

НЕЙРОФАРМАКОЛОГИЯ

DOI: 10.30906/0869-2092-2019-82-12-3-8

ВЛИЯНИЕ АМТИЗОЛА И УМЕРЕННОЙ ГИПОКСИИ В РЕЖИМЕ ПРЕКОНДИЦИОНИРОВАНИЯ НА ФУНКЦИЮ МИТОХОНДРИЙ МОЗГА В УСЛОВИЯХ НОРМОКСИИ И ИШЕМИИ ГОЛОВНОГО МОЗГА В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

В. Е. Новиков, К. Н. Кулагин, О. С. Левченкова, Н. С. Понамарева¹

Исследовано влияние комбинированного преко́ндиционирования с помощью комбинации амтизола (3,5-диамино-1,2,4-тиадиазола) и умеренной гипобарической гипоксии, а также их раздельного применения на уровень окислительного фосфорилирования в митохондриях головного мозга крысы в условиях нормоксии и при ишемии, вызванной двусторонней перевязкой общих сонных артерий. Выявлено, что фармакологическое преко́ндиционирование не влияет на скорость дыхания митохондрий в ткани мозга в различных метаболических состояниях при нормоксии, при этом ослабляет дыхательный контроль как в ранний, так и в поздний периоды преко́ндиционирования на 8,7 % ($p = 0,045$) и 4,2 % ($p = 0,038$), соответственно. Гипоксическое преко́ндиционирование снижает скорость фосфорилирующего окисления в митохондриях мозга в ранний период преко́ндиционирования на 13,6 % ($p = 0,019$), а также дыхательный контроль как в ранний, так и в поздний периоды преко́ндиционирования в среднем на 17 % ($p = 0,002$). При комбинированном преко́ндиционировании показатели окислительного фосфорилирования не отличаются от данных интактного контроля, в поздний период наблюдается увеличение коэффициента фосфорилирования на 10 % ($p = 0,005$). Через 1 сут после моделирования ишемии головного мозга наблюдаются нарушения окислительной и фосфорилирующей функции митохондрий. В случае использования за 1 и 48 ч до ишемии отдельно фармакологического или гипоксического преко́ндиционирования наблюдается повышение скорости дыхания V_3 и коэффициента АДФ/О в сравнении с контрольной группой с ишемией, но эти показатели остаются значимо ниже в сравнении с группой интактного контроля. Комбинированное преко́ндиционирование предотвращает вызванное ишемией нарушение митохондриального окислительного фосфорилирования, в частности, повышая скорость фосфорилирующего дыхания V_3 на 38,5 % ($p = 0,002$) в ранний и на 44,9 % ($p = 0,006$) в поздний периоды преко́ндиционирования, сопряженность окислительного фосфорилирования (коэффициент АДФ/О) при окислении НАД-зависимого субстрата глутамата на 22 % ($p = 0,002$) в ранний и на 30 % ($p = 0,0008$) в поздний периоды преко́ндиционирования.

Ключевые слова: преко́ндиционирование; амтизол; гипобарическая гипоксия; окислительное фосфорилирование; митохондрии; крысы.

ВВЕДЕНИЕ

Среди способов нейропротекции для предупреждения тяжелых последствий гипоксически-ишемических повреждений головного мозга (ГМ) изучается возможность применения различных вариантов адаптивного феномена, известного под названием преко́ндиционирования [5]. Преко́ндиционирование (ПреК), как способ повышения устойчивости организма к гипоксии и ишемии, нацелен на активацию срочных и отсроченных реакций адаптации за счет использования достаточно сильных (сублетальных) повторяющихся гипоксических или ишемических эпизодов. Принято выделять 2 важных защитных периода в развитии ПреК:

ранний период (срочной адаптации), когда защитный эффект наблюдается через несколько минут до 2 ч после ПреК, и поздний (отсроченной адаптации), который формируется через 24 – 72 ч после ПреК [11]. Эффективность комбинированного способа ПреК, когда физический вариант ПреК (ишемическое, гипоксическое) дополняется фармакологическим ПреК, всё чаще интересует исследователей [12, 17]. В качестве веществ для фармакологического потенцирования ПреК (ФПреК) изучают средства с антигипоксическим действием [2, 4, 14]. Это связано, в первую очередь, с тем, что в механизме действия некоторых из них имеются те же, что и при ПреК мишени на сигнальном и эффекторном этапе адаптации организма к гипоксии. Например, гипоксией индуцированный фактор HIF-1 α , NO-синтаза, активные формы кислорода, белки, включающиеся в энергетический обмен, процессы гликоли-

¹ Смоленский государственный медицинский университет, Россия, 214019, Смоленск, ул. Крупской, 28.

за, ферменты дыхательной цепи митохондрий, митохондриальный АТФ-зависимый калиевый канал, митохондриальная пора и др. Во-вторых, использование таких веществ до ПреК может смягчить воздействие на организм физического ПреК, при этом, не снизив эффективность последнего. Так, нами продемонстрирована эффективность применения циклического соединения 3,5-диамино-1,2,4-тиадиазола, известного под названием амтизол, до предстоящей ишемии мозга. Амтизол, потенцируя действие гипоксического preconditionирования (ГПреК), увеличивал выживаемость крыс и снижал тяжесть неврологического дефицита после двусторонней перевязки общих сонных артерий в ранний и поздний периоды ПреК [4].

Амтизол не является антигипоксантом прямого действия, компонентом дыхательной цепи, не шунтирует дыхательную цепь. В механизме его действия выявлена способность активировать гликолиз, снижать метаболический ацидоз, уменьшать образование лактата в клетке. Как следствие, образующийся при гликолизе пируват через последующее декарбоксилирование в матриксе митохондрий и превращение в ацетил-КоА поступает в цикл трикарбоновых кислот. Амтизол также способствует утилизации лактата в реакциях глюконеогенеза, поддерживая ресинтез углеводов [1, 3]. Есть данные о том, что амтизол улучшает микроциркуляцию [1], что, несомненно, важно для повышения устойчивости ткани к гипоксии и ишемии.

О влиянии амтизола на митохондриальное дыхание известно, что в условиях нормоксии при однократном введении *in vivo* он не изменяет скорость потребления кислорода митохондриями ГМ крыс [9]. В то же время он повышает скорость НАДН-дегидрогеназного окисления субстратов в цикле трикарбоновых кислот в нейронах медицинской пивавки [9].

Целью данного исследования явилось изучение влияния амтизола, умеренной гипобарической гипоксии и их комбинированного применения в режиме ПреК на функцию митохондрий головного мозга крыс в условиях нормоксии и после ишемии мозга.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследования выполнены на 96 белых крысах-самцах линии Вистар массой 200–240 г (питомник “Столбовая” ФГБУН НЦБМТ ФМБА России). Животных содержали в условиях вивария при свободном доступе к воде и корму, естественной освещенности. Все исследования проводили согласно этическим принципам, изложенным в Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей, а также с разрешения локального этического комитета СГМА (заключение от 25 апреля 2012 г.).

На предварительном этапе животные были типированы по устойчивости к острой гипоксии на высоко- и низкоустойчивых по оценке времени появления у них патологического дыхания типа апноэ при разряжении

атмосферного давления, соответствующего высоте 12000 м, после чего животных спускали с данной высоты. Время появления апноэ у высокоустойчивых животных составляло более 9 мин, у низкоустойчивых — менее 9 мин. Спустя 1 мес после тестирования в основной эксперимент брали низкоустойчивых к гипоксии крыс, так как именно для них характерно формирование срочной и долгосрочной адаптации к гипоксии [5].

ФПреК представляло собой инъекции амтизола в дозе 25 мг/кг внутривентриально в 1-й, 3-й и 5-й день эксперимента, всего 3 инъекции. Такой режим введения амтизола использовался нами ранее при комбинированном ПреК [4]. Субстанция амтизола синтезирована на кафедре фармакологии Военно-медицинской академии имени С. И. Кирова. Чистота субстанции составила не менее 99 %.

ГПреК моделировали, помещая животных в 1-й, 3-й и 5-й день эксперимента в условия умеренной гипобарической гипоксии (410 мм рт. ст., соответствуют высоте 5000 м, время пребывания — 60 мин), всего 3 подъема [4].

Комбинированное ПреК (КПреК) — чередующееся применение амтизола и гипобарической гипоксии в течение 6 дней — моделировали, вводя крысам внутривентриально амтизол в дозе 25 мг/кг в 1-й, 3-й и 5-й день эксперимента, а во 2-й, 4-й и 6-й день подвергая животных умеренной гипобарической гипоксии.

Ишемию ГМ моделировали одномоментной двусторонней перевязкой общих сонных артерий (ОСА) под наркозом (хлоралгидрат 8 % раствор, 400 мг/кг внутривентриально). Контролем для животных с ишемией ГМ служили интактные животные.

Проведены 2 серии опытов, в каждой из которых было по 7 групп экспериментальных животных: 1 контрольная и 6 опытных. Животные первой серии (условия нормоксии — активный контроль) были случайным образом разделены на следующие группы:

- 1-я — интактные крысы ($n = 10$);
- 2-я — животные с ФПреК, оценку окислительного фосфорилирования (ОФ) у которых проводили через 1 ч после последнего введения амтизола ($n = 6$);
- 3-я — животные с ФПреК, оценку ОФ у которых проводили через 48 ч после последнего введения амтизола ($n = 6$);
- 4-я — животные с ГПреК, оценку ОФ у которых проводили через 1 ч после последнего сеанса гипобарической гипоксии ($n = 6$);
- 5-я — животные с ГПреК, оценку ОФ у которых проводили через 48 ч после последнего сеанса гипобарической гипоксии ($n = 6$);
- 6-я — животные с КПреК, оценку ОФ у которых проводили через 1 ч после последнего предъявления preconditionирующего фактора ($n = 6$);
- 7-я — животные с КПреК, оценку ОФ у которых проводили через 48 ч после последнего предъявления preconditionирующего фактора ($n = 8$);

Во второй серии экспериментов (условия ишемии) были следующие группы:

1-я — контрольная группа с ишемией ($n = 10$);

2-я — ишемию ГМ моделировали спустя 1 ч после прекращения ФПреК (ранний период) ($n = 6$);

3-я — ишемию ГМ спустя 48 ч после прекращения ФПреК (поздний период) ($n = 6$);

4-я — ишемию ГМ спустя 1 ч после прекращения ГПреК (ранний период) ($n = 6$);

5-я — ишемию ГМ спустя 48 ч после прекращения ГПреК (поздний период) ($n = 6$);

6-я — ишемию ГМ спустя 1 ч после прекращения КПреК (ранний период) ($n = 6$);

7-я — ишемию ГМ спустя 48 ч после прекращения КПреК (поздний период) ($n = 8$).

Через 1 сут после ишемии крыс декапитировали. Оба полушария ГМ гомогенизировали на льду, используя среду выделения (сахароза 0,25 М, трис-НС1 0,01 М, ЭДТА 0,1 мМ, рН = 7,4) с помощью гомогенизатора (Schuett homgen Plus, Германия). Для выделения митохондрий клеток ГМ использовали метод дифференциального центрифугирования.

Дыхание и фосфорилирование митохондрий регистрировали полярографически с помощью амперометрического датчика растворённого кислорода ДК-01 (Эконикс Эксперт, Россия) типа закрытого электрода Кларка, анализатора растворенного кислорода (кислородомера) Эксперт 001-4 (0.1), программного обеспечения Эксперт-00Х М 03.04.11. Для создания графиков полярографических экспериментов использовали программу Origin Pro 8 [8].

Скорость дыхания выражали в нМ O_2 /мин/мг белка митохондрий и регистрировали в следующих метаболических состояниях: V_0 — начальное окисление (в качестве субстрата окисления использовали НАД-зависимый субстрат — глутамат 3 мМ); V_3 — скорость дыхания, сопряженного с фосфорилированием в присутствии АДФ (174 мкМ); V_4 — скорость дыхания после исчерпания добавленного АДФ. Кроме того, рассчитывали коэффициент дыхательного контроля (ДКч) как отношение V_3/V_4 , коэффициент сопряженности окислительного фосфорилирования (АДФ/О); скорость фосфорилирования добавленного АДФ (АДФ/т). Содержание белка в пробах определяли по методу Лоури [7].

Статистическую обработку результатов проводили с использованием программы StatPlus Pro 6.2.5.0. Для сравнения данных использовали непараметрический U -критерий Манна — Уитни. Различия показателей между группами считали достоверными при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Митохондрии, выделенные из ткани ГМ интактных крыс (контроль), демонстрировали скорость потребления кислорода (табл. 1), что согласуется с данными литературы [5, 7].

В группах животных, которых подвергали ФПреК, не было выявлено статистически значимых различий в скоростях потребления кислорода как в ранний, так и в поздний периоды ПреК. У животных с ГПреК через 1 ч после последнего эпизода гипобарической гипоксии, т.е. в ранний период, наблюдали тенденцию к снижению начальной скорости окисления субстрата V_0 и статистически значимое снижение скорости фосфорилирующего окисления V_3 на 13,6 % ($p = 0,019$). Через 48 ч после ГПреК (поздний период) данные показатели окислительного фосфорилирования не отличались от данных интактного контроля, а скорость окисления после фосфорилирования V_4 была выше значений интактного контроля на 18 % ($p = 0,032$). В группах животных с комбинированным ПреК не было выявлено различий от группы интактного контроля ни в ранний, ни в поздний периоды ПреК.

В острейшем периоде ишемии (через 1 сут после операции) в контрольной группе крыс с ишемией ГМ наблюдали угнетение работы дыхательной цепи митохондрий, проявляющееся снижением всех скоростей окисления: начальной скорости окисления субстрата V_0 на 32 % ($p = 0,003$), скорости дыхания, сопряженного с фосфорилированием V_3 на 31,8 % ($p = 0,0003$), скорости окисления после фосфорилирования V_4 на 21,7 % ($p = 0,005$) в сравнении с интактным контролем.

Применение фармакологического ПреК вызывало изменения в процессах окислительного фосфорилирования после ишемии. Так, в ранний период ПреК начальная скорость окисления субстрата V_0 была на 19,6 % ($p = 0,038$) выше в сравнении с контролем с ишемией. Скорость фосфорилирующего окисления V_3 была выше контроля с ишемией на 23,4 % ($p = 0,002$) и в то же время ниже значений интактного контроля на 16 % ($p = 0,006$). Скорость окисления после фосфорилирования V_4 не отличалась от значений контроля с ишемией. В поздний период ФПреК было выявлено повышение скорости фосфорилирующего окисления V_3 в сравнении с контролем с ишемией на 19 % ($p = 0,002$). Этот показатель был ниже интактного контроля.

В группе с ГПреК, когда ишемию производили через 1 ч после последнего эпизода гипобарической гипоксии, скорость окислительного фосфорилирования V_3 была выше в сравнении с контролем с ишемией на 23 % ($p = 0,002$) и ниже интактного контроля на 16,1 % ($p = 0,002$). Скорость нефосфорилирующего окисления V_4 была выше контроля с ишемией на 21 % ($p = 0,023$), не отличалась значимо от данных интактного контроля. В группе ГПреК, когда ишемию моделировали спустя 48 ч после последнего эпизода гипобарической гипоксии (поздний период ПреК) наблюдались сходные изменения в скоростях потребления кислорода, что и в предыдущей группе ГПреК. Так, скорость V_3 была выше в сравнении с контролем с ишемией на 24,5 % ($p = 0,002$), ниже интактного кон-

Таблица 1. Влияние ПреК на скорость потребления кислорода митохондриями ГМ крыс в условиях нормоксии и ишемии ГМ

Серия	Группа животных	Скорость дыхания, нмоль O ₂ /мин/мг белка		
		V ₀	V ₃	V ₄
1	Интактный контроль	26,9 (22,1; 28,7)	64,0 (58,6; 65,0)	21,7 (19,5; 23,1)
	Через 1 ч после ФПреК	27,0 (26,4; 29,0)	63,4 (59,8; 64,0)	23,8 (21,7; 23,8)
	Через 48 ч после ФПреК	29,0 (25,5; 31,0)	66,0 (62,5; 68,0)	22,8 (20,8; 24,1)
	Через 1 ч после ГПреК	24,0 (22,9; 27,0)	55,3* (53,0; 56,1)	25,1 (21,8; 27,4)
	Через 48 ч после ГПреК	26,7 (25,4; 28,0)	61,0 (59,7; 62,5)	25,7* (24,3; 27,1)
	Через 1 ч после КПреК	26,3 (24,0; 27,8)	62,0 (59,7; 63,0)	22,4 (21,3; 23,6)
	Через 48 ч после КПреК	28,0 (25,7; 29,9)	65,2 (63,4; 65,9)	21,5 (20,5; 22,3)
2	Контроль ишемия	18,3* (16,9; 19,6)	43,6* (42,1; 45,7)	17,0* (16,5; 19,7)
	ФПреК Ишемия через 1 ч	21,9 [#] (21,0; 27,0)	53,8* [#] (52,0; 54,0)	19,3 (18,4; 20,7)
	ФПреК Ишемия через 48 ч	20,6 (20,0; 22,3)	52,1* [#] (51,6; 52,6)	18,9* (18,0; 19,2)
	ГПреК Ишемия через 1 ч	21,8 (21,7; 23,1)	53,7* [#] (52,8; 54,0)	20,8 [#] (19,7; 21,6)
	ГПреК Ишемия через 48 ч	22,3 (21,9; 23,1)	54,0* [#] (53,8; 54,2)	20,6 [#] (19,7; 20,9)
	КПреК Ишемия через 1 ч	24,5 [#] (23,0; 25,0)	60,4 ^{#фг} (59,2; 61,8)	21,8 ^{#ф} (21,0; 22,3)
	КПреК Ишемия ч/з 48 ч	28,0 ^{#фг} (23,9; 30,6)	63,2 ^{#фг} (62,5; 63,5)	22,2 ^{#фг} (21,8; 23,7)

Данные представлены в виде: медиана (25-й; 75-й проценти). Различия достоверны ($p < 0,05$) по сравнению: * — с интактным контролем, [#] — с группой "Контроль ишемия", ^ф — в сравнении с соответствующей группой ФПреК 2 серии экспериментов, ^г — в сравнении с соответствующей группой ГПреК 2 серии экспериментов.

троля на 15,2 % ($p = 0,004$). Скорость V₄ была выше у крыс группы контроля с ишемией на 21 % ($p = 0,023$).

При комбинированном ПреК как в ранний, так и в поздний период ПреК изменения в показателях окислительного фосфорилирования, вызванные ишемией, становились менее выраженными. Так, при ишемии через 1 ч после КПреК начальная скорость окисления V₀ была выше контроля с ишемией на 34 % ($p = 0,03$), скорость фосфорилирующего окисления V₃ на 38,5 % ($p = 0,002$), скорость нефосфорилирующего окисления V₄ на 28 % ($p = 0,007$). Кроме того, при КПреК положительная динамика в восстановлении скоростей V₃ и V₄ значительнее в сравнении с группой ФПреК 1 ч и ГПреК 1 ч. При ишемии через 48 ч после КПреК не было снижения скоростей окисления. Так, значения V₀ были на 53 % ($p = 0,005$), V₃ на 44,9 % ($p = 0,006$), V₄ на 30 % ($p = 0,001$) выше в сравнении с контролем с ишемией. Более того, были выявлены значимые различия по всем 3 показателям с группами ФПреК и ГПреК ишемия через 48 ч.

При расчете дыхательных коэффициентов по данным полярограмм в группе интактного контроля были получены показатели, представленные в табл. 2. ФПреК в условиях нормоксии снижало ДКч в ранний и поздний период ПреК, при этом значимо не влияя на коэффициент АДФ/О и скорость фосфорилирования АДФ/t в сравнении с интактным контролем. ГПреК также снижало ДКч относительно интактного контроля как в ранний, так и в поздний период ПреК, причем более значимо, чем при фармакологическом ПреК. Эти изменения можно оценить как оптимизацию энергетического состояния при адаптации под действием амтизола и гипоксии. При КПреК не снижался коэффициент фосфорилирования в поздний период ПреК, он был на 30,7 % выше ($p < 0,001$) коэффициента фосфорилирования контрольной группы с ишемией, другие

показатели не отличались значимо от значений интактного контроля.

Ишемия, вызванная двусторонней перевязкой ОСА у крыс, вызывает нарушения функциональной активности митохондрий мозга, проявляющиеся угнетением процессов окисления в различных метаболических состояниях, и сопряжения процессов окисления и фосфорилирования в дыхательной цепи у выживших животных, что согласуется с данными других авторов [6]. Так, спустя 1 сут после операции наблюдалось снижение ДКч на 12 % ($p = 0,004$) в сравнении с интактным контролем. Также происходило снижение коэффициента и скорости фосфорилирования на 19,4 % ($p = 0,003$) и на 30,6 % ($p = 0,002$), соответственно, в сравнении с интактным контролем. Использование ФПреК несколько улучшало состояние дыхательной цепи митохондрий в сравнении с контролем с ишемией, увеличивая ДКч как в ранний, так и в поздний период ПреК, наблюдалось также повышение АДФ/О, более выраженное в ранний период ПреК. Вместе с тем коэффициент фосфорилирования был значимо ниже в сравнении с интактным контролем в обеих группах ФПреК с ишемией. В группах с ГПреК при ишемии ГМ ДКч и скорость фосфорилирования АДФ/t не отличались от данных контроля с ишемией и были ниже в сравнении с интактным контролем как в ранний, так и поздний период ПреК. Коэффициент АДФ/О повышался как и при ФПреК. В случае использования до ишемии КПреК значения всех 3 показателей были достоверно выше данных контроля с ишемией в обеих опытных группах, не отличались от данных интактного контроля, за исключением коэффициента фосфорилирования в поздний период ПреК, который был выше относительно интактного контроля на 10 % ($p = 0,005$).

Таблица 2. Влияние ПреК на расчетные показатели окислительного фосфорилирования в митохондриях ГМ крыс в условиях нормоксии и ишемии ГМ

Серия	Группа животных	ДКч	АДФ/О	АДФ/т
1	Интактный контроль	2,88 (2,78; 2,97)	2,58 (2,55; 2,68)	70 (64; 78)
	Через 1 ч после ФПреК	2,63* (2,54; 2,80)	2,71 (2,64; 2,75)	68 (63,7; 72,8)
	Через 48 ч после ФПреК	2,76* (2,74; 2,77)	2,75 (2,7; 2,86)	69,4 (68,4; 71,2)
	Через 1 ч после ГПреК	2,34* ^ф (2,31; 2,43)	2,57 (2,51; 2,63)	62,5 (60; 63)
	Через 48 ч после ГПреК	2,43* ^ф (2,3; 2,45)	2,78 (2,72; 2,79)	71,0 (68,7; 74,5)
	Через 1 ч после КПреК	2,76 (2,61; 2,80)	2,80 (2,68; 2,82)	71,3 (67; 72)
	Через 48 ч после КПреК	2,95 (2,77; 2,99)	2,84* (2,78; 2,90)	72 (69,4; 78,9)
	2	Контроль ишемии	2,54* (2,36; 2,59)	2,08* (2,05; 2,15)
ФПреК Ишемия через 1 ч		2,64 (2,59; 2,90)	2,41* [#] (2,27; 2,47)	59* (55; 63)
ФПреК Ишемия через 48 ч		2,7 [#] (2,63; 2,78)	2,27* [#] (2,27; 2,38)	54,5* (52; 55)
ГПреК Ишемия через 1 ч		2,59* (2,50; 2,73)	2,33* [#] (2,18; 2,35)	55,0* (53; 62)
ГПреК Ишемия через 48 ч		2,63* (2,51; 2,84)	2,47* [#] (2,38; 2,50)	58* (50; 63)
КПреК Ишемия через 1 ч		2,78 [#] (2,61; 2,83)	2,54 [#] † (2,48; 2,60)	63,5 [#] (61; 67)
КПреК Ишемия через 48 ч		2,83 [#] (2,64; 2,89)	2,72 [#] † (2,67; 2,77)	68 [#] (63,7; 71)

Данные представлены в виде: медиана (25-й; 75-й процентиля). Различия достоверны ($p < 0,05$) по сравнению: * — с интактным контролем, [#] — с группой “Контроль ишемии”, ^ф — в сравнении с соответствующей группой ФПреК, [†] — в сравнении с соответствующей группой ГПреК.

Таким образом, в механизме нейропротективного действия комбинированного ПреК с использованием амтизола и гипобарической гипоксии при последующей ишемии ГМ крыс определенное значение имеет их положительное влияние на показатели биоэнергетики. Выбранные нами варианты ПреК в разной степени защищают митохондрии ГМ при последующей ишемии ГМ, что не противоречит тому факту, что именно митохондрии играют ключевую роль в нейропротективном действии ПреК [16].

Дыхательная цепь митохондрий вовлечена в регуляцию экспрессии гипоксией индуцированного фактора-1 (HIF-1 α). HIF-1 α отводят важную роль в развитии ПреК. HIF-1 α стимулирует синтез протеинов, помогающих клетке сохранить жизнеспособность в условиях низкого содержания кислорода. Так, нами показано, что комбинированное ПреК с использованием амтизола в комбинации с умеренной гипоксией вызывает повышение уровня HIF-1 α в условиях нормоксии. В условиях экспериментальной ишемии КПреК приводит к стабилизации содержания HIF-1 α на уровне показателей интактного контроля [15].

Идея использования в качестве инициаторов феномена ПреК различных химических веществ появилась ещё в 90-е годы прошлого века. В настоящее время этот подход до сих пор обсуждается [11, 13]. Считают, что химически индуцированная толерантность к ишемическому инсульту может быть достигнута за счет влияния на различные митохондриальные белки, такие как митохондриальные комплексы (МФК) I, II и IV, адениннуклеотид транслоказу, митохондриальную пору (mPTP) и митохондриальный АТФ-зависимый калиевый канал. Так, например, изофлуран и галоперидол — ингибиторы МФК I, 3-нитропропионовая кислота — обратимый ингибитор МФК II, угнетая окис-

лительное фосфорилирование, могут повышать гипоксическую толерантность. Вместе с тем химическое ПреК не может получить должного развития, так как является достаточно рискованным воздействием, но из него выделилось направление фармакологического ПреК. В настоящее время показано нейропротективное действие при профилактическом введении ряда лекарственных веществ, способных ингибировать открытие mPTP. В предыдущей работе нами также показано, что исследуемая схема комбинированного ПреК с использованием амтизола и гипоксии влияет на киназу гликоген синтазы 3 β , а, следовательно, может препятствовать открытию митохондриальной поры [15].

Способность амтизола вызывать адаптивные изменения в организме, сходные по механизму развития со срочной адаптацией к гипоксии обсуждалась еще в работе [1], результаты которой свидетельствуют о том, что профилактическое введение амтизола до гипобарической гипоксии способствует усилению изменений показателей окислительного фосфорилирования в митохондриях, которые вызывала в них гипоксия. Амтизол участвует в формировании более эффективного с точки зрения энергообразования функционального состояния митохондрий за счет активации гликолиза, а также ингибирования липолиза и предупреждения повреждающего действия жирных кислот на митохондриальные мембраны, и, как следствие, уменьшения разобщенности окислительного фосфорилирования [1, 3]. Предположение о том, что среди мишеней действия для амтизола есть те, что имеют значение в реализации срочного этапа адаптации к гипоксии, в том числе активация гипоксией индуцированного фактора-1 (HIF-1 α), нашло подтверждение и в наших работах [15]. В свою очередь, как известно, дыхательная цепь митохондрий вовлечена в регуляцию экспрессии HIF [10].

Использование в качестве фармакологического компонента комбинированного ПреК средств с преобладающим антигипоксическим действием позволяет не только потенцировать устойчивость организма к последующей тяжелой гипоксии и/или ишемии, но и смягчить действие физического фактора. Механизм реализации такого потенцирующего действия для амтизола требует дальнейшего изучения.

ВЫВОДЫ

1. Амтизол (25 мг/кг, внутривенно 1 раз в день) в режиме ПреК не влияет на функциональную активность митохондрий ГМ крыс в условиях нормоксии.

2. Амтизол в сочетании с умеренной гипобарической гипоксией в режиме ПреК вызывает повышение сопряжения процессов окисления с фосфорилированием на 10 % ($p = 0,005$).

3. Двусторонняя перевязка общих сонных артерий у крыс вызывает угнетение всех показателей окислительного фосфорилирования митохондрий ГМ.

4. Амтизол в режиме ПреК улучшает функцию митохондрий ГМ крыс после ишемии. Похожие изменения наблюдаются при гипоксическом ПреК.

5. Амтизол в сочетании с умеренной гипобарической гипоксией в режиме ПреК обеспечивает нейропротекторный эффект (под их действием не снижаются показатели окислительного фосфорилирования митохондрий ГМ, скорости дыхания митохондрий, дыхательный контроль, сопряженность окисления с фосфорилированием) у крыс после экспериментальной ишемии ГМ.

ЛИТЕРАТУРА

1. А. Е. Александрова, *Эксперим. и клин. фармакол.*, **68**(5), 72 – 78 (2005); doi: 10.30906 / 0869-2092-2005-68-5-72-78.

2. М. М. Галагудза, А. В. Сыренский, Т. Д. Власов и др., *Эксперим. и клин. фармакол.*, **72**(6), 22 – 26 (2009); doi: 10.30906 / 0869-2092-2009-72-6-22-26.
3. И. В. Зарубина, П. Д. Шабанов, *Молекулярная фармакология антигипоксантов*, ООО “Издательство Н-Л”, Санкт-Петербург (2004).
4. О. С. Левченкова, В. Е. Новиков, К. Н. Кулагин, Н. С. Понамарева, *Эксперим. и клин. фармакол.*, **79**(6), 3 – 8 (2016); doi: 10.30906 / 0869-2092-2016-79-6-3-8.
5. А. Н. Макаренко, Ю. К. Карандеева, *Вісн. пробл. біол. і мед. диц.*, № 2, 27 – 31 (2013).
6. Н. Е. Максимович, Т. С. Милош, В. В. Ермак и др., *Ж. ГрГМУ*, **15**(4), 405 – 409 (2017); doi: 10.25298 / 2221-8785-2017-15-4-405-409.
7. В. Е. Новиков, *Автореф. дис. докт. мед. наук*, Смоленск (1993).
8. А. В. Панов, *Практическая митохондриология*, Новосибирск (2015); doi: 10.13140 / 2.1.1599.3127.
9. В. В. Яценцов, Е. П. Просвирина, Е. Г. Цублова, *Эксперим. и клин. фармакол.*, **75**(7), 8 – 10 (2012); doi: 10.30906 / 0869-2092-2012-75-7-8-10.
10. F. H. Agani, P. Pichiule, J. C. Chavez, J. C. LaManna, *J. Biol. Chem.*, **275**(46), 35863 – 35867 (2000); doi: 10.1074 / jbc. M005643200.
11. D. W. Busija, P. V. Katakam, *J. Vasc. Res.*, **51**(3), 175 – 189 (2014); doi: 10.1159 / 000360765.
12. E. Esposito, R. Desai, X. Ji, E. H. Lo, *Brain Circulation*, **1**(1), 104 – 113 (2015); doi: 10.4103 / 2394 – 8108.166380.
13. Z. Jin, J. Wu, L.-J. Yan, *Int. J. Mol. Sci.*, **17**, 351 (2016); doi: 10.3390 / ijms17030351.
14. K. B. Koronowski, K. R. Dave, I. Saul, V. Camarena, *Stroke*, **46**(8), 2293 – 2298 (2015); doi: 10.1161 / STROKEAHA.115.009876.
15. O. S. Levchenkova, V. E. Novikov, E. S. Abramova, Zh. A. Feoktistova, *Bul. Exp. Biol. Med.*, **164**(3), 320 – 323 (2018); doi: 10.1007 / s10517-018-3981-5.
16. M. J. Sisalli, L. Annunziato, A. Scorziello, *Front. Neurol.*, **6**, 115 (2015); doi: 10.3389 / fneur.2015.00115.
17. Y. Yang, F. Lu, L. Huang, et al., *Am. J. Transl. Res.*, **9**(12), 5308 – 5319 (2017); PMID: PMC5752883.

Поступила 09.11.19

INFLUENCE OF PRECONDITIONING BY AMTIZOL AND MODERATE HYPOXIA ON BRAIN MITOCHONDRIAL FUNCTION UNDER EXPERIMENTAL NORMOXIA/CEREBRAL ISCHEMIA CONDITIONS

V. E. Novikov, K. N. Kulagin, O. S. Levchenkova, and N. S. Ponomareva

Smolensk State Medical University, ul. Krupskoi 28, Smolensk, 214019 Russia

The effect of combined preconditioning with amtizol (3,5-diamino-1,2,4-thiadiazole) and moderate hypobaric hypoxia, as well as their separate use on the oxidative phosphorylation level in rat cerebral mitochondria has been studied in normoxia and ischemia caused by bilateral common carotid artery occlusion. It was established that pharmacological preconditioning does not significantly change the respiration rates in brain tissue in different metabolic states during normoxia, at the same time, respiratory control index decreases both in the early and late periods of preconditioning by 8.7 % ($p = 0.045$) and 4.2% ($p = 0.038$) respectively. Hypoxic preconditioning reduces the state 3 respiration rate in brain mitochondria in the early period by 13.6% ($p = 0.019$) as well as respiratory control index in both the early and late periods of preconditioning on the average by 17% ($p = 0.002$). In the case of combined preconditioning, the rates and indices of mitochondrial respiration do not differ from the intact control data; in the late period, an increase in the P/O ratio by 10% ($p = 0.005$) was observed. Impaired oxidative and phosphorylation functions of mitochondria were observed in one day after the cerebral ischemia induction. In the case of separate use, both the pharmacological and hypoxic preconditioning for 1 and 48h before ischemia increased the state 3 respiration rate and P/O ratio in comparison to the control group with ischemia, but these indices remain significantly lower in comparison to the intact control group. The combined preconditioning prevents ischemia-induced impairment of mitochondrial oxidative phosphorylation, in particular, by increasing the state 3 respiration rate by 38.5% ($p = 0.002$) in the early and by 44.9% ($p = 0.006$) in the late periods of preconditioning, and the P/O ratio in the oxidation of NAD-dependent glutamate substrate by 22 % ($p = 0.002$) in the early and 30 % ($p = 0.0008$) in the late periods of preconditioning.

Keywords: preconditioning; amtizol; hypobaric hypoxia; oxidative phosphorylation; mitochondria; rats.