

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2020

Клинова С.В.¹, Проценко Ю.Л.², Лукин О.Н.², Балакин А.А.², Никитина Л.В.², Герцен О.П.², Набиев С.Р.², Минигалиева И.А.¹, Привалова Л.И.¹, Сутункова М.П.¹

Изменения сократительной способности миокарда крыс, связанные с субхронической свинцовой интоксикацией

¹ФБУН «Екатеринбургский медицинский научный центр профилактики и охраны здоровья рабочих промпредприятий» Роспотребнадзора, 620014, Екатеринбург;

²ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» УрО РАН, 620049, Екатеринбург

Введение. Высокая вероятность связи развития сердечно-сосудистых заболеваний и профессиональной или экологически обусловленной свинцовой экспозиции, а также широкое распространение этого металла и особенности его интоксикации делают необходимым проведение экспериментальных исследований кардиотоксичности свинца. **Материал и методы.** После повторных внутрибрюшинных введений сублетальных доз ацетата свинца по 3 раза в неделю в течение 5 нед аутобредным самцам крыс сформировалась умеренно выраженная субхроническая свинцовая интоксикация, проявившаяся рядом характерных признаков. Влияние этой интоксикации на сократимость миокарда исследовано путём анализа механической активности изолированных препаратов трабекул и папиллярных мышц правого желудочка в изотоническом и физиологическом режимах нагрузки. Сократительная функция миокарда была также исследована на молекулярном уровне при измерении скорости движения реконструированных тонких филаментов по миозину.

Результаты. Было обнаружено, что свинцовая интоксикация привела в папиллярных мышцах к снижению (по сравнению с мышечными препаратами крыс контрольной группы) максимальных скоростей изотонического укорочения для всех постнагрузок, что согласуется с уменьшением скорости скольжения филаментов при анализе подвижности *in vitro*. В этом же типе мышц у крыс со свинцовой интоксикацией также обнаружены выраженные изменения большинства основных характеристик постнагрузочных циклов сокращение-расслабление, но в трабекулах эти изменения оказались менее выраженными. Описанные изменения были в той или иной мере ослаблены у крыс, подвергавшихся аналогичной свинцовой экспозиции на фоне приёма Са-содержащего биопротектора. Величина работы, производимой обоими мышечными препаратами во всём диапазоне постнагрузок, при свинцовой интоксикации не изменилась, что свидетельствует об адаптации к осуществлению адекватной механической работы, несмотря на развившиеся нарушения контрактильности.

Заключение. 1. При субхронической свинцовой интоксикации выявлены нарушения сократительной способности миокарда крыс, более выраженные для папиллярных мышц, чем для трабекул, и сопоставимые с ними изменения сократительных белков. 2. На фоне приёма Са-содержащего препарата эти изменения были ослаблены.

К л ю ч е в ы е с л о в а : токсичность свинца; сократимость миокарда *in vitro*; *in vitro* подвижная система; биопротекторные эффекты кальция.

Для цитирования: Клинова С.В., Проценко Ю.Л., Лукин О.Н., Балакин А.А., Никитина Л.В., Герцен О.П., Набиев С.Р., Минигалиева И.А., Привалова Л.И., Сутункова М.П. Изменения сократительной способности миокарда крыс, связанные с субхронической свинцовой интоксикацией. *Гигиена и санитария*. 2020; 99 (2): 193-199. DOI: <http://dx.doi.org/10.33029/0016-9900-2020-99-2-193-199>

Для корреспонденции: Клинова Светлана Владиславовна, научный сотрудник отдела токсикологии и биопротекции ФБУН «Екатеринбургского медицинского научного центра профилактики и охраны здоровья рабочих промпредприятий» Роспотребнадзора, 620014, Екатеринбург. E-mail: klinova.svetlana@gmail.com

Благодарность. Авторы признательны Борису Александровичу Кацнельсону за ценные консультации при обсуждении статьи.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Работа была частично выполнена в рамках тем ИИФ УрО РАН № AAA-A18-118020590031-8 и № AAAA-A18-118020590135-3.

Участие авторов: концепция и дизайн исследования – Проценко Ю.Л., Минигалиева И.А., Привалова Л.И., Гурвич В.Б., Сутункова М.П.; сбор и обработка материала – Клинова С.В., Лукин О.Н., Балакин А.А., Герцен О.П., Набиев С.Р.; статистическая обработка – Балакин А.А., Набиев С.Р.; подготовка рисунков – Лукин О.Н.; написание текста – Клинова С.В., Никитина Л.В., Проценко Ю.Л.; редактирование – Минигалиева И.А., Привалова Л.И., Кацнельсон Л.Б.; утверждение окончательного варианта статьи – Клинова С.В., Проценко Ю.Л., Никитина Л.В., Привалова Л.И., Кацнельсон Л.Б.

Поступила: 29.11.18

Принята к печати: 12.12.19

Опубликована: 23.03.2020

Klinova S.V.¹, Protsenko Y.L.², Lookin O.N.², Balakin A.A.², Nikitina L.V.², Gerzen O.P.², Nabiev S.R.², Minigalieva I.A.¹, Privalova L.I.¹, Sutunkova M.P.¹

Changes of myocardium contractility associated with a subchronic lead intoxication in rats

¹Yekaterinburg Medical Research Center for Prophylaxis and Health Protection in Industrial Workers, Yekaterinburg, 620014, Russian Federation;

²Institute of Immunology and Physiology of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Yekaterinburg, 620049, Russian Federation

Introduction. There is a high chance of a link between cardiovascular conditions and occupational or environmental exposure to lead. Taking into account the peculiarities of lead intoxication and the metal common occurrence it appeared to necessarily prove further experimental research of lead cardiotoxicity.

Material and methods. After repeated intraperitoneal administration of sublethal doses of lead acetate to outbred male rats 3 times a week for 5 weeks, there was obtained the moderately pronounced subchronic lead intoxication manifested by some characteristic features. Cardiotoxic effects on myocardial contractility were studied by the analysis of the mechanical activity of isolated preparations of right ventricular trabeculae and papillary muscles contracting in isotonic and physiological modes of loading. Myocardial contractile function was also studied at the molecular level by measuring the sliding velocity of reconstructed thin filaments over myosin.

Results. In papillary muscles lead intoxication led to a decrease in the maximal rate of isotonic shortening for all afterloads and a decrease in the thin filament sliding velocity in the *in vitro* motility assay. The same type of muscle from lead-exposed rats displayed marked changes in most of the main characteristics of afterload contraction-relaxation cycles, but in trabeculae, these changes were less pronounced. The reported changes were attenuated to some extent in rats similarly exposed to lead while being treated with a Ca-containing bio protector. The amount of work produced by both muscle preparations was unchanged under lead intoxication over the entire range of afterloads, which is an evidence of adaptation to the production of adequate mechanical work despite resulting contractility disturbances.

Conclusions. 1. Subchronic lead intoxication was shown to cause contractile dysfunction of rat myocardium. In papillary muscles the alterations were observed more than in trabeculae. The changes in contractile proteins corresponded with those seen in myocardium structures. 2. The reported changes were attenuated to some extent in rats being treated with a Ca-containing bio protector.

Key words: lead toxicity; myocardium *in vitro* contractility; *in vitro* motility assay; bioprotective effects of calcium.

For citation: Klinova S.V., Protsenko Y.L., Lookin O.N., Balakin A.A., Nikitina L.V., Gerzen O.P., Nabiev S.R., Minigalieva I.A., Privalova L.I., Sutunkova M.P. Changes of myocardium contractility associated with a subchronic lead intoxication in rats. *Gigiena i Sanitariya (Hygiene and Sanitation, Russian journal)*. 2020; 99 (2): 193-199. (In Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.33029/0016-9900-2020-99-2-193-199>

For correspondence: Svetlana V. Klinova, research associate of the Department of Toxicology and Biological Prophylaxis of the «Yekaterinburg Medical Research Center for Prophylaxis and Health Protection in Industrial Workers», Yekaterinburg, 620014, Russian Federation. E-mail: klinova.svetlana@gmail.com

Information about authors:

Klinova S.V., <http://orcid.org/0000-0002-0927-4062>; Protsenko Y.L., <http://orcid.org/0000-0002-4693-244X>; Lookin O.N., <http://orcid.org/0000-0001-9544-1885>; Balakin A.A., <http://orcid.org/0000-0002-7712-6686>; Nikitina L.V., <http://orcid.org/0000-0002-7174-2357>; Gerzen O.P., <http://orcid.org/0000-0003-3853-1571>; Nabiev S.R., <http://orcid.org/0000-0001-9095-6775>; Minigalieva I.A., <http://orcid.org/0000-0002-0097-7845>; Privalova L.I., <http://orcid.org/0000-0002-1442-6737>; Sutunkova M.P., <http://orcid.org/0000-0002-1743-7642>;

Gratitude. The authors thank Boris A. Katsnelson for valuable comments throughout the discussion process.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgment. The work was partly carried out within the framework of the IIF UrB RAS themes No AAA-A18-118020590031-8 and AAAA-A18-118020590135-3.

Contribution: The concept and design of the study – Protsenko Yu.L., Minigalieva I.A., Privalova L.I., Sutunkova M.P.; Collection and processing of material – Klinova S.V., Lookin O.N., Balakin A.A., Gerzen O.P., Nabiev S.R.; Statistical processing – Balakin A.A., Nabiev S.R.; Preparation of drawings – Lookin O.N.; Writing the text – Klinova S.V., Nikitina L.V., Protsenko Yu.L.; Editing – Minigalieva I.A., Privalova L.I.; Approval of the final manuscript – Klinova S.V., Protsenko Y.L., Nikitina L.V., Privalova L.I.

Received: November 29, 2019

Accepted: December 12, 2019

Published: March 23, 2020

Введение

Особая опасность свинца для здоровья экспонированного населения обуславливается двумя важными обстоятельствами. Первое состоит в том, что свинец даже в следовых количествах не является эссенциальным микроэлементом и мог бы быть охарактеризован как абсолютный ксенобиотик. Вторая особенность хронической свинцовой интоксикации – полиорганность (например, [1], [2] и др.), что делает её особо неблагоприятной.

Проблема высоко вероятной, но до сих пор недостаточно доказанной связи сердечно-сосудистой заболеваемости населения с профессиональной и экологически обусловленной свинцовой экспозицией [3–7] является особенно актуальной в связи с широкой распространённостью свинцовой экспозиции для населения как России, так и других стран мира.

В исследованиях на животных были выявлены негативные вторичные эффекты свинцовой экспозиции, связанные с нефротоксичностью свинца, приводящей к развитию артериальной гипертензии [8], и непосредственно с повышением артериального давления [9–12].

В качестве первичных эффектов было показано эффективное замещение кальция ионами свинца, изменяющее многие свойства кальмодулина [13] и активирующее миофибрилярную АТФ-азу [14].

Неоднозначные данные получены исследователями на многоклеточных препаратах миокарда крысы. Так, при остром воздействии свинца на организм одной группой исследователей было обнаружено снижение сократимости миокарда в правом желудочке [15], а другой – рост сократимости миокарда в левом желудочке [16], объясняемый в первом случае уменьшением поступления кальция через сарколемму и снижением АТФ-азной активности миозина [15], а во втором – повышением активно-

сти натрий-калиевого насоса и АТФ-азной активности миозина [16]. При подостром воздействии низких концентраций свинца не было обнаружено изменений изометрической силы сокращённых изолированных папиллярных мышц левого желудочка крысы [17], как и при субхроническом воздействии, хотя последнее вызвало транс-сарколеммальный приток кальция и уменьшение количества желудочковой SERCA-2 [18].

Таким образом, экспериментальные данные, полученные на миокарде крыс, немногочисленны и противоречивы. В этих работах представлены недостаточно, если вообще имеются, данные о выраженности свинцовой интоксикации на системно-органном уровне, что очень важно для оценки кардиотоксичности свинца в токсикологической перспективе. В связи с этим целью данной работы явился анализ изменений сократимости миокарда крыс при оценке субхронической свинцовой интоксикации на органо-системном уровне.

Материал и методы

Эксперимент проводили на 4-месячных аутобредных белых крысах-самцах собственного разведения с исходной массой тела около 300 г, распределённых случайным образом на 4 группы (Контроль, Pb, Pb+Ca, Ca) по 10 животных в каждой группе. Субхроническая интоксикация моделировалась путём повторных внутривенных инъекций раствора ацетата свинца 3 раза в неделю (всего 15 введений) при однократной дозе 12,5 мг/кг веса по свинцу, то есть около 1/10 ДЛ50 (контрольные животные получали тот же объём стерильной дистиллированной воды). Половина крыс в течение периода экспозиции получала препарат кальция и витамина D₃, смешанный с кормом (около 150 мг Ca на крысу ежедневно). Исследования проводили в соответствии с «International guiding principles for biomedical research

involving animals» (1985) и были одобрены локальным этическим комитетом ФБУН ЕМНЦ ПОЗРПП Роспотребнадзора.

Полное описание методов оценки субхронической свинцовой интоксикации приведено в статье [19, 20].

Исследование сократимости изолированных препаратов миокарда. Подробное описание условий работы с изолированными препаратами миокарда и описание изометрического режима работы изложены нами ранее [19, 20].

В этой статье остановимся на описании изотонического и физиологического режимов работы сердечных мышц. В программе управления задавали величину постнагрузки в долях от величины силы, развиваемой препаратом в изометрическом режиме. Компьютер отслеживал величину развиваемой изометрической силы с дискретом 100 мкс и при достижении установленной экспериментатором величины постнагрузки задавал укорочение мышцы, строго соблюдая постоянство величины силы, равной заданной величине постнагрузки, формируя плато силы. Это плато поддерживалось и в фазу расслабления, когда мышцу удлиняли под данной постнагрузкой вплоть до возвращения препарата на исходную длину. После этого мышца расслаблялась в изометрическом режиме на исходной длине. Модификацией изотонического режима является физиологический режим, который отражает фазы наполнения в ходе сердечного цикла: развитие изоволюмического напряжения стенки желудочка, фаза изгнания крови, изоволюмическое расслабление, диастолическое наполнение желудочка кровью из предсердия. Отличия физиологического режима от изотонического проявляются в фазу расслабления миокарда, в то время как до начала этой фазы, точно так же как в изотоническом режиме, поддерживается плато силы, равной постнагрузке. Однако в момент достижения максимального укорочения мышцы ее длина фиксируется, и она расслабляется на этой меньшей длине в изометрическом режиме, до тех пор, пока изометрическая сила не падает до уровня, равного исходной преднагрузке. После этого мышцу растягивают сервомотором с постоянной скоростью вплоть до момента достижения исходной диастолической длины.

Для сопоставления полученных результатов при обработке записей для препаратов миокарда сердец крыс исследуемых групп:

- величину силы препаратов нормировали на площадь поперечного сечения, а амплитуду укорочения нормировали на величину длины препарата при заданной преднагрузке (в нашем случае 95% от максимальной длины (95% L_{MAX}));
- вычисляли значение максимальной скорости укорочения, нормировали на длину препарата и по серии регистраций для разных уровней постнагрузки строили кривую зависимости «сила-скорость»;
- регистрация механической активности препаратов в физиологическом режиме нагрузок позволила построить по траектории силы и укорочения, аналогов параметрам давление и объём, фазовый портрет, аналог петли «давление-объём» [21, 22];
- оценку величины работы, производимой мышцами в физиологическом режиме смены последовательности нагрузок, производили по величине площади петли «напряжение-длина» при разных постнагрузках [23, 24]. Для сопоставления данных разных групп величину силы нормировали на площадь поперечного сечения, а длины нормировали на длину L_{MAX} для каждого препарата. Тогда размерность работы ($Work = tension \cdot dL / L_{MAX}$) получалась как $(mH / mm^2) \cdot (mm / mm)$.

Для оценки влияния свинца на процессы кальциевой регуляции сокращения и расслабления сердечной мышцы мы применяли широко распространённый индекс грузозависимого расслабления ($ИГЗР$), в котором используется отношение t_a/t_i , где t_a – продолжительность изотонической фазы сокращения под данной постнагрузкой, а t_i – продолжительность такой части изометрического сокращения, где сила остаётся выше, чем эта постнагрузка [25–28].

Все эксперименты выполнены на длине препарата 95% L_{MAX} , на которой миокард выполняет максимальную работу [29]. В соответствии с общепринятым подходом [29] вклад пассивной составляющей силы в совершаемую работу не учитывался.

Оценка механических характеристик актин-миозинового взаимодействия *in vitro*. С точки зрения теории скользящих нитей, выдвинутой Huxley и Niedergerke в 1954 г., укорочение мышц определяется движением актиновых нитей относительно миозиновых, поэтому моделью изучения такого движения и, в частности, его характерных скоростей является *in vitro* подвижная система. В наших экспериментах флуоресцентно-окрашенный реконструированный тонкий филамент (состоящий из актина, тропонина и тропомиозина) в присутствии АТФ и кальция в растворе (10^{-6} М) двигался по поверхности, покрытой миозином. Сравнивалась скорость скользящего филамента по миозинам, выделенным из правых желудочков сердец контрольной группы и при свинцовой интоксикации.

Актин был получен из скелетной мышцы кролика в соответствии со стандартной процедурой [30]. Сердечный тропонин выделяли из левого желудочка бычьего сердца [31]. Рекомбинантный тропомиозин получали, как описано ранее [32]. Использование сократительных и регуляторных белков из различных видов животных, которые объединяются в подвижной системе, является широко распространённой практикой [33, 34]. Тонкие нити были реконструированы из актина, тропонина и тропомиозина смешением этих белков [35], и их соотношение в тонких нитях проверялось в 10% SDS-ПААГ [36].

Анализ в *in vitro* подвижной системы проводили, как описано ранее [35]. Флуоресцентные меченые тонкие нити визуализировались с помощью инвертированного эпифлуоресцентного микроскопа Axiovert 200, оснащённого объективом 100×/1,45 Oil alpha Plan-Fluar (Carl Zeiss) и камерой EMCCD iXon-897BV (Andor Technology). Обычно в каждой ячейке потока регистрировались 10 полей по 30 с. Данные анализировались с использованием программного обеспечения GMimPro [37]. Были измерены скорости для > 100 отдельных филаментов при определении средней скорости и её стандартной ошибки для каждой крысы.

Статистическая обработка. Для статистической обработки результатов пользовались аппаратом многофакторного анализа ANOVA из программы «Statistica 10». В представленных результатах указаны средние значения и величина ошибки среднего (среднее $\pm m$). Для множественных сравнений использовали непараметрический U -критерий Манна–Уитни или для парного сравнения t -критерий Стьюдента или критерий Уилкоксона, различия считались статистически достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты

Показатели свинцовой интоксикации на органо-системном уровне. Количественные значения всех показателей состояния организма были представлены и подробно обсуждены нами ранее [19, 20], поэтому здесь не приводятся. Вкратце отметим, что в группах «Pb» и «Pb+Ca» существенная часть этих показателей отличалась от контрольных величин и в совокупности свидетельствовала о выраженной субхронической интоксикации. Помимо задержки прироста массы тела мы наблюдали более или менее специфичные показатели развития свинцовой интоксикации, такие как:

- нарушения порфиринового обмена: многократное повышение концентрации δ -аминолевулиновой кислоты и копропорфиринов в моче;
- изменения крови: снижение показателя гематокрита, числа и среднего объёма эритроцитов, но резкое повышение доли ретикулоцитов, выраженный лимфоцитарный лейкоцитоз, повышение числа тромбоцитов и показателя тромбоцита;
- атерогенные изменения липидного зеркала крови: резкое и значимое снижение липопротеидов высокой плотности (при почти не изменённом уровне липопротеидов низкой плотности) и статистически значимое увеличение уровня триглицеридов;
- гепатотоксичность: увеличение массы печени, снижение содержания общего белка, альбумина и глобулинов (индекс А/Г не изменён) и резкое повышение уровня аспартатаминотрансферазы в сыворотке крови (удвоение коэффициента де Ритиса);

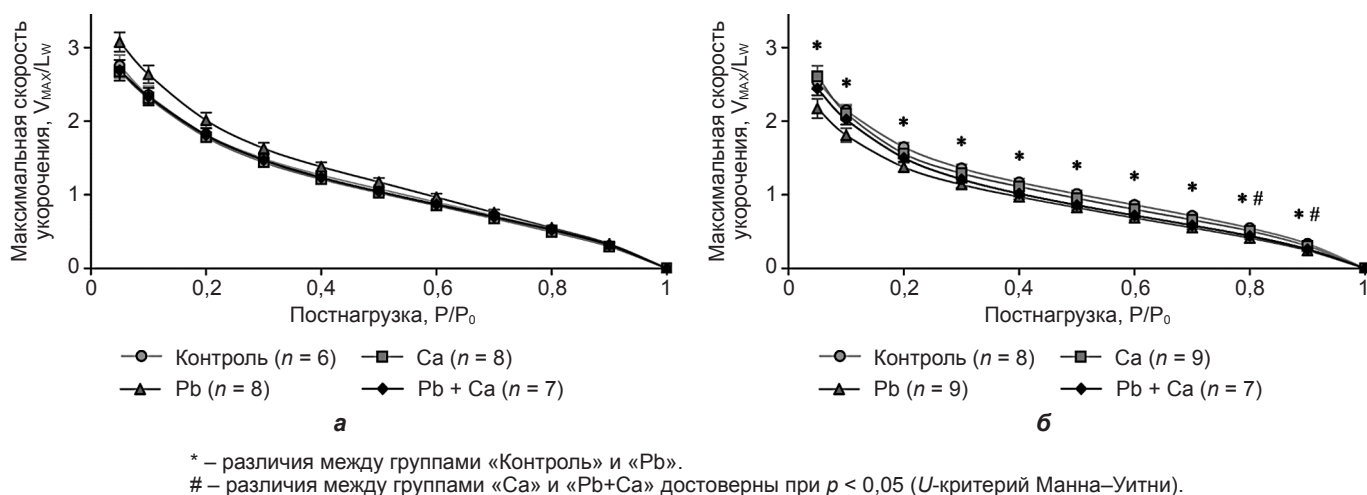


Рис. 1. Кривые связи максимальной скорости изотонического укорочения, нормированной на длину мышцы (V_{MAX}/L_W ; L_W – длина мышцы), с величиной постнагрузки (P/P_0 – величины постнагрузок пронормировали на величину пика силы изометрического сокращения): *а* – для препаратов трабекул; *б* – для папиллярных мышц правого желудочка крыс всех исследованных групп. Диастолическая (рабочая) длина мышц соответствует 95% L_{MAX} , частота стимуляции 1 Гц, температура раствора 30 °С.

- косвенные признаки наличия умеренной гипертрофии сердца: увеличение его массы в расчёте на 100 г массы тела, увеличение амплитуды комплекса QRS.

Судя по многим из этих показателей, развитие свинцовой интоксикации на системно-организменном уровне несколько ослаблено на фоне приёма Ca-содержащей добавки.

Сократимость препаратов миокарда. Анализ сократимости препаратов трабекул и папиллярных мышц из правого желудочка сердца крыс в изометрическом режиме сокращений был выполнен нами ранее [19, 20]. Вкратце укажем результаты:

- наряду с падением скорости развития силы изометрических сокращений стабилизация амплитуды силы обеспечивается за счёт увеличения времени достижения максимального значения силы и уменьшения скорости расслабления, особенно на малых длинах, благодаря равной развиваемой изометрической силе быстрых V1 и медленных V3 изомиозинов крысы [38] при найденном нами повышенном содержании последних при свинцовой экспозиции;
- максимальная величина скорости развития силы препаратов папиллярных мышц группы крыс со свинцовой интоксикацией («Pb») меньше, чем у всех папиллярных мышц крыс остальных групп, и не зависит от длины;
- на фоне приёма препарата кальция описанные сдвиги были ослаблены.

В данной статье мы подробнее остановимся на анализе поведения мышц в изотоническом и физиологическом режимах.

Амплитуда и скорость укорочения препарата при данной постнагрузке зависят от величины приложенной нагрузки, что отражает кривая зависимости максимальной скорости укорочения от величины постнагрузки (связь «сила-скорость»; рис. 1).

Для препаратов трабекул правого желудочка крыс всех обследованных групп не было обнаружено статистически значимых различий в характеристиках кривых связи «сила-скорость» (рис. 1, *а*). В то же время между препаратами папиллярных мышц групп «Pb» и «Контроль» выявлены значимые различия (а именно уменьшение скорости в группе «Pb») во всём диапазоне постнагрузок (рис. 1, *б*).

Экстраполяция кривых до пересечения с осью ординат даёт оценку величины скорости укорочения при отсутствии нагрузки, которая коррелирует с величиной АТФ-азной активности миозина: чем выше АТФ-азная активность миозина, тем выше скорость ненагруженного укорочения [39]. Максимальная величина скорости укорочения папиллярных мышц составила по группам: «Контроль» – $3,05 \pm 0,15 V_{MAX}/L_W$, «Pb» – $2,69 \pm 0,19 V_{MAX}/L_W$, «Ca» – $3,36 \pm 0,23 V_{MAX}/L_W$, «Pb+Ca» – $3,026 \pm 0,13 V_{MAX}/L_W$.

Для уточнения такой косвенной оценки скорости укорочения при отсутствии нагрузки мы дополнительно провели эксперименты на белках, экстрагированных из правых желудочков тех же сердец, для групп «Контроль» и «Pb». Скорость ненагруженного движения регулируемого тонкого филамента по миозину контрольной группы составила $2 \pm 0,25$ мкм/с ($n = 8$), по миозину группы, подвергнутой свинцовой интоксикации, – $1,5 \pm 0,2$ мкм/с ($n = 8$). Таким образом, скорость ненагруженного скольжения в группе «Pb» падает на 25% по сравнению с контролем, что качественно подтверждает косвенные оценки различия скоростей ненагруженного укорочения, полученные на папиллярных мышцах (падение на 12%), а количественно даже превышает эти различия.

Важным аспектом исследования была оценка влияния субхронической свинцовой интоксикации на работу, выполняемую изолированными препаратами пристеночных трабекул и папиллярных мышц правого желудочка крыс четырёх исследуемых групп. В качестве примера показаны петли «напряжение-длина» трабекул и папиллярных мышц при постнагрузке, равной $0,5 P_0$ (рис. 2).

Расчёты зависимостей величины произведённой работы препаратами трабекул и папиллярных мышц от величины постнагрузки не выявили достоверных различий между значениями этих зависимостей, имеющих экстремальный характер.

Обращает на себя внимание тот факт, что сохранение величины работы (то есть площади петель, образуемых фазовыми траекториями, на рис. 2) при свинцовой интоксикации в препаратах трабекул происходит за счёт увеличения амплитуды укорочения при некотором падении развиваемого напряжения по сравнению с контролем. Противоположная тенденция отмечается в препаратах папиллярных мышц (см. рис. 2, *а, б*). Таким образом, оба типа сердечных мышц продемонстрировали адаптацию к свинцовой интоксикации в отношении способности к совершению механической работы, которая в целостном организме имеет наибольшее гемодинамическое значение.

В изотоническом режиме нагрузок индекс грузозависимого расслабления (ИГЗР) характеризует влияние величины постнагрузки на длительность изотонической фазы цикла «сокращение-расслабление» миокарда, определяемую влиянием динамического изменения длин кардиомиоцитов на кальциевую активацию сокращений. Чем выше (ближе к 1,0) ИГЗР, тем менее грузозависимым является изотонический цикл «сокращение-расслабление». Для сердечной мышцы в норме характерными являются ИГЗР $< 1,0$ для постнагрузок меньше, чем $0,5 P_0$, причём чем меньше постнагрузка, тем меньше значение ИГЗР.

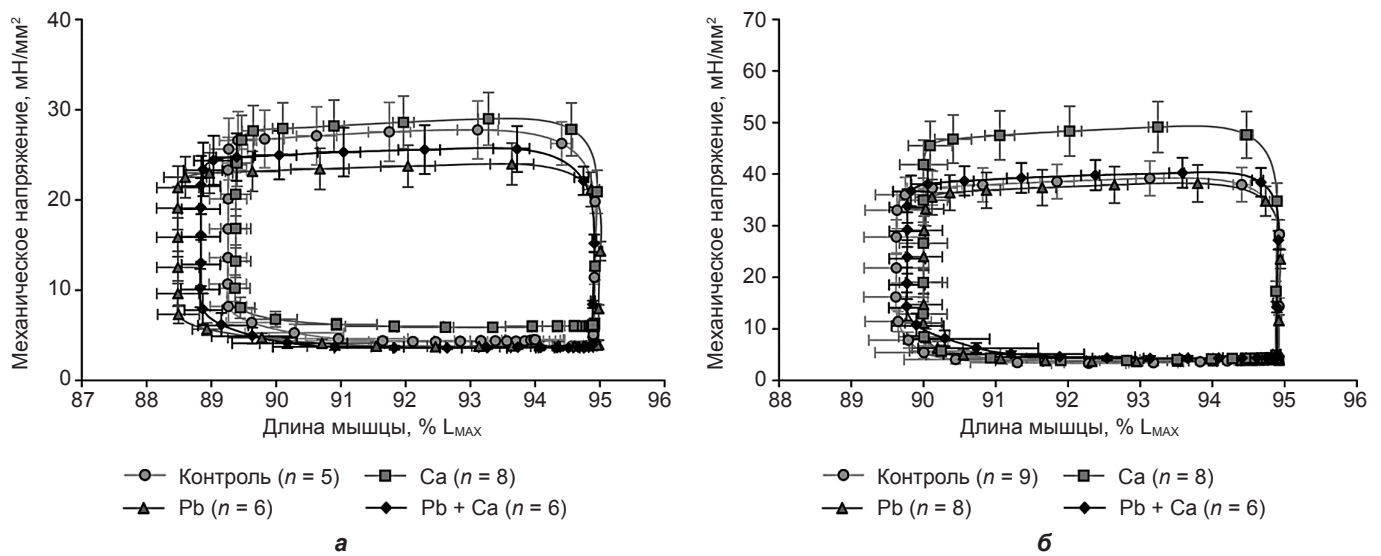
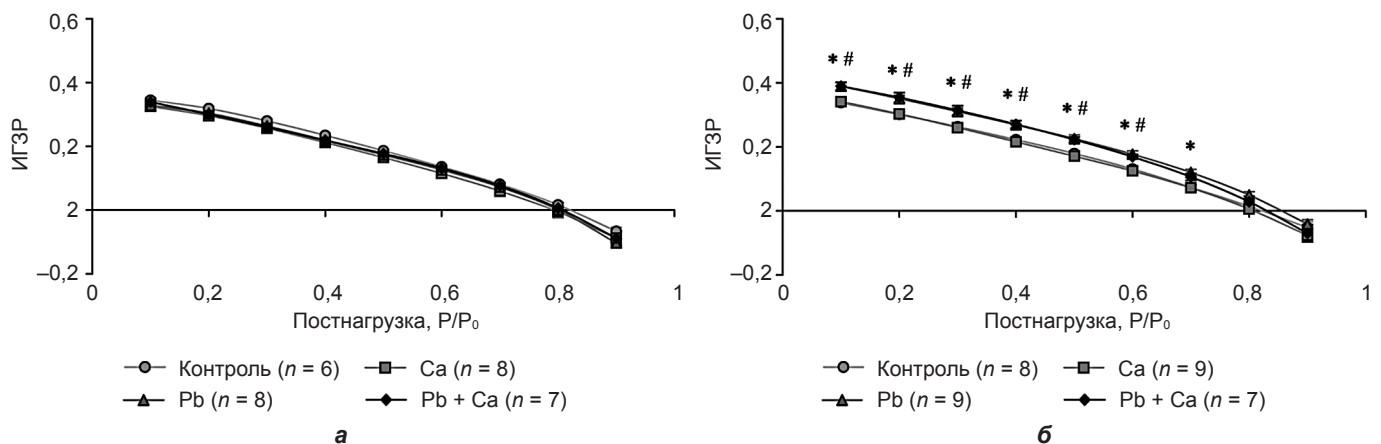


Рис. 2. Суперпозиция петель «механическое напряжение – длина», полученных при задании физиологического режима сокращения: а – для препаратов трабекул; б – для папиллярных мышц правого желудочка крыс всех исследованных групп. Напряжение выражено в абсолютных величинах (мН/мм²), изменение длины мышцы – в % от L_{MAX}, диастолическая (рабочая) длина мышц соответствует 95% L_{MAX}, частота стимуляции 1 Гц, температура раствора 30 °С.



* – различия между группами «Контроль» и «Pb».

– различия между группами «Ca» и «Pb+Ca» достоверны при $p < 0,05$ (U -критерий Манна–Уитни).

Рис. 3. Кривые связи величины индекса грузозависимого расслабления с величиной постнагрузки (P/P_0): а – для препаратов трабекул; б – для папиллярных мышц правого желудочка крыс всех исследованных групп. Диастолическая (рабочая) длина мышц соответствует 95% L_{MAX}, частота стимуляции 1 Гц, температура раствора 30 °С.

При расчёте ИГЗР по серии изотонических сокращений изолированных препаратов трабекул установлено отсутствие влияния ацетата свинца изолированно («Pb») и в присутствии Ca-содержащего препарата («Pb+Ca») на зависимость величины этого индекса от постнагрузки по сравнению с миокардом контрольных животных (рис. 3, а). В частности, увеличение длительности времени изометрического сокращения трабекул в группе «Pb» сопровождалось пропорциональным увеличением длительности фазы плато изотонического сокращения в этой группе.

В отличие от миокарда трабекул (см. рис. 3, а) найдено статистически значимое увеличение величины ИГЗР препаратов папиллярных мышц в группе крыс с субхронической свинцовой интоксикацией относительно контрольной группы в диапазоне постнагрузок 0,1–0,7 P₀ (рис. 3, б). Так, например, при 0,5 P₀ средняя величина ИГЗР составила в группе «Контроль» $0,179 \pm 0,008$, а в группе «Pb» – $0,225 \pm 0,012$.

Обсуждение

Полученные различия в скоростях ненагруженного движения регулируемого тонкого филамента по миозину (падение на 25% в группе «Pb» по сравнению с контролем) связано с вышеупомянутым сдвигом соотношения изоформ сердечного миозина при интоксикации свинцом в сторону изомиозинов V3 [19, 20], более медленных, чем V1, как в отношении скорости движения, так и более низкой АТФ-азной активности [38]. Эти данные могут свидетельствовать в пользу возможного развития умеренной гипертрофии миокарда в группе «Pb». Поскольку для проведения гель-электрофореза и для экспериментов на *in vitro* подвижной системе использовался весь правый желудочек, то возможное наличие некоторых региональных различий по содержанию изомиозинов и их скоростным характеристикам нивелировалось. В то же время наши данные, полученные на мышечных препаратах, свидетельствуют в пользу наличия региональной

неоднородности: изменение силоскоростных характеристик в препаратах группы «Рв» по сравнению с контролем слабо выражены для трабекул и гораздо более выражены для папиллярных мышц.

Увеличение ИГЗР свидетельствует об ослаблении грузозависимости папиллярных мышц из крыс группы «Рв» по сравнению с нормой. Механизмы, ответственные за грузозависимые изотонических циклов, а также факторы, влияющие на ослабление грузозависимости, обсуждались во многих работах [25–28, 40]. Спуская детали, следует подчеркнуть, что эффект грузозависимости в целом определяется наличием механо-кальциевых обратных связей в кардиомиоцитах: изменение механических условий сокращения (груз) и его механических характеристик (длина, скорость укорочения) существенно изменяют кальциевую активацию сократительного цикла. Эта механо-кальциевая обратная связь является главным адаптивным механизмом, позволяющим мышце подстраиваться под динамически меняющиеся условия сократительного цикла. Таким образом, уменьшение грузозависимости (увеличение ИГЗР) свидетельствует об ослаблении указанной обратной связи и, значит, частичной потере адаптивных возможностей папиллярной мышцей, подвергнутой свинцовой интоксикации.

В отличие от работ, проведённых другими исследовательскими группами [15–18], нами были выполнены измерения не только в изометрическом, но и в изотоническом и наиболее близком к реальному физиологическому режимам сокращения изолированных многоклеточных препаратов миокарда крыс. Это позволило выполнить оценку как скоростно-силовых характеристик трабекул и папиллярных мышц, так и производимой ими работы. Благодаря комплексному исследованию сократимости препаратов миокарда крыс при субхронической свинцовой экспозиции удалось обнаружить изменения, связанные не только с силой (анализ зависимости параметров изометрических сокращений от преднагрузки [19, 20]), но и с укорочением (при различных постнагрузках, то есть аналогично процессам, происходящим *in vivo*). Важным преимуществом нашего исследования является анализ сократимости многоклеточных препаратов миокарда и

характеристик миозинов из правого желудочка одних и тех же животных.

К ограничениям данного исследования можно отнести условия работы изолированных препаратов (частота стимуляции 1 Гц, температура раствора 30 °С), являющиеся не совсем физиологичными для миокарда крысы, но необходимыми для регистрации столь длительных измерений.

Заключение

При выраженной свинцовой интоксикации крыс впервые показаны следующие изменения миокарда крыс.

1. Региональная неоднородность влияния свинца на миокард крысы (более выраженные изменения для папиллярных мышц и менее выраженные – для трабекул).

2. Сдвиг в экспрессии изомиозина V3 при субхронической свинцовой интоксикации крыс хорошо коррелирует с уменьшением как скорости движения тонкого филамента, так и скоростей изометрических и изотонических укорочений изолированных мышц при сохранении значения силы изометрических сокращений изолированных мышц.

3. Не обнаружено изменений эффективности контрактного аппарата для обоих типов мышц во всех группах экспериментальных животных (величины работы, производимой мышцами во всём диапазоне постнагрузок), но при динамически меняющихся условиях сократительного цикла адаптивные способности папиллярных мышц снижены (увеличение индекса грузозависимости).

4. Показано умеренное кардиопротекторное действие на миокард крыс Са-содержащей добавки к рациону, которое проявлялось как в изометрических, так и в изотонических режимах сокращения мышечных препаратов.

Полученные результаты говорят о необходимости проведения дальнейших исследований с целью уточнения механизмов действия кардиотоксичных металлов и разработки способов ослабления их действия на сердечно-сосудистую систему.

Литература (пп. 1, 3–19, 21–40 см. References)

2. Привалова Л.И. Свинец и его соединения. В кн.: *Филов В.А., Мусичук Ю.И., Москвин А.В., Ивин Б.А., ред. Вредные вещества в окружающей среде. Элементы I–IV групп периодической системы и их неорганические соединения*. СПб.: Профессионал; 2005: 400–27.
20. Кацнельсон Б.А., Проценко Ю.Л., Клинова С.В., Лукин О.Н., Балакин А.А., Никитина Л.В. и соавт. Влияние субхронической свинцовой интоксикации на сократимость миокарда крысы. *Токсикологический вестник*. 2018; 5 (152): 22–31.

References

1. Inorganic lead. World Health Organization, International Programme on Chemical Safety. Environmental Health Criteria 165. Geneva: WHO; 1995. URL: <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc165.htm>. (accessed 31 July 2013)
2. Privalova L.I. Lead and its compounds. In: *Filov V.A., Musyichuk Yu.I., Moskvina A.V., Ivin B.A., eds. Harmful substances in the environment. Elements of groups I–IV of the periodic table and their inorganic compounds [Filov V.A., Musyichuk Yu.I., Moskvina A.V., Ivin B.A., red. Vrednyye veshchestva v okruzhayushchey srede. Elementy I–IV grupp periodicheskoy sistemy i ikh neorganicheskiye soyedineniya]*. Saint Petersburg: Professional; 2005: 400–27. (in Russian)
3. Navas-Acien A., Guallar E., Silbergeld E.K., Rothenberg S.J. Lead exposure and cardiovascular disease – a systematic review. *Environ Health Perspect*. 2007; 115: 472–82.
4. Fiorim J., Ribeiro R.F., Silveira E.A., Padilha A.S., Vescovi M.V., de Jesus H.C. et al. Low-level lead exposure increases systolic arterial pressure and endothelium-derived vasodilator factors in rat aortas. *PLoS One*. 2011; 6 (2): e17117.
5. Safety evaluation of certain food additives and contaminants. Geneva: WHO; 2011. 64 p.
6. Gidlow D.A. Lead toxicity. *Occup Med*. 2015; 65 (5): 348–56.
7. Yang W.Y., Zhang Z.Y., Thijs L., Cauwenberghs N., Wei F.F., Jacobs L. et al. Left Ventricular Structure and Function in Relation to Environmental Exposure to Lead and Cadmium. *J Am Heart Assoc*. 2017; 6 (2): e004692.
8. Staessen J.A., Lauwerys R.R., Buchet J.P., Bulpitt C.J., Rondia D., Vanrentghem Y. et al. Impairment of renal function with increasing blood lead concentrations in the general population. The Cadmibel Study Group. *N Engl J Med*. 1992; 327: 151–6.
9. Carmignani M., Volpe A.R., Boscolo P., Qiao N., Di Gioacchino M., Grilli A. et al. Catcholamine and nitric oxide systems as targets of chronic lead exposure in inducing selective functional impairment. *Life Sci*. 2000; 68: 401–15.
10. Simões M.R., Ribeiro Júnior R.F., Vescovi M.V., de Jesus H.C., Padilha A.S., Stefanon I. et al. Acute lead exposure increases arterial pressure: role of the renin-angiotensin system. *PLoS One*. 2011; 6: e18730.
11. Vaziri N.D., Norris K. Lipid disorders and their relevance to outcomes in chronic kidney disease. *Blood Purif*. 2011; 31 (1–3): 189–96.
12. Silveira E.A., Siman F.D., de Oliveira F.T., Vescovi M.V., Furieri L.B., Lizarido J.H. et al. Low-dose chronic lead exposure increases systolic arterial pressure and vascular reactivity of rat aortas. *Free Radic Biol Med*. 2014; 67: 366–76.
13. Chao S.H., Suzuki Y., Zysk J.R., Cheung W.Y. Activation of calmodulin by various metal cations as a function of ionic radius. *Mol Pharmacol*. 1984; 26 (1): 75–82.
14. Chao S.H., Bu C.-H., Cheung W.Y. Activation of troponin C by Cd²⁺ and Pb²⁺. *Arch Toxicol*. 1990; 64: 490–6.
15. Vassallo D.V., Lebarc E.C., Moreira C.M., Wiggers G.A., Stefanon I. Lead reduces tension development and the myosin ATPase activity of the rat right ventricular myocardium. *Braz J Med Biol Res*. 2008; 41: 789–95.
16. Fiorelli M., Furieri L.B., Simões M.R., Ribeiro R.F., Meira E.F., Fernandes A.A. et al. Acute exposure to lead increases myocardial contractility independent of hypertension development. *Braz J Med Biol Res*. 2013; 46: 178–85.
17. Silva M.A., de Oliveira T.F., Almenara C.C., Broseghini-Filho G.B., Vassallo D.V., Padilha A.S. et al. Exposure to a Low Lead Concentration Impairs Contractile Machinery in Rat Cardiac Muscle. *Biol Trace Elem Res*. 2015; 167: 280–7.

18. Fioresi M., Simões M.R., Furiere L.B., Broseghini-Filho G.B., Vescovi M.V., Stefanon I. et al. Chronic lead exposure increases blood pressure and myocardial contractility in rats. *PLoS One*. 2014; 9 (5): e96900.
19. Protsenko Y.L., Katsnelson B.A., Klinova S.V., Lookin O.N., Balakin A.A., Nikitina L.V. et al. Effects of subchronic lead intoxication of rats on the myocardium contractility. *Food Chem Toxicol*. 2018; 120: 378–89.
20. Katsnelson B.A., Protsenko Yu.L., Klinova S.V., Lookin O.N., Balakin A.A., Nikitina L.V. et al. Influence of subchronic lead intoxication of rats on the myocardium contractility. *Toksikologicheskii vestnik [Toxicological Review]*. 2018; 5 (152): 22–31. (in Russian)
21. Hisano R., Cooper G. Correlation of force-length area with oxygen consumption in ferret papillary muscle. *Circ Res*. 1987; 61: 318–28.
22. Mast F., Elzinga G. Heat released during relaxation equals force length area in isometric contractions of rabbit papillary muscle. *Circ Res*. 1990; 67: 893–901.
23. Loiselle D.S., Crampin E.J., Niederer S.A., Smith N.P., Barclay C.J. Energetic consequences of mechanical loads. *Progr Biophys Mol Biol*. 2008; 97: 348–66.
24. Han J-Ch., Taberner A.J., Nielsen P.M.F., Loiselle D.S. Interventricular comparison of the energetics of contraction of trabeculae carneae isolated from the rat heart. *J Physiol*. 2013; 591 (3): 701–17.
25. Lecarpentier Y.C., Waldenstroem A., CLerque M., Chemla D., Oliviero P., Martin J.L. et al. Major alteration in relaxation during cardiac hypertrophy induced by aortic stenosis in guinea pig. *Circ Res*. 1987; 61: 107–16.
26. Housmans P.R., Murat I. Comparative effects of halothane, enflurane and isoflurane at equipotent anesthetic concentrations on isolated ventricular myocardium of the ferret. II. Relaxation. *Anesthesiol*. 1988; 69: 464–71.
27. Dobrunz L.E., Berman M.R. Effect of temperature on Ca^{2+} -dependent and mechanical modulators of relaxation in mammalian myocardium. *J Mol Cell Cardiol*. 1994; 26: 243–50.
28. Katsnelson L.B., Markhasin V.S., Khazieva N.S. Mathematical modeling of the effect of the sarcoplasmic reticulum calcium pump function on load dependent myocardial relaxation. *Gen Physiol Biophys*. 2000; 19 (2): 137–70.
29. Layland J., Young I.S., Altringham J.D. The length dependence of work production in rat papillary muscles in vitro. *J Experiment Biol*. 1995; 198: 2491–9.
30. Pardee J.D., Spudich J.A. Purification of muscle actin. *Meth Enzymol*. 1982; 85: 164–79.
31. Potter J.D. Preparation of troponin and its subunits. *Meth Enzymol*. 1982; 85: 241–63.
32. Matyushenko A.M., Artemova N.V., Shchepkin D.V., Kopylova G.V., Ber-shitsky S.Y., Tsaturyan A.K. et al. Structural and functional effects of two stabilizing substitutions, D137L and G126R, in the middle part of α -tropo-myosin molecule. *FEBS J*. 2014; 281: 2004–16.
33. Alpert N.R., Brosseau C., Federico A., Krenz M., Robbins J., Warshaw D.M. Molecular mechanics of mouse cardiac myosin isoforms. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2002; 283: 1446–54.
34. Shaffer J.F., Wong P., Bezold K.L., Harris S.P. Functional differences between the N-terminal domains of mouse and human myosin binding protein-C. *J Biomed Biotechnol*. 2010; 789798: 1–9.
35. Nikitina L.V., Kopylova G.V., Shchepkin D.V., Katsnelson L.B. Study of the interaction between rabbit cardiac contractile and regulatory proteins. An in vitro motility assay. *Biochem (Mosc)*. 2008; 73: 178–84.
36. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970; 227: 680–5.
37. Mashanov G.I., Molloy J.E. Automatic detection of single fluorophores in livecells. *Biophys J*. 2007; 92 (6): 2199–211.
38. Malmqvist U.P., Aronshtam A., Lowey S. Cardiac Myosin Isoforms from Different Species Have Unique Enzymatic and Mechanical Properties. *Biochemistry*. 2004; 43: 15058–65.
39. Cappelli V., Bottinelli R., Poggese C., Moggio R., Rcgiani C. Shortening Velocity and Myosin and Myofibrillar ATPase Activity Related to Myosin Isoenzyme Composition During Postnatal Development in Rat Myocardium. *Circ Res*. 1989; 65: 446–57.
40. Katsnelson L.B., Markhasin V.S. Mathematical modeling of relations between the kinetics of free intracellular calcium and mechanical function of myocardium. *J Mol Cell Cardiol*. 1996; 28 (3): 475–86.