

ИЗМЕНЕНИЕ ОСНАЩЕННОСТИ МИТОХОНДРИЙ МИОКАРДА КРОЛИКА ЭНДОГЕННЫМИ ЭНЕРГЕТИЧЕСКИМИ СУБСТРАТАМИ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ЧАСТОТЫ И ДЛИТЕЛЬНОСТИ ВИБРАЦИИ

© 2021 г. В.В. Воробьева, П.Д. Шабанов

Институт экспериментальной медицины, 197376, Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, 12

E-mail: v.v.vorobeva@mail.ru

Поступила в редакцию 29.02.2020 г.

После доработки 29.02.2020 г.

Принята к публикации 14.04.2021 г.

Изучено изменение оснащенности митохондрий миокарда энергетическими субстратами в зависимости от частоты и длительности общей вертикальной вибрации полярографическим методом с помощью закрытого кислородного датчика гальванического типа (электрода Кларка) путем сопоставления скорости эндогенного дыхания на протяжении времени хранения гомогената в аэробных условиях. Наиболее длительное (56 сеансов) вибрационное воздействие с амплитудой 0.5 мм и частотой 44 Гц вызвало падение скорости эндогенного дыхания через 40 мин инкубации гомогената ткани миокарда в 1.4 раза ($p < 0.05$) по сравнению с контролем, свидетельствуя о развитии угнетения в системе окисления и утилизации янтарной кислоты, снижении доступности эндогенных субстратов к дыхательной цепи митохондрий кардиомиоцитов и, косвенно, о нарушении структуры и функции митохондриально-ретикулярной сети.

Ключевые слова: вибрация, митохондрии, энергетический обмен миокарда, янтарная кислота, митохондриально-ретикулярная сеть

DOI: 10.31857/S0006302921040116

Согласно результатам экспериментальных [1, 2] и клинических [3] исследований сердце является одним из наиболее чувствительных к воздействию вибрации органов. Формирующийся на фоне вибрации гипоксический тип клеточного метаболизма [4, 5] и уменьшение синтеза макроэргов влечет за собой развитие миокардиодистрофии. Учитывая высокую медико-социальную значимость вибрационной болезни особое прикладное значение приобретает детальное изучение вибрационной уязвимости системы энергопродукции миокарда [6].

Изучение окислительного метаболизма возможно в переживающих препаратах свежеприготовленных срезов, изолированных митохондрий и гомогенатов тканей [7]. Как известно, митохондрии в клетке объединены в единую митохондриально-ретикулярную сеть, которая благодаря специфическим механизмам подвижности вызывает распад или слияние митохондрий [8]. Пространственная структура, площадь и плотность разветвленной митохондриальной сети определяются типом ткани и ее потребностью в энергии [9] и, в свою очередь, обеспечивают регуляцию физиологического состояния клеток. Клетки сердечной, скелетной мышцы и нейроны характери-

зуются наиболее высокой плотностью митохондриальной сети, что и определяет их наибольшую чувствительность к нарушениям энергетического обмена различной этиологии. Процесс укрупнения митохондрий, их слияние в комплексы происходит благодаря белкам цитоскелета и имеет адаптационное значение при умеренных по силе стрессовых воздействиях. Если неблагоприятное воздействие выходит за границы физиологической нормы, наблюдается необратимый распад митохондриально-ретикулярной сети [10].

Целью нашего исследования стало изучение динамики скорости эндогенного дыхания в переживающем гомогенате ткани миокарда после вибрационного воздействия различной частоты и продолжительности.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты проведены на 75 кроликах-самцах породы Шиншилла (*Oristolagus cuniculus*, *Linnaeus*) массой 2.5–3.0 кг, в возрасте трех-четырех месяцев. Действие общей вертикальной вибрации с амплитудой 0.5 мм осуществляли с помощью промышленной установки УВ 70/200. Ежедневно в течение 7, 21 и 56 суток проводили

сеансы вибрации с частотой 8 Гц (низкочастотная вибрация) и 44 Гц (высокочастотная вибрация) по 60 мин в утренние часы с 9.00 до 11.00 в осенне-зимний период.

Некропсию животных осуществляли на фоне легкого эфирного наркоза методом воздушной эмболии путем введения в ушную артерию 5 мл воздуха. После вскрытия грудной клетки быстро извлекали сердце и помещали в среду выделения фиксированного состава, охлажденную до 0°C. Для имитации состава внутриклеточной среды использовали апробированные в других исследованиях [9] сложные солевые растворы. Концентрация компонентов среды выделения составляла 250 мМ сахарозы, 10 мМ трис-HCl (pH 7.2); концентрация компонентов среды инкубации — 10 мМ трис-HCl (pH 7.2), 20 мМ KH_2PO_4 , 10 мМ MgSO_4 , 150 мМ KCl. Все растворы готовили *ex tempore* на бидистиллированной воде.

После промывания от крови кусочки верхушки сердца массой примерно 250–300 мг помещали в охлажденный 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. Ткань разрушали мягкими продольными движениями пестика (15 тракций), затем гомогенат процеживали через капроновую сетку в охлажденную пробирку. Через 7–10 мин от момента извлечения тканей из организма животного получали 30%-й гомогенат [10].

Временной режим забора ткани миокарда, гомогенизации и инкубации был стандартизован. С момента забоя животного до окончания полярографического измерения показателей активности митохондрий тканей проходило не более 40 мин, что соответствовало методическим требованиям обеспечения адекватности статуса митохондрий *in vitro* их «нативному» состоянию, максимально приближенному к *in vivo* [10].

Для получения нативных митохондрий исключали этап промывки, использовали высококонцентрированный гомогенат, а из среды выделения и среды инкубации исключали этилендиаминтетрауксусную кислоту [8], тем самым сохраняя пул эндогенных метаболитов и уровни ионов Ca^{2+} и Mg^{+} , характерные для исходного состояния ткани на момент изъятия из организма животного-биомодели. Работа с митохондриями в составе тканевого гомогената обеспечивает их структурно-функциональную сохранность и позволяет дифференцировать экспериментальных животных по биоэнергетическому статусу ткани в зависимости от различных внешних воздействий, направленных на целостный организм [10].

Изучение функционального состояния нативных митохондрий в составе гомогената проводи-

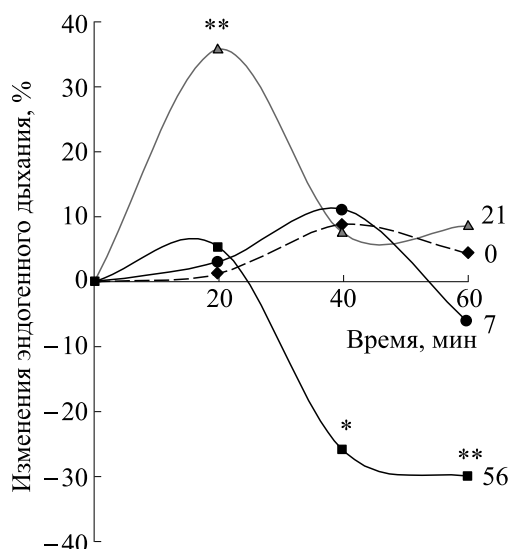
ли полярографическим методом с помощью закрытого кислородного датчика гальванического типа [11] в термостатируемой кювете объемом 1 мл при постоянном перемешивании в солевой среде инкубации, уравновешенной по газовому составу с воздухом при температуре 37°C. Полярографическая измерительная установка, в соответствии с требованиями метода, состояла из электрода, ячейки с перемешивающим стержнем, термостатируемого кожуха, водяного термостата ИТЖ-0 03 (Россия), самописца LKB-2210 2-Channel Recorder (Швеция). Скорость дыхания митохондрий (V) выражали в (нг-атом O) $\text{мин}^{-1} \text{мг}^{-1}$ белка.

Для оценки динамики истощения эндогенных энергетических субстратов в ткани использовали тест «временной деградации митохондрий» [7], в котором сопоставляли изменчивость скорости эндогенного дыхания (V_3) на протяжении 60 мин хранения гомогената в аэробных условиях при комнатной температуре 18–20°C. Каждые 20 мин отбирали пробы для измерения V_3 и относили значения к исходной скорости эндогенного дыхания, измеренной тотчас же после получения свежего гомогената.

Статистическую обработку данных проводили с помощью пакета 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 ОБСУЖДЕНИЕ

После семи сеансов вибрации с частотой 8 Гц на 60-й минуте наблюдали снижение скорости эндогенного дыхания относительно исходного уровня в 1.4 раза ($p < 0.01$), но после 56 сеансов вибрации был отмечен рост скорости дыхания гомогената на 40-й и 60-й минутах в 1.2 раза относительно исходного уровня ($p < 0.01$), достоверно превосходящий изменения в ткани интактного контроля. Вероятно, слабый раздражитель в виде низкочастотной непродолжительной (семь сеансов) вибрации, возбуждая ткань, одновременно включает компенсаторные механизмы, направленные на сохранение гомеостаза. Основным механизмом адаптивной компенсации на уровне системы энергопродукции клетки является активизация и регуляция (сдерживание) сукцинатзависимых реакций, в том числе и в переживающей ткани [12], вызывающие эффект «энергетического затормаживания» или «превентивное торможение» [11]. Подобное активное сдерживание сукцинатзависимой системы окисления соответствует отрегулированному состоянию энергетического обмена. Как предполагают, именно это



Влияние вибрации 44 Гц на изменчивость эндогенного дыхания (V_3) нативных митохондрий сердца кролика в тесте временной деградации. Ось абсцисс — время инкубации гомогената в минутах; ось ординат — диапазон и направленность изменений эндогенного дыхания в % от исходного уровня (V_{31}). Цифры возле кривых — количество сеансов вибрации; * — статистически значимые различия с исходным показателем (V_{31}); * — $p \leq 0.05$, ** — $p \leq 0.01$.

явление обеспечивает усиление процессов сано-генеза и лечебный эффект вибрации с определенными физическими характеристиками, широко используемый в клинике целого ряда заболеваний [13, 14]. Значительный рост V_3 после 56 сеансов низкочастотной вибрации свидетельствует о «возбужденном» состоянии системы энергопродукции. Для подобного состояния ткани характерно преобладание активности сукцинатзависимой системы окисления, что соответствует стадии «резистентности» при формировании адаптивной реакции в системе энергопродукции митохондрий кардиомиоцитов или стадии I биоэнергетической гипоксии [12].

Динамика изменения скорости эндогенного дыхания после семи сеансов вибрации с частотой 44 Гц на 20-й и 40-й минутах переживания гомогената идентична intactному контролю (рис. 1). На 60-й минуте отмечается снижение показателя эндогенного дыхания относительно V_{31} в 1.1 раза и в 1.4 раза относительно V_{31} intactной контрольной группы ($p < 0.01$). Двадцать один сеанс высокочастотной вибрации вызвал резкий подъем эндогенного дыхания относительно нулевого показателя в 1.4 раза ($p < 0.01$) через 20 мин инкубации гомогената и в 1.1 раза — через 40 мин, оставаясь на данном уровне и через 60 мин переживания ткани в проводимом тесте. Это может свидетельствовать о крайне возбужденном состоянии ткани, когда ско-

рости дыхания достигают максимальных величин, нарастая с 16.5 ± 4.2 у контрольных животных до 25.9 ± 6.6 (нг-атом О) $\text{мин}^{-1}\text{мг}^{-1}$ белка у животных, подвергнутых 21 сеансу вибрации с частотой 44 Гц, и происходит смена метаболических путей субстратного обеспечения миокарда с доминированием метаболизма янтарной кислоты [15].

После пролонгации вибрационного воздействия с частотой 44 Гц до 56 сеансов наблюдали падение скорости V_3 через 40 мин инкубации в 1.4 раза ($p < 0.05$) и дальнейшее плавное снижение до уровня 17.7 ± 5.7 (нг-атом О) $\text{мин}^{-1}\text{мг}^{-1}$ белка, что, вероятно, свидетельствует о развитии угнетения в системе окисления и утилизации янтарной кислоты, снижении доступности эндогенных субстратов к дыхательной цепи митохондрий кардиомиоцитов, формированию низкоэнергетического сдвига и нарастании дистрофических изменений в ткани миокарда вплоть до развития некротических изменений [16].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Настоящее экспериментальное исследование посвящено изучению влияния общей вертикальной вибрации с амплитудой 0.5 мм, частотой 8 и 44 Гц на протяжении 7, 21 и 56 сеансов по 60 мин на функциональную активность системы энергопродукции миокарда кролика посредством анализа скорости эндогенного дыхания в переживающих гомогенатах ткани сердца (миокарда) кролика.

Измерение дыхания митохондрий в составе тканевых гомогенатов проводилось полярографическим методом согласно методическим рекомендациям М.Н. Кондрашовой (ПНЦБИ РАН, Пушкино).

Было обнаружено, что в процессе формирования ответной реакции миокарда на вибрационное воздействие с различной частотой и длительностью его энергетические потребности возрастают и начинают восполняться за счет эндогенных энергетических ресурсов, уровень и доступность которых отражается в скорости эндогенного дыхания (V_3) митохондрий в гомогенате ткани и зависит от физических параметров стрессирующего вибрационного фактора. Тест «временной деградации митохондрий», отражая оснащенность митохондрий миокарда эндогенными энергетическими субстратами, может выступать в качестве метаболического критерия функционального состояния ткани и свидетельствовать о силе клеточного ответа на воздействие вибрации.

В эксперименте *in vitro* подтвердили важность сохранения биофизической организации нативных митохондрий в тканевом гомогенате. Работа с концентрированными по белку гомогенатами тканей позволяет информативно выявить силу и

направленность возбуждающих и повреждающих воздействий в организме экспериментальных животных.

Динамика показателя скорости эндогенного дыхания митохондрий в тесте временной деградации на фоне вибрационного воздействия также косвенно свидетельствует о нарушении функции митохондриально-ретикулярной сети, ее распаде и утрате регулирующей функции в адаптации. Можно предположить, что эти процессы протекают параллельно смене «метаболических путей» при стрессирующем воздействии и находят выражение в формировании митохондриальной дисфункции или биоэнергетической гипоксии.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (№№10-04-00473, №13-04-00186).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и институциональные принципы ухода и использования животных при выполнении работы были соблюдены. Исследования были выполнены 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.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. P. M. Janssen, A. Schiereck, and H. Honda, *Pflugers Arch.* **434** (6), 795 (1997).
2. T. A. Shishido, M. Sugimachi, and O. Kawaguchi, *Amer. J. Physiol.* **274**, 1404 (1998).
3. Е. Л. Потеряева, Е. Л. Амирова и Н. Г. Никифорова, *Медицина труда и промышленная экология*, № 6, 19 (2015).
4. V. V. Vorobieva and P. D. Shabanov, *Bull. Experim. Biol. Med.* **147** (6), 768 (2009).
5. J. M. Saxton, *Occup. Med.* **50** (2), 121 (2000).
6. В. А. Панков и М. П. Дьякович, *Медицина труда и промышленная экология*, № 3, 1 (2003).
7. Л. Д. Лукьянова, Дис. ... д-ра биол. наук (Москва, 1971).
8. М. В. Захарченко, Н. В. Хундерякова и М. Н. Кондрашова, *Биофизика* **56** (5), 840 (2011).
9. В. В. Воробьева и П. Д. Шабанов, *Обзоры по клинич. фармакологии и лекарственной терапии* **14** (1), 46 (2015).
10. М. Н. Кондрашова, Т. В. Сирота, А. В. Темнов и др., *Биохимия* **62** (2), 154 (1997).
11. *Руководство по изучению биологического окисления полярографическим методом*, под ред. Г. М. Франка и М. Н. Кондрашовой (Наука, М., 1973).
12. Л. Д. Лукьянова, *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*, № 1, 3 (2011).
13. С. А. Лытаев и А. Б. Шангин, *Вестн. новых мед. технологий* **6** (2), 11 (1999).
14. Д. И. Рощупкин, Е. Е. Фесенко и В. И. Новоселов, *Биофизика органов* (Наука, М., 2000).
15. В. В. Воробьева и П. Д. Шабанов, *Биофизика* **64** (2), 337 (2019).
16. В. В. Воробьева и П. Д. Шабанов, *Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова* **95** (8), 857 (2009).

A Change in the Content of Endogenous Energy Substrates in Rabbit Myocardium Mitochondria Depending upon Frequency and Duration of Vibration

V.V. Vorobieva and P.D. Shabanov

Institute of Experimental Medicine, ul. Akademika Pavlova 12, St. Petersburg, 197376 Russia

A change in the content of energy substrates in myocardial mitochondria depending upon the vibration frequency and the duration of the total vertical vibration exposure was studied polarographically using a closed galvanic oxygen sensor (the Clark electrode) by comparing the endogenous respiration rates over a period when the homogenate was stored under aerobic conditions. After exposure to the longest vibration (56 sessions) with amplitude of 0.5 mm and frequency of 44 Hz, the rate of endogenous respiration after 40-min incubation of myocardial tissue homogenate was 1.4 times slower ($p < 0.05$) than the control. It indicated the development of bottlenecking in the oxidation and utilization pathways of succinic acid, a decrease in the availability of endogenous substrates to the respiratory chain of cardiomyocytes mitochondria and, indirectly mitochondrial-reticular network disruption and dysfunction.

Keywords: vibration, mitochondria, myocardial energy metabolism, succinic acid, mitochondrial-reticular network