

ФАРМАКОЛОГИЧЕСКАЯ БЛОКАДА ВЫСОКОПОРОГОВЫХ КАЛЬЦИЕВЫХ КАНАЛОВ L-ТИПА КАРДИОМИОЦИТОВ ВОССТАНАВЛИВАЕТ АКТИВНОСТЬ ДЫХАТЕЛЬНОЙ ЦЕПИ, НАРУШЕННУЮ ВИБРАЦИЕЙ

© 2024 г. В.В. Воробьева*, #, О.С. Левченкова**, П.Д. Шабанов*

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

**Смоленский государственный медицинский университет, ул. Крупской, 28, Смоленск, 214019, Россия

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

Поступила в редакцию 20.09.2022 г.

После доработки 20.09.2022 г.

Принята к публикации 22.08.2023 г.

Перенос ионов кальция через клеточную мембрану кардиомиоцита сопряжен с преодолением высокого энергетического барьера и может быть нарушен воздействием вибрации. Поскольку лекарственные препараты группы блокаторов кальциевых каналов способны уменьшать повреждение митохондрий и клеточных мембран, оценено действие блокаторов кальциевых каналов нифедипина (адалата) в дозе 7.5 мг/кг на энергетический обмен кардиомиоцитов в условиях вибрационно-опосредованной (56 сеансов вибрации с частотой 44 Гц и амплитудой 0.5 мм) модели клеточной гипоксии. Функциональные состояния митохондрий в составе 30% гомогената ткани миокарда левого желудочка сердца кролика изучали полярографическим методом с помощью закрытого кислородного датчика гальванического типа в термостатируемой кювете объемом 1 мл при содержании белка в ячейке 2.4 ± 0.5 мг, измеренного модифицированным микробиуретовым методом. У животных, подвергнутых вибрации на фоне блокаторов кальциевых каналов, скорость эндогенного дыхания (V_o) удержалась на уровне интактных животных и составила 16.4 ± 4.1 [нг-атом О] $\text{мин}^{-1}\text{мг}^{-1}$ белка, чувствительность к амиталу возросла на 39%, а чувствительность к малонату снизилась на 40% по сравнению с показателями животных, подвергнутых вибрации без фармакологической защиты. Показатели соотношения активности митохондриальных ферментных комплексов I и II и процессов регуляции в разных метаболических состояниях митохондрий подтвердили восстановление активности митохондриального ферментного комплекса I, угнетенное воздействием вибрации, и регуляторное ограничение митохондриального ферментного комплекса II. Выявленное энергопротективное действие блокаторов кальциевых каналов повысило виброустойчивость ткани, предотвратив развитие в ней некротических изменений.

Ключевые слова: вибрация, энергетический обмен кардиомиоцита, митохондрии, блокаторы кальциевых каналов, тканевая гипоксия.

DOI: 10.31857/S0006302924020111, EDN: OUBAOP

Ионизированный кальций поступает в клетку через несколько типов кальциевых каналов клеточной мембраны, отличающихся по электрофизиологическим параметрам [1]. Кальциевые каналы активируются при высоких потенциалах на мембране (свыше -10 мВ), характеризуются высокой проводимостью и очень медленной кинетикой инактивации ($t < 500$ мс), регулируются

метаботропными рецепторами, сопряженными с G-белками [2], вторичным мессенджером в которых выступает циклический АМФ (цАМФ). Энергетический профиль медленного кальциевого канала L-типа имеет три энергетических барьера и две потенциальные энергетические «ямы», соответствующие наружному и внутреннему селективным филътрам. Молекулярная структура подобного Ca^{2+} -канала [3] представлена пятью белковыми субъединицами, из которых α_1 -субъединица выполняет такие функции, как селективность, проводимость, чувствительность

Сокращения: БКК — блокаторы кальциевых каналов, МФК — митохондриальный ферментный комплекс, КП — коэффициент приращения, КС — коэффициент стимуляции, КР — коэффициент разобщения.

к мембранному потенциалу и блокирующим агентам. [4].

В клетках есть также внутриклеточные кальциевые каналы, локализованные в мембранах цитоплазматического матрикса и митохондрий, транспортирующие ионы кальция с помощью митохондриального Ca^{2+} -унипортера [5], макромолекулярная структура которого функционирует параллельно с эндоплазматическим ретикулом благодаря наличию МАМ-контактов (мембраны, ассоциированные с митохондриями) [6], в которых высвобождаемые ионы кальция могут быть поглощены митохондриями. За освобождение ионов кальция из ретикулума 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), митофузину 2 (MFN2) и восьми белкам, содержащим домен PDZ (PDZ domain-containing protein 8). Все названные структуры функционально сопряжены и работают в зависимости от их окислительно-восстановительного потенциала [7]. Накопленный органеллами кальций освобождается через электронейтральные обменники типа $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ (в печени) и $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^+$ (в возбудимых тканях сердца и мозга), активность которых зависит от редокс-состояния мембраны митохондрий и от уровня восстановленности пиридиннуклеотидов [8]. Обмен ионов кальция на ионы натрия считается электрогенным со стехиометрией три иона Na^+ на один ион Ca^{2+} и осуществляется переносчиком антипортером (60 кДа) внутренней мембраны митохондрий, способным выбрасывать ион Ca^{2+} в обмен на ионы Na^+ или Li^+ (NCLX- $\text{Na}^+/\text{Li}^+/\text{Ca}^{2+}$ -exchanger) и принадлежащим к суперсемейству Ca^{2+} /катион $^+$ -антипортеров [9].

Концентрации цитоплазматического свободного кальция в животной клетке в состоянии покоя поддерживаются на определенном уровне (0.04–0.10 мкм), однако, существует целый ряд физических факторов, в частности, вибрация, воздействие которой вызывает дисбаланс кальция в клетке [10, 11], приводящий прежде всего к нарушениям функции сердечно-сосудистой системы у больных с вибрационной болезнью [12–14] и развитию тканевой и биоэнергетической гипоксии [15].

Как известно, свойства клеточных мембран можно модифицировать различными агентами, например, селективными блокаторами кальциевых каналов (БКК), дигидропиридиновые производные которых действуют на высокопороговые

кальциевые каналы L-типа, ответственные за сопряжение возбуждения и сокращения в клетках миокарда и сосудов [16–18]. На клеточном уровне в условиях эксперимента блокатор кальциевых каналов адалат (международное название – нифедипин) уменьшал или предотвращал повреждение митохондрий и клеточных мембран во время гипоксии благодаря уменьшению гиперкальциемии [16, 17, 19]. Однако детальные механизмы взаимодействия между проницаемостью клеточной мембраны для ионов кальция, измененной с помощью БКК, и активностью дыхательной цепи клетки на фоне гипоксии, вызванной вибрацией, не описаны.

Целью исследования явилось экспериментальное изучение взаимосвязи блокады кальциевых каналов клеточной мембраны с помощью антагониста кальциевых каналов производного диметилового эфира 1,4-Дигидро-2,6-диметил-4-(2-нитрофенил)-3,5-пиридиндикарбоновой кислоты (адалата) и активностью митохондриальных ферментных комплексов (МФК) дыхательной цепи кардиомиоцитов кролика на модели вибрационно-опосредованной клеточной гипоксии [20].

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты проведены на кроликах-самцах породы *Oryctolagus 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. Ежедневно в течение 56 суток проводили сеансы общей вертикальной вибрации с амплитудой 0.5 мм и частотой 44 Гц по 60 мин во временной промежуток с 9.00 до 11.00 в осенне-зимний период.

В качестве средства фармакологической защиты использовали БКК с коммерческим названием адалат (нифедипин; Pliva, Хорватия) в разовой дозе 7.5 мг/кг массы животного. Препарат вводили в виде суспензии по 2 мл внутривентрально с помощью тонкого эластичного зонда за 60 мин до вибрационного воздействия. Интактные и контрольные животные, которых подвергали воздействию вибрации без фармакологической защиты, получали физиологический раствор.

После вскрытия грудной полости животного быстро извлекали сердце, иссекали часть миокарда в области верхушки и помещали в среду выделения фиксированного состава [20, 21], охлажденную до 0°C. Для имитации состава внутриклеточной среды использовали сложные солевые растворы. Концентрация компонентов среды выделения: 250 ммоль сахарозы, 10 ммоль трис- HCl (pH 7.2). Концентрация компонентов среды инкубации: 10 ммоль трис- HCl (pH 7.2), 20 ммоль

KH_2PO_4 , 10 ммоль MgSO_4 , 150 ммоль KCl . Происхождение реактивов: сахароза, KH_2PO_4 , MgSO_4 , KCl — «Реахим», Россия); трис- HCl — Serva, Германия. Все растворы готовили *ex tempore* на бидистиллированной воде [21]. Из среды выделения и инкубации исключали этилендиаминтетрауксусную кислоту (ЭДТА) [22].

Кусочки ткани сердца массой примерно 250–300 мг после промывания от крови помещали в охлажденный стальной пресс с отверстиями 1 мм и продавливали в калиброванный гомогенизатор Даунса из кварцевого стекла с тefлоновым пестиком при соотношении «среда выделения» : «ткань» = 1 : 2. Через 7–10 мин с момента извлечения тканей из организма животного получали 30%-ный гомогенат [23]. Энергетический обмен нативных митохондрий сердца в гомогенате изучали полярографическим методом, регистрируя скорости поглощения кислорода митохондриями при 37°C в 1 мл солевой среды инкубации, уравновешенной с кислородом воздуха, как описано в ранее опубликованных работах [15, 20].

Единицей измерения скорости дыхания митохондрий (V) принимали $[\text{нг-атом O}] \text{ мин}^{-1} \text{ мг}^{-1}$ белка. Вклад в эндогенную дыхательную активность митохондрий НАД- и ФАД-зависимых субстратов оценивали по данным ингибиторного анализа с амиталом или малонатом [24, 25], вычисляя чувствительность эндогенного дыхания (V_9) к ингибиторам по формуле: «показатель чувствительности к ингибитору» = $(1 - V_{\text{инг}}/V_{\text{энд}}) \cdot 100\%$, 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» [26, 27] моделировали *in vitro* при варьировании экзогенных энергетических субстратов: ФАД-зависимого — янтарной кислоты 1 мМ или смеси НАД-зависимых субстратов — яблочной и глутаминовой кислот (малат + глутамат) по 3 мМ.

Введением в ячейку разобщителя 2,4-динитрофенола (2,4-ДНФ) до 20 мкМ имитировали состояние АТФазной «активности» митохондрий и получали показатели $V_{\text{як-днф}}$ и $V_{\text{мал+глу-днф}}$ [26, 27].

Отклик митохондрий на неблагоприятный фактор *in vivo* оценивали не только по совокупности кинетических (V), но и расчетных регуляторных параметров, которые количественно характеризовали переход митохондрий в разные состо-

яния (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 (КП) в состоянии покоя ($\text{КП}_\text{п}$) и разобщения ($\text{КП}_\text{р}$) [28]. Рассчитывали коэффициенты стимуляции (КС) и коэффициенты разобщения (КР), которые выражали в относительных единицах измерения.

С целью проведения морфологического анализа иссекали часть мышцы миокарда левого желудочка в области верхушки, помещали в 10%-й нейтральный раствор формалина, обрабатывали материал стандартным методом спиртово-парафиновой проводки. Окраску гистологических препаратов осуществляли гематоксилином и эозином.

Статистическую обработку данных выполняли с помощью пакетов прикладных программ Excel 2002 и STATISTICA 6.0. Значимость межгрупповых различий оценивали параметрическим (t -критерий Стьюдента) и непараметрическим (U -тест Манна–Уилки) критериями в зависимости от типа распределения, который определяли в модуле «Basic Statistica/Tables. Frequency tables» пакета программ STATISTICA 6.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Энергетические возможности органов с импульсным характером функционирования (сердце, мышцы) отличаются от органов с постоянным уровнем функциональной активности (печень, мозг) [29–31]. В проведенных экспериментах для митохондрий миокарда интактных контрольных животных получены показатели метаболических состояний (табл. 1, 2), согласующиеся с литературными данными [32].

Экспериментальное изучение феномена воздействия вибрации на энергопродукцию миокарда показало, что по мере накопления максимальной для обсуждаемого исследования вибрационной дозы (56 сеансов с частотой 44 Гц и амплитудой 0.5 мм) вклад активности НАД-зависимого МФК снизился [33], что согласуется с представлениями о его большей уязвимости [34].

Активность ФАД-зависимого МФК постепенно повышалась (от 7 к 21 сеансу с частотой 44 Гц), свидетельствуя о его ведущей роли в поддержании функции дыхательной цепи в неблагоприятных условиях [34]. Однако после 56 сеансов вибрации наблюдали гиперактивацию сукцинатдегидрогеназной системы окисления с нарастанием морфогистологических признаков дистрофии в ткани миокарда вплоть до развития некротических изменений [15]. Анализ оснащенности митохондрий миокарда эндогенными энергетиче-

Таблица 1. Показатели кинетических параметров метаболических состояний митохондрий сердца интактных кроликов

Показатели	$M \pm m$
V_o	16.3 ± 4.3
Амита́лчувствительность, %	50.6 ± 10.6
Малона́тчувствительность, %	35.1 ± 7.8
$V_{як}$	34.3 ± 7.6
$V_{глу+мал}$	22.7 ± 5.0
$V_{як-р}$	47.7 ± 14.2
$V_{глу+мал-р}$	48.1 ± 15.7

Примечание. Скорости дыхания митохондрий сердца даны в (нг-атом О) мин⁻¹мг⁻¹белка. Указаны средние значения показателей с их 95%-ми доверительными интервалами.

скими субстратами в переживающих гомогенатах ткани сердца кролика подтвердил выявленные зависимости между физическими характеристиками вибрации и совокупностью биоэнергетических параметров [35], а также признаки угнетения в системе окисления янтарной кислоты, вероятно, вследствие торможения шавелевоуксусной кислотой (ЩУК-ового торможения), снижения доступности эндогенных субстратов к дыхательной цепи митохондрий, нарушения функции митохондриально-ретикулярной сети, ее распада и утрате регулирующей функции в адаптации [35] и развитие тканевой и биоэнергетической гипоксии [36].

На фоне адалата скорость эндогенного дыхания (V_o) оставалась на уровне интактных животных (табл. 1), тогда как амита́лчувствительность повысилась на 39% ($p < 0.05$) по сравнению с группой вибрированных и на 40% ($p < 0.05$) по сравнению с показателем интактной группы животных. Малона́тчувствительность уменьшилась на 40% ($p < 0.05$) и сохранялась на уровне интактных животных (табл. 1). Коэффициент КП_э уменьшался на 56%, что свидетельствовало о восстановлении и преобладании активности НАД-зависимых оксидаз подобно интактным животным (табл. 2). Скорость окисления композиции субстратов «глутамат + малат» в состоянии «покоя» увеличивалась на 27%, приближалась к показателю интактного контроля.

В окислении экзогенной янтарной кислоты наблюдали тенденцию к уменьшению гиперактивации. Коэффициент КП_п снижался на 35% (табл. 2), приближаясь к показателю интактных животных (1.51), что свидетельствовало о сохранности НАД-зависимого звена на фоне фармако-

логической защиты БКК, с одной стороны, и о регуляторном сдерживании гиперактивации сукцинатдегидрогеназы — с другой.

Скорость окисления ФАД-зависимых субстратов (экзогенной янтарной кислоты) была снижена незначительно и сохранялась на уровне интактных животных, однако коэффициент КП_р уменьшался на 33%, оставаясь выше показателя интактного контроля (0.98). Это также свидетельствовало о том, что гиперактивация сукцинатдегидрогеназы снижалась и функционирование МФК II в митохондриях миокарда осуществлялось в более отрегулированном режиме на фоне фармакологической защиты.

Совокупность изменений, характеризующих метаболические состояния митохондрий миокарда в условиях защиты адалатом, свидетельствует о том, что характер вибропротективного действия БКК сводится к повышению активности НАД-зависимого участка дыхательной цепи и регуляторному сдерживанию гиперактивации сукцинатзависимого окисления.

Если неблагоприятные эффекты вибрации неизменно вызывали дистрофию кардиомиоцитов, уменьшение капиллярной сети, спазм артериол, увеличение межклеточного и межпучкового отека, очаги кровоизлияний и некроза, то гистоморфологическая картина ткани миокарда у животных, получавших адалат, была более благоприятна. В частности, в кардиомиоцитах наблюдались признаки набухания и зональной дистрофии, признаки компенсаторной гипертрофии отсутствовали, стромально-клеточная реакция была представлена преимущественно лимфоцитарными элементами. Несмотря на то, что степень полнокровия в сосудах сердца оказалась значительно выраженной и отмечались диапедезные кровоиз-

Таблица 2. Показатели переходных метаболических состояний митохондрий сердца интактных кроликов

Показатели	$M \pm m$
$KC_{\text{як}}$	2.1 ± 0.7
$KC_{\text{глу+мал}}$	1.3 ± 0.3
$KP_{\text{як}}$	1.4 ± 0.5
$KP_{\text{глу+мал}}$	2.1 ± 0.6
$KП_{\text{э}}$	0.79
$KП_{\text{п}}$	1.51
$KП_{\text{р}}$	0.98

Примечание: $KC_{\text{як}}$ и $KC_{\text{глу+мал}}$ — коэффициенты стимуляции; $KP_{\text{як}}$ и $KP_{\text{глу+мал}}$ — коэффициенты разобщения; $KП$ — коэффициент приращения скоростей дыхания митохондрий: исходного или эндогенного ($KП_{\text{э}}$), в состоянии покоя при нагрузке субстратами ($KП_{\text{п}}$), на фоне применения разобщителя 2,4- ДНФ ($KП_{\text{р}}$)

лияния, дистрофические изменения были ограничены, признаки некроза ткани отсутствовали.

Митохондрии разных тканей отличаются активностью кальцийтранспортирующих систем [37], и по кинетическим параметрам энергозависимые системы поглощения и выделения ионов кальция в митохондриях мозга и миокарда существенно превосходят системы печени, почек, легких [38, 39]. Так как в митохондриях функционирует целый ряд кальцийзависимых ферментов (пируватдегидрогеназа, НАД-зависимая изоцитратдегидрогеназа, пирогидрофосфатазы, АТФ-синтазы), между уровнями кальция и функциями митохондрий осуществляется взаимообратная связь [40]. Ионы Ca^{2+} , избыточно поступающие в клетку через потенциалзависимые медленные кальциевые каналы клеточной мембраны, могут подавлять интенсивность дыхания в клетке, усиливать гликолиз, снижать содержание АТФ, разобщать окислительное фосфорилирование, активировать АТФ-потребляющие ферменты [41]. Феномен повышения продукции АФК под действием ионов кальция отмечается многими авторами [42] и представляется одной из причин патофизиологических последствий кальциевой перегрузки митохондрий.

Блокатор кальциевых каналов адонат, подавляя активность ионопроводящей поры кальциевого канала клеточной мембраны кардиомиоцитов в зоне $\alpha 1$ -субъединицы, снижает уровни кальция в органеллах, что, вероятно, повышает окислительную и сохраняет сопрягающую активность МФК I, а также регуляторно сдерживает гиперактивацию ФАД-зависимого участка

дыхательной цепи (МФК II), содержащего метаболитные пуринергические G-белок-сопряженные рецепторы (GPR91) из семейства P2Y (лиганд — янтарная кислота).

Поэтому к известным эффектам дигидропиридиновых БКК, таким как снижение силы сердечных сокращений [43], уменьшение сердечного выброса, увеличение диастолического расслабления, снижение постнагрузки на миокард [16], можно добавить энергопротективное действие. Обнаруженная нами оптимизация работы МФК I и регулируемое фармакологическое ограничение гиперактивации МФК II обеспечивают «минимизацию» потребления O_2 , сохранение синтеза АТФ в условиях вибрационно-опосредованной тканевой гипоксии и согласуются с современными представлениями о фармакодинамике блокаторов кальциевых каналов. Морфогистологический анализ подтверждает, что фармакологическая коррекция дисбаланса Ca^{2+} с помощью БКК при неблагоприятном воздействии вибрации является патогенетически обоснованной и может способствовать смягчению и устранению сердечно-сосудистых нарушений, вызванных вибрационным воздействием.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют 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. Ertel E. A., Campbell K. P., Harpold M. M., Hofmann F., Mori Y., Perez-Reyes E., Schwartz A., Snutch T. P., Tanabe T., Birnbaumer L., Tsien R. W., and Catterall W. A. Nomenclature of voltage-gated calcium channels. *Neuron*, **25**, 533 (2000).
2. Ткачук В. А. и Авакян А. Э. Молекулярные механизмы сопряжения G-белков с мембранными рецепторами и системами вторичных посредников. *Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова*, **94** (12). 1478 (2008).
3. Catterall W. A. Structure and regulation of voltage-gated Ca^{2+} channels. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **16**, 521 (2000).
4. Foell J. D., Balijepalli R. C., Delisle B. P., Yuncker A. M. R., Robia S. L., Walker J. W., McEnery M. W., January C. T., and Kamp T. J. Molecular heterogeneity of calcium channel β -subunits in canine and human heart: evidence for differential subcellular localization. *Physiol. Genomics*, **17**, 183 (2004).
5. Hrynevich S. V., Waseem T. V., and Fedorovich S. V. Estimation of the mitochondrial calcium pool in rat brain synaptosomes using rhod-2 am fluorescent dye. *Biophysics*, **62** (1), 75 (2017). DOI: 10.1134/S0006350917010079
6. Leung A. W., Waranyuwatana P., and Halestrap A. P. The mitochondrial phosphate carrier interacts with cyclophilin D and may play a key role in the permeability transition. *J. Biol. Chem.*, **283**, 26312 (2008). DOI: 10.1074/jbc.M805235200
7. Hirabayashi Y., Kwon S.K., Paek H., Pernice W.M., Paul M.A., Lee J., Erfani P., Raczkowski A., Petrey D.S., Pon L.A., Polleux F. ER-mitochondria tethering by PDZD8 regulates Ca^{2+} dynamics in mammalian neuros. *Science*, **358**, 623 (2017). DOI: 10.1126/science.aan6009
8. Зинченко В. П., Каймачников Н. П., Долгачева Л. П. и Черных А. М. Регуляция и функциональное значение рецепторзависимого Ca^{2+} сигнала митохондрий. В сб. *Матер. симп. «Митохондрии, клетки и активные формы кислорода»* (Пушино, 2000), 179.
9. Palty R., Silverman W. F., Hershfinkel M., Caporale T., Sensi S. L., Parnis J., Nolte C., Fishman D., Shoshan-Barmatz V., Herrmann S., Khananshvil D., and Sekler I. NCLX is an essential component of mitochondrial $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 435 (2010).
10. Коломиец В. В. О патофизиологической роли нарушений обмена кальция в развитии ангиодистонического синдрома вибрационной болезни. *Гигиена труда и проф. заболевания*, **10**, 21 (1987).
11. Костюк И. Ф. и Капустник В. А. Роль внутриклеточного обмена кальция в развитии вазоспастических реакций при вибрационной болезни. *Медицина труда и пром. экология*, № 7, 14 (2004).
12. Кирьяков В. А., Павловская Н. А., Лапко И. В., Богатырева И. А., Антошина Л. И. и Ошкодеров О. А. Воздействие производственной вибрации на организм человека на молекулярно-клеточном уровне. *Медицина труда и пром. экология*, № 9, 34 (2018). DOI: 10.31089/1026-9428-2018-9-34-43
13. Корзенева Е. В. и Синева Е. Л. Заболевание сердечно-сосудистой системы у рабочих ведущих профессий горнорудной и машиностроительной промышленности. *Медицина труда и пром. экология*, № 10, 26 (2007).
14. Мелентьев А. В., Серебряков П. В. и Жеглова А. В. Влияние шума и вибрации на нервную регуляцию сердца. *Медицина труда и пром. экология*, № 9, 19 (2018).
15. Vorobieva V. V. and Shabanov P. D. Exposure to whole body vibration impairs the functional activity of the energy producing system in rabbit myocardium. *Biophysics*, **64** (2), 337 (2019). DOI: 10.1134/2FS0006350919020210
16. Vater W., Kroneberg G., and Hoffmeister F. Pharmacologie von 4-(2 Nitrophenyl)-2, 6-dimethyl-1,4-dihydropyridin-3, 5-dicarbonsauredim ethylester (Bay a 1040, Nifedipine). *Arzneim. Forsch.*, **22**, 1 (1972).
17. Abernethy D. R. and Soldatov J. Structure-functional diversity of human L-type Ca^{2+} channel: perspective for new pharmacological targets. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **300** (3), 724 (2002). DOI: 10.1124/jpet.300.3.724
18. Pogzig H. and Becher C. Voltage-dependent cooperative in interactions between Ca-channel blocking drugs in intact cardiac cell. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **560**, 306 (1994).
19. Clarck R. E., Christieb I. Y., Henry P. D., Fischer A. E., Nora J. D., Williamson J. R., Sobel B. E. Nifedipine: a

- miocardial protective agent. *Amer. J. Cardiol.*, **44** (5), 825–831 (1979). DOI: 10.1016/0002-9149(79)90204-2
20. Воробьева В. В. и Шабанов П. Д. Вибрационная модель гипоксического типа клеточного метаболизма, оцененная на кардиомиоцитах кролика. *Бюл. эксперим. биологии и медицины*, **147** (6), 712 (2009).
21. Солодовникова И. М., *Морфофункциональные характеристики митохондрий кардиомиоцитов изолированных кусочков миокарда при инкубации в условиях гипоксии*. Дис. ...канд. биол. наук (Москва, 2007).
22. Захарченко М. В., Хундерякова Н. В. и Кондрашова М. Н. Важность сохранения биофизической организации выделенных митохондрий для выявления физиологической регуляции их функций *Биофизика*, **56** (5), 840 (2011).
23. *Руководство по изучению биологического окисления полярнографическим методом*, под ред. Г. М. Франка и М. Н. Кондрашовой (Наука, М., 1973).
24. Никольс Д. *Биоэнергетика. Введение в хемиосмотическую теорию* (Мир, М., 1985).
25. Коваль А. Н., Грицук А. И. и Свергун В. Т. Параметры тканевого дыхания миокарда белых крыс при продолжительной инкорпорации радиоцезия. В сб. Матер. Всерос. раб. сов. «Митохондрии в патологии» (Пушино, 2001), с. 125.
26. Chance B. and Williams G. Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. *J. Biol. Chem.*, **217** (1), 324 (1955).
27. Chance B. and Hollunger G. The interaction of energy and electron transfer reactions in mitochondria. *J. Biol. Chem.*, **236** (5), 1534 (1961).
28. Маевский Е. И., Розенфельд А. С., Гришина Е. В. и Кондрашова М. Н. *Коррекция метаболического ацидоза путем поддержания функций митохондрий* (Пушино, 2001).
29. Akopova O. V., Nosar V. I., Mankovskaya I. N., and Sagach V. F. Effect of potential-dependent potassium uptake on production of reactive oxygen species in rat brain mitochondria. *Biochemistry*, **73**, (10), 1429 (2008). DOI: 10.1134/s0006297914010076
30. Brustovetsky N. N., Maevsky E. I., Kolaeva S. G., Danilova L. S., and Solomonov N. G. Regulation of the degree of coupling of oxidation with phosphorylation in rat liver mitochondria: relation to thermogenesis *Biochem. Physiol.*, **82** (3), 545 (1985).
31. Koves T. R., Noland R. C., Bates A. L., Henes S. T., Muoio D. M., and Cortright R. N. Subsarcolemmal and intermyofibrillar mitochondria play distinct roles in regulating skeletal muscle fatty acid metabolism. *Am. Physiol. Cell. Physiol.*, **288**, (1), 1074 (2005). DOI: 10.1152/ajpcell.00391.2004
32. Grishina E. V., Maevsky E. I., Brustovetsky N. N., and Okon M. S. Energy efficiency of anaerobic substrate transformation in mitochondria in rats. *Hypoxia Med. J.*, **2**, 30 (1996).
33. Vorobieva V. V. and Shabanov P. D., Tissue-specific peculiarities of vibration-induced hypoxia in rabbit liver and kidney. *Bull. Experim. Biol. Med.*, **167** (5), 621 (2019) DOI: 10.1007/s10517-019-04583-0
34. Лукьянова Л. Д. *Проблемы гипоксии: молекулярные, физиологические и медицинские аспекты* (Медицина, М., 2004).
35. Воробьева В. В. и Шабанов П. Д. Тканеспецифические особенности вибрационно-опосредованной гипоксии сердца, печени и почки кролика. *Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии*, **14** (1), 46 (2016). DOI: 10.17816/RCF14146-62
36. Погорелов А. Г., Погорелова В. Н. и Дубровкин М. И. Активация специфических мембранных механизмов мышечной клетки сердца на начальной стадии ишемии. *Биофизика*, **47**, 744 (2002).
37. Дерябина Ю. И., Исакова Е. П. и Звягильская Р. А. Ca^{2+} -транспортирующие системы митохондрий: свойства, регуляция, таксономические особенности. *Биохимия*, **69** (1), 114 (2004).
38. Авдонин П. В. и Ткачук В. А. *Рецепторы и внутриклеточный кальций* (Наука, М., 1994).
39. Белостоцкая Л. И., Чайка Л. А. и Гомон О. Н. Влияние циннаризина на митохондриальную систему окисления мозга, антиоксидантную активность крови и поведение крыс при гипоксии. *Эксперим. клин. фармакология*, **66** (6), 16 (2003).
40. Кудюков Д. Н. и Векшин Н. Л. О «набухании» митохондрий под действием пальмитиновой кислоты, кальция и гипотонии. *Биофизика*, **61** (4), 736 (2016).
41. Chastukhin D. S., Borodin A. V., and Khodorov B. I. Mathematical modeling of delayed calcium deregulation in brain neurons caused by hyperstimulation of glutamate receptors. *Biophysics*, **59** (2), 236 (2014). DOI: 10.1134/s0006350914020067.
42. Facundo H. T. F., de Paula J. G., and Kowaltowski A. J. Mitochondrial ATP-Sensitive K^+ Channels Prevent Oxidative Stress, Permeability Transition and Cell Death. *J. Bioenerg. Biomembr.*, **37**, 75–82 (2005). DOI: 10.1007/s10863-005-4130-1.
43. Катцунг Б. Г. *Базисная и клиническая фармакология*, в 2-х томах (Бином, Диалект, М., 2004).

Pharmacological Blockade of High Threshold L-Type Calcium Channels in Cardiomyocytes Restores Respiratory Chain Activity Disturbed by Vibration

V.V. Vorobieva*, O.S. Levchenkova**, and P.D. Shabanov*

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

***Smolensk State Medical University, ul. Krupskoj, 28, Smolensk, 214019 Russia*

The transport of calcium ions across the cardiomyocyte cellular membrane is associated with crossing a high energy barrier and can be dysregulated by the vibration. Calcium channel blockers are a group of medication that reduce damage of mitochondria and cell membranes. In this study, the effects of nifedipine (adalat), a calcium channel blocker drug, 7.5 mg/kg on energy metabolism of cardiomyocytes which underwent vibration-induced hypoxia (exposure to 56 vibration sessions at a single frequency, 44 Hz with an amplitude of 0.5 mm) were evaluated. The functional states of mitochondria in 30% rabbit left ventricular myocardial tissue homogenate were studied polarographically using a closed galvanic oxygen sensor in a 1 ml cuvette with thermostatic holder, the protein concentration in the system was 2.4 ± 0.5 mg and a modified microbiuret method was used for protein determination. In animals injected with calcium channel blockers and exposed to vibration, the rate of endogenous respiration (V_o) remained at the level as in intact animals and was 16.4 ± 4.1 [ng-atom O] $\text{min}^{-1}\text{mg}^{-1}$ protein, amytal sensitivity increased by 39%, and malonate sensitivity decreased by 40% as compared to animals that were not injected with calcium channel blockers but exposed to vibration. The indices of the ratio of the activity of mitochondrial enzyme complex I and complex II and the processes of regulation of mitochondria in different metabolic states indicate that the activity of mitochondrial complex I, inhibited by vibration, is restored and mitochondrial complex II exhibits limited regulatory functions. This study has shown the energy-protective action of calcium channel blockers, due to which tissue resistance in response to vibration increases, thereby preventing the development of necrotic changes in the tissue.

Keywords: vibration, cardiomyocyte energy metabolism, mitochondria, calcium channel blockers, tissue hypoxia