

# ФАРМАКОЛОГИЯ СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТОЙ СИСТЕМЫ

## ИЗУЧЕНИЕ МЕХАНИЗМА КАРДИОПРОТЕКТОРНОГО ЭФФЕКТА НИФЕДИПИНА ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ВИБРАЦИИ У КРОЛИКОВ

В. В. Воробьева<sup>1, 2</sup>, Н. К. Мазина<sup>2</sup>, П. Д. Шабанов<sup>1</sup>

Изучали механизм вибропротекторного действия блокатора кальциевых каналов нифедипина на кардиомиоцитах кроликов. При длительной общей вибрации (в течение 56 дней) наблюдали перестройку функциональной активности митохондрий. Нифедипин (7,5 мг/кг внутрь) активировал НАД-зависимый участок дыхательной цепи и регуляторно сдерживал гиперактивацию сукцинатзависимого дыхания. Положительное энерготропное действие нифедипина сопровождалось сохранением гистоморфологической архитектоники миокарда кроликов.

**Ключевые слова:** вибрация, митохондрии, нифедипин, кардиопротекция

### ВВЕДЕНИЕ

Длительная общая вибрация оказывает повреждающее действие на биологические объекты, что выражается в нарушении структурной организации тканей, клеток и внутриклеточных органелл [11, 19]. Сердечно-сосудистая система является одной из наиболее чувствительных к вибрации. В производственных условиях у человека длительная вибрация вызывает более стабильные и значимые изменения сердечной деятельности и работы сосудов, чем курение и алкоголизм [22, 23]. В эксперименте вибрационное воздействие на изолированное сердце кролика приводит к возникновению зон ишемии [29], угнетению сократимости миокарда и его ритмической деятельности [24], снижает способность папиллярных мышц к релаксации [26].

В основе вибрационного повреждения биологических структур лежит гипоксия и ишемия, которые формируются вследствие нейрогуморальной дисрегуляции [3]. При этом, как правило, угнетается аэробный синтез АТФ, усиливаются анаэробный гликолиз и перекисное окисление липидов (ПОЛ), разобщается окислительное фосфорилирование в митохондриях, кардиомиоциты перегружаются  $Ca^{2+}$  [18]. Оптимальное количество  $Ca^{2+}$  в клетке регулируется энергозависимыми процессами торможения и усиления транспорта ионов, которые связаны с окислением эндогенной янтарной кислоты и определяются функциональной активностью митохондрий [7, 21].

Уменьшение избыточного накопления  $Ca^{2+}$  рассматривается как один из механизмов, предупреждающих повреждение ткани в условиях неблагоприятного воз-

действия внешних факторов и гипоксии. Среди лекарственных средств хорошо известна группа блокаторов кальциевых каналов, которые эффективны при многих сердечно-сосудистых заболеваниях, ведущим звеном патогенеза которых является гипоксия и энергодефицит [16]. На этом основании они рекомендованы при лечении вибрационной болезни [10].

Наряду с этим вибропротекторные свойства блокаторов кальциевых каналов, механизм их действия на уровне систем энергопродукции кардиомиоцитов, а также способность предупреждать неблагоприятный эффект вибрации на миокард до настоящего времени исследовались недостаточно. Цель настоящей работы состояла в изучении действия нифедипина на митохондрии миокарда кроликов в условиях длительной вибрации и оценка его потенциального вибропротекторного эффекта на основании биохимических и морфологических исследований.

### МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты проводили на 45 кроликах-самцах породы Шиншилла весом 2,5–3 кг в возрасте 3–4 месяца. Действие общей вертикальной вибрации с амплитудой 0,5 мм осуществляли с помощью промышленной установки УВ 70/200 (Машиностроительное объединение “Маяк”, г. Киров). Ежедневно в течение 56 дней (без выходных) проводили сеансы общей вибрации с частотой 44 Гц по 60 мин в утренние часы с 9.00 до 11.00 в осенне-зимний период. Программы экспериментов были одобрены Комиссией по биомедицинской этике ГОУ ВПО Кировской государственной медицинской академии.

В качестве средства фармакологической защиты от вибрации использовали нифедипин (“Pliva”, Хорватия) в дозе 7,5 мг/кг. Препарат вводили внутрь в виде суспензии через тонкий эластичный зонд за 60 мин до сеанса в течение 56 дней. Интактным (без вибрации) и

<sup>1</sup> Кафедра фармакологии (зав. — проф. П. Д. Шабанов) Военно-медицинской академии им. С. М. Кирова МО РФ, Санкт-Петербург, 194175, ул. Акад. Лебедева, 6.

<sup>2</sup> Кафедра фармакологии (зав. — проф. В. С. Заугольников) Кировской государственной медицинской академии Росздрава.

контрольным животным, которые подвергались общей вибрации без фармакологической защиты, вводили 2 мл 0,9 % раствора хлорида натрия.

Изучение функциональной активности нативных митохондрий [8] сердца кроликов проводили полярографическим методом [6] в ячейке 1 мл, при 37 °С в среде инкубации, уравновешенной с кислородом воздуха. Скорость дыхания митохондрий ( $V$ ) в зависимости от добавок в ячейку выражали в [нг-атом О мин<sup>-1</sup> мг<sup>-1</sup> белка]. Метаболические состояния митохондрий “покоя” и “активности” моделировали *in vitro* при варьировании экзогенных энергетических субстратов (до и после введения в ячейку 2,4-динитрофенола) [6, 17].

Вклад в эндогенную дыхательную активность ( $V_э$ ) митохондрий НАД- и ФАД-зависимых субстратов (НАД-ЗС и ФАД-ЗС) оценивали по данным ингибиторного анализа [12] с амиталом или малонатом, вводимыми в ячейку на фоне эндогенного дыхания до концентрации 2 ммоль [13, 17]. В качестве экзогенных субстратов использовали ФАД-ЗС — янтарную кислоту ( $V_{як}$ ), 1 ммоль или смесь НАД-ЗС — глутаминовой и яблочной кислот (Глу + мал) по 3 ммоль ( $V_{глу}$ ). Введением в ячейку разобщителя 2,4-динитрофенола (2,4-ДНФ) [6, 17] до 20 мкмоль имитировали состояние АТФ-азной активности митохондрий ( $V_{днф}$ ).

Отклик митохондрий на неблагоприятный фактор *in vivo* и фармакологическую защиту оценивали по совокупности кинетических ( $V$ ) и расчетных параметров. В разных метаболических состояниях органелл рассчитывали коэффициенты приращения (КП) сукцинат-зависимого дыхания в состоянии покоя ( $\pi$ ) и разобщения ( $\rho$ ):  $КП_{\pi} = [ФАД/НАД]_{\pi} = \text{мал.ч./ам.ч.}$ ;  $КП_{\rho} = [ФАД/НАД]_{\rho} = V_{як}/V_{глу+мал}$ ;  $КП_{\rho} = [ФАД/НАД]_{\rho} = V_{як-р} V_{глу+мал-р}$ , где мал.ч и ам.ч — доли малонат- и амиталчувствительного эндогенного дыхания,  $V_{як}$  и  $V_{глу+мал}$  — скорости окисления экзогенного сукцината и смеси глутамата и малата в состоянии “покоя”,  $V_{як-р}$  и  $V_{глу+мал-р}$  — скорости окисления субстратов в “активном” состоянии Мх в условиях АТФ-азной нагрузки, моделируемой с помощью разобщителя 2,4-ДНФ [13]. Регуляторные параметры количественно характеризовали переход митохондрий в разные состояния (от эндогенного в состояние “покоя”; от “покоя” в “активное” состояние). Рассчитывали коэффициенты стимуляции (КС):  $КС_c = V_c/V_э$ ;  $КР_c = V_{c-р}/V_c$ , где:  $КС_c$  — стимуляция эндогенного дыхания экзогенным субстратом ( $c$ ),  $V_c$  — скорость дыхания митохондрий после добавления экзогенного субстрата (сукцинат или Глу + мал);  $КР_c$  — стимуляция субстратного дыхания 2,4-ДНФ,  $V_{c-р}$  — скорость окисления экзогенного субстрата после добавления 2,4-ДНФ.  $КС_c$  и  $КР_c$  выражали в относительных единицах.

Повреждающее действие общей вибрации на миокард и кардиопротекторные свойства нифедипина подтверждали гистологически. Обработку гистологического материала (ткань мышцы миокарда левого желу-

дочка в области верхушки) осуществляли в ходе стандартной гистологической спиртопарафиновой проводки. Окрашивание препаратов производили гематоксилином и эозином. Статистическую обработку данных проводили с помощью программ Statistica for Windows 6.0. Значимость межгрупповых различий оценивали по параметрическому ( $t$ -критерий Стьюдента) или непараметрическому ( $U$ -тест Вилкоксона – Манна – Уитни) критериям в зависимости от типа распределения.

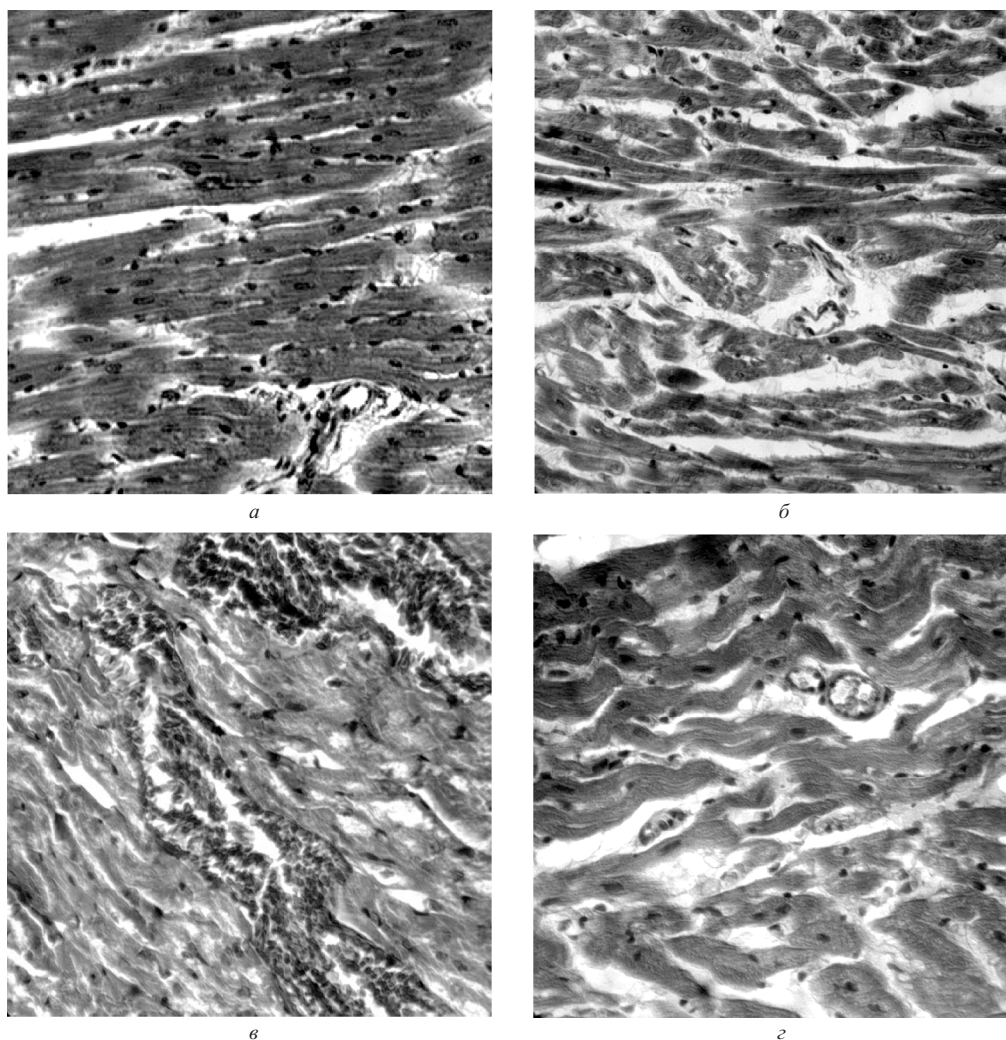
## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Длительная общая вибрация оказывала неблагоприятное действие на миокард. Перестройки морфогистологической архитектоники миокарда имели повреждающий характер (рис. 1). Типичные изменения включали: ухудшение тинкториальных свойств клеточных элементов ткани, дистрофию кардиомиоцитов и пикнолиз их ядер, уменьшение капиллярной сети, спазм артериол, явления межклеточного и межпучкового отека, обширные очаги кровоизлияний и некроза.

После 56 сеансов общей вибрации с предварительным введением нифедипина морфогистологическая структура миокарда характеризовалась гораздо менее выраженными повреждениями и приближалась к таковой у интактных животных. Межпучковые и межклеточные отеки были незначительно выражены, кардиомиоциты сохраняли свои размеры, форму, ядра и тинкториальные свойства, наблюдались очаги активного ангиогенеза.

Системы энергопродукции миокарда кроликов активно вовлекались в ответную реакцию организма, как на длительное воздействие общей вибрации [2], так и на введение нифедипина. Однако параметры функциональной активности митохондрий при этом изменялись разнонаправленно (рис. 2).

Ни общая вибрация, ни введение нифедипина не влияли на скорость окисления эндогенных субстратов ( $V_э$ ), рис. 2, а. Однако согласно результатам ингибиторного анализа при общей вибрации и действии нифедипина соотношение вклада эндогенных НАД-ЗС и янтарной кислоты в эндогенное дыхание ( $V_э$ ) сильно различалось (рис. 2, б). Значения показателя чувствительности к амиталу после общей вибрации не отличались от такового интактных животных, однако чувствительность к малонату возрастала более чем в 1,5 раза ( $p < 0,001$ ), что указывало на преобладание окисления эндогенной янтарной кислоты и активизацию сукцинатдегидрогеназы (СДГ) в процессе формирования ответной реакции миокарда на неблагоприятное воздействие. Напротив, при введении нифедипина на фоне общей вибрации чувствительность к амиталу возрастала на 38 % ( $p = 0,05$ ), тогда как чувствительность к малонату оставалась на уровне интактных животных. Следовательно, при неблагоприятном воздействии общей вибрации энергопродукция в кардиомиоцитах осуществлялась преимущественно за счет эндогенной янтарной кислоты. При защите нифедипи-



**Рис. 1.** Морфогистологическая архитектура миокарда кроликов после 56 сеансов общей вибрации и профилактического введения нифедипина.

*а* — интактные животные, *б* — после 56 сеансов общей вибрации (межклеточный и межпучковый отеки, дистрофия кардиомиоцитов); *в* — после 56 сеансов общей вибрации (зоны микроинфарктов и кровоизлияний), *з* — сохранность кардиомиоцитов и явления ангиогенеза при введении нифедипина в течение 56 сеансов общей вибрации. Окраска гематоксилином и эозином, ув.  $\times 180$ .

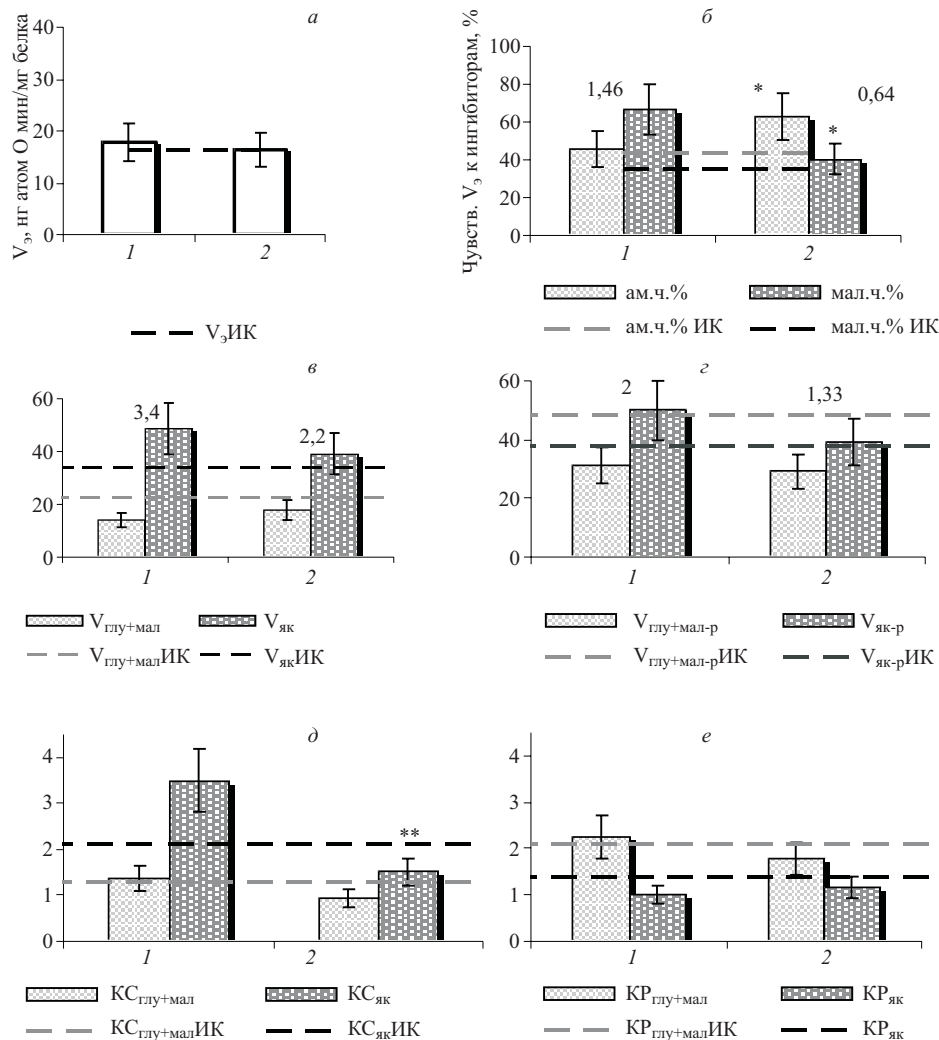
ном активизировался НАД-зависимый участок дыхательной цепи митохондрий, а активность ФАД-зависимого практически не изменялась по сравнению с интактными животными. В соответствии с этим КП<sub>р</sub> уменьшался на 57 %.

Этот феномен полностью подтвердился при окислении экзогенных НАД-ЗС и янтарной кислоты в функциональном состоянии митохондрий “покоя” (рис. 2, *в*) и “активности” (рис. 2, *з*). Скорость окисления 1 ммоль сукцината при неблагоприятном действии общей вибрации резко увеличивалась. Введение нифедипина приводило к уменьшению прироста  $V_{\text{як}}$  в обоих метаболических состояниях митохондрий, но мало влияло на темпы окисления Глу + мал. В соответствии с этим значения КП<sub>р</sub>, с одной стороны, свидетельствовали о доминировании системы окисления сукцината в дыхательной активности кардиомиоцитов, с другой — о фармакологическом ограничении этого домини-

рования при введении нифедипина. Способность нифедипина сдерживать гиперактивацию сукцинатзависимой биоэнергетики также соответствовала изменению коэффициентов КС (рис. 2, *д*, *е*): КС<sub>як</sub> снижался на 58 % ( $p \leq 0,01$ ), а КС<sub>Глу + мал</sub> снижался в меньшей мере — на 30 % ( $p \leq 0,05$ ) по отношению к интактным животным и после общей вибрации. При этом процессы сопряжения, судя по значениям КП<sub>р</sub>, в НАД-зависимом звене дыхательной цепи митохондрий преобладали по сравнению с ФАД-зависимым, независимо от воздействия общей вибрации и нифедипина.

Следовательно, перестройки в системах энергопродукции миокарда при фармакологической защите нифедипином свидетельствуют о том, что его протекторное действие, которое подтверждено в нашем исследовании гистологически, связано с повышением окислительной активности и сохранением сопрягающих механизмов НАД-зависимого участка дыхатель-





**Рис. 2.** Влияние нифедипина на показатели функциональной активности митохондрий кардиомиоцитов кролика при действии вибрации.

*a* — скорость эндогенного дыхания ( $V_3$ ); *b* — соотношение парциальных реакций эндогенного дыхания ( $V_3$ ); *в* — скорости окисления НАД-ЗС и ФАД-ЗС в состоянии "покоя"; *г* — скорости окисления НАД-ЗС и ФАД-ЗС в состоянии "активности"; *д* — показатели переходных состояний "покоя"; *e* — показатели переходных состояний "активности". Пунктир — интактный контроль; 1 — вибрация; 2 — вибрация + нифедипин. Цифры возле столбиков диаграмм — КП<sub>3</sub> (*b*); КП<sub>н</sub> (*в*) и КП<sub>р</sub> (*г*); \* —  $p \leq 0,05$ , \*\* —  $p \leq 0,01$  между группами 1 и 2.

ной цепи митохондрий, а также регуляторным ограничением активности СДГ.

Согласно литературным данным [10], вибрация активирует сократительный аппарат сердечной мышцы через симпатoadреналовую систему и высвобождает цитоплазматический и депонированный кальций. В процессе реализации основного механизма фармакодинамики нифедипина снижается активность работы кальциевых каналов и уровни кальция в кардиомиоцитах [25]. Это ведет к уменьшению силы сердечных сокращений [4], уменьшению сердечного выброса, увеличению диастолического расслабления [15]. В результате этого потребность миокарда в кислороде и "макроэргах" снижается [4], а эффективность работы кардиомиоцитов увеличивается.

Таким образом, обнаруженная нами оптимизация работы НАД-зависимого участка дыхательной цепи

митохондрий и регулируемое фармакологическое ограничение гиперактивации СДГ, обеспечивают "минимизацию" потребления  $O_2$  и сохранение наработки АТФ и согласуются с современными представлениями о механизме действия блокаторов кальциевых каналов. В соответствии с разрабатываемой в настоящее время классификацией лекарственных средств по их влиянию на функции митохондрий [9], нифедипин, как блокатор кальциевых каналов, может быть отнесен к группе препаратов, регулирующих функции митохондрий по типу ограничения гиперактивности СДГ (ключевого фермента ФАД-зависимого звена дыхательной цепи).

В качестве средств фармакологической коррекции сформировавшихся вибрационноопосредованных повреждений миокарда и сосудов многие исследователи предлагают блокаторы кальциевых каналов 1 и 2 поко-

лений [3, 19, 27]. Полученные нами результаты о вибропротекторном действии нифедипина и реализации его механизма действия на уровне НАД- и ФАД-зависимых участков дыхательной цепи митохондрий могут быть использованы как патогенетическое обоснование не только лечебного, но и профилактического приема блокаторов кальциевых каналов у лиц, работающих в виброопасных условиях.

## ВЫВОДЫ

1. Неблагоприятное влияние общей вибрации на миокард сопровождается активацией ФАД-зависимого и угнетением НАД-зависимого участков дыхательной цепи митохондрий, в частности, усилением активности сукцинатдегидрогеназы и повышением вклада эндогенной янтарной кислоты в окисление энергетических субстратов.

2. Блокатор кальциевых каналов нифедипин оказывает протекторное действие на системы энергопродукции миокарда при вибрации. Механизм фармакологической вибропротекции заключается в повышении окислительной и сохранении сопрягающей активности НАД-зависимого участка дыхательной цепи митохондрий, а также в регуляторном сдерживании гиперактивации ФАД-зависимого участка, в частности, сукцинатдегидрогеназы, ответственной за окисление янтарной кислоты.

## ЛИТЕРАТУРА

1. В. В. Воробьева, *Автореф. дис. канд. мед. наук*, Саранск (2006).
2. В. В. Воробьева, *Пермский мед. журн.*, **23**(3), 6 – 12 (2006).
3. О. И. Гоголева, *Автореф. дис. д-ра мед. наук*, Пермь (2000).
4. Г. Катцунг, *Базисная и клиническая фармакология: в 2-х т.*, Невский диалект, Санкт-Петербург (1998).
5. В. В. Коломиец, *Гигиена труда и проф. заболевания*, **10**, 21 – 24 (1987).
6. М. Н. Кондрашова, *Руководство по изучению биологического окисления полярографическим методом*, Наука, Москва (1973).
7. М. Н. Кондрашова, *Молекулярные механизмы клеточного гомеостаза*, Новосибирск (1987).

8. М. Н. Кондрашова, Т. В. Сирота, А. В. Темнова и др., *Биохимия*, **2**, 154 – 163 (1997).
9. М. Н. Кондрашова, В. А. Хазанов, *Регуляторы энергетического обмена. Клинико-фармакологические аспекты*, Москва (2003), сс. 18 – 31.
10. И. Ф. Костюк, В. А. Капустник, *Медицина труда и пром. экология*, **7**, 14 – 17 (2004).
11. С. А. Лытаев, А. Б. Шангин, *Вестн. новых мед. технологий*, **2**, 11 – 14 (1999).
12. Е. И. Маевский, М. Н. Кондрашова, *Митохондриальные процессы во временной организации жизнедеятельности*, Пушино (1978), сс. 24 – 32.
13. Е. И. Маевский, А. С. Розенфельд, Е. В. Гришина, М. Н. Кондрашова и др., *Митохондрии в патологии*, Пушино (2001).
14. Н. К. Мазина, *Автореф. дис. д-ра мед. наук*, Томск (2007).
15. С. Ю. Марцевич, *Кардиология*, **9**, 91 – 96 (1999).
16. В. И. Метелица, *Справочник по клинической фармакологии сердечно-сосудистых лекарственных средств*, Медпрактика, Москва (1996).
17. Д. Никольс, *Биоэнергетика. Введение в хемиосмотическую теорию*, Мир, Москва (1985).
18. А. Г. Погорелов, В. Н. Погорелова, М. И. Дубровкин, *Биофизика*, **47**, 744 – 751 (2002).
19. Е. Л. Потеряева, *Автореф. дис. д-ра мед. наук*, Новосибирск (1999).
20. И. Р. Саакян, С. Г. Саакян, М. Н. Кондрашова, *Биохимия*, **7**, 976 – 984 (2001).
21. В. П. Скулачев, *Энергетика биологических мембран*, Наука, Москва (1989).
22. С. Н. Филимонов, Л. А. Данилевская, Я. А. Горбатовский и др., *Клин. мед.*, **11**, 34 – 37 (2002).
23. M. Bovenzi, *Kurume Med. J.*, **37**, 85 – 94 (1990).
24. K. V. Campbell, Y. Wu, and R. D. Kirkpatrick, *Amer. J. Physiol.*, **274**, 1141 – 1151 (1998).
25. R. E. Clark, I. Y. Christieb, P. D. Henry, et al., *Amer. J. Cardiol.*, **44**, 825 – 831 (1979).
26. P. M. Janssen, P. Schiereck, H. Honda, et al., *Pflugers Arch.*, **434**, 6, 795 – 800 (1997).
27. T. Matoba and M. Chiba, *Angiology*, **36**(12), 19 – 26 (1985).
28. J. M. Saxton, *Occup. Med.*, **50**(2), 121 – 130 (2000).
29. T. Shishido, M. Sugimachi, O. Kawaguchi, et al., *Amer. J. Physiol.*, **274**, 1404 – 1415 (1998).
30. A. Widerberg, S. Bergman, N. Danielsen, et al., *Occup. Environ. Med.*, **54**(5), 312 – 315 (1997).

Поступила 03.04.08

## MECHANISM OF THE CARDIOPROTECTIVE EFFECT OF NIFEDIPINE IN RABBITS UNDER VIBRATION EXPOSURE CONDITIONS

V. V. Vorob'eva<sup>1</sup>, N. K. Mazina<sup>2</sup>, and P. D. Shabanov<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Pharmacology, Military Medical Academy, ul. Lebedeva 6, St. Petersburg, 194175, Russia

<sup>2</sup> Department of Pharmacology, Kirov State Medical Academy, Russia

Mechanisms of the vibroprotective action of nifedipine, a calcium channel blocker, have been studied in myocardiocytes of rabbits. Changes in the functional activity of mitochondria were observed in rabbits after prolonged (56 days) general vibration. Nifedipine (7.5 mg/kg *per os*) activated the NAD-dependent site of respiratory chain and prevented hyperactivation of the succinate-dependent breath. The positive energotropic action of nifedipine was accompanied by stability of the histomorphological cytoarchitecture of rabbit myocardium. It is suggested that nifedipine protects myocardium from negative effects of prolonged vibration.

**Key words:** Vibration, mitochondria, nifedipine, cardioprotection