

УДК 616.1:504.75

ПОКАЗАТЕЛИ СТАРЕНИЯ СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТОЙ СИСТЕМЫ КАК КРИТЕРИИ ОТДАЛЕННЫХ ПОСЛЕДСТВИЙ ЗАГРЯЗНЕНИЯ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ

© 2005 В.Н. Власов¹

Исследованы физиологические, биохимические и морфометрические показатели сердечно-сосудистой системы лабораторных животных (белых крыс) различного возраста. Выявлена взаимосвязь физиологических, биохимических и морфометрических показателей от возраста животного. Получены математические зависимости величины показателя от возраста. Показана возможность определения "биологического возраста" животного по величине показателя. Результаты создают основу ускоренного нормирования химических веществ, обладающих геронтогенным действием на сердечно-сосудистую систему.

Введение

Одним из основных направлений прогресса в различных областях экономической деятельности в развитых и развивающихся странах является широкое внедрение химической технологии. Особенно больших масштабов оно достигло в последнее время. Значительно расширилось насыщение сферы быта химическими продуктами, изделиями из полимерных материалов. Рост числа и общей массы химических соединений, которые могут оказывать влияние на здоровье человека непосредственно из производственной или окружающей среды, а также опосредованно через повреждение экологических систем, предопределяет высокую опасность создавшейся ситуации.

Результаты многочисленных клинико-гигиенических и эпидемиолого-гигиенических исследований свидетельствуют, что современная структура сердечно-сосудистой заболеваемости, являющейся основной причиной инвалидизации и смертности населения, обусловлена комплексом экзогенных влияний. Среди этих факторов химическим соединениям отводится роль факторов, способствующих развитию общих патологических процессов, лежащих в основе заболеваний сердца и сосудов. Поэтому особенно актуальна

¹Власов Валерий Николаевич (office@tltsu.ru), кафедра медико-биологических дисциплин Тольяттинского государственного университета, 445667, Россия, г. Тольятти, Самарская обл., ул. Белорусская, 14.

разработка прогностических критериев опасности развития отдаленных последствий химических воздействий на сердце и сосуды в эксперименте на животных, что позволяет своевременно внедрить в практику здравоохранения гигиенические регламенты, гарантирующие безопасность [1, 2].

В связи с отсутствием у большинства лабораторных животных (в первую очередь грызунов) нозологических форм сердечно-сосудистой патологии (характерной для человека) увеличивается теоретическая и практическая значимость разработки экспериментальных моделей. Анализ признаков естественного геронтогенеза целостного организма и отдельных его систем (в том числе сердечно-сосудистой системы) под действием химических соединений открывает реальные перспективы разработки таких моделей, что обусловлено близостью многих физиологических, биохимических и морфологических признаков состояния сердечно-сосудистой системы в динамике естественного старения и атерогенеза. Ускоренное старение сердечно-сосудистой системы при действии химического фактора подтверждено при нормировании большого количества химических соединений [3–5].

Целью исследования явилось изучение (на основе математического анализа значимости) признаков старения лабораторных животных (крыс-самок) для усовершенствования существующих критериев биологического возраста экспериментальных животных, используемых при прогнозировании опасности развития геронтогенных эффектов химических соединений, на сердечно-сосудистую систему.

1. Материалы и методы исследования

У лабораторных животных (крыс) начиная с четырехмесячного возраста ежемесячно (до момента их естественной гибели) изучали показатели (функциональные, биохимические и морфологические), связанные с деятельностью сердечно-сосудистой системы.

На протяжении всего опыта животные содержались при естественном освещении в виварии НИИ гигиены и экологии человека Самарского государственного медицинского университета, на стандартном пищевом рационе в соответствии с приказом МЗ СССР №1179 от 10 декабря 1983 года. Всего было использовано 450 животных, умерщвление которых происходило в соответствии с "Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных", утвержденными Минздравом СССР.

Приведем методы изучения показателей, связанных с деятельностью сердечно-сосудистой системы.

Функциональные показатели: частота сердечных сокращений (ЧСС) и структура ЭКГ регистрировалась во втором стандартном отведении на ЭЛ-КАР-2 при скорости движения ленты 100 мм/с с предварительной адапта-

цией животного; систолическое артериальное давление (САД) измеряли с помощью полиграфа "Салют".

Биохимические показатели: о состоянии липидного обмена судили по уровню общих липидов (реакция с сульфованилиновым реактивом) [6], бета-липопротеидов (метод М.М. Ледвиной, 1960) [7], фосфолипидов (метод В.Е. Предтеченского, 1960) [8], свободного и рыхлосвязанного холестерина (метод В.Н. Дружинина, 1973) [9], общего холестерина (метод Г.И. Удинцева и соавт., 1968) [10], триацилглицеридов (метод Н.Л. Аслаяна и соавт., 1977) [6] в сыворотке крови; состав соединительной ткани миокарда и аорты оценивали по содержанию гексуриновых кислот (ГУК) (метод L. Svennerholm, 1956) [11], гексозаминов (ГА) (метод R. Gatt, E. Berman, 1966) [12] и оксипролина (ОП) (метод H. Stegemann, 1958) [13].

Морфометрии подвергались поперечные срезы аорт толщиной 7 микрометров, окрашенные фукселином. Измерения проводились с помощью винтового окуляр-микрометра (МОВ-1х15) в 10 срезах аорты от одного животного при увеличении 1х750. На срезах измерялась толщина эластических и мышечных мембран.

Используя тестовую окулярную сетку в препаратах миокарда (увеличение 1х700), при окраске гематоксилин-эозин (15 замеров с препарата) определялось соотношение ядро/цитоплазма (Я/Ц). При окраске гематоксилин-пикрофуксин (20 замеров с препарата) — соотношение соединительная ткань/кардиомиоциты (СТ/КМ) (метод Г.Г. Автандилова, 1980) [14].

У животных различных возрастных групп определяли в цитоплазматической фракции миокарда активность гексокиназы (метод Л.А. Кильдема, Л.Э. Терас, 1969) [15], аспартатаминотрансферазы (АСТ) (метод S. Reitman, S. Frankel, 1957) [16], фруктозодифосфатаальдозазы (ФДФ) (метод В. Кулганека, В. Клашка, 1961) [17], алкогольдегидрогеназы (метод Г.А. Кочетова, 1980) [18] и глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназы (метод Ф.И. Путилиной, С.Д. Соидзе, 1982) [19]; в митохондриальной фракции (метод Н.Д. Ещенко, 1982) [19] — сукцинатдегидрогеназу (СДГ) и зависимую малатдегидрогеназу (МДГ) (метод Ф.И. Путилиной, С.Д. Соидзе, 1982) [19].

Математический анализ информативности, значимости и вариабельности выполнен на ЭВМ ЕС-1035 по программам "Соми" и "Канон". Факторный анализ позволил расположить показатели группы в порядке убывания их доли в суммарной дисперсии показателей. Методами корреляционного анализа определялись пары взаимосвязанных показателей. Кластерный анализ позволил расположить множество показателей группы на классы сходных в определенном смысле показателей. За меру сходства выбран коэффициент парной корреляции. Дисперсионный анализ позволил оценить степень влияния факторов, одновременно действующих на каждый показатель. Результаты дисперсионного анализа дополнялись сравнением наблюдений при разных уровнях факторов по критерию t-Стьюдента, а границы

доверительного интервала соответствовали критическим значениям показателя.

Значение показателя, лежащее вне доверительного интервала, существенно отличается от его математического ожидания. Критическим значениям показателя соответствуют пороговые значения возраста, которые могут быть определены, если известна зависимость показателя от возраста. При расчете порогового возраста необходимо иметь надежные модели, в этом случае расчетные значения показателя мало отличаются от экспериментальных. За оценку дисперсии при определении доверительного интервала показателя может быть выбрана дисперсия контрольного наблюдения.

Взаимосвязи между группами показателей могут быть определены методом канонической корреляции, значимость которой может решить вопрос об исключении из рассмотрения целых групп показателей. Если экспериментальных данных недостаточно для расчета канонических корреляций, то выполнялся корреляционный анализ по всем показателям и выявлялись пары наиболее тесно связанных показателей. В этом случае число возможных вариантов моделей очень велико, поэтому приходилось ограничивать исследования, выбирая только информативные показатели.

2. Результаты исследований и их обсуждение

Подтверждено представление о старении как о процессе многостадийном и многовариантном. Наряду с показателями, имеющими единую стабильную тенденцию к увеличению (или уменьшению) от предыдущей возрастной группы к последующим (ЧСС, САД, уровень фосфолипидов в сыворотке крови, содержание ОП в аорте и миокарде, толщина эластических мембран аорты, соотношение СТ/КМ и др.), ряд показателей претерпевал фазовые изменения (уровень триацилглицеридов и холестерина в сыворотке крови, средняя толщина мышечных волокон аорты, ферменты энергетического обмена миокарда и др.). Часть показателей значимо не менялась при естественном старении (соотношение Я/Ц миокарда).

Наибольшая вариабельность (коэффициент вариации $C_v \geq 30\%$) характерна для уровня бета-липопротеидов в сыворотке крови, соотношения толщины стенок левого и правого желудочков сердца, наименьшая ($C_v \geq 10\%$) — для САД, уровня ОП и ГА в стенке аорты и миокарда, средней толщины эластических мембран аорты.

Анализ данных, характеризующих деятельность сердечно-сосудистой системы, выявил, что наиболее значимыми и информативными являются перечисленные в табл. 1 показатели, которые имели высокие и значимые коэффициенты множественной канонической корреляции.

Наиболее низкие (менее года) пороговые значения показателей сердечно-сосудистой системы крыс в процессе естественного старения были следующими: соотношение СТ/КМ — 4,6 мес., фосфолипиды сыворотки крови —

Таблица 1

Определение информативных показателей и их пороговых значений по возрасту

Показатели, обрабатываемые на ЭВМ	Показатели, для которых получены зависимости от возраста	Информативные показатели по группе	Пороговый возраст (месяцы)
САД, ЧСС, интервал PQ на ЭКГ, комплекс QRST и QRS на ЭКГ, величина зубца R, на ЭКГ — систолический показатель	ЧСС, интервал PQ на ЭКГ, комплекс QRST на ЭКГ, САД	ЧСС, интервал PQ на ЭКГ, комплекс QRST на ЭКГ, САД	ЧСС — 8,5; комплекс QRST на ЭКГ — 10,9; интервал PQ на ЭКГ — 13,8; САД — 17,6
Ферменты миокарда: гексокиназа, глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназа, АСТ, ЛДГ, МДГ, СДГ, алкогольдегидрогеназа и ФДФ	Гексокиназа, глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназа, ЛДГ, МДГ, алкогольдегидрогеназа и ФДФ	ФДФ, гексокиназа, глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназа	ФДФ — 4,9; гексокиназа — 6,4; глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназа — 23,4
Липиды сыворотки крови: общие липиды, общий холестерин, свободный холестерин, бета-липопротеиды, фосфолипиды, триацилглицериды	Общий холестерин, бета-липопротеиды, фосфолипиды, триацилглицериды	Фосфолипиды, бета-липопротеиды	Фосфолипиды — 4,8; бета-липопротеиды — 18,6
Биохимия соединительной ткани: ОП миокарда, ГА миокарда, ГУК миокарда, ОП аорты, ГА аорты, ГУК аорты	ОП миокарда и аорты, ГА миокарда	ОП миокарда и аорты, ГА миокарда	ОП миокарда — 7,4; ГА миокарда — 9,9; ОП аорты — 15
Морфометрия аорты: толщина эластических и мышечных волокон, количество эластических волокон	Толщина эластических и мышечных волокон	Толщина мышечных волокон	Толщина мышечных волокон — 14,4
Морфометрия миокарда: Соотношения СТ/КМ и Я/Ц	Соотношение СТ/КМ	Соотношение СТ/КМ	Соотношение СТ/КМ — 4,6

4,8 мес., ФДФ миокарда 4,9 мес., гексокиназа миокарда — 6,4 мес., ОП миокарда — 7,4 мес., ЧСС — 8,5 мес., ГА миокарда — 9,9 мес., величина QRST на ЭКГ — 10,9 мес. Учитывая среднюю продолжительность жизни белой крысы — 2,5–3,5 года, пороговый возраст вышеперечисленных показателей соответствовал их первой половине срока жизни. Поэтому эти показатели необходимо включать в экспериментальные исследования, в первую очередь, как наиболее чувствительные при изучении геронтогенного действия химических веществ на сердечно-сосудистую систему.

Таблица 2

**Показатели сердечно-сосудистой системы крыс, для которых
получена зависимость от возраста в процессе естественного
старения**

Показатели	Зависимость возраста (X) от показателя (Y)	
	Коэффициент множественной корреляции*	Вид модели
ЧСС	0,876	$X = 427,8 - 1,52Y + 0,001Y^2$
Интервал PQ на ЭКГ	0,833	$X = -14,2 + 668,9Y$
Комплекс QRST на ЭКГ	0,943	$X = -30,1 + 590,8Y$
Гексокиназа миокарда	0,901	$X = 23,2 - 0,01Y + 0,0000015Y^2$
Глюкозо-6-фосфат дегидрогеназа миокарда	0,859	$X = 24 - 5,3Y$
ФДФ миокарда	0,833	$X = -0,568 + 0,892\sqrt{Y}$
ОП миокарда	0,948	$X = -18,1 + 5,3Y$
ГА миокарда	0,981	$X = 30,7 - 3,1Y$
ОП аорты	0,875	$X = 79 - 1,8Y$
Толщина мышечных волокон аорты	0,775	$X = -13,3 + 0,65Y$
Толщина эластических волокон аорты	0,852	$X = 59,24 - 3,6Y$
СТ/КМ миокарда	0,818	$X = 3,8 + 103,9Y$

* при уровне значимости $P < 0,05$

На основании регрессионного, факторного и корреляционного анализа из всех использованных характеристик деятельности сердечно-сосудистой системы наибольшей значимостью и информативностью обладают перечисленные в табл. 2 и 3 показатели. Уравнения регрессии, отражающие зависимость этих показателей от возраста с высокой степенью достоверности $\geq 95\%$, коррелировали с экспериментальными данными.

Практически линейная зависимость между возрастом и величиной показателя (коэффициент множественной корреляции $r \approx 0,95$) установлена для следующих показателей: комплекса QRST на ЭКГ, величины ОП миокарда, величины ГА миокарда. Из всех этих показателей ОП миокарда имел самый низкий возрастной порог (7,4 месяца) и достаточно низкую вариабельность, поэтому ОП миокарда наиболее пригоден для определения "биологического возраста животного" (крыс), при изучении отдаленных последствий влияния химических соединений на сердечно-сосудистую систему.

В качестве иллюстрации приводим график зависимости содержания ОП миокарда от возраста животного (рис. 1). С его помощью можно наглядно определить "биологический возраст" животного. Показатель является информативным при изучении воздействия химических соединений на сердечно-сосудистую систему, что подтверждено нашими исследованиями [19].

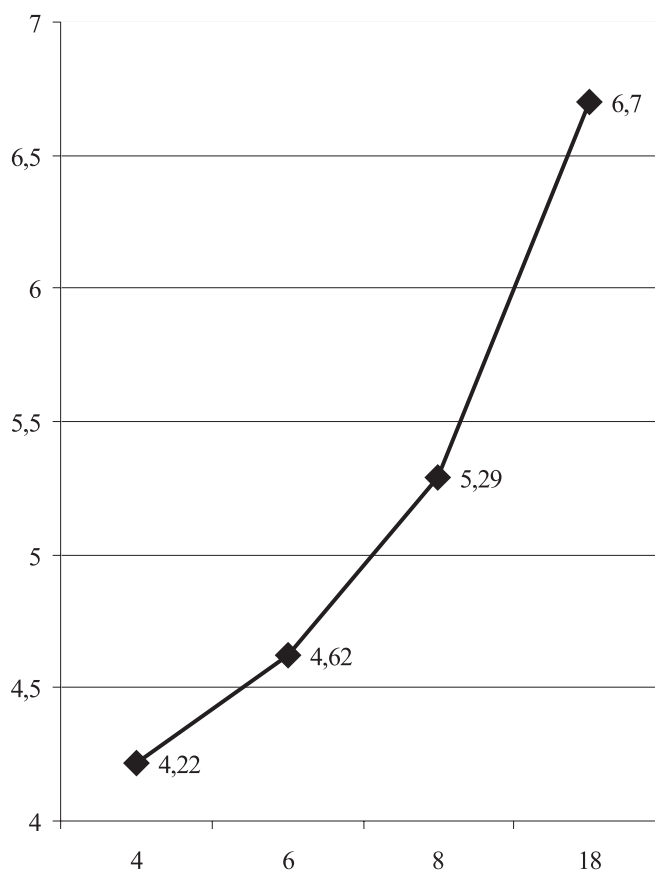


Рис. 1. График зависимости содержания ОП в миокарде от возраста крыс. По оси абсцисс — возраст, месяцы; по оси ординат — мг/г ткани

Так хроническое, ежедневное 4-х часовое ингаляционное воздействие ксилола в течение 4-х месяцев (в концентрации на уровне ПДК) приводит к изменению тех же показателей, которые оказались информативными для характера естественного геронтогенеза сердечно-сосудистой системы крыс. Направленность указанных изменений в конце хронического воздействия и в период восстановления совпадает с естественной возрастной динамикой, но существенно ее опережает. "Биологический возраст" подопытных животных, подвергавшихся воздействию ксилола в концентрации на уровне ПДК в конце эксперимента, по уровню ОП в миокарде, превышал параллельный контроль на 4 месяца.

"Биологический возраст" подопытных животных, подвергавшихся воздействию толуола (в концентрации на уровне ПДК), по уровню ОП в миокарде, превышал параллельный контроль в конце эксперимента на 6, а в восстановительном периоде на 11 месяцев [20]. То есть толуол вызывал бо-

лее выраженный геронтогенный эффект на сердечно-сосудистую систему экспериментальных животных по сравнению с ксилолом. Таким образом, геронтогенный эффект возможен даже при воздействии химических веществ на уровне предельно допустимых концентраций. Поэтому существующие в настоящее время ПДК ксилола и толуола (по геронтогенному эффекту на сердечно-сосудистую систему экспериментальных животных) не обеспечивают безопасности работающим на предприятиях, использующих эти химические вещества.

Таблица 3

Показатели сердечно-сосудистой системы крыс, для которых получена зависимость от возраста в процессе естественного старения

Показатели	Зависимость возраста (Y) от показателя (X)	
	Коэффициент множественной корреляции*	Вид модели
ЧСС	0,877	$Y = 581,5 - 10,2X + 0,204X^2$
Интервал PQ на ЭКГ	0,919	$Y = 0,05 - 0,006X + 0,0006X^2 - 0,000013X^3$
Комплекс QRST на ЭКГ	0,955	$Y = 0,0632 - 0,003X + 0,0005X^2 - 0,00001X^3$
Гексокиназа миокарда	0,916	$Y = 3582,8 - 300,8X + 8X^2$
Глюкозо-6-фосфат дегидрогеназа миокарда	0,972	$Y = 2 + 0,26X - 0,01X^2$
ФДФ миокарда	0,999	$Y = -152,82 + 96,03X - 10,04X^2 + 0,3232X^3$
ОП миокарда	0,944	$Y = 4,6 - 0,2X + 0,04X^2 - 0,001X^3$
ГА миокарда	0,995	$Y = 3,3 + 2,2X - 0,3X^2 + 0,001X^3$
ОП аорты	0,935	$Y = 36,4 + 1,4X - 0,2X^2 + 0,004X^3$
Толщина мышечных волокон аорты	0,775	$Y = 27,9 + 0,9X$
Толщина эластических волокон аорты	0,776	$Y = 16,1 - 0,28X + 0,007X^2$
СТ/КМ миокарда	0,752	$Y = -0,03 + 0,01X - 0,0003X^2$

* при уровне значимости $P < 0,05$

Заключение

Старение — необратимый процесс, поэтому ранние признаки геронтогенеза могут служить основой системы прогнозирования безопасных уровней воздействия химических соединений. Наибольшую прогностическую значимость в комплексе показателей, характеризующих скорость геронтогенеза сердечно-сосудистой системы, имеют показатели состава соединительной ткани миокарда и морфометрии миокарда (соотношение СТ/КМ). Это позволяет использовать их в качестве надежных критериев гигиенического нормирования химических веществ в объектах окружающей среды.

Полученные результаты создают основу ускоренного нормирования химических веществ, обладающих геронтогенным действием на сердечно-сосудистую систему. Все показатели, особенно имеющие низкий возрастной порог, выраженную зависимость от возраста и высокую информативность в группе, необходимо включать в исследования по изучению геронтогенного действия химических соединений на сердечно-сосудистую систему.

Литература

- [1] Ускоренная оценка действия химических соединений на сердечно-сосудистую систему в эксперименте с целью гигиенического нормирования: Методические указания / МЗ СССР; Сост. И.В. Саноцкий, Н.С. Гродецкая, И.М. Трахтенберг, В.Н. Власов и др.. М., 1988. 16 с.
- [2] Саноцкий И.В., Фоменко В.Н. Отдаленные последствия влияния химических соединений на организм. М.: Медицина, 1979. 232 с.
- [3] Анто́в Г.П. Гигиенна значимост на непосредствените и отдалечените последствия от въздействието на токсичните съединения върху сърдечно-съдовата система: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. София, 1986. 85 с.
- [4] Гродецкая Н.С. Анализ значимости признаков старения сердца и сосудов при гигиеническом нормировании промышленных соединений (экспериментальное исследование опасности развития отдаленных эффектов на сердечно-сосудистую систему) : Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. М., 1989. 49 с.
- [5] Саноцкий И.В., Гродецкая Н.С. Ускоренное старение организма — интегральный итог химического стресса // Токсикологический вестник. 1997. №6. С. 8–12.
- [6] Колб В.Г., Камышников В.С. Справочник по клинической химии. 2-е изд., перераб. и доп. Минск: Беларусь, 1982. 366 с.
- [7] Ледвина М.М. Определение бета-липопротеидов в сыворотке крови турбидиметрическим методом // Лаб. дело. 1973. №3. С. 13–17.
- [8] Предтеченский В.Е. Руководство по клиническим лабораторным исследованиям. М.: Медгиз, 1960. 963 с.

- [9] Дружинин В.Н. Простые и доступные методы исследования липидов // Лаб. дело. 1973. №12. С. 733–734.
- [10] Пособие по клинико-лабораторным методам исследования / Г.Н. Удинцев, В.Б. Бланк, Д.А. Кравец, И.С. Тимесков. Л.: Медицина, 1968. 261 с.
- [11] Svennerholm L. The quantitative estimation of cerebrosides in nervous tissue // J. Neurochemistry. 1956. V. 1. No. 1. P. 42–53.
- [12] Gatt R, Berman E. A rapid procedure for the estimation of amino sugars on a micro scale // Analyt. Biochem. 1966. V. 15. No. 1. P. 167–171.
- [13] Stegemann H. Mikrobestimmung von Hydroxyprolin mit Chloramin-T und p-Dimethylaminobenzaldehyd // Hoppe. Seylers Z. Physiol. Chem. 1958. Bd. 311. S. 41–45.
- [14] Автандилов Г.Г. Введение в количественную патологическую морфологию. М.: Медицина, 1980. 240 с.
- [15] Кильдема Л.А., Терас Л.Э. Активность гексокиназ на разных этапах малигнизации печени // Вопр. мед. химии. 1969. Т. 15. Вып. 5. С. 525–531.
- [16] Reitman S. Frankel S. A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxalacetic and glutamic pyruvic transaminases // Am. J. Clin. Path. 1957. V. 28. No. 1. P. 56–63.
- [17] Кулганек В., Клашка В. Упрощенное определение альдолазной активности в сыворотке крови // Вопр. мед. химии. 1961. Т. 7. №4. С. 434–436.
- [18] Кочетов Г.А. Практическое руководство по энзимологии / Под ред. С.Е. Северина. М.: Высшая школа, 1980. 272 с.
- [19] Методы биохимических исследований (липидный и энергетический обмен): Учебное пособие / Под ред. М.И. Прохоровой. Л.: Изд-во Ленинг. ун-та, 1982. 272 с.
- [20] Власов В.Н. Изучение изолированного и сочетанного действия ксилола и общей вибрации на сердечно-сосудистую систему (экспериментальное исследование): Автореф. дис. ... канд. мед. наук. М., 1989. 24 с.
- [21] Власов В.Н. Сочетанное воздействие толуола, общей вибрации и шума на сердечно-сосудистую систему экспериментальных животных // Труды IX Всероссийского конгресса "Экология и здоровье человека", 5–7 октября 2004 г., Самара, 2004. С. 41–45.

Поступила в редакцию 6/X/2004;
в окончательном варианте — 27/X/2004.

**PARAMETERS OF CARDIO-VASCULAR SYSTEM
AGEING AS A CRITERION OF FUTURE EFFECTS
OF ENVIROMENT POLLUTION**

© 2005 V.N. Vlasov²

Physiological, biochemical and morpho-metrical parameters of cardio-vascular system of various laboratory animals (white rats) are obtained. The correlation of physiological, biochemical, and morpho-metrical parameters as depending on animal ages are discussed. The mathematical dependence of animal ages is obtained. The possibility of definition the "biological age" of an animal is presented. The results form the base of accelerated chemical substances normalizing that have an effect on vascular system.

Paper received 6/X/2004.

Paper accepted 27/X/2004.

²Vlasov Valeriy Nickolaevich (office@tltsu.ru), Dept. of Medical and Biological Sciences, Togliatti State University, Togliatti, 445667, Russia.