4,73±0,18*   | 4,15±0,18                      | 4,08±0,15      | 4,32±0,20                                    | 4,95±0,23*   |
| Условная общая численность ядер КМЦ     | 11 217±480  | 11 003±463   | 9506±361*    | 7392±354*                      | 7560±324*      | 9612±440*                                    | 9108±395*    |
| Площадь КМЦ, пкс                        | 38 809±1834 | 34 557±1769* | 39 234±1756  | 55 863±1974*                   | 52 463±1856*   | 42 863±1945*                                 | 42 221±1967* |
| Площадь ядра КМЦ, пкс                   | 1515±65     | 874±34*      | 902±41*      | 2221±72*                       | 1921±69*       | 842±29*                                      | 928±35*      |
| Оптическая плотность ядер КМЦ, отн. ед. | 0,124±0,003 | 0,170±0,005  | 0,090±0,003* | 0,0946±0,0019*                 | 0,0989±0,0020* | 0,142±0,005*                                 | 0,102±0,009* |
| Площадь стромы, пкс                     | 32 836±1658 | 56 019±2542* | 34 153±1139  | 46 025±804*                    | 43 280±595*    | 33 240±1042                                  | 26 290±1045* |

Примечание. КМЦ — кардиомиоцит.

\* Различия по сравнению с контролем значимы при  $P < 0,05$ .

\*\* Различия по сравнению с данными в начале опыта значимы при  $P < 0,05$ .

отмечено отсутствие органелл. У части КМЦ ядра имели причудливую форму, были вытеснены за пределы клетки и свободно располагались в межклеточном пространстве.

Условная общая численность ядер КМЦ и показатели их оптической плотности у крыс с неодинаковым уровнем накопления радионуклидов практически не различались.

Анализ стромальных компонентов показал, что степень коллагенизации стромы миокарда увеличивалась в соответствии со степенью накопления радионуклидов.

У крыс 3-й группы, подвергшихся сочетанному действию стрессорных факторов, уровень накопления  $^{137}\text{Cs}$  не отличался от такового у 2-й группы.

При сочетанном стрессе динамика весовых показателей была близка к изменениям при гипокинезии. Гипертрофия КМЦ (на 9–10%) происходила на фоне уменьшения общей площади, занятой ядрами, и повышения их оптической плотности. Средняя площадь ядер КМЦ уменьшилась в 1,8 раза на 7-е сутки и в 1,6 раза — на 30-е сутки эксперимента. Морфологические изменения ядерного аппарата были сходны с таковыми у животных 1-й группы. Показатели оптической плотности на 30-е сутки эксперимента распределены бимодально (см. таблицу). Нижняя граница этого показателя в 46% случаев уменьшилась в 1,2 раза, а верхняя — у 54% КМЦ увеличилась в 1,5 раза по сравнению с контрольными значениями. Условная общая численность ядер КМЦ к 7-м суткам снизилась на 14% и продолжала снижаться. К 30-м суткам этот показатель уменьшился еще на 6%.

Обсуждение полученных данных. Проведенный анализ показал, что у всех крыс, подвергнутых иммобилизации, отмечались снижение абсолютной и увеличение относительной массы сердца. Инкорпорация  $^{137}\text{Cs}$  в малых и сверхмалых дозах не вызывала атрофии сердечной мышцы.

Снижение площади КМЦ в ранние сроки гипокинезии было пропорционально уменьшению абсолютной массы сердца и не сопровождалось потерей клеток. Известно, что выключение при гипокинезии скелетного сократительного звена приводит к отягощению насосной функции сердца и как следствие — к увеличению функциональной нагрузки на КМЦ, происходящей на фоне относительной недостаточности кровоснабжения миокарда [1, 8].

Результатом развивающейся гипоксии, как известно, является снижение интенсивности окислительного фосфорилирования с последующей депрессией генетического аппарата КМЦ, что, в конечном итоге, приводит к ослаблению процессов пластического синтеза и прогрессирующей гипотрофии клеток сократительного миокарда [3].

Увеличение площади КМЦ до контрольных значений, снижение оптической плотности их ядер, а также появление мелкодисперсного хроматина, отмеченные нами на 30-е сутки эксперимента, свидетельствует о частичной стабилизации клеточной системы сердца и повышении в ней уровня синтетических процессов.

Можно предположить, что произошедшая к этому моменту элиминация наименее устойчивой части мышечных клеток и уменьшение интерстициального отека привели к снижению метаболической конкуренции в популяции КМЦ и улучшению их трофики.

Самые значительные потери популяции КМЦ наблюдались на ранней стадии воздействия инкорпорированного  $^{137}\text{Cs}$ , но с увеличением накопленной дозы уровень клеточной гибели резко снижался.

Отмеченное для некоторых ядер перераспределение хроматина по периферии нуклеолеммы с формированием крупных глыбок, исчезновение органелл из околоядерной цитоплазмы, вытеснение ядер за пределы клетки совпадают с изменениями, характерными для заключительных фаз программируемой клеточной смерти [6, 7]. Такие изменения дают основания предположить, что причиной снижения численности популяции КМЦ в группах крыс, получавших  $^{137}\text{Cs}$ , может являться апоптоз, индуцированный действием радиации.

Известно, что вызванное ионизирующим излучением повреждение эндотелиоцитов, в частности, их мембранного компонента, приводит к высвобождению большого количества оксида азота и как следствие — к изменениям, отмеченным в проведенном исследовании, — дилатации, полнокровию и увеличению проницаемости сосудов микроциркуляторного русла [4]. Это приводит к тому, что в результате действия на КМЦ инкорпорированного  $^{137}\text{Cs}$  происходит сочетанное оксидантное воздействие как изнутри клетки, так и со стороны сосудистого русла. Высвобождение проапоптотических факторов, происходящее в результате деградации клеточных мембран и связанных с ними ферментных ансамблей, приводит к элиминации значительной части КМЦ уже при дозе накопления  $^{137}\text{Cs}$ , равной 1300 Бк/кг.

Дальнейшее возрастание накопленной дозы до 3400 Бк/кг не приводило к увеличению числа элиминированных КМЦ. Можно предположить, что нарастание процессов апоптоза тормозится модулями ферментативных МАР-киназ. Высокая степень накопления  $^{137}\text{Cs}$  вызывает увеличение количества высвобождаемых из мембран лигандов, чей избыток временно блокирует действие МАР-киназных комплексов и тормозит процесс апоптоза [5, 9].

Полученные результаты позволяют предположить, что увеличение размеров КМЦ имеет

различные причины, что обусловлено их физиологической гетерогенностью. В одной части КМЦ повышение средних размеров может происходить вследствие внутриклеточного отека, вызванного повреждением мембран и нарушением проницаемости клеток, а в другой части КМЦ — в результате их компенсаторной гипертрофии.

При совместном влиянии стрессорных факторов их воздействия накладываются друг на друга, усиливая функциональную нагрузку на сердце. Глубина морфологических изменений сердечной мышцы, с одной стороны, была вызвана влиянием гипокинезии. С другой стороны — свое негативное воздействие оказывал радиоактивный цезий, поглощенная доза которого постепенно увеличивалась. Зарегистрированный факт, что при сочетанном стрессе в течение 7 сут клеточная гибель была меньше, чем при воздействии только радиации, можно объяснить тем, что происходящая при гипокинезии недостаточность поступления кислорода тормозит развитие оксидантного стресса. Однако с увеличением срока воздействия радиации степень необратимых деструктивных нарушений нарастает, и выраженность апоптотической гибели КМЦ продолжает увеличиваться. О необратимом характере повреждений значительного числа КМЦ свидетельствует наблюдавшаяся очаговая фрагментация, цитоллиз и наличие очаговых участков пересокращения (субсегментарных контрактур).

Выявленное увеличение размеров КМЦ было обусловлено, в первую очередь, внутриклеточным отеком, происходившим из-за нарушения целостности биологических мембран. Уменьшение размеров и уплотнение ядер КМЦ, отмеченное на разных этапах сочетанного стресса, свидетельствует об угнетении процессов белкового синтеза в клетках сократительного миокарда.

Снижение численности и функциональной активности большого числа КМЦ приводит к нарушению в миокарде стромально-мышечных взаимосвязей. Выявленное увеличение количества коллагеновых волокон в межклеточном веществе может свидетельствовать об активизации фибробластов. Данные процессы наиболее выражены при сочетанном воздействии радиации и гипокинезии, что морфологически проявляется формированием диффузного кардиосклероза.

Таким образом, описанные структурные изменения являются проявлением компенсаторно-приспособительной реакции миокарда на воздействие инкорпорированного цезия и гипокинезии. Реализация адаптационного механизма происходит по-разному при гипокинезии и инкорпорации радиоцезия. Совокупное воздействие стрессорных факторов истощает резервные возможности клеток, вызывая необратимые структурные измене-

ния, которые создают предпосылки для инициации или усугубления сердечно-сосудистой патологии.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Володько Я.Т. Ультраструктура внутримышечных насосов. Минск, Наука и техника, 1991.
2. Грицук А.И., Вернер А.И., Матюхина Т.Г. и др. Влияние инкорпорированных радионуклидов цезия на ультраструктуру и процессы тканевого дыхания митохондрий кардиомиоцитов. Весці Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. Сер. медыкабіялаг. навук, 2002, № 2, с. 63–70.
3. Коваленко Е.А. и Гуровский Н.Н. Гипокинезия. М., Медицина, 1980.
4. Лобанок Л.М. и Суворова Т.А. Роль NO-опосредованных механизмов в пострadiационных изменениях нейрогуморальной регуляции функции сердца. Радиационная биология. Радиоэкология, 2004, т. 44, № 3, с. 312–318.
5. Мазурик В.К. Роль регуляторных сетей ответа клеток на повреждения в формировании радиационных эффектов. Радиационная биология. Радиоэкология, 2005, т. 45, № 1, с. 26–45.
6. Фролов В.А., Дроздова Г.А., Мустяца В.Ф. и др. О возможном механизме обратного развития гипертрофии сердца. Бюл. эксп. биол., 2001, т. 132, № 7, с. 42–44.
7. Цыпленкова В.Г. и Бескровнова Н.Н. Апоптоз. Арх. пат., 1996, т. 58, № 5, с. 71–74.
8. Чигарев А.В. и Михасев Г.И. Биомеханика: учебное пособие. Минск, Технопринт, 2004.
9. Эйдус Л.Х. Еще о действии малых доз излучения (по поводу статьи А.В. Никольского и А.Н. Котерова «Радиоадаптационный ответ клеток млекопитающих»). Мед. радиол. и радиац. безопасность, 1999, № 6, с. 19–22.
10. Howell R.W., Neti P.V.S.V., Pinto M. et al. Challenges and progress in predicting biological responses to incorporated radioactivity. Radiation Protection Dosimetry, 2006, v. 122, № 1–4, p. 521–527.

Поступила в редакцию 02.09.08  
Получена после доработки 05.02.09

#### MYOCARDIUM COMPENSATORY AND ADAPTIVE REACTIONS TO INCORPORATED RADIONUCLIDES AND HYPOKINESIA

*N.G. Mal'tseva, T.G. Kuznetsova and E.V. Tumanov*

This investigation was aimed at the morpho-functional evaluation of rat myocardium after isolated or combined effect of hypokinesia and  $^{137}\text{Cs}$  incorporation. Histological, morphometric, cytophotometric, radiometric and statistical methods were used. The histological characteristics of rat myocardium after exposure to both factors are presented, and the differences in the mechanisms of the compensatory response are shown. The incorporated radionuclides were found to cause early cellular death, which became attenuated with the extension of exposure period. The remaining cardiomyocytes underwent structural changes and hypertrophy, while the total heart mass remained unchanged. The combined action of radionuclides and hypokinesia resulted in the aggravation of the negative effects of both factors causing more profound destructive changes in the myocardium.

**Key words:** *myocardium, radionuclide incorporation, hypokinesia, morphometry, adaptation.*

Department of Histology, Cytology and Embryology, Gomel State Medical University, Belarus