

БЛОКАДА КАЛЬЦИЕВЫХ КАНАЛОВ КАРДИОМИОЦИТОВ КРОЛИКА ВОССТАНАВЛИВАЕТ АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТ-СУБСТРАТНЫХ КОМПЛЕКСОВ ДЫХАТЕЛЬНОЙ ЦЕПИ В МОДЕЛИ ВИБРАЦИОННО-ОПОСРЕДОВАННОЙ ГИПОКСИИ

В.В. Воробьева^{1,3,*}, О.С. Левченкова², П.Д. Шабанов^{1,3}

¹ ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»
197376, Российская Федерация, Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, 12

² ФГБОУ ВО «Смоленский государственный медицинский университет» Минздрава России
214019, Российская Федерация, Смоленск, ул. Крупской, 28

³ ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова» Минобороны России
194044, Российская Федерация, Санкт-Петербург, ул. Лебедева, 6

Оценено действие блокатора кальциевых каналов (БКК) нифедипина в дозе 7,5 мг/кг на энергетический обмен кардиомиоцитов кролика в условиях вибрационно-опосредованной (56 сеансов вибрации 44 Гц, амплитудой 0,5 мм) модели клеточной гипоксии. Энергетический обмен нативных митохондрий сердца в 30%-ном гомогенате ткани изучали полярографическим методом, регистрируя скорости поглощения кислорода митохондриями при 37 °С в 1 мл солевой среды инкубации, уравновешенной с кислородом воздуха. У животных, подвергнутых вибрации на фоне БКК, скорость эндогенного дыхания (V_o) оставалась на уровне интактных животных, амитаучувствительность повышалась на 39% ($p < 0,05$), малонатчувствительность уменьшалась на 40% ($p < 0,05$). Малаксоксидазная активность в состоянии «покоя» увеличивалась, а гиперактивация системы окисления эндогенной янтарной кислоты снижалась по сравнению с показателями животных, подвергнутых вибрации без фармакологической защиты, свидетельствуя о кардиопротективном действии нифедипина, предотвратившем развитие некроза кардиомиоцитов.

Ключевые слова: вибрация, энергетический обмен кардиомиоцита, митохондрии, нифедипин, тканевая гипоксия

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Воробьева В.В., Левченкова О.С., Шабанов П.Д. Блокада кальциевых каналов кардиомиоцитов кролика восстанавливает активность фермент-субстратных комплексов дыхательной цепи в модели вибрационно-опосредованной гипоксии. *Биомедицина*. 2022;18(4):63–73. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-18-4-63-73>

Поступила 18.04.2022

Принята после доработки 14.07.2022

Опубликована 10.12.2022

BLOCKADE OF RABBIT CARDIOMYOCYTE CALCIUM CHANNELS RESTORES THE ACTIVITY OF ENZYME-SUBSTRATE COMPLEXES OF THE RESPIRATORY CHAIN IN A MODEL OF VIBRATION-MEDIATED HYPOXIA

Viktoriya V. Vorobieva^{1,3,*}, Olga S. Levchenkova², Petr D. Shabanov^{1,3}

¹ Institute of Experimental Medicine

197376, Russian Federation, Saint-Petersburg, Akademika Pavlova Str., 12

² Smolensk State Medical University of the Ministry of Health Care of Russia
214019, Russian Federation, Smolensk, Krupskoy Str., 28

³ Military Medical Academy named after S.M. Kirov of the Ministry of Defense of Russia
194044, Russian Federation, St. Petersburg, Lebedeva Str., 6

The effect of nifedipine, a calcium channel blocker (CCB), at a dose of 7.5 mg/kg on the energy metabolism of rabbit cardiomyocytes was evaluated in a vibration-mediated model of cellular hypoxia (56 sessions of vibration 44 Hz, amplitude 0.5 mm). The energy metabolism of native heart mitochondria in a 30% tissue homogenate was assessed using a polarographic method, by recording the rate of oxygen uptake by mitochondria at 37°C in 1 ml of a saline incubation medium, equilibrated with atmospheric oxygen. In the animals exposed to vibration against the background of CCB, the rate of endogenous respiration (V_o) remained at the level of intact animals, with the amylal sensitivity increasing by 39% ($p < 0.05$) and the malonate sensitivity decreasing by 40% ($p < 0.05$). The malate oxidase activity at rest increased, and hyperactivation of the endogenous succinic acid oxidation system decreased as compared to the indices of the animals exposed to vibration without pharmacological protection. The observed results indicate the cardioprotective effect of nifedipine, which prevented the development of cardiomyocyte necrosis.

Keywords: vibration, energy metabolism of cardiomyocytes, mitochondria, nifedipine, tissue hypoxia

Conflict of interest: the authors declare no conflict of interest.

For citation: Vorobieva V.V., Levchenkova O.S., Shabanov P.D. Blockade of Rabbit Cardiomyocyte Calcium Channels Restores the Activity Of Enzyme-Substrate Complexes of the Respiratory Chain in a Model of Vibration-Mediated Hypoxia. *Journal Biomed.* 2022;18(4):63–73. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-18-4-63-73>

Submitted 18.04.2022

Revised 14.07.2022

Published 10.12.2022

Введение

Воздействие вибрации способствует развитию не только профессиональной патологии с нарушением кровоснабжения конечностей, но и заболеваниям, имеющим сложную многофакторную этиологию, таким как ишемическая болезнь сердца, артериальная гипертензия, болезни опорно-двигательного аппарата, желудочно-кишечного тракта и почек [7]. Немаловажное значение в патогенезе вибрационно-опосредованной сочетанной патологии имеет изменение кальциевого гомеостаза вследствие

нарушения уровней глюкокортикоидов [5], соматотропина, кальцийрегулирующих гормонов и витамина D, снижение кальций-связывающей способности сыворотки крови, уменьшение почечного клиренса кальция, повышение содержания в сыворотке крови общего и, особенно, ионизированного кальция [8].

Т. к. кальций в организме выполняет многообразные посреднические и регулирующие физиологические функции, то нарушение метаболизма кальция — важный элемент патогенеза различных сердечно-

сосудистых заболеваний у больных с вибрационной болезнью [7, 14]. В результате патологических изменений гемодинамики у больных с вибрационной болезнью развивается гипоксия тканей, повышается кислородная стоимость единицы работы миокарда, удлиняется время ликвидации кислородного долга на фоне высокой потребности в кислороде в покое и при физической нагрузке, снижается толерантность к физической нагрузке.

В регуляции внутриклеточного кальциевого гомеостаза важнейшую роль играют митохондрии, имеющие ряд идентифицированных к настоящему времени специфических, транспортирующих ионы кальция, структур, в частности митохондриальный Ca^{2+} -унипортер, белковый состав которого зависит от типа ткани [18]. Макромолекулярная структура митохондриального Ca^{2+} -унипортера функционирует параллельно с эндоплазматическим ретикуломом благодаря наличию МАМ контактов (мембраны, ассоциированные с митохондриями) [19], в которых ионы кальция, высвобождаемые из эндоплазматического ретикула, могут быть поглощены митохондриями. За освобождение ионов кальция из ретикула в зону МАМ контакта отвечают IP_3 рецепторы (IP_3R — рецептор инозитол 1,4,5-трифосфата), после контакта с которыми Ca^{2+} свободно движется в митохондрии через VDAC-каналы (порин) внешней митохондриальной мембраны благодаря функционированию белка-шаперона GRP75 (glucose-regulated protein 75), митофузина 2 (MFN2) и 8 белков, содержащих домен PDZ (PDZ domain-containing protein 8). Все названные структуры функционально сопряжены и работают в зависимости от их окислительно-восстановительного потенциала [17].

Непрерывное взаимодействие энергозависимых процессов торможения и усиления транспорта ионов через клеточную мембрану в митохондриях ответственно за оп-

тимальное количество кальция в клетке [1]. Доказано, что уменьшение избыточного накопления кальция в клетке с помощью лекарственных препаратов группы блокаторов высокопороговых (HVA) кальциевых каналов L-типа, регулируемых G-белками [22] и сопрягающих возбуждения и сокращения в клетках миокарда [20], предотвращает повреждение митохондрий и клеточных мембран во время гипоксии [15], приводит к вазодилатации и улучшению кровоснабжения тканей [25], антиаритмическому, антиангинальному [24], антиоксидантному, тормозящему ремоделирование миокарда и сосудов действию [16].

Рост заболеваемости, инвалидизации и смертности, обусловленные профессиональным и техногенным воздействием вибрации [13], низкая эффективность лечения, экспериментально доказанные феномены нарушения биоэнергетических процессов в различных тканях на фоне вибрации [3, 23], высокая энергоёмкость процессов транспорта ионов кальция [19, 21], его значение для функционирования клетки и наличие группы лекарственных препаратов, способных регулировать процессы клеточного и тканевого кальциевого обмена, позволили определить цель работы.

Целью исследования явилось экспериментальное изучение активности системы энергопродукции кардиомиоцитов кролика в условиях фармакологической коррекции вибрационно-обусловленных нарушений с помощью антагониста кальциевых каналов производного 1,4-дигидро-2,6-диметил-4-(2-нитрофенил)-3,5-пиридиндикарбоновой кислоты диметилового эфира с международным названием нифедипин (INN).

Материалы и методы

Эксперименты проведены на 95 кроликах-самцах породы *Oristolagus cuniculus*, *Linnaeus* массой 2,5–3 кг в возра-

сте 3–4 мес. Животные были получены из ФГУП «Питомник лабораторных животных «Рапполово» (Ленинградская обл.). Все эксперименты выполняли согласно методическим руководствам и нормативным документам, правилам лабораторной практики проведения доклинических исследований в Российской Федерации (ГОСТ Р 53434-2009) и Директиве 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского Союза от 22 сентября 2010 г. по охране животных, используемых в научных целях. Животные содержались в стандартных условиях вивария по две особи в клетке при температуре 18–23 °С со свободным доступом к воде, пище, при двенадцатичасовом цикле день/ночь.

Действие общей вертикальной вибрации с амплитудой 0,5 мм осуществляли с помощью промышленной установки. Ежедневно в течение 56-ти дней проводили сеансы общей вертикальной вибрации с частотой 44 Гц по 60 мин с 9⁰⁰ до 11⁰⁰ в осенне-зимний период. В качестве средства фармакологической защиты использовали нифедипин («Pliva», Хорватия) в разовой дозе 7,5 мг/кг массы животного (2-я группа), вычисленной с помощью коэффициента перерасчёта равноэффективных доз для разных видов млекопитающих и человека с учётом зависимости между массой тела и относительной площадью его поверхности [2]. Препарат вводили в виде суспензии по 2 мл внутрипищеводно с помощью тонкого эластичного зонда за 60 мин до вибрационного воздействия. Интактные и контрольные животные, которые подвергались воздействию вибрации без фармакологической защиты (1-я группа), получали физ. р-р.

После вскрытия грудной полости животного быстро извлекали сердце, иссекали часть миокарда в области верхушки и помещали в среду выделения фиксированного состава [3, 23], охлаждённую до 0 °С с помощью льда. Для имитации состава внутриклеточной среды использовали апроби-

рованные в других исследованиях [3, 23] сложные солевые растворы. Концентрация компонентов среды выделения: 250 ммоль сахарозы, 10 ммоль Трис-НCl (pH 7,2). Концентрация компонентов среды инкубации: Трис-НCl (pH 7,2) 10 ммоль, 20 ммоль KН₂PO₄, 10 ммоль MgSO₄, 150 ммоль KCl. Сахароза, KН₂PO₄, MgSO₄, KCl («Реахим», Россия); трис-НCl («Serva», Германия). Все растворы готовили *ex tempore* на бидистиллированной воде.

После промывания от крови кусочки ткани сердца массой примерно 250–300 мг помещали в охлаждённый стальной пресс с отверстиями 1 мм и продавливали в калиброванный гомогенизатор Даунса из кварцевого стекла с тефлоновым пестиком при соотношении «среда выделения/ткань» = 1/2. Через 7–10 мин с момента извлечения тканей из организма животного получали 30%-ный гомогенат.

Временной режим забора ткани миокарда, гомогенизации и инкубации был стандартизован и ограничивался 40 мин с момента забора животного до окончания полярографического измерения показателей активности митохондрий тканей, что соответствовало методическим требованиям обеспечения адекватности статуса митохондрий *in vitro* их «нативному» состоянию, максимально приближенному к состоянию *in vivo* [6].

Энергетический обмен нативных митохондрий сердца в гомогенате изучали полярографическим методом, регистрируя скорости поглощения кислорода митохондриями при 37 °С в 1 мл солевой среды инкубации, уравновешенной с кислородом воздуха. Исходя из того, что для митохондриальных субстратов протонный ток пропорционален скорости дыхания, кислородный электрод позволяет измерять скорость переноса электронов по фермент-субстратным комплексам дыхательной цепи (ДЦ) на кислород на фоне таких скоростлимитирующих процессов, как транспорт

субстрата через мембрану, активность дегидрогеназ, транспорт адениновых нуклеотидов через мембрану, АТФ-синтетазную активность и протонную проводимость мембраны.

Скорость дыхания митохондрий (V) измеряли в $[\text{нг-атом О}] \text{ мин}^{-1} \text{ мг}^{-1} \text{ белка}$. Вклад в эндогенную дыхательную активность митохондрий NAD- и FAD-зависимых субстратов оценивали по данным ингибиторного анализа с амиталом или малонатом [11]. Т. к. амитал, принадлежащий к классу барбитуратов, угнетает окисление NAD-зависимых субстратов за счёт блокирования потока электронов на уровне I фермент-субстратного комплекса ДЦ, обусловленного неспецифическим гидрофобным взаимодействием с ферментом NADH-CoQ-редуктазой, то величина чувствительности скорости эндогенного дыхания (V_3) к амиталу пропорциональна активности этого участка и вкладу эндогенных субстратов, окисляющихся по данному метаболическому пути [11].

Малонат является абсолютным специфическим ингибитором сукцинатдегидрогеназы (СДГ), и после введения его в полярографическую ячейку отсекается та часть эндогенного дыхания, которая определяется вкладом сукцината. Чувствительность эндогенного дыхания (V_3) к ингибиторам вычисляли по формуле: показатель чувствительности к ингибитору = $(1 - V_{\text{инг}}/V_{\text{энд}}) \times 100\%$, где показатель чувствительности к ингибитору — чувствительность эндогенного дыхания к малонату (малонатчувствительность) или амиталу (амиталчувствительность); $V_{\text{инг}}$ ($V_{\text{ам}}$ или $V_{\text{мал}}$) — скорость окисления эндогенных энергетических субстратов в присутствии соответствующего ингибитора в ячейке в концентрации 2 мМ.

Метаболические состояния митохондрий $V_{\text{як}}$ и $V_{\text{глу+мал}}$ «покоя» (состояние 4 — «контролируемое», или «отрегулированное», согласно [11]) моделировали *in vitro*



Рис. 1. Полярографическая измерительная установка состоит из электрода Кларка, ячейки с перемешивающим стержнем, термостатируемого кожуха, водяного термостата I ТЖ-0 03 (Россия), магнитной мешалки ММ-3М (Россия), самописца LKB Bromma 2210 2-Channel Recorder (Швеция).

Fig. 1. The polarographic measuring device consists of a Clarke electrode, a cell with a stirring rod, a thermostatically controlled casing, a water thermostat I TZh-0 03 (Russia), a magnetic stirrer MM-3M (Russia) and a LKB Bromma 2210 2-Channel Recorder (Sweden).

при варьировании экзогенных энергетических субстратов FAD-зависимого — янтарной кислоты 1 мМ или смеси NAD-зависимых субстратов — яблочной и глутаминовой кислот (малат + глутамат) по 3 мМ.

Введением в ячейку разбавителя 2,4-динитрофенола (2,4-ДНФ) до 20 мкМ имитировали состояние АТФ-азной «активности» митохондрий (состояние 3 по [11]) и получали показатели $V_{\text{як-р}}$ и $V_{\text{мал+глу-р}}$. Устраняя электрохимический потенциал клеточной мембраны и разбавляя все точки сопряжения в ДЦ, протонофор 2,4-ДНФ нарушает синтез АТФ и его регулирующее влияние в пунктах сопряжения дыхания с фосфорилированием, вследствие чего скорость окисления субстратов возрастает, увеличивается уровень АДФ, тем самым создается наиболее высокая функциональная нагрузка на ДЦ [11].

Отклик митохондрий на вибрационный фактор *in vivo* оценивали не только по сово-

купности кинетических (V), но и расчётных регуляторных параметров, которые количественно характеризовали переход митохондрий в разные состояния (от эндогенного дыхания в состояние «покоя»; от «покоя» в «активное» состояние). Для этого в доступных для нашего исследования метаболических состояниях митохондрий дополнительно ввели «регуляторные» коэффициенты приращения субстратного дыхания (K_P) в состоянии покоя (K_{P_0}) и разобщения (K_{P_r}). Рассчитывали коэффициенты стимуляции (K_C) и коэффициенты разобщения (K_P), например, $K_C = V_{\text{як}} / V_{\text{э}}$; $K_{P_r} = V_{\text{як-р}} / V_{\text{як}}$, где: K_C — стимуляция эндогенного дыхания экзогенным субстратом янтарной кислотой, $V_{\text{як}}$ — скорость дыхания митохондрий после добавления в полярографическую ячейку сукцината; K_{P_r} — стимуляция субстратного дыхания 2,4-ДНФ, $V_{\text{як-р}}$ — скорость окисления янтарной кислоты после добавления 2,4-ДНФ. Коэффициенты приращения и стимуляции выражали в относительных единицах измерения.

Предполагаемое повреждающее действие общей вибрации и защитные свойства лекарственного препарата подтверждали морфогистологически. Обработка гистологического материала (ткань мышцы миокарда левого желудочка в области верхушки) осуществлялась в ходе стандартной гистологической спирто-парафиновой проводки. Окрашивание препаратов производили гематоксилином и эозином.

Статистическую обработку данных выполняли с помощью пакета прикладных программ Excel 2002 («Microsoft Corp.», США), Statistica 6,0 («StatSoft Inc.», США). Значимость межгрупповых различий оценивали параметрическим (t-критерия Стьюдента) и непараметрическим (U-тест Манна–Уитни) критериями в зависимости от типа распределения, который определяли в модуле «Basic Statistica/Tables. Frequency tables» ППП Statistica 6,0.

Результаты и их обсуждение

В ранее опубликованных авторами результатах экспериментального изучения феномена вибрационного воздействия [3] было показано, что с увеличением частоты (от 8 до 44 Гц) и длительности вибрации (от 7-ми, 21-го до 56-ти сеансов) на уровне системы энергопродукции миокарда кроликов вклад активности комплекса NADH-CoQ-редуктаза (I комплекс ДЦ) в энергообеспечение ткани снижался, что согласуется с представлениями о его большей уязвимости [9]. Одновременно активность FAD-зависимого фермента субстратного комплекса (II комплекс ДЦ), шунтирующего часть электрон-транспортной цепи и обеспечивающего парциальные реакции ДЦ митохондрий с участием эндогенной и экзогенной янтарной кислоты *in vitro* [12], повышалась, свидетельствуя о его ведущей роли в поддержании энергетического обмена в неблагоприятных условиях внешней среды.

Пролонгация воздействия и накопление вибрационной дозы неизменно приводили к гиперактивации системы окисления янтарной кислоты, которая сопровождалась явлениями торможения и разобщения окислительного фосфорилирования, свидетельствуя о формировании низкоэнергетического сдвига в системах энергообеспечения тканей. Подобная функциональная перестройка в ДЦ митохондрий в ответ на вибрацию [23] соответствует аналогичной картине «смены метаболических путей» на фоне других видов неблагоприятных воздействий [9]. Это позволило использовать режим вибрации с определёнными характеристиками (56 сеансов, 44 Гц, 0,5 мм) в качестве неинвазивной модели [4], вызывающей митохондриальную дисфункцию и гипоксический тип клеточного метаболизма [3] для дальнейшего изучения биологических феноменов вибрации и возможностей фармакологической защиты от вибрации

и других неблагоприятных факторов физической природы.

У животных, получавших нифедипин на протяжении 56-ти сеансов вибрации 44 Гц, скорость эндогенного дыхания (V_o) оставалась на уровне интактных животных, тогда как вклад парциальных реакций, по данным ингибиторного анализа, значительно изменялся (рис. 2).

Амитачувствительность повышалась на 39% ($p < 0,05$) по сравнению с группой вибрированных животных, малонатчувствительность уменьшалась на 40% ($p < 0,05$), приближаясь к показателю интактных животных (рис. 2). При этом коэффициент KP_o ($KP_o = \text{мал.ч.}/\text{ам.ч.}$) уменьшался на 56%, что свидетельствовало о преобладании активности комплекса NADH-CoQ-редуктаза в окислительно-восстановительных реакциях, подобно активности у интактных животных.

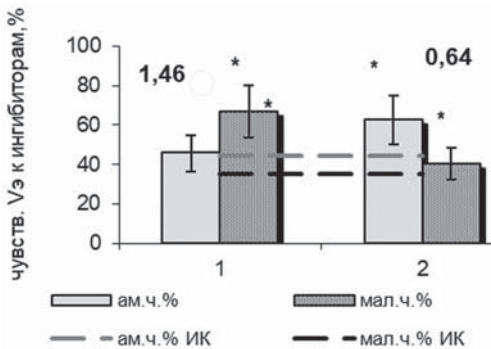


Рис. 2. Влияние нифедипина на соотношение парциальных реакций V_e по данным ингибиторного анализа с амитаом и малонатом.

Примечание: пунктир — интактный контроль (ИК); 1 — вибрация; 2 — вибрация + нифедипин. Цифры возле столбиков диаграмм — KP_o ; статистически значимые различия между группами 1 и 2: * — $p < 0,05$, ** — $p < 0,01$.

Fig. 2. The influence of nifedipine on the ratio of partial reactions V_e according to inhibitory analysis with amital and malonate.

Note: the dotted line shows intact control (ИК); 1 — vibration; 2 — vibration + nifedipine. The numbers near the bars of the diagrams stand for KP_o — statistically significant differences between groups 1 and 2: * — $p < 0,05$; ** — $p < 0,01$.

Скорость окисления композиции субстратов глутамат + малат в состоянии «покоя» увеличивалась на 27% и приближалась к показателю интактного контроля, тогда как в окислении экзогенной янтарной кислоты наблюдали уменьшение гиперактивации и приближение к границе уровня показателей интактной группы (рис. 3).

Показатели скорости субстратного дыхания ($V_{\text{як}}$ и $V_{\text{глу+мал}}$) в группе с нифедипином оказались выше скорости эндогенного дыхания, свидетельствуя об энергизирующем действии экзогенных субстратов («мягкие» условия инкубации гомогената), большей сохранности физиологической проницаемости мембран для субстратов, трансмембранной разности электрохимического потенциала ионов водорода ($\Delta\mu_{\text{H}^+}$), способности ферментного комплекса окислять субстраты и готовности последующих участков ДЦ транспортировать электроны

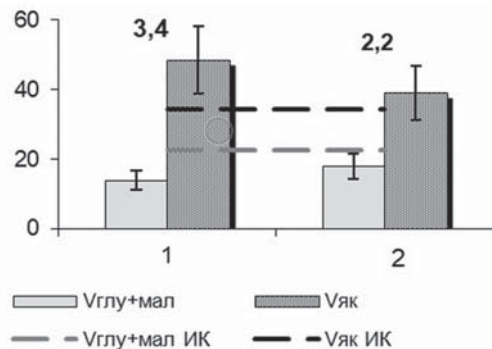


Рис. 3. Влияние нифедипина на скорость окисления NAD- и FAD-зависимых субстратов в состоянии «покоя» в [нг-атом O] $\text{мин}^{-1}\text{мг}^{-1}$ белка (ось Y).

Примечание: пунктир — интактный контроль (ИК); 1 — вибрация; 2 — вибрация + нифедипин. Цифры возле столбиков диаграмм — KP_o ; статистически значимые различия между группами 1 и 2: * — $p < 0,05$, ** — $p < 0,01$.

Fig. 3. The influence of nifedipine on the rate of oxidation of NAD- and FAD-dependent substrates at rest in [ng-O atom] $\text{min}^{-1}\text{mg}^{-1}$ protein (Y-axis).

Note: the dotted line shows intact control (ИК); 1 — vibration; 2 — vibration + nifedipine. The numbers near the bars of the diagrams stand for KP_o ; statistically significant differences between groups 1 and 2: * — $p < 0,05$, ** — $p < 0,01$.

к кислороду [6, 11] по сравнению с животными без фармакологической защиты.

Коэффициент $KP_{\text{п}}$ ($KP_{\text{п}} = V_{\text{як}} / V_{\text{глу+мал}}$) снижался на 35% (рис. 3), приближаясь к показателю интактных животных (1,51), что свидетельствовало о сохранности I звена ДЦ при фармакологической защите с одной стороны и о регуляторном сдерживании гиперактивации СДГ — с другой. Коэффициент $KP_{\text{р}}$ ($KP_{\text{р}} = V_{\text{як-р}} / V_{\text{глу+мал-р}}$) уменьшался на 33%, оставаясь выше показателя интактного контроля (0,98) и указывая на отрегулированный режим работы СДГ комплекса на фоне фармакологической защиты.

Однако в метаболическом состоянии «активности» скорость окисления экзогенных NAD-зависимых субстратов в тканях животных, получавших нифедипин, оставалась по-прежнему сниженной по сравнению с показателем интактных животных на 42% ($p < 0,05$); $KP_{\text{глу+мал}}$ уменьшался на 23% ($p < 0,05$) по сравнению с вибрированными животными, что ещё раз подчёркивает необходимость обобщённого анализа совокупности кинетических и расчётных показателей ввиду структурной (белковой, кофакторной) и функциональной сложности организации фермент-субстратных комплексов ДЦ [10, 12].

Как известно, ионы Ca^{2+} , избыточно поступающие в клетку через потенциалзависимые медленные кальциевые каналы, могут подавлять интенсивность дыхания в клетке, усиливать гликолиз, снижать содержание АТФ, разобщать окислительное фосфорилирование, активировать АТФ-потребляющие ферменты. Совокупность изменений, характеризующих метаболические состояния митохондрий миокарда на фоне воздействия вибрации и блокаторов кальциевых каналов, свидетельствует о том, что блокада транспорта ионов Ca^{2+} в клетку на уровне потенциалзависимых ионных каналов L-типа клеточной мембраны оказывает положительное воздей-

ствие на энергетический метаболизм кардиомиоцитов, восстанавливая активность высокоорганизованного стехиометрически продуктивного [10] полиферментного комплекса NADH-CoQ-редуктазы [11, 12]. Этот факт представляется важным, т. к. сайты сопряжения транспорта электронов с образованием высокоэнергетических протонов и стехиометрия этого сопряжения носят фиксированный характер. В частности, I комплекс ДЦ переносит $2\text{H}^+/\text{e}$, при этом энергия перепада окислительно-восстановительного потенциала протонов ($\Delta\mu_{\text{H}^+}$) запасается в виде трансмембранного потенциала $\Delta\psi$, который расходуется на синтез аденозин-5'-трифосфата при помощи протонной АТФ-синтазы митохондрий [12]. Активность и предположительная локализация АТФ-синтазы в структуре системы неспецифического выброса ионов кальция митохондриальной порой (МРТ пора) в качестве каналообразующего компонента внутренней мембраны митохондрий [19] указывает на одну из многочисленных точек соприкосновения кальциевого и энергетического обменов.

Параллельно с восстановлением активности I наблюдали регуляторное сдерживание активности СДГ (II) фермент-субстратного комплекса. Многокомпонентное устройство ДЦ, обеспечивающего высокую стехиометрию H^+/O , позволяет субстратам с большим положительным редокс-потенциалом, нежели у пары $\text{NADH}^+/\text{NAD}^+$ (-320 мВ), переносить восстановительные эквиваленты сразу на II (СДГ-зависимый) участок ДЦ. Подобным образом окисляется один из субстратов цикла Кребса — сукцинат (редокс-потенциал которого $+30$ мВ), донируя электроны в ДЦ на убихинон, минуя I комплекс, не способный полноценно функционировать в условиях гипоксии тканей [9, 12]. К сожалению, этот путь окисления, шунтирующий часть основного потока электронов, не сопряжён с образованием высокоэнергетических

потенциалов и, теоретически, эффективность окислительного фосфорилирования в зоне II фермент-субстратного комплекса в 1,5–2 раза ниже, чем в зоне I (NADH-зависимого) участка ДЦ [10].

Выявленная нами оптимизация работы I митохондриального комплекса, предполагаемая «минимизация» потребления O_2 и АТФ миокардом на фоне применения нифедипина [24] явилась, на наш взгляд, важным элементом его вибропротективного действия, что подтвердилось следующими результатами гистоморфологического анализа ткани. Если неблагоприятные эффекты вибрации неизменно вызывали дистрофию кардиомиоцитов, уменьшение капиллярной сети, спазм артериол, увеличение межклеточного и межпучкового отёка, очаги кровоизлияний и некроза [3, 23], то гистоморфологическая картина ткани миокарда у животных, получавших нифедипин, была более благоприятна. В частности, в кардиомиоцитах наблюдались признаки набухания и зональной дистрофии, признаки компенсаторной реакции в виде гипертрофии отсутствовали, стромально-клеточная реакция была представлена преимущественно лимфоцитарными элементами. Несмотря на то, что степень полнокровия в сосудах сердца оказалась значительно выраженной и отмечались диapedезные кровоизлияния в миокарде, дистрофические изменения были ограничены, признаки некроза ткани миокарда отсутствовали.

Выводы

На основании проведённой экспериментальной работы можно сделать следующие выводы:

1. Совокупность изменений, характеризующих метаболические состояния митохондрий миокарда на фоне применения нифедипина, свидетельствует о том, что блокада транспорта ионов Ca^{2+} на уровне высокопороговых (HVA) потенциалзависимых ионных каналов L-типа клеточной мембраны влияет на функциональную активность дыхательной цепи кардиомиоцитов.
2. Блокада нифедипином транспорта ионов Ca^{2+} на уровне ионных каналов клеточной мембраны восстанавливает активность I фермент-субстратного комплекса дыхательной цепи.
3. Нифедипин оказывает регуляторное сдерживание активности сукцинатдегидрогеназы в зоне II фермент-субстратного комплекса, предупреждая низкоэнергетический сдвиг в ткани.
4. Блокада кальциевых каналов клеточной мембраны кардиомиоцитов на фоне вибрационного воздействия предотвращает развитие некротических изменений в ткани миокарда экспериментальных животных, свидетельствуя о его кардиопротективном действии.

Результаты данного исследования вошли в грантовые разработки Российского фонда фундаментальных исследований РАН (РФФИ № 10-04-00473, № 13-04-00186).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Белослудцев К.Н., Дубинин М.В., Белослудцева Н.В., Миронова Г.Д. Транспорт ионов Ca^{2+} митохондрии: механизмы, молекулярные структуры и значение для клетки. *Биохимия*. 2019;84(6):759–775. [Belosludtsev K.N., Dubinin M.V., Belosludtseva N.V., Mironova G.D. Transport ionov Ca^{2+} mitokhondriami: mekhanizmy, molekulyarnye struktury i znachenie dlya kletki [Mitochondrial Ca^{2+} transport: Mechanisms, molecular structures, and role in cells]. *Biokhimiya* [Biochemistry]. 2019;84(6):759–775. (In Russian)]. DOI: 10.1134/S0320972519060022.
2. Волчегорский И.А., Долгушин И.И., Колесников О.А., Цейликман В.Э. *Экспериментальное моделирование и лабораторная оценка адаптивных реакций организма*. Челябинск: Изд-во Челябинского государственного педагогического университета, 2000:167. [Volchegorskiy I.A., Dolgushin I.I., Kolesnikov O.A., Tseylikman V.E. *Eksperimental'noe modelirovanie i laboratornaya otsenka adaptivnykh reaktsiy organizma* [Experimental modeling and laboratory assessment of the adaptive reactions of the body]. Chelyabinsk:

- Chelyabinsk State Pedagogical University Publ., 2000:167. (In Russian)].
3. Воробьева В.В., Шабанов П.Д. Вибрационная модель гипоксического типа клеточного метаболизма, оценённая на кардиомиоцитах кролика. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2009;147(6):712–715. [Vorob'eva V.V., Shabanov P.D. Vibratsionnaya model' gipoksicheskogo tipa kletochnoy metabolisma, otsenennaya na kardiomiotsitakh krolika [Vibration model for hypoxic type of cell metabolism evaluated on rabbit cardiomyocytes]. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2009;147(6):712–715. (In Russian)].
 4. Каркищенко Н.Н. *Основы биомоделирования*. М.: ВПК, 2005:608 [Karkishchenko N.N. *Osnovy biomodelirovaniya* [The basics of biomodelling]. Moscow: VPK Publ., 2005:608. (In Russian)].
 5. Кирьяков В.А., Павловская Н.А., Лапко И.В., Богатырева И.А., Антошина Л.И., Ошкoderов О.А. Воздействие производственной вибрации на организм человека на молекулярно-клеточном уровне. *Медицина труда и промышленная экология*. 2018;9:34–43. [Kiryakov V.A., Pavlovskaya N.A., Lapko I.V., Bogatyreva I.A., Antoshina L.I., Oshkoderov O.A. Vozdeystvie proizvodstvennoy vibratsii na organizm cheloveka na molekulyarno-kletochnom urovne [Impact of occupational vibration on molecular and cell level of human body]. *Meditsina truda i promyshlennaya ekologiya* [Russian Journal of Occupational Health and Industrial Ecology]. 2018;9:34–43. (In Russian)]. DOI: 10.31089/1026-9428-2018-9-34-43.
 6. Кондрашова М.Н. *Аппаратура и порядок работы при полярографическом измерении дыхания митохондрий. Руководство по изучению биологического окисления полярографическим методом*. Под ред. М.Н. Кондрашовой. М.: Наука, 1973:50–59. [Kondrashova M.N. *Apparatura i porядok raboty pri polyarograficheskom izmerenii dykhaniya mitokhondriy. Rukovodstvo po izucheniyu biologicheskogo okisleniya polyarograficheskim metodom* [Equipment and procedure for polarographic measurement of mitochondrial respiration. Guidelines for the study of biological oxidation by the polarographic method]. Ed. by M.N. Kondrashova. Moscow: Nauka Publ., 1973:50–59. (In Russian)].
 7. Коротенко О.Ю., Панев Н.И., Корчагина Ю.С., Панев Р.Н., Данилов И.П. Формирование патологии внутренних органов у шахтёров с вибрационной болезнью. *Медицина труда и промышленная экология*. 2020;60(6):399–403. [Korotenko O.Yu., Panev N.I., Korchagina Yu.S., Panev R.N., Danilov I.P. Formirovaniye patologii vnutrennikh organov u shakhterov s vibratsionnoy bolezn'yu [Formation of pathology of internal organs in miners with vibration disease]. *Meditsina truda i promyshlennaya ekologiya* [Russian Journal of Occupational Health and Industrial Ecology]. 2020;60(6):399–403. (In Russian)]. DOI: 10.31089/1026-9428-2020-60-6-399-403.
 8. Костюк И.Ф., Капустник В.А. Роль внутриклеточного обмена кальция в развитии вазоспастических реакций при вибрационной болезни. *Медицина труда и промышленная экология*. 2004;7:14–18. [Kostyuk I.F., Kapustnik V.A. Rol' vnutrikletochnogo obmena kal'tsiya v razvitiy vazospasticheskikh reaktsiy pri vibratsionnoy bolezn'i [Role of intracellular calcium metabolism in the development of vasospastic reactions in vibration disease]. *Meditsina truda i promyshlennaya ekologiya* [Russian Journal of Occupational Health and Industrial Ecology]. 2004;7:14–18. (In Russian)].
 9. Лукьянова Л.Д. *Проблемы гипоксии: молекулярные, физиологические и медицинские аспекты*. М.: Медицина, 2004:520. [Luk'yanova L.D. *Problemy gipoksii: molekulyarnye, fiziologicheskie i meditsinskie aspekty* [Problems of hypoxia: molecular, physiological and medical aspects]. Moscow: Medicina Publ., 2004:520. (In Russian)].
 10. Минкевич И.Г. *Стехиометрия метаболических путей в динамике клеточных популяций. Компьютерные исследования и моделирование*. 2011;3(4):455–475. [Minkevich I.G. *Stekhiometriya metabolicheskikh putey v dinamike kletochnykh populyatsiy* [The stoichiometry of metabolic pathways in the dynamics of cellular populations]. *Komp'yuternye issledovaniya i modelirovaniye* [Computer Research and Modeling]. 2011;3(4):455–475. (In Russian)]. DOI: 10.20537/2076-7633-2011-3-4-455-475.
 11. Никольс Д. *Биоэнергетика. Введение в хемиосмотическую теорию*. М.: Мир, 1985:190. [Nicol's D. *Bioenergetika. Vvedenie v hemiosmoticheskuyu teoriyu* [Bioenergetics. An Introduction to the chemiosmotic theory]. Moscow: Mir Publ., 1985:190. (In Russian)].
 12. Скулачев В.П., Богачев А.В., Каспаринский Ф.О. *Мембранная биоэнергетика. Уч. пособие*. М.: Изд-во Московского университета, 2010:368. [Skulachev V.P., Bogachev A.V., Kasparinskiy F.O. *Membrane bioenergetics. Textbook*. Moscow: Moscow University Press, 2010:368. (In Russian)].
 13. Тихонова Г.И., Пиктужанская Т.Е., Горчакова Г.Ю., Чуранова А.Н., Брылева А.С. Влияние длительности и интенсивности воздействия производственных факторов на уровни смертности шахтёров-угольщиков. *Медицина труда и промышленная экология*. 2018;7:16–21. [Tikhonova G.I., Piktushanskaya T.E., Gorchakova T.Yu., Churanova A.N., Bryleva M.S. Vliyaniye dlitel'nosti i intensivnosti vozdeystviya proizvodstvennykh faktorov na urovni smernosti shakhterov-ugol'shchikov [Influence of duration and intensity of exposure to occupational hazards on mortality levels of coal miners]. *Meditsina truda i promyshlennaya ekologiya* [Russian Journal of Occupational Health and Industrial Ecology]. 2018;7:16–21. (In Russian)]. DOI: 10.31089/1026-9428-2018-7-16-21.

14. Третьяков С.В., Шпагина Л.А. Перспективы изучения структурно-функционального состояния сердечно-сосудистой системы у больных вибрационной болезнью в сочетании с артериальной гипертензией. *Медицина труда и промышленная экология*. 2017;12:30–34. [Tret'yakov S.V., Shpagina L.A. *Perspektivy izucheniya strukturno-funktsional'nogo sostoyaniya serdечно-sosudistoy sistemy u bol'nykh vibratsionnoy bolezni'yu v sochetanii s arterial'noy gipertenziei* [Prospects of studying structural and functional state of cardiovascular system in vibration disease patients with arterial hypertension]. *Meditsina truda i promyshlennaya ekologiya* [Russian Journal of Occupational Health and Industrial Ecology]. 2017;12:30–34. (In Russian)].
15. Abernethy D.R., Soldatov J. Structure-functional diversity of human L-type Ca^{2+} channel: Perspectives for new pharmacological targets. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2002;300(3):724–728. DOI: 10.1124/jpet.300.3.724.
16. Chernorudskiy A.L., Zito E. Regulation of calcium homeostasis by ER redox: a close-up of the ER/mitochondria connection. *J. Mol. Biol.* 2017;429(5):620–632. DOI: 10.1016/j.jmb.2017.01.017.
17. Hirabayashi Y., Kwon S.K., Paek H., Pernice W.M., Paul M.A., Lee J., Erfani P., Raczowski A., Petrey D.S., Pon L.A., Polleux F. ER-mitochondria tethering by PDZD8 regulates Ca^{2+} dynamics in mammalian neurons. *Science*. 2017;358(6363):623–630. DOI: 10.1126/science.aan6009.
18. Hrynevich S.V., Waseem T.V., Fedorovich S.V. Estimation of the mitochondrial calcium pool in rat brain synaptosomes using Rhod-2 AM fluorescent dye. *Biophysics*. 2017;62(1):75–78. DOI: 10.1134/S0006350917010079.
19. Leung A.W., Waranyuwatana P., Halestrap A.P. The mitochondrial phosphate carrier interacts with cyclophilin D and may play a key role in the permeability transition. *J. Biol. Chem.* 2008;283(39):26312–26323. DOI: 10.1074/jbc.M805235200.
20. Pogzig H., Becher C. Voltage-dependent cooperative interactions between Ca-channel blocking drugs in intact cardiac cell. *Annals N.Y. Acad. Sci.* 1989;560(1):306–308. DOI: 10.1111/j.1749-6632.1989.tb24110.x.
21. Raturi A., Simmen T. Where the endoplasmic reticulum and the mitochondrion tie the knot: The mitochondria-associated membrane (MAM). *Biochim. Biophys. Acta*. 2013;1833(1):213–224. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2012.04.013.
22. Tkachuk V.A., Avakian A.E. Molecular mechanisms of G-proteins with membrane receptors and second messenger systems. *Russian Journal of Physiology*. 2008;89(12):1478–1490.
23. Vorobieva V.V., Shabanov P.D. Exposure to whole body vibration impairs the functional activity of the energy producing system in rabbit myocardium. *Biophysics*. 2019; 64(2):251–255. DOI: 10.1134/S0006350919020210.
24. Wappl E., Mitterdorfer J., Glossmann H., Striessnig J. Mechanism of dihydropyridine interaction with critical binding residues of L-type Ca^{2+} channel $\alpha 1$ subunits. *J. Biol. Chem.* 2001;276(16):12730–12735. DOI: 10.1074/jbc.M010164200.
25. Widerberg A., Bergman S., Danielsen N., Lundborg G., Dahlin L.B. Nerve injury induced by vibration: prevention of the effect of a conditioning lesion by D 600, Ca^{2+} channel block. *Occup. Environ. Med.* 1997;54(5):312–315. DOI: 10.1136/oem.54.5.312.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Воробьёва Виктория Владимировна*, д.м.н., ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова» Минобороны России;
e-mail: v.v.vorobeva@mail.ru

Левченкова Ольга Сергеевна, к.м.н., доц., ФГБВОУ ВО «Смоленский государственный медицинский университет» Минздрава России;
e-mail: levchenkova-o@yandex.ru

Шабанов Пётр Дмитриевич, д.м.н., проф., ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова» Минобороны России;
e-mail: pdshabanov@mail.ru

Viktoriya V. Vorobieva*, Dr. Sci. (Med.), Institute of Experimental Medicine, Military Medical Academy named after S.M. Kirov of the Ministry of Defense of Russia;
e-mail: v.v.vorobeva@mail.ru

Olga. S. Levchenkova, Cand. Sci. (Med.), Assoc. Prof., Smolensk State Medical University of the Ministry of Health Care of Russia;
e-mail: levchenkova-o@yandex.ru

Petr D. Shabanov, Dr. Sci. (Med.), Prof., Institute of Experimental Medicine, Military Medical Academy named after S.M. Kirov of the Ministry of Defense of Russia;
e-mail: pdshabanov@mail.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author