

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«ВОЛГОГРАДСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

На правах рукописи

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

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени

кандидата фармацевтических наук

Научный руководитель:

Островский Олег Владимирович

доктор медицинских наук, профессор

Научный консультант:

Перфилова Валентина Николаевна

доктор биологических наук, профессор

Волгоград - 2022

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	11
1.1. Строение и функции митохондрий кардиомиоцитов и нейронов	11
1.2. Роль митохондрий в развитии патологических состояний	14
1.3. Митохондриальная дисфункция как общий патогенетический механизм нейродегенеративных заболеваний.....	16
1.4. Митохондрии и сердечно-сосудистые заболевания.....	19
1.5. Структурно-функциональные изменения митохондрий при стрессорных воздействиях.....	20
1.6. Нарушения структуры и функции митохондрий при алкогольной интоксикации	24
1.7. Перспективы поиска среди производных нейроактивных аминокислот веществ, ограничивающих повреждение митохондрий	26
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	34
2.1. Изучение влияния производных ГАМК и ГК <i>in vitro</i> на функциональное состояние митохондрий, подвергавшихся окислительному повреждению ГПТБ	37
2.2. Влияние различных концентраций салифена и фенотропила на функциональную активность интактных и поврежденных ГПТБ митохондрий <i>in vitro</i>	39
2.3. Оценка влияния фенотропила и салифена <i>in vitro</i> на функциональное состояние митохондрий мозга и сердца крыс, подвергавшихся окислительному стрессу	40
2.4. Оценка влияния салифена и фенотропила <i>in vitro</i> на функциональное состояние изолированных митохондрий мозга и сердца крыс, подверженных острому иммобилизационно-болевого стрессу	42
2.5. Оценка влияния салифена и фенотропила <i>ex vivo</i> на функциональное состояние митохондрий мозга крыс, подверженных острому иммобилизационно-болевого стрессу.....	43
2.6. Изучение влияния салифена и фенотропила <i>ex vivo</i> на функциональное состояние митохондрий мозга и сердца крыс, подверженных острой алкогольной интоксикации.....	43

2.7. Изучение влияния салифена и фенотропила <i>ex vivo</i> на функциональное состояние митохондрий мозга и сердца крыс, подверженных хронической алкогольной интоксикации.....	45
2.8. Выделение митохондрий	46
2.9. Определение концентрации белка.....	47
2.10. Полярография	47
2.11. Обработка полярограмм.....	48
2.12. Интенсивность процессов ПОЛ.....	49
2.13. Определение концентрации малонового диальдегида	49
2.14. Измерение активности каталазы	50
2.15. Определение суммарной активности супероксиддисмутазы	50
2.16. Определение активности глутатионпероксидазы.....	51
2.17. Определение активности сукцинатдегидрогеназы.....	52
2.18. Методы статистической обработки.....	53
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	54
3.1.1. Влияние производных ГАМК и ГК <i>in vitro</i> на функциональное состояние митохондрий печени крыс, поврежденных ГПТБ.....	54
3.1.2. Влияние производных ГАМК и ГК на функциональное состояние интактных митохондрий печени крыс <i>in vitro</i>	64
3.2.1. Влияние различных концентраций салифена и фенотропила на функциональную активность интактных митохондрий <i>in vitro</i>	67
3.2.2. Влияние различных концентраций салифена и фенотропила на функциональную активность поврежденных митохондрий печени <i>in vitro</i>	70
3.3.1. Оценка влияния салифена и фенотропила <i>ex vivo</i> на функциональное состояние митохондрий мозга крыс, подвергавшихся окислительному стрессу	73
3.3.2. Оценка влияния салифена и фенотропила <i>ex vivo</i> на функциональное состояние митохондрий сердца крыс, инкубированных с ГПТБ	79
3.4.1. Влияние салифена и фенотропила <i>in vitro</i> на функциональное состояние изолированных митохондрий мозга крыс, подверженных острому иммобилизационно-болевого стрессу.....	86
3.4.2. Оценка влияния салифена и фенотропила <i>in vitro</i> на функциональное состояние митохондрий сердца крыс, подвергавшихся острому иммобилизационно-болевого стрессу.....	95

3.5.1. Оценка влияния салифена и фенотропила <i>ex vivo</i> на функциональное состояние митохондрий мозга крыс, подверженных острому иммобилизационно-болевого стрессу	100
3.5.2. Оценка влияния салифена и фенотропила <i>ex vivo</i> на функциональное состояние митохондрий сердца крыс, подверженных острому иммобилизационно-болевого стрессу	106
3.6.1. Оценка влияния салифена и фенотропила <i>ex vivo</i> на функциональное состояние митохондрий мозга крыс, подвергавшихся острой алкогольной интоксикации	113
3.6.2. Оценка влияния салифена и фенотропила <i>ex vivo</i> на функциональное состояние митохондрий сердца крыс, подвергавшихся острой алкогольной интоксикации	117
3.7.1. Оценка влияния производных ГАМК <i>ex vivo</i> на функциональное состояние митохондрий мозга крыс, подверженных хронической алкогольной интоксикации	121
3.7.2. Оценка влияния салифена и фенотропила <i>ex vivo</i> на функциональное состояние митохондрий сердца крыс, подверженных хронической алкогольной интоксикации	127
3.8. Оценка антиоксидантного действия производных нейроактивных аминокислот в условиях стресса	132
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ	141
ВЫВОДЫ	150
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	152
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	154

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Активное развитие «метаболического» направления в медицине за последние десятилетия позволило установить, что в основе многих социальнозначимых 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 β -окислением жирных кислот [Lim S. et al., 2016; Spinelli J. B., 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; Новиков В. Е. и др., 2016; 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, гипозенергетического 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 гипозенергетическими состояниями в клетках, можно предотвратить препаратами, нацеленными на регуляцию энергетического обмена. Известно, что γ -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

Особое внимание в последние годы уделяется изучению 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 энергетики 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

нейродегенеративных и сердечно-сосудистых заболеваний 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 алкоголизированных 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 алкоголизированных животных.

Новизна исследования

Впервые проведена комплексная оценка влияния производных ГАМК и ГК на функциональное состояние митохондрий сердца и мозга интактных, стрессированных и алкоголизированных 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 клеток головного мозга и сердца стрессированных и алкоголизированных 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-болевого 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 ВолгГМУ

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. Фенотропил и салифен оказывали наиболее выраженное защитное действие на интактные и поврежденные ГПТБ митохондрии *in vitro* среди изученных соединений.

2. Салифен и фенотропил снижают негативное влияние острого стресса и алкогольной интоксикации, что сопровождается повышением показателя V3 и коэффициента дыхательного контроля в митохондриях головного мозга и сердца крыс.

3. Фенотропил и салифен в исследованиях оказывали кардиопротективное и антистрессорное действие, что может быть объяснено активацией антиоксидантных систем и ограничением процессов ПОЛ в поврежденных митохондриях.

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 ВолгГМУ 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 184 страницах 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 238 источников, включая 48 отечественных и 190 зарубежных авторов.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Строение и функции митохондрий кардиомиоцитов и нейронов

В последние десятилетия в медицине активно развивается «метаболическое» направление, нацеленное на всестороннее изучение и анализ обменных процессов. Нарушение метаболизма является одним из важнейших этапов повреждения клеток, способствующих развитию множества заболеваний [Sadeghian M. et al., 2016]. Ключевым элементом в метаболизме клеток являются митохондрии, основные функции которых заключаются в регуляции энергообмена, апоптоза, внутриклеточной концентрации кальция и утилизации АФК [Percario S. et al., 2020].

Митохондрии представляют собой частично автономные высоко динамичные органеллы, имеющие двойную мембрану. Они способны изменять свою форму, размер и локализацию в зависимости от функций и потребностей клеток [Zahedi A. et al., 2018].

Внешняя митохондриальная мембрана обращена к цитозолю и содержит интегральные белки - порины, которые обеспечивают проницаемость мембраны для неорганических ионов и небольших белковых молекул с молекулярной массой до 10 кДа. Между внешней и внутренней мембраной находится межмембранное пространство.

Внутренняя мембрана выступает в матрикс, образуя множество складок (крист), увеличивающих площадь поверхности митохондрий [Margineantu D. N. et al., 2016]. Распределение и плотность крист зависит от энергетической потребности клетки. В клетках с высокой энергетической потребностью, таких как, например, сердечная мышца, кристы образуют плотно уложенные дискообразные структуры, занимающие большую часть объема митохондрий. В тканях, менее нуждающихся в энергии (клетки печени или почек), кристы располагаются более свободно, оставляя больше пространства для матрицы. Внутренняя мембрана проницаема для кислорода, углекислого газа и воды. Другие вещества могут проникать через нее только с помощью локализованных на ее поверхности специфических белковых

комплексов, каждый из которых селективен для определенной молекулы и иона [Aufschnaiter A. et al., 2017]. Высокая избирательность и непроницаемость внутренней мембраны создает электрохимический мембранный потенциал, необходимый для синтеза АТФ.

На поверхности внутренней мембраны так же имеются белковые комплексы, выполняющие каталитические функции. К ним относится Ca^{2+} -унипортер, опосредующий перемещение Ca^{2+} из цитоплазмы в матрикс; транслокатор адениновых нуклеотидов (adenine nucleotide translocator, ANT), который осуществляет транспорт АДФ из цитозоля в митохондрию и АТФ - из митохондрии в цитозоль [Tsai C.W. et al., 2017].

В митохондриях имеются мембраносвязанные мультиферментные комплексы, участвующие в переносе электронов и синтезе АТФ. К ним относятся: NADH-дегидрогеназа (комплекс I), сукцинатдегидрогеназа (II комплекс), QH_2 -дегидрогеназа (комплекс III), цитохромоксидаза (комплекс IV) (Рис.1).

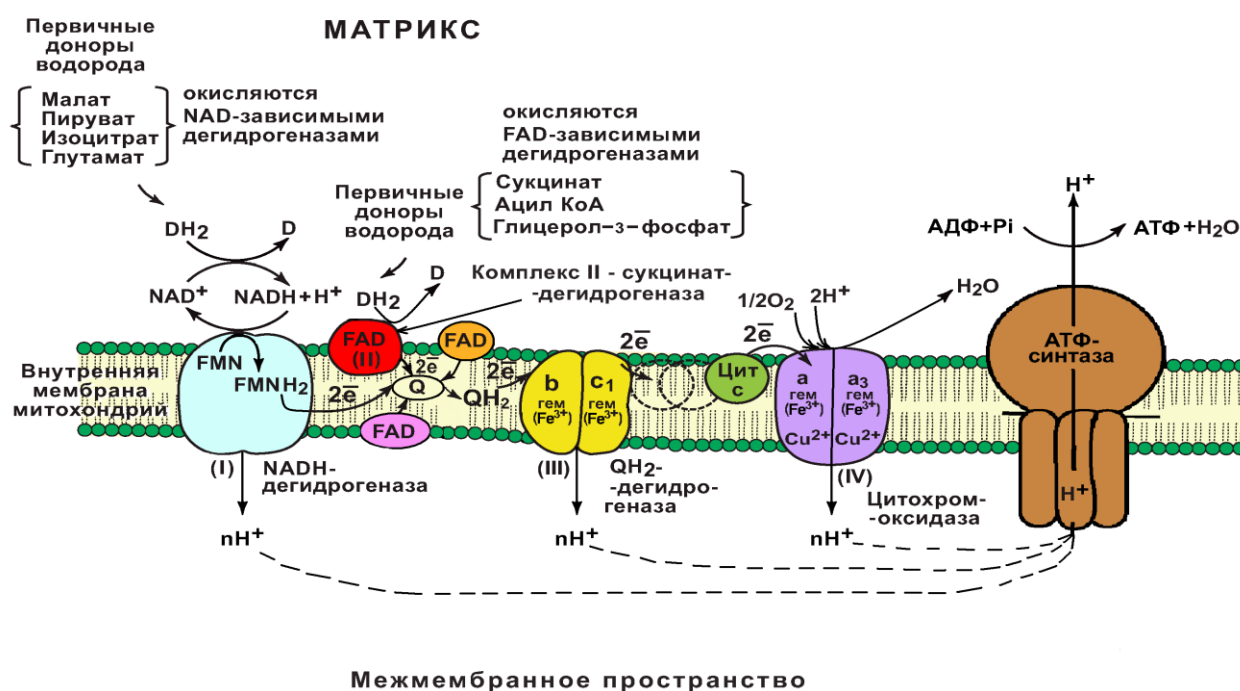


Рис.1. Дыхательная цепь митохондрий.

NAD-дегидрогеназа в эукариотических клетках находится на внутренней мембране митохондрий. Она состоит из флавинов мононуклеотида (ФМН) и 46 белковых молекул, 6 из которых представлены железосерными комплексами [Carroll J. et al., 2003, Hirst J., 2013]. Комплекс I катализирует окисление

никотинамидадениндинуклеотида (НАДН) и переносит электроны на коэнзим Q (убихинон). Энергия, высвобождаемая в реакции переноса электронов, используется для перекачки четырех протонов из матрикса на наружную поверхность внутренней мембраны, создавая при этом протонный градиент для синтеза АТФ [Efremov R. G. et al., 2012; Surve S. et al., 2012].

Сукцинатдегидрогеназа (СДГ) переносит электроны от сукцината на флавинадениндинуклеотид (ФАД), а затем электроны через железо–серные кластеры переносятся на убихинон [Korge, P. et al., 2017]. Комплекс II не участвует в создании протонного градиента на мембране, так как протоны, образующиеся при окислении сукцината, остаются на той же стороне внутренней мембраны и не переносятся через неё [Siebels I. et al., 2013].

QH₂-дегидрогеназа (комплекс III, цитохром с-редуктаза) представляет собой мультибелковый комплекс, состоящий из молекулы цитохрома *b*, цитохрома *c*₁ и железосерных белков. Он образует 2 мономера, каждый из которых содержит 11 полипептидных цепей. Его функция заключается в переносе электронов с коэнзима Q на цитохром *c*, при этом два протона прокачиваются в межмембранное пространство [Qu C. et al., 2019].

Убихинон (коэнзим Q) и цитохром *c* выступают как промежуточные переносчики электронов. Биологическая роль коэнзима Q заключается в переносе электронов в дыхательной цепи от флавопротеинов (комплексы I и II) к цитохромам (комплекс III) [Stefely J. A. et al., 2017].

Цитохром *c* – сложный, гем-содержащий белок, хромопротеин. Биологическая роль цитохрома *c* заключается в переносе электронов в дыхательной цепи от комплекса III к комплексу IV. Согласно современной концепции, цитохром *c* взаимодействует с комплексами III и IV через универсальный участок, состоящий из центрального гидрофобного и окружающего его электростатического домена. Стабильность электростатического взаимодействия между цитохромом *c* и комплексами III и IV определяется правильной пространственной ориентацией контактирующих белков [Chertkova R. V. et al., 2017].

Матрикс митохондрий представляет собой гелеобразную структуру с высоким значением рН (7,9 – 8,0), создающим трансмембранный электрохимический градиент, который стимулирует синтез АТФ. В матриксе локализована митохондриальная ДНК (мтДНК), ферменты цикла трикарбоновых кислот (ЦТК) и окисления жирных кислот, протекают реакции цикла Кребса, репликации ДНК, транскрипции и биосинтеза белка [Bulthuis E. P. et al., 2019].

Известно, что передача быстрых возбуждающих сигналов в нервных клетках осуществляется с помощью такого нейротрансмиттера как глутамат. Основным рецептором глутамата в синапсах периферической и центральной нервной системе являются ионотропные AMPA-рецепторы (рецепторы α -амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазолепропионовой кислоты). AMPA-рецепторы представляют собой интегральные тетрамерные белковые комплексы, состоящие из субъединиц GluA1-4 [Achzet L. M. et al., 2021; Guo C., Ma Y. Y. 2021]. Активность AMPA рецепторов играет важную роль в формировании нейропластичности в физиологических условиях и развитии эксайтотоксичности. В физиологических условиях AMPA рецепторы не проницаемы для Ca^{2+} . Гиперактивация AMPA рецепторов приводит к перегрузке цитозоля кальцием [Carriedo S. G. et al., 2000; Ruiz A et al., 2010].

1.2. Роль митохондрий в развитии патологических состояний

Митохондрии играют важную роль в физиологическом функционировании клеток. Они являются одновременно местом производства и утилизации активных форм кислорода, участвуют в гомеостазе кальция, активизируют и подавляют процесс запрограммированной гибели клеток [Nair R. R. et al., 2018]. Основная их функция заключается в синтезе АТФ путем окислительного фосфорилирования в результате расщепления глюкозы и жирных кислот. Особое значение митохондрии имеют для функционирования клеток с высокой потребностью в АТФ. К таким клеткам относятся нейроны, в которых для передачи нервных импульсов необходимо большое количество энергии и кардиомиоциты, выполняющие непрерывную механическую работу [Moehle E. A. et al., 2019; Toleikis A. et al., 2020].

Принято выделять первичные и вторичные митохондриальные дисфункции. В основе первичных лежат мутации генов, ответственных за митохондриальные белки [Novotny E. J. et al., 1986; Rotig A. et al., 1990; Ghezzi D. et al., 2012; Ng Y. S. et al., 2016].

Вторичные или приобретенные митохондриальные дисфункции возникают преимущественно как следствие повреждения митохондриальных структур различными эндогенными и экзогенными факторами. Выделяют несколько ключевых аспектов, лежащих в основе развития вторичных митохондриальных патологий: окислительное повреждение, нарушение обмена кальция и нарушение синтеза АТФ.

Митохондрии являются одновременно источником и мишенью активных форм кислорода [Ling F. et al., 2016; Yamada Y. et al. 2020]. АФК представляют собой группу различных веществ радикальной и нерадикальной природы, обладающих высокой реакционной способностью. Они образуются как побочные продукты в результате утечки электронов из I и III комплексов дыхательных цепей митохондрий во время синтеза АТФ [Dunn J. D. et al., 2015]. Особенно подвержены окислительному повреждению мембраны и ДНК митохондрий, ввиду их непосредственной близости к месту продуцирования АФК и отдельных предрасполагающих факторов, таких как высокое содержание полиненасыщенных жирных кислот в мембране и отсутствие гистонов в митохондриальной ДНК [Shadel G. S. et al., 2015; Kaarniranta K. et al., 2019].

АФК, образующиеся в митохондриях в физиологических условиях, удаляются клеточной системой антиоксидантной защиты, состоящей из супероксиддисмутазы, каталазы и глутатионпероксидазы. Однако при ишемии, действии некоторых ксенобиотиков, воспалении, старении, стрессе, алкогольной интоксикации и некоторых других состояниях, АФК производятся в таком количестве, что антиоксидантная система не справляется, и избыток окислительных радикалов накапливается в митохондриях [Cioffi F. et al., 2019]. Это оказывает прямое деструктивное действие на клеточные структуры; инициирует свободнорадикальное окисление липидов, белков и нуклеиновых кислот; приводит

к повреждению ДНК; снижению активности АТФ-зависимых ферментов и синтеза АТФ; развитию клеточного ацидоза; уменьшению электрохимического потенциала; разобщению процессов окисления и фосфорилирования, которое сопровождается снижением дыхательного контроля, уменьшением соотношения АДФ/О и угнетением скорости фосфорилирования [Singh-Mallah G. et al., 2019]. Окислительный стресс может вызывать дисфункцию эндотелия сосудов, воспаление, апоптоз, фиброз и другие повреждения сердечно-сосудистой системы [Andreyev A. Y. et al., 2015].

Несоответствие уровня производства АТФ потребностям клетки в энергии приводит к нарушению работы кальциевой АТФ-азы в эндоплазматическом и саркоплазматическом ретикулуме, а также в плазматической мембране, что способствует увеличению концентрации кальция сверх нормального диапазона. В ответ на увеличение кальция в цитозоле, запускается $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -насос, который с помощью кальциевого унипортера закачивает Ca^{2+} в митохондрии [Ruiz A. et al., 2014]. Окислительное повреждение митохондрий, истощение АТФ и перегрузка кальцием вместе вызывают увеличение проницаемости митохондрий [Kalani K. et al., 2018]. Это явление возникает из-за формирования поры на внутренней мембране, которая вызывает набухание и нарушение митохондриальной функции и может привести к гибели клеток [Hurst S. et al., 2015]. Перегрузка кальцием приводит к разобщению окислительного фосфорилирования, что сопровождается увеличением количества коферментов и субстратов в восстановленной форме и создает условия для дополнительной генерации АФК, таким образом запуская порочный круг [Parks R. J. et al., 2018].

1.3. Митохондриальная дисфункция как общий патогенетический механизм нейродегенеративных заболеваний

Нейродегенеративные заболевания – группа сложных гетерогенных расстройств, характеризующихся постепенной гибелью или дисфункцией определенных популяций нейронов центральной и периферической нервной системы [Kandimalla R. et al. 2018; Козин М. С. и др 2018]. К наиболее

распространенным и разрушительным нейродегенеративным заболеваниями относятся болезни Альцгеймера, Паркинсона, Гаттингтона, боковой амиотрофический склероз, лобно-височная деменция [Dupuis L. 2014; Khalil B. et al., 2015; Ryan B. J. et al., 2015; Ye X. et al., 2015; Cai Q. et al., 2016; Franco-Iborra S. et al., 2018]. Развитие данных патологий сопровождается нарушением когнитивных функций, прогрессирующей потерей памяти, суждения и интеллекта [Kandimalla R. et al. 2018; Percario S. et al., 2020]. Общей отличительной чертой нейродегенеративных заболеваний является развитие нейровоспаления, нарушение аутофагии, расслаивание и агрегация некоторых нейротоксичных белков с образованием и последующим отложением нерастворимых фибрилл, клубков и бляшек [Franco-Iborra S. et al., 2018].

Известно, что основным поставщиком энергии в нейронах и глиях являются митохондрии, которые используют 20% потребляемого организмом кислорода и 25% общей глюкозы на OXYPOS для образования АТФ [Engl E. et al., 2015; Fu H., et al., 2018; Chamberlain K. A. et al., 2019]. Запас энергии в центральной нервной системе в состоянии покоя может обеспечить полноценную работу нейронов лишь на несколько секунд. При активации нейронной сети потребность в АТФ увеличивается, поэтому для нормального функционирования клеток мозга необходима непрерывная и эффективная работа митохондрий [Chen H. et al., 2009]. Таким образом, нарушение функции митохондрий является центральным аспектом нейродегенеративных заболеваний [Lin M. T. et al., 2006; Petrozzi L. et al., 2007; Devine M. J. et al., 2018; Lou G. et al., 2020].

Митохондриальные дисфункции, лежащие в основе повреждения нейронов могут быть обусловлены нарушением продукции АТФ, гомеостаза Ca^{2+} , утечкой электронов из цепи переноса электронов с образованием активных форм кислорода, высвобождением цитохрома c в цитозоль через mPTP, индуцируя повреждение ДНК, активацию каспаз и апоптоз [Beal M. F., 2005; Sas K. et al. 2007; Trushina E., et al., 2007; Felipe A. et al., 2012; Wallace D. C., 2013].

В физиологических условиях небольшое количество поступающего в клетку кислорода идет на образование АФК. В норме антиоксидантная система

митохондрий способна их утилизировать, однако, при возникновении дисбаланса между про- и антиоксидантными системами, возможно развитие окислительного стресса в клетке, приводящее к повреждению липидов, белков, ДНК митохондрий и апоптозу [Finkel T. et al., 2000; Nicholls D. G. et al., 2000]. Ввиду особенностей строения и высокого содержания полиненасыщенных жирных кислот в мембранах нейронов, мозг очень чувствителен к избыточному образованию АФК и дефициту энергии.

Данные исследований показывают, что с возрастом в организме увеличивается количество митохондрий с морфологическими изменениями, что сопровождается нарушением функционирования, недостатком энергии и развитием патологий [Larsson N. G., 2010; Bratic A. et al., 2013]. По литературным сведениям, период полураспада митохондрий нейронов равен примерно 30 дням [Cai Q. et al., 2017]. Поддержание числа функционально активных митохондрий в нейронах имеет важное значение. Старые и дефектные митохондрии подвергаются динамической циркуляции путем слияния и деления или устранению с помощью процесса митофагии, представляющей собой селективную форму аутофагии, которая разрушает митохондрии в лизосомах после их переноса обратно в сому. Этот процесс играет фундаментальную роль в митохондриальном и метаболическом гомеостазе, снабжении энергией, выживании нейронов и является ключевым механизмом контроля качества митохондрий [Liu J. et al., 2019].

На динамику митохондрий в нейронах так же способны оказывать влияние ионотропные рецепторы возбуждающего нейромедиатора глутамата – AMPAR. В работах Kim J. E. и его коллег было показано, что активация AMPAR в условиях повышенного воздействия стресса способно приводить к чрезмерной фрагментации митохондрий. Нарушение динамики рассматривается как одна из причин митохондриальной дисфункции, приводящей к гибели нейронов и развитию нейродегенеративных заболеваний. Ингибирование активности AMPA рецептора в данном исследовании способствовало увеличению длины митохондрий. При этом – гиперактивация AMPAрецепторов приводит к кальциевой перегрузке цитозоля, развитию окислительного стресса,

гипоэнергетического состояния с последующим апоптозом клетки [Kim J. E. et al. 2019].

1.4. Митохондрии и сердечно-сосудистые заболевания

Сердечно-сосудистые заболевания выступают одной из наиболее важных проблем здравоохранения, которые являются причиной смерти 17,5 миллионов человек ежегодно во всем мире. Сердечно – сосудистая система обеспечивает поддержание кровяного давления, циркуляцию насыщенной кислородом крови к органам и тканям при различных условиях внешней и внутренней среды [Doenst T. et al., 2013]. Энергию, необходимую для работы сердца, поставляют митохондрии, которые занимают примерно 33% клеточного объема в каждом желудочковом кардиомиоците. Они активируют клеточный ответ на изменения в потребности энергии в результате физиологических и патофизиологических процессов посредством метаболических сигнальных механизмов. Нарушение обмена ионов и продуктов промежуточного метаболизма между матриксом и цитозолем приводит к снижению энергетического обеспечения в митохондриях кардиомиоцитов и сократительной функции сердца, способствуя развитию патологий [Goh K. Y. et al., 2016; Tian R. et al., 2019].

Основные патофизиологические механизмы, приводящие к митохондриальной дисфункции при сердечно-сосудистых заболеваниях включают: 1) ингибирование дыхательных комплексов и фермента аденин-нуклеотид транслоказы, осуществляющего перенос АТФ; 2) усиление утечки протонов через внутреннюю митохондриальную мембрану; 3) окисление фосфолипида митохондрий кардиомиоцитов – кардиолипина и его дисфункцию; 4) избыточное образование АФК; 5) открытие митохондриальной поры промежуточного перехода; 6) высвобождение цитохрома c в цитозоль клетки; 7) кальциевую перегрузку [Dey S. et al., 2018].

Считается, что основной причиной развития митохондриальной дисфункции служит образование АФК, а не снижение уровня антиоксидантных ферментов [Korge P. et al., 2017]. Известно, что основными источниками АФК в поврежденных

кардиомиоцитах являются I и III комплексы дыхательной цепи митохондрий [Boengler K. et al., 2017]. Существует прямая связь между мембранным потенциалом митохондрий и уровнем продукции АФК [Sanderson T. H. et al., 2013].

Известно, что митохондрии кардиомиоцитов производят энергию путем окисления различных субстратов, основным из которых в клетках здорового сердца являются свободные жирные кислоты, они поставляют 80% АТФ. Небольшое количество энергии образуется в результате окисления глюкозы, лактата и кетоновых тел. При возникновении патологических состояний, сопровождающихся снижением концентрации кислорода, митохондрии переключаются на гликолитический путь образования энергии. Он на 30% энергетически более эффективен, по сравнению с окислением жирных кислот в анаэробных условиях, так как во время окисления 1 молекулы глюкозы образуются 2 молекулы АТФ и 2 молекулы лактата, что способствует снижению рН среды. Вследствие нехватки электронных акцепторов НАДН⁺ Н⁺ и QH₂ не могут окисляться повторно, что ведет к снижению синтеза АТФ, ингибированию цитратного цикла. Ингибирование OXPOS является основной причиной низкого уровня АТФ. При этом запускается Na⁺/H⁺ обменник (NHE), перекачивающий протоны в матрикс, а Na⁺ в цитозоль. Одновременно активируется Na⁺/Ca²⁺ насос, способствующий переносу Ca²⁺ в матрикс митохондрий. Избыточное накопление Ca²⁺ в митохондриях приводит к открытию Ca²⁺-зависимой митохондриальной поры и является одним из ключевых этапов активации запрограммированной гибели клеток [Nathan C. D. et al., 2018].

1.5. Структурно-функциональные изменения митохондрий при стрессорных воздействиях

Согласно данным исследований последних лет, одной из существенных причин экспоненциального роста большинства хронических неинфекционных заболеваний выступает стресс [PeNa-Oyarzun D. et al., 2018; Diaz-Vegas A. et al., 2020]. В настоящее время термин «стресс» используют как объединяющее понятие,

отражающее взаимодействие организма с окружающей средой в условиях нарушения или угрозы нарушения гомеостаза [Koolhaas J. M. et al., 2011].

Под воздействием стрессорных факторов в организме активируется генетически детерминированный адаптивный компенсаторно-специфический ответ, необходимый для поддержания гомеостаза, однако чрезмерное и длительное его воздействие может стать фактором патогенеза сердечно-сосудистых, нейродегенеративных заболеваний, болезней пищеварительного тракта и прочих патологических состояний. Факторы стресса могут носить как биогенный характер (биологические и химические раздражители), так и психосоциальный.

Для поддержания гомеостаза, а также его восстановления после повреждающего воздействия стресса, в организме запускается каскад реакций, затрагивающих гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковую систему (ГГНС), вегетативную нервную, метаболическую и иммунную систему (включая сеть цитокин-продуцирующих клеток по всему организму), кишечник, почки. Процесс адаптации к стрессу, направленный на восстановление и поддержание гомеостаза, получил название аллостаза [McEwen B. S. et al., 2010]. Главными биомедиаторами этих систем являются: кортизол, адреналин, норадреналин, цитокины, метаболические гормоны, которые работают в нелинейной, динамической и интерактивной сети [Grigoruta M. et al., 2020].

Одним из необходимых условий аллостаза является увеличение продукции АТФ в клетках, так как в стрессовых условиях под воздействием глюкокортикоидов и других стероидных гормонов многие энергозатратные процессы интенсифицируются. Как известно, основным источником клеточной энергии выступают митохондрии, которые синтезируют молекулы АТФ в процессе гликолиза с помощью реакций окислительного фосфорилирования [Huttemann M. et al., 2007]. При этом клетки мозга не способны хранить гликоген, поэтому необходим постоянный запас глюкозы. Воздействие стресса приводит к нарушению окислительного фосфорилирования, снижению мембранного потенциала митохондрий, что влечет за собой резкое сокращение количества АТФ,

повреждению ультраструктур митохондрий в различных областях мозга, включая гиппокамп, кору головного мозга и гипоталамус [Флеров М.А. и др., 2011].

Умеренный по силе и времени стресс приводит к выбросу небольшого количества катехоламинов в организме, которые способствуют повышению активности основных ферментов цикла трикарбоновых кислот в митохондриях (изоцитратдегидрогеназы, α -кетоглутаратдегидрогеназу, цитратсинтазы и сукцинатдегидрогеназы), увеличению концентрации NADH в митохондриях, повышению градиента pH на внутренней митохондриальной мембране, стимулированию работы АТФазы. Таким образом повышается выработка энергии в клетках, необходимая для реакции организма на стресс [Кулинский В. И., Колесниченко Л. С. 2006].

Влияние длительного или чрезвычайного по силе раздражителя на организм приводит к развитию дистресса и нарушению протекания физиологических процессов. Дистресс способствует высвобождению большого количества катехоламинов, что ведет к увеличению концентрации митохондриального Ca^{2+} , интенсификации процессов образования АФК, увеличению 8-изопростана плазмы и сердечной ткани-биомаркера перекисного окисления липидов, повышению склонности к открытию митохондриальной поры, а также нарушению синтеза АТФ.

Внутриклеточная Ca^{2+} -перегрузка, открытие митохондриальной поры внутренней мембраны и окислительный стресс приводят к гибели кардиомиоцитов. При этом кардиомиоциты замещаются жестким фибриллярным коллагеном в виде фиброзной ткани, не способной выполнять сократительную функцию сердца [Tsigos C. et al., 2020]. Несмотря на то, что норадреналин и нейропептид Y (NPY) могут оказывать непосредственное кардиодепрессивное действие, считается, что сердечная недостаточность при стрессе является результатом нарушения микрососудистой перфузии [Reichmann F., Holzer P., 2015].

В условиях повышенного стрессового воздействия, когда энергозатратные процессы в клетке интенсифицируются, митохондрии не способны обеспечить адекватный уровень АТФ, необходимый для нормальной работы клеток.

Нарушение работы дыхательной цепи при стрессовом воздействии может способствовать усиленному образованию АФК в I и III комплексе дыхательной цепи. АФК играют значительную роль в регуляции основных функций клетки и в зависимости от силы действующего на клетку патогенного фактора могут выступать индукторами процессов адаптации либо апоптоза. АФК способны оказывать прямое деструктивное действие на клеточные структуры, инициировать свободнорадикальное окисление белков, липидов и нуклеиновых кислот, что лежит в основе патогенеза многих заболеваний [Apel K., Hirt H., 2004].

К АФК относятся супероксид анион-радикал ($O_2^{\bullet-}$), гидроксильный радикал ($\bullet OH$), перекись водорода (H_2O_2), синглетный кислород (O_2) [Poog P., 2020].

АФК выполняют сигнальную роль в регуляции основных функций клетки, а также участвуют в ауторегуляции образования свободных радикалов кислорода в митохондриях в условиях гипоксии и стресса. Когда митохондрии перестают справляться с проблемой детоксикации образуемых ими АФК, в клетке развивается «окислительный стресс». В результате избыточного образования кислородных радикалов, последние начинают выполнять в основном деструктивные функции. Наблюдаются специфические изменения клеточных компонентов: повреждаются мембранные структуры из-за перекисного окисления липидов (ПОЛ), происходит окисление белков по остаткам тирозина, цистеина и серина, повреждение ДНК, смещение редокс-потенциала клетки из-за окисления глутатиона и НАД(Ф)Н. Наблюдается разрушение митохондриальных структур от мембраны до ДНК (мтДНК). Окислительный стресс является причиной множества дегенеративных заболеваний, старения и гибели клетки [Dai D. F. et al., 2011].

В нормальных условиях митохондрии способны ограничивать окислительный стресс за счет собственных антиоксидантных систем и обеспечивать клеткам адекватный уровень энергии, но в условиях стресса данные функции нарушаются или выполняются недостаточно эффективно. Мозг особенно уязвим к окислительному стрессу и повреждениям из-за его высокого потребления кислорода, низкого уровня антиоксидантной защиты и повышенного содержания в клетках полиненасыщенных жиров, склонных к окислению [Austin K. W. et al.,

2016]. В целях предотвращения и ограничения повреждающего действия стресса, в современной медицине широко используются антиоксидантные препараты, способные восстанавливать нарушенный энергетический метаболизм за счет нормализации окислительного фосфорилирования в митохондриях и активации альтернативных метаболических путей.

1.6. Нарушения структуры и функции митохондрий при алкогольной интоксикации

Согласно статистическим данным, ежегодно в мире алкоголь становится причиной смерти около 3,3 миллионов человек [Кайгородова Т. В., Куликов А. А., 2010]. Алкогольная зависимость связана с широким спектром медицинских, психологических и социальных проблем. Острая алкогольная интоксикация приводит к повреждению и функциональным нарушениям некоторых органов, влияет на метаболизм белков, жиров и углеводов.

Степень вовлеченности органов и тканей в патологический процесс, а также пути метаболизма этанола при алкогольной интоксикации зависят от концентрации и времени воздействия алкоголя. После перорального приема этанол легко всасывается желудочно-кишечным трактом, около 20% поглощается через стенку желудка путем пассивной диффузии, а оставшиеся 80% – через стенки двенадцатиперстной и тонкой кишок. Большая часть абсорбированного этанола (95–98%) выводится в основном за счет обмена веществ, при этом небольшие доли введенной дозы выводятся без изменений с дыханием (0,7%), потом (0,1%) и мочой (0,3%). Основное повреждающее действие на клетки и ткани оказывает не сам этанол, а продукты метаболизма – ацетальдегид и ацетат [Di Rocco G. et al., 2018].

Ацетальдегид оказывает токсическое действие на митохондрии, подавляя их функции. Нарушение процесса переноса электронов по электрон – транспортной цепи приводит к образованию АФК, которые могут вызывать окисление дыхательных комплексов, нарушая их функционирование и снижая скорость синтеза АТФ [Yan T., Zhao Y., 2020].

Образующийся ацетальдегид способен связываться с ферментами, микросомальными белками и микротрубочками, образуя при этом белковые аддукты. Хроническое потребление алкоголя на посттранскрипционном уровне способствует снижению синтеза антиоксидантных ферментов-супероксиддисмутазы (СОД), каталазы и глутатионпероксидазы (GSH). Снижение антиоксидантной защиты способствует усилению окислительного стресса [Han D. et al., 2016].

АФК могут окислять липиды, повышая проницаемость внешних и внутренних митохондриальных мембран. Окисление тиоловых групп, регулирующих проницаемость митохондриальной поры, способствует проникновению в митохондрии проапоптического фактора *Bax*, который образует комплекс с зависимым от напряжения анионным каналом (VDAC) [Lemasters J. J. et al., 2012]. Открытие пор ведет к диффузии Ca^{2+} и воды в митохондрии, набуханию и разрыву наружной мембраны с высвобождением белков. В результате разрыва мембраны в матрикс выходит цитохром c, что вызывает активацию каспаз и фрагментацию ДНК, которые являются ключевыми событиями для индукции запрограммированной гибели клеток или апоптоза. АФК могут повреждать мтДНК, снижая при этом репарацию и репликацию.

Использование NAD^+ в качестве кофактора при окислении алкоголя, повышает соотношение НАДН/НАД⁺. Увеличение соотношения NADH/NAD^+ приводит к нарушению окислительно-восстановительного равновесия, снижению синтеза АТФ, увеличению выработки активных форм кислорода. Источниками образования $\text{O}_2^{\cdot-}$ и H_2O_2 могут выступать цитохром P450, митохондриальная цепь переноса электронов и цитозольные ферменты ксантиноксидаза и альдегидоксидаза. Цитохром P450 обладает высокой скоростью окисления НАДФН, что приводит к образованию большого количества $\text{O}_2^{\cdot-}$ и H_2O_2 [Hoyt L. R. et al., 2017]. Метаболизм этанола сопровождается увеличением концентрации восстановленного НАДН, сдвигая окислительно-восстановительное равновесие в комплексах I и III, тем самым облегчая восстановление O_2 до $\text{O}_2^{\cdot-}$. Снижение активности окислительных фосфорилирующих комплексов ведет к уменьшению

образования энергии. Известно, что в результате окислительно – восстановительных реакций в ЦПЭ регулярно образуется небольшое количество АФК, которое нейтрализуется антиоксидантными системами. К таким митохондриальным антиоксидантам относится глутатион GSH, который может быть окислен до его дисульфидной формы GSSG.

Согласно клиническим рекомендациям, фармакологическая терапия алкогольного абстинентного синдрома включает прием следующих групп лекарственных препаратов:

- Транквилизаторы – лекарственные препараты, обладающие противотревожным, снотворным, противосудорожным и миорелаксирующим эффектом.

- Витамины и ионсодержащие препараты. Восполняют уровень магния, возникающий в результате снижения всасывания в тонком отделе кишечника. Этанол способствует повышению экскреции Mg, что ведет к атаксии, тремору, бессоннице и повышенной раздражительности.

- Гепатопротекторные препараты. Группа препаратов, препятствующих разрушению клеточных мембран и стимулирующих регенерацию гепатоцитов.

- Нейрометаболические стимуляторы или ноотропы – препараты, обладающие психоаналептическим действием. Они активируют метаболические процессы в клетках головного мозга, оказывают противоишемическое действие в условиях гипоксии, повышают устойчивость организма к разнообразным вредным воздействиям. Препаратами выбора при лечении алкогольной интоксикации среди ноотропов являются ГАМКергические средства.

1.7. Перспективы поиска среди производных нейроактивных аминокислот веществ, ограничивающих повреждение митохондрий

Известно, что митохондрии являются одновременно местом производства и утилизации активных форм кислорода. Усиление генерации АФК или снижение антиоксидантной защиты при патофизиологических изменениях может приводить

к развитию окислительного стресса и гибели клеток. Для предотвращения окислительного повреждения митохондрий широко изучаются и тестируются фармакологические вещества, способные ограничивать производство АФК в клетках, усиливать антиоксидантную защиту [Силачев Д. Н., 2015; Ковалева Л. А. и др., 2016]. Особый интерес в этом аспекте представляют производные нейроактивных аминокислот.

ГАМК и ГК представляют собой аминокислоты, широко присутствующие в организме человека и позвоночных животных. В настоящее время ГАМК хорошо известна как основной тормозной нейромедиатор центральной нервной системы. Нарушение ГАМК – ергической сигнализации играет ключевую роль в развитии множества неврологических расстройств: болезни Альцгеймера, шизофрении, биполярного расстройства, аутизма.

Согласно данным многочисленных исследований, ГАМК и ее производные обладают симпатингибирующим, антиоксидантным, антигипоксическим и противовоспалительным эффектами, снижают производство АФК, стимулируют процессы окислительного фосфорилирования [Гусакова Е. А., Городецкая И. В., 2019]. Антиоксидантное действие ГАМК основано на их способности связывания и инактивации активных форм кислорода, снижении концентрации малонового диальдегида и повышении активности антиоксидантных ферментов – супероксиддисмутазы и глутатионпероксидазы [Ngo D. H., Vo T. S., 2019].

Известно, что производные ГАМК могут повышать скорость утилизации глюкозы и модифицировать биохимические реакции амина – бутиратного шунта (шунта Робертса), приводя к увеличению продукции АТФ митохондриями в условиях гипоксии и устранению энергодефицита. ГАМК – ергические соединения способны активировать пентозофосфатный путь с образованием дополнительного пула NADPH_2 , который инактивирует свободные кислородные радикалы и ограничивает процессы ПОЛ в мембранах клеток [Перфилова В. Н. и др., 2010].

ГАМК присутствует в высоких концентрациях в разных областях мозга, в меньшем количестве в периферических органах. В организме ГАМК образуется при декарбоксилировании глутаминовой кислоты под действием фермента

глутамат декарбоксилазы (GAD) [Ngo D.H. et al., 2019]. Выделяют 2 типа глутамат декарбоксилаз: *GAD65*, локализирующийся в везикулах и *GAD67*, который находится в цитоплазме. В нервной системе вновь синтезированные молекулы ГАМК с помощью везикулярных переносчиков (*vGAT*) собираются в везикулы. Деполяризация мембраны способствует высвобождению ГАМК в синаптическую щель, где она может связываться либо с инотропными ГАМК-А рецепторами (ГАМК-AR), либо с метаботропными ГАМК-В рецепторами (ГАМК-BR) на постсинаптической мембране, способствуя торможению постсинаптического нейрона. Из синапса молекулы ГАМК с помощью ГАМК-транспортеров переносятся в нейроны и астроциты, где они либо собираются в синаптические везикулы, либо метаболизируются ГАМК – трансаминазой (ГАМК-Т) в митохондриях до глутамата для нейронального поглощения.

На внутренней мембране митохондрий расположены специальные белки-переносчики (*Aralar*), которые транспортируют ГАМК из цитоплазмы в митохондрии и принимают участие в передаче электронов между митохондриями и цитоплазмой, усиливая окислительное фосфорилирование. В работах Канеллопулоса было установлено, что повышение активности митохондрий в ГАМК–ергических нейронах может приводить к перераспределению ГАМК в синаптической щели за счет увеличения захвата их переносчиками — *Aralar* митохондрий. Ингибирование активности *Aralar* приводило к улучшению состояния при некоторых неврологических заболеваниях [Kanellopoulos A. K. et al., 2020].

Таким образом, как недостаток, так и избыток ГАМК может способствовать развитию патологических состояний. Вероятно, увеличение концентрации ГАМК способствует гиперактивации митохондрий, в частности усиливается образование АФК, что оказывает повреждающее действие на клетки.

Другая важная функция ГАМК заключается в контроле уровня глутаминовой кислоты (возбуждающего нейромедиатора) и снижении чрезмерной активности нервных клеток. Обеспечение физиологического функционирования ГАМК-ергической системы имеет важное значение для регуляции ряда физиологических

и биохимических процессов, включающих нейронное развитие, контроль когнитивных (памяти, обучаемости и др.) и двигательных функций (Рис.2) [Jacobson L. H. et al., 2007; Stagg C. J. et al., 2011]. Она способна снижать возбудимость центральной нервной системы, оказывать успокаивающее действие, подавлять чувство тревоги и страха.

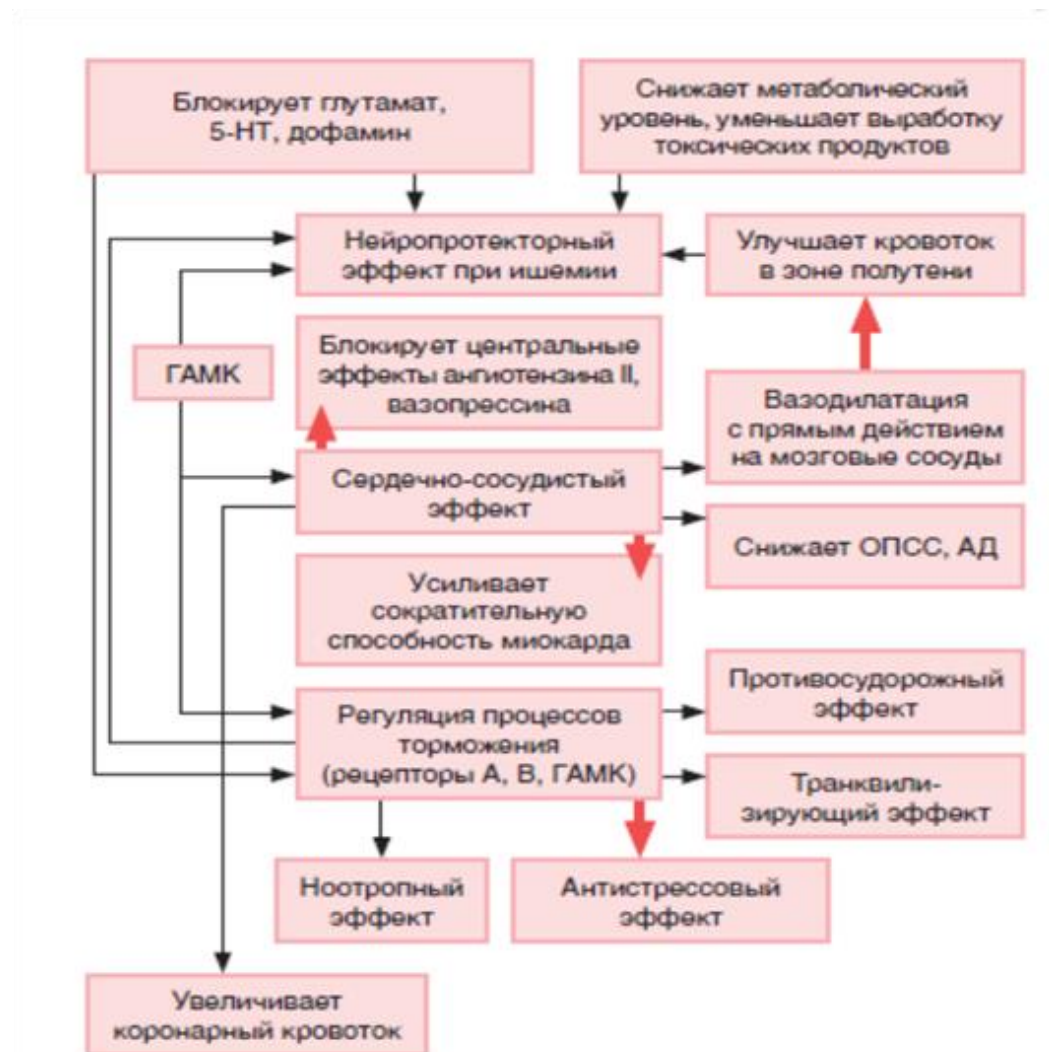


Рисунок 2. Роль ГАМК в функционировании нервной и сердечно-сосудистой систем.

Глутаминовая кислота (ГК) и ее производные обладают кардио– и мембранопротекторной активностью, оказывают антиагрегантное и антикоагулянтное действие при воздействии стрессорных факторов [Садикова Н.В., 2014], что может быть обусловлено наличием тесной связи между ГАМК-ергической системой и глутаминовой кислотой (Рис.3) [Li Y. et al., 2016].

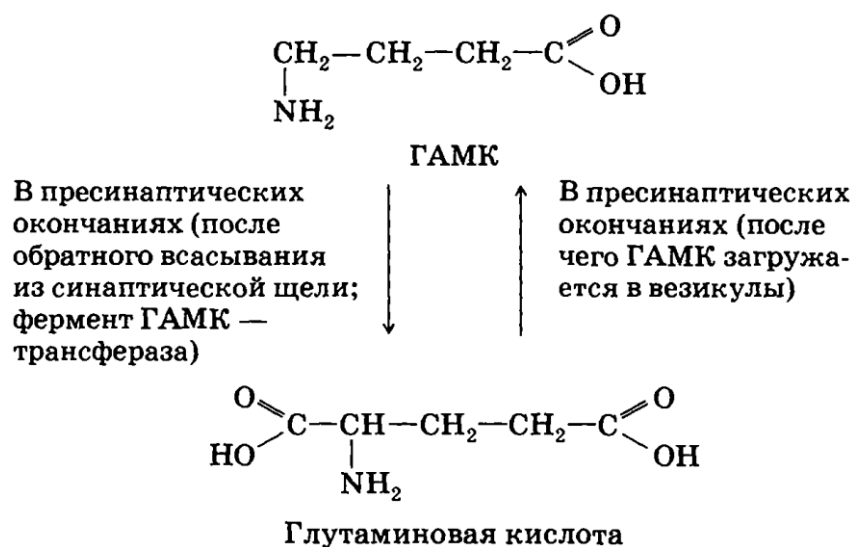


Рисунок 3. Взаимные превращения ГАМК и ГК.

ГК является одним из важнейших возбуждающих нейротрансмиттеров биохимических процессов в ЦНС. В экстремальных для организма условиях (длительный недостаток кислорода, стресс, физическая перегрузка и др.), сопровождающихся дефицитом энергии, в ЦНС запускается ряд биохимических реакций, в ходе которых большое количество ГК превращается в ГАМК. Последовательность этих биохимических реакций называется аминобутиратным шунтом или циклом Робертса.

ГК накапливается в везикулах синапсов глутаматергических нейронов, воздействие нервного импульса приводит к ее высвобождению в пресинаптическую щель и активации специфических глутаматных рецепторов. Она оказывает возбуждающее действие на ионотропные NMDA (N-метил-D-аспартат), AMPA (α -аминогидроксиметил α -амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксанолпропионат) и каинатные рецепторы, которые включают ионные каналы, проницаемые только для катионов, и модулирующее – на метаботропные рецепторы, сопряженные с G – белками (mGluR) [Meldrum B. S., 2000], основной функцией которых является регуляция внутриклеточной активности энергетического и пластического обменов и реализация когнитивных функций – обучения и памяти [McEntee W. J., Crook T. H., 1993].

В научных работах, проведенных ранее на кафедре фармакологии и биофармации ФУВ было выявлено кардио– и церебропротекторное действие производных ГАМК и 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].

Корректирующее действие производных ГАМК и ГК на митохондрии может быть обусловлено непосредственным влиянием на активность СДГ, первого акцептора электронов II комплекса (шунт Робертса).

Вышеперечисленные свойства ГАМК и ГК позволяют рассматривать их производных в качестве потенциальных лекарственных препаратов, способных ограничивать повреждение митохондрий и предотвращать развитие многих патологий. Для подробного изучения были выбраны 6 производных ГАМК: фенибут, мефебут, толибут, баклофен, фенотропил, салифен и 2 производных ГК-нейроглютам и соединение РГПУ-238. В ранее проведенных исследованиях показан широкий спектр фармакологической активности названных производных ГАМК и ГК.

Фенибут (4-амино-3-фенил-бутановая кислота) – агонист А- и В-рецепторов ГАМК в головном, спинном мозге и вегетативной нервной системе содержит дополнительную фенильную группу, которая усиливает диффузию через гематоэнцефалический барьер [Samokhvalov A. V. et al.,2013; Zheng K. H., 2019]. Он облегчает ГАМК-опосредованную передачу нервных импульсов, ускоряет метаболизм тканей, влияет на мозговое кровообращение, путем увеличения скорости мозгового кровотока и уменьшения тонуса сосудов мозга [Lapin I., 2001; Багметова В. В. и др., 2011; Kupats E. et al., 2020]. В клинических рекомендациях, одобренных Минздравом, фенибут широко применяется в медицинской практике как препарат, обладающий ноотропным, нейропротекторным, анксиолитическим и седативным действием [Малинина Е. В. и др., 2015; Хомазюк Т. А. и др., 2019].

Мефебут, представляющий собой метиловый эфир 4-амино-3-фенил-бутановой кислоты, обладает ноотропной, противосудорожной, противоишемической и нейропротекторной активностью [Воронков А.В. и др.,2004; Багметова В.В. и др., 2011]

У β -толил-гамма-аминомасляной кислоты (толибут) было выявлено анальгетическое, нейропротекторное, миорелаксирующее и транквилизирующее действие [Morozov I.S. et al., 1977; Tyurenkov I.N. et al., 2016].

Баклофен (β -(Аминометил) – 4-хлорбензолпропановая кислота) применяется в медицине как миорелаксант центрального действия. Он снижает повышенный тонус скелетных мышц, обусловленный повреждением спинного мозга, обладает анальгетическим, противосудорожным, седативным и анксиолитическим действием [Тюренков И. Н. и др., 2012]. Баклофен активирует пресинаптические ГАМК-Б рецепторы нейронов, уменьшает высвобождение возбуждающих нейротрансмиттеров (глутамата и аспартата) на уровне спинного мозга и головного мозга, не угнетая при этом нервно-мышечную передачу [Неретина А. Ф., 2009; Балакирева Е. А. и др., 2017]. В клинической практике баклофен широко используется для устранения мышечной спастичности при рассеянном склерозе и аффективных расстройствах при алкогольной интоксикации.

Фенотропил способствует улучшению обменных процессов и кровообращения головного мозга, улучшению регионарного кровотока в ишемизированных участках головного мозга, стимулированию окислительно-восстановительных реакций, повышению энергетического потенциала организма за счет утилизации глюкозы [Мокина Т. В. и др., 2010]. Оказывает ноотропное, анксиолитическое, анальгетическое, антиамнестическое действие, улучшает концентрацию внимания и повышает умственную активность, повышает устойчивость тканей мозга к гипоксии и токсическим воздействиям [Звонарева Е. В., 2006; Селянина Н. В. и др., 2008; Сережникова Т. К. и др., 2010]. В медицинской практике применяется для повышения устойчивости к стрессу, нарушениях обменных процессов в головном мозге, уменьшения симптомов астении при алкогольной интоксикации.

Композиция фенибута с салициловой кислотой, известная под названием «Салифен», обладает антигипоксическим, антистрессорным, антиоксидантным, антиагрегантным, нейро- и эндотелиопротекторным свойствами [Larin I. 2001; Иванова Л. Б и др., 2012; Отеллин В. А. и др., 2015].

Производное ГК – нейроглютам (гидрохлорид бета-фенилглутаминовой кислоты), обладает антидепрессантной, нейропротекторной, анксиолитической и иммуностимулирующей активностью [Багметова В. В. и др., 2013; Тюренков И. Н. и др., 2014]. Высокая физиологическая активность нейроглутама в экспериментах обусловлена тем, что он является производным естественных метаболитов нервной системы [Смирнов А. В. и др., 2019].

Согласно данным исследований, проведенных в Волгоградском государственном медицинском университете, у другого производного ГК - соединения РГПУ- 238 установлена противоишемическая и нейропротекторная активность [Перфилова В. Н. и др., 2015].

Нарушение функции митохондрий, вызванные окислительным стрессом, являются важнейшими этапами повреждения клеток и лежат в основе развития многих неврологических, эндокринных, сердечно — сосудистых и многих других заболеваний. Фармакологическая терапия, направленная на устранение митохондриальной дисфункции и восстановление нарушенного клеточного гомеостаза, может предотвратить развитие и ускорить процесс восстановления многих патологических состояний. Учитывая вышеперечисленные свойства ГАМК и ГК, их можно рассматривать как потенциальный путь профилактики и лечения различных заболеваний.

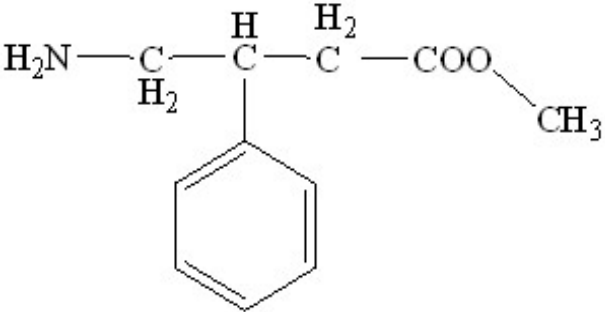
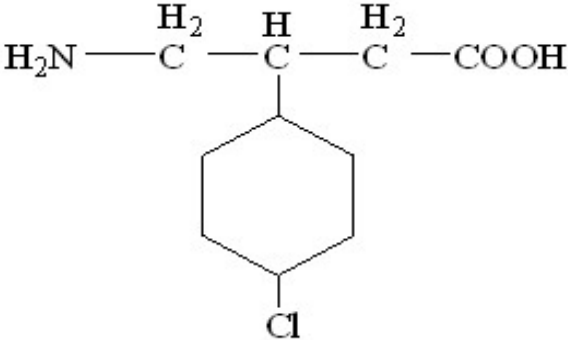
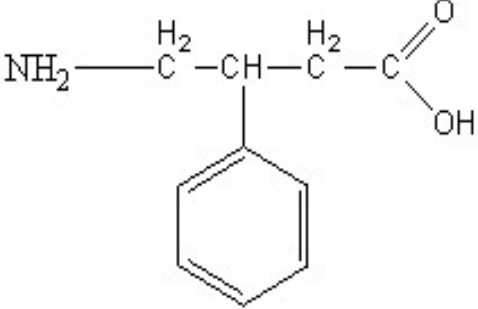
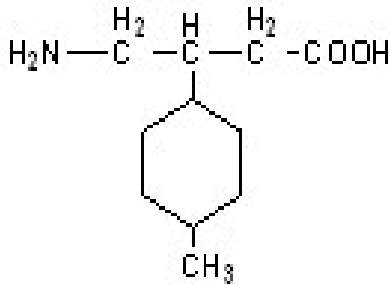
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

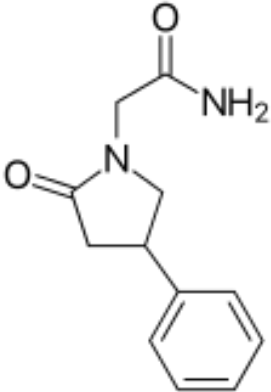
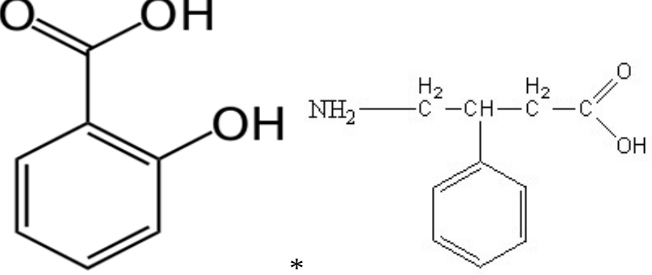
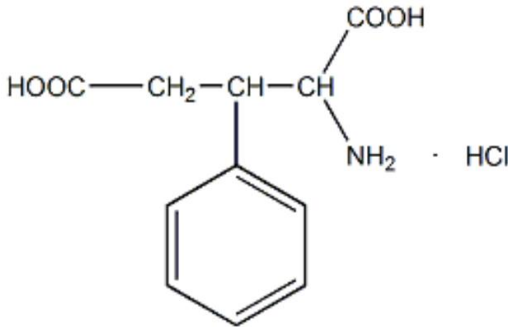
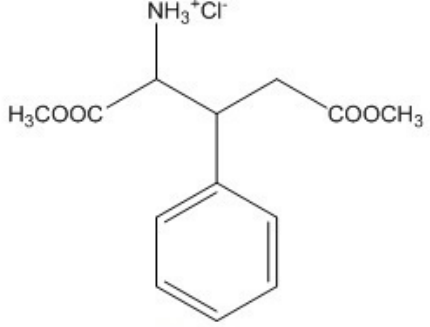
Исследование выполнено на крысах линии *Wistar*, полученных из ФГУП «Питомник лабораторных животных «Рапполово» (Ленинградская область). Животные содержались в условиях вивария с соблюдением всех правил лабораторных исследований при проведении доклинических испытаний в РФ (ГОСТ 33216 – 2014), а также 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) и доказательной медицины, а также 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.

Исследовали 6 производных ГАМК (фенибут, фенотропил, толибут, баклофен, салифен, мефебут) и 2 производных глутаминовой кислоты (нейроглютам, РГПУ – 238), синтезированных на кафедре органической химии ФГБОУ ВО «Российский государственный педагогический университет им. А.И. Герцена» (г. Санкт-Петербург) (Таб. 1).

Выбор данных соединений основан на исследованиях, проведенных ранее на кафедре фармакологии и биофармации ФУВ ВолгГМУ, согласно которым указанные препараты оказывали нейро- и кардиопротекторное действие в условиях алкогольной интоксикации и стрессорного воздействия [Бородкина Л. Е. и др. 2007; Перфилова В. Н. и др. 2007; Перфилова В. Н. и др. 2008].

Таблица 1. Структурные формулы изучаемых производных ГАМК и ГК

Мефебут (метиловый эфир фенибута)	 <chem>COC(=O)CC(N)c1ccccc1</chem>
Баклофен (4-амино-3-парахлорфенил) Номер регистрационного удостоверения: ЛП-006494	 <chem>NC(=O)CC(N)c1ccc(Cl)cc1</chem>
Фенибут (аминофенилмасляная кислота) Номер регистрационного удостоверения: П N010924	 <chem>OC(=O)CC(N)c1ccccc1</chem>
Толибут (4-амино-3-метилфенил-бутановая кислота)	 <chem>CC1=CC=C(N)C=C1CC(N)C(=O)O</chem>

Фенотропил (N-карбамоилметил-4-фенил-2-пирролидон) Номер регистрационного удостоверения: Р N002784/01	
Салифен (композиция фенибута с салициловой кислоты)	
Нейроглютамин (гидрохлорид бета-фенилглутаминовой кислоты)	
Соединение ГРПУ-238 (гидрохлорид диметил-3-фенилглутаминовой кислоты)	

2.1. Изучение влияния производных ГАМК и ГК *in vitro* на функциональное состояние митохондрий, подвергавшихся окислительному повреждению ГПТБ

Эксперименты проведены на 16 крысах линии *Wistar* массой 250 – 300 г. Митохондрии из печени крыс выделяли методом дифференциального центрифугирования. В опытных группах повреждение митохондрий моделировали путем инкубирования митохондриальной фракции с сильным окислителем - трет-Бутилгидропероксидом (ГПТБ) («Chuangyu Chem», Китай) в дозе 200 нмоль в течение 10 минут. Далее добавляли исследуемые вещества в концентрации 1×10^{-5} М на 100 мкл митохондриальной фракции и инкубировали 10 минут. В качестве препарата сравнения был выбран кверцетин («Химреактив», Россия). Кверцетин представляет собой вещество растительного происхождения - флавоноид с химической формулой $C_{15}H_{10}O_7$. Кверцетин способен подавлять перекисное окисление липидов, стимулировать митохондриальный биогенез, регулировать проницаемость пор и повышать дыхательную активность митохондрий [Коваленя Т. А. и др. 2020]. В литературных источниках приводятся данные экспериментальных исследований, согласно которым кверцетин в условиях *in vitro* и *in vivo* оказывал нейропротекторное действие при моделировании нейродегенеративных расстройств [Li Y. et al. 2016; Alvarez-Arellano L. 2020].

Для изучения действия исследуемых веществ *in vitro* на функциональную активность поврежденных митохондрий, суспензию митохондрий, выделенную из печени одного животного, делили на следующие группы:

Поврежденные (n=8, где n – количество животных):

- 1 – интактная – митохондрии, инкубированные с 0,9% физ. р-ром в течение 10 минут
- 2 – контрольная – митохондрии, инкубированные в течение 10 минут с ГПТБ в концентрации 200 нмоль
- 3 – ГПТБ+баклофен – митохондрии, инкубированные с ГПТБ с последующим добавлением баклофена

- 4 – ГПТБ+мефебут – митохондрии, инкубированные с ГПТБ с последующим добавлением мефебута
- 5 – ГПТБ+нейроглютам – митохондрии, инкубированные с ГПТБ с последующим добавлением нейроглутама
- 6 – ГПТБ+соединение РГПУ-238 – митохондрии, инкубированные с ГПТБ с последующим добавлением соединения РГПУ-238
- 7 – ГПТБ+салифен – митохондрии, инкубированные с ГПТБ с последующим добавлением салифена
- 8 – ГПТБ+толибут – митохондрии, инкубированные с ГПТБ с последующим добавлением толибута
- 9 – ГПТБ+фенибут – митохондрии, инкубированные с ГПТБ с последующим добавлением фенибута
- 10 – ГПТБ+фенотропил – митохондрии, инкубированные с ГПТБ с последующим добавлением фенотропила
- 11 - ГПТБ+кверцетин – митохондрии, инкубированные с ГПТБ с последующим добавлением кверцетина

Для изучения влияния исследуемых веществ на интактные митохондрии, суспензию митохондрий, выделенную из печени одного животного, делили на следующие группы:

Интактные (n=8, где n – количество животных):

- 1 – Интактная – митохондрии, инкубированные с 0,9% физ. р – ром в течение 10 минут
- 2 – баклофен – митохондрии, инкубированные в течение 10 минут с баклофеном
- 3 – мефебут – митохондрии, инкубированные в течение 10 минут с мефебутом
- 4 – нейроглютам – митохондрии, инкубированные в течение 10 минут с нейроглутамом
- 5 – соединение РГПУ-238 – митохондрии, инкубированные в течение 10 минут с соединением РГПУ-238

- 6 – салифен – митохондрии, инкубированные в течение 10 минут с салифеном
- 7 – толибут – митохондрии, инкубированные в течение 10 минут с толибутом
- 8 – фенибут – митохондрии, инкубированные в течение 10 минут с фенибутом
- 9 – фенотропил – митохондрии, инкубированные в течение 10 минут с фенотропилом
- 10 - кверцетин – митохондрии, инкубированные в течение 10 минут с кверцетином

2.2. Влияние различных концентраций салифена и фенотропила на функциональную активность intactных и поврежденных ГПТБ митохондрий *in vitro*

Изучено влияние различных концентраций салифена и фенотропила на поврежденные и intactные митохондрии печени для выявления наиболее активной минимальной концентрации и зависимости функциональной активности митохондрий от дозы исследуемых веществ. Митохондриальная фракция, выделенная из печени одного животного, была разделена на следующие группы:

Intactная (n=8, где n – количество животных):

- 1 – intactная – митохондрии, инкубированные в течение 10 минут с 0,9% физ. раствором;
- 2 – фенотропил 1×10^{-5} – митохондрии, инкубированные в течение 10 минут с фенотропилом в концентрации 1×10^{-5} ;
- 3 – фенотропил 1×10^{-6} – митохондрии, инкубированные в течение 10 минут с фенотропилом в концентрации 1×10^{-6} ;
- 4 – фенотропил 5×10^{-7} – митохондрии, инкубированные в течение 10 минут с фенотропилом в концентрации 5×10^{-7} ;
- 5 – салифен 1×10^{-5} – митохондрии, инкубированные в течение 10 минут с салифеном в концентрации 1×10^{-5} ;
- 6 – салифен 1×10^{-6} – митохондрии, инкубированные в течение 10 минут с салифеном в концентрации 1×10^{-6} ;

- 7 – салифен в концентрации 5×10^{-7} – Митохондрии, инкубированные в течение 10 минут с салифеном в концентрации 5×10^{-7} .

Поврежденные ГПТБ (n=8, где n – количество животных):

- 1 – интактная – митохондрии, инкубированные в течение 10 минут с 0,9% физ. раствором.
- 2 – ГПТБ+фенотропил 1×10^{-5} – митохондрии, поврежденные ГПТБ (200 нмоль) и инкубированные в течение 10 минут с фенотропилом в концентрации 1×10^{-5}
- 3 – ГПТБ+фенотропил 1×10^{-6} – митохондрии, поврежденные ГПТБ (200 нмоль) и инкубированные в течение 10 минут с фенотропилом в концентрации 1×10^{-6}
- 4 – ГПТБ+фенотропил 5×10^{-7} – митохондрии, поврежденные ГПТБ (200 нмоль) и инкубированные в течение 10 минут с фенотропилом в концентрации 5×10^{-7}
- 5 – ГПТБ+салифен 1×10^{-5} – митохондрии, поврежденные ГПТБ (200 нмоль) и инкубированные в течение 10 минут с салифеном в концентрации 1×10^{-5}
- 6 – ГПТБ+салифен 1×10^{-6} – митохондрии, поврежденные ГПТБ (200 нмоль) и инкубированные в течение 10 минут с салифеном в концентрации 1×10^{-6}
- 7 – ГПТБ+салифен 5×10^{-7} – митохондрии, поврежденные ГПТБ (200 нмоль) и инкубированные в течение 10 минут с салифеном в концентрации 5×10^{-7}

2.3. Оценка влияния фенотропила и салифена *in vitro* на функциональное состояние митохондрий мозга и сердца крыс, подвергавшихся окислительному стрессу

Для изучения влияния производных ГАМК – фенотропила, салифена и препарата сравнения – гидрохлорид γ -амино- β -фенилмасляной кислоты (фенибут) на функциональную активность митохондрий сердца и мозга, животным за 24 часа до декапитации внутрибрюшинно вводили исследуемые препараты. Согласно данным зарубежных и российских исследователей, фенибут – оказывает нейро- и кардиопротекторное действие, обладает антиоксидантным эффектом,

предупреждает нарушения окислительного фосфорилирования в митохондриях и развитие гипознергетического состояния в условиях стрессорного повреждения [Перфилова В. Н. и др., 2005. Kupats E. et al., 2020]. Исходя из выше перечисленных свойств, он был выбран в качестве препарата сравнения. Повреждение митохондрий моделировали *ex vivo*. Митохондрии, выделенные из мозга и сердца крыс, повреждали ГПТБ в дозе 200 нмоль на 100 мкл суспензии митохондрий в течение 10 минут. Были сформулированы следующие группы:

- 1 – интактная–митохондрии, инкубированные с 0,9% физ. раствором (n=8).
- 2 – ГПТБ–митохондрии, инкубированные с ГПТБ после выделения из сердца и мозга животных, которым был введен 0,9% р-р NaCl раствором (n=8).
- 3 – ГПТБ+фенотропил–митохондрии, инкубированные с ГПТБ после выделения из сердца и мозга животных, которым был введен фенотропил в дозе 25 мг/кг раствором (n=8).
- 4 – ГПТБ+салифен–митохондрии, инкубированные с ГПТБ после выделения из сердца и мозга животных, которым был введен салифен в дозе 15 мг/кг раствором (n=8).
- 5 – ГПТБ+фенибут–митохондрии, инкубированные с ГПТБ после выделения из сердца и мозга животных, которым был введен фенибут в дозе 25 мг/кг раствором (n=8).

Субстанции фенотропила, салифена и фенибута получены на кафедре органической химии Российского государственного педагогического университета им. А.И. Герцена (Санкт-Петербург, Россия).

Выбор эффективных доз был основан на литературных данных, согласно которым исследуемые вещества оказывали наиболее выраженное кардио– и нейропротекторное действие [Тюренков И. Н. и др., 2016].

2.4. Оценка влияния салифена и фенотропила *in vitro* на функциональное состояние изолированных митохондрий мозга и сердца крыс, подверженных острому иммобилизационно-болевого стрессу

Острое стрессорное воздействие моделировали подвешиванием крыс за дорсальную шейную кожную складку на 24 часа с помощью зажима Кохера, после чего наркотизировали хлоралгидратом в дозе 400 мг/кг, производили забор сердца и мозга у стрессированных ($n=10$, где n – количество крыс) и интактных ($n=10$ где n – количество крыс) животных. Митохондрии выделяли методом дифференциального центрифугирования. Изучение влияния производных ГАМК на функциональное состояние митохондрий интактных и стрессированных животных проводили путем их инкубирования с исследуемыми веществами в концентрации 10^{-5} в течение 10 минут. Были сформированы следующие группы:

- 1 – интактная– митохондрии сердца и мозга животных, инкубированные с 0,9% раствор NaCl в течение 10 минут.

Митохондрии, полученные от крыс, подвергавшихся 24-х часовому острому иммобилизационно-болевого стрессу были разделены на группы:

- 2 – стресс+физ. р-р – митохондрии, выделенные из сердца и мозга животных и инкубированные в течение 10 минут с 0,9% р-р NaCl.
- 3 - стресс+салифен – митохондрии, выделенные из сердца и мозга животных и инкубированные с салифеном.
- 4 - стресс+фенотропил – митохондрии, выделенные из сердца и мозга животных и инкубированные с фенотропилом.
- 5 - стресс+фенибут – митохондрии, выделенные из сердца и мозга животных и инкубированные с фенибутом.

2.5. Оценка влияния салифена и фенотропила *ex vivo* на функциональное состояние митохондрий мозга крыс, подверженных острому иммобилизационно-болевому стрессу

Исследование проведено на крысах линии *Wistar*, массой 250-300 г. За 1 час до моделирования острого иммобилизационно-болевого 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).
- 2 – стресс+физ. р-р– митохондрии, выделенные из сердца и мозга животных, которым вводили 0,9% р-р NaCl и подвергали острому иммобилизационно-болевому стрессу (n=8).
- 3 – стресс+салифен– митохондрии, выделенные из сердца и мозга животных, которым вводили салифен в дозе 15 мг/кг и подвергали 24 – часовому острому иммобилизационно-болевому стрессу (n=7).
- 4 – стресс+фенотропил–митохондрии, выделенные из сердца и мозга животных, которым вводили фенотропил в дозе 25 мг/кг и подвергали 24 – часовому острому иммобилизационно-болевому стрессу (n=7).
- 5 – стресс+фенибут–митохондрии, выделенные из сердца и мозга животных, которым вводили фенилу в дозе 25 мг/кг и подвергали 24 – часовому острому иммобилизационно – болевому стрессу (n=7).

2.6. Изучение влияния салифена и фенотропила *ex vivo* на функциональное состояние митохондрий мозга и сердца крыс, подверженных острой алкогольной интоксикации

Эксперименты проведены на белых крысах – самках линии *Wistar*, массой 280-320 г. Перед моделированием острой алкогольной интоксикации (ОАИ) животные были подвергнуты 6 – часовой пищевой депривации. Моделирование ОАИ осуществляли путем перорального введения 32% раствора этанола из расчета 4 г/кг веса [Jeon E. J., 2020]. Интактные животные получали эквивалентное

количество дистиллированной воды. Спустя 10 часов после моделирования ОАИ, крысам внутрибрюшинно вводили исследуемые вещества: фенотропил, салифен и препарат сравнения – мельдоний (лекарственный препарат – милдронат, «Гриндекс АО», Латвия).

Милдронат является метаболическим средством. Известно, что он эффективен при ишемии сердца и ее последствиях, восстанавливает нарушенное мозговое кровообращение, обеспечивает равновесие между процессами образования и потребления O_2 , предотвращает накопление цитотоксических промежуточных продуктов β – окисления жирных кислот в ишемических тканях, предотвращает процессы перекисного окисления липидов, ограничивает образование АФК в митохондриях. Милдронат замедляет образование некротической зоны в миокарде в условиях гипоксии [Сытый В. П., 2007; Кочуева М. Н. и др., 2014]. В клинической практике широко используется для лечения абстинентного синдрома при хронической алкогольной интоксикации (в комплексе со специфической терапией алкоголизма). На основании вышеперечисленных свойств, милдронат был выбран в качестве препарата сравнения. Выбор дозы милдроната основан данных экспериментальных исследований, в которых указанная концентрация оказывала наиболее выраженное положительное действие при алкогольной интоксикации [Сутулов Ю. Л. и др., 1994; Кустова М. В., Перфилова В. Н., 2021].

Были сформированы следующие группы:

1- интактная – митохондрии сердца и мозга животных, получавших физ. р-р в количестве 1мл/кг ($n=7$, где n – количество животных).

2 - ОАИ+физ.р-р – митохондрии сердца и мозга животных, получавших после ОАИ физ. р-р 1 мл/кг ($n=7$).

3 - ОАИ+салифен – митохондрии сердца и мозга животных, получавших после ОАИ салифен в дозе 15 мг/кг ($n=7$).

4 - инкубирование – митохондрии сердца и мозга животных, получавших после ОАИ фенотропил в дозе 25 мг/кг ($n=7$).

5 - ОАИ+милдронат – митохондрии сердца и мозга животных, получавших после ОАИ милдронат в дозе 50 мг/кг (n=7).

Исследуемые соединения растворяли в 0,9 % физ. р-ре. Милдронат использовали в виде раствора для инъекций.

2.7. Изучение влияния салифена и фенотропила *ex vivo* на функциональное состояние митохондрий мозга и сердца крыс, подверженных хронической алкогольной интоксикации

Эксперименты проведены на самцах и самках крыс линии *Wistar*, массой 280-320 г, в возрасте 10 месяцев. 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 алкоголя в течение 14 дней животным внутрибрюшинно вводили 0,9% р-р NaCl и исследуемые вещества – салифен, фенотропил и препарат сравнения – милдронат.

Для приготовления 10% по объему раствора этилового спирта использовали 95% раствор для наружного применения и приготовления лекарственных форм (ЗАО «РФК», Россия). Разведение спирта для получения 1000 мл раствора нужной концентрации произведено по формуле: $X = V * b/a$, где

X – объем крепкого спирта (мл);

V – объем спирта желаемой крепости (мл);

b – концентрация спирта желаемой крепости, %(v);

a – концентрация крепкого спирта, %(v);

Для приготовления 1000 мл 10% этилового спирта из 95% потребуется $X = 1000 * 10 / 95$, X=105,3 мл. Необходимые объемы спирта (105,3 мл) добавляли к 894,7 мл воды.

Были сформированы следующие группы животных:

- 1 – интактная – митохондрии мозга и сердца животных, не подверженных моделированию хронической алкогольной интоксикации (n=9).

- 2 – ХАИ+физ. – митохондрии мозга и сердца животных, получавших внутрибрюшинно физ. раствор в дозе 1 мл/кг (n=10).
- 3 – ХАИ+салифен – митохондрии мозга и сердца животных, получавших внутрибрюшинно салифен в дозе 15 мг/кг (n=7).
- 4 – ХАИ+фенотропил – митохондрии мозга и сердца животных, получавших внутрибрюшинно фенотропил в дозе 25 мг/кг (n=7).
- 5 – ХАИ+милдронат - митохондрии мозга и сердца животных, получавших внутрибрюшинно милдронат в дозе 50 мг/кг (n=7).

* n – количество животных

На следующий день после окончания лечения животных наркотизировали хлоралгидратом в дозе 400 мг/кг, производили забор сердца и мозга.

2.8. Выделение митохондрий

Все этапы выделения митохондрий проводили на холоду (камера холодильная «КХС-2») при температуре +4°C. Животных наркотизировали путем внутрибрюшинного введения раствора хлоралгидрата в концентрации 400 мг/кг, извлекали печень, сердце, мозг, промывали ледяным физиологическим раствором, измельчали ножницами и гомогенизировали на льду в стеклянном гомогенизаторе Поттера-Эльвейема с добавлением среды выделения в соотношении 1:5. Среда выделения митохондрий содержала: 220мМ (40,08 г.) маннита («Вектон», Россия); 100 мМ (34, 23 г.) сахарозы («Sigma-Aldrich», Швейцария); 1мМ (0,292 г.) EGTA («Sigma-Aldrich», Швейцария); 4мМ (0,544г.) KH_2PO_4 («Sigma», США); 20 мМ (4,77 г.) HEPES («ДИАЭМ», Германия); 1 г/л свободного от жирных кислот бычьего сывороточного альбумина (БСА) («Sigma-Aldrich», США) на 1 литр дистиллированной воды, pH=7,36.

Полученный гомогенат центрифугировали с охлаждением (центрифуга «К-23», Германия) при 2000 g в течение 10 мин для осаждения клеточного дебриса и неразрушенных клеток. Отбирали надосадочную жидкость, которую центрифугировали 20 минут с охлаждением при 8000 g. Полученный супернатант сливали, осадок ресуспендировали в 1 мл среды выделения, переносили в

микроцентрифужные пробирки и использовали в качестве митохондриальной фракции. Суспензию митохондрий хранили на холоде до окончания работы [Lanza I.R. et al., 2009].

2.9. Определение концентрации белка

К 0,5 мл определяемого раствора белка приливали 0,5 мл реактива Лоури, перемешивали и оставляли на 20 минут. Затем добавляли 0,25 мл реактива Фолина. Раствор тщательно перемешивали и оставляли на 30 минут в темноте. В качестве раствора сравнения вместо образца использовали аналогичное количество среды выделения. Оптическую плотность определяли при λ 750 нм.

Измерения проводили в 3 аналитических повторностях.

Приготовление реактивов

Реактив А – 2% раствор Na_2CO_3 (АО «ЛенРеактив», Россия) в 0,1Н растворе NaOH

Реактив В – 0,5% раствор $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (АО «ЛенРеактив», Россия) в 1% растворе $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6\text{Na} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (АО «ЛенРеактив», Россия) (хранится неопределенно долгое время)

Реактив Лоури - 50 мл реактива А + 1 мл реактива В (реактивы сливаются в день определения).

2.10. Полярография

Определение окислительной и фосфорилирующей активности митохондрий, характеризующей их функциональное состояние, проводили с использованием полярографического метода.

Для полярографического измерения дыхания митохондрий при окислении различных субстратов использовали платиновый электрод закрытого типа (электрод Кларка) и полярограф Oxytherm system («Hansatech Inst», Англия)

Полярографическую ячейку заполняли термостатированной при 33 °С, насыщенной кислородом средой полярографии, содержащей 60 мМ лактобионата калия («Sigma-Aldrich», США); 0,5мМ (0,146г.) ЭДТА («Sigma-Aldrich», Швейцария); 3мМ (0,61г.) $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ («Sigma-Aldrich», Китай); 20 мМ (2,5г.) таурин; 10 мМ (1,361г.) KH_2PO_4 («Sigma», США); 20мМ (4,766г.) HEPES

(«ДИАЭМ», Германия); 110мМ (37,653г.) сахара («Sigma-Aldrich», Швейцария); 1 г/л БСА («Sigma-Aldrich», США) на 1л. раствора, pH= 7.1

Определяли скорость дыхания митохондрий в нескольких субстратных состояниях:

- 1) Базовое дыхание митохондрий (*V1 по Чансу*). В закрытую полярографическую ячейку вносили суспензию митохондрий (100 мкл), в течение 40 с. – 1 мин измеряли базальное дыхание.
 - 2) Дыхание митохондрий в присутствии субстрата (*V2 по Чансу*). С помощью автоматической микропипетки в ячейку вносили субстрат I комплекса (10 мМ малат в присутствии 10 мМ глутамата). Записывали линию во втором субстратном состоянии 40 с. – 1 мин.
 - 3) Стимулированное АДФ дыхание (*V3 I комплекса по Чансу*). В ячейку вносили 2,5мМ АДФ («Sigma-Aldrich», США) для максимального стимулирования дыхания I комплекса и регистрировали в течение 1–1,5 мин.
 - 4) Дыхание митохондрий после исчерпания АДФ (*V4 I комплекса по Чансу*).
 - 5) Дыхание митохондрий в присутствии субстрата (*V3 по Чансу комплекс I+II*). В ячейку вносили субстрат II комплекса сукцинат (10 мМ) и АДФ (2,5мМ), регистрировали стимуляцию дыхания комплексов I и II 40 с. – 1 мин.
- 6) Ингибирование I комплекса (*V2 по Чансу комплекс II*). В ячейку вносили ротенон (ингибитор I комплекса) в концентрации 0,5мкМ/мл регистрировали дыхание II комплекса 1– 1,5 мин.

2.11. Обработка полярограмм

Согласно Чансу митохондрии могут находиться в пяти состояниях (Рис.4):

V1 – дыхание осуществляется только за счет имеющихся в митохондриях эндогенных субстратов и систем окисления и фосфорилирования.

V2 – наступает после дополнительного внесения субстрата.

V3 – возникает после совместного внесения АДФ и субстрата окисления, что сопровождается резким активированием процесса. Лимитировать дыхание может только проницаемость митохондриальных мембран и скорость окисления.

V4 – наступает вследствие истощения всей внесенной АДФ и ее превращения в АТФ.

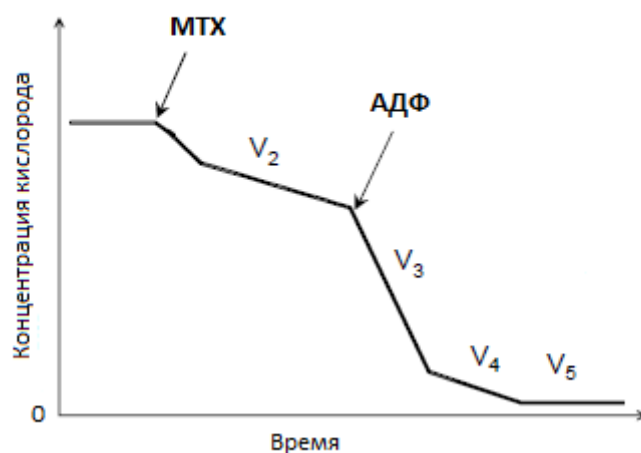


Рисунок 4. Потребление кислорода митохондриями в различных метаболических состояниях по Б. Чансу.

Для оценки функционального состояния митохондрий и сопряжения процессов окисления и фосфорилирования был рассчитан коэффициент дыхательного контроля (отношение V_3/V_4). Стандартизацию проводили по количеству митохондриального белка.

2.12. Интенсивность процессов ПОЛ

Определение интенсивности процессов ПОЛ проводили по концентрации малонового диальдегида (вторичного продукта ПОЛ) и активности антиоксидантных ферментов (каталазы, супероксиддисмутазы (СОД), глутатионпероксидазы (ГлП)) в полученных митохондриальных фракциях из гомогенатов исследуемых органов.

2.13. Определение концентрации малонового диальдегида

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. К смеси, содержащей 600 мкл 1,3% раствора ортофосфорной кислоты и 40 мкл раствора

сульфата железа (II) добавляли 200 мкл суспензии митохондрий, смесь тщательно перемешивали. Затем в пробирки вносили по 200 мкл 0,7% раствора тиобарбитуровой кислоты и нагревали на кипящей водяной бане в течение 30 минут. После охлаждения под проточной водой полученную смесь центрифугировали в течение 10 минут при 8000 об/мин. Отбирали образовавшийся супернатант и фотометрировали при 532 нм на спектрофотометре Helios (Великобритания). Концентрацию МДА рассчитывали с помощью молярного коэффициента экстинкции ($1,56 \cdot 10^5 \text{ см}^{-1} \text{ M}^{-1}$) и выражали в ммоль/л/мг белка.

2.14. Измерение активности каталазы

Определение активности каталазы проводили по методу Королюка М.А. [Королюк М.А. и др., 1988]. Методика основана на образовании окрашенного комплекса пероксида водорода и соли аммония. К 1,0 мл 0,03% раствора пероксида водорода в Na-P-буфере (pH 6,8) добавляли 250 мкл суспензии митохондрий и 250 мкл дистиллированной воды. После инкубации 20 минут при 37 °C в пробирки вносили по 500 мкл 4,0% раствора молибдата аммония и центрифугировали при 8000 об/мин в течение 20 минут. Определение оптической плотности супернатанта проводили на спектрофотометре Helios (Великобритания) при длине волны 410 нм. Расчёт производили по формуле, вычисленной по калибровочной кривой.

Расчёт производили по формуле [Зайцев В.Г., 2002]:

$$y = 4,7052x^2 + 0,9456x + 0,1876$$

$$\text{Активность} = 13,64 - 1,55y$$

$$x = \Delta E (\text{контр} - \text{опыт})$$

Расчёт активности каталазы проводили на концентрацию белка, для измерения которого использовали набор КлиниТест-ОБ («Эко-сервис», Россия).

Активность каталазы выражали в мг H_2O_2 / 1 мин / мг белка.

2.15. Определение суммарной активности супероксиддисмутазы

Суммарную активность супероксиддисмутазы определяли по степени торможения реакции окисления кверцетина [Костюк В.А. и др., 1990]. К 3,4 мл фосфатного буфера (pH 7,8), содержащему 0,08 mM этилендиаминтетраацетата и

0,8 mM тетраметилэтилендиамина, добавляли 100 мкл раствора кверцетина в диметилсульфоксиде (ДМСО) (0,2 мг/мл) и 150 мкл суспензии митохондрий. Измеряли исходную оптическую плотность проб и спустя 20 минут при $\lambda = 406$ нм. Расчет процента торможения производили по формуле:

$$I = 100 - ((A_{\text{оп}}0' - A_{\text{оп}}20') / (A_{\text{контр}}0' - A_{\text{контр}}20')) \times 100,$$

где I – процент ингибирования; $A_{\text{оп}}0'$ и $A_{\text{оп}}20'$ - исходная оптическая плотность опытной пробы и спустя 20 минут инкубации соответственно; $A_{\text{контр}}0'$ и $A_{\text{контр}}20'$ – исходная оптическая плотность контрольной пробы и через 20 минут инкубации соответственно.

Активность СОД выражали в условных единицах на 1 мг белка.

2.16. Определение активности глутатионпероксидазы

Изучение активности глутатионпероксидазы проводили по методу Моина В.М. (1986), который основан на изменении концентрации восстановленного глутатиона в реакции с 5,5'-дитио-бис- (2-нитробензойной кислотой) (ДТНБК) (АО «Вектон», Россия). Для этого в две серии пробирок, содержащих по 400 мкл буферного раствора (0,1 Н трис-HCl, pH 8,5, содержащего 4,8 mM восстановленного глутатиона), добавляли по 50 мкл исследуемого объекта, в контрольной пробе осаждали белок добавлением 100 мкл 20% раствора трихлоруксусной кислоты (АО «ЛенРеактив», Россия). Затем в пробирки вносили по 50 мкл свежеприготовленного 10 mM раствора гидроперекиси трет-бутила. После 5 минут инкубации при комнатной температуре в пробирки с опытными пробами добавляли по 100 мкл 20% раствора трихлоруксусной кислоты и центрифугировали в течение 10 минут при 3000 об/мин. Далее отбирали по 50 мкл надосадочной жидкости, в нее вливали по 2,0 мл буферного раствора и по 50 мкл реактива Элмана (10 mM раствора ДТНБК в этаноле). Фотометрирование проводили после 5 минут инкубации при комнатной температуре при длине волны 412 нм на спектрофотометре Helios (Великобритания). Активность фермента определяли по разности концентраций GSH в опытной и контрольной пробах. Активность ГлП выражали в ммоль GSH за 1 мин на 1 мг белка.

2.17. Определение активности сукцинатдегидрогеназы

Метод определения активности сукцинатдегидрогеназы основан на реакции восстановления желтого $K_3[Fe(CN)_6]$ (ООО ОРТ «Химреактивы» Россия) в бесцветный $K_4[Fe(CN)_6]$ сукцинатом под действием сукцинатдегидрогеназы.

Схема реакции:



Параллельно ставили контроль и опыт. В опытные пробы вносили 1 мл фосфатного буфера, 0,1 мл янтарной кислоты (АО «ЛенРеактив», Россия), 0,1 мл ЭДТА (АО «ЛенРеактив», Россия), 0,1 мл азида Na, 0,1 мл дистиллированной воды, 2 мл трихлоруксусной кислоты (ТХУ) и добавляли 0,5 мл суспензий митохондрий для ингибирования цитохромоксидазы азидом натрия (ООО ОРТ «Химреактивы», Россия). Инкубировали 5 минут. Реакцию начинали с добавления к пробам 0,1 мл раствора феррицианида калия при температуре 30 °С, инкубировали 15 минут и добавляли 2 мл трихлоруксусной кислоты для осаждения денатурированного митохондриального белка. В контрольные пробы, содержащие все компоненты инкубационной смеси, трихлоруксусную кислоту добавляли до внесения суспензии митохондрий. В контрольных пробах сукцинатдегидрогеназа с начала инкубации полностью денатурирована и специфического восстановления феррицианида сукцинатом не происходило. Пробы охлаждали и центрифугировали 10 мин при 2 тыс. об/мин.

Надосадочную жидкость фотометрировали на спектрофотометре при 420 нм

В качестве оптического контроля использовали раствор, состоящий из 2 мл ТХУ и 2 мл фосфатного буфера

Измеряли оптическую плотность $K_3[Fe(CN)_6]$

Количество $K_3[Fe(CN)_6]$, восстановленное за время инкубирования рассчитывали по разности $E_k - E_{\text{опыт}}$ – разность экстинций контрольных и опытных проб;

$$A = 100 * \frac{m}{2} * M * a * t$$

m – Количество восстановленного $K_3[Fe(CN)_6]$ в пробе мкг

M – Молекулярная масса $K_3[Fe(CN)_6]$

a – Содержание белка в пробе мг

t – Время инкубации мин.

2.18. Методы статистической обработки

Статистическую обработку данных исследования проводили с помощью пакета прикладных программ STATISTICA v.12.5 («StatSoft Inc.», США). Нормальность распределения проверяли по критерию Шапиро-Уилка, для парных сравнений использовали U-критерий МаннаУитни и t-критерий Стьюдента, а для множественных – критерии Ньюмена-Кейлса, Крускала-Уоллиса с пост-тестом Данна. Критическим уровнем альфа считали 0,05. Результаты представлены в виде $M \pm \sigma$; Me (Q_1 ; Q_3), где M – среднее арифметическое, σ – стандартное отклонение от среднего, Q_1 – нижний квартиль, Q_3 – верхний квартиль.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Нарушение функций митохондрий при алкогольной интоксикации и стрессовом воздействии является одной из наиболее ранних этапов повреждения клеток [Yan M. et al., 2007; El-Mas M. M. et al., 2019]. Митохондриальная дисфункция приводит к изменению энергообеспечения, гомеостаза кальция, дисбалансу между про- и антиоксидантной системами и, как следствие, к гибели клеток [King A. L. et al. 2010; Zhong Z. et al. 2014;]. Согласно данным российских и зарубежных исследований, развитие митохондриальной патологии можно предотвратить фармакологическими препаратами [Перфилова В. Н. и др. 2010; Marin W. et al. 2021].

Известно, что ГАМК, ГК и их ее производные восстанавливают нарушенный окислительно-восстановительный баланс и энергетический статус клеток [Chen C. et al. 2019].

В этой связи *in vitro* среди 6 производных ГАМК (фенибут, салифен, мефебут, толибут, фенотропил, баклофен) и 2 производных ГК (нейроглютам, соединение РГПУ-238) был проведен скрининг веществ, влияющих на функциональную активность интактных и поврежденных митохондрий печени,

3.1.1. Влияние производных ГАМК и ГК *in vitro* на функциональное состояние митохондрий печени крыс, поврежденных ГПТБ

В митохондриях, подверженных воздействию ГПТБ, скорость стимулированного дыхания в присутствии малата/глутамата (субстрата I комплекса) составляла 49,5 нМ O₂ /мин/мг белка и была ниже на 25% (p<0,05) по сравнению с группой интактных митохондрий, у которых исследуемый показатель был равен 65,6 нМ O₂ /мин/мг белка. Исследуемые вещества, добавленные к поврежденным митохондриям, способствовали повышению скорости стимулированного дыхания. Мефебут повышал V₃ I комплекса на 27% (p<0,05), нейроглютам – на 21% (p<0,05), салифен – на 58% (p<0,05), толибут – на 19% (p<0,05), фенибут – на 22% (p<0,05), фенотропил – на 34% (p<0,05), кверцетин – на

9%($p<0,05$) относительно контрольной группы митохондрий. Соединение РГПУ-238 и баклофен не оказывали значимого влияния на данный показатель (Рис.5).

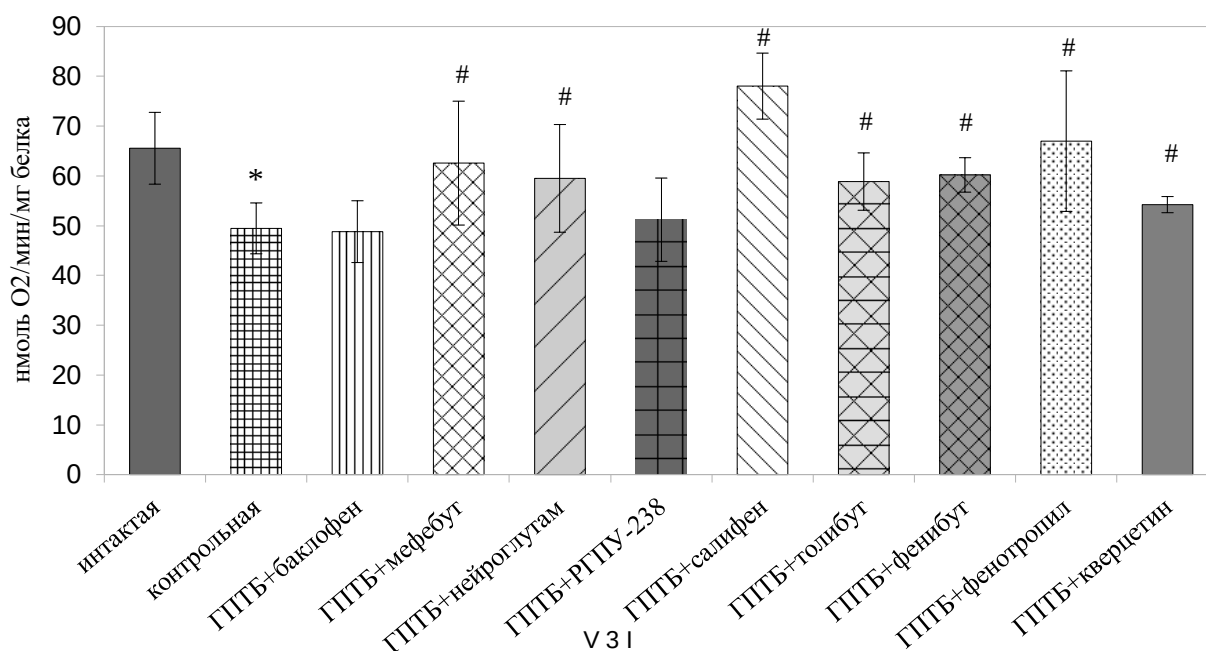


Рисунок 5. Влияние производных ГАМК и глутаминовой кислоты на скорость стимулированного дыхания (V_3 по Чансу) митохондрий клеток печени, инкубированных с ГПТБ при окислении субстратов I комплекса ($M \pm \sigma$).

Примечание:

Изменения статистически значимы относительно показателей:

*-интактной группы митохондрий (t- критерий Стьюдента, $p<0,05$)

#-группы митохондрий, подверженных воздействию ГПТБ (критерий Ньюмена-Кейлса, $p<0,05$).

После исчерпания экзогенного АДФ при окислении субстратов I комплекса, скорость поглощения кислорода контрольной группе была незначительно выше, чем у интактной группы митохондрий. Данный показатель в митохондриях, инкубированных с баклофеном, соединением РГПУ-238, толибутом и фенотропилом был незначительно ниже, чем у контрольной группы. Кверцетин снижал V_4 I комплекса на 22% ($p<0,05$). Мефебут, нейроглютам, салифен и фенибут, добавленные к поврежденным ГПТБ митохондриям, способствовали небольшому повышению скорости дыхания в состоянии V_4 (Рис.6).

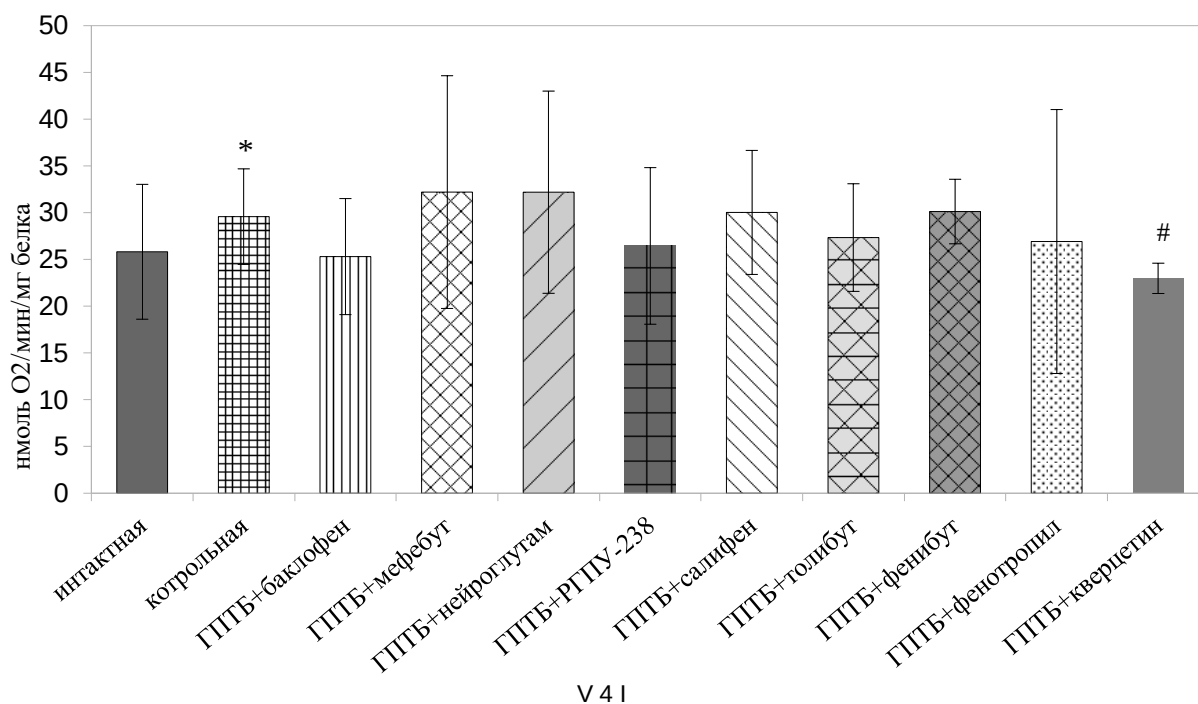


Рисунок 6. Влияние производных ГАМК и глутаминовой кислоты на скорость дыхания митохондрий клеток печени (V3 по Чансу), инкубированных с ГПТБ, после истощения АДФ при окислении субстратов I комплекса ($M \pm \sigma$).

Примечание:

Изменения статистически значимы относительно показателей:

*-интактной группы митохондрий (t- критерий Стьюдента, $p < 0,05$)

#-группы митохондрий, подверженных воздействию ГПТБ (критерий Ньюмена-Кейлса, $p < 0,05$).

Скорость поглощения кислорода в контрольной группе при одновременной активации I и II комплекса дыхательной цепи митохондрий, после добавления АДФ была равна 60,86 нМ O₂ /мин/мг белка, что было на 28% ($p < 0,05$) ниже относительно интактной группы, у которой данный показатель составлял 85,04 нМ O₂ /мин/мг белка (Рис.7). Исследуемые вещества, добавленные к поврежденным ГПТБ митохондриям, способствовали повышению данного показателя. Так, в митохондриях, инкубированных с мефебутом V3 I+II комплекса была выше на 29% ($p < 0,05$), с нейроглютамом – на 26% ($p < 0,05$), с салифеном – на 54% ($p < 0,05$), с толибутом на 22% ($p < 0,05$), с фенибутом – на 21% ($p < 0,05$), а с фенотропилом – на 43% ($p < 0,05$), относительно контрольной группы митохондрий. Соединение РГПУ-238 и баклофен незначительно изменяли исследуемый показатель.

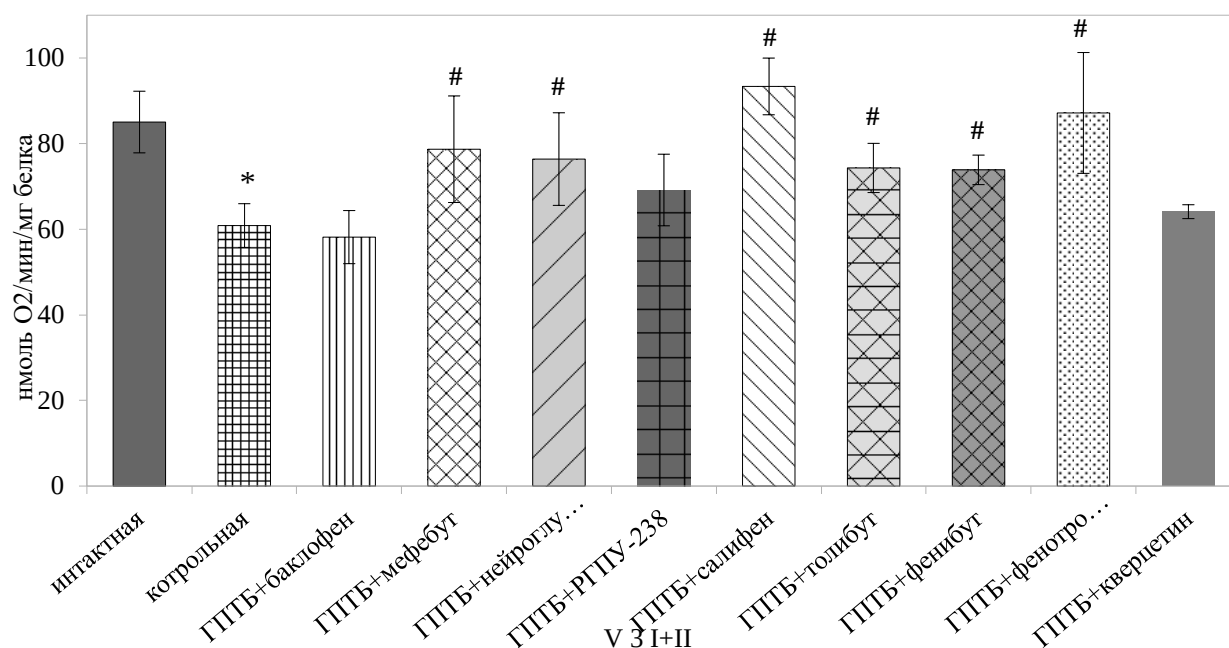


Рисунок 7. Влияние производных ГАМК и глутаминовой кислоты на скорость стимулированного дыхания (V_3 по Чансу) митохондрий клеток печени, инкубированных с ГПТБ, при окислении субстратов I + II комплекса ($M \pm \sigma$).

Примечание:

Изменения статистически значимы относительно показателей:

**-интактной группы митохондрий (t- критерий Стьюдента, $p < 0,05$)*

#-группы митохондрий, подверженных воздействию ГПТБ (критерий Ньюмена-Кейлса, $p < 0,05$).

После истощения АДФ при окислении субстрата I и II комплекса скорость поглощения O_2 в митохондриях, поврежденных ГПТБ, выросла на 35% ($p < 0,05$) по сравнению с митохондриями интактной группы, что свидетельствует об утечке электронов в ЦПЭ. В поврежденных митохондриях, инкубированных с исследуемыми соединениями, скорость дыхания после истощения экзогенного АДФ была ниже, чем у контрольной группы, при этом фенотропил и кверцетин статистически значимо снижали данный показатель на 25% ($p < 0,05$) и 34% ($p < 0,05$) (Рис. 8).

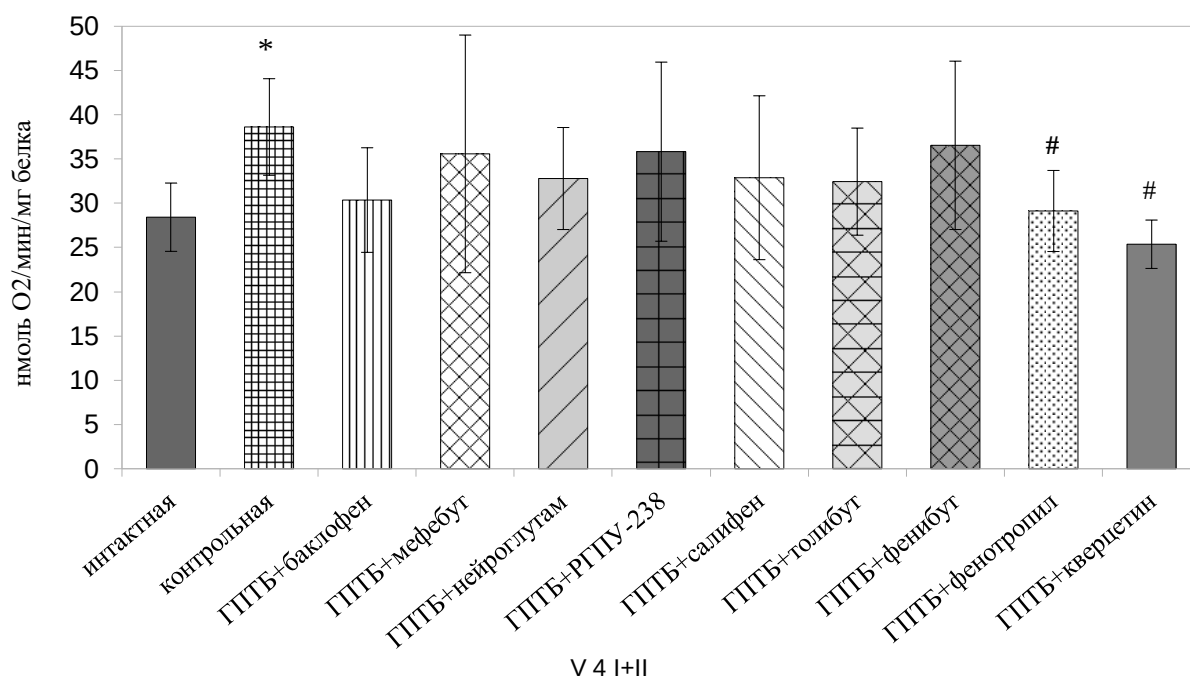


Рисунок 8. Влияние производных ГАМК и глутаминовой кислоты на скорость дыхания (V_4 по Чансу) митохондрий клеток печени, инкубированных с ГПТБ, после истощения АДФ при окислении субстрата I + II комплекса ($M \pm \sigma$).

Примечание:

Изменения статистически значимы относительно показателей:

**-интактной группы митохондрий (t- критерий Стьюдента, $p < 0,05$)*

#-группы митохондрий, подверженных воздействию ГПТБ (критерий Ньюмена-Кейлса, $p < 0,05$).

Добавляя к суспензии митохондрий, содержащей субстраты малат/глутамат и сукцинат, ингибитор I комплекса дыхательной цепи — ротенон, регистрировали скорость поглощения кислорода во II комплексе. Скорость стимулированного дыхания в митохондриях печени, инкубированных с ГПТБ при активации II комплекса дыхательной цепи, составляла 50,18 нМ O₂ /мин/мг белка, что было на 17 % ($p < 0,05$) ниже, чем у интактной группы. При этом салифен, фенотропил и кверцетин способствовали повышению данного показателя на 29% ($p < 0,05$), 18% ($p < 0,05$) и 17% ($p < 0,05$) в поврежденных митохондриях соответственно по сравнению с контрольной группой (Рис.9).

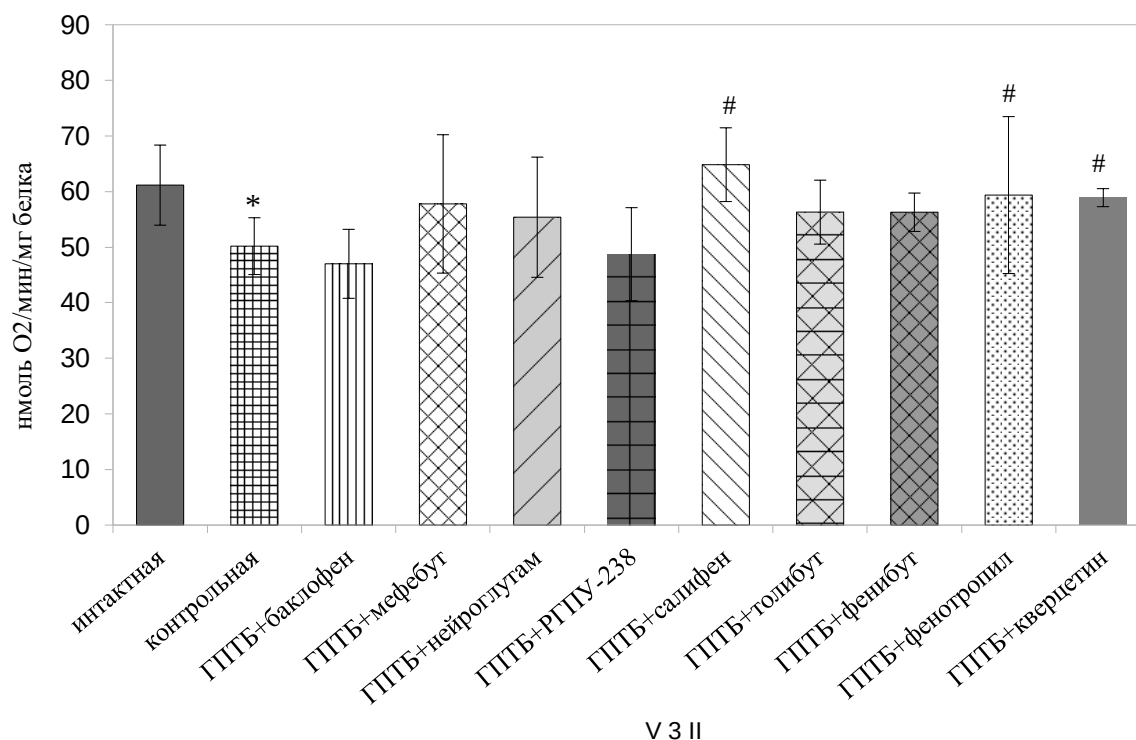


Рисунок 9. Влияние производных ГАМК и глутаминовой кислоты на скорость стимулированного дыхания (V_3 по Чансу) митохондрий клеток печени, инкубированных с ГПТБ, при окислении субстратов II комплекса ($M \pm \sigma$).

Примечание:

Изменения статистически значимы относительно показателей:

**-интактной группы митохондрий (t- критерий Стьюдента, $p < 0,05$)*

#-группы митохондрий, подверженных воздействию ГПТБ (критерий Ньюмена-Кейлса, $p < 0,05$).

После истощения экзогенно введенного АДФ, скорость потребления кислорода в митохондриях контрольной группы составляла 32,65 нМ O₂ /мин/мг белка, что было на 52% ($p < 0,05$) ниже, чем у интактных. В поврежденных митохондриях, нкубированных с фенотропилом и кверцетином, данный показатель был ниже на 37% ($p < 0,05$) и 20% ($p < 0,05$) соответственно по сравнению с митохондриями контрольной группы (Рис. 10).

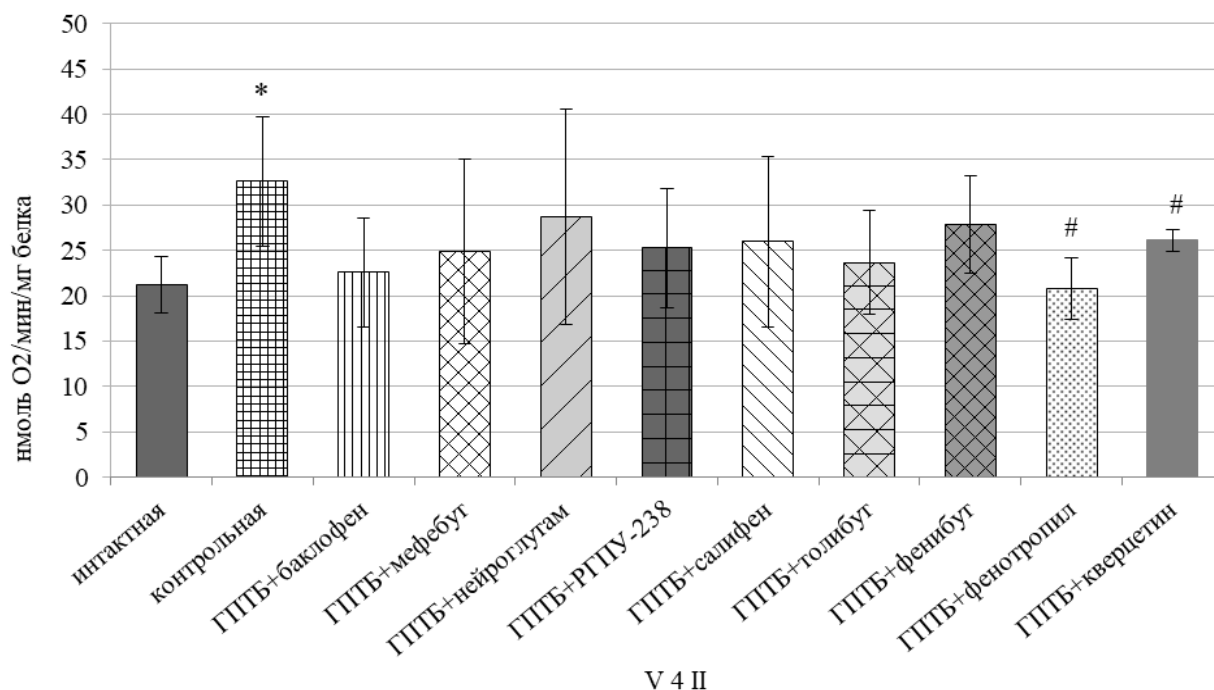


Рисунок 10. Влияние производных ГАМК и глутаминовой кислоты на скорость дыхания (V4 по Чансу) митохондрий клеток печени, инкубированных с ГПТБ, после истощения АДФ при окислении субстрата II комплекса ($M \pm \sigma$).

Примечание:

Изменения статистически значимы относительно показателей:

*-интактной группы митохондрий (t- критерий Стьюдента, $p < 0,05$)

#-группы митохондрий, подверженных воздействию ГПТБ (критерий Ньюмена-Кейлса, $p < 0,05$).

Для оценки функционального состояния митохондрий и сопряжения процессов окисления и фосфорилирования был рассчитан коэффициент дыхательного контроля как соотношение скорости стимулированного дыхания к скорости дыхания после истощения АДФ. Воздействие ГПТБ на изолированные митохондрии печени вызывало снижение показателя ДК I комплекса и составляло 1,7, что было на 34% ($p < 0,05$) ниже по сравнению с интактной группой, где коэффициент был равен 2,56. Мефебут повышал данный показатель на 19% ($p < 0,05$), салифен – на 57% ($p < 0,05$), толибут – на 37% ($p < 0,05$), фенибут – на 21% ($p < 0,05$), фенотропил – на 48% ($p < 0,05$) а кверцетин – на 39% ($p < 0,05$), по сравнению с митохондриями контрольной группы (Рис.11).

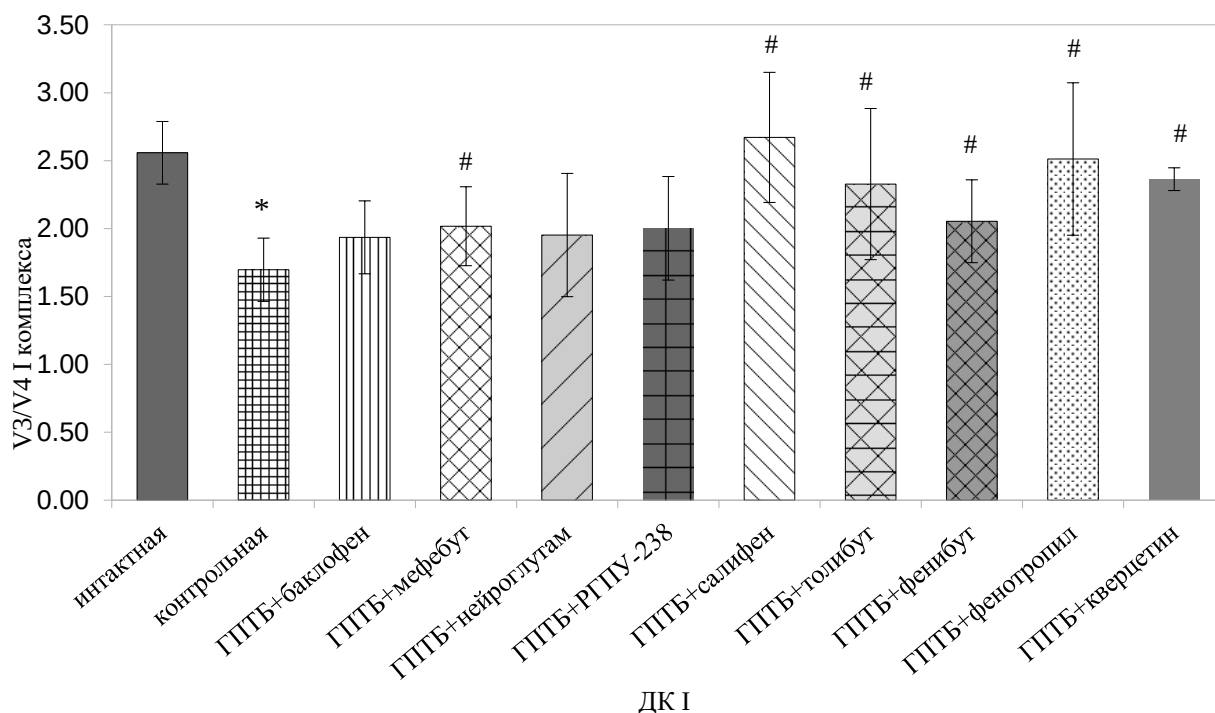


Рисунок 11. Изменение показатель ДК I комплекса митохондрий клеток печени, инкубированных с ГПТБ, под влияние производных ГАМК и глутаминовой кислоты ($M \pm \sigma$).

Примечание:

Изменения статистически значимы относительно показателей:

*-интактной группы митохондрий (t- критерий Стьюдента, $p < 0,05$)

#-группы митохондрий, подверженных воздействию ГПТБ (критерий Ньюмена-Кейлса, $p < 0,05$).

Показатель V3/V4 в митохондриях печени, подверженных воздействию ГПТБ, при окислении субстратов малат/глутамат и сукцинат был равен 1,59, что было на 52% ($p < 0,05$) ниже, чем в интактной группе митохондрий. Производные ГАМК и ГК способствовали повышению дыхательного контроля I+II комплекса в поврежденных митохондриях: баклофен – на 23% ($p < 0,05$), мефебут – на 48% ($p < 0,05$), нейроглютам – на 47% ($p < 0,05$), соединение РГПУ-238 – на 26% ($p < 0,05$), салифен – на 86% ($p < 0,05$), толибут – на 47% ($p < 0,05$), фенибут – на 33% ($p < 0,05$), фенотропил – на 90 % ($p < 0,05$) а кверцетин – на 60% ($p < 0,05$), по сравнению с показателями контрольной группы. (Рис.12).

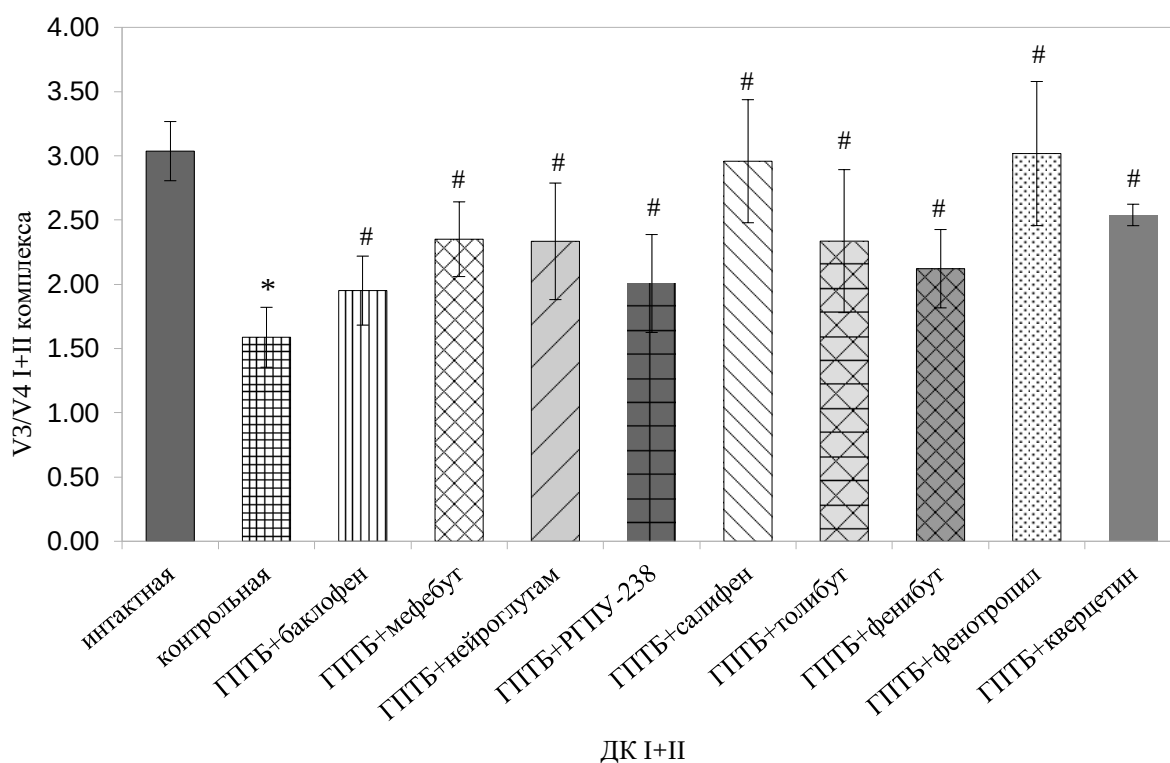


Рисунок 12. Изменение показателя ДК I+ II комплекса митохондрий клеток печени, инкубированных с ГПТБ под влияние производных ГАМК и глутаминовой кислоты ($M \pm \sigma$).

Примечание:

Изменения статистически значимы относительно показателей:

**-интактной группы митохондрий (t- критерий Стьюдента, $p < 0,05$)*

#-группы митохондрий, подверженных воздействию ГПТБ (критерий Ньюмена-Кейлса, $p < 0,05$).

Трет-Бутилгидропероксид разобщал процессы окисления и фосфорилирования в изолированных митохондриях печени крыс. Дыхательный контроль II комплекса в группе поврежденных митохондрий был на 47% ($p < 0,05$) ниже по сравнению с интактной группой митохондрий и составлял 1,58. Воздействие исследуемых соединений приводило к улучшению работы II комплекса. Баклофен способствовал повышению ДК II комплекса на 38% ($p < 0,05$), мефебут – на 56% ($p < 0,05$), салифен – на 66% ($p < 0,05$), толибут – на 61% ($p < 0,05$), фенибут – на 32% ($p < 0,05$), фенотропил – на 87% ($p < 0,05$), а кверцетин – на 43% ($p < 0,05$) по сравнению с таковыми показателями контрольной группы. Нейроглютам и соединение РГПУ- 238 не оказывали существенного влияния на данный показатель (Рис.13).

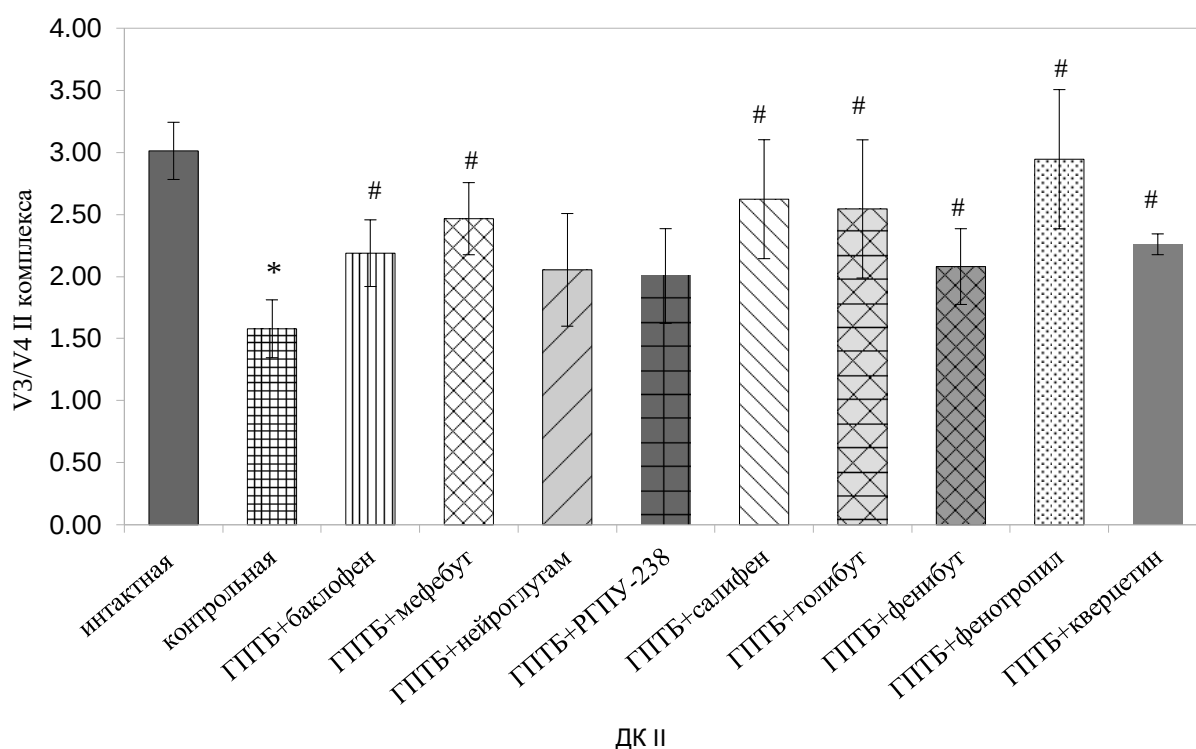


Рисунок 13. Изменение показателя ДК II комплекса митохондрий клеток печени, инкубированных с ГПТБ, под влиянием производных ГАМК и глутаминовой кислоты ($M \pm \sigma$).

Примечание:

Изменения статистически значимы относительно показателей:

**-интактной группы митохондрий (t- критерий Стьюдента, $p < 0,05$)*

#-группы митохондрий, подверженных воздействию ГПТБ (критерий Ньюмена-Кейлса, $p < 0,05$).

Результаты проведенного эксперимента показали, что ГПТБ вызывает окислительное повреждение митохондрий, нарушает процесс энергообразования, работу дыхательных комплексов. На это указывает снижение скорости стимулированного дыхания и сопряжения процессов окисления и фосфорилирования во всех метаболических состояниях. Повышение скорости потребления кислорода при окислении НАДН и ФАД – зависимых субстратов после истощения АДФ указывает на утечку электронов в дыхательной цепи. При этом исследуемые соединения ограничивают повреждающее действие ГПТБ на митохондрии, о чем свидетельствует достоверное повышение скорости стимулированного дыхания и показателей дыхательного контроля.

3.1.2. Влияние производных ГАМК и ГК на функциональное состояние интактных митохондрий печени крыс *in vitro*

Для оценки влияния исследуемых веществ на дыхательную функцию митохондрий печени интактной группы проводили инкубирование производных ГАМК и ГК с выделенными митохондриями. Было установлено, что баклофен при добавлении к интактной группе митохондрий снижает скорость поглощения кислорода в состоянии V3 на 22% ($p<0,05$) по сравнению с интактными митохондриями, так же при этом показатель дыхательного контроля достоверно снижался для I комплекса на 18%, для I+II и II комплекса на 21%. Можно предположить, что баклофен ограничивает «утечку электронов», но возможно сам вызывает небольшой оксидантный эффект (Таб.2).

Мефебут, соединение РГПУ- 238 и толибут, добавленные к неповрежденным митохондриям, практически не оказывало влияния на показатели функционального состояния последних.

Нейроглютам при добавлении к неповрежденным митохондриям, способствовал снижению скорости стимулированного дыхания I и I+II комплекса на 12% ($p<0,05$), II комплекса – на 16% ($p<0,05$). При этом значимых изменений ДК не наблюдалось.

Салифен, добавленный к неповрежденным митохондриям, способствовал значимому увеличению скорости поглощения кислорода при окислении НАДН – зависимых и ФАДН – зависимых субстратов на 28% и 18% по сравнению с митохондриями интактной группы, фенибут вызывал незначительное разобщение функционирования I комплекса.

Фенотропил повышал скорость поглощения кислорода интактными митохондриями в состоянии V3 на 20% ($p<0,05$) преимущественно для I комплекса и ДК I и I+II комплексов на 23% ($p<0,05$) и 12% ($p<0,05$) соответственно.

Препарат сравнения – кверцетин повышал скорость стимулированного дыхания I + II комплекса на 12% ($p<0,05$), ДК I комплекса – на 17% ($p<0,05$) соответственно по сравнению с таковыми значениями митохондрий интактной группы.

На основании результатов проведенного скрининга для дальнейшего исследования были выбраны 2 производных ГАМК – салифен и фенотропил, как наиболее перспективные, так как они значимо повышали функциональную активность поврежденных митохондрий почти во всех метаболических состояниях. Кроме того, они больше других исследуемых веществ повышали уровень поглощения кислорода интактными митохондриями печени.

Таблица 2. Влияние производных ГАМК и ГК в концентрации 1×10^{-5} на функциональную активность интактных митохондрий печени крыс ($M \pm \sigma$).

Исследуемый показатель Группы	V3(I) нМ O ₂ /мин/мг белка	V4(I) нМ O ₂ /мин/мг белка	V3(I+II) нМ O ₂ /мин/мг белка	V4(I+II) нМ O ₂ /мин/мг белка	V3 (II) нМ O ₂ /мин/мг белка	V4(II) нМ O ₂ /мин/мг белка	ДК (I)	ДК(I+II)	ДК(II)
Интактная	65,56±7,21	25,82±3,59	85,04±7,13	28,43±3,86	61,16±5,18	21,25±3,07	2,56±0,23	3,04±0,43	3,01±0,38
Интактная+баклофен	56,7±12,20 (-14%)	27,12±8,08 (+5%)	66,07±10,8* (-22%)	26,92±3,49 (-5%)	52,01±6,57 (-15%)	22,16±3,59 (+4%)	2,13±0,22* (-17%)	2,44±0,16* (-20%)	2,37±0,20* (-21%)
Интактная +мефебут	60,99±11,85 (-7%)	24,63±4,60 (-5%)	79,43±13,96 (-7%)	29,50±7,35 (+4%)	55,37±8,75 (-10%)	22,47±5,56 (+6%)	2,51±0,48 (-2%)	2,77±0,52 (-9%)	2,62±0,48 (-13%)
Интактная+нейроглютам	57,24±6,68* (-13%)	24,52±8,67 (-5%)	76,48±5,01* (-10%)	29,99±6,48 (+6%)	51,16±4,52* (-16%)	21,08±2,94 (-1%)	2,58±0,82 (+1%)	2,65±0,58 (-13%)	2,46±0,34 (-18%)
Интактная+РГПУ 238	55,03±7,81* (-16%)	27,14±1,28 (+5%)	64,17±11,8* (-25%)	28,83±5,80 (+2%)	45,18±6,08* (-26%)	19,17±4,12 (-10%)	2,02±0,24* (-21%)	2,25±0,32* (-26%)	2,46±0,66 (-18%)
Интактная+ салифен	84,40±10,8* (+29%)	32,80±7,29* (+27%)	104,87±26,6 (+23%)	36,02±13,0* (+27%)	72,10±13,3* (+18%)	27,60±9,31* (+30%)	2,64±0,38 (+3%)	3,09±0,70 (+2%)	2,63±1,26 (-13%)
Интактная+толибут	59,17±4,90* (-10%)	23,53±3,90 (-9%)	76,07±11,37 (-11%)	28,39±4,38 (-1%)	58,86±6,00 (-4%)	22,32±1,47 (+5%)	2,58±0,54 (+1%)	2,72±0,49 (-11%)	2,64±0,19 (-12%)
Интактная+фенибут	65,24±8,11 (-1%)	30,74±5,32 (+19%)	79,98±9,04 (-6%)	31,45±4,63 (+11%)	54,73±9,49 (-11%)	20,57±5,68 (-3%)	2,16±0,30* (-16%)	2,58±0,22 (-15%)	2,87±1,02 (-5%)
Интактная+фенотропил	78,24±7,64* (+19%)	25,51±5,23 (-1%)	100,38±9,6* (-18%)	30,76±7,98 (+8%)	62,49±11,32 (+2%)	19,91±4,04 (-6%)	3,16±0,36* (+24%)	3,41±0,2* (+12%)	3,19±0,59* (+6%)
Интактная+кверцетин	70,22±7,80 (+7%)	23,45±4,68 (-9%)	95,46±5,6* (+12%)	28,65±6,65 (+1%)	60,56±8,62 (-1%)	20,61±3,65 (-3,5%)	2,99±0,36* (+17%)	3,33±0,2 (+9%)	2,93±0,59 (+3%)

Примечание: *- изменения статистически значимы по сравнению с интактной группой (по t-критерию Стьюдента, $p < 0,05$)

3.2.1. Влияние различных концентраций салифена и фенотропила на функциональную активность интактных митохондрий *in vitro*

Для выявления зависимости эффекта от концентрации производных ГАМК, было проведено изучение функциональной активности интактных митохондрий печени, инкубированных с различными концентрациями исследуемых веществ.

При добавлении к митохондриям печени интактной группы различных концентраций салифена наблюдалась тенденция к снижению скорости стимулированного дыхания при окислении НАД – зависимых субстратов. Показатель V3 I комплекса в митохондриях печени при инкубировании с салифеном в концентрации 1×10^{-6} и 1×10^{-7} был ниже на 25% ($p < 0,05$) и 23% ($p < 0,05$) по сравнению с митохондриями интактной группы, на 27% ($p < 0,05$) и 24% ($p < 0,05$) по сравнению с митохондриями, инкубированными с салифеном в концентрации 1×10^{-5} . При окислении НАДН – и ФАД – зависимых субстратов после внесения экзогенного АДФ в суспензию митохондрий, инкубированных с салифеном, наблюдалась прямая зависимость скорости потребления кислорода от концентрации салифена. При этом данный показатель был ниже в митохондриях, инкубированных с салифеном в дозе 1×10^{-6} и 1×10^{-7} , на 26% ($p < 0,05$) и 32% ($p < 0,05$) соответственно. V3 II комплекса в митохондриях печени после добавления салифена в концентрации 1×10^{-5} и 1×10^{-6} незначительно повышалась по сравнению с митохондриями интактной группы. Скорость потребления кислорода после исчерпания АДФ при окислении НАД– и ФАД–зависимых субстратов в митохондриях, инкубированных с различными концентрациями салифена, практически не отличалась от показателей интактной группы.

Показатель дыхательного контроля при окислении малат/глутамата в митохондриях, инкубированных с салифеном в дозе 1×10^{-5} был незначительно выше, чем у интактной группы. Салифен в концентрации 1×10^{-6} и 1×10^{-7}

способствовал снижению данного показателя на 16% ($p<0,05$) и 33% ($p<0,05$) соответственно по сравнению с интактной группой митохондрий, при этом с увеличением концентрации исследуемого вещества, ДК I комплекса повышался. Значимых отличий показателя дыхательного контроля при активации I+II и II комплекса не было выявлено, однако с повышением дозы салифена наблюдалась тенденция к увеличению данного параметра.

Фенотропил, добавленный к неповрежденным митохондриям в дозе 1×10^{-5} , 1×10^{-6} и 1×10^{-7} , приводил к снижению скорости потребления кислорода при окислении малат/глутамата на 3%, 20 % ($p<0,05$) и 23% ($p<0,05$) соответственно. Воздействие фенотропила в концентрации 10^{-5} на неповрежденные митохондрии приводило к незначительному повышению показателя V3 I+II комплекса, при этом добавление фенотропила в концентрации 10^{-6} и 10^{-7} вызывало снижение данного показателя на 28% ($p<0,05$) и 29% ($p<0,05$) относительно интактной группы митохондрий. В показателе V3 II комплекса в исследуемых группах митохондрий не было выявлено статистически значимых отличий. В скорости дыхания митохондрий после истощения экзогенного АДФ так же не наблюдалось статистически значимых отличий. Было выявлено, что с уменьшением концентрации фенотропила, добавленного к неповрежденным митохондриям при окислении малат/глутамата и сукцината показатель дыхательного контроля так же снижается.

Проведенный анализ зависимости функционального состояния интактных митохондрий, выделенных из печени крыс и инкубированных с различными концентрациями салифена и фенотропила, показал, что в исследуемых группах митохондрий наблюдается зависимость скорости поглощения кислорода в различных состояниях от концентрации исследуемых соединений (Таб.3). Уменьшение концентрации салифена и фенотропила приводило к снижению показателя ДК во всех метаболических состояниях.

Таблица 3. Влияние различных концентраций салифена и фенотропила на функциональную активность интактных митохондрий печени Ме (Q_1 ; Q_3)

Исследуемый показатель Группы	V3(I) нМ O_2 /мин/мг белка	V4(I) нМ O_2 /мин/мг белка	V3(I+II) нМ O_2 /мин/мг белка	V4(I+II) нМ O_2 /мин/мг белка	V3(II) нМ O_2 /мин/мг белка	V4(II) нМ O_2 /мин/мг белка	ДК(I)	ДК(I+II)	ДК(II)
Интактная	63,06 (59,63;67,48)	22,25 (19,17;25,04)	79,69 (61,11; 81,26)	28,62 (18,60; 31,20)	40,04 (27,53;45,39)	15,24 (10,23;19,00)	3,08 (2,50;3,25)	2,67 (2,51;3,64)	2,45 (2,19;3,19)
Салифен 1×10^{-5}	64,43 (54,95;70,64) ^{^#}	21,29 (21,02; 21,75)	63,81 (48,02; 73,72)	23,04 (16,17;24,76)	48,79 (38,16;54,42) [#]	13,27 (13,01;20,26)	2,90 (2,59;3,34) ^{^#^}	2,62 (2,53;3,48)	2,82 (2,46;3,73)
Салифен 1×10^{-6}	46,92 (46,76;53,53) [*]	19,68 (18,19; 22,78)	58,60 (54,01; 60,87) [*]	25,33 (24,16;25,72)	50,81 (34,08;51,33)	18,48 (14,23;22,56)	2,57 (2,06;2,72) ^{^#}	2,40 (2,10;2,43)	2,39 (2,25;2,78) [#]
Салифен 1×10^{-7}	48,77 (30,27; 50,06) [*]	22,20 (14,78; 24,59)	54,29 (45,74; 54,31) [*]	23,90 (17,06;25,40)	32,78 (30,44;35,57)	13,90 (13,38;14,02)	2,05 (2,04;2,20) [*]	2,27 (2,14;2,68)	2,36 (2,17;2,66)
Фенотропил 1×10^{-5}	61,39 (55,97;64,64) ^{^#}	23,52 (22,43; 25,44)	74,81 (65,61; 80,92)	26,45 (24,07;27,70) [#]	50,11 (42,37;53,13) [^]	16,08 (15,35;18,32)	2,54 (2,45;2,65)	2,820 (2,43;3,30)	2,95 (2,56;3,30)
Фенотропил 1×10^{-6}	50,24 (40,64;54,41) [*]	20,63 (19,13;23,00)	57,25 (40,66; 75,33)	23,24 (15,63;25,05)	40,17 (36,60;43,40)	16,17 (13,34;18,30)	2,32 (2,10;2,49) [*]	2,81 (2,29;3,02)	2,54 (2,14;3,0)
Фенотропил 1×10^{-7}	48,77 (42,62;52,68) [*]	19,79 (16,06; 21,21)	56,48 (48,50; 65,71)	20,26 (17,90;24,55)	42,64 (35,31;49,66)	17,84 (12,82;19,33)	2,65 (2,30;2,66)	2,71 (2,68;2,79)	2,57 (2,39;2,75)

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

3.2.2. Влияние различных концентраций салифена и фенотропила на функциональную активность поврежденных митохондрий печени *in vitro*

Салифен, добавленный к в различных концентрациях к поврежденным ГПТБ митохондриям, способствовал повышению скорости стимулированного дыхания при окислении НАД – зависимых субстратов. Наибольшее значение данного показателя наблюдалось в группе митохондрий с концентрацией салифена 10^{-5} . Скорость стимулированного дыхания I+II комплекса в поврежденных митохондриях после добавления к ним салифена в концентрации 1×10^{-5} была выше на 21% ($p < 0,05$) по сравнению с контрольной группой. Снижение концентрации салифена приводило к незначительному уменьшению V3 I+II комплекса по отношению к контрольной группе. Статистически значимых отличий в потреблении кислорода после исчерпания АДФ в исследуемых группах митохондрий не было обнаружено. Показатель дыхательного контроля I комплекса при добавлении салифена в дозе 1×10^{-5} , 1×10^{-6} и 1×10^{-7} к поврежденным митохондриям был выше на 24% ($p < 0,05$), 31% ($p < 0,05$), и 18% ($p < 0,05$) соответственно. ДК I+II комплекса в митохондриях печени, подверженных воздействию ГПТБ, повышался после инкубирования с салифеном в дозе 1×10^{-5} на 27 % ($p < 0,05$), 1×10^{-6} – на 24% и 1×10^{-7} – на 19% ($p < 0,05$). Показатель дыхательного контроля в поврежденных митохондриях печени при окислении сукцината после инкубирования с салифеном в дозе 1×10^{-5} был выше на 19%, 1×10^{-6} – на 24%, 1×10^{-7} – на 23% ($p < 0,05$).

Фенотропил в дозе 1×10^{-5} , 1×10^{-6} и 1×10^{-7} , добавленный к поврежденным ГПТБ митохондриям печени способствовал повышению показателя V3 при окислении НАД– зависимых субстратов на 17% ($p < 0,05$), 21% ($p < 0,05$) и 11% ($p < 0,05$) соответственно. Скорость стимулированного дыхания I+II и II комплекса в митохондриях после добавления фенотропила в концентрации 1×10^{-5} , 1×10^{-6} и 1×10^{-7} была выше, чем в группе поврежденных митохондрий, однако статистически значимых изменений показателя V3 в зависимости от концентрации не наблюдалось. Скорость потребления кислорода после

исчерпания АДФ в исследуемых группах митохондрий отличалась незначительно. Соотношение скорости стимулированного дыхания к скорости дыхания после исчерпания АДФ при окислении субстрата малат/глутамат при инкубировании с фенотропилом в дозе 10^{-5} , 10^{-6} и 10^{-7} было выше на 16% ($p < 0,05$), 24 % ($p < 0,05$) и 11% ($p < 0,05$) соответственно. При этом наблюдалась зависимость ДК I комплекса от концентрации фенотропила. V_3/V_4 I+II комплекса был выше на 25% ($p < 0,05$), 31% ($p < 0,05$) и 28% ($p < 0,05$) после добавления фенотропила в концентрации 1×10^{-5} , 1×10^{-6} и 1×10^{-7} соответственно по сравнению с митохондриями контрольной группы. Показатель ДК при окислении ФАД-зависимых субстратов в поврежденных ГПТБ митохондриях после инкубирования с фенотропилом в концентрации 1×10^{-5} , 1×10^{-6} и 1×10^{-7} был выше на 31% ($p < 0,05$), 23% ($p < 0,05$) и 28% ($p < 0,05$) по сравнению с контрольной группой митохондрий.

Таблица 4. Влияние различных концентраций салифена и фенотропила на функциональное состояние поврежденных митохондрии печени Ме (Q_1 ; Q_3).

Исследуемый показатель Группы	V3(I) нМ O_2 /мин/мг белка	V4(I) нМ O_2 /мин/мг белка	V3(I+II) нМ O_2 /мин/мг белка	V4(I+II) нМ O_2 /мин/мг белка	V3(II) нМ O_2 /мин/мг белка	V4(II) нМ O_2 /мин/мг белка	ДК(I)	ДК(I+II)	ДК(II)
ГПТБ (200 нмоль)	37,96 (35,11;38,81)	20,27 (17,85;24,86)	41,24 (40,87;45,10)	25,45 (20,53;27,36)	40,09 (28,09;41,12)	19,60 (15,89;26,33)	1,870 (1,56;1,97)	1,770 (1,51;1,99)	1,770 (1,52;2,10)
ГПТБ+салифен 1×10^{-5}	45,86 (34,86;48,25)	18,36 (15,28;20,76)	52,41 (51,25;56,46) * [^] #	23,36 (22,01;25,28) [^]	40,92 (39,81;45,13)	19,09 (18,27;21,51)	2,320 (2,28;2,50) *	2,240 (2,23;2,33) * [^]	2,100 (2,09;2,24)
ГПТБ+салифен 1×10^{-6}	39,18 (37,28;41,81)	16,84 (15,42;18,09)	39,68 (31,12;48,90)	19,06 (17,81;21,58)	39,87 (33,43;43,31)	18,13 (17,50;18,77)	2,440 (2,21;2,46) *	2,200 (1,68;2,29)	2,200 (1,86;2,37)
ГПТБ+салифен 1×10^{-7}	40,19 (38,80;41,58)	18,29 (17,85;18,73)	37,03 (31,11;42,94)	17,41 (15,54;19,28)	32,37 (29,64;35,10)	14,85 (13,11;16,59)	2,200 (2,07;2,33) * [#]	2,115 (2,00;2,23* [#])	2,19 (2,12;2,26) *
ГПТБ+фенотропил 1×10^{-5}	44,56 (41,02;47,26) *	20,28 (18,42;23,08)	53,62 (46,75;59,17)	23,79 (21,92;24,60)	37,65 (32,03;45,53)	16,87 (13,81;19,47)	2,165 (2,00;2,32) *	2,210 (2,13;2,45) *	2,320 (2,19;2,36)
ГПТБ+фенотропил 1×10^{-6}	45,40 (42,85;47,37) *	19,24 (18,64;22,94)	43,81 (43,79;55,35)	19,75 (18,04;23,88)	42,14 (31,75;46,61)	19,31 (15,38;20,87)	2,300 (2,06;2,36) *	2,320 (2,22;2,43) *	2,180 (2,06;2,23)
ГПТБ+фенотропил 1×10^{-7}	42,09 (40,83;44,73)	19,99 (19,21;21,56)	56,00 (54,41;56,64)	24,82 (22,82;25,02)	41,15 (36,00;42,36)	18,57 (15,58;19,16)	2,080 (2,05;2,17) * [^]	2,260 (2,25;2,38) * [^]	2,270 (2,13;2,33) [^]

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

3.3.1. Оценка влияния салифена и фенотропила *ex vivo* на функциональное состояние митохондрий мозга крыс, подвергавшихся окислительному стрессу

ГПТБ, добавленный к изолированным митохондриям мозга крыс приводил к снижению скорости стимулированного дыхания при окислении НАД – зависимого субстрата и на 39% ($p<0,05$) по сравнению с интактными митохондриями, у которых данный показатель был равен 59,52 нМ O_2 /мин/мг белка. В митохондриях мозга крыс, которым однократно *in vivo* вводили фенотропил, салифен и фенибут, а затем *ex vivo* повреждали ГПТБ, скорость потребления кислорода при окислении субстрата I комплекса была на 37% ($p<0,05$), 30% ($p<0,05$) и 29% ($p<0,05$) выше, чем в митохондриях контрольной группы (Рис 14).

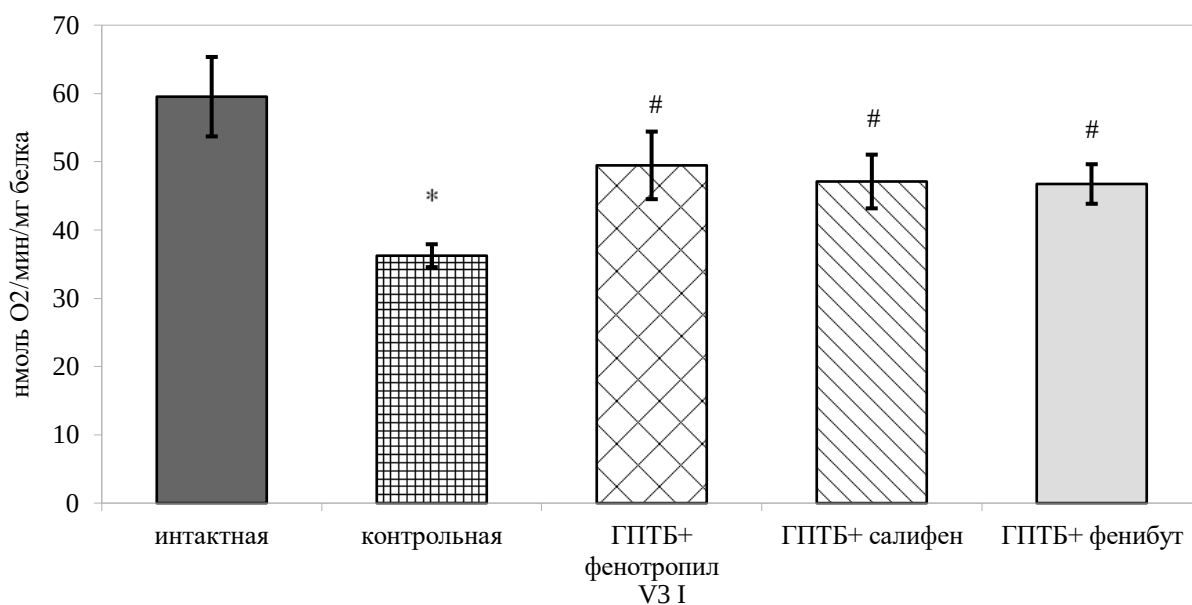


Рисунок 14. Влияние салифена и фенотропила *ex vivo* на скорость стимулированного дыхания при окислении субстратов I комплекса в митохондриях мозга крыс, подвергавшихся окислительному стрессу ($M \pm \sigma$).

Примечание:

Изменения статистически значимы относительно показателей:

*- интактной группы митохондрий (t- критерий Стьюдента, $p<0,05$)

#- контрольной группы митохондрий (критерий Ньюмена-Кейлса, $p<0,05$).

В изолированных митохондриях мозга крыс ГПТБ вызывал снижение скорости потребления кислорода при окислении НАД – и ФАД – зависимых субстратов на 47% ($p<0,05$) по сравнению с митохондриями интактной группы. Фенотропил, салифен и фенибут, введенные животным за 24 часа до декапитации, способствовали значимому повышению скорости стимулированного дыхания I+II комплекса на 43% ($p<0,05$), 34% ($p<0,05$) и 33,5% ($p<0,05$) соответственно по сравнению с показателями контрольной группы (Рис 15).

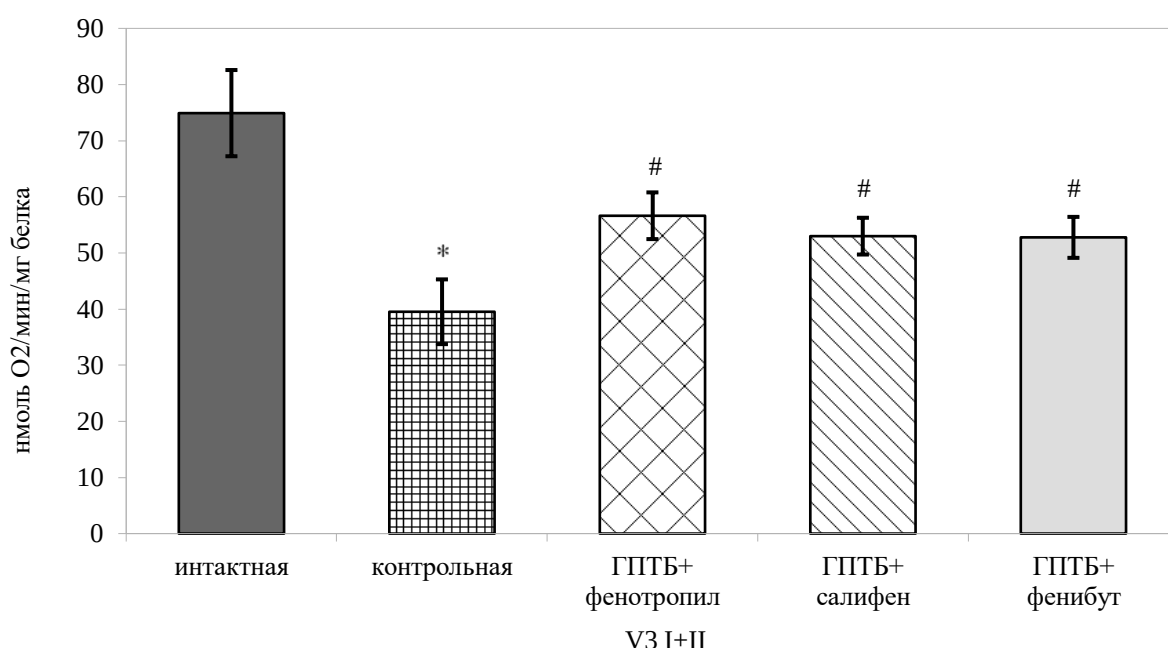


Рисунок 15. Влияние салифена и фенотропила *ex vivo* на скорость стимулированного дыхания при окислении субстратов I+II комплекса в митохондриях мозга крыс, подвергавшихся окислительному стрессу ($M \pm \sigma$).

Примечание:

Изменения статистически значимы относительно показателей:

**-интактной группы митохондрий (t- критерий Стьюдента, $p<0,05$)*

#- контрольной группы митохондрий (критерий Ньюмена-Кейлса, $p<0,05$).

После добавления ротенона в суспензию митохондрий достигалось ингибирование I комплекса дыхательной цепи. Показатель V3 при окислении сукцината в митохондриях, инкубированных с ГПТБ, был на 29% ($p<0,05$), ниже, чем у интактной группы (Рис 16). Скорость стимулированного дыхания II комплекса в митохондриях мозга животных, которым вводили фенотропил,

составляла 45,6нМ O_2 /мин/мг белка, салифен – 44,5нМ O_2 /мин/мг белка, фенибут – 40,6нМ O_2 /мин/мг белка, что было на 32% ($p<0,05$), 29% ($p<0,05$) и 18% ($p<0,05$) соответственно выше по сравнению с показателями контрольной группы.

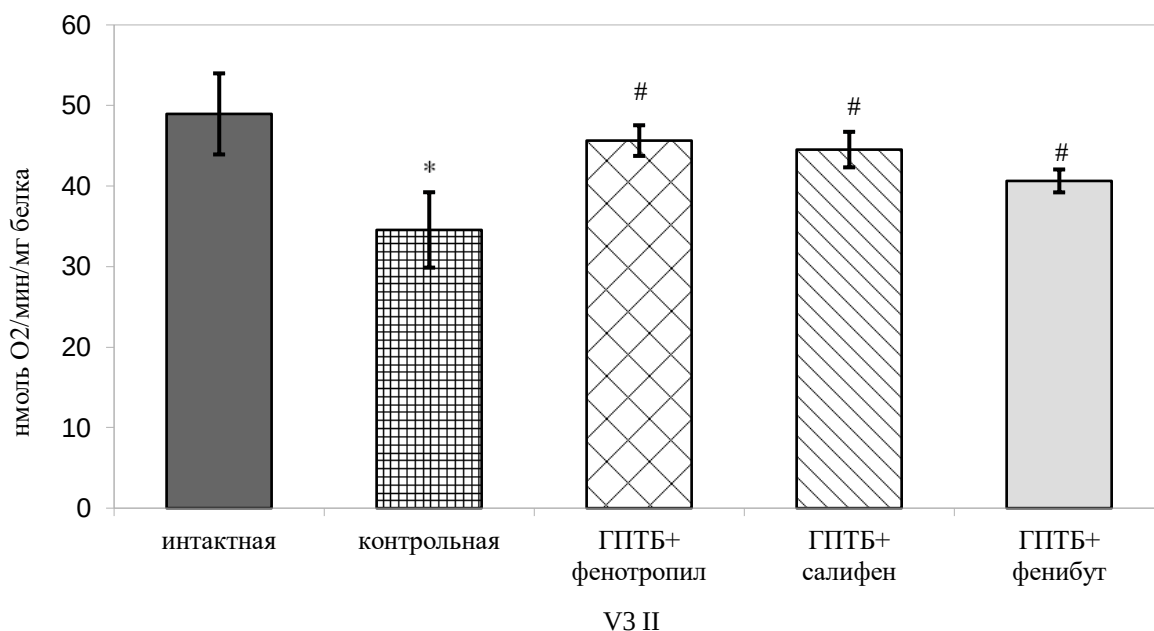


Рисунок 16. Влияние салифена и фенотропила *ex vivo* на скорость стимулированного дыхания при окислении субстратов II комплекса в митохондриях мозга крыс, подвергавшихся окислительному стрессу ($M \pm \sigma$).

Примечание:

Изменения статистически значимы относительно показателей:

**-интактной группы митохондрий (t- критерий Стьюдента, $p<0,05$)*

#- контрольной группы митохондрий (критерий Ньюмена-Кейлса, $p<0,05$).

Скорость дыхания после истощения АДФ при окислении субстратов I комплекса в митохондриях после добавления ГПТБ была ниже на 7% ($p<0,05$) по сравнению с интактной группой (Рис 17). В митохондриях мозга животных, которым вводили изучаемые вещества, показатель V4 II комплекса не отличался от таковых значений контрольной группы.

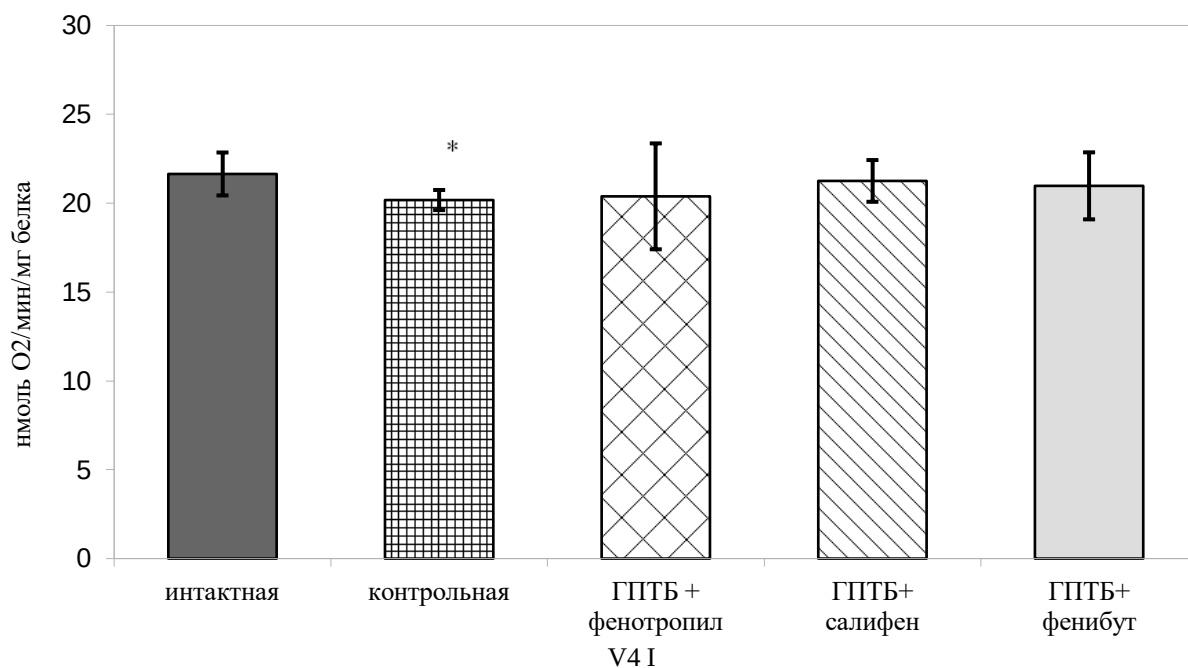


Рисунок 17. Влияние салифена и фенотропила *ex vivo* на скорость дыхания после истощения АДФ при окислении субстратов I комплекса в митохондриях мозга крыс, подвергавшихся окислительному стрессу ($M \pm \sigma$).

Примечание:

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+II и II комплекса практически не отличалось в исследуемых группах.

Соотношение скорости стимулированного дыхания к скорости дыхания после истощения АДФ при окислении малат/глутамата в контрольной группе составляло 1,8, что было на 35% ($p < 0,05$) ниже, чем в интактной группе митохондрий. Фенотропил повышал данный показатель на 36% ($p < 0,05$), салифен – на 23% ($p < 0,05$), фенибут – на 24% ($p < 0,05$) по сравнению с контрольной группой митохондрий (Рис 18).

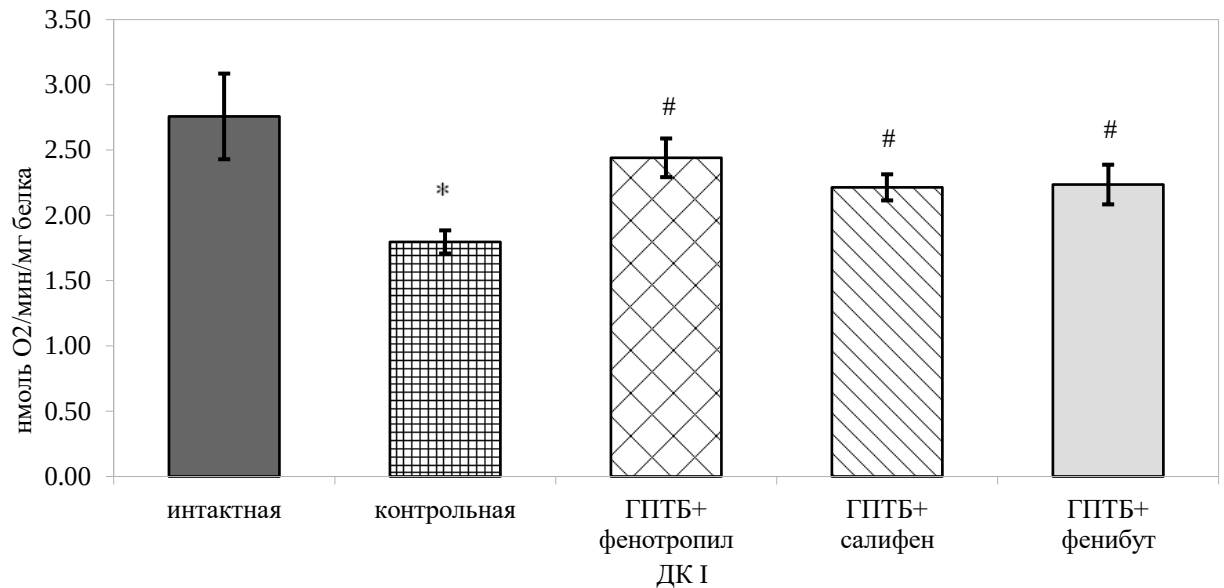


Рисунок 18. Изменение показателя ДК I комплекса в митохондриях мозга крыс, инкубированных с ГПТБ, под влиянием салифена и фенотропила *ex vivo* ($M \pm \sigma$).

Примечание:

Изменения статистически значимы относительно показателей:

**-интактной группы митохондрий (t- критерий Стьюдента, $p < 0,05$)*

#- контрольной группы митохондрий (критерий Ньюмена-Кейлса, $p < 0,05$).

Повреждение изолированных митохондрий мозга крыс ГПТБ приводило к снижению показателя дыхательного контроля при одновременном окислении малат/глутамата и сукцината на 31% ($p < 0,05$) по сравнению с интактной группой митохондрий. Фенотропил, введенный животным за сутки до декапитации, способствовал повышению дыхательного контроля I+II комплекса на 33% ($p < 0,05$), салифен – на 22% ($p < 0,05$) по сравнению с таковым показателем контрольной группы. Фенибут повышал данный показатель всего на 16% (Рис 19).

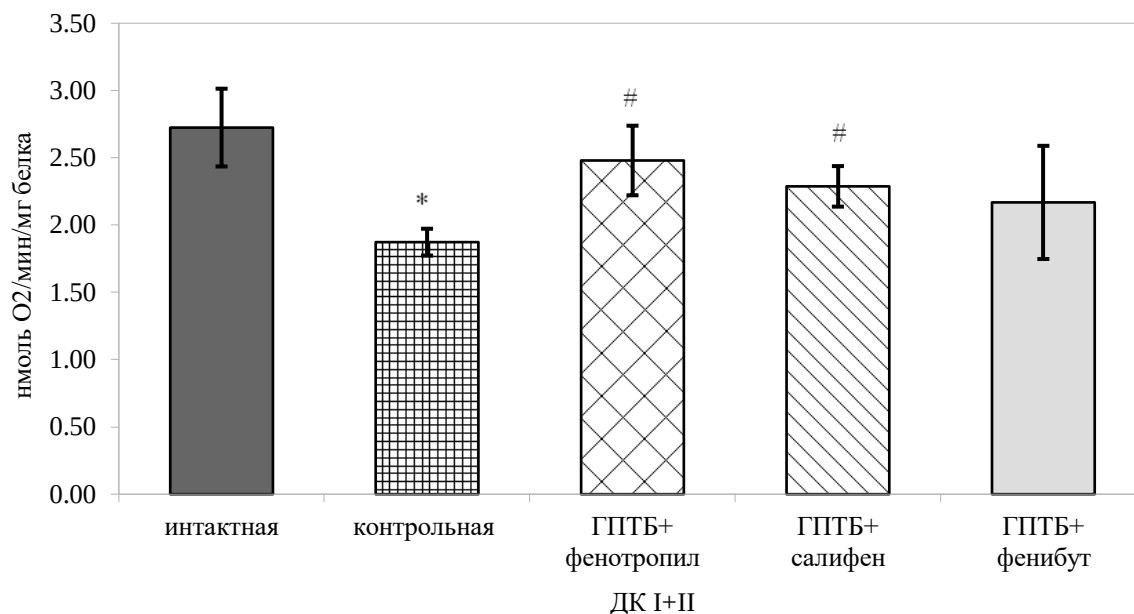


Рисунок 19. Изменение показателя ДК I+II комплекса в митохондриях мозга крыс, инкубированных с ГПТБ, под влиянием салифена и фенотропила *ex vivo* ($M \pm \sigma$).

Примечание:

Изменения статистически значимы относительно показателей:

**-интактной группы митохондрий (t- критерий Стьюдента, $p < 0,05$)*

#- контрольной группы митохондрий (критерий Ньюмена-Кейлса, $p < 0,05$).

Соотношение скорости стимулированного дыхания к скорости дыхания после исчерпания АДФ при окислении НАД – и ФАД – зависимых субстратов в контрольной группе изолированных митохондрий мозга крыс равнялось 1,82, что было ниже на 31% ($p < 0,05$), чем в интактной группе, где данный показатель составлял 2,43. Фенотропил способствовал повышению показателя ДК I+II комплекса на 28% ($p < 0,05$), салифен и фенибут – на 12% (Рис 20).

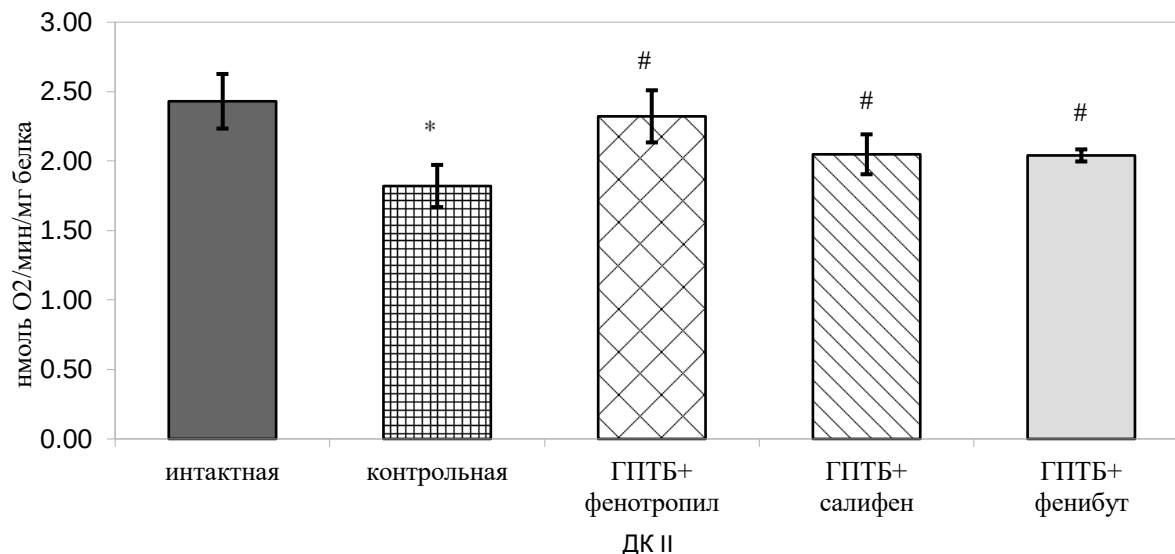


Рисунок 20. Изменение показателя ДК II комплекса в митохондриях мозга крыс, инкубированных с ГПТБ, под влиянием салифена и фенотропила *ex vivo* ($M \pm \sigma$).

Примечание:

Изменения статистически значимы относительно показателей:

**-интактной группы митохондрий (t- критерий Стьюдента, $p < 0,05$)*

#- контрольной группы митохондрий (критерий Ньюмена-Кейлса, $p < 0,05$).

3.3.2. Оценка влияния салифена и фенотропила *ex vivo* на функциональное состояние митохондрий сердца крыс, инкубированных с ГПТБ

Для изучения *ex vivo* влияния производных ГАМК на скорость потребления кислорода в различных метаболических состояниях, животным за сутки до забоя внутривенно вводили фенотропил, салифен и фенибут. Для моделирования окислительного повреждения к суспензии митохондрий *in vitro* добавляли ГПТБ.

Скорость стимулированного потребления кислорода I комплекса в изолированных митохондриях сердца крыс после инкубирования с ГПТБ составляла 37,66 нМ O₂ /мин/мг белка, что было на 31% ($p < 0,05$) ниже по отношению к интактным митохондриям, у которых данный показатель достигал 54,7 нМ O₂/мин/мг белка (Рис 21). В изолированных митохондриях

сердца животных, которым внутрибрюшинно вводили фенотропил, потребление O_2 после инкубирования с ГПТБ при окислении субстратов II комплекса повышалось на 35% ($p < 0,05$) по сравнению с таковым показателем негативного контроля и было равно 50,66 нМ O_2 /мин/мг белка. Салифен и фенибут повышали данный показатель на 27% ($p < 0,05$) и 23% ($p < 0,05$), что составило 47,80 нМ O_2 /мин/мг белка и 46,31 нМ O_2 /мин/мг белка соответственно.

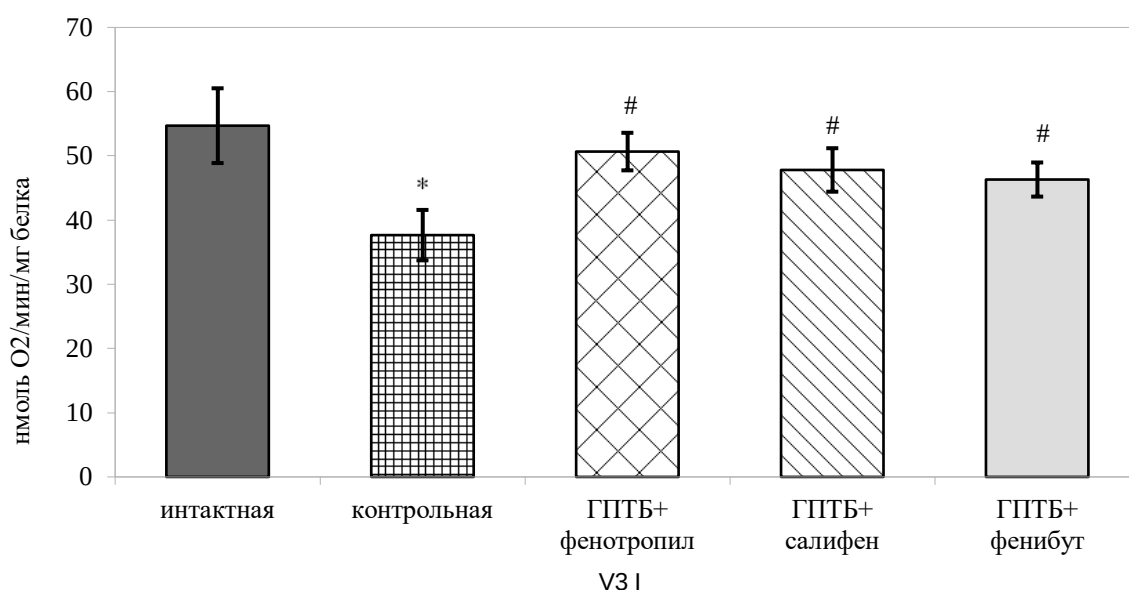


Рисунок 21. Влияние салифена и фенотропила на скорость стимулированного дыхания при окислении субстратов I комплекса в митохондриях сердца крыс, подверженных окислительному стрессу ($M \pm \sigma$).

Примечание:

Изменения статистически значимы относительно показателей:

**-интактной группы митохондрий (t- критерий Стьюдента, $p < 0,05$)*

#- контрольной группы митохондрий (критерий Ньюмена-Кейлса, $p < 0,05$).

Скорость АДФ-индуцированного потребления кислорода в митохондриях сердца крыс после кратковременного инкубирования с ГПТБ при одновременном окислении малат/глутамата и сукцината составляла 42 нМ O_2 /мин/мг белка, что было на 40% ($p < 0,05$) ниже, чем в интактной группе, у которой данный показатель был равен 69,95 нМ O_2 /мин/мг белка. Показатель V3 I+II комплекса в изолированных митохондриях сердца крыс, которым за 24 часа до декапитации внутрибрюшинно вводили фенотропил,

составлял 55,74 нМ O_2 /мин/мг белка, в группе салифена данный показатель был равен 56,42 нМ O_2 /мин/мг белка, а фенибута - 52,77 нМ O_2 /мин/мг белка, что было на 33% ($p < 0,05$), 34% ($p < 0,05$) и 26% ($p < 0,05$) выше по сравнению с таковыми значениями митохондрий контрольной группы (Рис. 22).

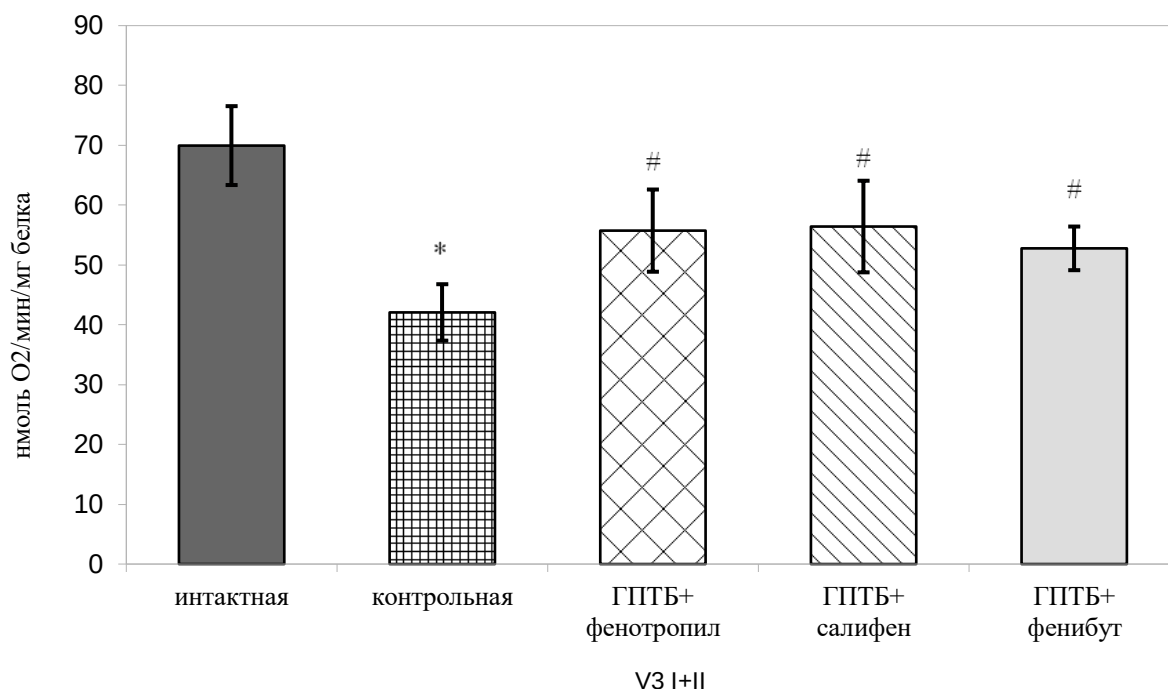


Рисунок 22. Влияние салифена и фенотропила на скорость стимулированного дыхания при окислении субстратов I+II комплекса в митохондриях сердца крыс, подверженных окислительному стрессу ($M \pm \sigma$).

Примечание:

Изменения статистически значимы относительно показателей:

**-интактной группы митохондрий (t- критерий Стьюдента, $p < 0,05$ #- контрольной группы митохондрий (критерий Ньюмена-Кейлса, $p < 0,05$).*

Добавление ротенона к суспензии митохондрий, содержащей малат/глутамат и сукцинат, после внесения экзогенного АДФ позволило выделить II комплекс дыхательной цепи. Воздействие ГПТБ на изолированные митохондрии сердца крыс приводило к снижению скорости V3 II комплекса на 30% ($p < 0,05$) по сравнению с митохондриями интактной группы (Рис 23). Скорость потребления кислорода в митохондриях, к которым добавляли фенотропил, салифен и фенибут была выше на 30%

($p < 0,05$), 21% ($p < 0,05$) и 33% ($p < 0,05$) по сравнению с показателями контрольной группы и составляла 39,69 нМ O_2 /мин/мг белка, 36,92 нМ O_2 /мин/мг белка и 40,77 нМ O_2 /мин/мг белка соответственно.

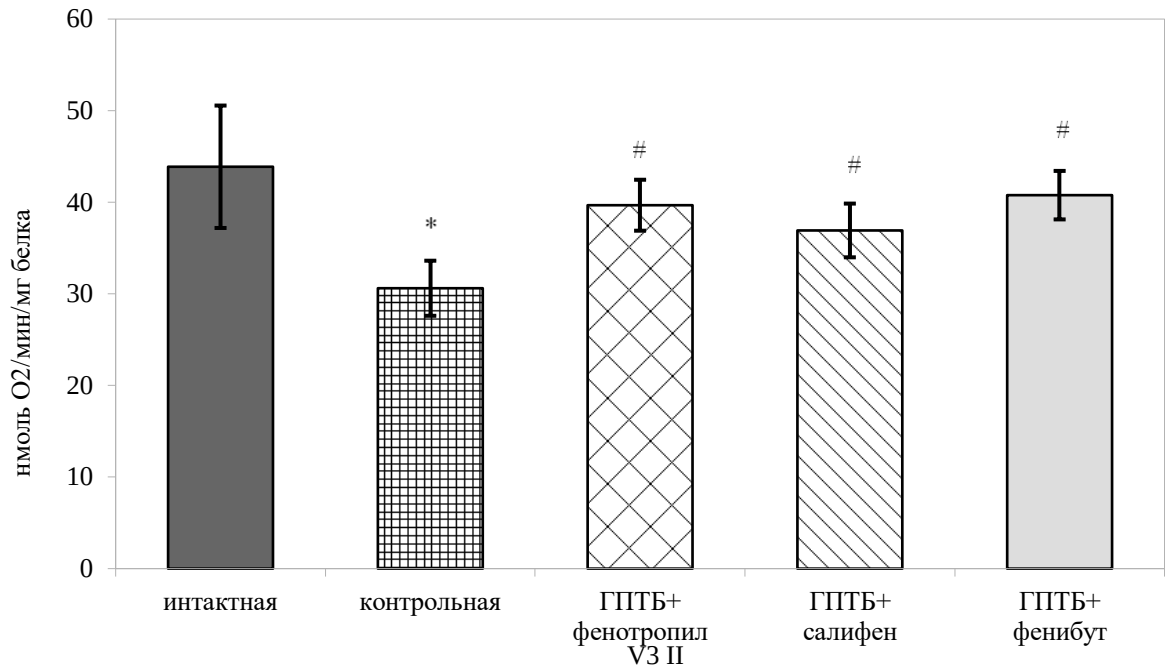


Рисунок 23. Влияние салифена и фенотропила на скорость стимулированного дыхания при окислении субстратов II комплекса в митохондриях сердца крыс, подверженных окислительному стрессу ($M \pm \sigma$).

Примечание:

Изменения статистически значимы относительно показателей:

**-интактной группы митохондрий (t- критерий Стьюдента, $p < 0,05$)*

#-контрольной группы митохондрий (критерий Ньюмена-Кейлса, $p < 0,05$).

В скорости потребления кислорода после истощения АДФ при окислении малат/глутамата и сукцината в исследуемых группах изолированных митохондрий сердца крыс значимых отличий не было выявлено (таб.5).

Таблица 5. Влияние фенотропила, салифена и фенибута на скорость потребления кислорода после истощения АДФ в митохондриях сердца крыс, инкубированных с ГПТБ (200 нмоль) ($M \pm \sigma$)

Исследуемый показатель группы	V4 I нМ O ₂ /мин/мг белка	V4 I+II нМ O ₂ /мин/мг белка	V4 II нМ O ₂ /мин/мг белка
Интakтные митохондрии	21,4±3,21	25,88±1,89	18,19±3,56
Митохондрии +ГПТБ	20,12±1,60	21,18±2,62	16,76±2,93
Фенотропил (25 мг/кг) +ГПТБ	23,06±0,85	24,18±2,47	17,94±1,91
Салифен (15 мг/кг) +ГПТБ	22,10±1,87	24,68±2,29	17,00±0,99
Фенибут (25 мг/кг) +ГПТБ	20,55±1,46	22,80±2,86	18,21±2,49

В изолированных митохондриях сердца крыс, к которым добавляли ГПТБ, наблюдалось снижение показателя дыхательного контроля I комплекса на 27% ($p < 0,05$), по сравнению с митохондриями интактной группы (Рис 24). Фенотропил, введенный животным внутрибрюшинно до декапитации, предотвращал повреждение митохондрий при инкубировании с ГПТБ, о чем свидетельствует повышение показателя ДК I комплекса на 18% ($p < 0,05$) по сравнению с показателем группы негативного контроля. Салифен и фенибут повышали дыхательный контроль при окислении малат/глутамата на – 16% и 21% соответственно, по сравнению с поврежденными митохондриями.

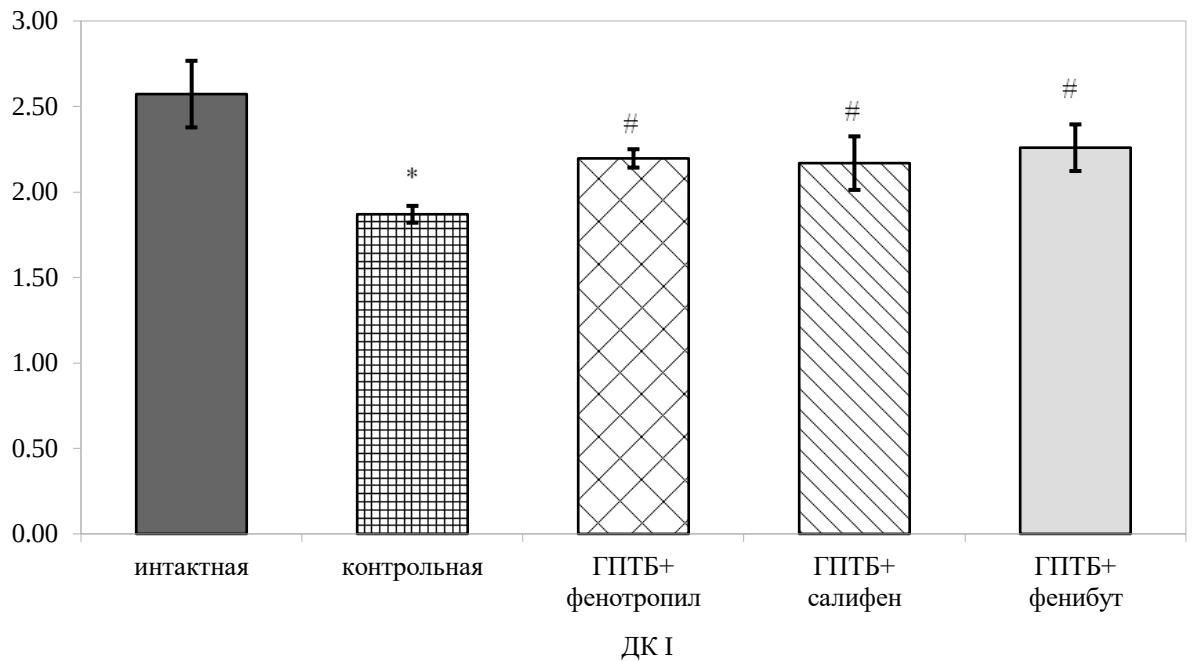


Рисунок 24. Изменение показателя ДК I комплекса в митохондриях сердца крыс, инкубированных с ГПТБ, под влияние салифена и фенотропила ($M \pm \sigma$).

Примечание:

Изменения статистически значимы относительно показателей:

**-интактной группы митохондрий (t- критерий Стьюдента, $p < 0,05$)*

#- контрольной группы митохондрий (критерий Ньюмена-Кейлса, $p < 0,05$).

Соотношение скорости стимулированного дыхания к скорости дыхания после истощения АДФ при одновременном окислении субстратов I и II комплекса в митохондриях сердца, поврежденных ГПТБ, составляло 1,99, что было ниже, чем у интактной группы на 26% ($p < 0,05$), где данный показатель равнялся 2,7. Фенотропил, введенный животным за 24 часа до декапитации, приводил к повышению показателя дыхательного контроля после инкубирования с ГПТБ на 16% ($p < 0,05$) по сравнению с показателем контрольной группы. Салифен и фенибут способствовали повышению данного показателя на 15% ($p < 0,05$) и 17% ($p < 0,05$) соответственно по сравнению с контрольной группой (Рис 25).

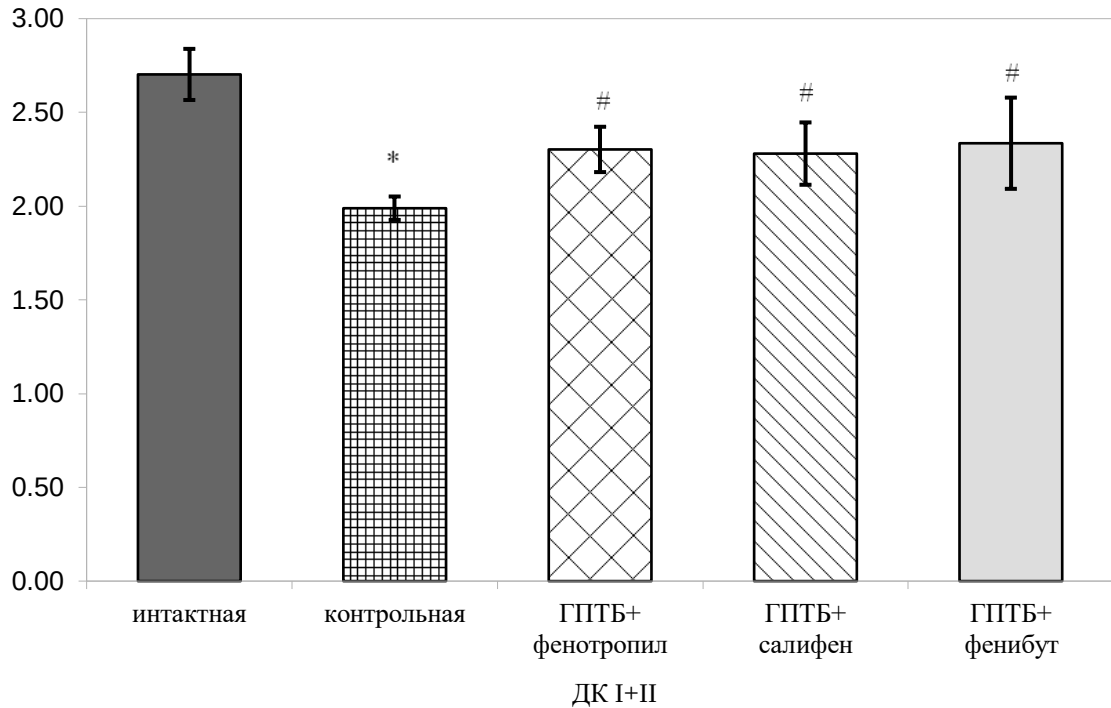


Рисунок 25. Изменение показателя ДК I+II комплекса в митохондриях сердца крыс, инкубированных с ГПТБ, под салифена и фенотропила ($M \pm \sigma$).

Примечание:

Изменения статистически значимы относительно показателей:

**-интактной группы митохондрий (t- критерий Стьюдента, $p < 0,05$)*

#- контрольной группы митохондрий (критерий Ньюмена-Кейлса, $p < 0,05$).

Добавление к изолированным митохондриям сердца крыс ГПТБ приводило к снижению показателя дыхательного контроля при окислении субстратов II комплекса на 24% ($p < 0,05$) по отношению к митохондриям интактной группы. Фенотропил, салифен и фенибут способствовали повышению исследуемого показателя на 20% ($p < 0,05$), 18% ($p < 0,05$) и 23% ($p < 0,05$) относительно митохондрий контрольной группы (Рис 26).

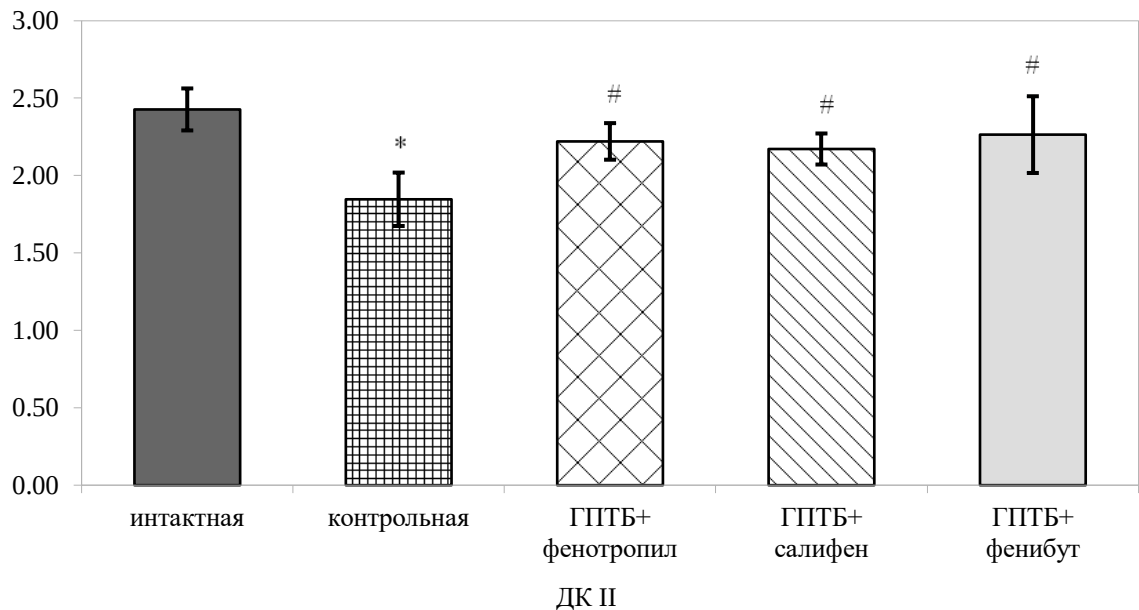


Рисунок 26. Изменение показателя ДК II комплекса в митохондриях сердца крыс, инкубированных с ГПТБ под влиянием салифена и фенотропила ($M \pm \sigma$).

Примечание:

Изменения статистически значимы относительно показателей:

**-интактной группы митохондрий (t- критерий Стьюдента, $p < 0,05$)*

#- контрольной группы митохондрий (критерий Ньюмена-Кейлса, $p < 0,05$).

3.4.1. Влияние салифена и фенотропила *in vitro* на функциональное состояние изолированных митохондрий мозга крыс, подверженных острому иммобилизационно-болевого стрессу

Биологические процессы, протекающие в организме, требуют значительного количества энергии, которое в большей степени удовлетворяется митохондриальным дыханием и синтезом АТФ. В нормальных условиях, когда внутренняя митохондриальная мембрана не повреждена, генерируемый трансмембранный градиент эффективно используется для синтеза АТФ, соответствующего энергопотребностям клеток. Однако, в условиях повышенного стрессового воздействия, когда энергозатратные процессы в клетке интенсифицируются, митохондрии не способны обеспечить адекватный уровень АТФ, необходимый для

нормальной работы клеток. Под воздействием стресса усиливается образование АФК, что приводит к повреждению митохондриальных мембран, снижению мембранного потенциала и уровня синтеза АТФ [Mikhed Y., et. al., 2015].

Основными потребителями энергии в стрессовых условиях являются клетки сердца и мозга. Один только психологический стресс может повышать частоту сердечных сокращений и артериальное давление более чем на 10–20%, что соответствует эквивалентному увеличению потребности сердца в энергии. Сокращение кардиомиоцитов основано на реакциях гидролиза миллиардов молекул АТФ, необходимых для передачи волны деполяризации/реполяризации, для перекрестного мостика актина-миозина, обеспечивающего мощный импульс сокращения во время систолы и для откачки Ca^{2+} , позволяющего расслабиться во время диастолы. Увеличение потребности в клеточной энергии также приводит к системным изменениям, таким как увеличение частоты дыхания и минутной вентиляции, что также дополнительно увеличивает общее потребление энергии [Ikawa M. et al. 2020].

Влияния стресса на функциональную активность митохондрий клеток мозга и сердца крыс изучали путем моделирования 24 – часового острого иммобилизационно-болевого стресса. Установлено, что острый стресс снижает скорость стимулированного дыхания в митохондриях клеток мозга при окислении малат/глутамата на 42% ($p < 0,05$) по отношению к интактной группе. При этом, салифен, фенотропил и фенибут повышали показатель V3 I комплекса митохондрий, выделенных из головного мозга стрессированных животных на 44% ($p < 0,05$), 55% ($p < 0,05$) и 31% ($p < 0,05$) соответственно, по сравнению с показателями контрольной группы (Рис.27).

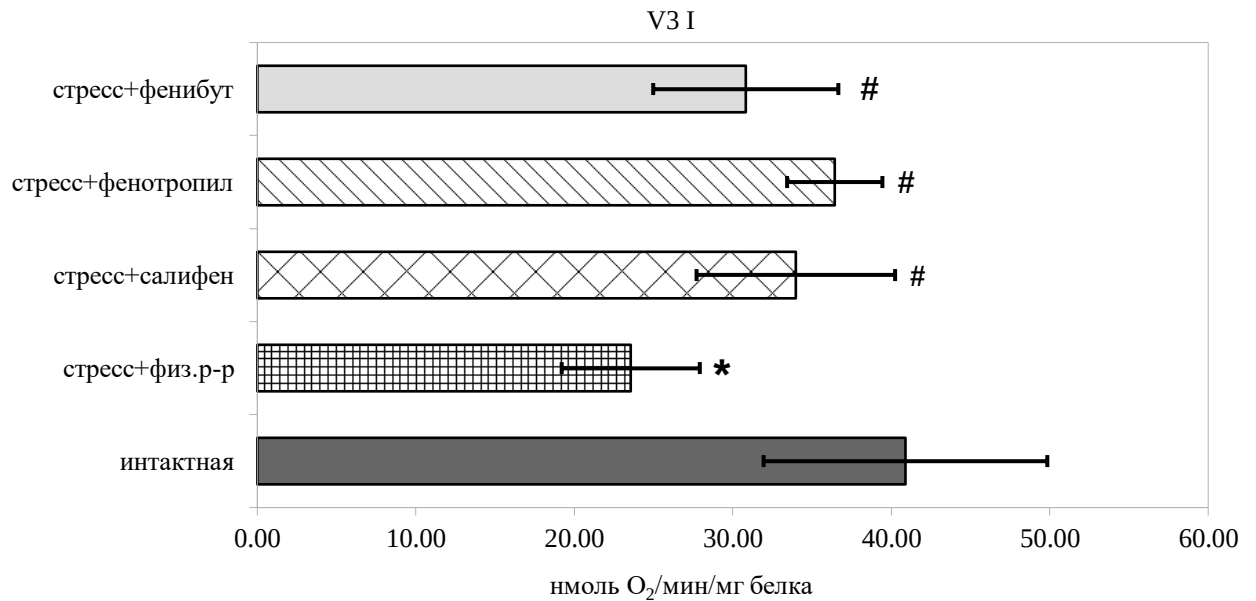


Рисунок 27. Влияние салифена и фенотропила *in vitro* на скорость стимулированного дыхания (V3 по Чансу) I комплекса митохондрий клеток мозга крыс, подвергавшихся 24 – часовому острому иммобилизационно-болевному стрессу ($M \pm \sigma$).

Примечание:

Изменения статистически значимы относительно показателей:

**-интактной группы митохондрий (t- критерий Стьюдента, $p < 0,05$)*

#-группы митохондрий, выделенных из мозга стрессированных животных (критерий Ньюмена-Кейлса, $p < 0,05$).

После истощения экзогенного АДФ у контрольной группы и группы митохондрий, инкубированных с исследуемыми препаратами, отличий в скорости потребления кислорода не было выявлено.

Поглощение кислорода после внесения экзогенного АДФ при окислении малат/глутамата и сукцината в митохондриях мозга стрессированных животных было на 45% ($p < 0,05$) ниже, чем у интактных. В митохондриях стрессированных крыс, инкубированных с салифеном, фенотропилом и фенибутом скорость стимулированного дыхания при одновременном окислении малат/глутамата и сукцината составляла 54,53 нМ O₂ /мин/мг белка, 57,38 нМ O₂ /мин/мг белка, 44,77 нМ O₂ /мин/мг белка, что было на 58% ($p < 0,05$), 67% ($p < 0,05$) и 30% ($p < 0,05$) выше показателей контрольной группы (Рис.28).

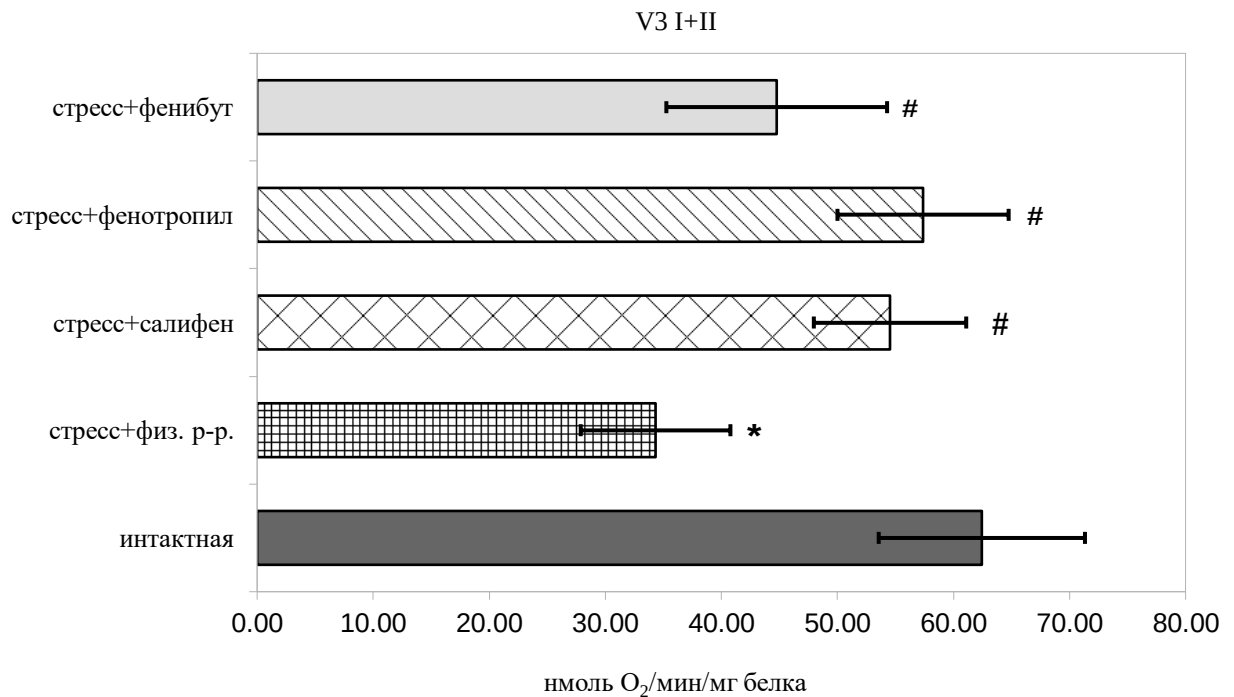


Рисунок 28. Влияние салифена и фенотропила *in vitro* на скорость стимулированного дыхания (V3 по Чансу) I +II комплекса митохондрий клеток мозга крыс, подвергавшихся 24 – часовому острому иммобилизационно-болевному стрессу ($M \pm \sigma$).

Примечание:

Изменения статистически значимы относительно показателей:

**-интактной группы митохондрий t- критерий Стьюдента, $p < 0,05$)*

#-группы митохондрий, выделенных из мозга стрессированных животных (критерий Ньюмена-Кейлса, $p < 0,05$).

Показатель V4 I+II в митохондриях мозга крыс стрессированных животных был на 28% ниже, чем у интактных животных. Исследуемые вещества – салифен, фенотропил и фенибут, добавленные к митохондриям, выделенным из мозга стрессированных животных, способствовали повышению показателя V4 I+II комплекса на 32% ($p < 0,05$), 25% ($p < 0,05$) и 20% соответственно относительно показателей контрольной группы (Рис. 29).

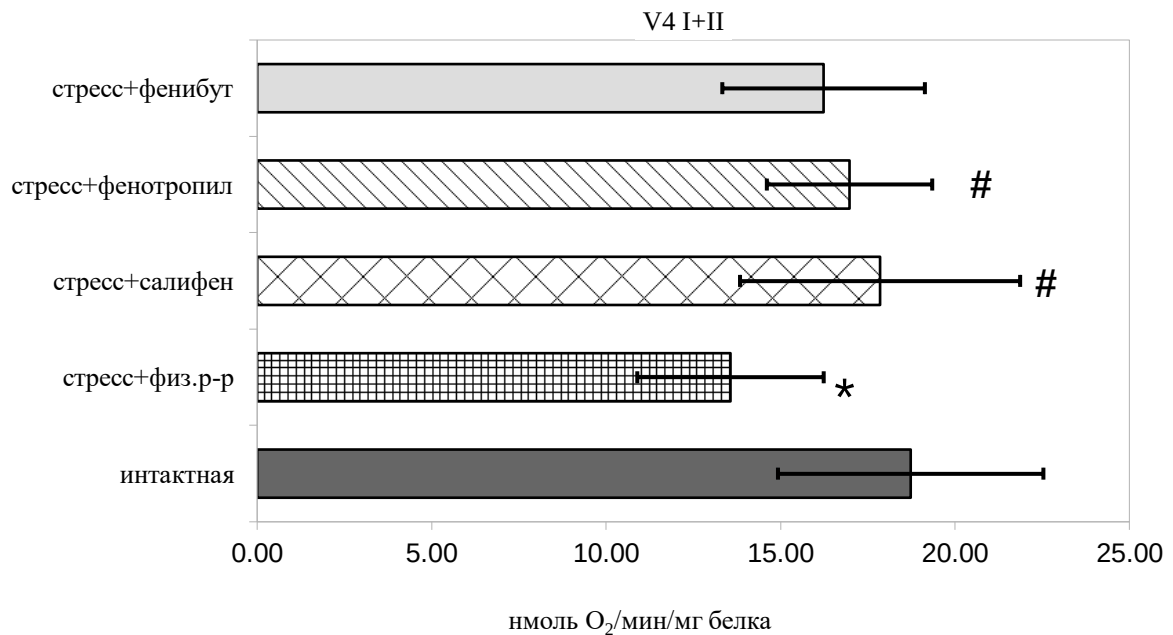


Рисунок 29. Влияние салифена и фенотропила *in vitro* на скорость дыхания (V4 по Чансу) I +II комплекса митохондрий клеток мозга крыс, подвергавшихся 24-х часовому острому иммобилизационно-болевному стрессу после истощения АДФ ($M \pm \sigma$).

Примечание:

Изменения статистически значимы относительно показателей:

**-интактной группы митохондрий (t- критерий Стьюдента, $p < 0,05$)*

#-группы митохондрий, выделенных из мозга стрессированных животных (критерий Ньюмена-Кейлса, $p < 0,05$).

Для изучения активности II комплекса дыхательной цепи в ячейку вносили ротенон, который ингибировал I комплекс. После добавления АДФ в изолированные митохондрии мозга стрессированных крыс, скорость АДФ-индуцированного потребления кислорода во II комплексе составляла 21,04 нМ O₂ /мин/мг белка, что было на 39% ($p < 0,05$) ниже по сравнению с интактной группой, у которых данный показатель достигал значения 34,58 нМ O₂/мин/мг белка. Салифен и фенотропил, инкубированные с поврежденными митохондриями в течение 10 минут, способствовали повышению скорости стимулированного дыхания II комплекса на 66% ($p < 0,05$) и 48% ($p < 0,05$) соответственно, относительно таковых показателей контрольной группы.

Препарат сравнения фенибут повышал данный показатель на 23% ($p<0,05$) (Рис.30).

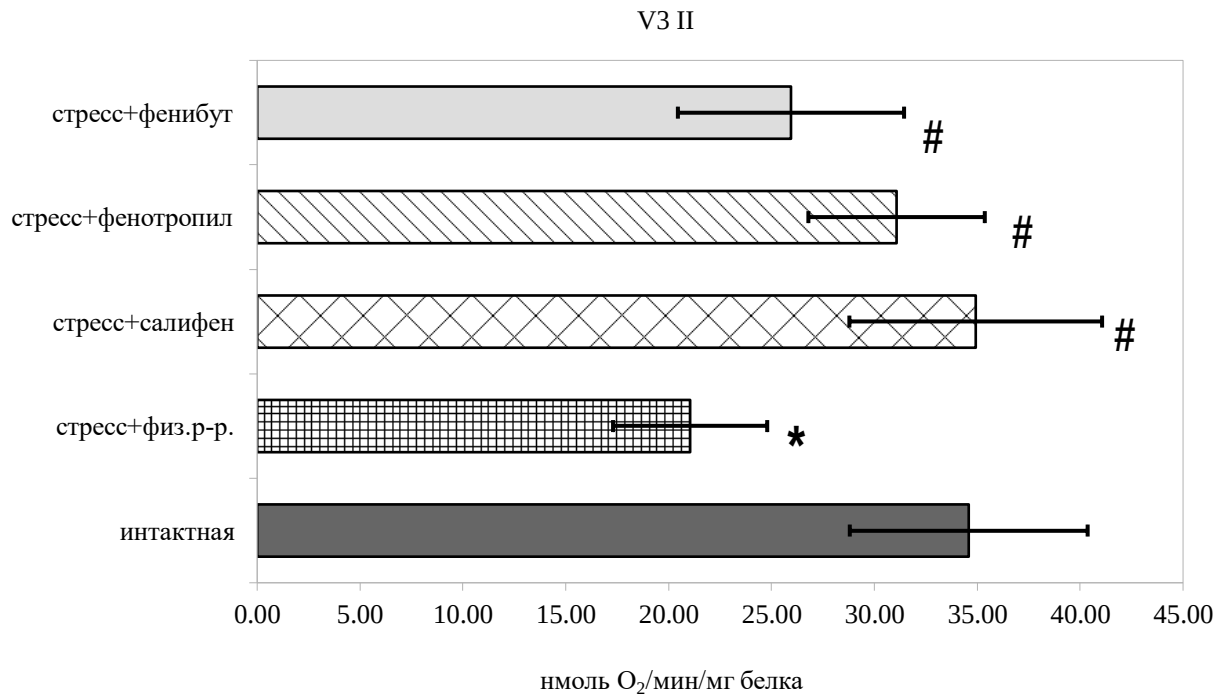


Рисунок 30. Влияние салифена и фенотропила *in vitro* на скорость стимулированного дыхания (V3 по Чансу) II комплекса митохондрий клеток мозга крыс, подвергавшихся 24 – часовому острому иммобилизационно-болевному стрессу ($M \pm \sigma$).

Примечание:

Изменения статистически значимы относительно показателей:

**-интактной группы митохондрий (t- критерий Стьюдента, $p<0,05$)*

#-группы митохондрий, выделенных из мозга стрессированных животных (критерий Ньюмена-Кейлса, $p<0,05$).

Скорость поглощения кислорода после истощения АДФ в митохондриях мозга стрессированных животных при окислении субстратов II комплекса была на 28% ($p<0,05$) ниже, чем у интактных животных. Салифен, фенотропил и фенибут, добавленные к митохондриям, выделенным из мозга стрессированных животных способствовали повышению показателя V4 II комплекса на 32% ($p<0,05$), 25% ($p<0,05$) и 20% соответственно по сравнению с митохондриями мозга стрессированных животных (Рис.31).

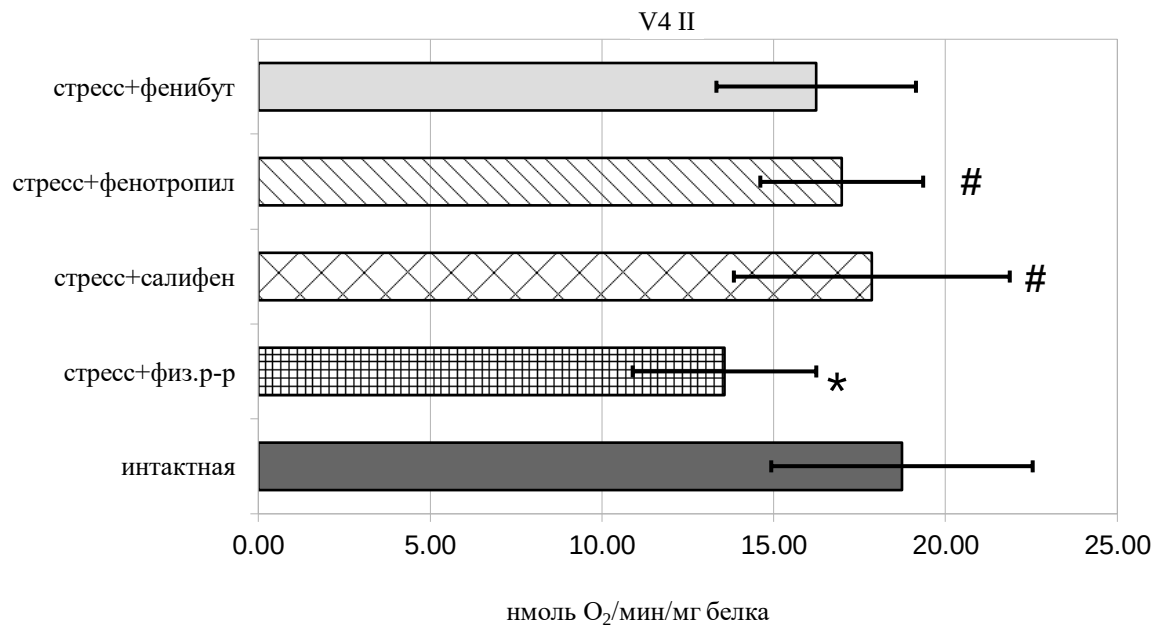


Рисунок 31. Влияние салифена и фенотропила *in vitro* на скорость дыхания в состоянии V4 II комплекса митохондрий клеток мозга крыс, подвергавшихся 24 – часовому острому иммобилизационно-болевному стрессу ($M \pm \sigma$).

Примечание:

Изменения статистически значимы относительно показателей:

**-интактной группы митохондрий (t- критерий Стьюдента, $p < 0,05$)*

#-группы митохондрий, выделенных из мозга стрессированных животных (критерий Ньюмена-Кейлса, $p < 0,05$).

Показатель дыхательного контроля, отражающий сопряженность процессов окисления и фосфорилирования при окислении НАД – зависимых субстратов, в контрольной группе митохондрий был на 31% ($p < 0,05$) ниже по сравнению с интактными митохондриями. В митохондриях, инкубированных с салифеном и фенотропилом, соотношение скорости стимулированного дыхания к скорости дыхания после АДФ в присутствии субстрата малат/глутамат было выше на 24% ($p < 0,05$) и 41% ($p < 0,05$), чем в контрольной группе митохондрий. В митохондриях, инкубированных с фенибутом, данный показатель был выше, чем в контрольной группе на 19% ($p < 0,05$) (Рис. 32).

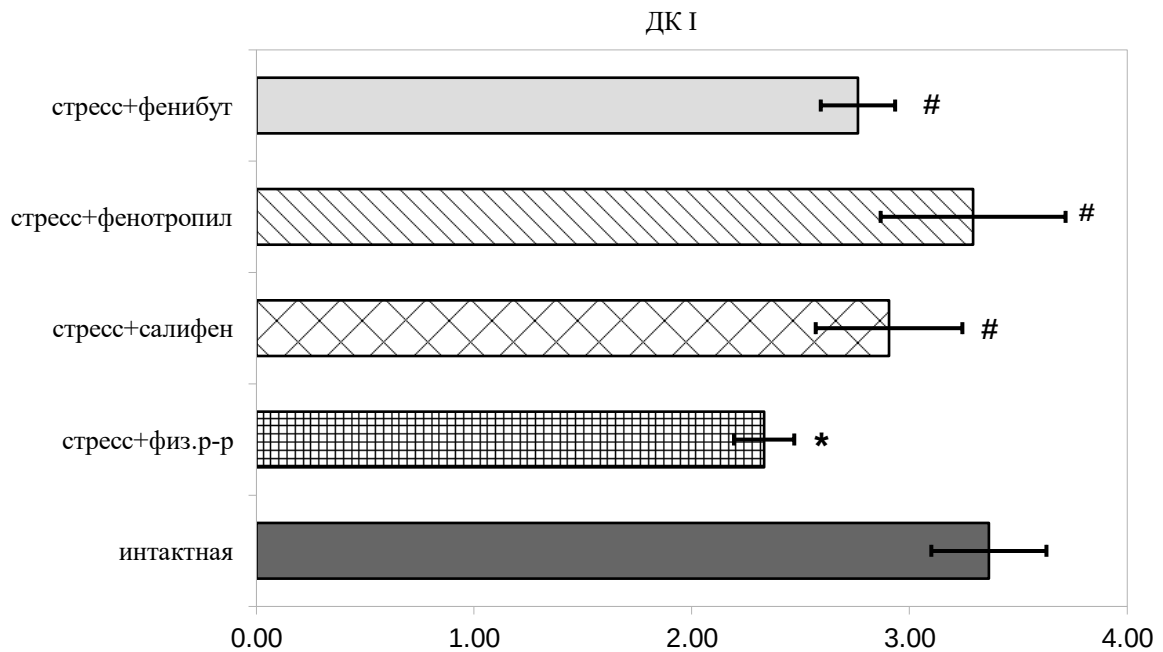


Рисунок 32. Изменение показателя дыхательного контроля I комплекса в митохондриях мозга крыс, подвергавшихся иммобилизационно-болевого стрессу, под влиянием салифена и фенотропила *in vitro* ($M \pm \sigma$).

Примечание:

Изменения статистически значимы относительно показателей:

*-интактной группы митохондрий (*t*- критерий Стьюдента, $p < 0,05$)

#-группы митохондрий, выделенных из мозга стрессированных животных (критерий Ньюмена-Кейлса, $p < 0,05$).

При окислении малат/глутамата и сукцината показатель дыхательного контроля в митохондриях из клеток головного мозга крыс, подвергавшихся иммобилизационно-болевого стрессу составлял 2,55, что было на 27% ($p < 0,05$) ниже по сравнению с интактной группой, у которой данный показатель равнялся 3,51. Добавление к изолированным митохондриям, выделенным из мозга стрессированных животных, салифена, фенотропила и фенибута способствовало повышению показателя V3/V4 – на 22% ($p < 0,05$), 33% ($p < 0,05$) и 8% соответственно по отношению к негативному контролю (Рис.33).

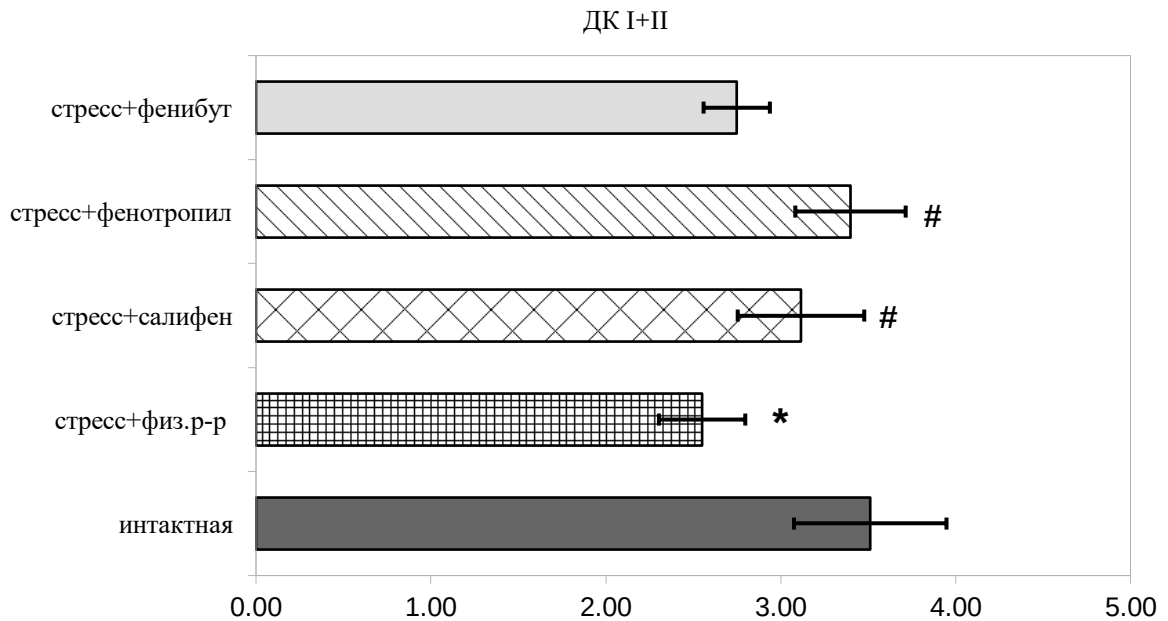


Рисунок 33. Изменение показателя дыхательного контроля I+II комплекса в митохондриях мозга крыс, подвергавшихся иммобилизационно-болевого стрессу, под влиянием салифена и фенотропила *in vitro* ($M \pm \sigma$).

Примечание:

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 – часового стресса приводило к снижению показателя дыхательного контроля в митохондриях клеток мозга при окислении ФАД – зависимых субстратов на 30% ($p < 0,05$) по сравнению с интактной группой. Дыхательный контроль II комплекса в митохондриях мозга стрессированных крыс повышался под влиянием производных ГАМК – фенотропила, салифена и фенибута на 31% ($p < 0,05$), 19% ($p < 0,05$) и 17% ($p < 0,05$) соответственно (Рис.34).

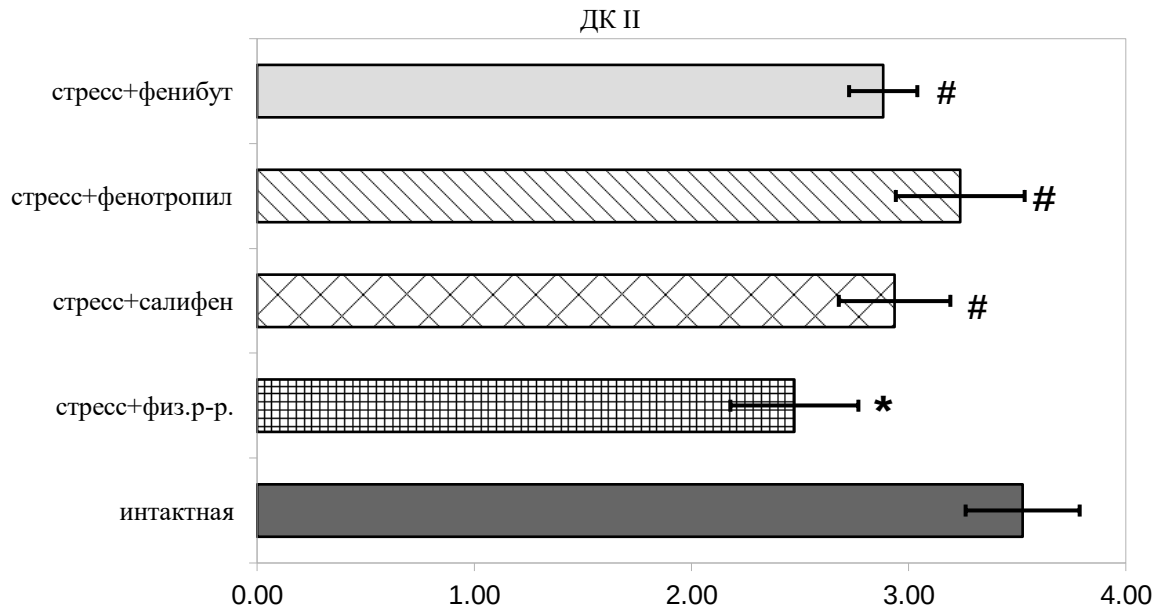


Рисунок 34. Изменение показателя дыхательного контроля II комплекса митохондрий мозга крыс, подвергавшихся иммобилизационно-болевого стрессу, под влиянием салифена и фенотропила *in vitro* ($M \pm \sigma$).

Примечание:

Изменения статистически значимы относительно показателей:

**-интактной группы митохондрий (t- критерий Стьюдента, $p < 0,05$)*

#-группы митохондрий, выделенных из мозга стрессированных животных (критерий Ньюмена-Кейлса, $p < 0,05$).

3.4.2. Оценка влияния салифена и фенотропила *in vitro* на функциональное состояние митохондрий сердца крыс, подвергавшихся острому иммобилизационно-болевого стрессу

Под воздействием острого иммобилизационно-болевого стресса, скорость стимулированного дыхания при окислении малат/глутамата снижалась на 42% ($p < 0,05$) по сравнению с таковыми показателями митохондрий интактной группы. Кратковременное воздействие салифена, фенотропила и фенибута на изолированные митохондрии сердца крыс, подвергавшихся стрессовому воздействию, способствовало повышению уровня потребления O_2 в I комплексе в состоянии V3 на 19% ($p < 0,05$), 24% ($p < 0,05$) и 32% ($p < 0,05$) соответственно (Таб.6). Потребление O_2 в митохондриях сердца стрессированных крыс после добавления АДФ при

одновременном окислении малат/глутамата и сукцината было ниже на 35% ($p<0,05$) по сравнению с интактными митохондриями. Добавление салифена, фенотропила и фенибута к изолированным митохондриям сердца крыс, подвергавшихся иммобилизационно – болевому стрессу, способствовало повышению показателя V3 I+II на 8%, 19% и 23%. Скорость поглощения кислорода в митохондриях, выделенных из сердца крыс группы негативного контроля, при окислении сукцината была ниже на 29% ($p<0,05$), чем в интактных. Статистически значимых отличий в скорости поглощения кислорода после исчерпания экзогенного АДФ при окислении субстратов I и II комплекса в исследуемых группах митохондрий не было обнаружено.

Таблица 6. Влияние салифена и фенотропила в концентрации 1×10^{-5} *in vitro* на показатели функционального состояния митохондрий сердца стрессированных крыс ($M \pm \sigma$).

Исследуемый показатель группы	V3(I) нМ O ₂ /мин/мг белка	V4(I) нМ O ₂ /мин/мг белка	V3(I+II) нМ O ₂ /мин/мг белка	V4(I+II) нМ O ₂ /мин/мг белка	V3(II) нМ O ₂ /мин/мг белка	V4(II) нМ O ₂ /мин/мг белка
Интактная группа	39,13 $\pm$ 4,96	11,26 $\pm$ 1,59	57,74 $\pm$ 5,41	15,75 $\pm$ 2,96	31,17 $\pm$ 3,96	9,56 $\pm$ 1,89
Стресс+физ.р-р	22,45* $\pm$ 3,36 (-42%)	9,53* $\pm$ 1,83 (-15%)	37,35* $\pm$ 6,30 (-35%)	16,23 $\pm$ 2,81 (+3%)	22,12* $\pm$ 4,14 (-29%)	9,52 $\pm$ 1,86 (-0,5%)
Стресс +салифен	26,70 [#] $\pm$ 4,17 (+19%)	9,43 $\pm$ 1,33 (-1%)	40,42 $\pm$ 9,60 (+8%)	14,39 $\pm$ 3,60 (-11%)	24,45 $\pm$ 6,84 (+10%)	9,25 $\pm$ 2,97 (-3%)
Стресс+фенотроп- ил	27,88 [#] $\pm$ 3,93 (+24%)	9,22 $\pm$ 2,03 (-3%)	44,53 $\pm$ 6,54 (+19%)	14,46 $\pm$ 2,20 (-11%)	25,00 $\pm$ 2,38 (+13%)	8,68 $\pm$ 1,14 (-9%)
Стресс+ фенибут	29,54 [#] $\pm$ 5,01 (+32%)	10,12 $\pm$ 2,10 (+6%)	45,99 $\pm$ 10,14 (+23%)	14,62 $\pm$ 3,02 (-10%)	26,83 $\pm$ 2,87 (+21%)	9,14 $\pm$ 1,06 (-4%)

Примечание:

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 – часового острого иммобилизационно-болевого стресса приводило к снижению показателя дыхательного контроля в митохондриях сердца при окислении ФАД – зависимых субстратов на 32%

($p < 0,05$) по сравнению с интактной группой митохондрий (Рис. 35). Дыхательный контроль I комплекса в митохондриях сердца крыс после инкубирования с салифеном, фенотропилом и фенибутом был на 20% ($p < 0,05$), 30% ($p < 0,05$) и 24% ($p < 0,05$) выше, по сравнению с таковыми показателями митохондрий стрессированных животных и составлял 2,68, 2,9 и 2,95 соответственно.

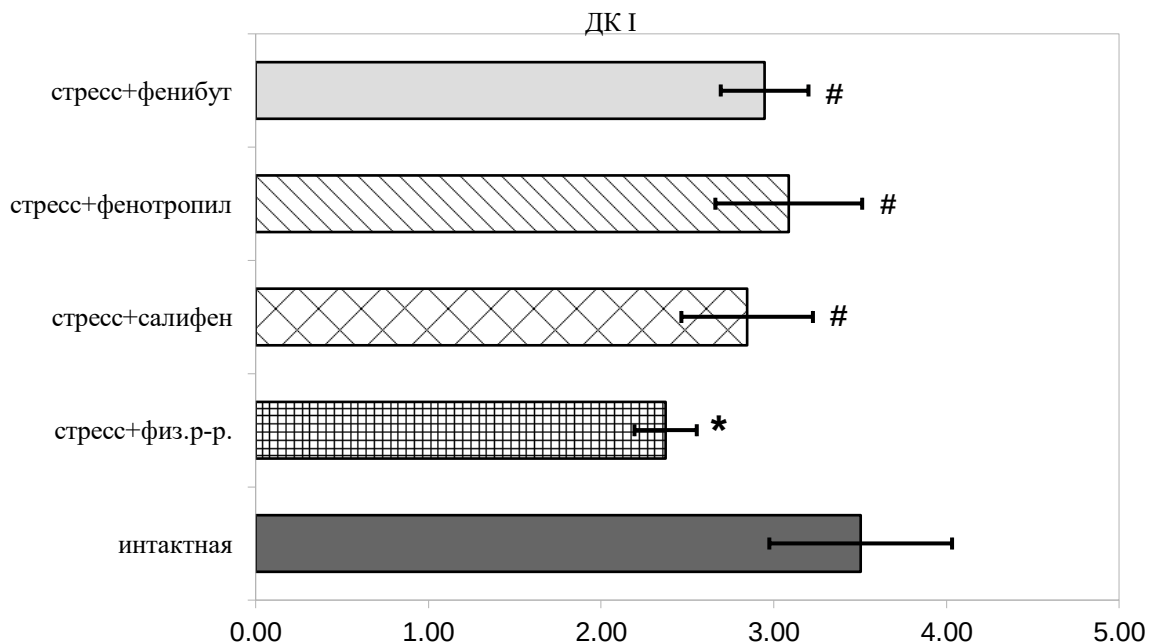


Рисунок 35. Изменение показателя дыхательного контроля I комплекса в митохондриях сердца крыс, подвергавшихся иммобилизационно-болевого стрессу, под влиянием салифена и фенотропила *in vitro* ($M \pm \sigma$).

Примечание:

изменения статистически значимы по сравнению с показателями:

*- митохондрий интактной группы (t- критерий Стьюдента, $p < 0,05$);

#- митохондрий контрольной группы (стресс+физ. р-р), (критерий Ньюмена-Кейлса, $p < 0,05$).

Дыхательный контроль при одновременном окислении субстратов I и II комплекса в контрольной группе был ниже на 38% ($p < 0,05$) по сравнению с интактной группой. Салифен, фенотропил и фенибут, добавленные к изолированным митохондриям, выделенным из сердца стрессированных крыс, способствовали повышению коэффициента дыхательного контроля на 24%, 35% и 36%, по сравнению с показателями митохондрий стрессированных животных (Рис.36).

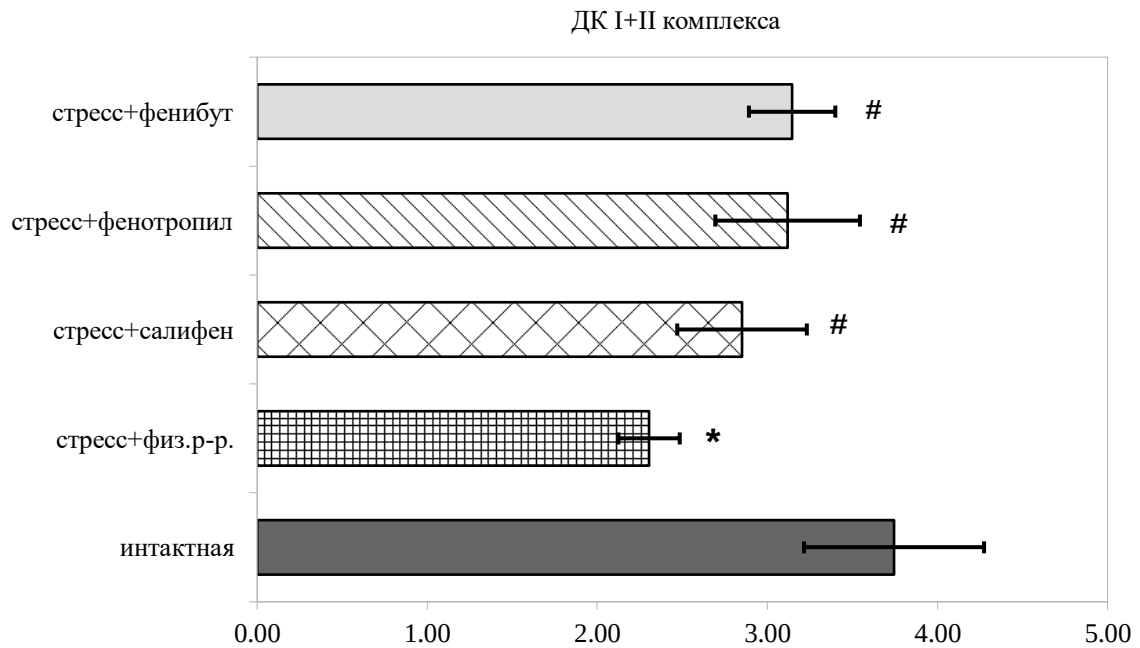


Рисунок 36. Изменение показателя дыхательного контроля I+II комплекса в митохондриях сердца крыс, подвергавшихся иммобилизационно-болевому стрессу под влиянием салифена и фенотропила *in vitro* ($M \pm \sigma$).

Примечание:

изменения статистически значимы по сравнению с показателями:

*- митохондрий сердца интактной группы (t- критерий Стьюдента, $p < 0,05$);

#- митохондрий сердца контрольной группы (стресс+физ.р-р), $p < 0,05$ (критерий Ньюмена-Кейлса, $p < 0,05$).

Соотношение скорости стимулированного дыхания к скорости дыхания после истощения АДФ при окислении ФАД – зависимых субстратов в митохондриях из сердца крыс, подвергавшихся 24 – часовому иммобилизационно-болевому стрессу, было на 29% ($p < 0,05$) ниже, чем у интактной группы. Салифен повышал ДК II комплекса митохондрий, выделенных из сердца стрессированных крыс на 15% ($p < 0,05$), фенотропил – на 25% ($p < 0,05$), а фенибут – на 26% ($p < 0,05$) относительно таковых показателей контрольной группы (Рис.37).

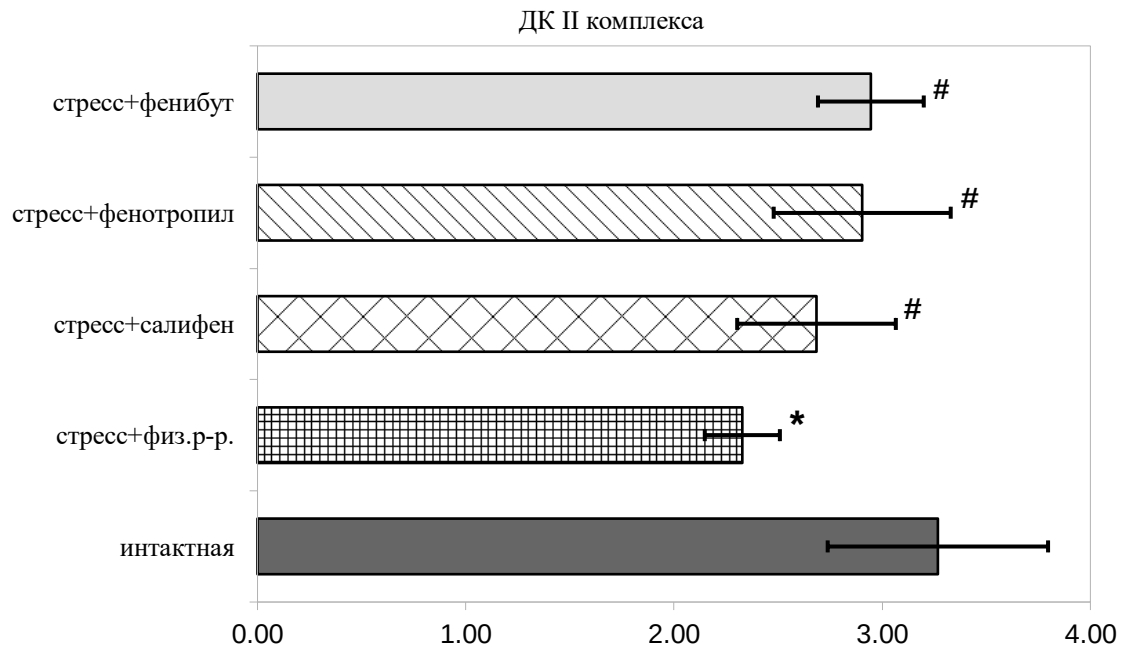


Рисунок 37. Изменение показателя дыхательного контроля II комплекса в митохондриях сердца крыс, подвергавшихся иммобилизационно-болевого стрессу под влиянием салифена и фенотропила *in vitro* ($M \pm \sigma$).

Примечание:

изменения статистически значимы по сравнению с показателями:

*- митохондрий интактной группы (t- критерий Стьюдента, $p < 0,05$);

#- митохондрий контрольной группы (стресс+физ. р-р), (критерий Ньюмена-Кейлса, $p < 0,05$).

Полученные данные свидетельствуют о выраженном повреждающем действии острого иммобилизационно-болевого стресса на функциональное состояние митохондрий сердца крыс, что сопровождается снижением уровня стимулированного дыхания и как результат – разобщением процессов окисления и фосфорилирования. Исследуемые производные ГАМК – салифен, фенотропил и фенибут ограничивают негативное действие стресса на митохондрии сердца.

3.5.1. Оценка влияния салифена и фенотропила *ex vivo* на функциональное состояние митохондрий мозга крыс, подверженных острому иммобилизационно-болевому стрессу

Воздействие 24-х часового иммобилизационно-болевого стресса приводило к снижению скорости стимулированного дыхания в митохондриях головного мозга крыс при окислении субстратов I комплекса – малат/глутамата на 49% ($p < 0,05$), по сравнению с таковым показателем митохондрий интактной группы, у которых данный показатель был равен 26,45 нМ O_2 /мин/мг белка (Рис 38). Исследуемые вещества – фенотропил, салифен и фенибут, введенные животным внутривенно за час до моделирования стресса, способствовали повышению показателя V_3 I комплекса на 58% ($p < 0,05$), 54% ($p < 0,05$) и 41% ($p < 0,05$) соответственно по сравнению с значениями митохондрий стрессированных животных и составляло 41,88 нМ O_2 /мин/мг белка; 40,80 нМ O_2 /мин/мг белка; 37,2 нМ O_2 /мин/мг белка.

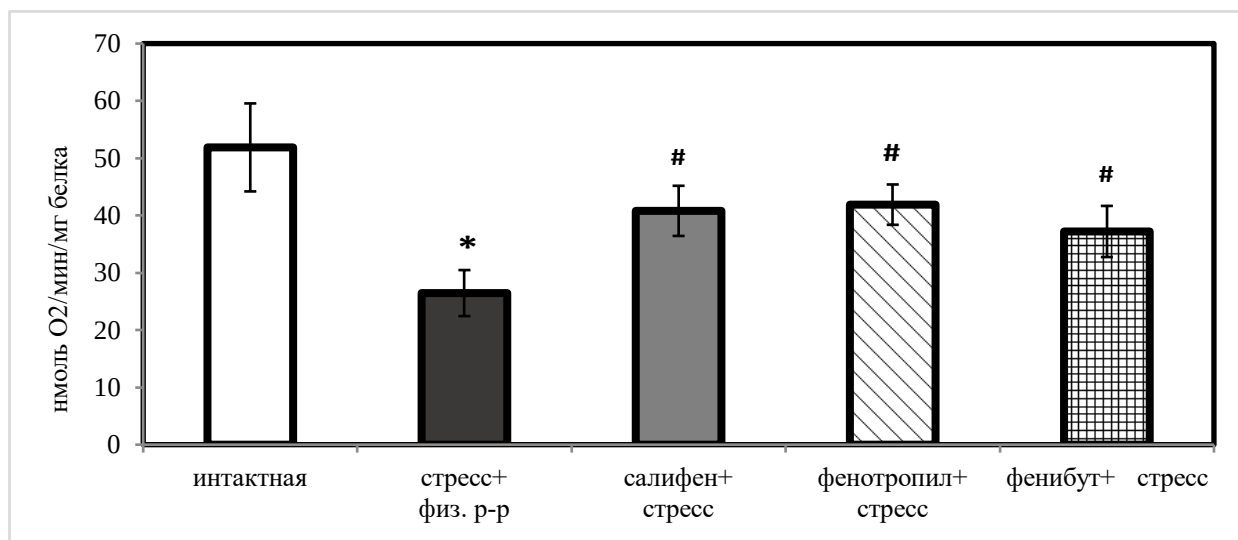


Рисунок 38. Влияние салифена и фенотропила *ex vivo* на скорость стимулированного дыхания при окислении субстратов I комплекса в митохондриях мозга крыс, подвергавшихся острому иммобилизационно-болевому стрессу ($M \pm \sigma$).

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

Потребление кислорода при одновременном окислении малат/глутамата и сукцината после добавления АДФ в митохондриях головного мозга стрессированных крыс было ниже на 55% ($p < 0,05$) по сравнению с показателем митохондрий интактной группой (Рис. 39). Фенотропил способствовал повышению V3 I+II комплекса на 71% ($p < 0,05$), при этом салифен и препарат сравнения фенибут повышали данный показатель на 78% ($p < 0,05$) и 57% ($p < 0,05$) по сравнению с показателями митохондрий стрессированных животных.

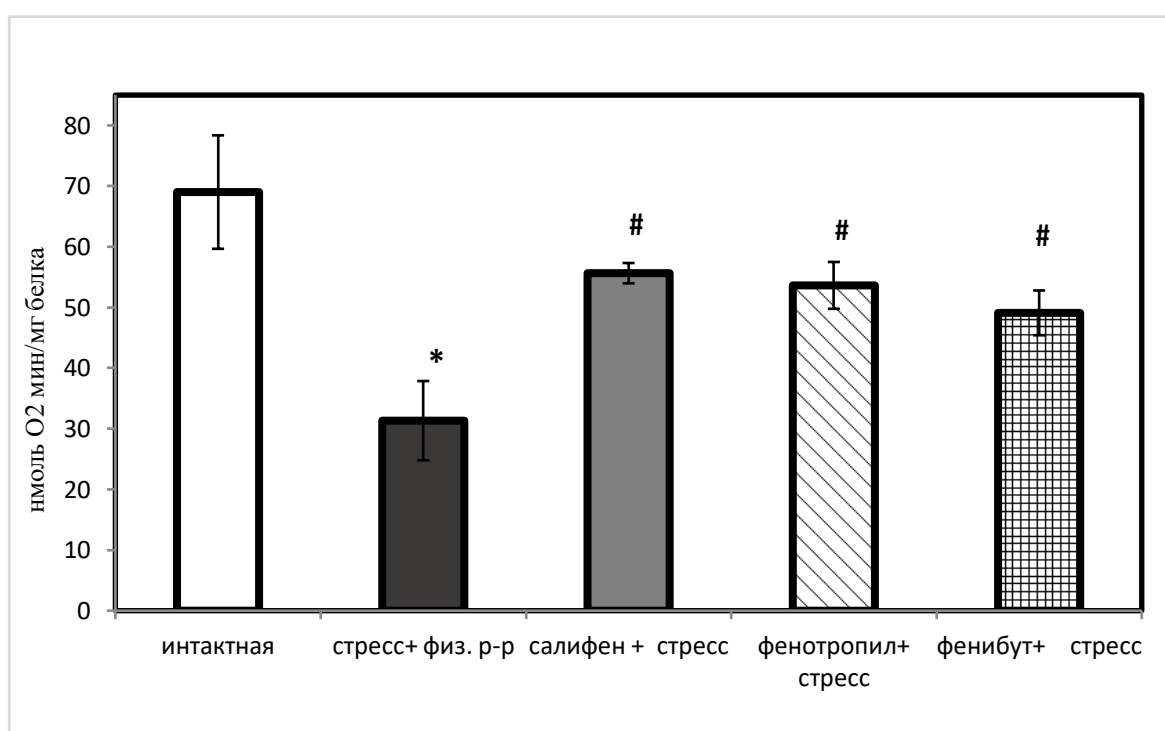


Рисунок 39. Влияние салифена и фенотропила на скорость стимулированного дыхания при окислении субстратов I+II комплекса в митохондриях мозга крыс, подвергавшихся острому иммобилизационно-болевого стрессу ($M \pm \sigma$).

Примечание:

Изменения статистически значимы относительно показателей:

**-интактной группы митохондрий (t- критерий Стьюдента, $p < 0,05$)*

#-группы митохондрий, выделенных из мозга стрессированных животных (критерий Ньюмена-Кейлса, $p < 0,05$).

Стрессирование животных приводило к снижению скорости стимулированного дыхания в митохондриях головного мозга при окислении субстрата II комплекса на 50% ($p < 0,05$) по сравнению с интактной группой и

составляло 44,73 нМ O_2 /мин/мг белка (Рис. 40). В митохондриях мозга крыс, которым за 24 часа до декапитации вводили фенотропил, салифен и фенибут показатели V3 II комплекса составляли 33,83; 34,75 и 28,95 нМ O_2 /мин/мг белка, что было на 52% ($p<0,05$), 56% ($p<0,05$) и 30% ($p<0,05$) выше, чем в контрольной группе.

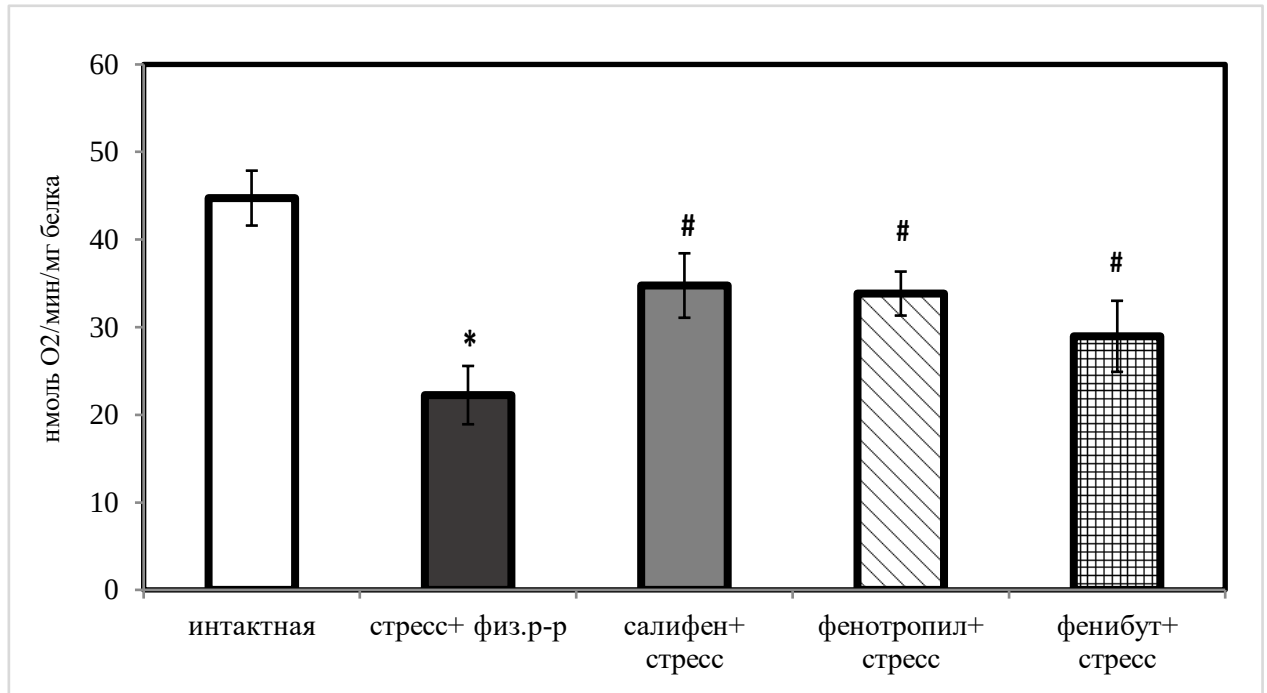


Рисунок 40. Влияние салифена и фенотропила *ex vivo* на скорость стимулированного дыхания при окислении субстратов II комплекса в митохондриях мозга крыс, подвергавшихся острому иммобилизационно-болевному стрессу ($M \pm \sigma$).

Примечание:

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 острого иммобилизационно-болевого стресса приводило к снижению скорости потребления кислорода после исчерпания АДФ при окислении субстратов I комплекса на 33% ($p<0,05$), при одновременной активации I+II — на 32% ($p<0,05$), поглощение O_2 во II комплексе снижалось на 31% по сравнению с таковым показателем митохондрий головного мозга интактных животных (Таб.6). Фенотропил способствовал повышению

показателя V4 при окислении малат/глутамата на 25 % ($p<0,05$), малат/глутамата и сукцината — на 17%, сукцината — на 24%. Исследуемый показатель в митохондриях мозга животных, которым до стрессирования вводили салифен, был выше в I комплексе на 26% ($p<0,05$), в I+II комплексах на 32% ($p<0,05$) и на 35% ($p<0,05$) – во II комплексе дыхательной цепи. В митохондриях животных, получавших фенибут, показатель V4 был выше на 7% при окислении субстратов I комплекса, на 6% при одновременном окислении субстратов I+II комплексов и на 15% при окислении субстратов II комплекса.

Таблица 7. Влияние фенотропила, салифена и фенибута *ex vivo* на скорость потребления кислорода после истощения АДФ в митохондриях мозг крыс ($M \pm \sigma$).

Группы	V4 I нМ O ₂ /мин/мг белка	V4 I+II нМ O ₂ /мин/мг белка	V4 II нМ O ₂ /мин/мг белка
Интakтная	18,93±3,78	23,54±3,98	15,42±3,08
Стресс+физ. р-р.	12,63±2,18* (-33%)	15,91±4,44* (-32%)	10,61±2,24* (-31%)
Стресс+фенотропил (25мг/кг)	15,83±2,16 [#] (+25%)	18,66±2,61 (+17%)	13,19±2,56 [#] (+24%)
Стресс +салифен (15мг/кг)	15,95±1,69 [#] (+26%)	20,97±,32 [#] (+32%)	14,29±1,23 (+35%)
Стресс+фенибут (25мг/кг)	13,55±2,07 (+7%)	16,78±1,89 (+6%)	12,22±3,63 (+15%)

Примечание:

Изменения статистически значимы относительно показателей:

**-интактной группы митохондрий (t- критерий Стьюдента, $p<0,05$)*

#-группы митохондрий, выделенных из мозга стрессированных животных (критерий Ньюмена-Кейлса, $p<0,05$).

Дыхательный контроль был рассчитан как показатель наиболее полно отражающий функциональное состояние митохондрий. Воздействие острого иммобилизационно-болевого стресса вызывало достоверное снижение

дыхательного контроля при окислении НАД-зависимых субстратами на 24% по сравнению с митохондриями интактной группы (Рис. 41). В митохондриях, выделенных из мозга животных, которым до стрессирования вводили фенотропил, салифен и фенибут, соотношение скорости стимулированного дыхания к скорости дыхания после истощения АДФ при окислении субстратов I комплекса было достоверно выше на 21%, 28% и 29% соответственно по сравнению с показателем группы стрессированных крыс.

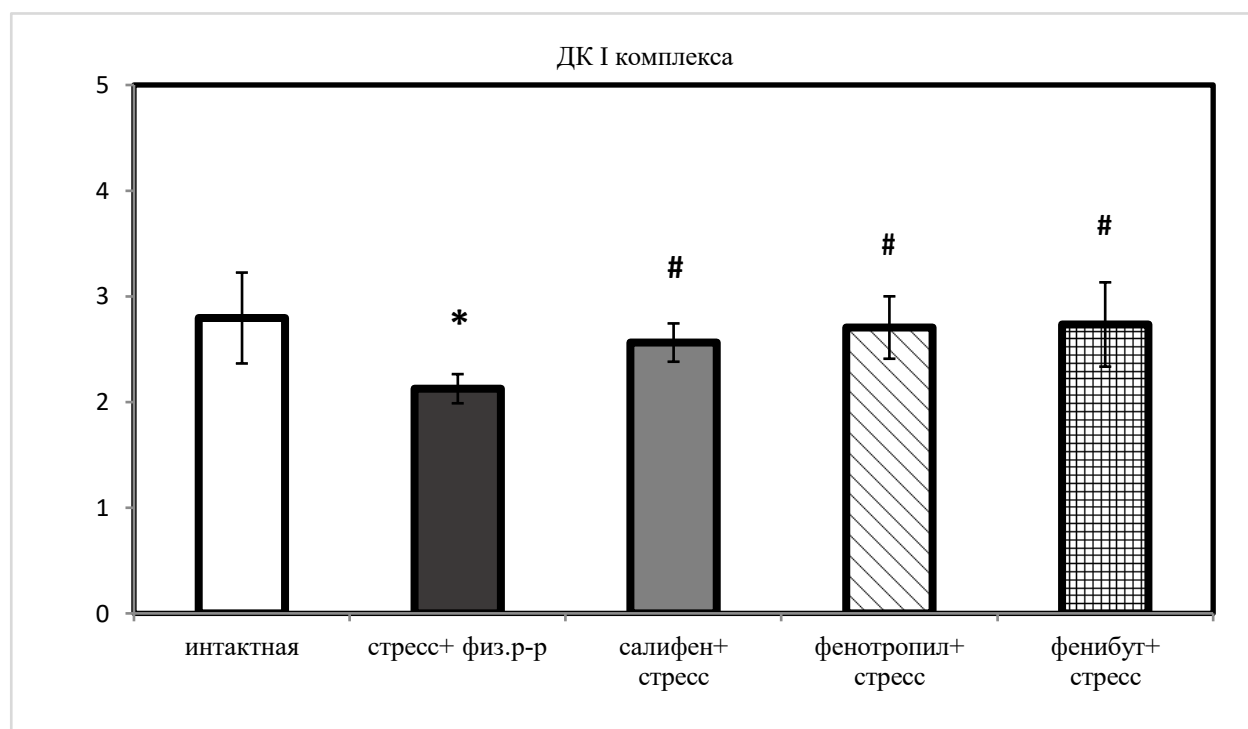


Рисунок 41. Изменение показателя дыхательного контроля при окислении субстратов I комплекса в митохондриях мозга крыс, подвергавшихся острому иммобилизационно-болевому стрессу, под влиянием салифена и фенотропила *ex vivo* ($M \pm \sigma$).

Примечание:

Изменения статистически значимы относительно показателей:

**-интактной группы митохондрий (t- критерий Стьюдента, $p < 0,05$)*

#-группы митохондрий, выделенных из мозга стрессированных животных (критерий Ньюмена-Кейлса, $p < 0,05$).

24 – часовой острый стресс вызывал снижение показателя дыхательного контроля при окислении малат/глутамата и сукцината на 31% ($p < 0,05$) по сравнению с показателем интактной группы животных (Рис. 42). Фенотропил, салифен и фенибут, введенные животным до стрессирования

способствовали повышению анализируемого показателя на 26% ($p<0,05$), 17% ($p<0,05$) и 29% ($p<0,05$) соответственно.

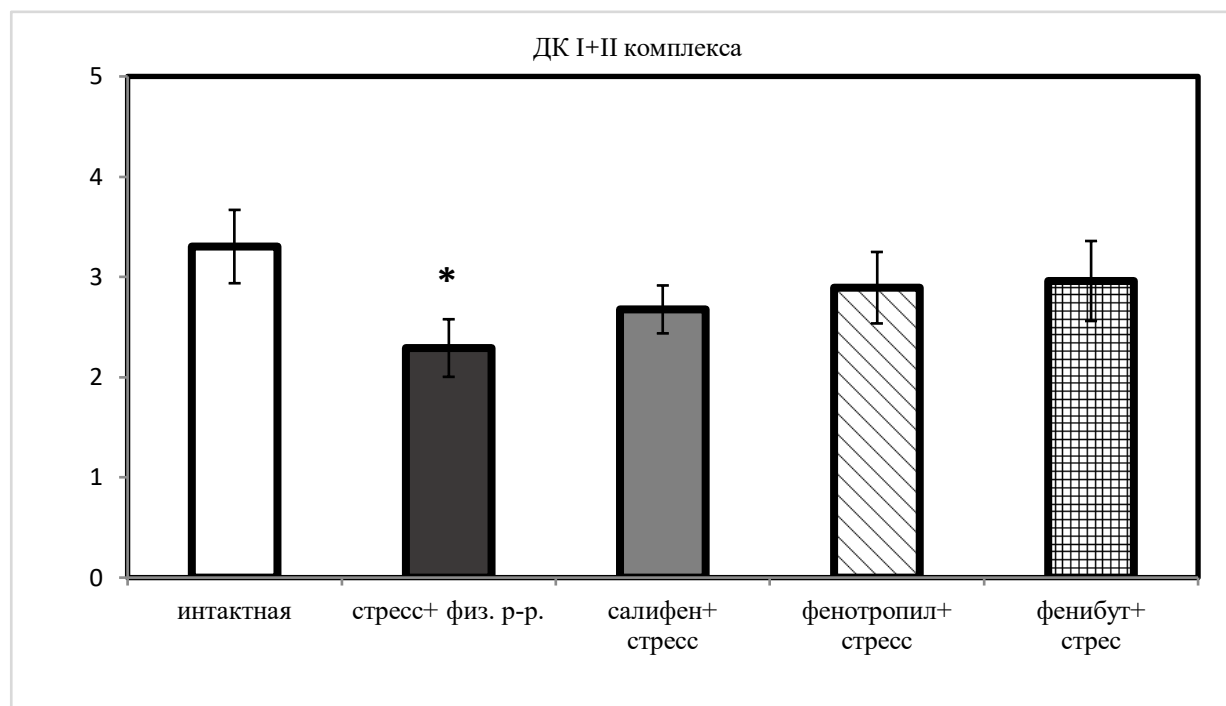


Рисунок 42. Изменение показателя дыхательного контроля при окислении субстратов I+II комплекса в митохондриях мозга крыс, подвергавшихся острому иммобилизационно-болевному стрессу, под влиянием салифена и фенотропила *ex vivo* ($M \pm \sigma$).

Примечание:

Изменения статистически значимы относительно показателей:

**-интактной группы митохондрий (t- критерий Стьюдента, $p<0,05$)*

#-группы митохондрий, выделенных из мозга стрессированных животных (критерий Ньюмена-Кейлса, $p<0,05$).

Соотношение скорости стимулированного дыхания к скорости дыхания после истощения АДФ в митохондриях из головного мозга стрессированных крыс при окислении сукцината было ниже на 31% ($p<0,05$), чем в митохондриях интактной группы (Рис 43). В митохондриях мозга животных, которым до моделирования стресса вводили фенотропил, салифен и фенибут, показатель дыхательного контроля II комплекса был выше на 28% ($p<0,05$), 13% и 26% ($p<0,05$) соответственно по сравнению с показателем из митохондрий стрессированных животных.

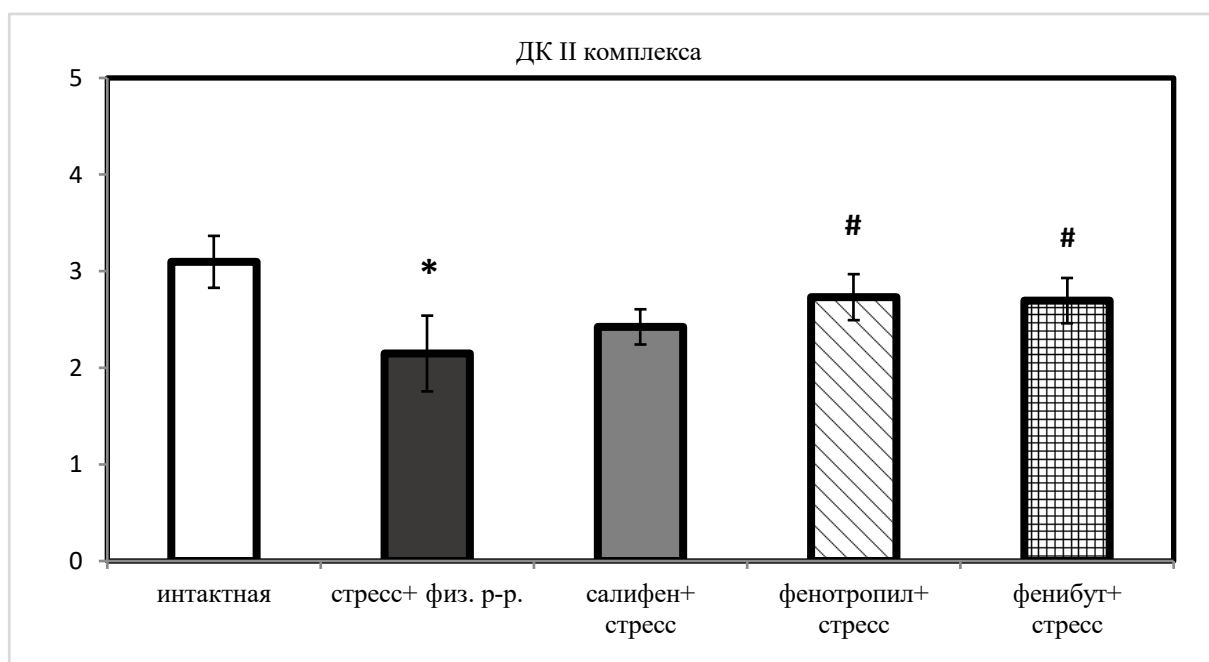


Рисунок 43. Изменение показателя дыхательного контроля при окислении субстратов II комплекса в митохондриях мозга крыс, подвергавшихся острому иммобилизационно-болевого стрессу, под влиянием салифена и фенотропила *ex vivo* ($M \pm \sigma$).

Примечание:

Изменения статистически значимы относительно показателей:

**-интактной группы митохондрий (t- критерий Стьюдента, $p < 0,05$)*

#-группы митохондрий, выделенных из мозга стрессированных животных (критерий Ньюмена-Кейлса, $p < 0,05$).

3.5.2. Оценка влияния салифена и фенотропила *ex vivo* на функциональное состояние митохондрий сердца крыс, подверженных острому иммобилизационно-болевого стрессу

Моделирование острого иммобилизационно - болевого стресса приводило к статистически значимому снижению скорости стимулированного дыхания при окислении НАД - зависимых субстратов на 45% по сравнению с митохондриями интактной группы и была равна 53,23 нМ O_2 /мин/мг белка. Фенотропил, салифен и фенибут, введённые животным до стрессирования, способствовали значимому повышению скорости стимулированного дыхания I комплекса на 62%, 73% и 45%, по сравнению с таковым показателем митохондрий контрольной группы животных и

составляли 47,76; 51,0 и 42,6 нМ О₂ /мин/мг белка соответственно (Рис. 44).

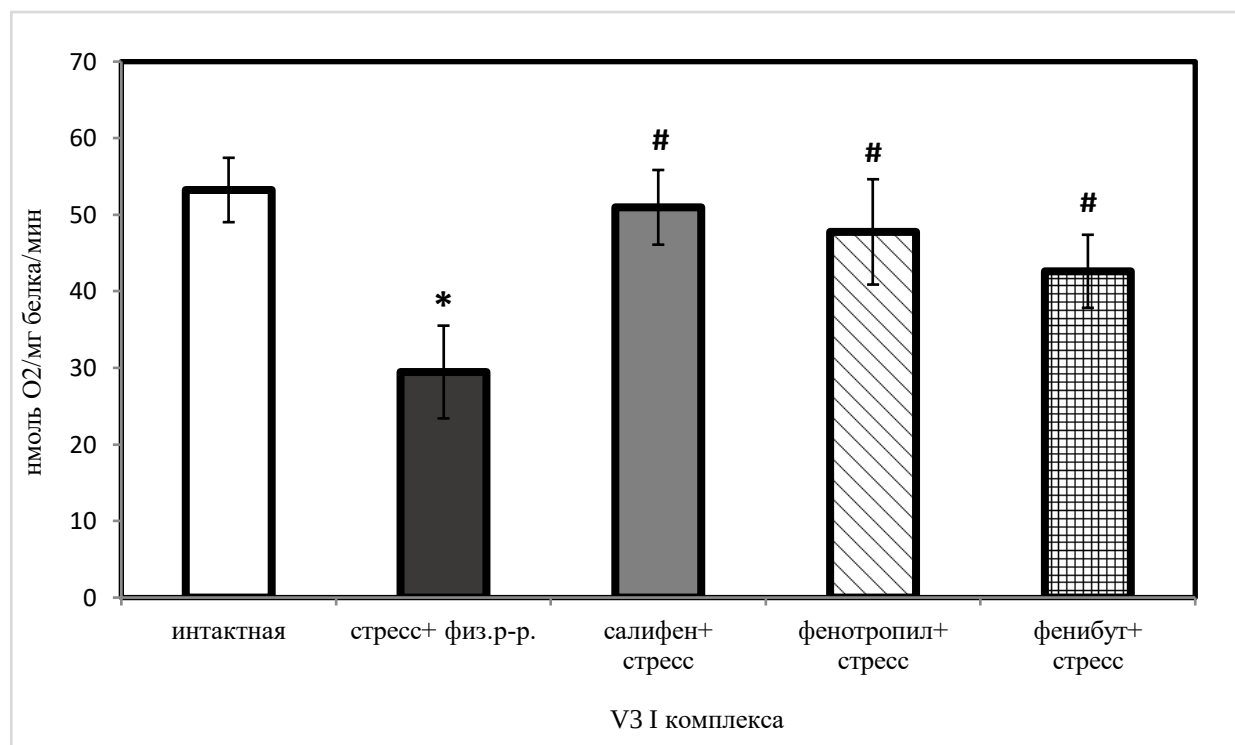


Рисунок 44. Изменение показателя дыхательного контроля при окислении субстратов I комплекса в митохондриях сердца крыс, подвергавшихся острому иммобилизационно-болевого стрессу, под влиянием салифена и фенотропила *ex vivo* на показатель ($M \pm \sigma$).

Примечание:

Изменения статистически значимы относительно показателей:

**-интактной группы митохондрий (t - критерий Стьюдента, $p < 0,05$)*

#-группы митохондрий, выделенных из сердца стрессированных животных (критерий Ньюмена-Кейлса, $p < 0,05$).

В митохондриях сердца крыс, подвергавшихся стрессовому воздействию, скорость стимулированного дыхания при одновременном внесении в полярографическую ячейку субстратов I+II комплексов, снижалась на 50% ($p < 0,05$), по сравнению с таковым показателем митохондрий интактной группы и была равна 76,84 нМ О₂/мин/мг белка (Рис 45). В митохондриях сердца крыс, получавших исследуемые вещества, V3 при окислении НАД – и ФАД — зависимых субстратов составляло 63,3 нМ О₂/мин/мг белка после введения фенотропила, 74,26 нМ О₂ /мин/мг белка после введения салифена и 56,92 нМ О₂/мин/мг белка после введения

фенибута, что было на 65% ($p<0,05$), 93% ($p<0,05$) и 48 % ($p<0,05$) выше, чем в митохондриях стрессированных животных.

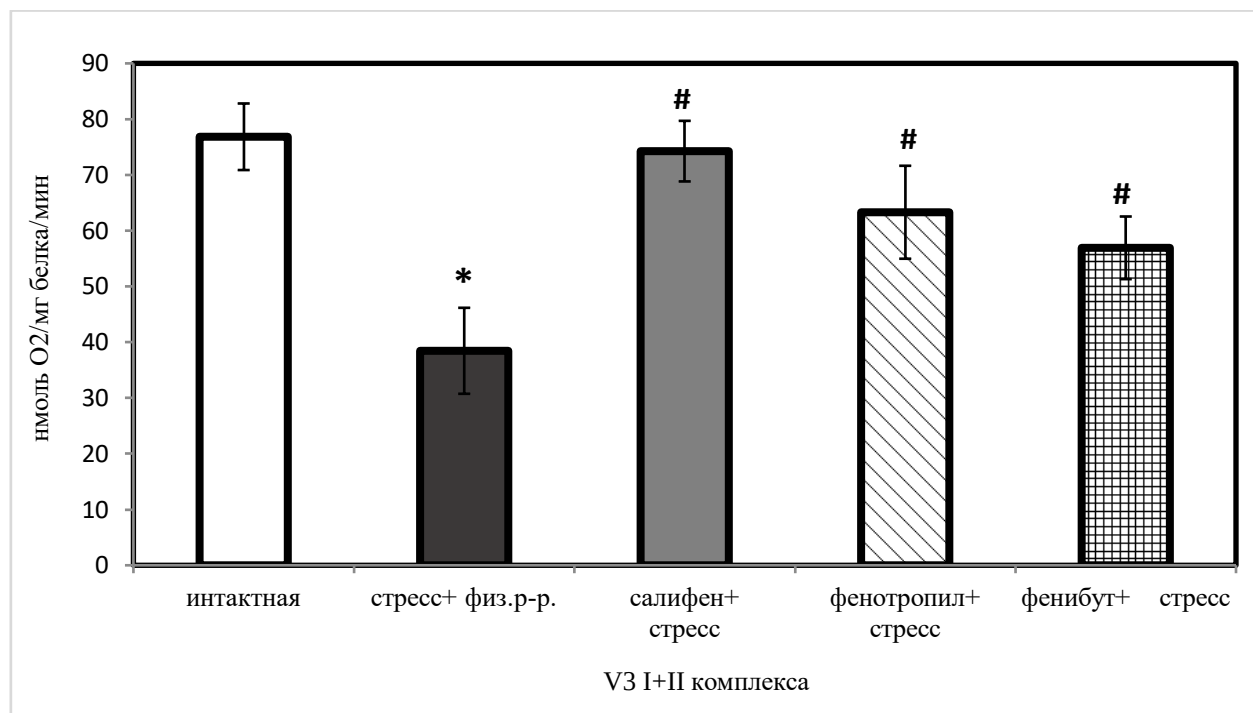


Рисунок 45. Влияние салифена и фенотропила *ex vivo* на скорость стимулированного дыхания при окислении субстратов I+II комплексов в митохондриях сердца крыс, подверженных острому иммобилизационно-болевному стрессу ($M \pm \sigma$).

Примечание:

Изменения статистически значимы относительно показателей:

**-интактной группы митохондрий (t- критерий Стьюдента, $p<0,05$)*

#-группы митохондрий, выделенных из сердца стрессированных животных (критерий Ньюмена-Кейлса, $p<0,05$).

Воздействие острого стресса приводило к снижению потребления кислорода при окислении ФАД — зависимых субстратов в присутствии АДФ на 47,5% ($p<0,05$) по сравнению с митохондриями интактной группы, у которых данный показатель был равен 44,19 нМ O₂/мин/мг белка (Рис. 46). У животных, получавших до моделирования стресса исследуемые вещества, поглощение O₂ улучшалось. Так, скорость стимулированного дыхания во II комплексе митохондрий сердца животных, которым был введен фенотропил составлял 41,54 нМ O₂/мин/мг белка, салифен - 40,53 нМ O₂/мин/мг белка, а фенибут - 34,96 нМ O₂/мин/мг белка, что было на 79%($p<0,05$), 75% и 51%

($p < 0,05$) выше по сравнению с таковым показателем контрольной группы (23,18 нМ O_2 /мин/мг белка).

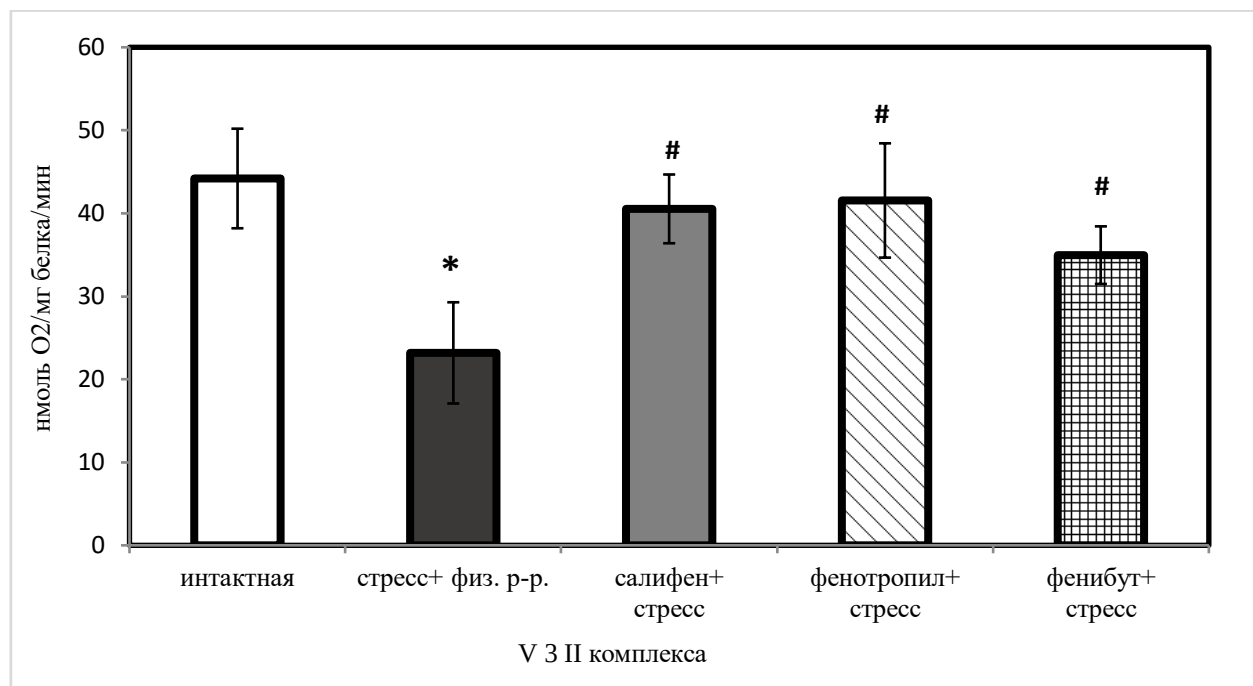


Рисунок 46. Влияние салифена и фенотропила *ex vivo* на скорость стимулированного дыхания при окислении субстратов II комплекса в митохондриях мозга крыс, подверженных острому иммобилизационно-болевому стрессу ($M \pm \sigma$).

Примечание:

Изменения статистически значимы относительно показателей:

**-интактной группы митохондрий (t- критерий Стьюдента, $p < 0,05$)*

#-группы митохондрий, выделенных из сердца стрессированных животных (критерий Ньюмена-Кейлса, $p < 0,05$).

При измерении скорости потребления кислорода после истощения, внесенного в ячейку АДФ, в митохондриях из сердца стрессированных животных наблюдалась тенденция к снижению показателя V4. В I комплексе поглощение O_2 снизилось на 32%, в I+II комплексах – на 36%, а во II комплексе – на 35%. Потребление кислорода в митохондриях, выделенных из сердца животных, которым вводили фенотропил при окислении НАД – зависимых субстратов было выше на 26%, при одновременном окислении НАД — и ФАД — зависимых субстратов данный показатель повышался на 37%. Салифен, введенный животным до стрессирования, способствовал

статистически значимому повышению данного показателя в I комплексе – на 77% ($p<0,05$), в I+II комплексов – на 87 % ($p<0,05$), а во II комплексе – на 88 % ($p<0,05$). Фенибут повышал V4 при окислении НАД — зависимых субстратов на 40%, при окислении НАД — и ФАД — зависимых субстратов – на 56%, а при окислении ФАД — зависимых субстратов – на 45% (таб.).

Таблица 8. Влияние фенотропила, салифена и фенибута *ex vivo* на скорость потребления кислорода после истощения АДФ в митохондриях сердца крыс, подверженных острому иммобилизационно-болевого стрессу Me (Q_1 ; Q_3).

Исследуемые показатели Группы	V4 I нМ O ₂ /мин/мг белка	V4 I+II нМ O ₂ /мин/мг белка	V4 II нМ O ₂ /мин/мг белка
Интактные митохондрии	18,23 (10,66; 19,27)	22,41 (18,10;23,53)	14,34 (13,55;16,93)
Стресс+физ. р-р.	12,42 (10,28;13,11) (-32%)	14,28 (13,32;14,74) (-36%)	9,304 (7,32;14,00) (-35%)
Стресс +салифен (15 мг/кг)	22,00 (19,56;23,79) [#] (+77%)	26,75 (24,60;32,22) [#] (+87%)	16,99 (14,72;18,76) [#] (+88%)
Стресс+фенотропил (25 мг/кг)	15,61 (13,96;19,36) (+26%)	19,50 (16,27;23,23) (+37%)	12,37 (10,26;17,39) (+37%)
Стресс+фенибут (25 мг/кг)	17,36 (12,53;20,31) (+40%)	22,20 (14,64;23,11) (+56%)	13,43 (10,50;13,71) (+45%)

Примечание:

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 24 — часового острого стресса приводило к снижению показателя дыхательного контроля в митохондриях сердца животных при окислении малат/глутамата на 38% ($p<0,05$). У животных, получавших до моделирования острого иммобилизационно-болевого стресса салифен, дыхательный контроль повышался на 8%. Фенотропил и фенибут повышали

исследуемый показатель 36% ($p<0,05$) и 18% ($p<0,05$) соответственно по сравнению с таковым показателем группы негативного контроля (Рис.47).

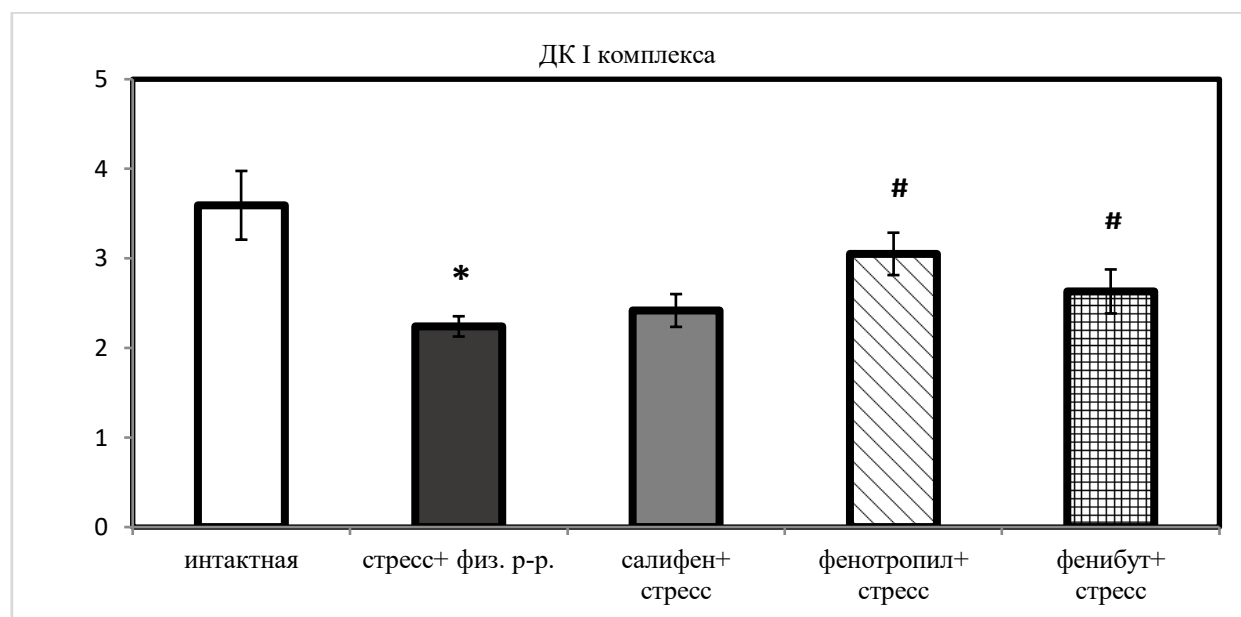


Рисунок 47. Изменение показателя дыхательного контроля при окислении субстратов I комплекса в митохондриях мозга крыс, подвергавшихся острому иммобилизационно-болевному стрессу, под влиянием салифена и фенотропила *ex vivo* ($M \pm \sigma$).

Примечание:

Изменения статистически значимы относительно показателей:

**-интактной группы митохондрий (t- критерий Стьюдента, $p<0,05$)*

#-группы митохондрий, выделенных из сердца стрессированных животных (критерий Ньюмена-Кейлса, $p<0,05$).

Соотношение скорости стимулированного дыхания к скорости дыхания после истощения АДФ при одновременном окислении НАД — и ФАД — зависимых субстратов в митохондриях из сердца стрессированных крыс равнялось 2,29, что было на 39% ($p<0,05$) ниже, чем в митохондриях интактных животных, у которых данный показатель составлял 3,73 (Рис.48). Салифена способствовал повышению показателя дыхательного контроля для I+II комплексов на 23% ($p<0,05$) и был равен 2,81. Фенотропил улучшал функциональное состояние митохондрий, о чем свидетельствует повышение показателя дыхательного контроля на 38% ($p<0,05$). В митохондриях сердца животных, которые получали фенибут, соотношение V3/V4 было выше на

27% ($p < 0,05$) по сравнению с показателем стрессированных животных.

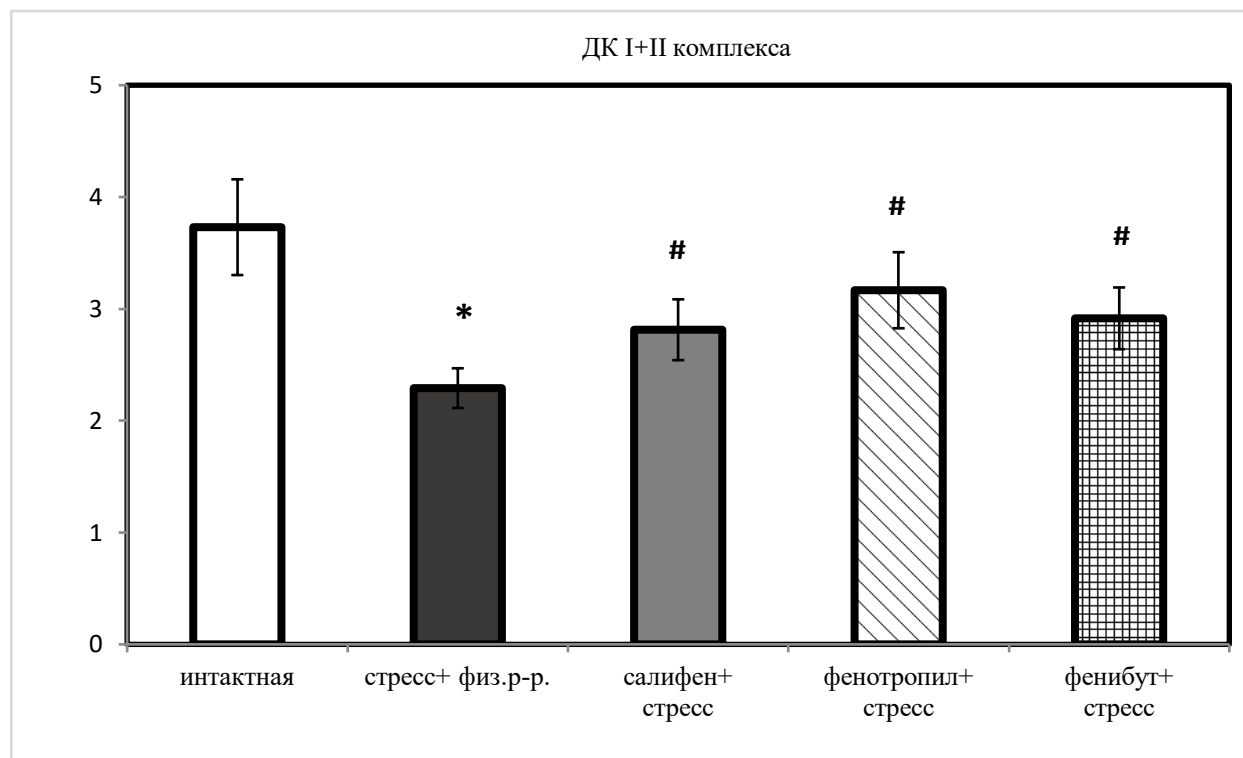


Рисунок 48. Изменение показателя дыхательного контроля при окислении субстратов I+II комплекса в митохондриях мозга крыс, подвергавшихся острому иммобилизационно-болевному стрессу, под влиянием салифена и фенотропила *ex vivo* ($M \pm \sigma$).

Примечание:

Изменения статистически значимы относительно показателей:

**-интактной группы митохондрий (t- критерий Стьюдента, $p < 0,05$)*

#-группы митохондрий, выделенных из сердца стрессированных животных (критерий Ньюмена-Кейлса, $p < 0,05$).

Острое стрессорное воздействие на животных вызывало снижение сопряжения процессов окисления и фосфорилирования в митохондриях сердца крыс, что выражалось в уменьшении показателя дыхательного контроля при окислении субстратов I комплекса на 22% ($p < 0,05$) (Рис.49). Салифен способствовал повышению соотношения скорости стимулированного дыхания к скорости дыхания после истощения АДФ во II комплексе на 6% и составляло 2,48. ДК II комплекса у стрессированных животных, которым вводили фенотропил и фенибут составлял 3,12 и 2,83, что было выше на 33% ($p < 0,05$) и 20% ($p < 0,05$) соответственно, по сравнению

с таковым значением митохондрий из сердца стрессированных животных.

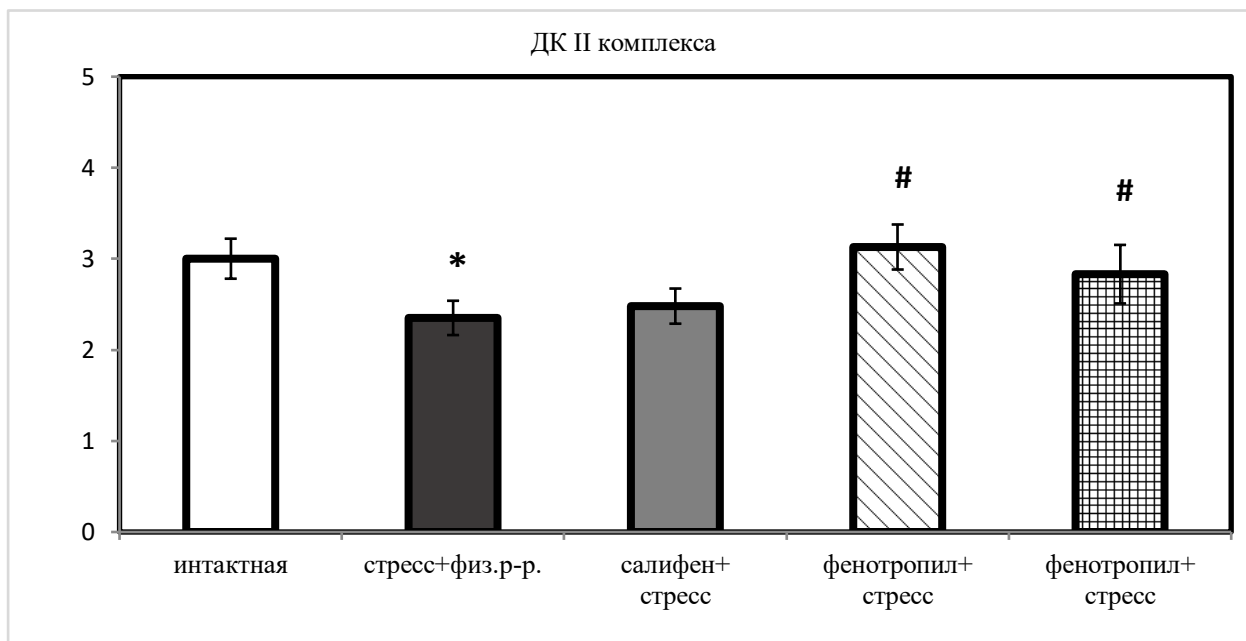


Рисунок 49. Изменение показателя дыхательного контроля при окислении субстратов II комплекса в митохондриях мозга крыс, подвергавшихся острому иммобилизационно-болевого стрессу, под влиянием салифена и фенотропила *ex vivo* ($M \pm \sigma$).

Примечание:

Изменения статистически значимы относительно показателей:

**-интактной группы митохондрий (t- критерий Стьюдента, $p < 0,05$)*

#-группы митохондрий, выделенных из сердца стрессированных животных (критерий Ньюмена-Кейлса, $p < 0,05$).

3.6.1. Оценка влияния салифена и фенотропила *ex vivo* на функциональное состояние митохондрий мозга крыс, подвергавшихся острой алкогольной интоксикации

При изучении влияния острой алкогольной интоксикации на функциональную активность митохондрий мозга было установлено, что однократное введение этанола в дозе 4 мг/кг снижает скорость эндогенного дыхания. Потребление кислорода в состоянии V1 в митохондриях контрольной группы было на 20% ниже, чем у интактной группы (Таб. 9). Салифен, фенотропил и милдронат, введённые животным за 10 минут до моделирования ОАИ, способствовали значимому повышению данного показателя на 22%, 21% и 19% соответственно относительно контрольной

группы. Скорость поглощения кислорода в состоянии V2 в контрольной группе была на 13% ($p<0,05$) ниже, чем у интактных митохондрий. Салифен, введенный животным до моделирования ОАИ, способствовал повышению показателя V2 на 20% ($p<0,05$), фенотропил повышал данный показатель на 11% ($p<0,05$), а милдроната — на 5%. Скорость потребления кислорода при окислении НАДН – зависимых субстратов в присутствии АДФ в контрольной группе была на 25% ($p<0,05$) ниже, чем у интактных. Салифен повышал показатель V3 I комплекса на 20% ($p<0,05$), фенотропил – на 20%, а милдронат – на 19% относительно таковых показателей контрольной группы.

В митохондриях мозга крыс, подвергавшихся острой алкогольной интоксикации, скорость стимулированного дыхания при одновременном внесении в полярографическую ячейку субстратов I и II комплексов, снижалась на 27% ($p<0,05$) по сравнению с таковым показателем митохондрий интактной группы. У животных, получавших исследуемые вещества — фенотропил, салифен и милдронат, скорость стимулированного дыхания при окислении НАД – и ФАД — зависимых субстратов значимо повышалась на 20 %, 19 % и 24 % соответственно.

Для регистрации потребления кислорода во II комплексе дыхательной цепи митохондрий в полярографическую ячейку вносили ротенон. После добавления АДФ скорость поглощения O_2 во II комплексе митохондрий мозга животных с ОАИ была значимо ниже на 34% по сравнению с показателями интактной группы. Салифен и фенотропил, введенные животным до моделирования острой алкогольной интоксикации, способствовали статистически значимому повышению скорости поглощения кислорода на 19% и 27% соответственно. Препарат сравнения милдронат повышал данный показатель на 26% ($p<0,05$).

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 комплекса в митохондриях мозга крыс на 19%, по сравнению интактной группой. В митохондриях мозга животных, которым до алкоголизации вводили салифен, ДК I комплекса был на 21% выше, чем у контрольной группы. Фенотропил и милдронат повышали данный показатель на 22% ($p<0,05$) и 19% ($p<0,05$).

Показатель ДК в митохондриях мозга крыс, подвергавшихся ОАИ при одновременном окислении субстратов I+II комплексов дыхательной цепи, значимо снижался на 18% ($p<0,05$) по сравнению интактной группой. Производные ГАМК — салифен, фенотропил и милдронат, введенные животным за 10 минут до моделирования ОАИ способствовал улучшению функционального состояния митохондрий, о чем свидетельствует повышение ДК на 10% ($p<0,05$), 15% ($p<0,05$) и 17% ($p<0,05$) соответственно.

ДК II комплекса митохондрий контрольной группы был на 20% ниже интактной группы. Салифен способствовал повышению показателя ДК II комплекса на 14% ($p<0,05$), фенотропил — на 19% ($p<0,05$), а милдронат — на 12%.

Таблица 9. Влияние салифена и фенотропила на функциональную активность митохондрий головного мозга крыс, подвергавшихся острой алкогольной интоксикации ($M \pm \sigma$).

Исследуемые показатели группы	V1 нМ O ₂ /мин/мг белка	V2 нМ O ₂ /мин/мг белка	V3(I) нМ O ₂ /мин/мг белка	V4(I) нМ O ₂ /мин/мг белка	V3(I+II) нМ O ₂ /мин/мг белка	V4(I+II) нМ O ₂ /мин/мг белка	V3(II) нМ O ₂ /мин/мг белка	V4(II) нМ O ₂ /мин/мг белка	ДК(I)	ДК(I+II)	ДК(II)
Интактная	25,36±2,18	30,10±2,46	44,81±2,8	17,63±1,54	58,54±4,67	22,72±1,67	50,25±3,32	19,1±1,9	2,54±0,16	2,57±0,16	2,63±0,17
ОАИ+физ. р-р	20,21±2,06 [#] (-20%)	26,11±2,04 [#] (-13%)	33,56±3,14 [#] (-25%)	16,36±1,88 (-7%)	42,63±3,06 [#] (-27%)	20,07±1,56 (-12%)	33,04±2,5 [#] (-34%)	15,61±1,62 [#] (-18%)	2,05±0,15 [#] (-19%)	2,12±0,11 [#] (-18%)	2,11±0,07 [#] (-20%)
ОАИ+ салифен	24,67±1,98 *(+22%)	30,87±3,76* (+18%)	40,11±2,81* (+20%)	16,21±1,05 (-1%)	50,78±1,72* (+19%)	21,68±1,07 (+8%)	39,17±4,67 (+19%)	16,23±2,17 (+5%)	2,47±0,15* (+21%)	2,34±0,08* (+10%)	2,41±0,12* (+14%)
ОАИ+ фенотропил	24,36±1,64 *(+21%)	29,05±2,06* (+11%)	39,89±4,75 (+19%)	15,98±1,28 (-3%)	51,32±1,66* (+20%)	20,99±2,01 (+4%)	42,00±5,19* (+27%)	16,78±2,43 (+8%)	2,49±0,15* (+22%)	2,44±0,11* (+15%)	2,50±0,15* (+19%)
ОАИ+ милдронат	24,04±1,75 *(+19%)	27,38±1,52 (+5%)	40,71±4,09 (+21%)	16,64±1,64 (+2%)	52,71±3,85* (+24%)	21,23±1,6 (+6%)	41,56±5,25* (+26%)	17,6±2,33 (+13%)	2,44±0,09* (+19%)	2,48±0,14* (+17%)	2,36±0,21 (+12%)

Примечание:

Изменения статистически значимы относительно показателей:

[#]-интактной группы митохондрий (t- критерий Стьюдента, $p < 0,05$)

*-группы митохондрий, выделенных из головного мозга животных, подвергавшихся острой алкогольной интоксикации (критерий Ньюмена-Кейлса, $p < 0,05$).

3.6.2. Оценка влияния салифена и фенотропила *ex vivo* на функциональное состояние митохондрий сердца крыс, подвергавшихся острой алкогольной интоксикации

Для изучения влияния острой алкогольной интоксикации на функциональное состояние митохондрий сердца крыс, животным однократно перорально вводили этанол в концентрации 4 г/кг. Было изучено влияние производных ГАМК на инотропные резервы сердца при острой алкогольной интоксикации. В экспериментальных исследованиях помимо функциональной активности митохондрий рассматривали кардиопротективные свойства исследуемых производных ГАМК. Было установлено, что острая алкогольная интоксикация животных приводит к уменьшению сократительной способности миокарда при увеличении преднагрузки, снижению скорости сокращения и расслабления миокарда, понижению левожелудочкового давления во время окклюзии восходящей части дуги аорты во время проведения нагрузки. Все это может свидетельствовать о снижении функциональных резервов сердца [Кустова М. В., 2021; Кустова М. В., Перфилова В. Н., 2021].

В митохондриях сердца наблюдалось уменьшение скорости эндогенного дыхания на 15% (Таб. 10). Салифен, фенотропил и милдронат способствовали повышению скорости эндогенного дыхания на 9%, 19% и 15% соответственно. Поглощение кислорода после добавления малата в митохондриях контрольной группы было на 22% ниже относительно интактной группы. В митохондриях, выделенных из сердца животных, которым вводили салифен, фенотропил и милдронат, показатель V_2 был выше на 9%, 19% ($p < 0,05$) и 10% соответственно по сравнению с таковыми показателями контрольной группы. Скорость стимулированного дыхания в митохондриях сердца животных контрольной группы при окислении субстратов I комплекса была на 23% ниже, чем у интактных животных. Салифен, введенный животным до моделирования острой алкогольной интоксикацией, способствовал

повышению скорости стимулированного дыхания на 18% ($p<0,05$), фенотропил увеличивал данный показатель на 15%, а милдронат (препарат сравнения) – на 11%. Потребление кислорода при одновременном активировании I и II комплексов в митохондриях сердца животных, подвергавшихся острой алкогольной интоксикации, было значимо ниже на 15% по сравнению с интактной группой митохондрий. В митохондриях сердца животных, которым до моделирования ОАИ вводили салифен ($p < 0, 05$) и фенотропил, показатель V3 I+II комплексов повышался на 11%, а после введения милдроната – на 13% ($p<0,05$). Потребление O_2 во II комплексе в митохондриях контрольной группы было достоверно на 17% ниже, по сравнению с интактными митохондриями. Кратковременное воздействие салифена, фенотропила и милдроната *ex vivo* способствовало повышению скорости стимулированного дыхания II комплекса на 20% ($p<0,05$), 14% и 18% ($p<0,05$) соответственно по сравнению с контрольной группой. Статистически значимых отличий в скорости поглощения кислорода в изучаемых группах митохондрий при окислении субстратов I и II комплексов после исчерпания экзогенного АДФ не было выявлено. Показатель дыхательного контроля при окислении субстратов I комплекса в митохондриях животных, подвергавшихся однократной острой алкогольной интоксикации, был на 21% ($p<0,05$) ниже, по сравнению с интактной группой митохондрий. Салифен и фенотропил, введенные животным до моделирования ОАИ способствовали повышению показателя ДК на 17% ($p<0,05$), а милдронат – на 23% ($p<0,05$) по сравнению с контрольной группой. Острая алкогольная интоксикация животных приводила к значимому снижению показателя ДК при окислении субстратов I+II комплексов на 20%. Салифен, фенотропил и милдронат значимо повышали ДК I+II комплексов на 18%, 24% и 18% соответственно, по сравнению с таковым показателем контрольной группы. Дыхательный контроль II комплекса в митохондриях контрольной группы был значимо ниже на 26%, чем у интактных митохондрий. Салифен способствовал повышению ДК II комплекса на 16% ($p<0,05$), фенотропил и милдронат

увеличивали данный показатель на 22% ($p < 0,05$) по сравнению с показателями митохондрий контрольной группой.

Таблица 10. Влияние салифена и фенотропила на функциональную активность митохондрий сердца крыс, подвергавшихся острой алкогольной интоксикации ($M \pm \sigma$).

Исследуемые показатели группы	V1 нМ O ₂ /мин/мг белка	V2 нМ O ₂ /мин/мг белка	V3(I) нМ O ₂ /мин/мг белка	V4(I) нМ O ₂ /мин/мг белка	V3(I+II) нМ O ₂ /мин/мг белка	V4(I+II) нМ O ₂ /мин/мг белка	V3(II) нМ O ₂ /мин/мг белка	V4(II) нМ O ₂ /мин/мг белка	ДК(I)	ДК(I+II)	ДК(II)
Интактная+физ. р-р	25,23±2,4 3	32,26±3,0	47,46±4,96	18,53±2,0 4	57,30±3,39	21,67±1,47	44,21±1,85	15,92±0,5 2	2,56±0,17	2,64±0,11	2,77±0,08
Контроль+физ. р- р	21,38±4,3 8 (-15%)	25,15±3,35 [#] (-22%)	36,12±3,48 [#] (-23%)	17,81±1,4 2 (-4%)	48,73±3,07 [#] (15%)	23,11±2,13 (+7%)	36,84±3,85 [#] (-17%)	17,96±1,9 1 (+13%)	2,02±0,11 [#] (-21%)	2,11±0,14 [#] (-20%)	2,05±0,11 [#] (-26%)
ОАИ + салифен	23,34±2,6 (+9%)	27,49±2,11 (+9%)	42,65±2,27* (+18%)	17,94±1,8 4(+1%)	53,93±2,68* (+11%)	21,71±1,22 (-6%)	44,32±2,90* (+20%)	18,65±1,4 9(+3%)	2,37±0,13 *(+17%)	2,48±0,14 *(+18%)	2,37±0,15(+16%)
ОАИ+ фенотропил	25,48±1,8 (+19%)	29,87±2,74* (+19%)	41,56±3,16 (+15%)	16,67±1,8 2(-7%)	53,85±3,25 (+11%)	20,58±1,73 (-11%)	41,94±4,44 (+14%)	16,77±2,1 4(-7%)	2,49±0,16 *(+23%)	2,61±0,15* (+24%)	2,5±0,15* (+22%)
ОАИ+ милдронат	24,58±1,1 7(+15%)	27,66±3,5 (+10%)	40,19±2,2 (+11%)	17,02±0,9 5(-5%)	54,89±2,24* (+13%)	22,11±2,17 (-5%)	43,17±2,18* (+18%)	17,32±1,4 7(-4%)	2,36±0,08 *(+17%)	2,48±0,17 *(+18%)	2,49±0,14* (+22%)

Примечание:

Изменения статистически значимы относительно показателей:

#-интактной группы митохондрий (t- критерий Стьюдента, $p < 0,05$

**-группы митохондрий, выделенных из сердца животных, подвергавшихся острой алкогольной интоксикации (критерий Ньюмена-Кейлса, $p < 0,05$).*

3.7.1. Оценка влияния производных ГАМК *ex vivo* на функциональное состояние митохондрий мозга крыс, подверженных хронической алкогольной интоксикации

Результаты проведенного исследования показали, что хроническая алкогольная интоксикация крыс приводит к снижению скорости стимулированного дыхания в митохондриях мозга при окислении субстратов I комплекса на 42% ($p < 0,05$) по сравнению с интактной группой. Лечение крыс в течение 2 недель после ХАИ производными ГАМК – салифеном и фенотропилом способствовало повышению показателя V3 I комплекса на 61% ($p < 0,05$) и 65% ($p < 0,05$) по сравнению с группой не леченных животных. Препарат сравнения милдронат повышал данный показатель на 42% ($p < 0,05$) по сравнению с контрольной группой животных (Рис.50).

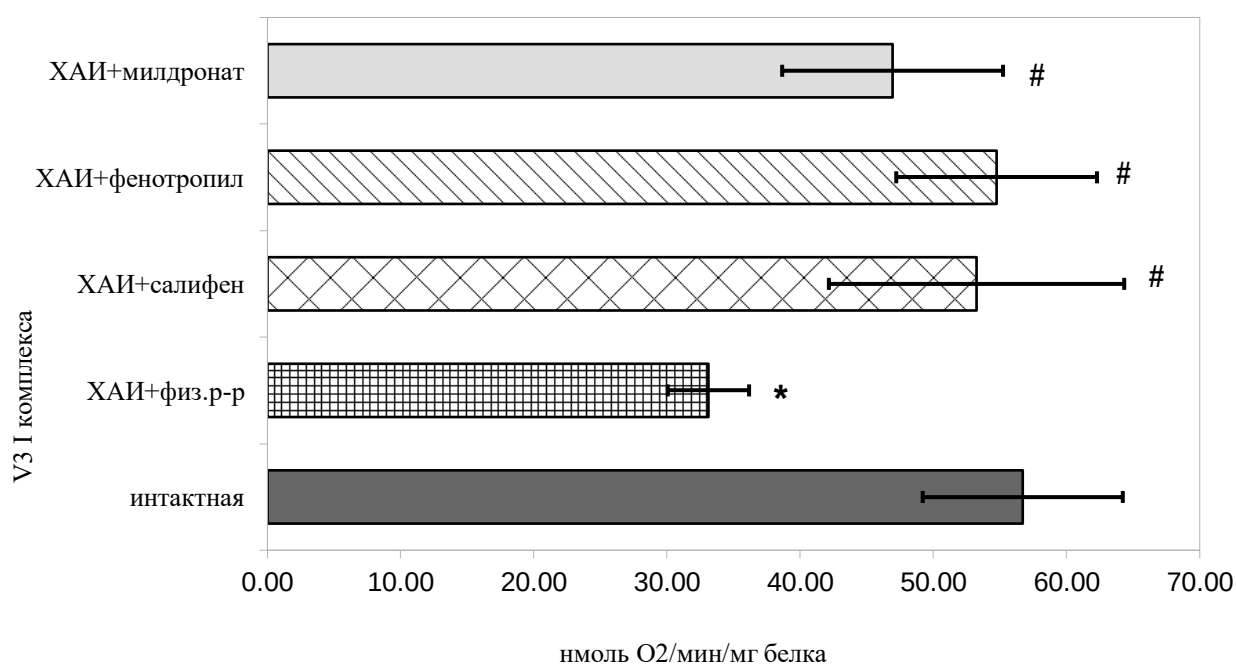


Рисунок 50. Влияние салифена и фенотропила *ex vivo* на скорость потребления кислорода в состоянии V3 при окислении субстратов I комплекса в митохондриях мозга крыс, подвергавшихся хронической алкогольной интоксикации ($M \pm \sigma$).

Примечание:

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 потребления кислорода в изолированных митохондриях мозга крыс, подверженных хронической алкогольной интоксикации, при одновременной активации I и II комплексов дыхательной цепи в присутствии АДФ была на 38% ($p < 0,05$) ниже по сравнению с митохондриями интактной группы. Скорость стимулированного дыхания в митохондриях головного мозга животных, которым в течение 2-х недель после хронической алкогольной интоксикации вводили салифен, фенотропил и милдронат при окислении малат/глутамата и сукцината повышалась на 55% ($p < 0,05$), 63% ($p < 0,05$) и 38% ($p < 0,05$) соответственно по сравнению с показателем митохондрий животных контрольной группы (Рис. 51).

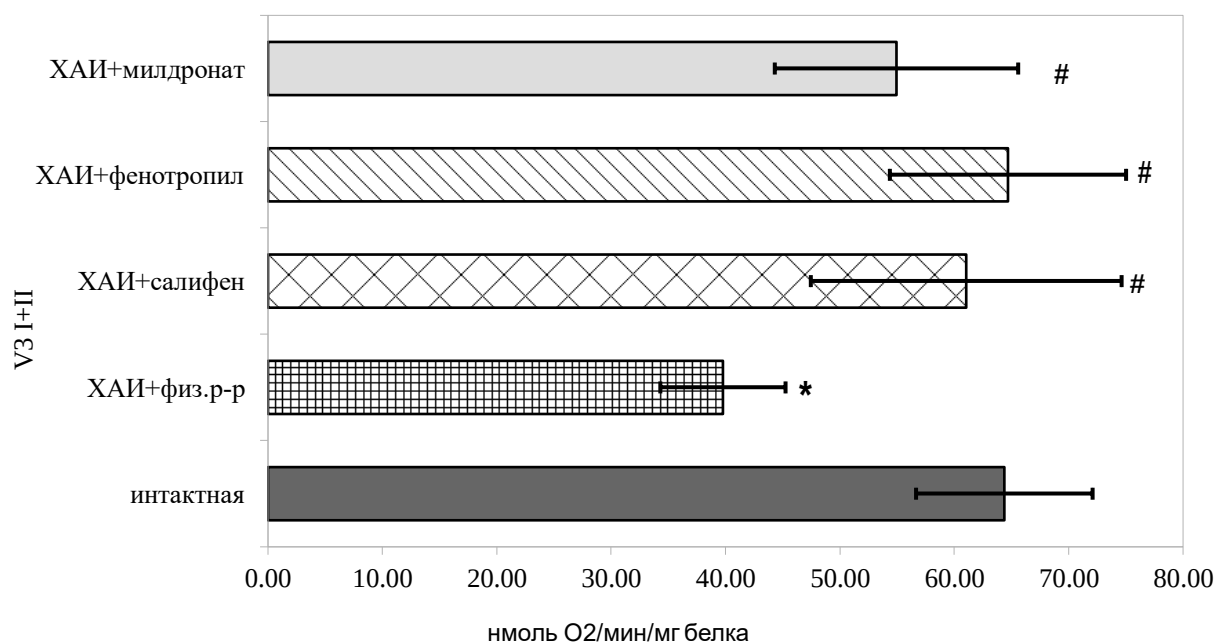


Рисунок 51. Влияние салифена и фенотропила *ex vivo* на скорость потребления кислорода в состоянии V3 при окислении субстратов I+II комплекса в митохондриях мозга крыс, подвергавшихся хронической алкогольной интоксикации ($M \pm \sigma$).

Примечание:

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, $p < 0,05$).

После ингибирования I комплекса дыхательной цепи регистрировали поглощение кислорода во II комплексе ЦПЭ. Скорость потребления кислорода после введения экзогенного АДФ в митохондриях мозга крыс с ХАИ составляла 30,6 нМ O_2 /мин/мг белка, что было на 45% ($p < 0,05$) ниже, чем у интактной группы, у которых данный показатель равнялся 55,0 нМ O_2 /мин/мг белка. Салифен, фенотропил и милдронат способствовали повышению скорости потребления O_2 на 81% ($p < 0,05$), 59% ($p < 0,05$) и 47% ($p < 0,05$) соответственно (Рис. 52).

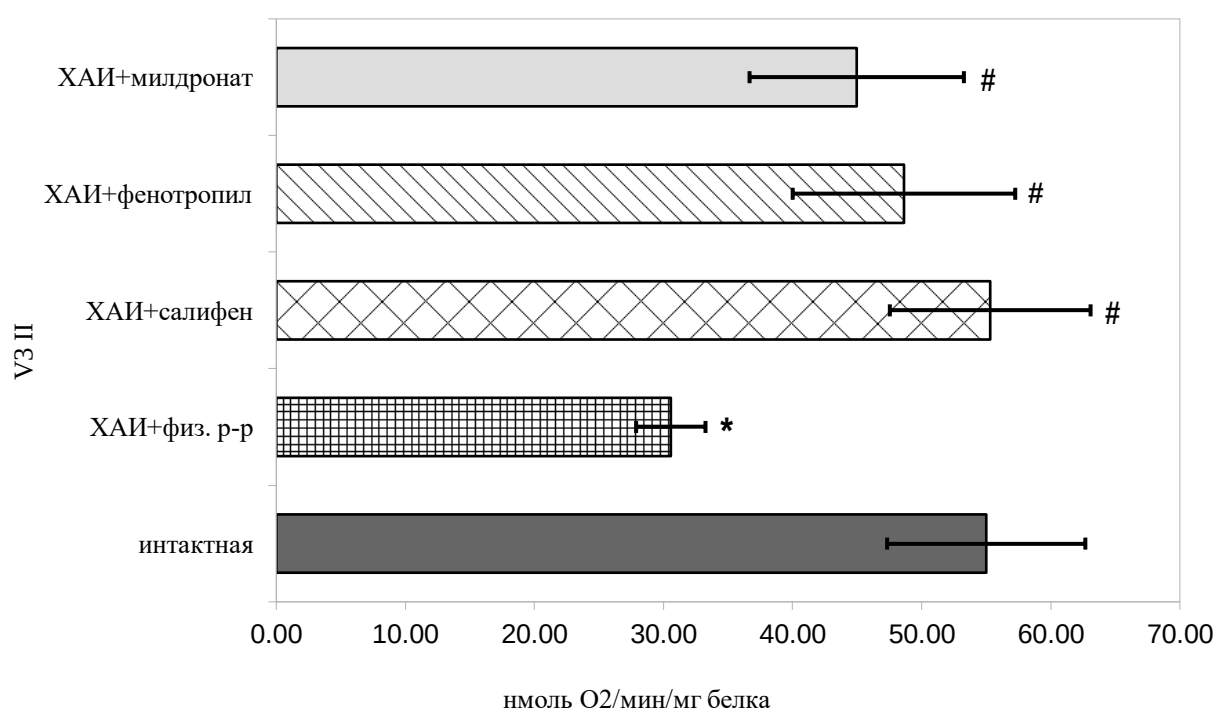


Рисунок 52. Влияние салифена и фенотропила и милдроната *ex vivo* на скорость потребления кислорода в состоянии V3 при окислении субстратов II комплекса в митохондриях мозга крыс, подвергавшихся хронической алкогольной интоксикации ($M \pm \sigma$).

Примечание:

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, $p < 0,05$).

После исчерпания экзогенного АДФ потребление кислорода было практически одинаковым во всех исследуемых группах.

Коэффициент дыхательного контроля, отражающий сопряжение процессов окисления и фосфорилирования при окислении субстратов I комплекса у алкоголизованных животных был ниже на 38% ($p < 0,05$) по сравнению с показателями митохондрий головного мозга крыс интактной группы. 2-х недельное лечение животных, подвергавшихся хронической алкогольной интоксикации, исследуемыми препаратами — салифеном, фенотропилом и милдронатом приводило к повышению показателя дыхательного контроля I комплекса на 20%, 32% ($p < 0,05$) и 27% ($p < 0,05$) соответственно по отношению к митохондриям группы негативного контроля (Рис.53).

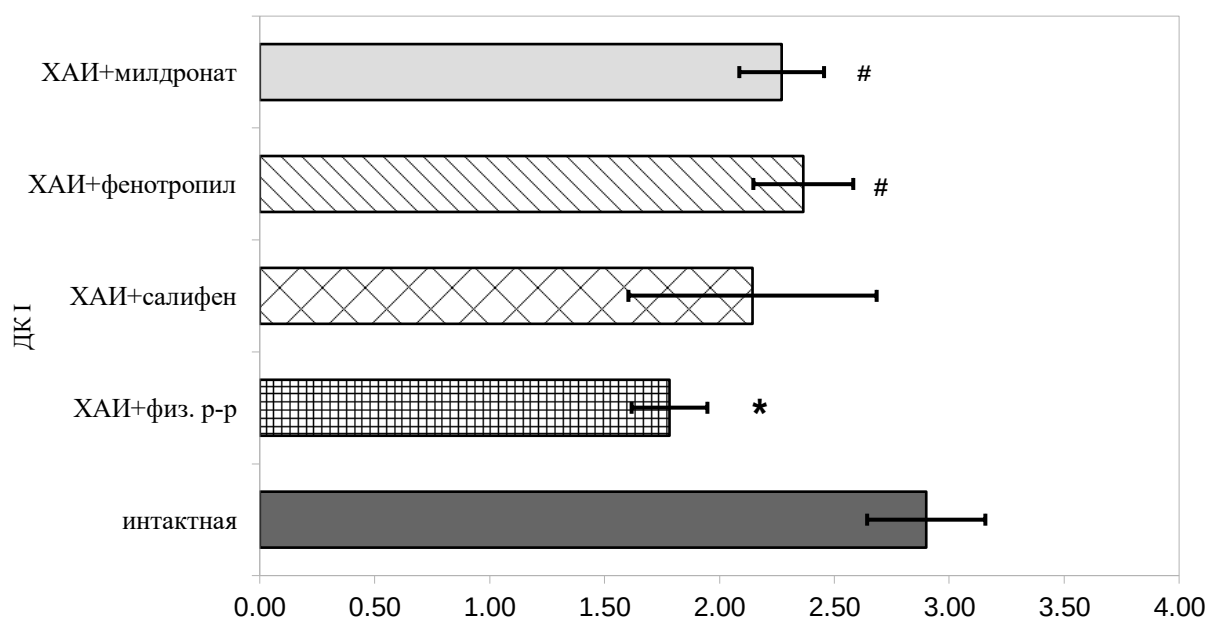


Рисунок 53. Влияние салифена и фенотропила *ex vivo* на показатель дыхательного контроля при окислении субстратов I комплекса в митохондриях мозга крыс, подвергавшихся хронической алкогольной интоксикации ($M \pm \sigma$).

Примечание:

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, $p < 0,05$).

Соотношение скорости стимулированного дыхания к скорости дыхания после истощения внесенного АДФ при окислении НАДН и ФАДН₂ — зависимых субстратов в митохондриях головного мозга алкоголизованных

животных составляло 2,13, что было на 35% ($p<0,05$) ниже по сравнению с показателем интактной группы, который был равен 3,29. В митохондриях головного мозга животных, которым после ХАИ вводили салифен, фенотропил и милдронат, коэффициент ДК I+II комплексов был выше на 15%, 30% ($p<0,05$) и 24% ($p<0,05$) соответственно по сравнению с показателем контрольной группы (Рис. 54).

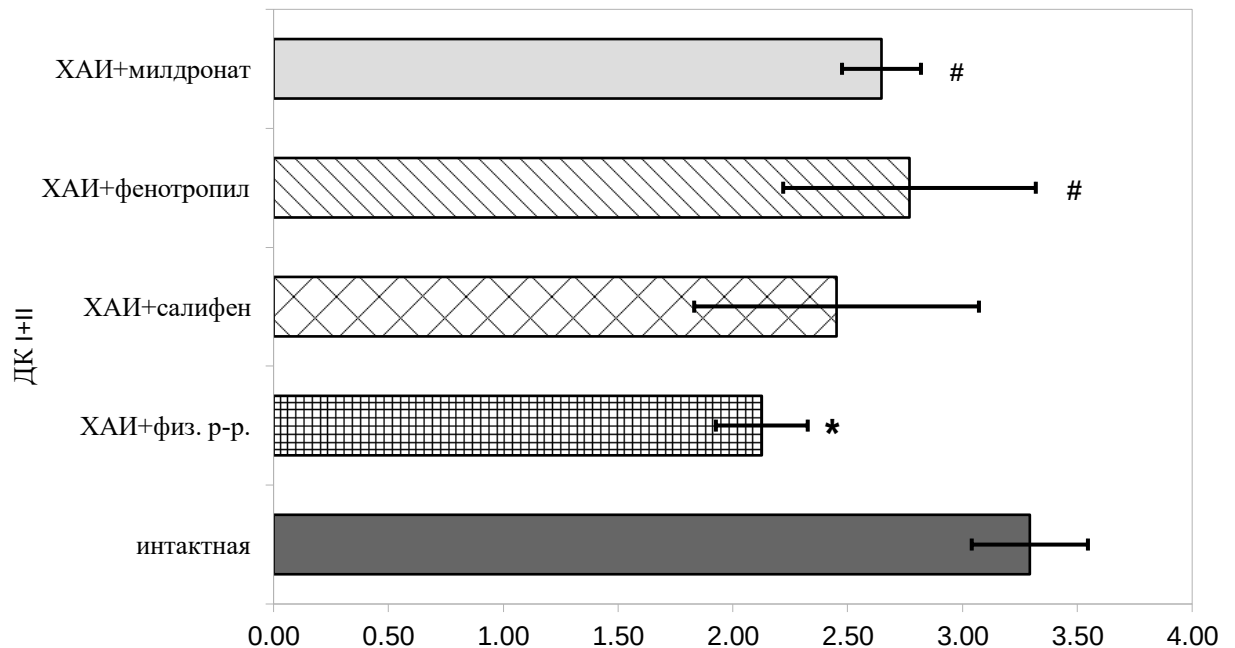


Рис. 54. Влияние салифена и фенотропила *ex vivo* на показатель дыхательного контроля при окислении субстратов I+II комплексов в митохондриях головного мозга крыс, подвергавшихся хронической алкогольной интоксикации ($M \pm \sigma$).

Примечание:

Изменения статистически значимы относительно показателей:

*-интактной группы митохондрий (t- критерий Стьюдента, $p < 0,05$)

#- группы митохондрий, выделенных из мозга животных, подвергавшихся (критерий Ньюмена-Кейлса, $p < 0,05$).

Соотношение V3/V4 II комплекса в митохондриях головного мозга животных после длительной алкогольной интоксикации было на 42% ($p<0,05$) меньше, чем у интактной группы. Салифен и милдронат, введенные животным после ХАИ, способствовали повышению коэффициента ДК при окислении субстрата II комплекса на 32% ($p<0,05$), а фенотропил увеличивал данный показатель на 26% ($p<0,05$) по сравнению с таковыми показателями

контрольной

группы

(Рис.55).

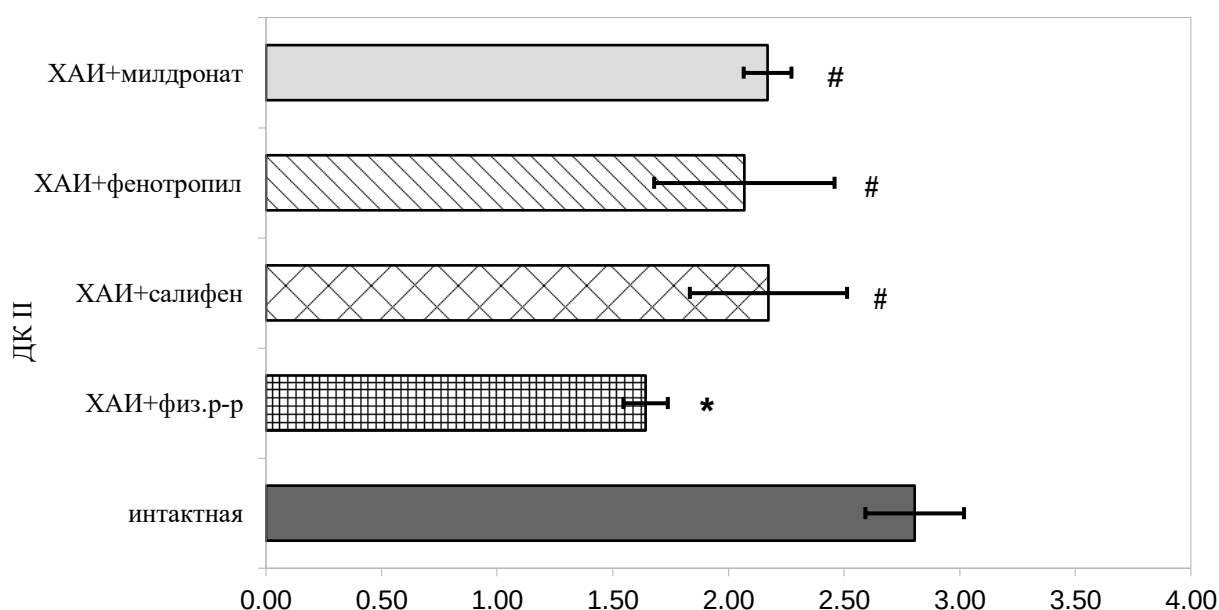


Рисунок 55. Влияние салифена и фенотропила *ex vivo* на показатель дыхательного контроля при окислении субстратов II комплекса в митохондриях мозга крыс, подвергавшихся хронической алкогольной интоксикации ($M \pm \sigma$).

Примечание:

Изменения статистически значимы относительно показателей:

*-интактной группы митохондрий (t- критерий Стьюдента, $p < 0,05$)

#- группы митохондрий, выделенных из мозга животных, подвергавшихся (критерий Ньюмена-Кейлса, $p < 0,05$)

В результате проведенной серии экспериментов было установлено, что длительная алкогольная интоксикация животных ведет к уменьшению скорости поглощения кислорода в митохондриях мозга крыс во всех метаболических состояниях и, как следствие, к снижению показателей ДК, что свидетельствует о нарушении работы комплексов цепи переноса электронов, утечке электронов, разобщении процессов окисления и фосфорилирования. Все это, в свою очередь, запускает механизм окислительного стресса и способствует развитию митохондриальной дисфункции.

Лечение животных после ХАИ в течение 2 недель фенотропилом, салифеном и милдронатом усиливало потребление кислорода в присутствии АДФ во всех комплексах дыхательной цепи и способствовало повышению

показателя дыхательного контроля по сравнению с контрольной группой и достигало таковых значений интактной группы, что может свидетельствовать об ограничении утечки электронов в ЦПЭ и свободнорадикального окисления.

3.7.2. Оценка влияния салифена и фенотропила *ex vivo* на функциональное состояние митохондрий сердца крыс, подверженных хронической алкогольной интоксикации

Кардиоваскулярная система является одной из наиболее подверженных негативному воздействию алкогольной интоксикации [Arthur L. Klatsky et al. 2010]. Длительное потребление алкоголя в высоких дозах может способствовать усилению атеросклероза коронарных, церебральных и периферических сосудов, возникновению артериальной гипертензии [Puddey I.B., et al., 2019], индуцировать аритмии и вызывать прогрессирующее повреждение миокарда (алкогольная дилатационная кардиомиопатия - АСМ) [Piano M.R., et al., 2014].

Ацетальдегид, образующийся при распаде этанола способен нарушать сократительную функцию, запускать процесс перекисного окисления липидов с дальнейшим развитием окислительного стресса [Aberle N.S., et al., 2003]. Ацетальдегид может вступать во взаимодействие с белками, образуя высокореактивные белково-аддуктные соединения, которые способны инициировать воспалительные и иммунологические повреждения сердца.

В митохондриях сердца крыс, которым на протяжении 24 – недель давали 10% раствор этанола, скорость поглощения кислорода при окислении НАД – зависимых субстратов была на 38% ($p < 0,05$) ниже, чем у интактных животных. Салифен, фенотропил и милдронат, введенные животным в течение 2-х недель после хронической алкогольной интоксикацией способствовали повышению скорости стимулированного дыхания I комплекса на 43% ($p < 0,05$), 40% ($p < 0,05$) и 49% ($p < 0,05$) соответственно по сравнению с показателями митохондрий контрольной группы (таб.9).

Скорость стимулированного дыхания в митохондриях сердца контрольной группы животных при одновременном окислении НАД – и ФАД – зависимых субстратов была на 41% ($p<0,05$) ниже, по сравнению с показателем интактной группы. Лечение животных в течение 2-х недель после ХАИ салифеном способствовало повышению анализируемого показателя на 42% ($p<0,05$) по сравнению с группой негативного контроля. Фенотропил способствовал повышению показателя V3 I+II на 37% ($p<0,05$), а милдронат – на 57% ($p<0,05$) по сравнению с показателем контрольной группы. Длительная алкогольная интоксикация приводила к снижению скорости поглощения кислорода в присутствии АДФ во II комплексе изолированных митохондрий сердца животных на 39% ($p<0,05$) по сравнению с показателем митохондрий интактной группы. Салифен, введенный животным после ХАИ вызывал повышение скорости стимулированного дыхания II комплекса на 60% ($p<0,05$), фенотропила – на 66% ($p<0,05$), милдроната – на 32% ($p<0,05$) по сравнению с таковым показателем митохондрий алкоголизированных животных. Исследование скорости потребления кислорода после истощения экзогенно введенного АДФ не выявило значимых отличий в анализируемом показателе среди рассматриваемых групп.

Таблица 11. Влияние салифена, фенибута и фенотропила *ex vivo* на показатели дыхания митохондрий сердца крыс после ХАИ Me (Q_1 ; Q_3).

Исследуемые показатели Группы	V3(I) нМ O ₂ /мин/мг белка	V3(I+II) нМ O ₂ /мин/мг белка	V3(II) нМ O ₂ /мин/мг белка	V4 нМ O ₂ /мин/мг белка
интактная	56,30 (52,16;62,59)	68,25 (64,71;75,35)	45,41 (42,73;50,83)	18,14 (17,06;19,79)
ХАИ+физ.р-р.	37,27 (31,10; 40,10) * (-34%)	41,22 (35,11;44,58) * (-40%)	27,63 (24,48;33,19) * (-39%)	18,48 (17,65;19,99) (+2%)
ХАИ+салифен (15 мг/кг)	56,78 (47,35;62,23) # (+52%)	64,72 (54,96;68,45) # (+57%)	50,58 (46,18;54,28) # (+83%)	24,46 (22,11;26,25) (+32%)

ХАИ+фенотропил (25 мг/кг)	59,10 (47,24;61,11) # (+59%)	62,36 (53,44;68,26) # (+51%)	54,64 (45,96;58,35) # (+97%)	24,29 (21,82;24,75) (+31%)
ХАИ+милдронат (50мг/кг)	52,39 (49,54;57,28) # (+41%)	62,40 (59,51;71,10) # (+51%)	38,25 (33,71;42,52) # (+38%)	19,96 (19,06;21,98) (+8%)

*- изменения статистически значимы по сравнению с митохондриями интактной группы с использованием критерия Манна-Уитни, $p < 0,05$.

#- 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 комплекса на 36% ($p < 0,05$) по сравнению с таковыми показателями митохондрий интактной группы. Салифен способствовал повышению показателя дыхательного контроля в митохондриях сердца животных после ХАИ на 21% ($p < 0,05$), фенотропил – на 13% ($p < 0,05$), милдронат – на 37% ($p < 0,05$) (Рис. 56).

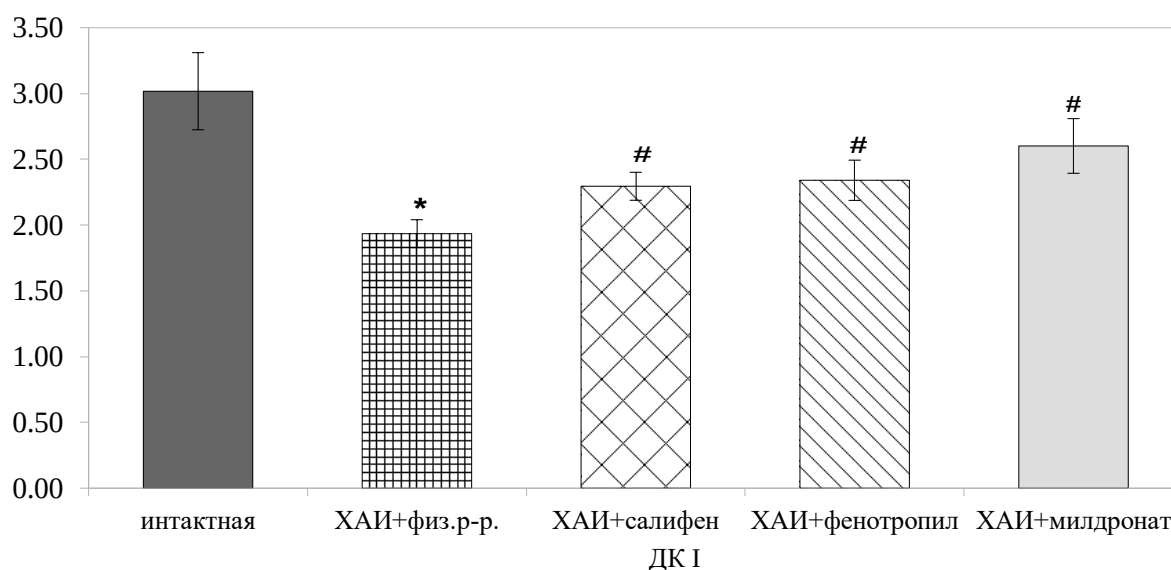


Рисунок 56. Изменение показателя дыхательного контроля при окислении субстратов I комплекса в митохондриях сердца крыс, подвергавшихся хронической алкогольной интоксикации, под влиянием салифена и фенотропила *ex vivo* ($M \pm \sigma$).

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

При одновременной активации I и II комплекса ЦПЭ коэффициент ДК в митохондриях сердца крыс, подвергавшихся ХАИ снижался на 40% ($p<0,05$) по сравнению с показателями митохондрий животных интактной группы и составлял 2,2. Салифен и фенотропил, введенные животным в течение 2 недель после алкогольной интоксикации способствовали улучшению функционального состояния митохондрий, на что указывает повышение ДК на 8% ($p<0,05$) и 23% ($p<0,05$), в то время как милдронат увеличивал данный показатель на 41% ($p<0,05$) по сравнению с таковыми значениями митохондрий животных, подвергавшихся ХАИ (Рис. 57).

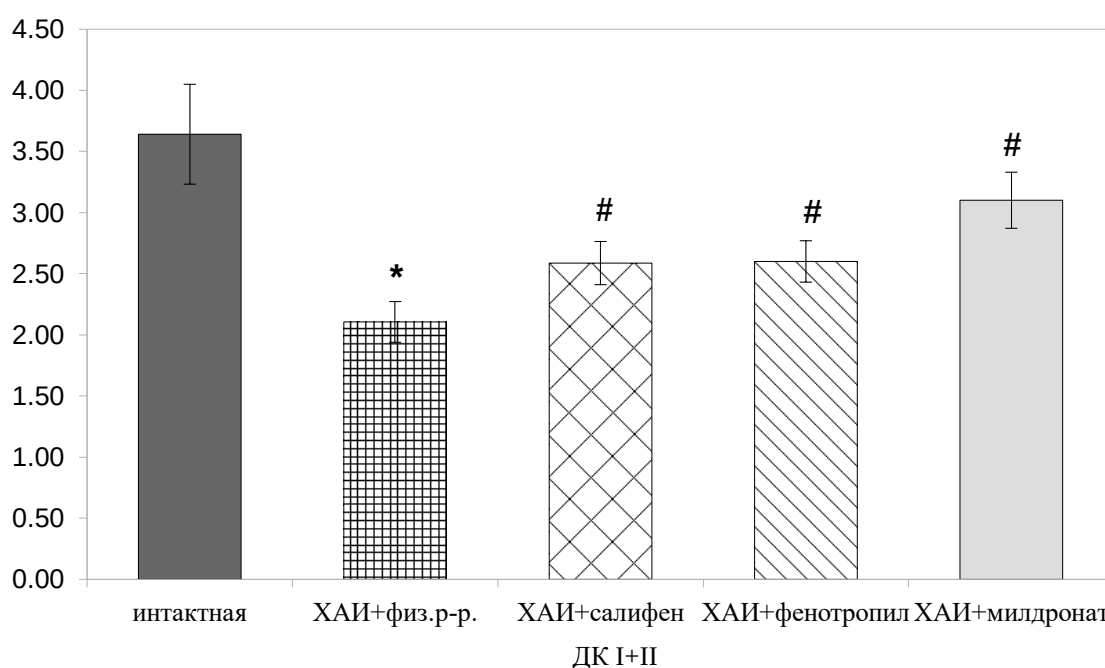


Рисунок 57. Изменение показателя дыхательного контроля при окислении субстратов I+II комплекса в митохондриях сердца крыс, подвергавшихся хронической алкогольной интоксикации, под влиянием салифена и фенотропила *ex vivo* ($M \pm \sigma$).

Примечание:

Изменения статистически значимы относительно показателей:

**-интактной группы митохондрий (t- критерий Стьюдента, $p<0,05$)*

#-группы митохондрий, выделенных из сердца животных, подвергавшихся ХАИ (критерий Ньюмена-Кейлса, $p<0,05$).

II комплекс дыхательной цепи, выделенный после ингибирования NADH-дегидрогеназного комплекса ротеноном, был менее подвержен

разобщению, по сравнению с I. Соотношение скорости стимулированного дыхания к скорости дыхания после истощения АДФ при окислении ФАД-зависимых субстратов в митохондриях сердца животных, подвергавшихся алкогольной интоксикации составляло 1,57, что было на 39% ($p<0,05$) ниже по сравнению с таковым интактной группы, где он был равен 2,58. Салифен и фенотропил способствовали повышению ДК II комплекса на 31% ($p<0,05$) и 30% ($p<0,05$) по сравнению с контрольной группой. Милдронат повышал V3/V4 II комплекса на 20% ($p<0,05$) (Рис.58).

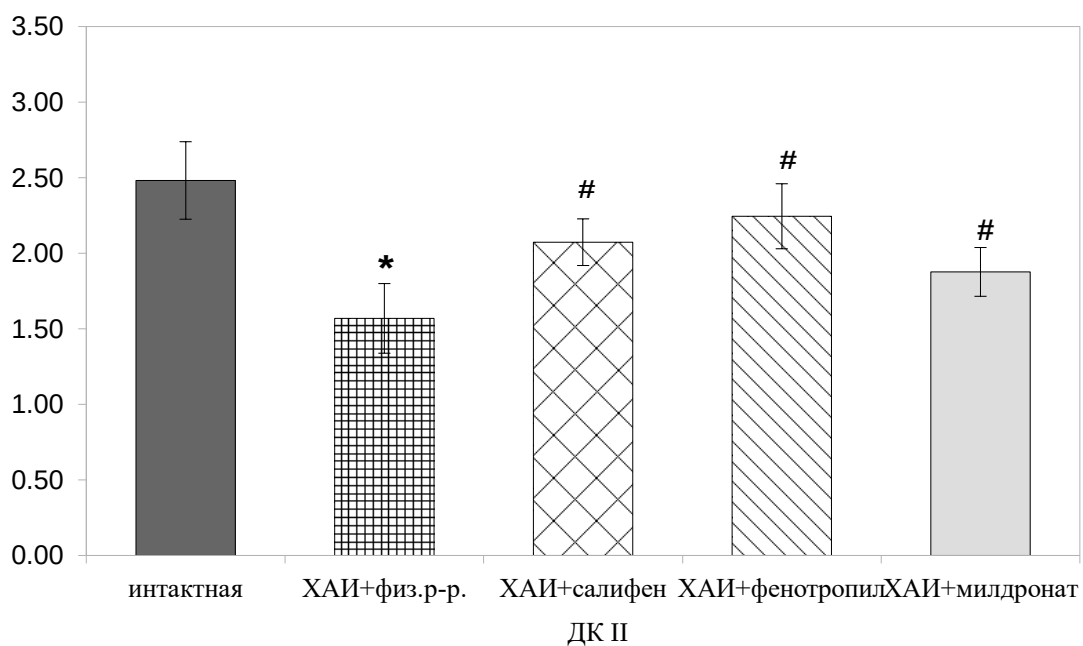


Рисунок 58. Изменение показателя дыхательного контроля при окислении субстратов II комплекса в митохондриях сердца крыс, подвергавшихся хронической алкогольной интоксикации, под влиянием салифена и фенотропила *ex vivo* ($M \pm \sigma$).

Примечание:

Изменения статистически значимы относительно показателей:

**-интактной группы митохондрий (t- критерий Стьюдента, $p<0,05$)*

#-группы митохондрий, выделенных из сердца животных, подвергавшихся ХАИ (критерий Ньюмена-Кейлса, $p<0,05$).

Результаты проведенного исследования показали, что хроническая алкоголизация животных приводит к снижению скорости поглощения кислорода во всех метаболических состояниях, утечке электронов, нарушению сопряженности процессов окислительного фосфорилирования и

функциональной активности митохондрий сердца крыс. В митохондриях сердца крыс, которым после длительной алкогольной интоксикации вводили исследуемыми производными ГАМК – салифен и фенотропил, а также препарат сравнения – милдронат, показатели функционального состояния были выше, чем у животных контрольной группы, и практически достигали таковых значений интактной группы. Исследуемые вещества способствовали повышению скорости потребления кислорода во всех метаболических состояниях. Фенотропил восстанавливал нарушенную функцию митохондрий эффективнее, чем салифен и милдронат, о чем свидетельствуют более высокие значения показателя дыхательного контроля при окислении субстратов I и II комплексов.

3.8. Оценка антиоксидантного действия производных нейроактивных аминокислот в условиях стресса

Под воздействием острого стресса в митохондриях головного мозга и сердца увеличивалась концентрация продуктов перекисного окисления липидов (Таб.12). Концентрация малонового диальдегида в митохондриях мозга и сердца стрессированных крыс была на 50% ($p<0,05$) и 73% ($p<0,05$) выше, чем у интактных животных и составляла 34,55 ммоль/мг белка и 16,27 ммоль/мг белка соответственно. У животных, которым до моделирования острого стресса вводили фенотропил, концентрация МДА в митохондриях мозга и сердца составляла 24,62 ммоль/мг белка и 11,8 ммоль/мг белка, что было на 29% ($p<0,05$) и 28% ниже, чем у контрольной группы митохондрий. В митохондриях мозга и сердца животных, получавших салифен, концентрация МДА была на 23% ($p<0,05$) и 25% ниже относительно показателей контрольной группы. Фенибут способствовал снижению концентрации МДА в митохондриях головного мозга и сердца животных на 24% ($p<0,05$) и 15% соответственно по сравнению с митохондриями контрольной группы.

Таблица 12. Влияние фенотропила, салифена и фенибута на концентрацию продуктов ПОЛ в митохондриях клеток сердца и головного мозга стрессированных животных ($M \pm \sigma$).

Группы животных \ Исследуемый показатель	МДА, мозг	МДА, сердце
Интактная (n=8)	23,11±3,3	9,43±2,59
Стресс+физ. р-р (n=8)	34,55±5,27* (+50%)	16,27±3,74* (+73%)
Стресс+фенотропил (25мг/кг) (n=8)	24,62±3,98 [#] (-29%)	11,8±2,8 (-28)
Стресс+салифен (15 мг/кг) (n=8)	26,59±3,47 [#] (-23%)	12,24±1,75 (-25%)
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 стрессированных крыс (критерий Ньюмена-Кейлса, $p < 0,05$).

Воздействие 24 – часового острого иммобилизационно-болевого стресса на животных приводило к снижению концентрации антиоксидантных ферментов в митохондриях головного мозга. Активность супероксиддисмутазы составляла 59,12 у.е./мг белка, каталазы – 9,3мг H_2O_2 /мин/мг белка, а глутатионпероксидазы – 26,66 мМ GSH/мин/мг белка, что было на 45% ($p < 0,05$), 32% и 43% ($p < 0,05$) ниже, чем у интактной группы животных (Таб. 13). В митохондриях мозга животных, которым до стрессирования вводили фенотропил, активность СОД, каталазы и глутатионпероксидазы была выше на 44% ($p < 0,05$), 22% и 29% ($p < 0,05$) соответственно, по сравнению с показателями митохондрий контрольной группы. Салифен повышал активность СОД на 44% ($p < 0,05$), каталазы — на 18%, а глутатионпероксидазы — на 38% ($p < 0,05$) по сравнению с показателями митохондрий стрессированных крыс. Фенибут, введенный животным до

моделирования острого иммобилизационно–болевого стресса, способствовал увеличению активности СОД, каталазы и глутатионпероксидазы в митохондриях головного мозга на 63% ($p<0,05$), 30% и 12% соответственно.

Другим ферментом, показывающим функциональное состояние митохондрий, выступает сукцинатдегидрогеназа (СДГ). Уровень активности СДГ является одним из критериев оценки выраженности гипоксии. Он отражает скорость потребления кислорода и образование АТФ в дыхательной цепи.

Острый иммобилизационно – болевой стресс приводил к снижению активности СДГ в митохондриях кардиомиоцитов на 27% ($p<0,05$), по сравнению с таковыми значениями митохондрий интактной группы. Исследуемые вещества — фенотропил, салифен и препарата сравнения — фенибут, введенные животным до моделирования стресса способствовали повышению активности СДГ на 12%, 25% и 28% ($p<0,05$) соответственно.

Таблица 13. Влияние фенотропила, салифена и фенибута на активность антиоксидантных ферментов в митохондриях клеток мозга стрессированных животных ($M \pm \sigma$).

Группы животных	Исследуемый показатель			
Исследуемые показатели Группы животных	Супероксид- дисмутаза, у.е./мг белка	Каталаза, мг H_2O_2 /мин/мг белка	Глутатион- пероксидаза, мМ GSH/мин/мг белка	Сукцинат- дегидрогеназа, нмоль сукцината/мин/мг белка
Интактная (n=8)	61,19±6,65	11,76±3,06	44,97±6,32	28,34±3,22
Стресс+физ. р-р (n=8)	38,86±3,06 * (-37%)	6,61±0,9* (-44%)	27,59±2,89* (-39%)	21,23±2,83* (-25%)
Стресс+фенотропил (25мг/кг) (n=8)	50,76±6,59 # (+30%)	8,52±0,55# (+29%)	34,73±6,38 (+26%)	23,66±3,43 (+12%)
Стресс+салифен (15мг/кг) (n=8)	51,55±8,61 # (+33)	9,03±2,16# (+37%)	32,03±5,89 (+16%)	23,82±2,57 (+12%)
Стресс+фенибут (25 мг/кг) (n=8)	56,46±8,74 # (+45)	7,33±2,77 (+11)	34,65±6,3 (+26%)	25,83±4,3 (+22%)

изменения статистически значимы относительно показателей

*- интактной группы животных (t- критерий Стьюдента, $p < 0,05$)

#- группы стрессированных крыс (критерий Ньюмена-Кейлса, $p < 0,05$).

Установлено, что 24-х часовое воздействие стресса приводит к снижению активности СОД, каталазы и глутатионпероксидазы в митохондриях сердца крыс на 37% ($p<0,05$), 44% ($p<0,05$) и 39% ($p<0,05$) соответственно по сравнению с таковыми значениями митохондрий интактной группы (Таб.14). У животных, получавших фенотропил до моделирования острого иммобилизационно — болевого стресса, активность супероксиддисмутаза, каталазы и глутатионпероксидазы составляла 50,76 у.е./мг белка, 8,52 мг H_2O_2 /мин/мг белка и 34,73 мМ GSH/мин/мг белка, что было на 30% ($p<0,05$), 29% ($p<0,05$) и 26% выше, чем в митохондриях животных контрольной группы. Под воздействием салифена активность СОД, каталазы и глутатионпероксидазы также повышалось на 33% ($p<0,05$), 37% ($p<0,05$) и 16% соответственно. В митохондриях сердца животных, которым до моделирования стресса вводили фенибут, активность СОД была выше на 45% ($p<0,05$), каталазы — на 11%, а глутатионпероксидазы — на 26%.

Активность СДГ в митохондриях головного мозга стрессированных животных составляла 21,23 нмоль сукцината/мин/мг белка, что было на 25% ($p<0,05$) ниже, чем у интактных животных, у которых данный показатель составлял 28,34 нмоль сукцината/мин/мг белка. Исследуемые соединения ограничивали повреждение митохондрий мозга, вызванное острым стрессом. Активность СДГ у животных, которым до стрессирования вводили фенотропил составляла 23,66 нмоль сукцината/мин/мг белка, что было на 12% выше, чем у контрольной группы. Салифен и фенибут повышали активность СДГ на 12% и 22% соответственно, по сравнению с анализируемым показателем контрольной группы.

Таблица 14. Влияние фенотропила, салифена и фенибута на активность антиоксидантных ферментов в митохондриях клеток сердца стрессированных животных ($M \pm \sigma$).

Исследуемые показатели Группы животных	Супероксид- дисмутаза, у.е./мг белка	Каталаза, мг H_2O_2 /мин/мг белка	Глутатион- пероксидаза, мМ GSH/мин/мг белка	Сукцинат- дегидрогеназа, нмоль сукцината/мин/мг белка
Интактная (n=8)	107,31 $\pm$ 9,17	13,68 $\pm$ 3,92	46,84 $\pm$ 3,95	37,5 $\pm$ 4,0
Стресс+физ. р-р (n=8)	59,12 $\pm$ 11,35* (-45%)	9,3 $\pm$ 2,0 (-32%)	26,66 $\pm$ 6,63* (-43%)	27,42 $\pm$ 4,69* (-27%)
Стресс+фенотропи л (1×10^{-5}) (n=8)	85,63 $\pm$ 10,12# (+44%)	11,38 $\pm$ 2,21 (+22%)	34,35 $\pm$ 5,54# (+29%)	30,55 $\pm$ 6,78 (+12%)
Стресс+салифен (1×10^{-5}) (n=8)	85,26 $\pm$ 9,73# (+44 %)	10,96 $\pm$ 2,6 (+18)	36,83 $\pm$ 6,62# (+38%)	34,30 $\pm$ 3,9 (+25%)
Стресс+фенибут (1×10^{-5}) (n=8)	96,73 $\pm$ 8,69# (+63%)	12,11 $\pm$ 3,57 (+30%)	29,87 $\pm$ 3,39 (+12%)	35,05 $\pm$ 2,75# (+28%)

Примечание:

изменения статистически значимы относительно показателей

*- интактной группы животных (t- критерий Стьюдента, $p < 0,05$)

#- группы стрессированных крыс (критерий Ньюмена-Кейлса, $p < 0,05$).

Длительное потребление алкоголя способно вызывать необратимые изменения во многих органах и системах. Известно, что метаболизм этанола вызывает выработку ацетальдегида и малонового диальдегида. Окисление этанола в первой фазе метаболизма такими ферментами, как алкогольдегидрогеназа и цитохром *P2E1*, приводит к образованию ацетальдегида в тканях, развитию перекисного окисления липидов и накоплению малонового диальдегида [Hoyt L. R. et al., 2017].

В проведенных экспериментах воздействие хронической алкогольной интоксикации на крыс в течение 24 — недель приводило к повышению уровня МДА в митохондриях мозга и сердца на 23% ($p < 0,05$) и 64% ($p < 0,05$) соответственно (Таб. 15). Лечение животных после алкогольной интоксикации

фенотропилом в течение 2-х недель способствовало снижению уровня МДА в митохондриях мозга и сердца на 17% ($p<0,05$) и 30% соответственно по сравнению с контрольной группой. Салифен снижал концентрацию МДА в митохондриях мозга и сердца на 16% ($p<0,05$) и 10%, соответственно. У животных, которые после хронической алкоголизации получали милдронат, концентрация МДА в митохондриях мозга и сердца составляла 35,37 ммоль/мг белка и 14,58 ммоль/мг белка, что было на 11% и 15% ($p<0,05$) ниже, чем показатель митохондрий контрольной группы.

Таблица 15. Влияние фенотропила, салифена и фенибута на концентрацию продуктов ПОЛ в митохондриях головного мозга и сердца животных, подвергавшихся длительной алкогольной интоксикации ($M \pm \sigma$).

Исследуемый показатель Группы животных	МДА, мозг	МДА, сердце
Интактная (n=8)	32,38±4,3	12,08±3,83
ХАИ+физ.р-р. (n=8)	39,85±2,41* (+23%)	19,78±3,11* (+64%)
ХАИ+фенотропил (25мг/кг) (n=8)	33,18±4,33 [#] (-17%)	13,89±4,01 (-30%)
ХАИ+салифен (15мг/кг) (n=8)	33,53±4,81 (-16%)	17,73±2,9 (-10%)
ХАИ+милдронат (50мг/кг) (n=8)	35,37±3,44 (-11%)	14,58±1,87 (-15%)

Примечание:

изменения статистически значимы относительно показателей

*- интактной группы животных (t- критерий Стьюдента, $p < 0,05$)

[#]- группы животных, подвергавшихся ХАИ (критерий Ньюмена-Кейлса, $p < 0,05$).

Хроническая алкогольная интоксикация животных приводила к снижению уровня антиоксидантных ферментов (Таб. 16). Активность СОД, каталазы и глутатионпероксидазы в митохондриях сердца крыс была ниже на 31% ($p<0,05$), 28% ($p<0,05$) и 23% ($p<0,05$) соответственно, по сравнению с таковыми значениями митохондрий интактной группы. Фенотропил,

введенный животным после 24 — недельной алкогольной интоксикации способствовал повышению активности СОД на 7%, каталазы — на 26%, глутатионпероксидазы — на 8%. У животных, получавших салифен наблюдалось повышение активности СОД на 13%, каталазы — на 33%, ГП — на 15% по сравнению с показателями контрольной группы. В митохондриях сердца крыс, которым после ХАИ внутрибрюшинно вводили милдронат, активность СОД, каталазы и ГП была выше на 21%, 18% и 20% соответственно, по сравнению с показателями контрольной группы.

Воздействие хронической алкогольной интоксикации приводило к снижению активности СДГ на 42% ($p<0,05$) и составляло 28,61 нмоль сукцината/мин/мг белка. Фенотропил повышал активность СДГ на 55% ($p<0,05$), по сравнению с контрольной группой. У животных, получавших салифен и милдронат после алкогольной интоксикации, активность СДГ составляла 35,4 нмоль сукцината/мин/мг белка и 36,75 нмоль сукцината/мин/мг белка, что было выше на 24% и 28% ($p<0,05$), по сравнению с анализируемым показателем контрольной группы.

Таблица 16. Влияние фенотропила, салифена и милдроната на активность антиоксидантных ферментов в митохондриях клеток сердца животных, подвергавшихся длительной алкогольной интоксикации ($M \pm \sigma$).

Исследуемый показатель Группы животных	Супероксид-дисмутаза, у.е./мг белка	Каталаза, мг H_2O_2 /мин/мг белка	Глутатион-пероксидаза, мМ GSH/мин/мг белка	Сукцинат-дегидрогеназа, нмоль сукцината/мин/мг белка
Интактная (n=8)	42,45 $\pm$ 4,07	10,10 $\pm$ 1,08	28,19 $\pm$ 2,74	49,27 $\pm$ 6,76
ХАИ+физ.р-р. (n=8)	29,38 $\pm$ 4,26* (-31%)	7,24 $\pm$ 1,51* (-28%)	21,70 $\pm$ 2,85* (-23%)	28,61 $\pm$ 3,61* (-42%)
ХАИ+фенотропил (25 мг/кг) (n=8)	32,22 $\pm$ 5,52 (+7%)	9,08 $\pm$ 1,54 (+26%)	23,47 $\pm$ 4,26 (+8%)	44,23 $\pm$ 2,6 [#] (+55%)
ХАИ+салифен (15 мг/кг) (n=8)	33,24 $\pm$ 3,33 (+13 %)	9,60 $\pm$ 1,04 (+33%)	24,85 $\pm$ 3,79 (+15%)	35,40 $\pm$ 3,81 (+24%)
ХАИ+милдронат (50 мг/кг) (n=8)	35,43 $\pm$ 4,44 (+21%)	8,52 $\pm$ 1,35 (+18%)	25,99 $\pm$ 3,44 (+20%)	36,75 $\pm$ 4,1 [#] (+28%)

изменения статистически значимы относительно показателей

*- интактной группы животных (t- критерий Стьюдента, $p < 0,05$)

#- группы животных, подвергавшихся ХАИ (критерий Ньюмена-Кейлса, $p < 0,05$).

В митохондриях мозга животных с ХАИ так же наблюдалось снижение активности антиоксидантных ферментов. Активность СОД, каталазы и глутатионпероксидазы составлял 43,05 у.е./мг белка, 9,14 мг H_2O_2 /мин/мг белка и 14,23мМ GSH/мин/мг белка что было соответственно на 28 % ($p < 0,05$), 20% и 27% ($p < 0,05$) ниже, чем у интактных животных (Таб.17). Фенотропил, введенный животным в течение 2 — недель после хронической алкогольной интоксикации способствовал повышению активности СОД, каталазы и глутатионпероксидазы на 14%, 5% и 13% соответственно, по сравнению с таковыми показателями митохондрий контрольной группы и равнялась 48,92 у.е./мг белка, 9,57 H_2O_2 /мин/мг белка и 16,00 мМ GSH/мин/мг белка. Салифен способствовал повышению активности СОД, каталазы и глутатионпероксидазы на 15%, 10% и 33% ($p < 0,05$) соответственно.

Милдронат повышал активность СОД на 25%, каталазы — на 20%, а глутатионпероксидазы — на 23%, по сравнению с анализируемым показателем контрольной группы.

В результате проведенных исследований было обнаружено, что хроническая алкогольная интоксикация животных снижает активность СДГ в митохондриях головного мозга крыс на 23% ($p<0,05$). У животных, которым после ХАИ вводили фенотропил, салифен и милдронат, активность СДГ составляла 31,68 нмоль сукцината/мин/мг белка, 29,02 нмоль сукцината/мин/мг белка и 31,05 нмоль сукцината/мин/мг белка, что было на 26% ($p<0,05$), 15% и 23% ($p<0,05$) выше, чем у контрольной группы.

Таблица 17. Влияние фенотропила, салифена и милдроната на активность антиоксидантных ферментов в митохондриях клеток головного мозга животных, подвергавшихся хронической алкоголизации ($M \pm \sigma$).

Исследуемый показатель Группы животных	Супероксид-дисмутаза, у.е./мг белка	Каталаза, мг H_2O_2 /мин/мг белка	Глутатион-пероксидаза, мМ GSH/мин/мг белка	Сукцинат-дегидрогеназа, нмоль сукцината/мин/мг белка
Интактная (n=8)	60,02±5,12	11,41±1,93	19,57±2,76	32,53±3,37
ХАИ+физ.р-р. (n=8)	43,05±4,59* (-28%)	9,14±2,69 (-20%)	14,23±3,14* (-27%)	25,24±1,97* (-23%)
ХАИ+фенотропил (25 мг/кг) (n=8)	48,92±2,85 (+14%)	9,57±1,54 (+5%)	16,00±1,81 (+13%)	31,68±1,6 [#] (+26%)
ХАИ+салифен (15 мг/кг) (n=8)	49,36±3,33 (+15 %)	10,02±1,75 (+10%)	18,98±1,56 [#] (+33%)	29,02±2,15 (+15%)
ХАИ +милдронат (50 мг/кг) (n=8)	53,83±5,43 [#] (+25%)	10,93±2,04 (+20%)	17,52±1,68 (+23%)	31,05±2,75 [#] (+23%)

изменения статистически значимы относительно показателей

*- интактной группы животных (t- критерий Стьюдента, $p < 0,05$)

#- группы животных, подвергавшихся ХАИ (критерий Ньюмена-Кейлса, $p < 0,05$).

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ

Открытие в 1950 году Е.Робертсом и С.Френкелем ГАМК в клетках головного мозга стало важным событием в фармакологии нейролептиков. Основные свойства ГАМК были выявлены только в 1963 году английским ученым К. Крневичем. В последующие годы было создано большое количество производных ГАМК, обладающих похожими свойствами.

Установлено, что ГАМК и его производные способны улучшать кровоснабжение головного мозга, активировать энергетические процессы, повышать дыхательную активность тканей, улучшать утилизацию глюкозы [Bhat R., et al., 2010]. Кроме того, производные ГАМК ограничивают процессы ПОЛ, обладают эндотелио — и кардиопротекторными, антиагрегантными, антикоагулянтными свойствами [Перфилова В.Н., 2009].

Для выявления наиболее активных соединений был проведен скрининг среди производных ГАМК и глутаминовой кислоты. Митохондрии повреждали трет-бутилгидропероксидом, что приводило к статистически значимому снижению скорости стимулированного дыхания при активации I, I+II и II комплексов дыхательной цепи в среднем на 25%. При этом, скорость потребления кислорода после истощения АДФ повышалась на 34%, что свидетельствовало об «утечке» электронов. Показатель дыхательного контроля, отражающий сопряженность процессов окисления и фосфорилирования, достоверно снижался после инкубирования митохондрий с ГПТБ и составлял в среднем 1,6. Известно, что снижение коэффициента ДК меньше 2 свидетельствует о разобщении процессов окисления и фосфорилирования и нарушении функционирования митохондрий

Добавление исследуемых соединений *in vitro* к митохондриям печени, поврежденным ГПТБ приводило к повышению скорости стимулированного дыхания. Наибольшее поглощение кислорода в присутствии АДФ регистрировалось в поврежденных митохондриях, инкубированных с салифеном и фенотропилом. Мефебут, нейроглутам, толибут и фенибут повышали показатель V3 в митохондриях контрольной группы в меньшей

степени. Баклофен и соединение РГПУ-238 способствовали способствовало незначительному повышению скорости поглощения O_2 в присутствии субстратов окисления I и II комплексов в митохондриях, поврежденных ГПТБ. Потребление кислорода после истощения АДФ в митохондриях, инкубированных с исследуемыми соединениями при окислении субстратов I+II и II комплекса была ниже чем у контрольной группы. Мефебут, толибут и фенибут так же способствовали статистически значимому повышению ДК. В митохондриях, к которым добавляли нейрoглутам и соединение РГПУ-238 регистрировалось повышение ДК при одновременном окислении субстратов I+II комплекса. В группе баклофена так же наблюдалась тенденция к повышению ДК по сравнению с показателем контрольной группы.

Скорость стимулированного дыхания и показатель дыхательного контроля при окислении субстратов I и II комплекса в интактных митохондриях, инкубированных с баклофеном, мефебутом, нейрoглутамом, фенибутом, толибутом и соединением РГПУ-238 была выше, чем в митохондриях контрольной группы, однако, данные показатели не достигали таковых значений группы интактных митохондрий. В работах Копернауса было показано, то как недостаток, так и избыток ГАМК может оказывать негативное действие на функциональное состояние митохондрий. Вероятно, увеличение концентрации ГАМК способствует гиперактивации митохондрий, в частности усиливается образование АФК, что оказывает повреждающее действие на клетки. Статистически значимых отличий в скорости потребления кислорода после истощения АДФ в исследуемых группах не было выявлено. В интактных митохондриях, инкубированных с салифеном и фенотропилом наблюдалось значимое повышение показателя V_3 в среднем на 46% и 32%, ДК при этом был выше для I, I+II и II комплекса в среднем на 69% и 74%, по сравнению с анализируемыми показателями контрольной группой и достигали таковых значений митохондрий интактной группы.

В результате проведенного анализа влияния производных ГАМК и глутаминовой кислоты на функциональную активность интактных и поврежденных митохондрий были выбраны 2 производных ГАМК- салифен и фенотропил, как вещества, обладающие наиболее выраженным положительным эффектом на биоэнергетику митохондрий.

Оценка зависимости эффекта воздействия на функциональную активность интактных митохондрий от концентрации исследуемых веществ не выявил статистически значимых отличий в исследуемых группах. При рассмотрении дозозависимости в поврежденных митохондриях была отмечена зависимость скорости потребления кислорода и показателя дыхательного контроля от концентрации исследуемых веществ. Наиболее активной концентрацией для салифена и фенотропила была доза 10^{-5} .

Для оценки влияния фенотропила, салифена и фенибута на резистентность митохондрий к стрессу, животным за 24 часа до декапитации вводили исследуемые вещества. Выделенные митохондрии повреждали ГПТБ *in vitro*, что приводило достоверному снижению показателя V3 на 47%. при этом фенотропил повышал данный показатель на 37%, салифен на 32%, а фенибут — на 26% относительно контрольной группы.

Показатель ДК так же снижался под действием ГПТБ. В митохондриях животных, которым вводили фенотропил, салифен и фенибут данный показатель значимо повышался и стремился к значениям интактной группы, что может указывать на повышение устойчивости митохондрий к окислительному стрессу.

Регулярное воздействие стресса, обусловленное внешними и внутренними факторами, является пусковым фактором, лежащим в основе развития 80% хронических неинфекционных заболеваний [Segerstrom S. C., Miller G. E., 2004]. Стресс может оказывать влияние на развитие множества психических симптомов, включая когнитивную дисфункцию и деменцию. Согласно данным многочисленных исследований, хронический стресс является фактором риска развития сосудистых заболеваний и повышения

заболеваемости и смертности у пациентов с уже существующей ишемической болезнью сердца.

В ответ на стресс в организме активируется гипоталамус —гипофизарно — надпочечниковая ось (ГПА), способствующая высвобождению кортизола, и активации симпатико-надпочечниково-мозговой оси. В результате этого происходит высвобождение большого количества адреналина и интенсификации энергозатратных процессов (повышение ЧСС, АД, дыхания, минутной вентиляции). Под влиянием стресса в клетках усиливается образование АФК, что приводит к повреждению митохондриальных мембран, снижению мембранного потенциала и сопряжения процессов окисления и фосфорилирования. Результатом этих событий является снижение уровня синтеза АТФ и нарушение клеточной биоэнергетики [Meerson F. Z., 1994; McEwen B. S., 1998; Lucassen P.J. et al. 2014; Lagrassauw H.M. et. al., 2015].

Глюкокортикоиды, высвобождаемые из надпочечников в ответ на стресс индуцируют активность окислительно — восстановительной системы в клетке. Окислительно — восстановительная система включает в себя физико-химический механизм, позволяющий переносить электроны между донором/акцептором и молекулами-мишенями во время окислительного фосфорилирования, одновременно поддерживая общую клеточную среду в восстановленном состоянии. Прекращение каскада стрессовой реакции способствует предотвращению повреждений, связанных с длительным воздействием стресса [Ceccato S. et al., 2015].

Несмотря на тщательные исследования влияния стресса на развитие сердечно — сосудистых и нейроэндокринных заболеваний, прогресс в диагностике и лечении, эти патологии все еще остаются основной причиной заболеваемости, ведущей к росту инвалидности и смертности, лежащей в основе важности поиска и характеристики новых путей фармакокоррекции.

Известно, что в регуляции стресс реакции важную роль играет ГАМК. ГАМК представляет собой непротеиногенную аминокислоту, являющуюся важнейшим тормозным нейромедиатором ЦНС. ГАМК обеспечивает защиту

нервных клеток от истощения, путем ограничения работы стресс — активирующих систем организма. [Cullinan W.E. et al., 2008; Hasler G. et al., 2010].

В проведенном исследовании, иммобилизационно — болевое воздействие на животных приводило к развитию оксидативного стресса, что сопровождалось нарушением функционирования митохондрий сердца и головного мозга — снижалась скорость АДФ — индуцированного потребления кислорода во всех метаболических состояниях и увеличивалась после истощения АДФ, что свидетельствует о разобщении процесса дыхания и окислительного фосфорилирования. Изучаемые производные ГАМК, введенные животным до моделирования иммобилизационно — болевого стресса, способствовали повышению скорости стимулированного АДФ дыхания и показателя дыхательного контроля в митохондриях сердца и головного мозга. В митохондриях, выделенных *ex vivo* из головного мозга крыс, подвергавшихся острому иммобилизационно — болевому стрессу, наблюдалось статистически значимое снижение показателя V3 в среднем на 42%, а коэффициент ДК на 30%. При этом, салифен, введенный животным до моделирования стресса способствовал повышению показателя V3 в среднем на 56%, фенотропил на 57%, а фенибут на 28%. Показатель ДК так же повышался в среднем на 25%, 31% и 14 % соответственно. Острый стресс оказывал негативное воздействие так же и на митохондрии сердца, что выражалось в снижении показателя V3 на 35%, а коэффициента ДК — на 33%. Салифен, фенотропил и фенибут, добавленные к митохондриям, выделенным из сердца стрессированных крыс, способствовали значимому повышению уровня потребления O₂ в состоянии V3 и коэффициента ДК. Возможно, это связано с ограничением производным ГАМК стресс — реакции на центральном уровне. Улучшение дыхательной функции митохондрий сердца и мозга под влиянием изучаемых соединений, может быть обусловлено ограничением повреждающего действия АФК на митохондрии.

Алкогольная интоксикация является еще одним важным фактором, способствующим развитию морфофункциональных нарушений митохондрий. Под воздействием этанола снижаются биоэнергетические процессы, включая глутамат/малатное и сукцинатное дыхание в митохондриях.

В физиологических условиях, окисление различных субстратов сопровождается образованием восстановленного НАДН или восстановленного убихинона, которые далее окисляются через цепь переноса электронов во внутренней митохондриальной мембране. В результате этого на внутренней мембране митохондрий создается разность электрических потенциалов, необходимый для транспорта ионов или энергосвязанной пиридиннуклеотидтрансгидрогеназы — фермента, ответственного за поддержание митохондриального НАДФ в восстановленном состоянии. В нормальных условиях скорость окисления НАДН через дыхательную цепь часто ограничена клеточной потребностью в АТФ. Наличие в клетках регуляторных механизмов позволяет координировать потребность в АТФ с окислением субстратов.

Метаболизм этанола, протекающий под действием фермента алкогольдегидрогеназы, сопровождается образованием цитозольного НАДН, который окисляется митохондриальным электронным транспортом в зависимости от механизмов переноса водорода. Дальнейшее окисление образующегося ацетальдегида происходит преимущественно с помощью митохондриальной низкомолекулярной альдегиддегидрогеназы, которая также генерирует НАДН для окисления в митохондриях. Таким образом, обе стадии зависят от митохондриального переноса электронов. Даже небольшое количество этанола приводит к значительному снижению как цитозольного, так и митохондриального никотинамидадениндинуклеотида (НАД). Это создает острую метаболическую проблему для энергетического обмена в клетках. Известно, что этанол может способствовать образованию АФК с помощью цитохрома P450 и вызывать окислительный стресс.

Этанол также влияет на окислительное фосфорилирование митохондрий в печени, подавляя синтез белков дыхательных комплексов (НАДН-дегидрогеназы (комплекс I), цитохрома *b*-C1 (комплекс III) и цитохромоксидазы (комплекс IV), а также комплекса АТФ — синтазы (комплекс V)), способствует образованию АФК и усиливает окислительный стресс не только в печени, ее главном месте окисления, но и в мозге, сердце или легких, которые имеют гораздо меньший окислительный метаболизм этанола, поскольку им не хватает АдГ.

В экспериментальных исследованиях, пероральное однократное и длительное введение животным этанола животным приводило к значительным изменениям в работе дыхательных комплексов. В митохондриях, выделенных из головного мозга и сердца крыс, подвергавшихся воздействию острой и хронической алкогольной интоксикации, наблюдалось снижение скорости АДФ — стимулированного дыхания (V_3 по Чансу), при относительно высоких значениях V_4 , в результате чего были получены низкие значения коэффициента ДК, свидетельствующие о разобщении процессов окисления и фосфорилирования. Фенотропил, салифен и препарат сравнения — милдронат, введенные животным после ХАИ, способствовали восстановлению функциональной активности митохондрий головного мозга и сердца животных. Потребление кислорода в присутствии АДФ в I и II комплексах дыхательной цепи повышалось и приближалось к таковым значениям интактной группы. Скорость дыхания после истощения экзогенного АДФ в исследуемых группах была относительно не большой, что способствовало достижению более высоких показателей ДК, усилению процессов окислительного фосфорилирования и синтезу необходимого количества энергии. Наиболее выраженное положительное действие на митохондрии среди изучаемых соединений оказывал фенотропил. Это, вероятно обусловлено его положительным влиянием на кровообращение, обменные и окислительно-восстановительные

процессы, а также способностью повышать энергетический потенциал за счет утилизации глюкозы.

Известно, что МДА — вторичный продукт распада ПОЛ, очень токсичен и способен повреждать мембраны клеточных структур и дыхательные комплексы. Он является клиничко-лабораторным маркером оксидативного стресса и широко используется для определения гипоксических состояний. Воздействие острого иммобилизационно — болевого стресса приводило к увеличению концентрации МДА в митохондриях головного мозга и сердца. У стрессированных животных, которым вводили фенотропил, салифен и фенибут наблюдалось снижение концентрации малонового диальдегида в митохондриях мозга и сердца. Воздействие 24 — часового острого иммобилизационно — болевого стресса на животных приводило так же к снижению концентрации антиоксидантных ферментов в митохондриях головного мозга. Активность супероксиддисмутазы, каталазы и глутатионпероксидазы под воздействием фенотропила, салифена и фенибута была значимо выше, чем в контрольных группах и приближалась к значениям интактной группы. Вероятно, это связано с ограничением «утечки» электронов из цепи переноса электронов и снижением образования свободных радикалов, в результате чего увеличивается энергопродукция.

Согласно литературным данным, дисфункция комплексов дыхательной цепи митохондрий способна приводить к усилению продуцирования свободных радикалов и может вызвать гибель клеток [Chen Y.R. et al., 2014]. В митохондриях сердца стрессированных животных наблюдалось снижение активности супероксиддисмутазы, каталазы и глутатионпероксидазы. при этом исследуемые соединения повышали активность антиоксидантных ферментов.

Другим ферментом, отражающим функциональное состояние митохондрий, выступает сукцинатдегидрогеназа (СДГ). Уровень активности СДГ является одним из критериев оценки выраженности гипоксии. Он отражает скорость потребления кислорода и образование АТФ в дыхательной цепи. Фенотропил,

салифен и фенибут, введенные животным до моделирования стресса, способствовали повышению активности СДГ в митохондриях клеток головного мозга и сердца, ограничивая таким образом повреждение митохондрий. ХАИ приводила к увеличению концентрации МДА в митохондриях головного мозга и сердца. У стрессированных животных, которым вводили фенотропил, салифен и фенибут наблюдалось снижение концентрации малонового диальдегида в митохондриях мозга и сердца. Длительная алкогольная интоксикация животных способствовала снижению уровня СОД, каталазы и глутатионпероксидазы в митохондриях сердца и мозга. Салифен, фенотропил и милдронат, введенные животным в течение 2 недель после ХАИ, способствовали повышению активности антиоксидантной системы.

В результате проведенных исследований было обнаружено, что хроническая алкогольная интоксикация животных снижает активность СДГ в митохондриях головного мозга и сердца крыс. Лечение животных фенотропилом, салифеном и милдронатом способствовало повышению активности СДГ в митохондриях мозга и сердца.

Таким образом, салифен и фенотропил повышают активность антиоксидантной системы, функциональное состояние митохондрий, увеличивают сопряжение процессов окисления и фосфорилирования, восстанавливая нарушенный энергетический баланс, возникающий под воздействием внешних и внутренних повреждающих факторов.

ВЫВОДЫ

1. Среди изученных 6 производных ГАМК и 2 производных ГК в концентрации 1×10^{-5} М наиболее выраженное защитное действие на поврежденные ГПТБ митохондрии печени оказывали салифен и фенотропил, что проявлялось увеличением скорости потребления кислорода в состоянии V3 по Чансу на 46 % и 32%, а коэффициента ДК на 69% и 74%.
2. Салифен и фенотропил в диапазоне концентрации от 1×10^{-7} М до 1×10^{-5} М дозозависимо увеличивали показатели V3 интактных и поврежденных ГПТБ митохондрий печени крыс в среднем на 24% и 21%, а ДК на 25% и 15% соответственно.
3. Фенотропил в дозе 25мг/кг в условиях снижал негативное ГПТБ на митохондрии клеток головного мозга и сердца, что сопровождалось увеличением V3 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 V3 в среднем на 28%, а коэффициента ДК - на 18%.
4. Салифен (15 мг/кг) и фенотропил (25мг/кг) препятствовали снижению скорости поглощения кислорода митохондриями клеток головного мозга и сердца, угнетению процессов окислительного фосфорилирования при остром стрессорном воздействии, острой и хронической алкогольной интоксикации, о чем свидетельствует увеличение показателя ДК.
5. Салифен (15 мг/кг) и фенотропил (25мг/кг) снижали концентрацию МДА при остром стрессе и алкогольной интоксикации 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 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
- СПР — саркоплазматический ретикулум
- ФАД — флавинадениндинуклеотид
- ФМН — флавин мононуклеотида
- ХАИ — хроническая алкогольная интоксикация
- ЦПЭ — цепь переноса электронов
- ЦТК — цикл трикарбоновых кислот, цитратный цикл
- СYP2E1 — цитохром P450 2E1
- GDH — глутаматдегидрогеназный комплекс
- GSH — глутатионпероксидаза
- IFM — миофибриллярные митохондрии
- Mfn1, Mfn 2 – митофузины 1 и 2
- mGluR — глутаматные транспортеры

mPTP – трансмембранная высокопроницаемая митохондриальная пора

NPY — нейропептид Y

OXPHOS — окислительное фосфорилирование

PNM — пренуклеарные митохондрии

SSM — субсарколеммальные митохондрии

V3- скорость фосфорилирующего дыхания по Чансу и Вильямсу

V4- скорость нефосфорилирующего дыхания (состояние 4) по Чансу и Вильямсу

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Багметова, В. В. Экспериментальное сравнение ноотропных свойств аналога ГАМК фенибута и его соли с янтарной кислотой / В. В. Багметова, А. Н. Кривицкая, И. Н. Тюренков и др. // Вестник новых медицинских технологий. – 2012. – Т. 19. – №. 4.
2. Багметова, В. В. Сравнительная оценка антидепрессивных свойств гидрохлорида β -фенилглутаминовой кислоты (РГПУ-135, глутарон) / В. В. Багметова, Ю. В. Чернышева, О. В. Меркушенкова и др. // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2013. – Т. 76. – №. 3. – С. 7-9.
3. Багметова, В. В. Сравнительное экспериментальное изучение ноотропных свойств аналога ГАМК фенибута и его метилового эфира / В. В. Багметова, Л. Е. Бородкина, И. Н. Тюренков. и др. // Фундаментальные исследования. – 2011. – Т. 3. – №. 10.
4. Балакирева, Е. А. Ноотропил в лечении перинатального поражения центральной нервной системы у детей первого года жизни / Е. А. Балакирева, А. Ф. Неретина // Казанский медицинский журнал. – 2009. – Т. 90. – №. 3.
5. Бородкина, Л. Е. Результаты изучения противоишемических свойств нового производного ГАМК соединения РГПУ-189 и фенибута в сравнительном аспекте / Л. Е. Бородкина, М. Н. Багметов, В. В. Епишина и др. // Современные наукоемкие технологии. – 2007. – №. 5.
6. Верткин А. Л. Эффективная тканевая противоишемическая терапия сосудистых заболеваний головного мозга различного генеза / А. Л. Верткин // Кардиоваскулярная терапия и профилактика. – 2016. – Т. 15. – №. 2.
7. Воронина, Т. А. Роль гипоксии в развитии инсульта и судорожных состояний. Антигипоксанты / Т. А. Воронина // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. – 2016. – Т. 14. – №. 1.

8. Воронков, А. В. Эффективность влияния мефебута на скорость церебрального кровотока по результатам доплерографического исследования у крыс с острой ишемической патологией головного мозга / А. В. Воронков, И. Н. Тюренков, Л. Е. Бородкина и др. //Успехи современного естествознания. – 2004. – №. 12. – С. 41-41.
9. Гусакова, Е. А. Значение ГАМК-миметиков в ограничении стрессорного повреждения / Е. А. Гусакова, И. В. Городецкая //Достижения фундаментальной, клинической медицины и фармации. – 2019. – С. 277-278.
10. Даниленко, Л. М. Но в сигнальном каскаде фармакологического preconditionирования при ишемии-реперфузии миокарда / Л. М. Даниленко, М. В. Покровский, Т. А. Денисюк и др. //Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения. – 2015. – №. 2. – С. 40-44.
11. Звонарева, Е. В. Фенотропил в терапии когнитивных расстройств у подростков с астеническим синдромом / Е. В. Звонарева //Нервные болезни. – 2006. – №. 2.
12. Иванова, Л. Б. Влияние производных ГАМК на функцию эндотелия крыс с экспериментальным гестозом / Л. Б. Иванова, В. И. Карамышева, В. Н. Перфилова и др. //Проблемы репродукции. – 2012. – №. 1. – С. 28-30.
13. Кайгородова, Т. В. Подходы Всемирной организации здравоохранения к борьбе со злоупотреблением алкоголем / Т. В. Кайгородова, А. А. Куликов //Социальные аспекты здоровья населения. – 2010. – Т. 14. – №. 2.
14. Камчатнов П. Р. Применение миорелаксантов у пациентов с болевыми синдромами поясничной области / П. Р. Камчатнов, С. Б. Ханмурзаева, А. В. Чугунов и др. //Терапия. – 2017. – №. 2. – С. 135-140.
15. Ковалева, Л. А. Фармакологическая коррекция функции митохондрий при травме мозга у неполовозрелых животных / Л. А. Ковалева, В. Е.

- Новиков, Е. И. Климкина и др. //Смоленский медицинский альманах. – 2016. – №. 3.
- 16.Коваленя, Т. А. Эффект кверцетина и комплекса кверцетин-гидроксипропил- β -циклодекстрин при окислительном повреждении митохондрий *in vitro* / Т. А. Коваленя, Т. В. Ильич, А. И. Савко, и др.//Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем. – 2020. – С. 39-39.
 - 17.Козин, М. С., Участие митохондрий в развитии нейродегенерации при рассеянном склерозе / М. С. Козин, О. Г. Кулакова, О. О. Фаворова //Биохимия. – 2018. – Т. 83. – №. 7. – Р. 1002-1021.
 - 18.Кочуева, М. Н. Современные возможности использования корректоров клеточного метаболизма в условиях гипоксии: в фокусе милдронат / М. Н. Кочуева, Г. И. Кочуев //Новости медицины и фармации. – 2014. – №. 5. – С. 10-13_m.
 - 19.Кустова, М. В. Влияние производных гамк и глутаминовой кислоты на инотропные резервы сердца алкоголизированных животных в условиях увеличения преднагрузки / М. В. Кустова, В. Н. Перфилова //Бюллетень медицинской науки. – 2021. – Т. 24. – №. 4. – С. 116-119.
 - 20.Кустова, М. В. Изучение влияния нового производного гамк на инотропные резервы сердца при максимальной изометрической нагрузке у крыс после хронической алкогольной интоксикации / М. В. Кустова //Молекулярные и Биологические аспекты Химии, Фармацевтики и Фармакологии. – 2020. – С. 56-56.
 - 21.Малинина, Е. В. Клинические рекомендации по диагностике и лечению органического психического расстройства в детском возрасте / Е. В. Малинина, Е. В. Макушкин //Москва–Челябинск. – 2015.
 - 22.Мокина Т. В. и др. Эффективность Фенотропила при лечении астенического синдрома у больных дисциркуляторной энцефалопатией

- / Т. В. Мокина, Е. А. Антипенко, А. В. Густов //Лечебное дело. – 2010. – №. 4.
- 23.Новиков, В. Е. Митохондриальная синтаза оксида азота и ее роль в механизмах адаптации клетки к гипоксии / В. Е.Новиков, О. С.Левченкова, Е. В. Пожилова //Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. – 2016. – Т. 14. – №. 2. – С. 38-46.
- 24.Отеллин, В. А. Воздействие перинатальной гипоксии на структуры гематоэнцефалического барьера у крыс при введении салифена / В. А. Отеллин, Л. И. Хожай, И. Н. Тюренков //Морфология. – 2015. – Т. 148. – №. 6. – С. 34-37.
- 25.Перфилова, В. Н. Влияние соединения РГПУ-238 на функциональные резервы сердца стрессированных животных разных возрастных групп / В. Н. Перфилова, Н. В. Садикова, И. И. Прокофьев и др. //Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2015. – Т. 78. – №. 5. – С. 49-49.
- 26.Перфилова, В. Н. Влияние структурного аналога гамма-аминомасляной кислоты на выраженность процессов перекисного окисления липидов и активность антиоксидантных ферментов в условиях ишемического повреждения миокарда / В. Н. Перфилова, И. Н. Тюренков, О. Ю. Гречко и др. //Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. – 2010. – №. 1 (33).
- 27.Перфилова, В. Н. Возможные механизмы антиангинального действия производных ГАМК / В. Н. Перфилова, И. Н. Тюренков //Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2005. – Т. 68. – №. 5. – С. 68-71.
- 28.Перфилова, В. Н. Изменения функционирования системы микроциркуляции под влиянием нового производного ГАМК-соединения РГПУ-147 при хроническом стрессорном воздействии/ В. Н. Перфилова, И. Н.Тюренко, С.А. Лебедева и др. //Регионарное кровообращение и микроциркуляция. – 2007. – Т. 6. – №. 4. – С. 64-67.

29. Перфилова, В. Н. Роль ГАМК-ергической системы в ограничении стрессорного повреждения миокарда / В. Н. Перфилова, И. Н.Тюренко //Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. – 2005. – Т. 4. – №. 1. – С. 21-26.
- 30.Перфилова, В. Н. Кардиопротекторные свойства структурных аналогов ГАМК / В. Н. Перфилова //Автореф. дисс. д-ра биол. наук. – 2009.
- 31.Перфилова, В. Н. Коррекция дисфункции митохондрий ГАМК-ергическими средствами / В. Н. Перфилова, И. Н. Тюренков, О. В. Островский и др. //Волгоградский научно-медицинский журнал. – 2010. – №. 3 (27).
- 32.Перфилова, В. Н. Морфофункциональная оценка кардиопротекторного действия производных ГАМК в условиях хронической алкогольной интоксикации / В. Н. Перфилова, И. Н.Тюренков, В. Б. Писарев, и др. //Волгоградский научно-медицинский журнал. – 2008. – №. 1 (17). – С. 16-20.
- 33.Перфилова, В. Н., Тюренков И. Н. Роль ГАМК-ергической системы в ограничении стрессорного повреждения миокарда / В. Н. Перфилова, И. Н. Тюренков //Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. – 2005. – Т. 4. – №. 1.
- 34.Садикова, Н. В. Коррекция производными глутаминовой кислоты стрессорных повреждений сердца / Н. В. Садикова // дис. – Волгоград: Садикова Наталья Владимировна, 2016.
- 35.Селянина, Н. В. Опыт применения Фенотропила у больных с начальными проявлениями недостаточности кровоснабжения мозга / Н. В. Селянина, А. А. Шутов //Биомедицина (Баку). – 2008. – №. 2.
- 36.Семернин, Е. Н. Алкогольная болезнь сердца. Клинико-генетические и морфо-функциональные аспекты. Современное представление / Е. Н. Семернин, А. Я. Гудкова // Артериальная гипертензия. – 2008. – Т. 14. – №. Приложение 1-2.

- 37.Сережникова, Т. К. Психомодулирующее действие сукцината фенотропила в условиях информационно-физического стресса / Т. К. Сережникова, М. А. Самотруева, И. Н. Тюренков и др. //Современные наукоемкие технологии. – 2010. – №. 9. – С. 212-212.
- 38.Силачев, Д. Н. Митохондрии как мишень для нейропротекции / Д. Н. Силачев, Л. Д. Зорова, Э. А. Усатикова и др. //Биологические мембраны: Журнал мембранной и клеточной биологии. – 2015. – Т. 32. – №. 5-6. – С. 388-388.
- 39.Смирнов, А. В. Морфологические преобразования в пирамидном слое зоны са1 гиппокампа крыс при моделировании хронической алкогольной интоксикации и фармакологической коррекции соединением нейроглутам / А. В. Смирнов, И. Н. Тюренков, А. А. Замлелов и др. //Волгоградский научно-медицинский журнал. – 2019. – №. 4.
- 40.Солгалова, А. С. Пирацетам и бетагистин: возможные механизмы эндотелиопротекции / А. С. Солгалова, В. О. Солдатов, М. А. Першина и др. //Курский научно-практический вестник «Человек и его здоровье». – 2018. – №. 2.
- 41.Сутулов, Ю. Л. Средство для лечения алкогольных поражений внутренних органов/ Ю. Л. Сутулов, В. В. Попов, Л. В. Логунова – 1994.
- 42.Сытый, В. П. Клинические исследования эффективности Милдроната/ В. П. Сытый //Рецепт. – 2007. – №. 4. – С. 76-80.
- 43.Тюренков И. Н. Влияние различных композиций фенибута с органическими кислотами на неврологический, когнитивный и поведенческий дефицит у крыс при фокальной ишемии головного мозга / И. Н. Тюренков, Д. В. Куркин, Е. В. Волотова и др. //Сибирский медицинский журнал (Иркутск). – 2012. – Т. 115. – №. 8.
- 44.Тюренков, И. Н.и др. Кардиопротекторное действие нового производного гамк-соединения ргпу-207-в условиях острого

- иммобилизационно-болевого стрессорного воздействия / И. Н. Тюренков, В. Н. Перфилова, И. С. Мокроусов //Современные проблемы науки и образования. – 2016. – №. 4. – С. 100-100.
- 45.Тюренков, И. Н. Стресспротекторное действие нового производного глутаминовой кислоты при блокаде нейрональной NO-синтазы /И. Н. Тюренков, Т. А. Попова, В. Н. Перфилова //Биомедицинская химия. – 2017. – Т. 63. – №. 1. – С. 47-55.
- 46.Тюренков, И. Н. Изучение нейропротекторного действия нового производного глутаминовой кислоты — нейроглутама при фокальной ишемии мозга у крыс / И. Н. Тюренков, Д. В. Куркин, Д. А. Бакулин и др. //Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2014. – Т. 77. – №. 9. – С. 8-12.
- 47.Тюренков. И. Н. Теоретическое обоснование применения ГАМК-ергических средств для лечения ишемии мозга / И. Н. Тюренков, М. Н. Багметов, В. В. Елишина и др.//Биомедицина. – 2006. – №. 4.
- 48.Флеров, М. А. Свободнорадикальное окисление липидов в гипоталамусе крыс при стрессе после введения кортизола / М. А. Флеров, А. В. Вьюшина //Российский физиологический журнал им. ИМ Сеченова. – 2011. – Т. 97. – №. 9. – С. 898-902.
- 49.Хан, В. В. Влияние некоторых производных гаммааминомасляной и янтарной кислот на коронарное кровообращение в условиях ишемизированного миокарда / В. В. Хан //Ростов-н/Д. – 1990.
- 50.Хомазюк, Т. А. Ментальное здоровье пациентов с сосудистой коморбидной патологией: реальная врачебная практика и инновационные подходы к решению проблемы/ Т. А. Хомазюк, В. Ю. Кротова, О. В. Соя //Неврология И Нейрохирургия. Восточная Европа. – 2019. – Т. 9. – №. 2. – С. 290-309.

51. Aberle, N. S. Experimental assessment of the role of acetaldehyde in alcoholic cardiomyopathy / N. S. Aberle, J. Ren // Biological procedures online. – 2003. – T. 5. – №. 1. – C. 1-12.
52. Achzet L. M. Oxidative Stress Underlies the Ischemia/Reperfusion-Induced Internalization and Degradation of AMPA Receptors / L. M. Achzet, C. J. Davison, et al. // International Journal of Molecular Sciences. – 2021. – T. 22. – №. 2. – C. 717.
53. Alam, S. Human peripheral blood mononuclear cells express GABAA receptor subunits / S. Alam, D. L. Laughton, A. Walding [et al.] // Molecular immunology. – 2006. – T. 43. – №. 9. – P. 1432-1442.
54. Al-Gadi, I. S. Endocrine disorders in primary mitochondrial disease / I. S. Al-Gadi, R. H. Haas, M. J. Falk et al. // Journal of the Endocrine Society. – 2018. – T. 2. – №. 4. – P. 361-373.
55. Alvarez-Arellano L. Neuroprotective effects of quercetin in pediatric neurological diseases / L. Alvarez-Arellano, M. Salazar-García, J. C. Corona // Molecules. – 2020. – T. 25. – №. 23. – C. 5597.
56. Andreyev, A. Y. Mitochondrial ROS metabolism: 10 years later / A. Y. Andreyev, Y. E. Kushnareva, A. N. Murphy et al. // Biochemistry (Moscow). – 2015. – T. 80. – №. 5. – P. 517-531.
57. Apel, K. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction / K. Apel, H. Hirt // Annu. Rev. Plant Biol. – 2004. – T. 55. – P. 373-399.
58. Aufschnaiter, A. Mitochondrial lipids in neurodegeneration / A. Aufschnaiter, V. Kohler, J. Diessl et al. // Cell and tissue research. – 2017. – T. 367. – №. 1. – P. 125-140.
59. Austin, K. W. An integrated review of psychological stress in Parkinson's disease: biological mechanisms and symptom and health outcomes / K. W. Austin, S. W. Ameringer, L. J. Cloud // Parkinson's disease. – 2016. – T. 2016.

60. Balbo, S. Implications of acetaldehyde-derived DNA adducts for understanding alcohol-related carcinogenesis / S. Balbo, P. J. Brooks // *Biological Basis of Alcohol-Induced Cancer*. – 2015. – P. 71-88.
61. Beal, M. F. Mitochondria take center stage in aging and neurodegeneration / M. F. Beal // *Annals of Neurology: Official Journal of the American Neurological Association and the Child Neurology Society*. – 2005. – T. 58. – №. 4. – P. 495-505.
62. Belosludtsev, K. N. Diabetes mellitus, mitochondrial dysfunction and Ca²⁺-dependent permeability transition pore / K. N. Belosludtsev, N. V. Belosludtseva, M. V. Dubinin // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2020. – T. 21. – №. 18. – P. 6559.
63. Bennett, C. F. Targeting Adaptive Cellular Responses To Mitochondrial Bioenergetic Deficiencies In Human Disease / C. F. Bennett, C. T. Ronayne, P. Puigserver // *The FEBS Journal*. – 2021.
64. Bhat, R. Inhibitory role for GABA in autoimmune inflammation / R. Bhat, R. Axtell, A. Mitra et al. // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2010. – T. 107. – №. 6. – P. 2580-2585.
65. Birk, A. V. Targeting mitochondrial cardiolipin and the cytochrome c/cardiolipin complex to promote electron transport and optimize mitochondrial ATP synthesis / A. V. Birk, W. M. Chao, C. Bracken et al. // *British journal of pharmacology*. – 2014. – T. 171. – №. 8. – P. 2017-2028.
66. Boengler, K. Mitochondria and ageing: role in heart, skeletal muscle and adipose tissue / K. Boengler, M. Kosiol, M. Mayr et al. // *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle*. – 2017. – T. 8. – №. 3. – P. 349-369.
67. Bratic, A. The role of mitochondria in aging / A. Bratic, N. G. Larsson // *The Journal of clinical investigation*. – 2013. – T. 123. – №. 3. – P. 951-957.
68. Bulthuis, E. P. Mitochondrial morphofunction in mammalian cells / E. P. Bulthuis, M. J. Adjobo-Hermans, P. H. Willems et al. // *Antioxidants & redox signaling*. – 2019. – T. 30. – №. 18. – P. 2066-2109.

69. Cai, Q. Alterations in mitochondrial quality control in Alzheimer's disease / Q. Cai, P. Tammineni // *Frontiers in cellular neuroscience*. – 2016. – T. 10. – P. 24.
70. Cai, Q. Mitochondrial aspects of synaptic dysfunction in Alzheimer's disease / Q. Cai, P. Tammineni // *Journal of Alzheimer's disease*. – 2017. – T. 57. – №. 4. – P. 1087-1103.
71. Carriedo S. G. AMPA exposures induce mitochondrial Ca²⁺ overload and ROS generation in spinal motor neurons in vitro/ S. G. Carriedo et al. // *Journal of Neuroscience*. – 2000. – T. 20. – №. 1. – C. 240-250.
72. Carroll, J. Analysis of the Subunit Composition of Complex I from Bovine Heart Mitochondria S / J. Carroll, I. M. Fearnley, R. J. Shannon et al. // *Molecular & Cellular Proteomics*. – 2003. – T. 2. – №. 2. – P. 117-126.
73. Castillo, T. Role of cytochrome P-450 2E1 in ethanol-, carbon tetrachloride—and iron-dependent microsomal lipid peroxidation / T. Castillo, D. R. Koop, S. Kamimura [et al.] // *Hepatology*. – 1992. – T. 16. – №. 4. – C. 992-996.
74. Ceccato, S. Increased risk taking in relation to chronic stress in adults / S. Ceccato, B. M. Kudielka, C. Schwieren // *Frontiers in psychology*. – 2016. – T. 6. – P. 2036.
75. Celes, M. R. N. Disruption of calcium homeostasis in cardiomyocytes underlies cardiac structural and functional changes in severe sepsis / M. R. Celes, L. M. Malvestio, S. O. Suadicaní et al. // *PLoS One*. – 2013. – T. 8. – №. 7. – P. e68809.
76. Chamberlain, K. A. Mechanisms for the maintenance and regulation of axonal energy supply / K. A. Chamberlain, Z. H. Sheng // *Journal of neuroscience research*. – 2019. – T. 97. – №. 8. – P. 897-913.
77. Chandel, N. S. Mitochondria as signaling organelles / N. S. Chandel // *BMC biology*. – 2014. – T. 12. – №. 1. – P. 1-7.

- 78.Chen, H. Mitochondrial dynamics–fusion, fission, movement, and mitophagy–in neurodegenerative diseases / H. Chen, D. C. Chan //Human molecular genetics. – 2009. – T. 18. – №. R2. – P. R169-R176.
- 79.Chen, Y. PINK1-phosphorylated mitofusin 2 is a Parkin receptor for culling damaged mitochondria / Y. Chen, G. W. Dorn //Science. – 2013. – T. 340. – №. 6131. – P. 471-475.
- 80.Chen, Y. R. Cardiac mitochondria and reactive oxygen species generation / Y. R. Chen, J. L. Zweier //Circulation research. – 2014. – T. 114. – №. 3. – P. 524-537.
- 81.Chertkova, R. V. New insight into the mechanism of mitochondrial cytochrome c function / R. V. Chertkova, N. A. Brazhe, T. V. Bryantseva et al. //PLoS One. – 2017. – T. 12. – №. 5. – P. e0178280.
- 82.Cioffi, F. Molecular mechanisms and genetics of oxidative stress in Alzheimer's disease / Cioffi, R. H. I. Adam, K. Broersen //Journal of Alzheimer's Disease. – 2019. – T. 72. – №. 4. – P. 981-1017.
- 83.Cohen, S. Psychological stress and susceptibility to the common cold / S. Cohen, A. J. Tyrrell D., A. P. Smith //New England journal of medicine. – 1991. – T. 325. – №. 9. – P. 606-612.
- 84.Court, F. A. Mitochondria as a central sensor for axonal degenerative stimuli / F. A. Court, M. P. Coleman // Trends in neurosciences. – 2012. – T. 35. – №. 6. – P. 364-372.
- 85.Cui, C. Progress in understanding mitochondrial calcium uniporter complex-mediated calcium signalling: A potential target for cancer treatment/ C.Cui, J.Yang, L. Fu [et al.] //British journal of pharmacology. – 2019. – T. 176. – №. 9. – P. 1190-1205.
- 86.Cullinan, W. E. Functional role of local GABAergic influences on the HPA axis / W. E. Cullinan, D. R. Ziegler, J. P. Herman //Brain Structure and Function. – 2008. – T. 213. – №. 1-2. – P. 63.

- 87.Cullinan, W. E., Ziegler D. R., Herman J. P. Functional role of local GABAergic influences on the HPA axis / W. E. Cullinan, D. R. Ziegler, J. P. Herman //Brain Structure and Function. – 2008. – T. 213. – №. 1-2. – P. 63.
- 88.Dai, D. F. Mitochondrial oxidative stress mediates angiotensin II–induced cardiac hypertrophy and Gαq overexpression–induced heart failure / D. F. Dai, S. C. Johnson, J. J. Villarín et al. //Circulation research. – 2011. – T. 108. – №. 7. – P. 837-846.
- 89.Del Campo, A. Mitochondrial fragmentation impairs insulin-dependent glucose uptake by modulating Akt activity through mitochondrial Ca²⁺ uptake / A. Del Campo, V. Parra, C. Vásquez-Trincado et al. //American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism. – 2014. – T. 306. – №. 1. – P. E1-E13.
- 90.Deng, H. Mitochondrial dynamics regulates Drosophila intestinal stem cell differentiation / H. Deng, S. Takashima, M. Paul et al. //Cell death discovery. – 2018. – T. 4. – №. 1. – C. 1-13.
- 91.Denham, N. C. Calcium in the pathophysiology of atrial fibrillation and heart failure / N. C. Denham, C. M. Pearman, J. L. Caldwell et al. //Frontiers in Physiology. – 2018. – T. 9. – P. 1380.
- 92.Devine, M. J. Mitochondria at the neuronal presynapse in health and disease / M. J. Devine, J. T. Kittler //Nature Reviews Neuroscience. – 2018. – T. 19. – №. 2. – P. 63-80.
- 93.Dey, S. Mitochondrial ROS drive sudden cardiac death and chronic proteome remodeling in heart failure / S. Dey, D. DeMazumder, A. Sidor et al. //Circulation research. – 2018. – T. 123. – №. 3. – P. 356-371.
- 94.Di Rocco, G. Protein disulfide isomerase as a prosurvival factor in cell therapy for muscular and vascular diseases / G. Di Rocco, S. Baldari, A. Gentile et al. //Stem cell research & therapy. – 2018. – T. 9. – №. 1. – P. 1-11.]
- 95.Diaz-Vegas, A. Is mitochondrial dysfunction a common root of noncommunicable chronic diseases? / A. Diaz-Vegas, P. Sanchez-Aguilera, J. R. Krycer et al. //Endocrine reviews. – 2020. – T. 41. – №. 3. – P. 491-517.

96. Doenst, T. Cardiac metabolism in heart failure: implications beyond ATP production / T. Doenst, T. D. Nguyen, E. D. Abel // *Circulation research*. – 2013. – T. 113. – №. 6. – P. 709-724.
97. Dunn, J. D. Reactive oxygen species and mitochondria: A nexus of cellular homeostasis / J. D. Dunn, L. A. Alvarez, X. Zhang et al. // *Redox biology*. – 2015. – T. 6. – P. 472-485.
98. Dupuis, L. Mitochondrial quality control in neurodegenerative diseases / L. Dupuis // *Biochimie*. – 2014. – T. 100. – P. 177-183.
99. Efremov, R. G., Sazanov L. A. The coupling mechanism of respiratory complex I—a structural and evolutionary perspective / R. G. Efremov, L. A. Sazanov // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*. – 2012. – T. 1817. – №. 10. – P. 1785-1795.
100. El-Mas M. M., Abdel-Rahman A. A. Role of alcohol oxidative metabolism in its cardiovascular and autonomic effects / M.M. El-Mas, A.A. Abdel-Rahman // *Aldehyde dehydrogenases*. – 2019. – C. 1-33.
101. Engl, E. Non-signalling energy use in the brain / E. Engl, D. Attwell // *The Journal of physiology*. – 2015. – T. 593. – №. 16. – P. 3417-3429.
102. Fernández-Moriano, C. Mitochondria-targeted protective compounds in Parkinson's and Alzheimer's diseases / C. Fernández-Moriano, E. González-Burgos, M. P. Gómez-Serranillos // *Oxidative medicine and cellular longevity*. – 2015. – T. 2015.
103. Filadi, R. Mitofusin 2: from functions to disease / R. Filadi, D. Pendin, P. Pizzo // *Cell death & disease*. – 2018. – T. 9. – №. 3. – P. 1-13.
104. Finkel, T. Oxidative stress and the biology of ageing / T. Finkel, N. J. Holbrook // *nature*. – 2000. – T. 408. – №. 6809. – P. 239-247.
105. Franco-Iborra, S. Defective mitochondrial protein import contributes to complex I-induced mitochondrial dysfunction and neurodegeneration in Parkinson's disease / S. Franco-Iborra, T. Cuadros, A. Parent et al. // *Cell death & disease*. – 2018. – T. 9. – №. 11. – P. 1-17.

106. Franco-Iborra, S. Mitochondrial quality control in neurodegenerative diseases: focus on Parkinson's disease and Huntington's disease / S. Franco-Iborra, M. Vila, C. Perier //Frontiers in neuroscience. – 2018. – T. 12. – P. 342.
107. Fu, H. Selective vulnerability in neurodegenerative diseases / H. Fu, J. Hardy, K. E. Duff //Nature neuroscience. – 2018. – T. 21. – №. 10. – P. 1350-1358.
108. Fujioka, H. Mitochondrial division in rat cardiomyocytes: an electron microscope study / H. Fujioka, B. Tandler, C. L. Hoppel //The Anatomical Record: Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology. – 2012. – T. 295. – №. 9. – P. 1455-1461.
109. Ghezzi, D. Mutations of the mitochondrial-tRNA modifier MTO1 cause hypertrophic cardiomyopathy and lactic acidosis / D. Ghezzi, E. Baruffini, T. B. Haack et al. //The American Journal of Human Genetics. – 2012. – T. 90. – №. 6. – P. 1079-1087.
110. Goh, K. Y. Impaired mitochondrial network excitability in failing guinea-pig cardiomyocytes / K. Y. Goh, J. Qu, H. Hong et al. //Cardiovascular research. – 2016. – T. 109. – №. 1. – P. 79-89.
111. Granatiero, V. Mitochondrial calcium handling in physiology and disease / V. Granatiero, D. De Stefani, R. Rizzuto //Mitochondrial Dynamics in Cardiovascular Medicine. – 2017. – P. 25-47.
112. Grigoruta, M. Psychological stress phenocopies brain mitochondrial dysfunction and motor deficits as observed in a parkinsonian rat model / M. Grigoruta, A. Martinez-Martinez, R. Y. Dagda et al. //Molecular neurobiology. – 2020. – T. 57. – №. 4. – P. 1781-1798.
113. Guo, C. Calcium permeable-AMPA receptors and excitotoxicity in neurological disorders / C. Guo, Y. Y.Ma //Frontiers in Neural Circuits. – 2021. – C. 82.

114. Han, D. Mitochondrial remodeling in the liver following chronic alcohol feeding to rats / D. Han, H. S. Johnson, M. P. Rao et al //Free Radical Biology and Medicine. – 2017. – T. 102. – P. 100-110.
115. Hasler G. Effect of acute psychological stress on prefrontal GABA concentration determined by proton magnetic resonance spectroscopy / G. Hasler, J. W. van der Veen, C. Grillon [et al.] //American Journal of Psychiatry. – 2010. – T. 167. – №. 10. – P. 1226-1231.
116. Hirst, J. Mitochondrial complex I / J. Hirst //Annual review of biochemistry. – 2013. – T. 82. – P. 551-575.
117. Hoyt, L. R. Mitochondrial ROS induced by chronic ethanol exposure promote hyper-activation of the NLRP3 inflammasome / L. R. Hoyt, M. J. Randall, J. L. Ather et al. //Redox biology. – 2017. – T. 12. – P. 883 - 896.
118. Hoyt, L. R. Mitochondrial ROS induced by chronic ethanol exposure promote hyper-activation of the NLRP3 inflammasome / L. R. Hoyt, M. J. Randall, J. L. Ather, et al.//Redox biology. – 2017. – T. 12. – C. 883-896.
119. Hurst, S. Mitochondrial Ca²⁺ and regulation of the permeability transition pore / S. Hurst, J. Hoek, S. S. Sheu //Journal of bioenergetics and biomembranes. – 2017. – T. 49. – №. 1. – P. 27-47.
120. Hüttemann, M. Regulation of mitochondrial oxidative phosphorylation through cell signaling / M. Hüttemann, I. Lee, L. Samavati et al.//Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research. – 2007. – T. 1773. – №. 12. – P. 1701-1720.
121. Iglewski, M. Mitochondrial fission and autophagy in the normal and diseased heart /. M. Iglewski, J. A.Hill, S. Lavandero,et al. //Current hypertension reports. – 2010. – T. 12. – №. 6. – P. 418-425.
122. Jacobson, L. H. Specific roles of GABAB (1) receptor isoforms in cognition / L. H. Jacobson, P. H. Kelly, B. Bettler, et al. //Behavioural brain research. – 2007. – T. 181. – №. 1. – P. 158-162.
123. Jeon, E. J. Enhanced alcohol degradation and hepatic protective effects of an Acetobacter Pasteurianus-derived product, CureZyme-ACE, in an acute

- intoxication rat model / E. J. Jeon, Y. S. Cho, A. H. Kim et al. //Laboratory Animal Research. – 2020. – T. 36. – P. 1-8.
124. Joo, Y. S. Alcohol consumption and progression of chronic kidney disease: results from the Korean cohort study for outcome in patients with chronic kidney disease / Y. S. Joo, H. Koh, K. H. Nam et al. //Mayo Clinic Proceedings. – Elsevier, 2020. – T. 95. – №. 2. – P. 293-305.
 125. Joshi, A. A Comparative Analysis of Thermodynamic Stability of Electron transport Chain Complex I Proteins and the Maximum Life Span of Host Organisms : дис. – 2014.
 126. Kaarniranta, K. Role of mitochondrial DNA damage in ROS-mediated pathogenesis of age-related macular degeneration (AMD) / K. Kaarniranta, E. Pawlowska, J. Szczepanska et al.//International journal of molecular sciences. – 2019. – T. 20. – №. 10. – P. 2374.
 127. Kalani, K. Mitochondrial permeability transition pore: a potential drug target for neurodegeneration / K. Kalani, S. F. Yan, S. S. Yan //Drug discovery today. – 2018. – T. 23. – №. 12. – P. 1983-1989.
 128. Kalkhoran, S. B. Unique morphological characteristics of mitochondrial subtypes in the heart: the effect of ischemia and ischemic preconditioning / S. B. Kalkhoran, P. Munro, F. Qiao et al.//Discoveries (Craiova, Romania). – 2017. – T. 5. – №. 1.
 129. Kandimalla, R. Hippocampal phosphorylated tau induced cognitive decline, dendritic spine loss and mitochondrial abnormalities in a mouse model of Alzheimer's disease / R. Kandimalla, M. Manczak, X. Yin et al. //Human molecular genetics. – 2018. – T. 27. – №. 1. – P. 30-40.
 130. Kanellopoulos, A. K. Aralar sequesters GABA into hyperactive mitochondria, causing social behavior deficits/ A. K. Kanellopoulos, V. Mariano, M. Spinazzi et al.//Cell. – 2020. – T. 180. – №. 6. – C. 1178-1197. e20.

131. Khalil, B. PINK1-induced mitophagy promotes neuroprotection in Huntington's disease / B. Khalil, N. El Fissi, A. Aouane et al. // *Cell death & disease*. – 2015. – T. 6. – №. 1. – P. e1617-e1617.
132. Kim J. E. Blockade of AMPA receptor regulates mitochondrial dynamics by modulating ERK1/2 and PP1/PP2A-mediated DRP1-S616 phosphorylations in the normal rat hippocampus / J. E. Kim et al. // *Frontiers in cellular neuroscience*. – 2019. – T. 13. – C. 179.
133. Kim, J. Role of mitochondria-cytoskeleton interactions in the regulation of mitochondrial structure and function in cancer stem cells / J. Kim, J. H. Cheong // *Cells*. – 2020. – T. 9. – №. 7. – P. 1691.
134. Klatsky, A. L. Alcohol and cardiovascular health / A. L. Klatsky // *Physiology & behavior*. – 2010. – T. 100. – №. 1. – P. 76-81.
135. Koolhaas, J. M. Stress revisited: a critical evaluation of the stress concept / J. M. Koolhaas, A. Bartolomucci, B. Buwalda et al. // *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. – 2011. – T. 35. – №. 5. – P. 1291-1301.
136. Koopman, W. J. H. Monogenic mitochondrial disorders / W. J. H. Koopman, P. H. G. M. Willems, J. A. M. Smeitink // *New England Journal of Medicine*. – 2012. – T. 366. – №. 12. – P. 1132-1141.
137. Korge, P. Reactive oxygen species production induced by pore opening in cardiac mitochondria: The role of complex III / P. Korge, G. Calmettes, S. A. John et al. // *Journal of Biological Chemistry*. – 2017. – T. 292. – №. 24. – P. 9882-9895.
138. Korge, P. Reactive oxygen species production induced by pore opening in cardiac mitochondria: The role of complex III / P. Korge, G. Calmettes, S. A. John et al. // *Journal of Biological Chemistry*. – 2017. – T. 292. – №. 24. – P. 9882-9895.
139. Kumar, A. A. Mitochondrial dysfunction in heart failure with preserved ejection fraction / A. A. Kumar, D. P. Kelly, J. A. Chirinos // *Circulation*. – 2019. – T. 139. – №. 11. – P. 1435-1450.

140. Kupats, E. et al. Mitochondrial-protective effects of R-Phenibut after experimental traumatic brain injury / E. Kupats, G. Stelfa, B. Zvejniece // *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. – 2020. – T. 2020.
141. Kupats, E. Safety and tolerability of the anxiolytic and nootropic drug phenibut: a systematic review of clinical trials and case reports / E. Kupats, J. Vrublevska, B. Zvejniece et al. // *Pharmacopsychiatry*. – 2020.
142. Lagraauw, H. M. Acute and chronic psychological stress as risk factors for cardiovascular disease: Insights gained from epidemiological, clinical and experimental studies / H.M. Lagraauw, J. Kuiper, I. Bot // *Brain, behavior, and immunity*. – 2015. – T. 50. – P. 18-30.
143. Lapin, I. Phenibut (β -phenyl-GABA): A tranquilizer and nootropic drug / I. Lapin // *CNS drug reviews*. – 2001. – T. 7. – №. 4. – P. 471-481.
144. Larsson, N. G. Somatic mitochondrial DNA mutations in mammalian aging // *Annual review of biochemistry*. – 2010. – T. 79. – P. 683-706.
145. Lee, J. Autophagy, mitochondria and oxidative stress: cross-talk and redox signalling / J. Lee, S. Giordano, J. Zhang // *Biochemical Journal*. – 2012. – T. 441. – №. 2. – P. 523-540.
146. Lemasters J. J. Regulation of mitochondrial function by voltage dependent anion channels in ethanol metabolism and the Warburg effect / J. J. Lemasters, E. L. Holmuhamedov, C. Czerny et al. // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*. – 2012. – T. 1818. – №. 6. – P. 1536-1544.
147. Li, Y. et al. Quercetin, inflammation and immunity. *Nutrients*, 8(3), 167. Quercetin, inflammation and immunity / Y. Li, J. Yao, C.Han, // *Nutrients*. – 2016. – T. 8. – №. 3. – C. 167
148. Li, Y. Implications of GABAergic neurotransmission in Alzheimer's disease / Y. Li, H. Sun, Z. Chen, et al. // *Frontiers in aging neuroscience*. – 2016. – T. 8. – P. 31.

149. Lim, S. Regulation of mitochondrial functions by protein phosphorylation and dephosphorylation/ S. Lim, K. R. Smith, S. T. S. Lim et al. //Cell & bioscience. – 2016. – T. 6. – №. 1. – P. 1-15.
150. Lin, M. T. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases / M. T. Lin, M. F. Beal //Nature. – 2006. – T. 443. – №. 7113. – P. 787-795.
151. Ling, F. Reactive oxygen species stimulate mitochondrial allele segregation toward homoplasmy in human cells / F. Ling, R. Niu, H. Hatakeyama et al. //Molecular biology of the cell. – 2016. – T. 27. – №. 10. – P. 1684-1693.
152. Liu, F. Mitochondria in ischemic stroke: new insight and implications / F. Liu, J. Lu, A. Manaenko et al.//Aging and disease. – 2018. – T. 9. – №. 5. – P. 924.
153. Liu, J. C. The in vivo biology of the mitochondrial calcium uniporter / J. C. Liu, R. J. Parks, J. Liu et al. // Mitochondrial Dynamics in Cardiovascular Medicine. – 2017. – P. 49-63.
154. Liu, J. Mitophagy in Parkinson's disease: from pathogenesis to treatment / J. Liu, W. Liu, R. Li et al. //Cells. – 2019. – T. 8. – №. 7. – P. 712.
155. Lobo, V. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health / V. Lobo, A. Patil, A. Phatak et al. // Pharmacognosy reviews. – 2010. – T. 4. – №. 8. – P. 118.
156. Lou, G. Mitophagy and neuroprotection / G. Lou, K. Palikaras, S. Lautrup et al. //Trends in molecular medicine. – 2020. – T. 26. – №. 1. – P. 8-20.
157. Lucassen, P. J. Neuropathology of stress / P. J. Lucassen, J. Pruessner, N. Sousa et al. //Acta neuropathologica. – 2014. – T. 127. – №. 1. – P. 109-
158. Lucero, M. Phosphoregulation on mitochondria: Integration of cell and organelle responses / M. Lucero, A. E. Suarez, J. W. Chambers // CNS neuroscience & therapeutics. – 2019. – T. 25. – №. 7. – P. 837-858.

159. Ma, Y. The role of mitochondrial dynamics in human cancers / Y. Ma, L. Wang, R. Jia // American Journal of Cancer Research. – 2020. – T. 10. – №. 5. – P. 1278.
160. Margineantu, D. H. Mitochondrial functions in stem cells / D. H. Margineantu, D. M. Hockenbery //Current Opinion in Genetics & Development. – 2016. – T. 38. – P. 110-117.
161. Marin, W. Mitochondria as a therapeutic target for cardiac ischemia-reperfusion injury / W. Marin, D. Marin, X. Ao, X. [et al.] //International Journal of Molecular Medicine. – 2021.
162. McEntee, W. J. Glutamate: its role in learning, memory, and the aging brain / W. J. McEntee, T. H. Crook //Psychopharmacology. – 1993. – T. 111. – №. 4. – P. 391-401.
163. McEwen, B. S. Protective and damaging effects of stress mediators / B. S. McEwen //New England journal of medicine. – 1998. – T. 338. – №. 3. – P. 171-179.
164. McEwen, B. S. Stress, adaptation, and disease: Allostasis and allostatic load / B. S. McEwen //Annals of the New York academy of sciences. – 1998. – T. 840. – №. 1. – P. 33-44.
165. McEwen, B. S., Gianaros P. J. Central role of the brain in stress and adaptation: links to socioeconomic status, health, and disease / B. S. McEwen, P. J. Gianaros //Annals of the New York Academy of Sciences. – 2010. – T. 1186. – P. 190.
166. Meerson, F. Z. Stress-induced arrhythmic disease of the heart-Part I / F. Z. Meerson //Clinical cardiology. – 1994. – T. 17. – №. 7. – P. 362-371.
167. Meijer, O. C. Understanding stress through the genome / O. C. Meijer //Stress. – 2006. – T. 9. – №. 2. – P. 61-67.
168. Meldrum, B. S. Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology / B. S. Meldrum //The Journal of nutrition. – 2000. – T. 130. – №. 4. – P. 1007S-1015S.

169. Moehle, E. A. Mitochondrial proteostasis in the context of cellular and organismal health and aging / E. A. Moehle, K. Shen, A. Dillin // *Journal of Biological Chemistry*. – 2019. – T. 294. – №. 14. – P. 5396-5407.
170. Morozov, I. S. Effect of analogs of γ -aminobutyric acid on the uptake of [^3H]- γ -aminobutyric acid by synaptosomes of the rat brain / I. S. Morozov, G. I. Kovalev, N. I. Maisov et al. // *Pharmaceutical Chemistry Journal*. – 1977. – T. 11. – №. 1. – P. 10-12.
171. Nair, R. R. Impaired mitochondrial fatty acid synthesis leads to neurodegeneration in mice / R. R. Nair, H. Koivisto, K. Jokivarsi et al. // *Journal of Neuroscience*. – 2018. – T. 38. – №. 45. – P. 9781-9800.
172. Ngo, D. H. An updated review on pharmaceutical properties of gamma-aminobutyric acid / D. H. Ngo, T. S. Vo // *Molecules*. – 2019. – T. 24. – №. 15. – P. 2678.
173. Ngo, Y. S. Mitochondrial disease: genetics and management / Y. S. Ng, D. M. Turnbull // *Journal of neurology*. – 2016. – T. 263. – №. 1. – P. 179-191.
174. Nicholls, D. G. Mitochondria and neuronal survival / D. G. Nicholls, S. L. Budd // *Physiological reviews*. – 2000. – T. 80. – №. 1. – P. 315-360.
175. Novotny, E. J. Leber's disease and dystonia: a mitochondrial disease / E. J. Novotny, G. Singh, D. C. Wallace et al. // *Neurology*. – 1986. – T. 36. – №. 8. – P. 1053-1053.
176. Oemer, G. Molecular structural diversity of mitochondrial cardiolipins / G. Oemer, K. Lackner, K. Muigg et al. // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2018. – T. 115. – №. 16. – P. 4158-4163.
177. Pallafacchina, G. Recent advances in the molecular mechanism of mitochondrial calcium uptake / G. Pallafacchina, S. Zanin, R. Rizzuto // *F1000Research*. – 2018. – T. 7.
178. Paradies, G. Functional role of cardiolipin in mitochondrial bioenergetics / G. Paradies, V. Paradies, V. De Benedictis et al. // *Biochimica*

- et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics. – 2014. – T. 1837. – №. 4. – P. 408-417.
179. Parks, R. J. Cyclophilin D-mediated regulation of the permeability transition pore is altered in mice lacking the mitochondrial calcium uniporter / R. J. Parks, S. Menazza, K. M. Holmstrom et al. // Cardiovascular research. – 2019. – T. 115. – №. 2. – P. 385-394.
 180. Pena-Oyarzun, D. Autophagy and oxidative stress in non-communicable diseases: a matter of the inflammatory state? / D. Pena-Oyarzun, R. Bravo-Sagua, A. Diaz-Vega et al. // Free Radical Biology and Medicine. – 2018. – T. 124. – P. 61-78.
 181. Peng, Y. Central and peripheral metabolic defects contribute to the pathogenesis of Alzheimer's disease: targeting mitochondria for diagnosis and prevention / Y. Peng, P. Gao, L. Shi et al. // Antioxidants & redox signaling. – 2020. – T. 32. – №. 16. – P. 1188-1236.
 182. Percário, S. Oxidative stress in parkinson's disease: Potential benefits of antioxidant supplementation / S. Percário, A. da Silva Barbosa, E. L. P. Varela et al. // Oxidative Medicine and Cellular Longevity. – 2020. – T. 2020.
 183. Percário, S. Oxidative stress in parkinson's disease: Potential benefits of antioxidant supplementation / S. Percário, A. da Silva Barbosa, E. L. Varela et al. // Oxidative Medicine and Cellular Longevity. – 2020. – T. 2020.
 184. Petrozzi, L. Mitochondria and neurodegeneration / L. Petrozzi, G. Ricci, N. J. Giglioli et al. // Bioscience reports. – 2007. – T. 27. – №. 1-3. – P. 87-104.
 185. Phaniendra, A. Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases / A. Phaniendra, D. B. Jestadi, L. Periyasamy // Indian journal of clinical biochemistry. – 2015. – T. 30. – №. 1. – P. 11-26.
 186. Piano, M. R. Alcoholic cardiomyopathy: pathophysiologic insights / M. R. Piano, S. A. Phillips // Cardiovascular toxicology. – 2014. – T. 14. – №. 4. – P. 291-308.

187. Picard, M. An energetic view of stress: focus on mitochondria / M. Picard, B. S. McEwen, E. S. Epel et al. //Frontiers in neuroendocrinology. – 2018. – T. 49. – P. 72-85.
188. Picard, M. The rise of mitochondria in medicine / M. Picard, D. C. Wallace, Y. Burelle //Mitochondrion. – 2016. – T. 30. – P. 105-116.
189. Poor, P. Effects of salicylic acid on the metabolism of mitochondrial reactive oxygen species in plants / P. Poor //Biomolecules. – 2020. – T. 10. – №. 2. – P. 341.
190. Puddey, I. B. Alcohol and hypertension—new insights and lingering controversies / I. B. Puddey, T. A. Mori, A. E. Barden [et al.] //Current hypertension reports. – 2019. – T. 21. – №. 10. – P. 1-10.
191. Qu, C. Mitochondrial electron transport chain complex III sustains hepatitis E virus replication and represents an antiviral target / C. Qu, S. Zhang, W. Wang et al. //The FASEB Journal. – 2019. – T. 33. – №. 1. – P. 1008-1019.
192. Rashmi, D. γ -aminobutyric acid (GABA): biosynthesis, role, commercial production, and applications / D. Rashmi, R. Zanan, S. John et al.//Studies in natural products chemistry. – Elsevier, 2018. – T. 57. – P. 413-452.
193. Reichmann, F. Neuropeptide Y: a stressful review / F. Reichmann, P. Holzer //Neuropeptides. – 2016. – T. 55. – P. 99-109.
194. Reyes-García, M. G. GABA (A) receptor subunits RNA expression in mice peritoneal macrophages modulate their IL-6/IL-12 production / M. G. Reyes-García, F. Hernández-Hernández, B. Hernández-Téllez [et al.]//Journal of neuroimmunology. – 2007. – T. 188. – №. 1-2. – P. 64-68.
195. Rötig, A. Pearson's marrow-pancreas syndrome. A multisystem mitochondrial disorder in infancy / A. Rötig, V. Cormier, S. Blanche et al. //The Journal of clinical investigation. – 1990. – T. 86. – №. 5. – P. 1601-1608.

196. Ruiz A. Intracellular Ca²⁺ release through ryanodine receptors contributes to AMPA receptor-mediated mitochondrial dysfunction and ER stress in oligodendrocytes/ A.Ruiz, C.Matute, E.Alberdi //Cell death & disease. – 2010. – T. 1. – №. 7. – C. e54-e54.
197. Ruiz, A. Mitochondrial division inhibitor 1 (mdivi-1) protects neurons against excitotoxicity through the modulation of mitochondrial function and intracellular Ca²⁺ signaling / A. Ruiz, E. Alberdi, C. Matute //Frontiers in molecular neuroscience. – 2018. – T. 11. – P. 3.
198. Ryan, B. J. Mitochondrial dysfunction and mitophagy in Parkinson's: from familial to sporadic disease / B. J. Ryan, S. Hoek, E. A. Fon et al. //Trends in biochemical sciences. – 2015. – T. 40. – №. 4. – P. 200-210.
199. Sadeghian, M. Mitochondrial dysfunction is an important cause of neurological deficits in an inflammatory model of multiple sclerosis / M. Sadeghian, V. Mastrolia, A. R. Haddad et al. //Scientific reports. – 2016. – T. 6. – №. 1. – P. 1-14.
200. Samokhvalov, A. V. Phenibut dependence / A. V. Samokhvalov, C. L. Paton-Gay, K. Balchand et al. //Case Reports. – 2013. – T. 2013. – P. bcr2012008381.
201. Sanderson, T. H. Molecular mechanisms of ischemia–reperfusion injury in brain: pivotal role of the mitochondrial membrane potential in reactive oxygen species generation / T. H. Sanderson, C. A. Reynolds, R. Kumar et al.//Molecular neurobiology. – 2013. – T. 47. – №. 1. – P. 9-23.
202. Sandi, C. Stress, cognitive impairment and cell adhesion molecules / C. Sandi //Nature Reviews Neuroscience. – 2004. – T. 5. – №. 12. – P. 917-930.
203. Saneto, R. P. Mitochondrial diseases: expanding the diagnosis in the era of genetic testing / R. P. Saneto //Journal of translational genetics and genomics. – 2020. – T. 4. – P. 384.
204. Sas, K. Mitochondria, metabolic disturbances, oxidative stress and the kynurenine system, with focus on neurodegenerative disorders / K. Sas, H.

- Robotka, J. Toldi et al. //Journal of the neurological sciences. – 2007. – T. 257. – №. 1-2. – P. 221-239.
205. Schurmann, P. Ethanol for the treatment of cardiac arrhythmias / P. Schurmann, J. Peñalver, M. Valderrábano //Current opinion in cardiology. – 2015. – T. 30. – №. 4. – P. 333.
206. Segerstrom, S. C. Psychological stress and the human immune system: a meta-analytic study of 30 years of inquiry / S. C. Segerstrom, G. E. Miller //Psychological bulletin. – 2004. – T. 130. – №. 4. – P. 601.
207. Setshedi, M. Acetaldehyde adducts in alcoholic liver disease / M. Setshedi, J. R. Wands, S. M. de la Monte //Oxidative medicine and cellular longevity. – 2010. – T. 3. – №. 3. – P. 178-185.
208. Shadel, G. S. Mitochondrial ROS signaling in organismal homeostasis / G. S. Shadel, T. L. Horvath //Cell. – 2015. – T. 163. – №. 3. – P. 560-569.
209. Sheng, Z. H. Mitochondrial transport in neurons: impact on synaptic homeostasis and neurodegeneration / Z. H. Sheng, Q. Cai //Nature Reviews Neuroscience. – 2012. – T. 13. – №. 2. – P. 77-93.
210. Siebels, I. Q-site inhibitor induced ROS production of mitochondrial complex II is attenuated by TCA cycle dicarboxylates / I. Siebels, S. Dröse //Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics. – 2013. – T. 1827. – №. 10. – P. 1156-1164.
211. Singh, R. Autophagy regulates lipid metabolism / R. Singh, S. Kaushik, Y. Wang [et al.] //Nature. – 2009. – T. 458. – №. 7242. – P. 1131-1135.
212. Singh-Mallah, G. The role of mitochondrial and endoplasmic reticulum reactive oxygen species production in models of perinatal brain injury / G. Singh-Mallah, S. Nair, M. Sandberg et al. //Antioxidants & redox signaling. – 2019. – T. 31. – №. 9. – P. 643-663.
213. Stagg, C. J. The role of GABA in human motor learning / C. J. Stagg, V. Bachtia, H. Johansen-Berg //Current Biology. – 2011. – T. 21. – №. 6. – P. 480-484.

214. Stefely, J. A. Biochemistry of mitochondrial coenzyme Q biosynthesis / J. A. Stefely, D. J. Pagliarini //Trends in biochemical sciences. – 2017. – T. 42. – №. 10. – C. 824-843.
215. Surve, S. Enigmatic presence of mitochondrial complex I in *Trypanosoma brucei* bloodstream forms / S. Surve, M. Heestand, B. Panicucci et al. //Eukaryotic cell. – 2012. – T. 11. – №. 2. – P. 183-193.
216. Teplova, V. V. Mechanism of triclosan toxicity: Mitochondrial dysfunction including complex II inhibition, superoxide release and uncoupling of oxidative phosphorylation / V. V. Teplova, K. N. Belosludtsev, A. G. Kruglov //Toxicology letters. – 2017. – T. 275. – P. 108-117.
217. Tian, R. Unlocking the secrets of mitochondria in the cardiovascular system: path to a cure in heart failure—a report from the 2018 National Heart, Lung, and Blood Institute Workshop / R. Tian, W. S. Colucci, Z. Arany et al. //Circulation. – 2019. – T. 140. – №. 14. – P. 1205-1216.
218. Tinker, R. J. Current and emerging clinical treatment in mitochondrial disease / R. J. Tinker, A. Z. Lim, R. J. Stefanetti et al.//Molecular diagnosis & therapy.– 2021. – P. 1-26.
219. Toleikis, A. Fatty acid oxidation and mitochondrial morphology changes as key modulators of the affinity for ADP in rat heart mitochondria / A. Toleikis, S. Trumbeckaite, J. Liobikas et al. //Cells. – 2020. – T. 9. – №. 2. – P. 340.
220. Tomita, H. Aldehyde dehydrogenase 1A1 in stem cells and cancer / H. Tomita, K. Tanaka, T. Tanaka et al. //Oncotarget. – 2016. – T. 7. – №. 10. – P. 11018.
221. Trushina, E. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in neurodegenerative diseases / E. Trushina, C. T. McMurray //Neuroscience. – 2007. – T. 145. – №. 4. – P. 1233-1248.
222. Tsai, C. W. Proteolytic control of the mitochondrial calcium uniporter complex / C. W. Tsai, Y. Wu, P. C. Pao et al. // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2017. – T. 114. – №. 17. – P. 4388-4393.

223. Tsigos, C. Stress: endocrine physiology and pathophysiology / C. Tsigos, I. Kyrou, E. Kassi et al. //Endotext [Internet]. – 2020.
224. Turkson, S. Neuroendocrine drivers of risk and resilience: The influence of metabolism & mitochondria / S. Turkson, A. Kloster, P. J. Hamilton et al. //Frontiers in neuroendocrinology. – 2019. – T. 54. – P. 100770.
225. Tyurenkov, I. N. Comparison of nootropic and neuroprotective features of aryl-substituted analogs of gamma-aminobutyric acid / I. N. Tyurenkov, L. E. Borodkina, V. V. Bagmetova [et al.] //Bulletin of experimental biology and medicine. – 2016. – T. 160. – №. 4. – P. 465-469.
226. Varga, Z. V. Drug-induced mitochondrial dysfunction and cardiotoxicity / Z. V. Varga, P. Ferdinandy, L. Liaudet et al.//American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology. – 2015. – T. 309. – №. 9. – P. H1453-H1467.
227. Vincent, A. E. The spectrum of mitochondrial ultrastructural defects in mitochondrial myopathy / A. E. Vincent, Y. S. Ng, K. White et al. //Scientific reports. – 2016. – T. 6. – №. 1. – P. 1-12.
228. Wagner, S. GABA in the mammalian suprachiasmatic nucleus and its role in diurnal rhythmicity / S.Wagner, M. Castel, H. Gainer et al.//Nature. – 1997. – T. 387. – №. 6633. – P. 598-603.
229. Wallace, D. C. A mitochondrial bioenergetic etiology of disease / D. C. A. Wallace //The Journal of clinical investigation. – 2013. – T. 123. – №. 4. – P. 1405-1412.
230. Wang, Z. Increased expression of microRNA-378a-5p in acute ethanol exposure of rat cardiomyocytes / Z. Wang, J. Song, L. Zhang, et al. // Cell Stress and Chaperones. – 2017. – T. 22. – №. 2. – P. 245-252.
231. Xu, S. Role of Mitochondria in Neurodegenerative Diseases: From an Epigenetic Perspective / S. Xu, X. Zhang, C. Liu et al.//Frontiers in Cell and Developmental Biology. – 2021. – P. 2402.

232. Yamada, Y. Cardiac muscle thin filament structures reveal calcium regulatory mechanism / Y. Yamada, K. Namba, T. Fujii //Nature communications. – 2020. – T. 11. – №. 1. – P. 1-9.
233. Yan, T. Acetaldehyde induces phosphorylation of dynamin-related protein 1 and mitochondrial dysfunction via elevating intracellular ROS and Ca²⁺ levels / T. Yan, Y. Zhao //Redox biology. – 2020. – T. 28. – P. 101381.
234. Yan, T. Astaxanthin inhibits acetaldehyde-induced cytotoxicity in SH-SY5Y cells by modulating Akt/CREB and p38MAPK/ERK signaling pathways / T. Yan, Y. Zhao, X.Zhang et al //Marine drugs. – 2016. – T. 14. – №. 3. – P. 56.
235. Ye, X. Parkin-mediated mitophagy in mutant hAPP neurons and Alzheimer's disease patient brains / X. Ye, X. Sun, V. Starovoytov et al.//Human molecular genetics. – 2015. – T. 24. – №. 10. – P. 2938-2951.
236. Zahedi, A. Deep analysis of mitochondria and cell health using machine learning / A. Zahedi, V. On, R. Phandthong et al. //Scientific reports. – 2018. – T. 8. – №. 1. – P. 1-15.
237. Zheng, K. H. Phenibut Addiction in a Patient with Substance Use Disorder / K. H. Zheng, A. Khan, E. D. Espiridion //Cureus. – 2019. – T. 11. – №. 7.
238. Zhong, Y. Induction of brain CYP2E1 by chronic ethanol treatment and related oxidative stress in hippocampus, cerebellum, and brainstem / Y. Zhong, G. Dong, H. Luo et al. // Toxicology. – 2012. – T. 302. – №. 2-3. – P. 275-284.
239. Zhou, B. Mitochondrial dysfunction in pathophysiology of heart failure / B. Zhou, R. Tian //The Journal of clinical investigation. – 2018. – T. 128. – №. 9. – P. 3716-3726.
240. Zielonka, J. Mitochondria-targeted triphenylphosphonium-based compounds: syntheses, mechanisms of action, and therapeutic and diagnostic applications / J. Zielonka, J. Joseph, A. Sikora et al. //Chemical reviews. – 2017. – T. 117. – №. 15. – P. 10043-10120.