

**Хусаинова Гульнара Хамзаевна**

**ПРОИЗВОДНЫЕ НЕЙРОАКТИВНЫХ АМИНОКИСЛОТ КАК  
РЕГУЛЯТОРЫ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ МИТОХОНДРИЙ  
ВОЗБУДИМЫХ ТКАНЕЙ КРЫС В НОРМЕ И ПРИ  
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ПАТОЛОГИЯХ**

3.3.6.- Фармакология, клиническая фармакология

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени кандидата  
фармацевтических наук

Работа выполнена в ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет»  
Министерства здравоохранения Российской Федерации

**Научный руководитель:**

Доктор медицинских наук, профессор

**Островский Олег Владимирович**

**Научный консультант:**

Доктор биологических наук, профессор

**Перфилова Валентина Николаевна**

**Официальные оппоненты:**

Заведующий кафедрой фармакологии и  
клинической фармакологии ФГАОУ ВО  
«Белгородский государственный национальный  
исследовательский университет» Минобрнауки РФ,  
доктор медицинских наук, профессор

**Покровский Михаил Владимирович**

заведующая кафедрой фармацевтической  
химии, фармакогнозии и организации  
фармацевтического дела факультета  
фундаментальной медицины ФГБОУ ВО  
«Московский государственный университет  
имени М.В. Ломоносова», доктор  
фармацевтических наук, профессор

**Каленикова Елена Игоревна**

**Ведущая организация:**

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования  
«Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения  
Российской Федерации

Защита диссертации состоится «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2022 г. в \_\_\_\_\_ ч. на заседании  
Диссертационного Совета 21.2.005.02 ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный  
медицинский университет» Минздрава России по адресу 400131, г. Волгоград, пл. Павших  
Борцов, 1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ([www.volgmed.ru](http://www.volgmed.ru)) ФГБОУ ВО  
«Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава России.

Автореферат разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2022 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,  
доктор биологических наук

**Любовь Ивановна Бугаева**

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ДИССЕРТАЦИИ

### **Актуальность темы исследования**

Активное развитие «метаболического» направления в медицине за последние десятилетия позволило установить, что в основе развития многих социально значимых заболеваний лежит нарушение клеточного энергообмена [Pfeffer G. et al., 2013; Muraresku C. C., et al., 2018]. Известно, что основным поставщиком энергии в клетках являются митохондрии, которые синтезируют АТФ путем окислительного фосфорилирования одновременно с окислением метаболитов в цикле Кребса и  $\beta$ -окислением жирных кислот [Lim S. et al., 2016; Spinelli J. V., 2018]. Митохондрии участвуют в таких важных процессах как апоптоз, генерация и утилизация активных форм кислорода, метаболизм энергетических субстратов и гомеостаз кальция [Покровский М. В. и др., 2015; Дудылина А. Л. и др., 2019; Granatiero V. et al., 2017; Pallafacchina G. et al., 2018; Sas K. et al., 2018; Zhou B. et al., 2018; Belosludtsev K. N. et al., 2020]. Так же они играют значительную роль в процессах нейропластичности и дифференцировке нейронов. Нарушение физиологического функционирования митохондрий под воздействием внешних и внутренних патофизиологических факторов, таких как стресс, некоторые лекарственные препараты (бриостатин, азидотимидин), этанол, химические агенты, ионизирующее и ультрафиолетовое излучение, недостаточность некоторых микроэлементов (например, селена) является ключевым и наиболее ранним этапом повреждения клеток и способно приводить к развитию окислительного стресса, гипоэнергетического состояния и дальнейшему развитию клеточной альтерации вплоть до гибели клетки [Iglewski M. et al., 2010; Tanaka K. et al., 2016; Kumar A. et al., 2019].

Согласно данным исследований российских и зарубежных ученых, развитие заболеваний, связанных с гипоэнергетическими состояниями в клетках, можно предотвратить препаратами, нацеленными на регуляцию энергетического обмена. Известно, что  $\gamma$ -аминомасляная кислота (ГАМК) — важный тормозный нейромедиатор центральной и периферической нервной системы, играет важную роль в обмене аминокислот и углеводов в мозге, ускоряет утилизацию глюкозы в клетках головного мозга, улучшает его кровоснабжение, повышает респираторную активность клеток, оказывает стимулирующее действие на цикл трикарбоновых кислот.

В научных работах, проведенных ранее на кафедре фармакологии и биофармации ФУВ было выявлено кардио- и церебропротекторное действие производных ГАМК и глутаминовой кислоты (ГК) [Тюренков И. Н. и др. 2006; Васильев П. М. и др., 2008; Тюренков И. Н. и др. 2012; Щербакова Т. Н. и др. 2021].

Принимая во внимание роль митохондриальной дисфункции в патогенезе заболеваний сердца и мозга, представлялось перспективным и целесообразным изучение влияния производных ГАМК и ГК на функциональную активность интактных и поврежденных митохондрий при стрессе и алкогольной интоксикации.

### **Степень разработанности проблемы**

В последние десятилетия в медицине активно развивается «метаболическое» направление, основанное на изучении роли обменных процессов в формировании патологических состояний. Наибольший интерес в этом аспекте вызывают митохондрии. Согласно большому количеству данных, опубликованных российскими и зарубежными учеными, негативные изменения в работе митохондрий являются важнейшим этапом повреждения клеток. Они ведут к недостаточности энергообеспечения, нарушению многих других важных обменных процессов, дальнейшему развитию клеточного повреждения вплоть до ее гибели [Перфилова В. Н. и др., 2010; Al-Gadi I.S., et al., 2018; Liu F. et al., 2018; Peng Y. et al., 2020; Saneto R.P. et al., 2020; Tinker R. J. et al., 2021].

Установлено, что митохондриальные дисфункции могут быть первичными или генетическими, обусловленными мутациями генов, и вторичными или фенотипическими, в основе которых лежит нарушение клеточного энергообмена. Активно формируются представления о роли нарушений клеточной энергетике в развитии нейродегенеративных патологий, заболеваний сердечно-сосудистой и эндокринной системы [Тюренков И. Н. и др., 2017; Varga Z. V. et al., 2015; Picard M. et al., 2016].

На сегодняшний день наиболее перспективной стратегией лечения дегенеративных болезней нервной и сердечно-сосудистой систем является применение фармакологических препаратов, направленных на ограничение окислительного повреждения клеток и восстановление энергообмена. Ведется активное изучение влияния производных ГАМК и ГК на функциональное состояние митохондрий [Перфилова В. Н. и др., 2005; Верткин А. Л. 2016; Солгалова А. С. и др., 2018; Гусакова Е. А. и др., 2019].

#### **Цель исследования**

Комплексная оценка производных ГАМК и ГК как регуляторов функционального состояния митохондрий сердца и мозга интактных, стрессированных и алкоголизованных животных.

#### **Задачи исследования**

1. Скрининг среди производных нейроактивных аминокислот веществ, влияющих на скорость поглощения кислорода митохондриями печени в различных метаболических состояниях цепи переноса электронов.
2. Изучить зависимость концентрация-эффект наиболее активных производных ГАМК и ГК на функциональное состояние митохондрий интактных и поврежденных клеток печени крыс.
3. Оценить влияние наиболее активных производных ГАМК и ГК на дыхательную функцию митохондрий головного мозга и сердца крыс, подвергнутых окислительному стрессу, индуцированному гидроперекисью третбутила *in vitro*.
4. Исследовать влияние наиболее активных производных ГАМК и ГК *ex vivo* на функциональное состояние митохондрий мозга и сердца стрессированных крыс и подвергнутых острой и хронической алкогольной интоксикации животных.
5. Провести *ex vivo* анализ влияния производных ГАМК и ГК на продукцию малонового диальдегида, активность каталазы, СОД и сукцинатдегидрогеназы митохондрий сердца и мозга стрессированных и алкоголизованных животных.

#### **Новизна исследования**

Впервые проведена комплексная оценка влияния производных ГАМК и ГК на функциональное состояние митохондрий сердца и мозга интактных, стрессированных и алкоголизованных животных.

Проведенное скрининговое исследование позволило выделить среди производных ГАМК и ГК два наиболее активных вещества – фенотропил и салифен, – которые повышали показатели функционального состояния интактных и поврежденных митохондрий в большей степени по сравнению с остальными производными ГАМК и ГК.

Впервые изучена зависимость функциональной активности митохондрий от дозы фенотропила и салифена.

Установлено, что фенотропил и салифен повышают скорость АДФ-индуцированного дыхания, ограничивают потребление  $O_2$  после исчерпания АДФ, способствуя увеличению показателя дыхательного контроля (ДК), препятствуют угнетению процессов окислительного фосфорилирования и снижению эффективности антиоксидантной системы в митохондриях, выделенных из головного мозга и кардиомиоцитов стрессированных и алкоголизованных животных. Это указывает на способность исследуемых соединений ограничивать повреждение митохондрий.

#### **Научно-практическая ценность работы**

В результате проведенного исследования было установлено, что производные ГАМК – салифен и фенотропил – способствуют улучшению функционального состояния митохондрий мозга и сердца крыс, подвергавшихся острой (ОАИ) и хронической алкогольной интоксикации (ХАИ), острому иммобилизационно-болевному стрессу, ограничивают развитие окислительного стресса и митохондриальной дисфункции.

В ходе экспериментальных исследований выбраны наиболее перспективные производные ГАМК для дальнейшего исследования с целью создания на их основе препаратов, ограничивающих повреждение митохондрий в условиях алкогольной интоксикации и стресса.

Полученные результаты анализа влияния производных ГАМК на показатели функциональной активности и антиоксидантный статус митохондрий внедрены в образовательный и научный процессы в Волгоградском государственном медицинском университете и научный процесс в Научном центре инновационных лекарственных средств ВолГМУ

#### **Методология и методы исследования.**

Методологической основой изучения влияния производных ГАМК и ГК на функциональное состояние митохондрий возбудимых тканей при алкогольной интоксикации и стрессе являлись отечественные и зарубежные рекомендации, а также научные работы по биохимии и фармакологии. Статистическую обработку полученных данных проводили с применением соответствующих методов статистического анализа.

Проведение экспериментов осуществляли в соответствии с «Методическими рекомендациями по доклиническому изучению лекарственных средств» (Миронов А.Н. и др., 2012) с использованием достаточного количества лабораторных животных. Работа была одобрена Региональным Исследовательским Этическим Комитетом Волгоградской области (протокол № 1 от 17.02.2017 г).

Исследование проведено на крысах линии *Wistar* (самцы и самки) (n=204) массой 230-350 г.

#### **Положения, выносимые на защиту**

1. Из 6 исследуемых производных ГАМК и 2 производных ГК наиболее выраженное положительное действие на интактные и поврежденные митохондрии оказывают фенотропил и салифен. Исследуемые вещества дозозависимо повышают показатели функциональной активности митохондрий (V3, ДК).

2. Салифен и фенотропил в исследованиях *ex vivo* снижают негативное влияние острого стрессорного воздействия, ОАИ и ХАИ, что сопровождается повышением скорости потребления кислорода в состоянии V3 и коэффициента дыхательного контроля в митохондриях головного мозга и сердца крыс.

3. Изучаемые соединения ограничивают процессы ПОЛ в поврежденных митохондриях клеток головного мозга и сердца, увеличивают активность антиоксидантных ферментов.

#### **Личный вклад автора**

Автор принимал участие в разработке концепции исследования, задач, выводов и научно-практических рекомендаций, разработке дизайна, протоколов экспериментов и подборе методов исследования. Автором проведен анализ современных литературных источников, касающихся темы диссертации, выполнена экспериментальная часть работы, сбор первичных данных, статистическая обработка, анализ и обобщение полученных результатов, формулировка, написание оригинальных статей по теме диссертации.

#### **Степень достоверности и апробация результатов**

Высокая степень достоверности результатов диссертационного исследования подтверждается достаточным объемом полученных данных в экспериментальных исследованиях, проведенных на крысах линии *Wistar* с использованием современных методологических подходов и высокотехнологичного оборудования, а также адекватных методов статистической обработки результатов.

Материалы диссертации докладывались и обсуждались на XXII региональной конференции молодых исследователей Волгоградской области (Волгоград, 2017); 74-ой (диплом I степени), 75-ой (диплом I степени), 76-ой, 77-ой (диплом II степени) и 78-ой (диплом II степени) открытых научно-практических конференциях молодых ученых и студентов ВолГМУ с международным участием «Актуальные проблемы экспериментальной и клинической медицины». По результатам диссертационного исследования опубликовано 14 печатных работ, из них – 6 в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ.

#### **Объем и структура диссертации**

Диссертация изложена на 181 странице машинописного текста, проиллюстрирована 17 таблицами и 58 рисунками, состоит из введения, обзора литературы (глава I), описания материалов и методов исследования (глава II), экспериментальной части (глава III), обсуждения

результатов, выводов, научно-практических рекомендаций и списка литературы, который содержит 240 источников, включая 50 отечественных и 190 зарубежных авторов.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

**В первой главе** приведены данные российских и зарубежных исследователей о возможных механизмах повреждения клеток в результате развития митохондриальной дисфункции под действием стресса и алкогольной интоксикации.

**Во второй главе** описаны материалы и методы исследования. Работа была выполнена на крысах линии *Wistar*, полученных из ФГУП «Питомник лабораторных животных «Рапполово» (Ленинградская область). Животные содержались в условиях вивария с соблюдением всех правил лабораторных исследований при проведении доклинических испытаний в РФ (ГОСТ 33216 – 2014), а также приказа Минздравсоцразвития России № 708н от 23.08.2010 г. «Об утверждении правил лабораторной практики», в соответствии с рекомендациями ВОЗ по экспериментальной работе с использованием лабораторных животных. Эксперименты проводили в соответствии с требованиями Российского национального комитета по биоэтике при Российской академии наук, надлежащей лабораторной практики (GLP), доказательной медицины и международными рекомендациями Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных исследованиях (1997). Работа была одобрена Региональным Исследовательским Этическим Комитетом Волгоградской области: № 1-2017 от 16.02.2017 г.

На митохондриях, выделенных из печени крыс ( $n=16$ ), в условиях *in vitro* был проведен скрининг среди 6 производных гамма – аминокислоты (ГАМК): мефебут (метилэфир фенибута), баклофен (4-амино-3-парахлорфенил), фенибут ( $\gamma$ -амино- $\beta$ -фенилмасляная кислота), толибут (4-амино-3-метилфенил-бутановая кислота), фенотропил (N-карбамоилметил-4-фенил-2-пирролидон), салифен (композиция фенибута с салициловой кислоты в соотношении 2:1) и 2 производных глутаминовой кислоты (ГК): нейроглутам (гидрохлорид бета-фенилглутаминовой кислоты), соединение ГРПУ-238 (гидрохлорид диметил-3-фенилглутаминовой кислоты) веществ, оказывающих наиболее выраженное положительное действие на митохондрии. Вещества были синтезированы на кафедре органической химии Российского государственного педагогического университета имени А.Н. Герцена (Санкт-Петербург, Россия). Первый этап исследования проводили в условиях *in vitro*. Рассматривали влияние исследуемых веществ на показатели функциональной активности поврежденных и интактных митохондрий. Были сформированы следующие группы: 1 – интактная, 2 – контрольная, 3 – 11 – поврежденные митохондрии, инкубированные с изучаемыми веществами. **Повреждение митохондрий моделировали** путем инкубирования митохондриальной фракции с сильным окислителем - трет-бутилгидропероксидом (ГПТБ) в дозе 200 нмоль в течение 10 минут. Далее добавляли исследуемые вещества в концентрации  $1 \times 10^{-5}$  М на 100 мкл митохондриальной фракции и инкубировали 10 минут. В качестве препарата сравнения был выбран кверцетин – флавоноид, обладающий антиоксидантной активностью [Коваленя Т. А. и др. 2020]. Интактные митохондрии были разделены на группы: 1– интактная, 2 – 10 – митохондрии, инкубированные с изучаемыми веществами. Исследование зависимости доза – эффект проводили на интактных ( $n=8$ ) и поврежденных митохондриях печени ( $n=8$ ), инкубированных с фенотропилом и салифеном в концентрации  $1 \times 10^{-5}$ ,  $1 \times 10^{-6}$ ,  $1 \times 10^{-7}$ .

Проводили оценку влияния фенотропила (в дозе 25 мг/кг) и салифена (в дозе 15 мг/кг) на функциональное состояние митохондрий мозга и сердца крыс, подвергавшихся окислительному стрессу *in vitro*. В качестве препарата сравнения был выбран фенибут, обладающий нейро – и кардиопротекторным, антиоксидантным эффектом в условиях стрессорного повреждения.

Дальнейшие исследования были проведены *ex vivo*. Рассматривали влияние фенотропила в дозе 25 мг/кг, салифена в дозе 15 мг/кг и фенибута в дозе 25 мг/кг на показатели функциональной активности митохондрий головного мозга и сердца крыс, подвергавшихся острому иммобилизационно – болевому стрессу. **Острый иммобилизационно – болевой стресс моделировали** путем подвешивания крыс за дорсальную шейную складку на 24 часа с помощью

зажима Кохера. За час до моделирования стресса животным внутрибрюшинно вводили исследуемые вещества. Были сформированы следующие группы 1– интактная– митохондрии, выделенные из сердца и мозга животных, которым вводили 0,9% раствор NaCl (n=8, где n – количество животных), 2– стресс+физ. р-р– митохондрии, выделенные из сердца и мозга животных, которым вводили 0,9% р-р NaCl и подвергали острому иммобилизационно-болевному стрессу (n=8), 3–5 – митохондрии, выделенные из сердца и мозга животных, которым вводили салифен ( 15 мг/кг) (n=7), фенотропил (25 мг/кг) (n=7), фенибут ( 25 мг/кг) и подвергали 24 – часовому острому иммобилизационно-болевному стрессу (n=7).

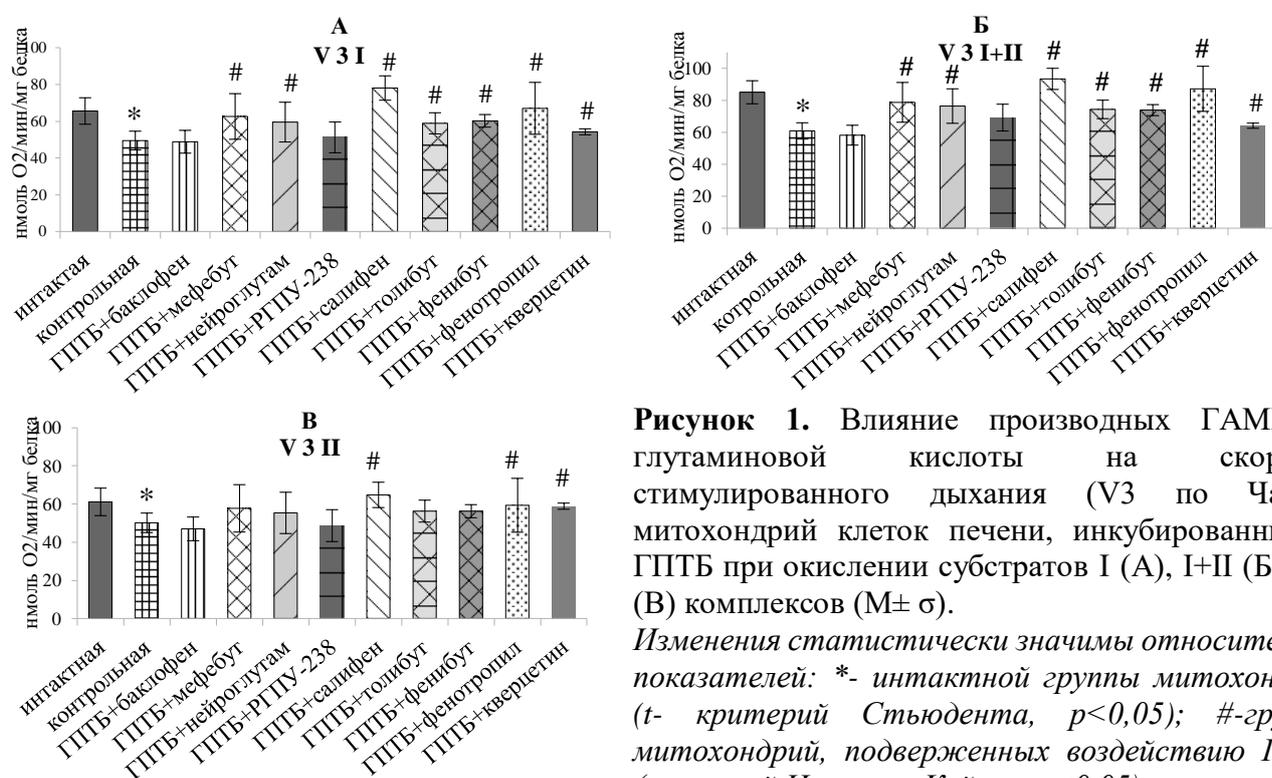
**Острую алкогольную интоксикацию (ОАИ) моделировали** путем перорального введения 32% раствора этанола из расчета 4 г/кг веса [Jeon E. J.,2020]. Интактные животные получали эквивалентное количество дистиллированной воды. За 10 минут до моделирования ОАИ, крысам внутрибрюшинно вводили исследуемые вещества: фенотропил (25мг/кг), салифен (15мг/кг) и мельдоний (50 мг/кг) (лекарственный препарат – милдронат, Гриндекс АО, Латвия). Были сформированы следующие группы: 1- интактная – митохондрии сердца и мозга животных, получавших физ. р-р в количестве 1мл/кг (n=7); 2 - ОАИ+физ.р-р – митохондрии сердца и мозга животных, получавших после ОАИ физ. р-р 1 мл/кг (n=7); 3 –5– ОАИ+исследуемые вещества– митохондрии сердца и мозга животных, получавших после ОАИ салифен в дозе 15 мг/кг (n=7), фенотропил в дозе 25 мг/кг (n=7) и милдронат в дозе 50 мг/кг (n=7). **Хроническую алкогольную интоксикацию (ХАИ) моделировали** путем замены питьевой воды на 10 % раствор этилового спирта в течение 24 недель. Ежедневно регистрировали количество выпитого алкоголя. После отмены этанола, в течение 14 дней животным внутрибрюшинно вводили 0,9% р-р NaCl и исследуемые вещества – салифен, фенотропил и препарат сравнения – милдронат. Милдронат является метаболическим средством. Известно, что он эффективен при ишемии сердца и ее последствиях, восстанавливает нарушенное мозговое кровообращение, обеспечивает равновесие между процессами доставки O<sub>2</sub> и его потребления, предотвращает накопление цитотоксических промежуточных продуктов β-окисления жирных кислот в ишемических тканях, предотвращает процессы перекисного окисления липидов, ограничивает образование АФК в митохондриях. Были сформированы следующие группы животных: 1– интактная – митохондрии мозга и сердца животных, не подвергавшихся хронической алкогольной интоксикации (n=9); 2– ХАИ+физ. р– р – митохондрии мозга и сердца животных, получавших после ХАИ внутрибрюшинно физ. раствор в дозе 1 мл/кг (n=10); 3– 5 ХАИ+исследуемые вещества – митохондрии мозга и сердца животных, получавших после ХАИ внутрибрюшинно салифен в дозе 15 мг/кг (n=7), фенотропил в дозе 25 мг/кг (n=7), и милдронат в дозе 50 мг/кг (n=7). Выбор эффективных доз исследуемых веществ был основан на литературных данных, согласно которым они оказывали наиболее выраженное кардио- и нейропротекторное действие [Тюренок И. Н. и др., 2016].

**Выделение митохондрий** осуществляли методом дифференциального центрифугирования. Определение окислительной и фосфорилирующей активности митохондрий, характеризующей их функциональное состояние, проводили с помощью полярографического метода с использованием платинового электрода закрытого типа (электрод Кларка) и полярографа Oxytherm system («Hansatech Inst», Англия). Измеряли скорость АДФ индуцированного поглощения кислорода при окислении субстратов I и II комплекса (V3 по Чансу), дыхание митохондрий после исчерпания АДФ (V4 по Чансу). Рассчитывали коэффициент дыхательного контроля (ДК) как соотношение скорости V3 к V4. **Концентрацию белка определяли** методом Лоури. **Уровень малонового диальдегида** определяли по методике Стальной И.Д. [Стальная И.Д. и др., 1977], основанной на образовании окрашенных комплексов малонового диальдегида (МДА) с тиобарбитуровой кислотой. **Определение активности каталазы** проводили по методу Королюка М.А., основанному на образовании окрашенного комплекса пероксида водорода и соли аммония [Королюк М.А. и др., 1988]. **Суммарную активность супероксиддисмутазы** определяли по степени торможения реакции окисления кверцетина [Костюк В.А. и др., 1990]. Изучение активности глутатионпероксидазы проводили по методу Моина В.М. (1986), основанному на изменении концентрации восстановленного глутатиона в реакции с 5,5'-дитио-бис- (2-нитробензойной кислотой) (ДТНБК). **Определение**

**активности сукцинатдегидрогеназы** проводили по методу, основанному на реакции восстановления желтого  $K_3 [Fe (CN)_6]$  в бесцветный  $K_4 [Fe (CN)_6]$  сукцинатом под действием сукцинатдегидрогеназы. Статистическую обработку данных исследования проводили с помощью пакета прикладных программ STATISTICA v.12.5 («StatSoft Inc.», США). Нормальность распределения проверяли по критерию Шаперо-Уилка, для парных сравнений использовали U-критерий Манна-Уитни и t-критерий Стьюдента, а для множественных – критерии Ньюмена-Кейлса, Крускала-Уоллиса с пост-тестом Данна. Результаты представлены в виде  $M \pm \sigma$ ;  $Me (Q_1; Q_3)$ , где  $M$  – среднее арифметическое,  $\sigma$  – стандартное отклонение от среднего,  $Q_1$  – нижний квартиль,  $Q_3$  – верхний квартиль.

**В третьей главе** представлены результаты исследования *in vitro* и *ex vivo* влияния производных ГАМК и ГК на функциональную активность митохондрий интактных животных и подвергавшихся острому иммобилизационно-болевого стрессу, острой и хронической алкогольной интоксикации.

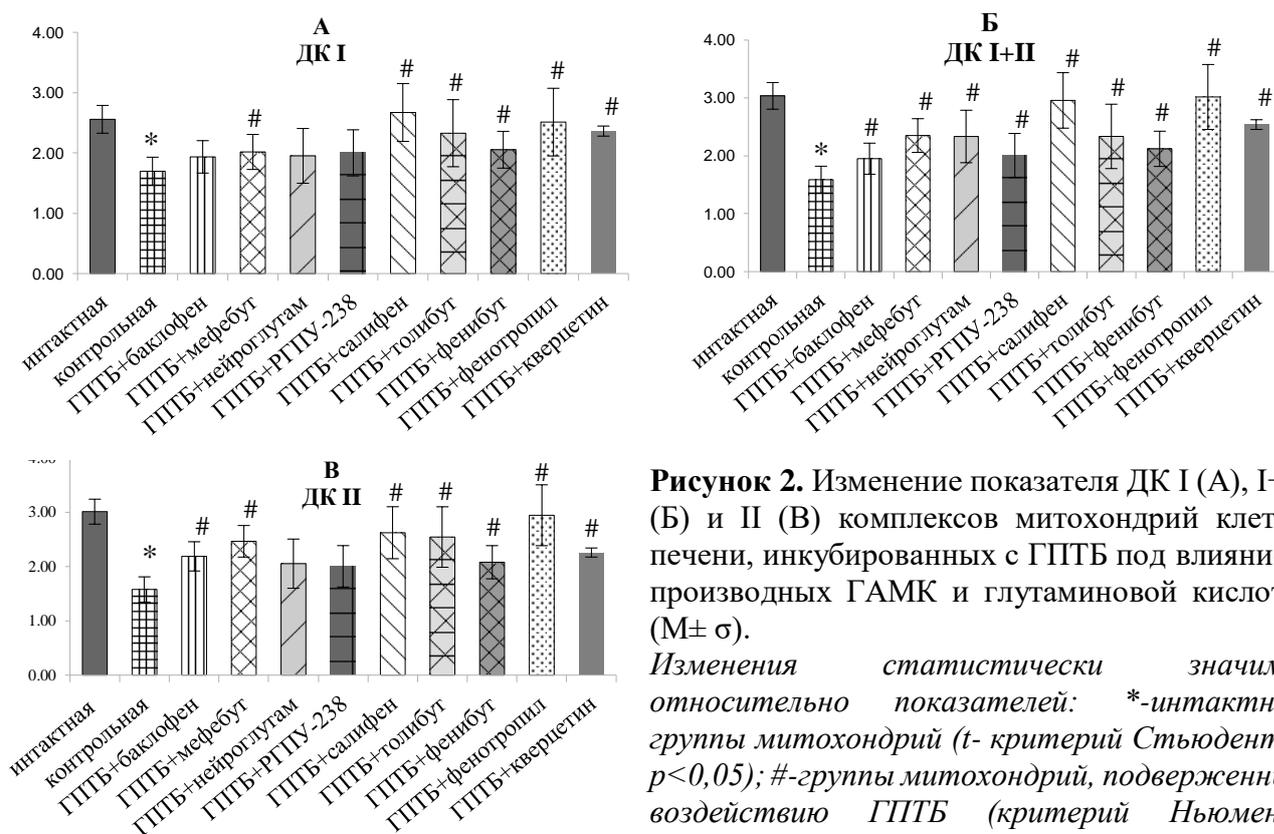
Воздействие сильного окислителя – ГПТБ на митохондрии печени приводило к снижению скорости стимулированного дыхания в I и II комплексах дыхательной цепи. Исследуемые производные ГАМК и ГК в концентрации  $1 \times 10^{-5}$  М способствовали повышению скорости стимулированного дыхания. Наиболее высокие значения показателя V3 были зафиксированы в митохондриях, инкубированных с салифеном и фенотропилом (Рис.1).



Скорость поглощения  $O_2$  в митохондриях, поврежденных ГПТБ, после истощения АДФ при окислении субстрата I и II комплекса вырастала по сравнению с показателями митохондрий интактной группы, что может свидетельствовать об утечке электронов в ЦПЭ. В поврежденных митохондриях, инкубированных с исследуемыми соединениями, скорость дыхания после истощения АДФ была ниже, чем у контрольной группы.

Для оценки функционального состояния митохондрий и сопряжения процессов окисления и фосфорилирования был рассчитан коэффициент ДК, как соотношение скорости стимулированного дыхания к скорости дыхания после истощения АДФ. Добавление ГПТБ к изолированным митохондриям печени вызывало снижение показателя ДК в I и II комплексах дыхательной цепи и составляло меньше 2 единиц, что свидетельствует о разобщении процессов окисления и фосфорилирования. Воздействие исследуемых веществ на изолированные митохондрии способствовало статистически значимому повышению показателя ДК (Рис.2).

Наиболее высокие значения коэффициента ДК были достигнуты в митохондриях, инкубированных с салифеном и фенотропилом, они повышали исследуемый показатель в среднем на 69% и 75%.



**Рисунок 2.** Изменение показателя ДК I (А), I+II (Б) и II (В) комплексов митохондрий клеток печени, инкубированных с ГПТБ под влиянием производных ГАМК и глутаминовой кислоты ( $M \pm \sigma$ ).

Изменения статистически значимы относительно показателей: \* - интактной группы митохондрий (*t*- критерий Стьюдента,  $p < 0,05$ ); # - группы митохондрий, подверженных воздействию ГПТБ (критерий Ньюмена-Кейлса,  $p < 0,05$ ).

На основании полученных результатов, для дальнейшего углубленного изучения были выбраны 2 производных ГАМК - салифен и фенотропил, так как в проведенном исследовании они оказывали наиболее выраженное защитное действие на поврежденные митохондрии печени.

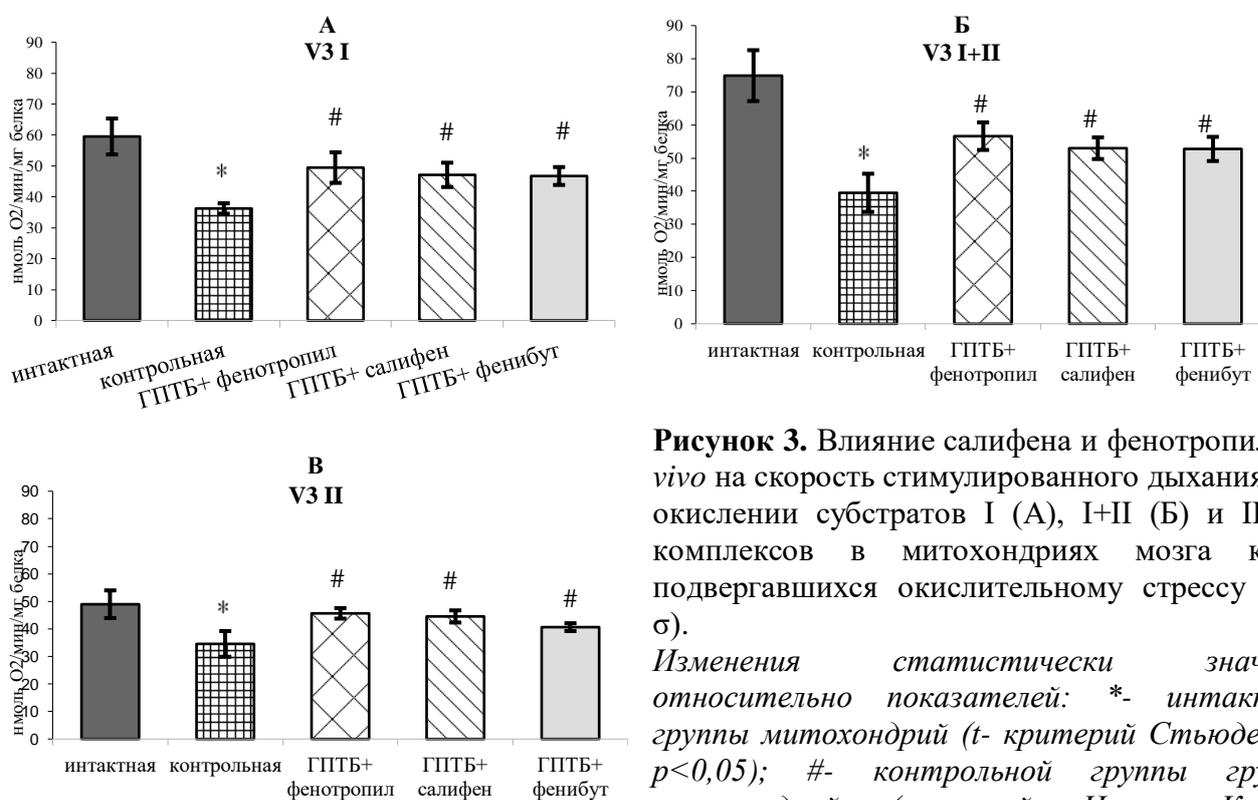
Изучение дозозависимости проводилось в диапазоне концентраций  $1 \times 10^{-7} M - 1 \times 10^{-5} M$ . Салифен и фенотропил, добавленные к поврежденным ГПТБ митохондриям, оказывали дозозависимый эффект – повышение концентрации исследуемых веществ приводило к увеличению показателя V3 и коэффициента ДК, при этом скорость потребления кислорода после истощения АДФ в исследуемых группах митохондрий отличалась незначительно (Таб.1).

**Таблица 1.** Влияние различных концентраций салифена и фенотропила на функциональную активность поврежденных митохондрий печени ( $M \pm \sigma$ )

Группы \ Исследуемый показатель	V3(I) нМ O <sub>2</sub> /мин/мг белка	V3(I+II) нМ O <sub>2</sub> /мин/мг белка	V3(II) нМ O <sub>2</sub> /мин/мг белка	ДК(I)	ДК(+II)	ДК(II)
ГПТБ (200 нмоль)	37,3±1,7	42,4±2,3	36,4±7,2	1,8±0,2	1,76±0,2	1,8±0,3
ГПТБ+салифен $1 \times 10^{-5}$	42,9±7,1	53,3±2,7* ^#	41,9±2,8	2,3±0,1*	2,2±0,1*^	2,1±0,1
ГПТБ+салифен $1 \times 10^{-6}$	39,4±2,6	39,9±3,6	38,6±5,2	2,3±0,1*	2,0±0,3	2,1±0,2
ГПТБ+салифен $1 \times 10^{-7}$	40,1±1,9	37,0±8,3	32,3±3,8	2,2±0,1*#	2,1±0,2*#	2,1±0,1*
ГПТБ+фенотропил $1 \times 10^{-5}$	43,7±3,3*	50,3±6,4	37,6±7,2	2,3±0,1*	2,1±0,1*	2,2±0,1
ГПТБ+фенотропил $1 \times 10^{-6}$	45,2±2,2*	47,6±6,6	40,1±7,6	2,2±0,2*	2,3±0,1*	2,1±0,1
ГПТБ+фенотропил $1 \times 10^{-7}$	42,7±2,1*	56,2±1,2	39,1±3,6	2,0±0,1*^	2,2±0,1*^	2,2±0,1^

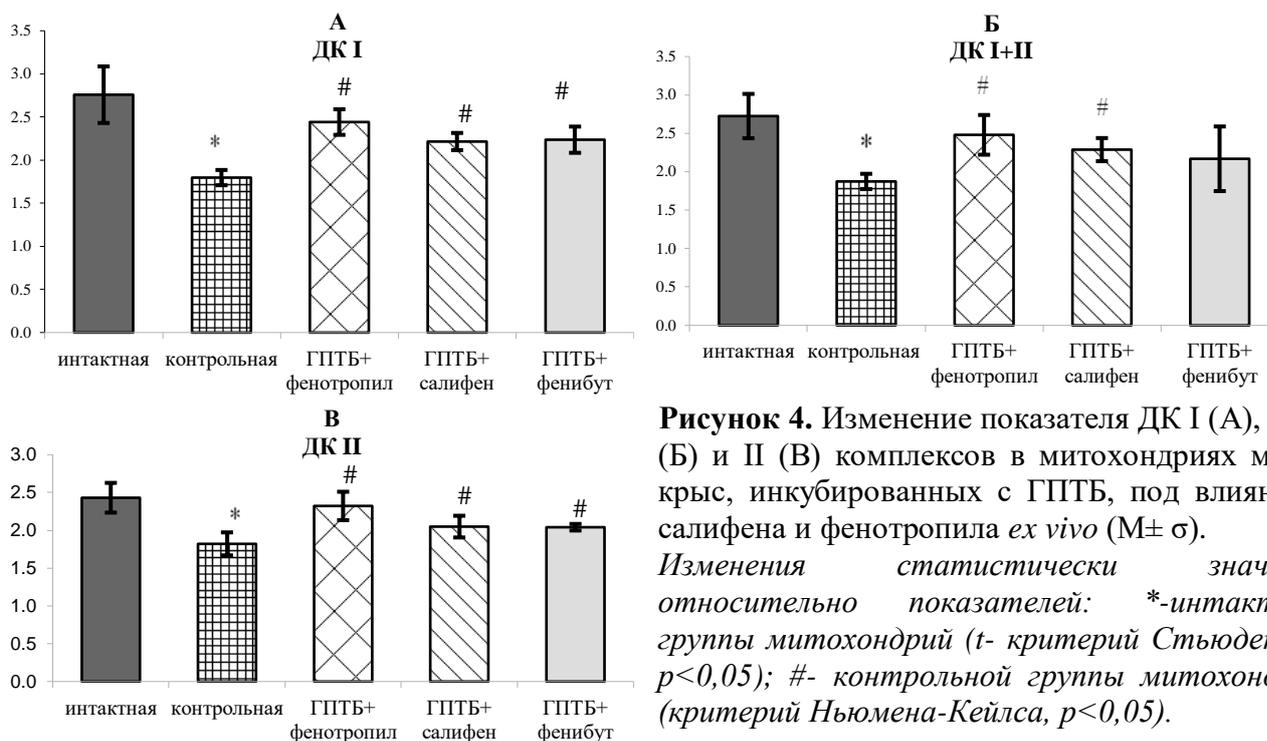
Примечание: \* - изменения статистически значимы по сравнению с интактной группой; ^ - по сравнению с препаратом в концентрации  $1 \times 10^{-6}$ ; # - по сравнению с препаратом в концентрации  $1 \times 10^{-7}$  по U-критерию Манна-Уитни,  $p < 0,05$

Для оценки влияния производных ГАМК на активность митохондрий при стрессе, животным за 24 часа до декапитации внутрибрюшинно вводили фенотропил, салифен и фенибут. Окислительное повреждение моделировали путем добавления к суспензии митохондрий *in vitro* сильного окислителя – ГПТБ в дозе 200 нмоль. Он снижал скорость стимулированного дыхания в изолированных митохондриях мозга крыс при окислении субстратов I и II комплекса. Исследуемые вещества – салифен, фенотропил и фенибут – повышали скорость стимулированного дыхания в изолированных митохондриях головного мозга, поврежденных ГПТБ в среднем на 31%, 47% и 27% (Рис.3).



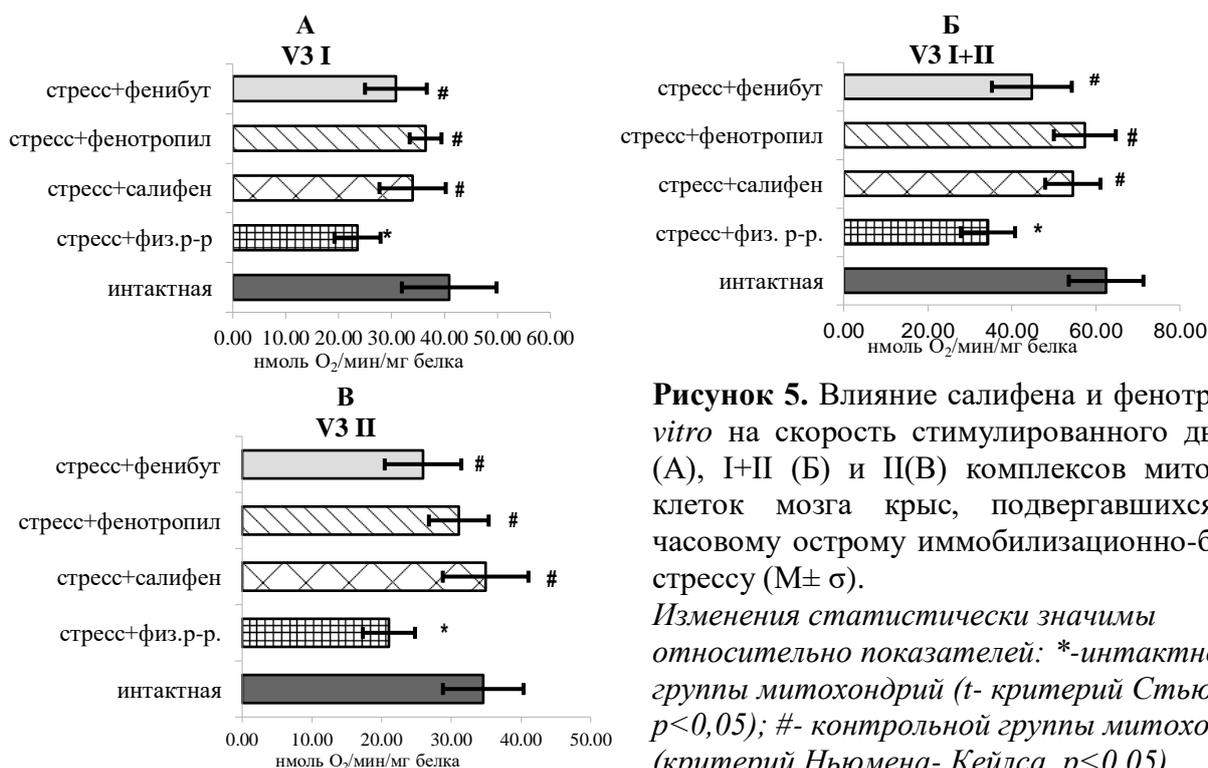
**Рисунок 3.** Влияние салифена и фенотропила *ex vivo* на скорость стимулированного дыхания при окислении субстратов I (А), I+II (Б) и II (В) комплексов в митохондриях мозга крыс, подвергавшихся окислительному стрессу ( $M \pm \sigma$ ). Изменения статистически значимы относительно показателей: \* - интактной группы митохондрий (*t*- критерий Стьюдента,  $p < 0,05$ ); # - контрольной группы митохондрий (критерий Ньюмена-Кейлса,  $p < 0,05$ ).

Потребление кислорода после истощения экзогенного АДФ митохондриями мозга крыс при окислении субстратов I, I+II и II комплексов практически не отличалось в исследуемых группах. Коэффициент ДК I (А), I+II (Б) и II (В) комплексов дыхательной цепи митохондрий контрольной группы был меньше 2 единиц, что указывает на повреждение митохондрий и разобщение процессов окисления и фосфорилирования. Введение животным за сутки до декапитации фенотропила и салифена способствовало статистически значимому повышению показателя дыхательного контроля в I, I+II и II комплексах дыхательной цепи митохондрий (Рис.4).



**Рисунок 4.** Изменение показателя ДК I (А), I+ II (Б) и II (В) комплексов в митохондриях мозга крыс, инкубированных с ГПТБ, под влиянием салифена и фенотропила *ex vivo* ( $M \pm \sigma$ ). Изменения статистически значимы относительно показателей: \*-интактной группы митохондрий (*t*- критерий Стьюдента,  $p < 0,05$ ); #- контрольной группы митохондрий (критерий Ньюмена-Кейлса,  $p < 0,05$ ).

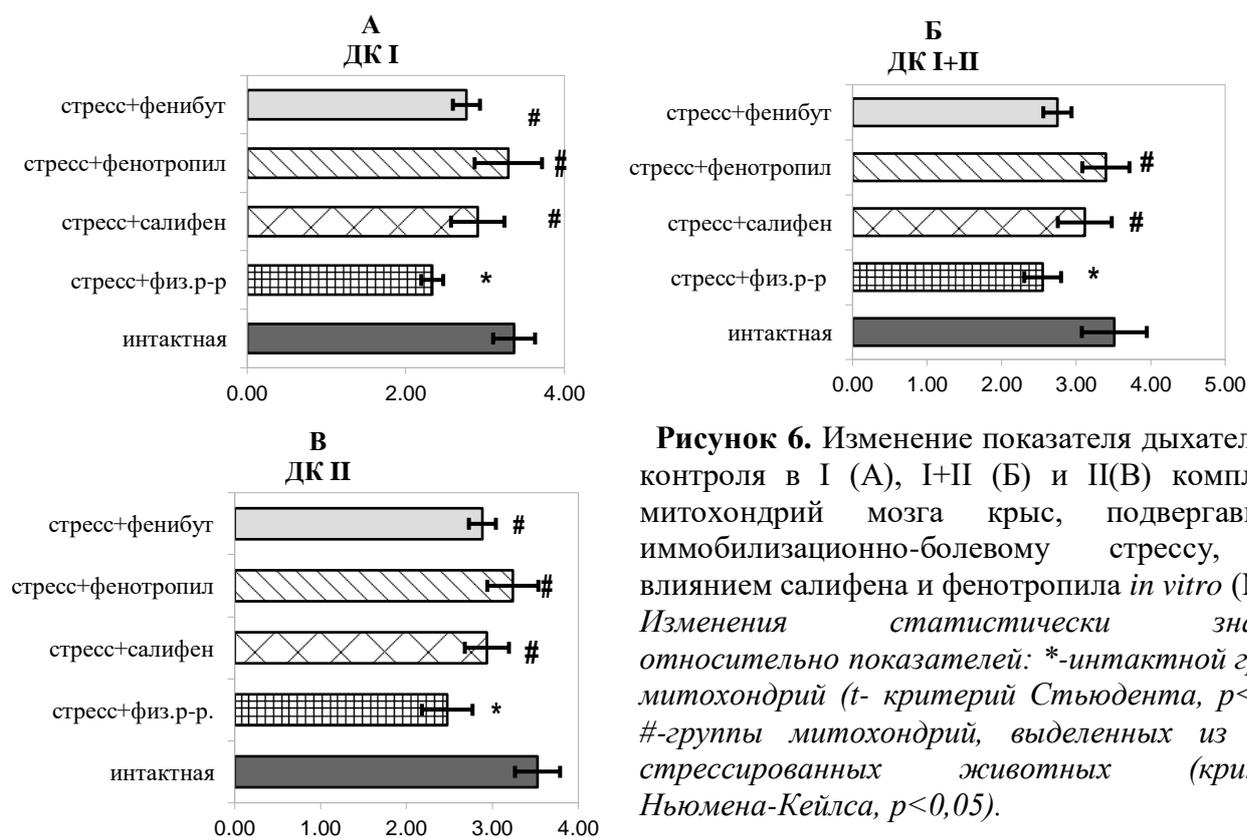
Влияние стресса на функциональную активность митохондрий клеток головного мозга и сердца крыс было изучено путем моделирования 24 – часового острого иммобилизационно-болевого стресса. Проведенные исследования показали, что острый стресс снижает скорость стимулированного дыхания в митохондриях клеток головного мозга крыс при окислении субстратов I, I+II и II комплексов в среднем на 38%, по отношению к показателям интактной группы. При этом, кратковременное воздействие *in vitro* салифена, фенотропила и фенибута в концентрации  $1 \times 10^{-5}$  М на митохондрии, выделенные из мозга стрессированных животных, вызывало повышение показателя V3 I, I+ II и II комплекса цепи переноса электронов по сравнению с показателями митохондрий контрольной группы (Рис.5).



**Рисунок 5.** Влияние салифена и фенотропила *in vitro* на скорость стимулированного дыхания I (А), I+II (Б) и II(В) комплексов митохондрий клеток мозга крыс, подвергавшихся 24 – часовому острому иммобилизационно-болевому стрессу ( $M \pm \sigma$ ). Изменения статистически значимы относительно показателей: \*-интактной группы митохондрий (*t*- критерий Стьюдента,  $p < 0,05$ ); #- контрольной группы митохондрий (критерий Ньюмена- Кейлса,  $p < 0,05$ ).

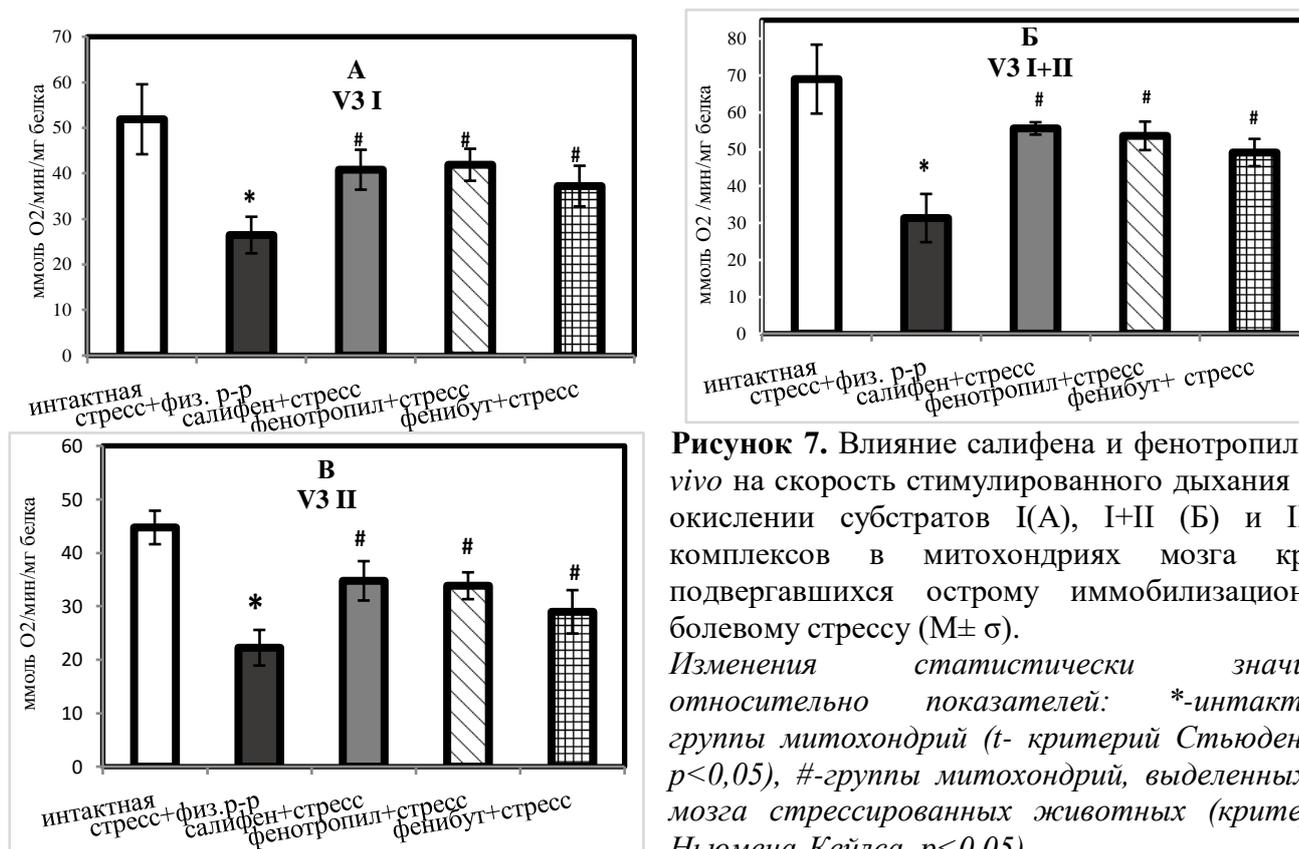
Существенных отличий в скорости потребления кислорода после исчерпания АДФ при окислении субстратов I комплекса в исследуемых группах митохондрий головного мозга крыс не было выявлено. Показатель V4 в I+II и II комплексах дыхательной цепи митохондрий мозга стрессированных животных был значимо ниже, чем у интактных животных. Салифен, фенотропил и фенибут повышали показатель V4 митохондрий мозга стрессированных животных.

Показатель дыхательного контроля, отражающий сопряженность процессов окисления и фосфорилирования при окислении НАД – и ФАД –зависимых субстратов, в контрольной группе митохондрий был на 27% ниже по сравнению с показателем интактных митохондрий. При этом, салифен, фенотропил и фенибут, способствовали повышению коэффициента ДК I, I+II и II комплексов митохондрий, выделенных из клеток головного мозга стрессированных животных (Рис.6).



**Рисунок 6.** Изменение показателя дыхательного контроля в I (А), I+II (Б) и II(В) комплексах митохондрий мозга крыс, подвергавшихся иммобилизационно-болевого стрессу, под влиянием салифена и фенотропила *in vitro* ( $M \pm \sigma$ ). Изменения статистически значимы относительно показателей: \*-интактной группы митохондрий (*t*- критерий Стьюдента,  $p < 0,05$ ), #-группы митохондрий, выделенных из мозга стрессированных животных (критерий Ньюмена-Кейлса,  $p < 0,05$ ).

Воздействие 24-х часового иммобилизационно-болевого стресса приводило к снижению скорости стимулированного дыхания в митохондриях головного мозга крыс при окислении субстратов I, I+II и II комплексов по сравнению с таковым показателем митохондрий интактной группы. Исследуемые вещества – фенотропил (25 мг/кг), салифен (15 мг/кг) и фенибут (25 мг/кг), введенные животным за час до моделирования стресса, способствовали повышению показателя V3 при окислении НАД– и ФАД–зависимых субстратов (Рис.7).



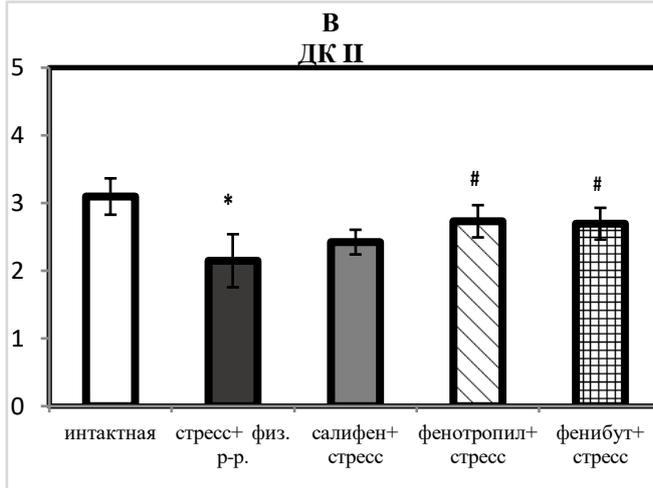
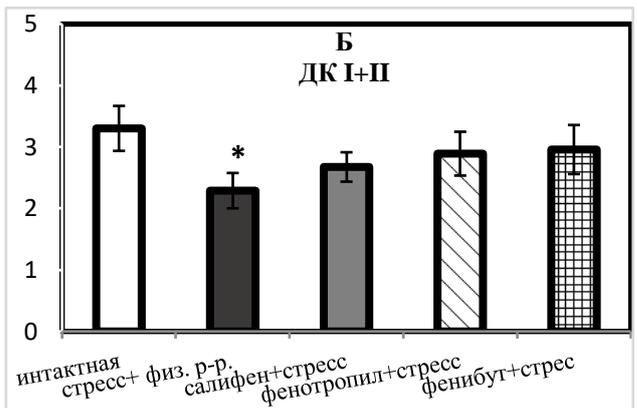
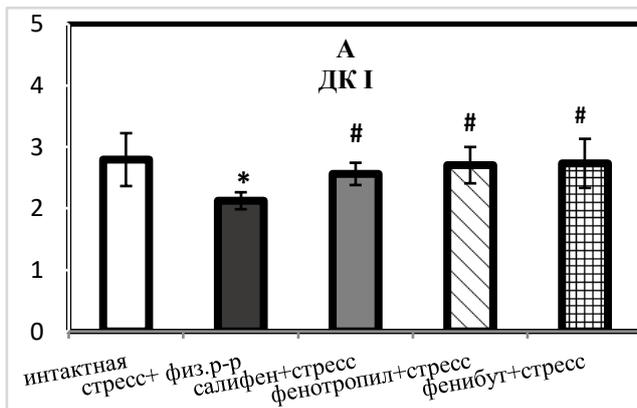
**Рисунок 7.** Влияние салифена и фенотропила *ex vivo* на скорость стимулированного дыхания при окислении субстратов I(A), I+II (Б) и II(В) комплексов в митохондриях мозга крыс, подвергавшихся острому иммобилизационно-болевому стрессу ( $M \pm \sigma$ ).  
Изменения статистически значимы относительно показателей: \* -интактной группы митохондрий (*t*- критерий Стьюдента,  $p < 0,05$ ), # - группы митохондрий, выделенных из мозга стрессированных животных (критерий Ньюмена-Кейлса,  $p < 0,05$ ).

Острый иммобилизационно-болевого стресс приводил к снижению скорости V4 I, I+II и II комплексов по сравнению с таковым показателем митохондрий головного мозга интактных животных (Таб.2). Фенотропил способствовал повышению показателя V4 I, I+II и II комплексов. **Таблица 2.** Влияние фенотропила, салифена и фенибута *ex vivo* на скорость потребления кислорода после истощения АДФ в митохондриях мозг крыс ( $M \pm \sigma$ ).

Группы	Исследуемый показатель	V4 I нМ O <sub>2</sub> /мин/мг белка	V4 I+II нМ O <sub>2</sub> /мин/мг белка	V4 II нМ O <sub>2</sub> /мин/мг белка
Интактная		18,93±3,78	23,54±3,98	15,42±3,08
Стресс+физ. р-р.		12,63±2,18*	15,91±4,44*	10,61±2,24*
Стресс+фенотропил (25мг/кг)		15,83±2,16#	18,66±2,61	13,19±2,56#
Стресс +салифен (15мг/кг)		15,95±1,69#	20,97±,32#	14,29±1,23
Стресс+фенибут (25мг/кг)		13,55±2,07	16,78±1,89	12,22±3,63

Изменения статистически значимы относительно показателей: \* -интактной группы митохондрий (по *U*-критерию Манна-Уитни,  $p < 0,05$ ); # - группы митохондрий, выделенных из сердца стрессированных животных (по критерию Крускала-Уоллиса, с пост-тестом Данна,  $p < 0,05$ ).

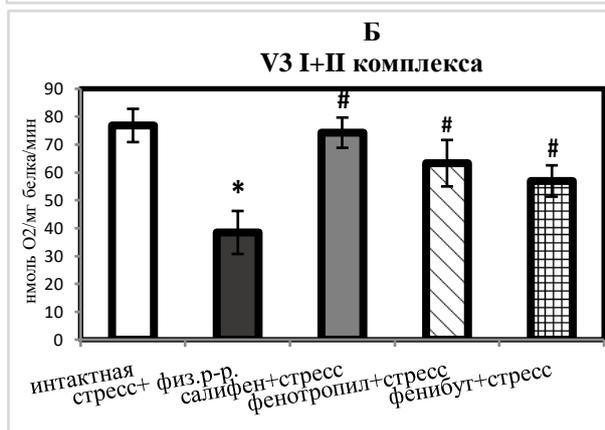
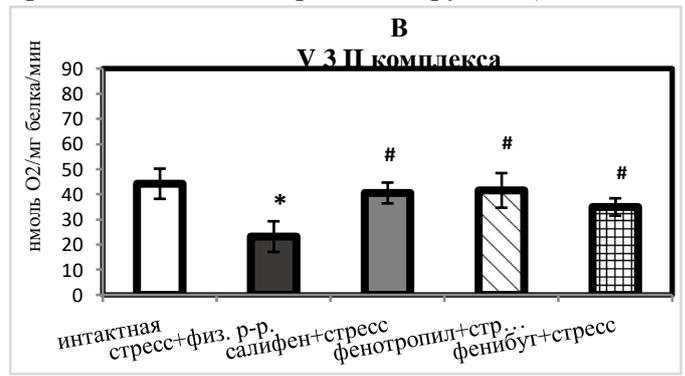
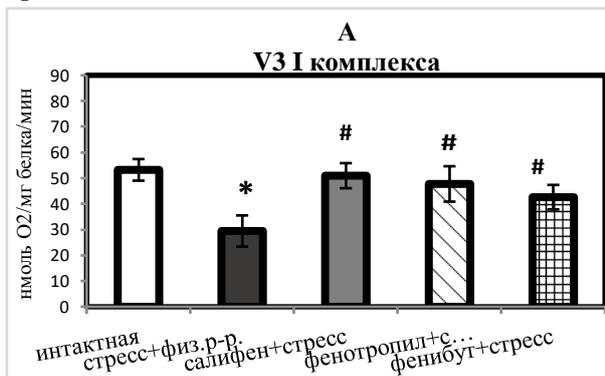
Воздействие острого иммобилизационно-болевого стресса вызывало снижение коэффициента ДК в митохондриях головного мозга крыс контрольной группы при окислении НАД – и ФАД–зависимых субстратов (Рис. 8). В митохондриях, выделенных из мозга животных, которым до стрессирования вводили фенотропил (25 мг/кг), салифен (15 мг/кг) и фенибут (25 мг/кг), показатель ДК I, I+II и II комплексов был значимо выше по сравнению с показателями группы стрессированных крыс.



**Рисунок 8.** Изменение показателя дыхательного контроля при окислении субстратов I (А), I+II (Б) и II(В) комплексов в митохондриях мозга крыс, подвергавшихся острому иммобилизационно-болевному стрессу, под влиянием салифена и фенотропила *ex vivo* ( $M \pm \sigma$ ).

Изменения статистически значимы относительно показателей: \*-интактной группы митохондрий (*t*-критерий Стьюдента,  $p < 0,05$ ), #-группы митохондрий, выделенных из мозга стрессированных животных (критерий Ньюмена-Кейлса,  $p < 0,05$ ).

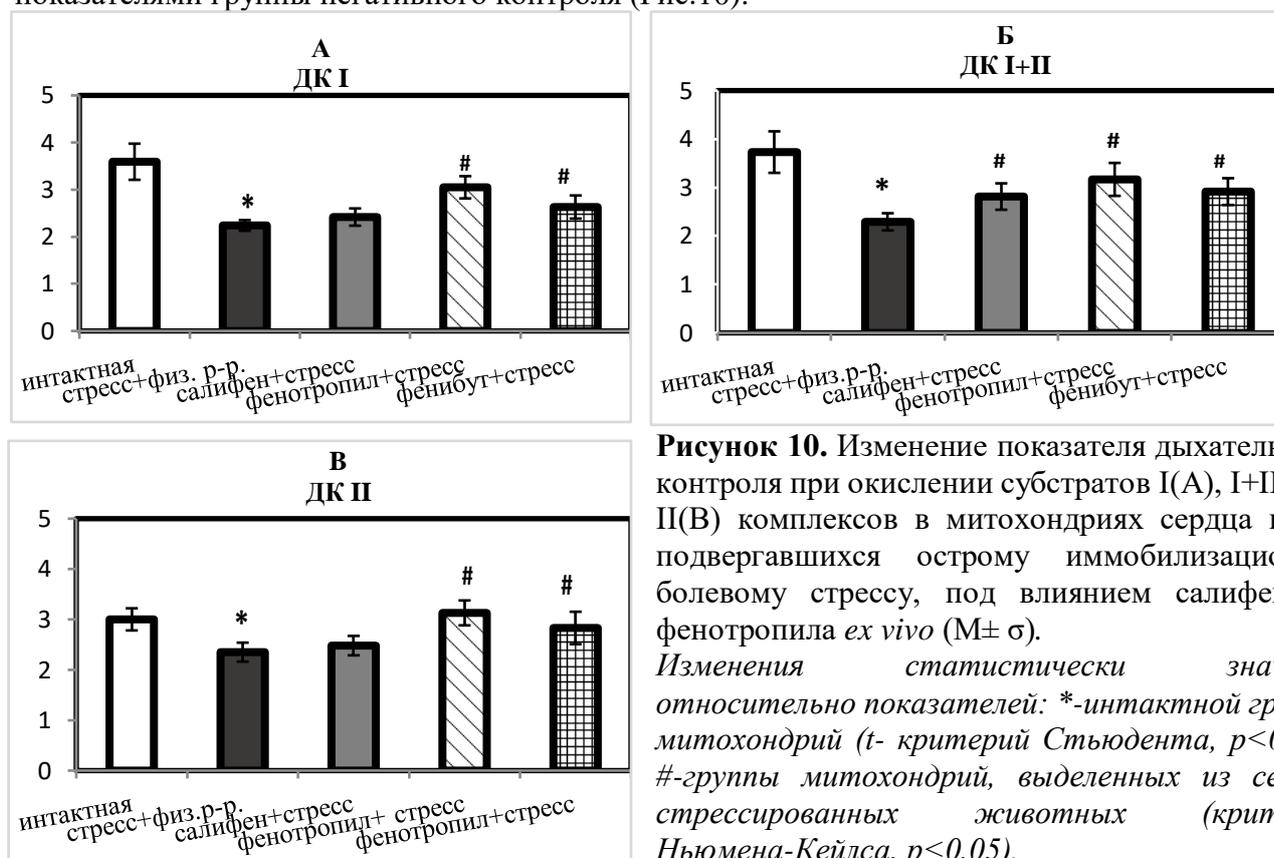
Острый иммобилизационно – болевой стресс приводил к статистически значимому снижению скорости стимулированного дыхания в митохондриях сердца при окислении субстратов I, I+II и II комплексов. Фенотропил, салифен и фенибут, введённые животным за 1 час до стрессирования, способствовали значимому повышению исследуемого показателя по сравнению с таковыми показателями митохондрий животных контрольной группы (Рис. 9).



**Рисунок 9.** Изменение показателя дыхательного контроля при окислении субстратов I(А), I+II(Б) и II(В) комплексов в митохондриях сердца крыс, подвергавшихся острому иммобилизационно-болевному стрессу, под влиянием салифена и фенотропила *ex vivo* ( $M \pm \sigma$ ).

Изменения статистически значимы относительно показателей: \*-интактной группы митохондрий (*t*-критерий Стьюдента,  $p < 0,05$ ), #-группы митохондрий, выделенных из сердца стрессированных животных (критерий Ньюмена-Кейлса,  $p < 0,05$ ).

Острый иммобилизационно-болевой стресс приводил к снижению коэффициента ДК в митохондриях сердца животных. У крыс, получавших до моделирования острого стресса салифен, фенотропил и фенибут, коэффициент ДК значительно повышался по сравнению с таковыми показателями группы негативного контроля (Рис.10).



**Рисунок 10.** Изменение показателя дыхательного контроля при окислении субстратов I(А), I+II(Б) и II(В) комплексов в митохондриях сердца крыс, подвергавшихся острому иммобилизационно-болевному стрессу, под влиянием салифена и фенотропила *ex vivo* ( $M \pm \sigma$ ).

Изменения статистически значимы относительно показателей: \*-интактной группы митохондрий (*t*- критерий Стьюдента,  $p < 0,05$ ); #-группы митохондрий, выделенных из сердца стрессированных животных (критерий Ньюмена-Кейлса,  $p < 0,05$ ).

Далее рассматривали влияние острой алкогольной интоксикации на показатели функциональной активности митохондрий клеток головного мозга и сердца крыс. Острая алкогольная интоксикация приводила к снижению скорости потребления  $O_2$  в состоянии V3 в митохондриях головного мозга животных, относительно показателей контрольной группы. Салифен (15 мг/кг), фенотропил (25 мг/кг) и милдронат (50мг/кг), введённые животным спустя 10 часов после алкоголизации, способствовали значимому повышению скорости V3 в I, I+II и II комплексах. Статистически значимых отличий в скорости потребления кислорода после исчерпания АДФ при окислении НАД — и ФАД — зависимых субстратов в исследуемых группах митохондрий не было выявлено. Острая алкогольная интоксикация животных приводила к снижению показателя ДК I, I+II и II комплексов в митохондриях мозга крыс по сравнению интактной группой. При этом, салифен, фенотропил и милдронат способствовали значимому повышению показателя ДК I, I+II и II комплексов относительно показателей контрольной группы (Таб.3).

**Таблица 3.** Влияние салифена и фенотропила на функциональную активность митохондрий головного мозга крыс, подвергавшихся острой алкогольной интоксикации ( $M \pm \sigma$ ).

Исследуемые показатели группы	V3(I) нМ O <sub>2</sub> /мин/мг белка	V3(I+II) нМ O <sub>2</sub> /мин/мг белка	V3(II) нМ O <sub>2</sub> /мин/мг белка	ДК(I)	ДК(I+II)	ДК(II)
Интактная	44,81±2,8	58,54±4,67	50,25±3,32	2,54±0,16	2,57±0,16	2,63±0,17
ОАИ+физ. р-р	33,56±3,14 <sup>#</sup> (-25%)	42,63±3,06 <sup>#</sup> (-27%)	33,04±2,5 <sup>#</sup> (-34%)	2,05±0,15 <sup>#</sup> (-19%)	2,12±0,11 <sup>#</sup> (-18%)	2,11±0,07 <sup>#</sup> (-20%)
ОАИ+салифен	40,11±2,81 <sup>*</sup> (+20%)	50,78±1,72 <sup>*</sup> (+19%)	39,17±4,67 (+19%)	2,47±0,15 <sup>*</sup> (+21%)	2,34±0,08 <sup>*</sup> (+10%)	2,41±0,12 <sup>*</sup> (+14%)
ОАИ+фенотропил	39,89±4,75 (+19%)	51,32±1,66 <sup>*</sup> (+20%)	42,00±5,19 <sup>*</sup> (+27%)	2,49±0,15 <sup>*</sup> (+22%)	2,44±0,11 <sup>*</sup> (+15%)	2,50±0,15 <sup>*</sup> (+19%)
ОАИ+милдронат	40,71±4,09 (+21%)	52,71±3,85 <sup>*</sup> (+24%)	41,56±5,25 <sup>*</sup> (+26%)	2,44±0,09 <sup>*</sup> (+19%)	2,48±0,14 <sup>*</sup> (+17%)	2,36±0,21 (+12%)

Изменения статистически значимы относительно показателей: <sup>#</sup>-интактной группы митохондрий (по U-критерию Манна-Уитни,  $p < 0,05$ ), <sup>\*</sup>-группы митохондрий, выделенных из сердца животных, подвергавшихся острой алкогольной интоксикации (по критерию Крускала Уоллиса с пост-тестом Данна,  $p < 0,05$ ).

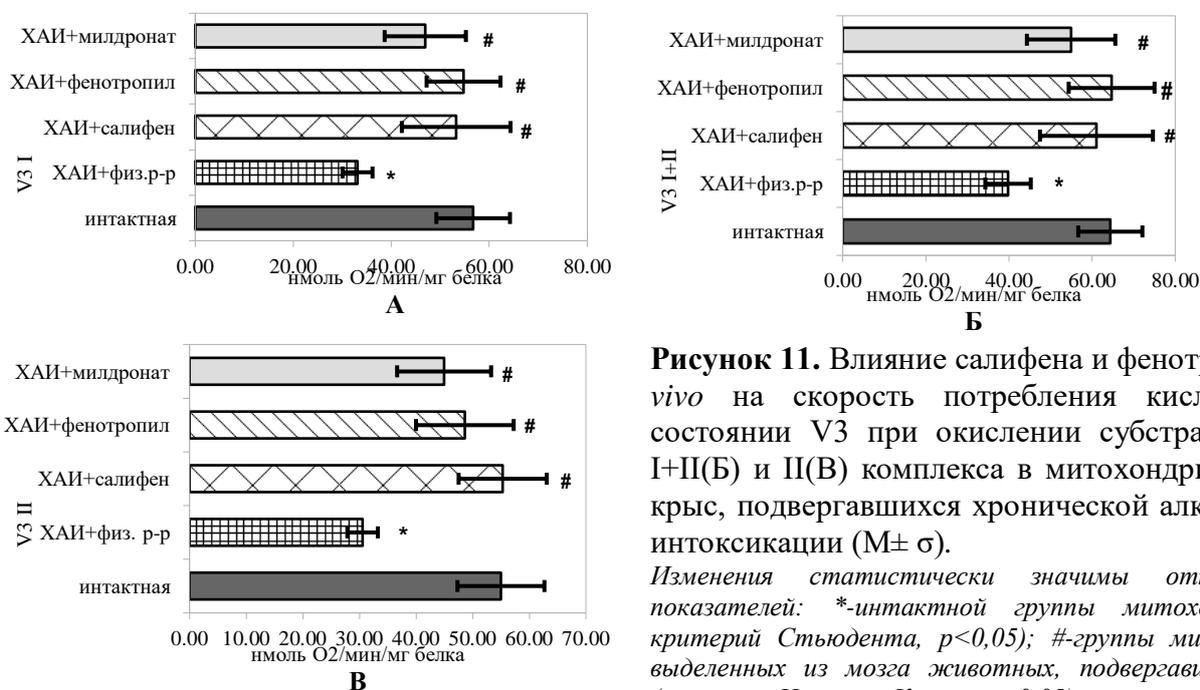
В проведенных исследованиях было установлено, что острая алкогольная интоксикация приводит к снижению сократительной способности миокарда при увеличении преднагрузки [Кустова М. В., Перфилова В. Н., 2021]. В митохондриях сердца наблюдалось уменьшение скорости V3 в I, I+II и II комплексах дыхательной цепи (Таб. 5). Салифен (15 мг/кг), фенотропил (25 мг/кг) и милдронат (50 мг/кг), введенные животным за 10 минут до моделирования ОАИ, способствовали повышению скорости V3 при окислении НАД – и ФАД– зависимых субстратов. Показатель дыхательного контроля при окислении субстратов I, I+II и II комплексов в митохондриях животных, подвергавшихся однократной острой алкогольной интоксикации, был ниже, по сравнению с интактной группой митохондрий. Салифен, фенотропил и фенибут способствовали повышению данного показателя по сравнению с контрольной группой (Таб.4).

**Таблица 4.** Влияние салифена и фенотропила на функциональную активность митохондрий сердца крыс, подвергавшихся острой алкогольной интоксикации ( $M \pm \sigma$ ).

Исследуемые показатели группы	V3(I) нМ O <sub>2</sub> /мин/мг белка	V3(I+II) нМ O <sub>2</sub> /мин/мг белка	V3(II) нМ O <sub>2</sub> /мин/мг белка	ДК(I)	ДК(I+II)	ДК(II)
Интактная+физ. р-р	47,4±4,9	57,3±3,3	44,2±1,8	2,5±0,1	2,6±0,1	2,7±0,1
Контрольная+физ. р-р	36,1±3,4 <sup>#</sup> (-23%)	48,7±3,0 <sup>#</sup> (-15%)	36,8±3,8 <sup>#</sup> (-17%)	2,0±0,1 <sup>#</sup> (-21%)	2,1±0,1 <sup>#</sup> (-20%)	2,0±0,1 <sup>#</sup> (-26%)
ОАИ+салифен	42,6±2,2 <sup>*</sup> (+18%)	53,9±2,6 <sup>*</sup> (+11%)	44,3±2,9 <sup>*</sup> (+20%)	2,3±0,1 <sup>*</sup> (+17%)	2,4±0,1 <sup>*</sup> (+18%)	2,3±0,1 (+16%)
ОАИ+фенотропил	41,5±3,1 (+15%)	53,8±3,2 (+11%)	41,9±4,4 (+14%)	2,4±0,1 <sup>*</sup> (+23%)	2,6±0,1 <sup>*</sup> (+24%)	2,5±0,1 <sup>*</sup> (+22%)
ОАИ+милдронат	40,1±2,2 (+11%)	54,8±2,2 <sup>*</sup> (+13%)	43,1±2,1 <sup>*</sup> (+18%)	2,3±0,1 <sup>*</sup> (+17%)	2,4±0,17 (+18%)	2,4±0,1 <sup>*</sup> (+22%)

Изменения статистически значимы относительно показателей: <sup>#</sup>-интактной группы митохондрий (по U-критерию Манна-Уитни,  $p < 0,05$ ), <sup>\*</sup>-группы митохондрий, выделенных из сердца животных, подвергавшихся острой алкогольной интоксикации (по критерию Крускала–Уоллиса с пост-тестом Данна,  $p < 0,05$ ).

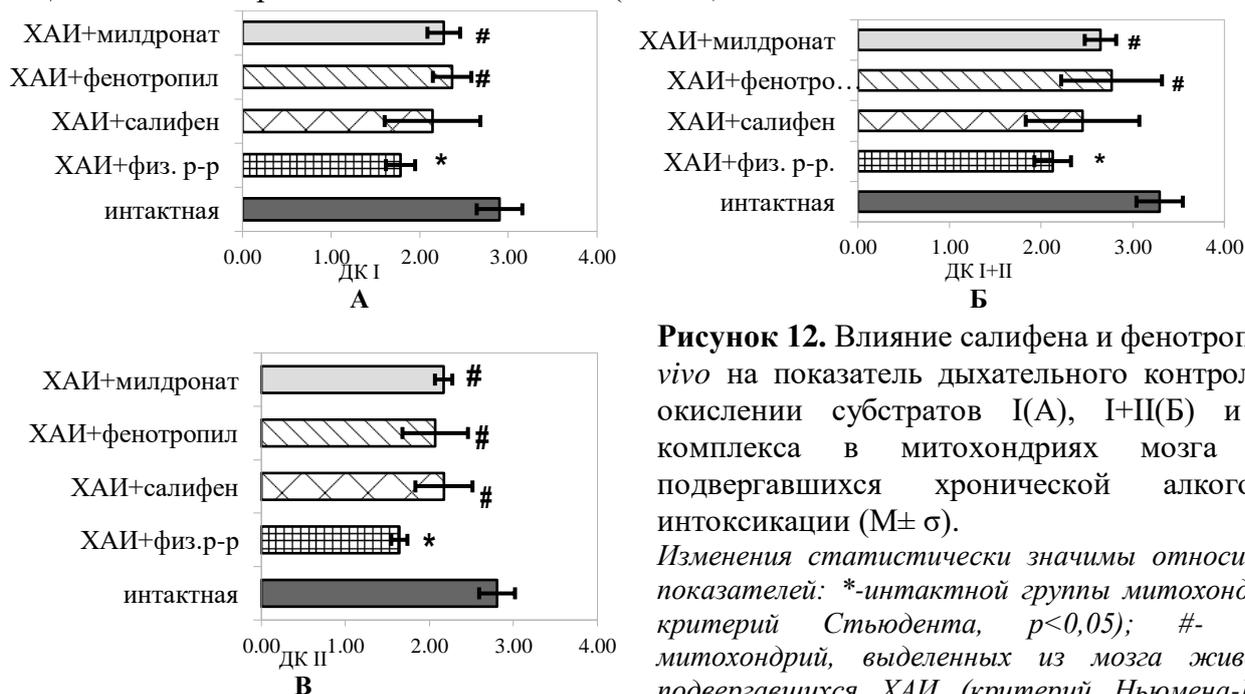
При изучении влияния хронической алкогольной интоксикации на показатели функциональной активности митохондрий клеток головного мозга крыс было установлено, что ХАИ приводит к снижению скорости стимулированного дыхания при окислении субстратов I, I+II и II комплексов. Введение животным в течение 2 недель после ХАИ салифена (15 мг/кг) и фенотропила (25 мг/кг) способствовало повышению показателя V3 I, I+II и II комплексов, по сравнению с показателями группы животных, подвергавшихся ХАИ (Рис.11).



**Рисунок 11.** Влияние салифена и фенотропила *ex vivo* на скорость потребления кислорода в состоянии V3 при окислении субстратов I(A), I+II(Б) и II(В) комплекса в митохондриях мозга крыс, подвергавшихся хронической алкогольной интоксикации ( $M \pm \sigma$ ).

Изменения статистически значимы относительно показателей: \*-интактной группы митохондрий (t-критерий Стьюдента,  $p < 0,05$ ); #-группы митохондрий, выделенных из мозга животных, подвергавшихся ХАИ (критерий Ньюмена-Кейлса,  $p < 0,05$ ).

Коэффициент ДК I, I+II и II комплексов митохондрий, выделенных из клеток головного мозга животных, подвергавшихся длительной алкогольной интоксикации был значимо ниже по сравнению с показателями интактной группы. Введение животных после ХАИ в течение 2 недель салифена, фенотропила и милдроната способствовало повышению показателей V3 и ДК в I, I+II и II комплексах митохондрий, что может свидетельствовать об ограничении утечки электронов в ЦПЭ и свободнорадикального окисления. (Рис.12).



**Рисунок 12.** Влияние салифена и фенотропила *ex vivo* на показатель дыхательного контроля при окислении субстратов I(A), I+II(Б) и II(В) комплекса в митохондриях мозга крыс, подвергавшихся хронической алкогольной интоксикации ( $M \pm \sigma$ ).

Изменения статистически значимы относительно показателей: \*-интактной группы митохондрий (t-критерий Стьюдента,  $p < 0,05$ ); #- группы митохондрий, выделенных из мозга животных, подвергавшихся ХАИ (критерий Ньюмена-Кейлса,  $p < 0,05$ ).

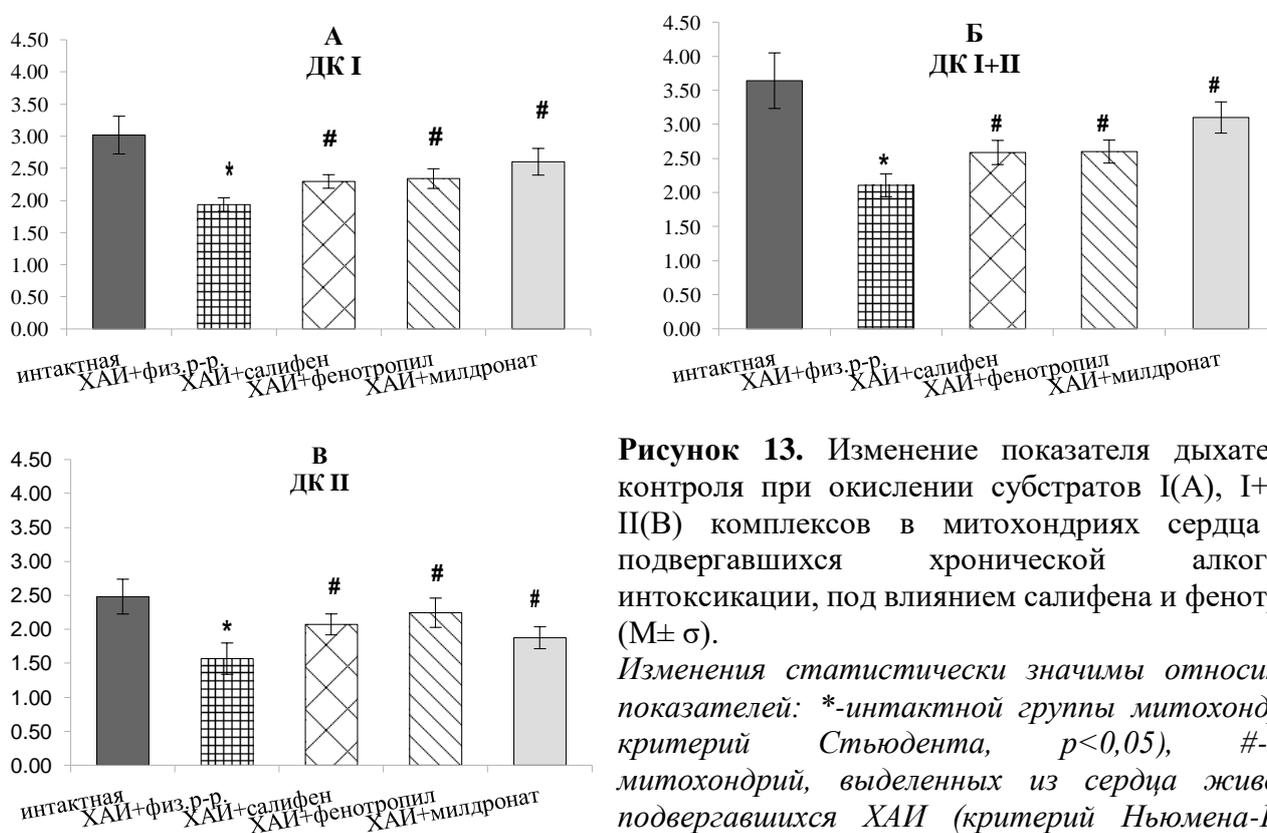
Скорость поглощения кислорода при окислении НАД – и ФАД – зависимых субстратов в митохондриях сердца крыс, получавших на протяжении 24 – недель 10% раствор этанола, была ниже, чем у интактных животных. Салифен (15 мг/кг), фенотропил (25 мг/кг) и милдронат 50 мг/кг), введённые животным в течение 2-х недель после ХАИ, способствовали повышению скорости стимулированного дыхания I, I+II и II комплексов по сравнению с показателями митохондрий контрольной группы (таб.5).

**Таблица 5.** Влияние салифена, фенибута и фенотропила *ex vivo* на показатели дыхания митохондрий сердца крыс после ХАИ (M±σ).

Группы	Исследуемые показатели	V3(I) нМ O <sub>2</sub> /мин/мг белка	V3(I+II) нМ O <sub>2</sub> /мин/мг белка	V3(II) нМ O <sub>2</sub> /мин/мг белка	V4 нМ O <sub>2</sub> /мин/мг белка
интактная		57,78±7,31	69,64±8,78	47,15±8,81	19,41±3,91
ХАИ+физ.р-р.		35,99±5,80*	40,67±6,90*	29,02±5,74*	18,62±2,56
ХАИ+салифен (15 мг/кг)		51,48±7,62 <sup>#</sup>	57,90±7,40 <sup>#</sup>	46,35±5,66 <sup>#</sup>	22,43±2,83
ХАИ+фенотропил (25 мг/кг)		50,32±7,15 <sup>#</sup>	55,81±7,50 <sup>#</sup>	48,27±7,09 <sup>#</sup>	21,48±2,01
ХАИ+милдронат (50мг/кг)		53,64±6,39 <sup>#</sup>	63,75±6,67 <sup>#</sup>	38,37±6,06 <sup>#</sup>	20,66±2,27

\*- изменения статистически значимы по сравнению с митохондриями интактной группы с использованием критерия Манна-Уитни,  $p < 0,05$ , <sup>#</sup>- изменения статистически значимы по сравнению с показателями митохондрий, выделенных из сердца животных, подвергавшихся ХАИ с использованием критерия Крускала–Уоллиса с пост-тестом Данна,  $p < 0,05$ .

24-х недельная алкогольная интоксикация животных приводила к разобщению процессов окисления и фосфорилирования, о чем свидетельствует снижение показателя дыхательного контроля I, I+II и II комплексов по сравнению с таковыми показателями митохондрий интактной группы. Салифен, фенотропил и милдронат повышали коэффициент дыхательного контроля в митохондриях сердца животных после ХАИ (Рис. 13).



**Рисунок 13.** Изменение показателя дыхательного контроля при окислении субстратов I(A), I+II(Б) и II(В) комплексов в митохондриях сердца крыс, подвергавшихся хронической алкогольной интоксикации, под влиянием салифена и фенотропила (M±σ).

Изменения статистически значимы относительно показателей: \*-интактной группы митохондрий (t-критерий Стьюдента,  $p < 0,05$ ), <sup>#</sup>-группы митохондрий, выделенных из сердца животных, подвергавшихся ХАИ (критерий Ньюмена-Кейлса,  $p < 0,05$ ).

Воздействие острого стресса и длительной алкогольной интоксикации приводило к увеличению содержания продуктов ПОЛ. Концентрация малонового диальдегида (МДА) в митохондриях мозга и сердца крыс, подвергавшихся длительной алкогольной интоксикации и стрессовому воздействию, была выше, чем у интактных животных. При этом, салифен (15 мг/кг), фенотропил (25 мг/кг) и препараты сравнения — фенибут (25 мг/кг) и милдронат (50 мг/кг), введённые животным до моделирования стресса и после длительной алкогольной интоксикации, способствовали снижению концентрации МДА в митохондриях мозга и сердца (Таб.6).

**Таблица 6.** Влияние фенотропила, салифена и фенибута на концентрацию продуктов ПОЛ в митохондриях клеток сердца и головного мозга стрессированных животных ( $M \pm \sigma$ ).

Исследуемый показатель Группы животных	МДА		Исследуемый показатель Группы животных	МДА	
	мозг	сердце		мозг	сердце
Интактная (n=8)	23,11±3,3	9,43±2,59	Интактная (n=8)	23,11±3,3	9,43±2,59
ХАИ+физ.р-р. (n=8)	34,55±5,27* (+50%)	16,27±3,74* (+73%)	Стресс+физ. р-р (n=8)	34,55±5,27* (+50%)	16,27±3,74* (+73%)
ХАИ+фенотропил (25мг/кг) (n=8)	24,62±3,98# (-29%)	11,8±2,8 (-28)	Стресс+фенотропил (25мг/кг) (n=8)	24,62±3,98# (-29%)	11,8±2,8 (-28)
ХАИ+салифен (15мг/кг) (n=8)	26,59±3,47# (-23%)	12,24±1,75 (-25%)	Стресс+салифен (15 мг/кг) (n=8)	26,59±3,47# (-23%)	12,24±1,75 (-25%)
ХАИ+милдронат (50мг/кг) (n=8)	26,37±3,49# (-24%)	13,88±1,41 (-15)	Стресс+фенибут (25 мг/кг) (n=8)	26,37±3,49# (-24%)	13,88±1,41 (-15)

*Изменения статистически значимы относительно показателей: \*- интактной группы животных (t- критерий Стьюдента,  $p < 0,05$ ) #- группы животных, подвергавшихся ХАИ и острому стрессу (критерий Ньюмена-Кейлса,  $p < 0,05$ ).*

Острый иммобилизационно-болевым стресс приводил к снижению антиоксидантной защиты клеток головного мозга и сердца. Введение животным до стрессирования исследуемых веществ – фенотропила (25 мг/кг), салифена (15 мг/кг) и фенибута (25 мг/кг) препятствовало снижению концентрации СОД, каталазы и глутатионпероксидазы в митохондриях клеток головного мозга и сердца крыс (Таб. 7). Другим ферментом, отражающим функциональное состояние митохондрий, выступает сукцинатдегидрогеназа (СДГ). Уровень активности СДГ является одним из критериев оценки выраженности гипоксии. Он показывает скорость потребления кислорода и образование АТФ в дыхательной цепи. В исследованиях, острый иммобилизационно – болевой стресс приводил к снижению активности СДГ в митохондриях клеток головного мозга и сердца. Фенотропил, салифен и фенибут, введенные животным до моделирования стресса, способствовали повышению активности СДГ в митохондриях клеток головного мозга и сердца животных.

**Таблица 7.** Влияние фенотропила, салифена и фенибута на активность антиоксидантных ферментов и СДГ в митохондриях клеток головного мозга и сердца стрессированных животных ( $M \pm \sigma$ ).

Исследуемые показатели	СОД, у.е./мг белка		Каталаза, мг $H_2O_2$ /мин/мг белка		ГП, мМ GSH/мин/мг белка		СДГ, нмоль сукцината/мин/мг белка	
	мозг	сердце	мозг	сердце	мозг	сердце	мозг	сердце
Интактная	61,1±6,6	107,3±9,1	11,7±3,0	13,6±3,9	44,9±6,3	46,8±3,9	28,3±3,2	37,5±4,0
Стресс+физ. р-р	38,8±3,0*	59,1±11,3*	6,6±0,9*	9,3±2,0	27,5±2,8*	26,6±6,6*	21,2±2,8*	27,4±4,6*
Стресс+фенотропил	50,7±6,5 <sup>#</sup>	85,6±10,1 <sup>#</sup>	8,5±0,5 <sup>#</sup>	11,3±2,2	34,7±6,3	34,3±5,5 <sup>#</sup>	23,6±3,4	30,5±6,7
Стресс+салифен	51,5±8,6 <sup>#</sup>	85,2±9,7 <sup>#</sup>	9,0±2,1 <sup>#</sup>	10,9±2,6	32,0±5,8	36,8±6,6 <sup>#</sup>	23,8±2,5	34,3±3,9
Стресс+фенибут	56,4±8,7 <sup>#</sup>	96,7±8,6 <sup>#</sup>	7,3±2,7	12,1±3,5	34,6±6,3	29,8±3,3	25,8±4,3	35,0±2,7 <sup>#</sup>

Изменения статистически значимы относительно показателей: \*- интактной группы животных (*t*- критерий Стьюдента,  $p < 0,05$ ), #- группы стрессированных крыс (критерий Ньюмена-Кейлса,  $p < 0,05$ ).

В митохондриях мозга и сердца животных после ХАИ так же наблюдалось снижение активности антиоксидантных ферментов (Таб.8). Фенотропил, салифен и милдронат, введенные животным в течение 2 — недель после хронической алкоголизации, способствовали повышению активности СОД, каталазы и глутатионпероксидазы. В результате проведенных исследований было обнаружено, что хроническая алкогольная интоксикация животных снижает активность СДГ в митохондриях головного мозга и сердца крыс. У животных, леченных фенотропилом, салифеном и милдронатом активность СДГ была значимо выше, чем у контрольной группы.

**Таблица 8.** Влияние фенотропила, салифена и фенибута на активность антиоксидантных ферментов и СДГ в митохондриях клеток головного мозга и сердца животных, подвергавшихся ХАИ ( $M \pm \sigma$ ).

Исследуемый показатель	СОД, у.е./мг белка		Каталаза, мг $H_2O_2$ /мин/мг белка		ГП, мМ GSH/мин/мг белка		СДГ, нмоль сукцината/мин/мг белка	
	мозг	сердце	мозг	сердце	мозг	сердце	мозг	сердце
Интактная (n=8)	60,0±5,1	42,4±4,0	11,4±1,9	10,10±1,08	19,57±2,76	28,19±2,7	32,5±3,3	49,2±6,7
ХАИ+физ. р-р.	43,0±4,5*	29,3±4,2*	9,1±2,6	7,2±1,5*	14,2±3,1*	21,7±2,8*	25,2±1,9*	28,6±3,6*
ХАИ+фенотропил	48,9±2,8	32,2±5,5	9,5±1,5	9,0±1,5	16,0±1,8	23,4±4,2	31,6±1,6 <sup>#</sup>	44,2±2,6 <sup>#</sup>
ХАИ+салифен	49,3±3,3	33,2±3,3	10,0±1,7	9,6±1,0	18,9±1,5 <sup>#</sup>	24,8±3,7	29,0±2,1	35,4±3,8
ХАИ+милдронат	53,8±5,4 <sup>#</sup>	35,4±4,4	10,9±2,0	8,5±1,3	17,5±1,6	25,9±3,4	31,0±2,7 <sup>#</sup>	36,7±4,1 <sup>#</sup>

Примечание: изменения статистически значимы относительно показателей: \*- интактной группы животных (*t*- критерий Стьюдента,  $p < 0,05$ ), #- группы животных, подвергавшихся ХАИ (критерий Ньюмена-Кейлса,  $p < 0,05$ ).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты проведенного исследования показали, что острое стрессорное воздействие и алкогольная интоксикация приводят к снижению скорости стимулированного дыхания, при относительно высоких значениях  $V_4$ , что сопровождается низкими показателями дыхательного контроля в митохондриях клеток головного мозга и сердца крыс при окислении субстратов I и II комплексов; повышению содержания продуктов ПОЛ и ослаблению антиоксидантной системы.

При этом, введение экспериментальным животным салифена и фенотропила способствовало ограничению повреждающего действия стресса и алкогольной интоксикации на митохондрии клеток головного мозга и сердца животных, восстановлению нарушенного энергетического баланса и стабилизации комплексов дыхательной цепи, о чем свидетельствует повышение показателей функциональной активности митохондрий, увеличение концентрации ферментов антиоксидантной защиты и снижение продуктов ПОЛ.

## ВЫВОДЫ

1. Среди изучаемых 6 производных ГАМК и 2 производных ГК в концентрации  $1 \times 10^{-5}$  М наиболее выраженное защитное действие на поврежденные ГПТБ митохондрии печени оказывали салифен и фенотропил, что проявлялось увеличением скорости потребления кислорода в состоянии  $V_3$  по Чансу на 46 % и 32%, а коэффициента ДК на 69% и 74%.
2. Салифен и фенотропил в диапазоне концентрации от  $1 \times 10^{-7}$  М до  $1 \times 10^{-5}$  М дозозависимо увеличивали показатели  $V_3$  и ДК в интактных и поврежденных ГПТБ митохондриях печени крыс.
3. Фенотропил в дозе 25мг/кг снижал негативное влияние окислительного стресса на митохондрии клеток головного мозга и сердца, что сопровождалось увеличением  $V_3$  в среднем на 34%, а ДК – на 24%. Салифен в дозе 15 мг/кг ограничивал повреждение митохондрий клеток головного мозга и сердца ГПТБ, что подтверждалось повышением показателя  $V_3$  в среднем на 28%, а коэффициента ДК - на 18%.
4. В исследованиях *ex vivo* салифен (15 мг/кг) и фенотропил (25мг/кг) препятствовали снижению скорости поглощения кислорода митохондриями клеток головного мозга, угнетению процессов окислительного фосфорилирования при остром стрессорном воздействии, острой и хронической алкогольной интоксикации, о чем свидетельствует увеличение показателя ДК в среднем на 19% и 26%. В митохондриях сердца наблюдалось повышение показателя ДК под действием салифена и фенотропила на 18% и 36%.
5. Салифен (15 мг/кг) и фенотропил (25мг/кг) снижали концентрацию МДА при остром стрессе и ХАИ в среднем на 24% и 28%, при этом активность СОД возрастала на 26% и 39 %, каталазы – на 25% и 21%, ГП- на 26% и 19%, что может свидетельствовать об ограничении окислительного стресса и стабилизации цепи переноса электронов в поврежденных митохондриях.

## НАУЧНО- ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Результаты проведенного исследования свидетельствуют о положительном влиянии производных ГАМК на функциональную активность митохондрий клеток головного мозга и сердца, состояние АОС в условиях стресса, острой и хронической алкогольной интоксикации, что позволяет рекомендовать дальнейший поиск высокоактивных веществ среди данной группы соединений.
2. Полученные данные позволяют считать перспективным и целесообразным дальнейшее изучение фармакологической активности салифена для разработки на их основе препаратов, ограничивающих повреждающее действие стресса, снижающих негативные последствия и ускоряющих процесс восстановления нормального функционирования клеток головного мозга и сердца после алкогольной интоксикации.
3. Полученные результаты дают основание для расширения терапевтического потенциала и показаний к применению препарата фенотропил.

## СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ:

### *Статьи в ведущих рецензируемых научных журналах, рекомендованных Минобрнауки РФ*

1. Попова, Т. А., Хусаинова, Г. Х., Перфилова, В. Н., Мокроусов, И. С., Тюренков, И. Н., Багметова, В. В., Дудченко, Г. П. Сравнительная оценка изменений функциональных показателей митохондрий клеток головного мозга крыс разного пола и возраста при хронической интоксикации 5-и 10% раствором этанола // **Российский физиологический журнал им. Сеченова**. – 2018. – Т. 104. – №. 3. – С. 312—326-312—326.
2. Попова, Т. А., Прокофьев, И. И., Хусаинова, Г. Х., Перфилова, В. Н., Кустова, М. В., Тюренков, И. Н., Дудченко, Г. П. Возрастные изменения функциональных показателей митохондрий клеток сердца у крыс при хронической алкогольной интоксикации// **Успехи геронтологии**. – 2019. – Т. 32. – №. 1-2. – С. 29-37.
3. Попова, Т. А., Хусаинова, Г. Х., Прокофьев, И. И., Перфилова, В. Н., Тюренков, И. Н., Багметова, В. В. Островский, О. В. Коррекция производными нейроактивных аминокислот алкогольных повреждений митохондрий клеток сердца и головного мозга // **Бюллетень экспериментальной биологии и медицины**. – 2020. – Т. 169. – №. 2. – С. 176-181.
4. Popova, T. A., Prokofiev, I. I., **Khusainova, G. K.**, Perfilova, V. N., Kustova, M. V., Tyurenkov, I. N., Dudchenko, G. P. Age-Related Changes in the Functional Indices of Cardiac Mitochondria in Chronic Alcohol Intoxication in Rats // **Advances in Gerontology**. – 2019. – Т. 9. – №. 3. – С. 274-282.
5. Perfilova, V. N., Kustova, M. V., Popova, T. A., **Khusainova, G. H.**, Prokofiev, I. I., Nesterova, K. I., Tyurenkov, I. N. Cardioprotective effects of a new glutamic acid derivative in chronic alcohol intoxication // **Alcohol**. – 2021. – Т. 93. – С. 1-10.
6. Popova, T.A., Kustova, M.V., **Khusainova, G.Kh.**, Perfilova, V.N., Prokofiev, I.I., Smolnyakova, Yu.A., Borodkina, L.E., Tyurenkov, I.N., Ostrovskiy, O.V., Vasil'eva, O.S. Changes in the respiratory function of the heart and brain mitochondria of animals after chronic alcohol intoxication affected by a new GABA derivative // **Research Results in Pharmacology**. – 2021. Т. 7. № 1. С. 33-40.
7. **Хусаинова Г.Х.**, Попова Т.А., Кустова М.В., Островский О.В., Влияние производных ГАМК и глутаминовой кислоты на функциональную активность митохондрий клеток печени in vitro в условиях окислительного стресса// **Вестник волгоградского государственного медицинского университета**. -2022. т. 19. № 1 (81). с. 147-152.

### *Статьи в журналах и сборниках материалов конференций:*

8. **Хусаинова Г. Х.** Влияние РГПУ-189 на скорость дыхания митохондрий // В сборнике: Актуальные проблемы экспериментальной и клинической медицины. Материалы 74-й открытой научно-практической конференции молодых ученых и студентов ВолГМУ с международным участием. Под редакцией В.И. Петрова. – 2016. – С. 34-34.
9. **Хусаинова Г.Х.**, Магомедова М.Н. Влияние алкогольной интоксикации на функциональное состояние митохондрий сердца крыс // в сборнике: Актуальные проблемы экспериментальной и клинической медицины. Материалы 75-й открытой научно-практической конференции молодых ученых и студентов ВолГМУ с международным участием. – 2017. С. 598-599.
10. **Хусаинова Г. Х.**, Музыко Е. А., Кустова М. В. Гендерные различия изменений функциональных показателей митохондрий из сердца крыс при хронической алкогольной интоксикации // в сборнике: XXII Региональная конференция молодых исследователей Волгоградской области. – 2017. – С. 57-59.
11. **Хусаинова Г. Х.**, Сорокин В. В., Шукшин Н. А. влияние алкогольной интоксикации на функциональное состояние митохондрий мозга крыс // в сборнике: Актуальные проблемы экспериментальной и клинической медицины. материалы 76-й международной научно-практической конференции молодых ученых и студентов – 2018. – С. 510-511.
12. **Хусаинова Г. Х.** Влияние толибута и фенибута на функциональное состояние митохондрий // в сборнике: Актуальные проблемы экспериментальной и клинической медицины. Материалы 77-й международной научно-практической конференции молодых ученых и студентов. 2019. С. 495.

13.Хусаинова Г. Х. Влияние мефебута, салифена и фенибута на функциональную активность митохондрий // в сборнике: Молодежная наука и современность. Материалы 85-ой Международной научной конференции студентов и молодых ученых, посвященной 85-летию КГМУ. 2020. С. 73-75.

14.Хусаинова Г. Х. Влияние производных ГАМК фенотропила и салифена на показатель дыхательного контроля в митохондриях клеток головного мозга интактных и стрессированных животных *in vitro* //актуальные проблемы экспериментальной и клинической медицины. Материалы 78-й международной научно-практической конференции молодых ученых и студентов. – 2020. – С. 333-334.

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АТФ — аденозинтрифосфорная кислота  
АФК — активные формы кислорода  
ГАМК — гамма—аминомасляная кислота  
ГГНС — гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковая система  
ГК — глутаминовая кислота  
ГПТБ — трет-Бутилгидропероксид  
ДК- коэффициент дыхательного контроля по Чансу и Вильямсу (V3/ V4)  
НАДН – никотинамидадениндинуклеотид  
ОАИ —острая алкогольная интоксикация  
ПОЛ — перекисное окисление липидов  
СДГ — сукцинатдегидрогеназа  
СОД — супероксиддисмутаза  
ФАД — флавинадениндинуклеотид  
ФМН — флаavin мононуклеотида  
ХАИ — хроническая алкогольная интоксикация  
ЦПЭ — цепь переноса электронов  
ЦТК — цикл трикарбоновых кислот, цитратный цикл  
GSH — глутатионпероксидаза  
ОХРНOS — окислительное фосфорилирование  
V3- скорость фосфорилирующего дыхания по Чансу и Вильямсу  
V4- скорость нефосфорилирующего дыхания (состояние 4) по Чансу и Вильямсу

**Хусаинова Гульнара Хамзаевна**

**Производные нейроактивных аминокислот как регуляторы  
функционального состояния митохондрий возбудимых тканей крыс в норме  
и при экспериментальных патологиях**

*АВТОРЕФЕРАТ*

*диссертации на соискание ученой степени кандидата  
фармацевтических наук*

Подписано в печать \_\_. \_\_.20\_\_ г.

Формат 60x84/16. Печать офсетная. Усл.-печ. л. \_\_.

Усл. изд.л. \_\_ Тираж 100 экз. Заказ \_\_

Отпечатано в типографии