

ОКИСЛИТЕЛЬНОЕ ФОСФОРИЛИРОВАНИЕ ПОД ДЕЙСТВИЕМ АМТИЗОЛА В КОМБИНАЦИИ С ГИПОБАРИЧЕСКОЙ ГИПОКСИЕЙ ПРИ ИШЕМИИ ГОЛОВНОГО МОЗГА В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

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

Смоленский государственный медицинский университет

Актуальность. Среди нейропротективных способов для предупреждения тяжелых последствий гипоксически-ишемических повреждений головного мозга (ГМ) исследуется возможность применения адаптивного феномена, известного под названием прекондиционирования (ПреК). Принято выделять два защитных периода в развитии ПреК: ранний период срочной адаптации и поздний период отсроченной адаптации. Эффективность комбинированного способа ПреК, когда физический фактор (ишемическое, гипоксическое ПреК) дополняется фармакологическим, всё чаще интересует исследователей. В качестве фармакологического ПреК изучаются средства с антигипоксическим действием, в механизме действия которых имеются те же, что и при ПреК мишени на сигнальном и эффекторном этапе адаптации организма к гипоксии (гипоксией индуцированный фактор (HIF)-1 α , активные формы кислорода, белки энергетического обмена, процессов гликолиза, ферменты дыхательной цепи митохондрий) [1, 2]. Нами продемонстрирована эффективность применения 3,5-диамино-1,2,4-тиадиазола, известного под названием амтизол, до предстоящей ишемии мозга. Амтизол, потенцируя действие гипоксического прекондиционирования, увеличивал выживаемость крыс и снижал тяжесть неврологического дефицита после операции двусторонней перевязки общих сонных артерий в ранний и поздний периоды ПреК [3].

Цель данного исследования: изучение влияния амтизола в комбинации с умеренной гипобарической гипоксией на функцию митохондрий ГМ крыс в условиях нормоксии и после ишемии мозга.

Материалы и методы исследования. Исследования выполнены на белых крысах самцах линии Вистар. Комбинированное ПреК – чередующееся применение амтизола (25 мг/кг внутривентриально) и гипобарической гипоксии (410 мм рт. ст. соответствующих высоте 5000 метров, экспозиция 60 мин) в течение 6 дней.

Оценку окислительного фосфорилирования проводили у животных при нормоксии через 1 ч и 48 ч после последнего предъявления

комбинированного ПреК, а также при ишемии мозга, которую моделировали спустя 1 ч и 48 ч после прекращения комбинированного ПреК путем одномоментной двусторонней перевязки общих сонных артерий (ОСА) под наркозом (хлоралгидрат 400 мг/кг). Через сутки после ишемии крыс декапитировали. 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. Статистическую обработку результатов проводили с использованием программы StatPlus Pro 6.2.5.0, непараметрического U-критерия Манна-Уитни. Данные представлены в виде: медиана (25-й; 75-й процентиля).

Результаты. Митохондрии, выделенные из ткани ГМ интактных крыс (контроль) демонстрировали следующие скорости потребления кислорода: $V_0=26,9$ (22,1; 28,7); $V_3=64,0$ (58,6; 65,0); $V_4=21,7$ (19,5; 23,1) нмоль O_2 /мин/мг белка, коэффициент фосфорилирования АДФ/О=2,58 (2,55; 2,68). При комбинированном прекондиционировании показатели окислительного фосфорилирования не отличались от данных интактного контроля, в поздний период наблюдалось увеличение коэффициента фосфорилирования на 10% ($p=0,005$). Через сутки после моделирования ишемии ГМ наблюдалось нарушения окислительной и фосфорилирующей функции митохондрий: $V_0=18,3$ (16,9; 19,6); $V_3=43,6$ (42,1; 45,7); $V_4=17,0$ (16,5; 19,7) нмоль O_2 /мин/мг белка, коэффициент фосфорилирования АДФ/О=2,08 (2,05; 2,15). Комбинированное прекондиционирование предотвращало 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 период прекондиционирования, сопряженность окислительного фосфорилирования (коэффициент АДФ/О) при окислении НАД-зависимого субстрата глутамата на 22% ($p=0,002$) в ранний и на 30% ($p<0,001$) в поздний периоды прекондиционирования. 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. Следует также отметить, что 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 выжить в условиях низкого содержания кислорода [1].

Комбинированное ПреК с использованием амтизола в комбинации с умеренной гипоксией вызывает повышение уровня гипоксией индуцированного фактора-1 альфа в условиях нормоксии. В условиях экспериментальной ишемии комбинированное прекондиционирование приводит к стабилизации содержания HIF-1 α на уровне показателей интактного контроля [3].

Выводы:

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

2. Двусторонняя перевязка общих сонных артерий у крыс вызывает угнетение всех показателей окислительного фосфорилирования митохондрий мозга в среднем на 28% у выживших животных.

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

Литература

1. Lukyanova, L. D. Mitochondria-controlled signalling mechanisms of brain protection in hypoxia / L. D. Lukyanova, Y. I. Kirova // *Frontiers in Neuroscience*. – 2015. – Vol. 9. – P. 1–13.

2. Rybnikova, E. Current insights into the molecular mechanisms of hypoxic pre and postconditioning using hypobaric hypoxia / E. Rybnikova, M. Samoilov // *Frontiers in Neuroscience*. – 2015. – Vol. 9. – P. 388-399.

3. Levchenkova, O. S. Signal mechanism of the protective effect of combined preconditioning by amtizole and moderate hypoxia / O. S. Levchenkova [et al] // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. – 2018. – Vol. 164, № 3. – P. 320–323.