

УДК 576.308 (343)



ОЦЕНКА РЕСПИРОМЕТРИЧЕСКОЙ ФУНКЦИИ МИТОХОНДРИЙ В УСЛОВИЯХ ПАТОЛОГИЙ РАЗЛИЧНОГО ГЕНЕЗА

А.В. Воронков¹, Д.И. Поздняков¹, С.А. Нигарян¹, Е.И. Хури¹, К.А. Мирошниченко¹,
А.В. Сосновская¹, Е.А. Олохова²

¹ Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава России
Россия, 357532, г. Пятигорск, пр. Калинина, 11

² ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет им. профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого» Минздрава России
Россия, 660005, г. Красноярск, ул. Партизана Железняка, д. 1

Поступила в редакцию: 18.12.2018

Принята к печати: 11.02.2019

Цель исследования – оценить изменение респирометрической функции митохондрий в условиях различных патологий. **Материалы и методы.** Исследование выполнено на крысах самцах линии Wistar. В качестве модельных патологий в работе использовали экспериментальную фокальную ишемию головного мозга, черепно-мозговую травму, коронаро-окклюзионный инфаркт миокарда и мышечную дисфункцию. Фокальную ишемию воспроизводили методом необратимой термокоагуляции средней мозговой артерии. Черепно-мозговую травму моделировали методом свободного падения груза. Экспериментальный инфаркт миокарда воспроизводили лигированием нисходящей ветви левой коронарной артерии. Мышечную дисфункцию моделировали методом «принудительного плавания с 20% отягощением». Дыхательную функцию митохондрий оценивали методом респирометрии по изменению потребления кислорода при внесении в среду разобщителей митохондриального дыхания: олигомицин, ротенон и FCCP. Дополнительно оценивали интенсивность процесса гликолиза и активность дыхательных комплексов I, II, IV и V. С целью комплексной оценки респирометрической функции проводили ИФА-исследование с определением концентрации АТФ, митохондриальной АТФ-синтазы, цитохром-с-оксидазы и НАДФ-оксидазы 4. **Результаты.** В ходе проведения исследования установлено, что в условиях экспериментальной ишемии головного мозга, черепно-мозговой травмы, инфаркта миокарда и мышечной дисфункции отмечено ухудшение АТФ-генерирующей способности митохондрий, максимального уровня дыхания и респираторной емкости, при этом снижение общей респирометрической функции сопровождалось усилением процессов гликолиза, которое носило некомпенсированный характер, а также дисфункцией митохондриальных комплексов I, II, IV и V, подтверждаемой увеличением активности НАДФ-оксидазы 4 и снижением активности цитохром-с-оксидазы и АТФ-синтазы. В итоге наблюдаемые изменения респирометрической функции митохондрий способствовали уменьшению концентрации АТФ в условиях церебральной ишемии – в 3,2 раза ($p < 0,05$), черепно-мозговой травмы – в 2,6 раза ($p < 0,05$), инфаркта миокарда – в 1,8 раза ($p < 0,05$) и мышечной дисфункции – в 4 раза ($p < 0,05$). **Заключение.** Основываясь на полученных данных, можно предположить, что в условиях ишемии головного мозга, черепно-мозговой травмы, инфаркта миокарда и мышечной дисфункции наблюдается ухудшение респирометрической функции митохондрий с угнетением синтеза АТФ и усилением процессов гликолиза.

Ключевые слова: ишемия головного мозга, инфаркт миокарда, черепно-мозговая травма, мышечная дисфункция, респирометрия митохондрий

Для цитирования: А.В. Воронков, Д.И. Поздняков, С.А. Нигарян, Е.И. Хури, К.А. Мирошниченко, А.В. Сосновская, Е.А. Олохова. Оценка респирометрической функции митохондрий в условиях патологий различного генеза. *Фармация и фармакология*. 2019;7(1): 20-31. DOI:10.19163/2307-9266-2019-7-1-20-31

© А.В. Воронков, Д.И. Поздняков, С.А. Нигарян, Е.И. Хури, К.А. Мирошниченко, А.В. Сосновская, Е.А. Олохова, 2019

For citation: A.V. Voronkov, D.I. Pozdnyakov, S.A. Nigaryan, E.I. Khouri, K.A. Miroshnichenko, A.V. Sosnovskaya, E.A. Olokhova. Evaluation of the mitochondria respirometric function in the conditions of pathologies of various geneses. *Pharmacy & Pharmacology*. 2019;7(1):20-31. DOI:10.19163/2307-9266-2019-7-1-20-31

EVALUATION OF THE MITOCHONDRIA RESPIROMETRIC FUNCTION IN THE CONDITIONS OF PATHOLOGIES OF VARIOUS GENESES

A.V. Voronkov¹, D.I. Pozdnyakov¹, S.A. Nigaryan¹, E.I. Khouri¹, K.A. Miroshnichenko¹,
A.V. Sosnovskaya¹, E.A. Olokhova²

¹ Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute – branch of Volgograd State Medical University
11, Kalinin Ave., Pyatigorsk, Russia, 357532

² Krasnoyarsk State Medical University n. a V.F. Voyno-Yasenetsky
1, Partizan Zheleznyak Str., Krasnoyarsk, Russia, 660005

Received: 18.12.2018

Принята к печати: 11.02.2019

*The aim of the paper is to assess the change in the mitochondrial respirometric function under conditions of various pathologies. **Materials and methods.** The study was performed on male Wistar rats. Experimental focal cerebral ischemia, traumatic brain injury, coronary occlusive myocardial infarction and muscle dysfunction were used as pathological models. Focal ischemia was reproduced by the method of irreversible thermocoagulation of the middle cerebral artery. Traumatic brain injury was modeled by the method of free fall of the load. Experimental myocardial infarction was reproduced by ligating the descending branch of the left coronary artery. Muscle dysfunction was modeled by the method of «forced swimming with a 20% burden». The respiratory function of mitochondria was assessed by the method of respirometry by the change in oxygen consumption when introducing mitochondrial respiration into the medium: Oligomycin, Rotenone and FCCP. Additionally, we evaluated the intensity of the glycolysis process and the activity of respiratory complexes I, II, IV and V. In order to comprehensively assess the respiratory function, an ELISA study was conducted to determine the concentration of ATP, mitochondrial ATP synthetase, cytochrome C oxidase and NADP-Oxidase 4. **Results.** In the course of the study it was established that under conditions of experimental cerebral ischemia, traumatic brain injury, myocardial infarction and muscle dysfunction, the ATP-generating ability of mitochondria the maximum breathing and respiratory capacity deteriorated, hereby the decrease in overall respiratory function was accompanied by an increase in glycolysis, which was uncompensated, as well as dysfunction of mitochondrial complexes I, II, IV and V, confirmed by an increase in NADPH oxidase 4 activity and a decrease in cytochrome C oxidases and ATP synthetase. As a result, the observed changes in mitochondrial respiration function contributed to a decrease in ATP concentration under conditions of cerebral ischemia - by 3.2 times ($p < 0.05$), traumatic brain injury – by 2.6 times ($p < 0.05$), myocardial infarction – by 1.8 times ($p < 0.05$) and muscle dysfunction – by 4 times ($p < 0.05$). **Conclusion.** Basing on the data obtained, we can assume that in conditions of cerebral ischemia, traumatic brain injury, myocardial infarction and muscle dysfunction, there is deterioration of the mitochondrial respirometric function with inhibition of ATP synthesis and increased glycolysis.*

Keywords: cerebral ischemia, myocardial infarction, traumatic brain injury, muscle dysfunction, respirometry of mitochondria

ВВЕДЕНИЕ

Митохондрии – клеточные органеллы, являющиеся основными источниками энергии в клетке, играющие также значимую роль в регуляции процессов каспаза-зависимого и каспаза-независимого путей апоптоза, редокс-сигнализации клетки [1]. В соответствии с этим выделяют три ведущие митохондриальные функции: респиromетрическая – обеспечение синтеза макроэргов в процессе окислительно-восстановительных реакций в электрон-транспортной митохондриальной дыхательной цепи [2]; апоптоз-регулирующая – регуляция инициации и прогрессирования апоптотического сигнала [3] и антиоксидантная – инактивация свободных радикалов [4]. При этом основной функцией митохондрий является респиromетрическая, которая обеспечивает взаимосвязь между редокс-состоянием клетки и активацией проапоптотических молекул [5]. На сегодняшний день установлено, что к числу «митохондриальных болезней», патогенез которых ассоциирован с нару-

шением функциональной активности митохондрий, относятся ишемический инсульт, болезнь Альцгеймера, черепно-мозговая травма (ЧМТ), ишемическая болезнь сердца и инфаркт миокарда, мышечное утомление [6]. В литературных источниках приводятся данные о том, что в патогенезе данных заболеваний центральная роль отводится энергодефициту, возникающему при наличии митохондриальной дисфункции [7]. В то же время уменьшение образования макроэргических соединений неотрывно связано с нарушением транспорта электронов в дыхательной цепи митохондрий и разобщением реакций субкомплексов I, II, IV и V, ведет к активации гликолиза и существенному снижению синтеза АТФ [8]. Кроме того, дисфункция комплексов I и II способствует перераспределению потока кислорода в сторону образования прооксидантов, в частности супероксидного радикала [9], а уменьшение образования АТФ ведет к активации каспаза-зависимого пути апоптоза [10]. Одновременно интенсификация анаэробных процес-

сов окисления ведет к накоплению недоокисленных продуктов обмена, что сдвигает внутриклеточное значение pH в кислую сторону. В сложившихся условиях отмечается активация проапоптотических сигнальных молекул (белки семейства Bid/Bax), запускающих каспаза-независимый путь апоптоза, что усиливает клеточную деструкцию [11]. Таким образом, оценка изменения респирометрической функции митохондрий в условиях различных патологий может являться базисом для разработки новых стратегий терапии «митохондриальных болезней», позволяющих устранить энергодифицит и сопряженные с ним апоптоз и окислительную модификацию клеточных структур.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Биологическая модель

Исследование выполнено на 50 крысах самцах линии Wistar массой 220-240 г, полученных из питомника лабораторных животных «Рапполово». Содержание и все проводимые с животными манипуляции соответствовали требованиям Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментов и других научных целей (Страсбург, 1986 г.). Крысы размещались в макролоновых клетках, где в качестве подстилочного материала использовали гранулированную древесную фракцию при относительной влажности $60 \pm 5\%$ и температуре воздуха $22 \pm 2^\circ\text{C}$. Корм и воду животные получали в свободном доступе. В ходе проведения исследования были сформированы следующие экспериментальные группы: интактные животные ($n=10$), крысы с воспроизведенной церебральной ишемией ($n=10$), ЧМТ ($n=10$), инфарктом миокарда ($n=10$) и мышечной дисфункцией ($n=10$).

Модель фокальной ишемии головного мозга

Фокальную ишемию головного мозга моделировали путем необратимой правосторонней термокоагуляции средней мозговой артерии под хлоралгидратным наркозом (350 мг/кг). Область ниже и правее глаза депилировали, делали надрез и раздвигали мягкие ткани, обнажая отросток скуловой кости, который удаляли. Далее буром проделывали трепанационное отверстие и термокоагулятором пережигали среднюю мозговую артерию под местом ее пересечения с обонятельным трактом. В дальнейшем, по возможности, восстанавливали топографию мягких тканей. Шов обрабатывали 5% спиртовым раствором йода [12]. Забор биоматериала осуществляли на 4-й день после воспроизведения фокальной ишемии.

Модель экспериментальной ЧМТ черепно-мозговой травмы

ЧМТ моделировали методом свободного падения груза массой 150 г с высоты 50 см. На теменную

область головного мозга крыс. Животных помещали в специальную установку, представляющую собой полый цилиндр с подложкой и фиксаторами, в которых закрепляли голову крыс, после чего производили сброс груза [13]. Забор биоматериала осуществляли на 4-й день с момента воспроизведения ЧМТ.

Модель мышечной дисфункции

Мышечную дисфункцию воспроизводили методом «принудительного плавания с 20% отягощением», при этом после определения исходного значения времени плавания, животных подвергали тренировочным тестам на протяжении 28 дней (продолжительность плавания составляла 20% от первоначального показателя). На 7, 14, 21 и 28 день крыс подвергали истощающему тесту – плаванию до полного отказа борьбы за жизнь, после чего животных извлекали из воды. Забор биоматериала производили на 28 день [14].

Модель острого инфаркта миокарда

У животных в условиях хлоралгидратного наркоза (350 мг/кг) и искусственной вентиляции легких на предварительно депилированном участке рассекали кожу в области грудины и отпрепаровывали мышцы. Далее выделяли IV ребро, производили вскрытие грудной клетки. Миокард отделяли от эпикарда и выводили сердце в рану. В дальнейшем осуществляли лигирование нисходящей ветви левой коронарной артерии шелковой нитью. Рану послойно ушивали. Забор биоматериала осуществляли через 24 часа после операции [15].

Забор биоматериала и пробоподготовка

В качестве биоматериала в работе использовали головной мозг, миокард и мышечную ткань (*m.quadriceps femoris*) крыс. Животных декапитировали под хлоралгидратным наркозом (350 мг/кг), производили забор органов, после чего биоматериал гомогенизировали в механическом гомогенизаторе Поттера в среде выделения (1 ммоль ЭДТА, 215 ммоль маннита, 75 ммоль сахарозы, 0,1% раствор БСА, 20 ммоль HEPES, с pH 7,2). Популяцию клеток получали дифференциальным центрифугированием, для чего полученный гомогенат биообразцов центрифугировали в режиме $1,400g \rightarrow 3$ мин. при 4°C , после чего супернатант переносили в пробирки на 2 мл. Далее полученный супернатант центрифугировали в режиме $13000g \rightarrow 10$ мин и надосадочную жидкость (культура содержит нативные митохондрии) удаляли для проведения анализа [16].

Респирометрический анализ

Анализ состояния дыхательной функции митохондрий производили методом респирометрии с использованием системы лабораторного респирометра АКПМ1-01Л (Альфа Бассенс, РФ). В работе применялся протокол анализа SEAHORSE, согласно которому респирометрическую функцию митохондрий

оценивают по изменению потребления кислорода в среде на фоне введения разобщителей митохондриального дыхания. В качестве последних в работе выступали: олигомицин 1 мкг/мл; 4 – (трифлуорометокси)фенилгидразоно)малонитрил (FCCP – 1 мМ); ротенон – 1 мМ; натрия азид – 20 ммоль. Субстратами окисления служили: глюкоза – 15 ммоль; пировиноградная кислота – 10 ммоль; малат – 1 ммоль; сукцинат – 10 ммоль; аскорбат – 2 ммоль; АДФ – 1 ммоль; N,N,N',N'-тетраметил-1,4-фенилендиамин (TMPD – 0,5 ммоль). Общую оценку митохондриальной функции определяли по уровню потребления кислорода в среде после последовательного добавления в среду олигомицина, FCCP и ротенона, при этом определяли АТФ-генерирующую способность (по разнице потребления кислорода после добавления FCCP и олигомицина); максимальный уровень дыхания (по разнице потребления кислорода после добавления FCCP и ротенона) и респираторную емкость (по разнице потребления кислорода после добавления FCCP и базальным уровнем потребления кислорода). Активность процессов гликолиза оценивали при использовании в качестве субстрата окисления глюкозы в ходе регистрации потребления кислорода в условиях последовательного добавления в среду глюкозы, олигомицина и азиды натрия. При этом определяли интенсивность гликолиза (по разнице потребления кислорода после добавления глюкозы и базальным уровнем потребления кислорода), гликолитическую емкость (по разнице потребления кислорода после добавления олигомицина и глюкозы) и гликолитический резерв (по разнице потребления кислорода после добавления глюкозы и азиды натрия). Дополнительно оценивали активность комплексов I, II, IV и V митохондриальной дыхательной цепи. Активность комплекса I определяли по разнице потребления кислорода после внесения в среду смеси малат/пируват и ротенона. Активность комплекса II оценивали по разнице потребления кислорода после внесения в среду сукцината и олигомицина. Активность комплекса IV определяли по разнице потребления кислорода после внесения в среду смеси ротенон/ TMPD/аскорбат и азиды натрия. Активность комплекса V оценивали по разнице потребления кислорода после внесения в среду ротенона и АДФ. В ходе анализа объем биобразца составлял 275 мкл, вводимых анализаторов – 25 мкл. Потребление кислорода определяли в ppm [17].

ИФА-исследование

В ходе данного исследования методом ИФА в супернатантах тканей миокарда, головного мозга и мышц определяли концентрацию АТФ, митохондриальной АТФ-синтетазы (мАТФ), цитохром-с-оксидазы (CoX) и НАДФ-оксидазы 4 (NOX4). В работе использовали видоспецифичные наборы реактивов производства *Cloud clone corp.* (США). Пробоподготовка и ход анализа соответствовали инструкции, прилагаемой к набору.

Методы статистического анализа

Статистическую обработку полученных результатов производили с применением пакета стат-анализа «STATISTICA 6.0». Данные представляли в виде $M \pm SEM$. Сравнение групп средних производили методом «ANOVA» с пост-тестом Ньюмена-Кейсла при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В ходе общей оценки респирометрической функции митохондрий в условиях различных патологий было установлено, что у крыс на фоне ЧМТ и церебральной ишемии (рис.1) в сравнении с интактными животными наблюдалось уменьшение АТФ-генерирующей способности митохондрий в 1,75 раза ($p < 0,05$) и 4,6 раза ($p < 0,05$) соответственно. Также у животных в условиях церебральной ишемии отмечено снижение максимального уровня дыхания и респираторной емкости относительно интактных крыс в 2,85 раза ($p < 0,05$) и 2,13 раза ($p < 0,05$) соответственно. На фоне экспериментальной ЧМТ у животных в сравнении с интактными крысами наблюдалось уменьшение максимального уровня дыхания в 1,77 раза ($p < 0,05$) и респираторной емкости в 3,92 раза ($p < 0,05$).

В условиях инфаркта миокарда (рис.2) у крыс отмечено снижение АТФ-генерирующей активности, максимального уровня дыхания и респираторной емкости относительно группы интактных животных в 2,27 раза ($p < 0,05$); 2,98 раза ($p < 0,05$) и 2,78 раза ($p < 0,05$) соответственно.

У крыс на фоне мышечной дисфункции (рис. 3) в сравнении с интактными животными наблюдалось уменьшение максимального уровня дыхания, АТФ-генерирующей активности и респираторной емкости в 3,28 раза ($p < 0,05$); 4,62 раза ($p < 0,05$) и 2,13 раза ($p < 0,05$) соответственно.

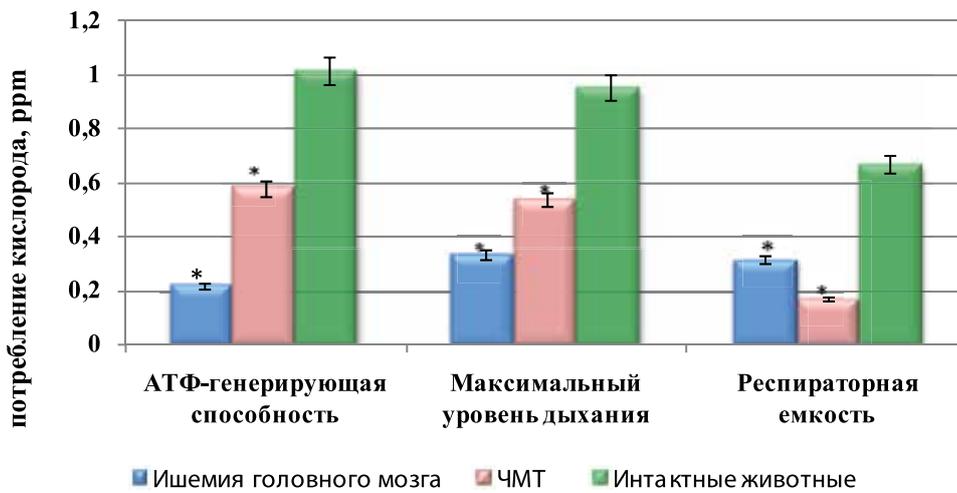


Рисунок 1. Общая оценка респирометрической функции митохондрий в условиях церебральной ишемии и черепно-мозговой травмы

Примечание: * – статистически значимо относительно группы интактных животных (критерий Ньюмена-Кейсла, $p < 0,05$)

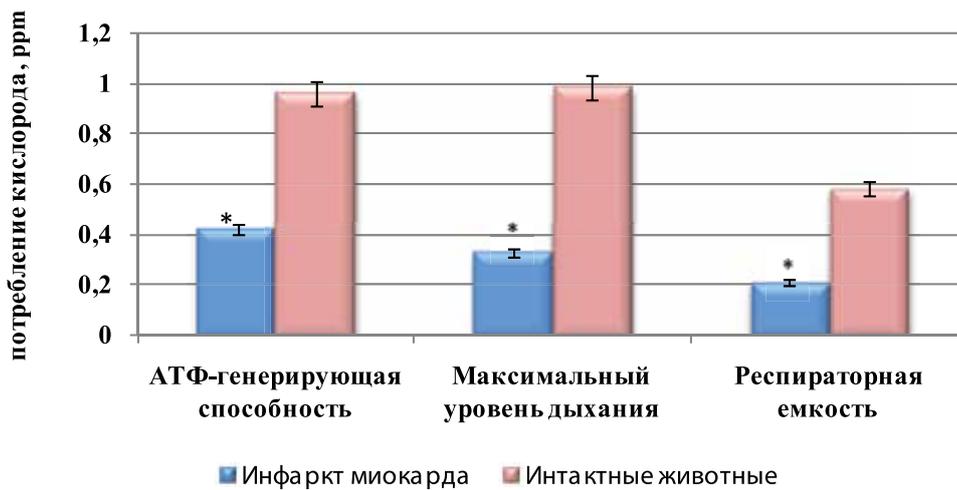


Рисунок 2. Общая оценка респирометрической функции митохондрий в условиях экспериментального инфаркта миокарда

Примечание: * – статистически значимо относительно группы интактных животных (критерий Ньюмена-Кейсла, $p < 0,05$)

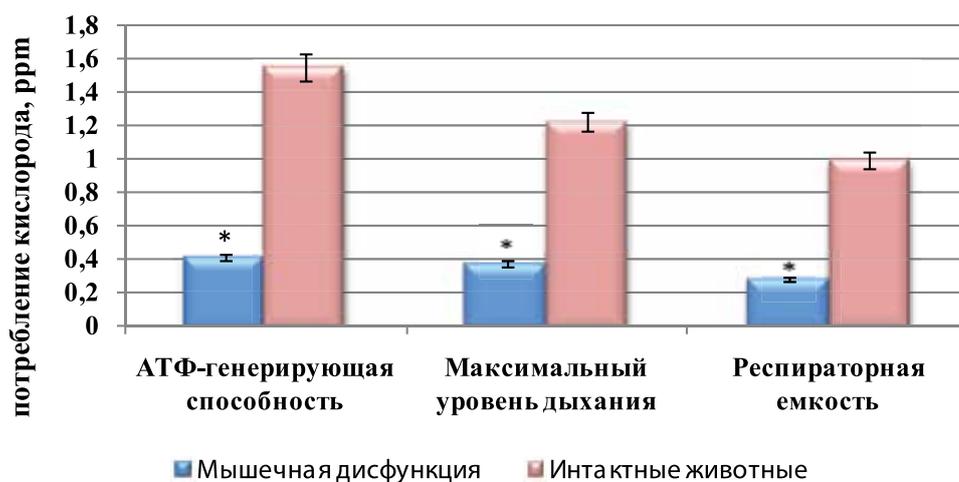


Рисунок 3. Общая оценка респирометрической функции митохондрий в условиях мышечной дисфункции

Примечание: * – статистически значимо относительно группы интактных животных (критерий Ньюмена-Кейсла, $p < 0,05$)

При оценке гликолитических процессов в условиях различных патологий установлено, что у животных на фоне ЧМТ и церебральной ишемии (рис.4) отмечено повышение интенсивности гликолиза в сравнении с группой интактных животных в 18,04 раза ($p < 0,05$) и 23,89 раза ($p < 0,05$) соответственно. В тоже время у крыс с экспериментально воспроизведенной ишемией головного мозга на-

блюдалось уменьшение гликолитической емкости относительно группы интактных животных в 4 раза ($p < 0,05$), а уровень гликолитического резерва принимал отрицательное значение (рис. 4). На фоне ЧМТ у крыс в сравнении с интактной группой животных гликолитическая емкость и гликолитический резерв снизились в 22,6 раза ($p < 0,05$) и 6 раз ($p < 0,05$) соответственно.

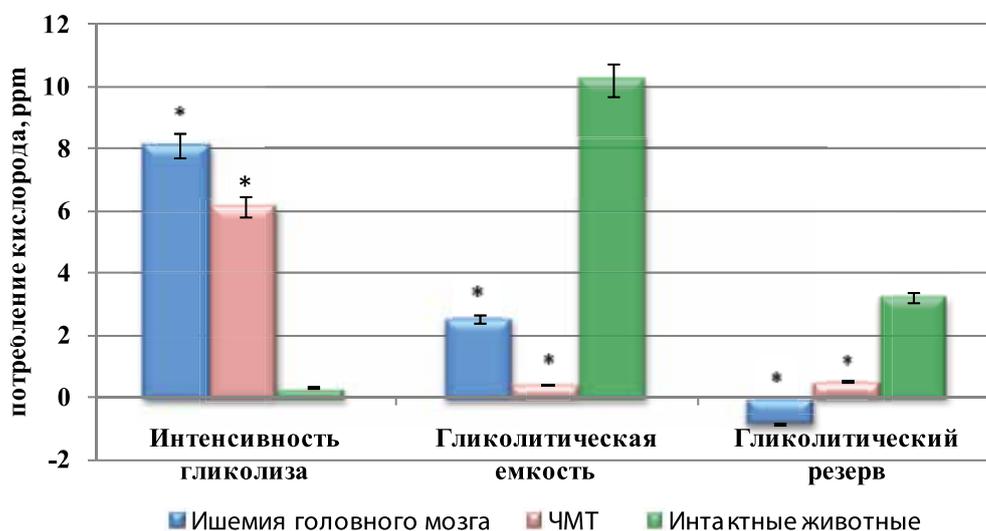


Рисунок 4. Оценка изменения процесса гликолиза в условиях экспериментальной церебральной ишемии и черепно-мозговой травмы

Примечание: * – статистически значимо относительно группы интактных животных (критерий Ньюмена-Кейсла, $p < 0,05$)

В условиях инфаркта миокарда (рис. 5) у экспериментальных животных интенсивность процессов гликолиза превосходила аналогичный показатель интактной группы животных в 17,3 ($p < 0,05$) раза, на

фоне снижения гликолитической емкости и гликолитического резерва в 9,25 раза ($p < 0,05$) и 37,28 раза ($p < 0,05$) соответственно.

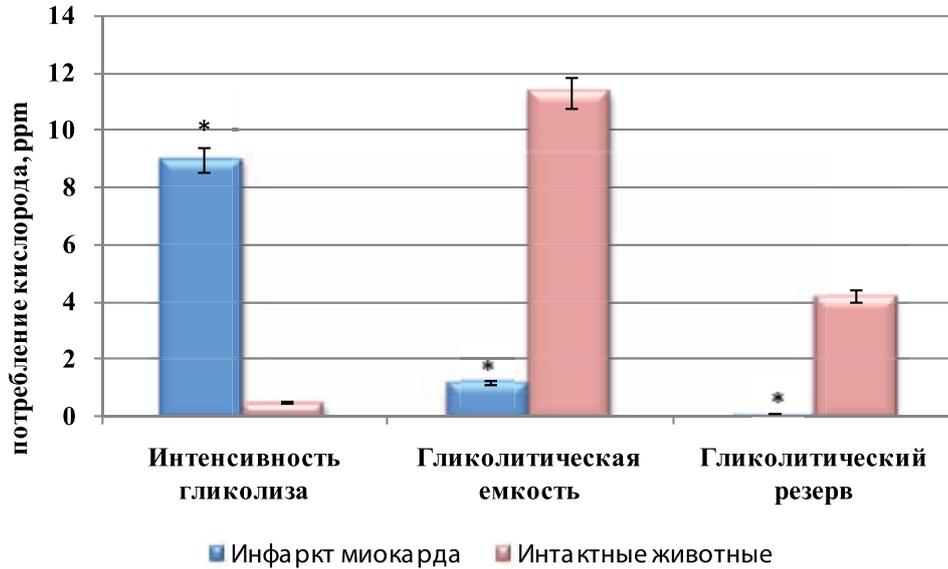


Рисунок 5. Оценка изменения процесса гликолиза в условиях экспериментального инфаркта миокарда

Примечание: * – статистически значимо относительно группы интактных животных (критерий Ньюмена-Кейсла, $p < 0,05$)

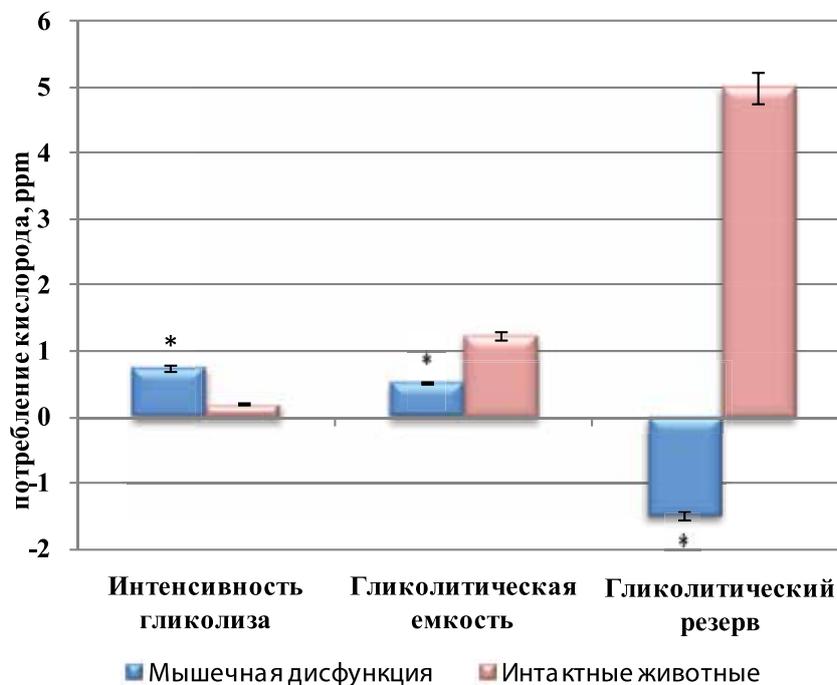


Рисунок 6. Оценка изменения процесса гликолиза в условиях мышечной дисфункции

Примечание: * – статистически значимо относительно группы интактных животных (критерий Ньюмена-Кейсла, $p < 0,05$)

У крыс на фоне мышечной дисфункции (рис. 6) в сравнении с интактными животными наблюдалось повышение интенсивности гликолиза, а также уменьшение гликолитической емкости в 3,55 раза ($p < 0,05$) и 2,35 раза ($p < 0,05$), при этом величина гликолитического резерва принимала отрицательное значение.

Оценивая изменение активности комплексов митохондриальной дыхательной цепи установлено, что у крыс в условиях ишемии головного мозга (рис. 7)

наблюдалось снижение активности митохондриальных комплексов I, II, IV и V в сравнении с интактной группой крыс в 4,8 ($p < 0,05$) раза; 4,6 раза ($p < 0,05$); 13,4 раза ($p < 0,05$) и 9,33 раза ($p < 0,05$) соответственно. На фоне экспериментально смоделированной ЧМТ (рис. 7) у животных относительно интактной группы крыс наблюдалось уменьшение активности комплекса I – в 2,17 раза ($p < 0,05$), комплекса II – в 4,8 раза ($p < 0,05$), комплекса IV – в 11,1 раза ($p < 0,05$) и комплекса V – в 8,1 раза ($p < 0,05$).

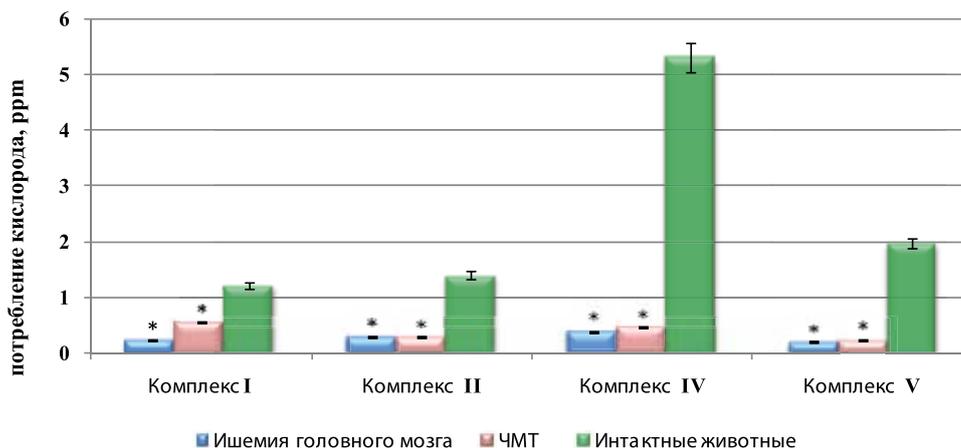


Рисунок 7. Оценка изменения активности комплексов митохондриальной дыхательной цепи в условиях экспериментальной ишемии головного мозга и черепно-мозговой травмы

Примечание: * – статистически значимо относительно группы интактных животных (критерий Ньюмена-Кейсла, $p < 0,05$)

В условиях инфаркта миокарда (рис. 8) у животных отмечено уменьшение активности митохондриальных комплексов I, II, IV и V в сравнении с ин-

тактными животными в 3,3 раза ($p < 0,05$); 3,4 раза ($p < 0,05$); 11,1 раза ($p < 0,05$) и 7,5 раза ($p < 0,05$) соответственно.

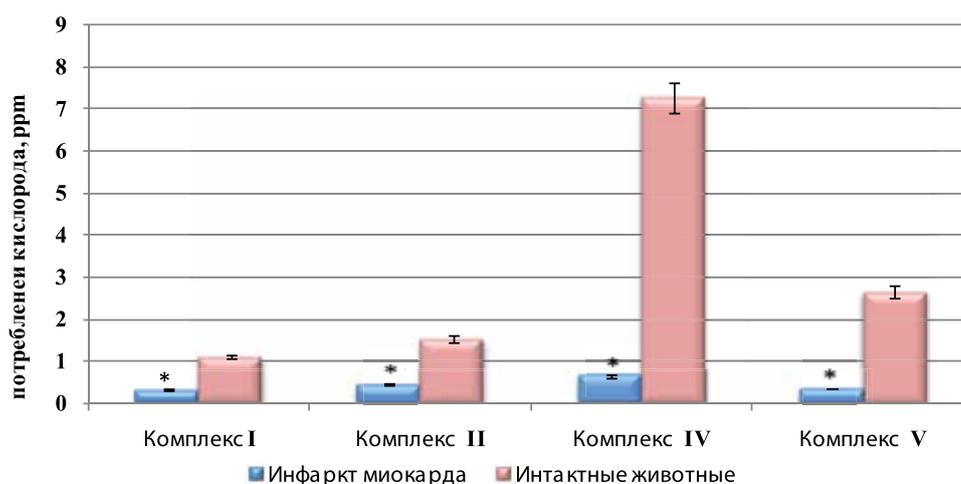


Рисунок 8. Оценка изменения активности комплексов митохондриальной дыхательной цепи в условиях экспериментального инфаркта миокарда

Примечание: * – статистически значимо относительно группы интактных животных (критерий Ньюмена-Кейсла, $p < 0,05$)

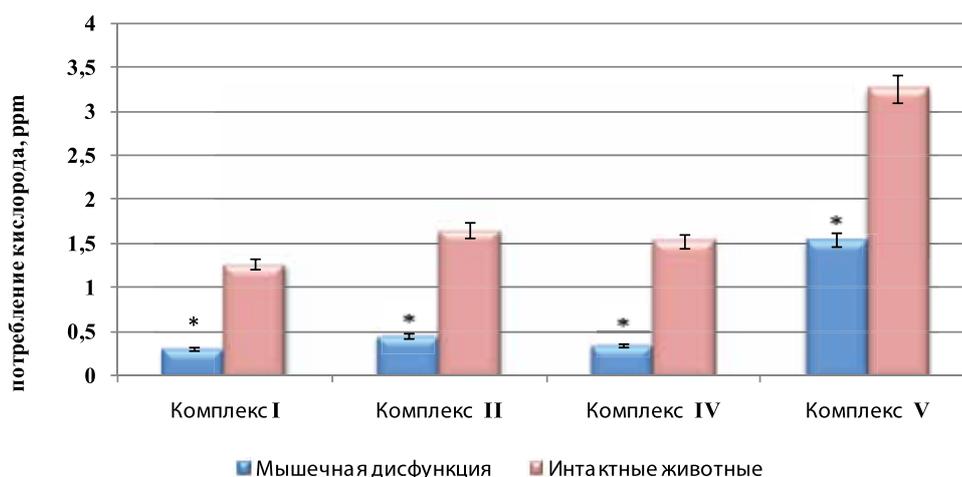


Рисунок 9. Оценка изменения активности комплексов митохондриальной дыхательной цепи в условиях экспериментальной мышечной дисфункции

Примечание: * – статистически значимо относительно группы интактных животных (критерий Ньюмена-Кейсла, $p < 0,05$)

У животных с воспроизведенной мышечной дисфункцией (рис. 9) активность дыхательных комплексов I, II, IV и V была ниже в сравнении с интактными крысами в 4 раза ($p < 0,05$); 3,6 раза ($p < 0,05$); 4,3 раза ($p < 0,05$) и 2,1 раза ($p < 0,05$) соответственно.

Оценивая изменение концентрации ферментативных комплексов, характеризующих митохондриальную функцию (табл. 1), было установлено, что содержание NOX4 увеличивается в группах животных

с модельными патологиями: ишемия головного мозга, ЧМТ, инфаркт миокарда и мышечная дисфункция в сравнении с группой интактных крыс в 15,8 раза ($p < 0,05$); 10,2 раза ($p < 0,05$); 9,2 раза ($p < 0,05$) и 6,1 раза ($p < 0,05$) соответственно. Также у животных с экспериментально воспроизведенной церебральной ишемией наблюдалось уменьшение концентрации CoX и МАТФ относительно группы интактных крыс в 2,9 раза ($p < 0,05$) и 3,4 раза ($p < 0,05$) соответственно.

Таблица 1. Изменение концентрации маркеров митохондриальной функции в условиях патологии различного генеза (ИФА-исследование)

Группа	NOX4, нг/мл	CoX, нг/мл	МАТФ, нг/мл	АТФ, нг/мл
Интактные животные (головной мозг)	1,2±0,014	46,97±0,695	98,62±2,631	1172,34±10,291
ЧМТ	12,23±0,237*	26,4±0,896*	36,3±1,917*	453,1±8,614*
Церебральная ишемия	18,1±0,331*	16,35±0,417*	29,1±1,118*	364,61±7,924*
Интактные животные (миокард)	1,6±0,028	43,94±0,792	101,2±2,939	1233,1±9,144
Инфаркт миокарда	14,75±0,542*	28,6±0,991*	43,2±1,249*	662,4±5,271*
Интактные животные (мышечная ткань)	2,65±0,634	48,91±0,541	109,24±1,712	1536,2±8,176
Мышечная дисфункция	16,2±0,524±0,743*	27,5±0,335*	18,6±2,364*	379,65±6,928*

Примечание: * – статистически значимо относительно группы интактных животных (критерий Ньюмена-Кейсла, $p < 0,05$)

В то же время у животных с ЧМТ содержание CoX и МАТФ в сравнении с интактными крысами снизилась в 1,8 раза ($p < 0,05$) и 2,7 раза ($p < 0,05$) соответственно. В условиях инфаркта миокарда (табл.1) у крыс наблюдалось снижение концентрации CoX и МАТФ относительно интактной группы животных в 1,5 раза ($p < 0,05$) и 2,3 раза ($p < 0,05$) соответственно,

кроме того, содержание данных ферментов на фоне экспериментальной мышечной дисфункции (табл. 1), также уменьшилась (в сравнении с интактной группой крыс: CoX – в 1,8 раза ($p < 0,05$); МАТФ – в 5,9 раза ($p < 0,05$)). Немало важно, что наблюдаемые негативные изменения митохондриальной функции в условиях церебральной ишемии, ЧМТ, инфаркта

миокарда и мышечной дисфункции сопровождались уменьшением концентрации АТФ относительно интактных крыс в 3,2 раза ($p < 0,05$); 2,6 раза ($p < 0,05$); 1,8 раза ($p < 0,05$) и 4 раза ($p < 0,05$) соответственно.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

На сегодняшний день установлено, что значительное число патологий сопряжено с развитием митохондриальной дисфункции [18]. Нарушение деятельности митохондрий является неотъемлемой частью этиопатогенеза различного рода заболеваний, однако, наибольшее значение митохондриальная дисфункция играет в развитии и прогрессировании патологий головного мозга, сердца и скелетной мускулатуры, т.е. наиболее энергозатратных органов, для функционирования которых необходим постоянный пул макроэргов [19, 20, 21]. Настоящее исследование было сосредоточено на оценке респирометрической функции митохондрий в условиях патологий ишемического генеза, при которых наблюдается существенный энергодифицит, прямо характеризующий деятельность митохондрий – фокальной ишемии, ЧМТ, инфаркте миокарда и мышечной дисфункции [22].

В ходе исследования было установлено, что в условиях модельных патологий отмечается существенное ухудшение АТФ-синтетической способности митохондрий, что отражает снижение максимального уровня дыхания, респираторной емкости и АТФ-генерирующей способности митохондрий в сравнении с интактными животными [23]. При этом немало важно, что уменьшение АТФ-синтезирующей функции митохондрий сопровождалось интенсификацией процессов гликолиза, которая носила не компенсированный и предельно допустимый характер, о чем можно судить по значительному снижению гликолитической емкости, гликолитического резерва и концентрации АТФ у животных с модельными патологиями относительно интактных крыс [24]. Кроме того, у животных на фоне патологического процесса головного мозга, миокарда и мышц наблюдалась

дисфункция митохондриальных комплексов I, II, IV и V, что, в конечном счете, негативно отражалось на процессе переноса электронов в митохондриальной дыхательной цепи [25]. Так, повышение активности (носящее компенсаторный характер) NOX4 свидетельствует о значительном снижении электронтранспортного потенциала комплексов I и II, с возрастающим прооксидантным потенциалом клетки [26]. Известно, что при невозможности прямого транспорта кислорода в митохондриальной дыхательной цепи, окислитель метаболизируется в альтернативном пути с активацией НАДФ-оксидазы и в частности NOX4, в результате чего отмечается существенное увеличение внутриклеточной концентрации супероксидного радикала, запускающего окислительный стресс [27]. В дальнейшем терминирование переноса электронов в комплексах IV и V (подтверждаемое снижением активности CoX и мАТФ) препятствует конвертации АДФ в АТФ, и как результат, уменьшается общий пул макроэргических соединений, требующий усиления процессов гликолиза, что также установлено в ходе данного исследования и согласуется с литературными данными [28].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании полученных данных можно предполагать существенное ухудшение респирометрической функции митохондрий в условиях ишемических патологий головного мозга, миокарда и скелетной мускулатуры, сопровождаемое разобщением переноса электронов в митохондриальной дыхательной цепи (дисфункцией комплексов I, II, IV и V), снижением АТФ-синтезирующей способности митохондрий и усилением процессов гликолиза, носящего предельный характер. При этом, вероятно, коррекция дыхательной функции митохондрий может являться новой стратегией терапии ишемических состояний, позволяющей направленным терапевтическим воздействием нивелировать энергодифицит и сопряженные с ним механизмы клеточного повреждения в условиях ишемии.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

- Lerner C.A., Sundar I.K., Rahman I. Mitochondrial redox system, dynamics, and dysfunction in lung inflammaging and COPD // *Int J Biochem Cell Biol.* – 2016. – Vol. 81 (Pt B). – P. 294–306. DOI: 10.1016/j.biocel.2016.07.026.
- Zielonka J., Joseph J., Sikora A., et al. Mitochondria-Targeted Triphenylphosphonium-Based Compounds: Syntheses, Mechanisms of Action, and Therapeutic and Diagnostic Applications // *Chem Rev.* – 2017. – Vol. 117, №15. – P. 10043–10120. DOI: 10.1021/acs.chemrev.7b00042.
- Menges S., Minakaki G., Schaefer P.M., et al. Alpha-synuclein prevents the formation of spherical mitochondria and apoptosis under oxidative stress // *Sci Rep.* – 2017. – Vol. 7. – P. 42942. DOI:10.1038/srep42942.
- Zorov D.B., Juhaszova M., Sollott S.J. Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release // *Physiol Rev.* – 2014. – Vol. 94, №3. – P. 909–950. DOI: 10.1152/physrev.00026.2013.
- Bergman O., Ben-Shachar D. Mitochondrial Oxidative Phosphorylation System (OXPHOS) Deficits in Schizophrenia: Possible Interactions with Cellular Processes // *Can J Psychiatry.* – 2016. – Vol. 61, №8. – P. 457–469. DOI: 10.1177/0706743716648290.
- Alston C.L., Rocha M.C., Lax N.Z., Turnbull D.M., Taylor R.W. The genetics and pathology of

- mitochondrial disease // *J Pathol.* – 2017. – Vol. 241, №2. – P. 236–250. DOI: 10.1002/path.4809
7. Chinnery P.F. Mitochondrial disease in adults: what's old and what's new? // *EMBO Mol Med.* – 2015. – Vol. 7, №12. – P. 1503–1512. DOI: 10.15252/emmm.201505079.
 8. O-Uchi J., Ryu S.Y., Jhun B.S., Hurst S., Sheu S.S. Mitochondrial ion channels/transporters as sensors and regulators of cellular redox signaling // *Antioxid Redox Signal.* – 2014. – Vol. 21, №6. – P. 987–1006. DOI: 10.1089/ars.2013.5681.
 9. Di Meo S., Reed T.T., Venditti P., Victor V.M. Role of ROS and RNS Sources in Physiological and Pathological Conditions // *Oxid Med Cell Longev.* – 2016. – Vol. 2016. – P. 1245049. DOI: 10.1155/2016/1245049.
 10. Ferrari D., Stepczynska A., Los M., Wesselborg S., Schulze-Osthoff K. Differential regulation and ATP requirement for caspase-8 and caspase-3 activation during CD95- and anticancer drug-induced apoptosis // *J Exp Med.* – 1998. – Vol. 188, №5. – P. 979–984.
 11. Khacho M., Tarabay M., Patten D. Acidosis overrides oxygen deprivation to maintain mitochondrial function and cell survival // *Nat Commun.* – 2014. – T. 5. DOI:10.1038/ncomms4550.
 12. Bederson J.B., Pitts L.H., Tsuji M., Nishimura M.C., Davis R.L., Bartkowski H. Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination // *Stroke.* – 1986. – Vol. 17, №3. – P. 472–476.
 13. Воронков А.В., Калашникова С.А., Хури Е.И., Поздняков Д.И. Моделирование черепно-мозговой травмы в условиях эксперимента у крыс // *Современные проблемы науки и образования.* – 2016. – № 1. URL: <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=25242>.
 14. Воронков А.В., Поздняков Д.И., Воронкова М.П. Комплексная валидационная оценка нового методического подхода к изучению физического и психоэмоционального перенапряжения в эксперименте // *Фундаментальные исследования.* – 2015. – №1–5. – С. 915–919.
 15. Сисакян А.С., Оганян В.А., Семерджян А.Б., Петросян М.В., Сисакян С.А., Гуревич М.А. Влияние фактора ангиогенеза на морфофункциональное состояние миокарда у крыс при экспериментальном инфаркте миокарда // *Российский кардиологический журнал.* – 2008. – Т. 13, № 2. – С. 63–66.
 16. Patel S.P., Sullivan P.G., Pandya J.D et al. N-acetylcysteine amide preserves mitochondrial bioenergetics and improves functional recovery following spinal trauma // *Exp Neurol.* – 2014. – Vol. 257. – P. 95–105. DOI: 10.1016/j.expneurol.2014.04.026.
 17. Redmann M., Benavides G.A., Wani W.Y. et al. Methods for assessing mitochondrial quality control mechanisms and cellular consequences in cell culture // *Redox Biol.* – 2018. – Vol. 17. – P. 59–69. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.redox.2018.04.005>.
 18. Picard M., Wallace D.C., Burelle Y. The rise of mitochondria in medicine // *Mitochondrion.* – 2016. – Vol. 30. – P. 105–116. DOI: 10.1016/j.mito.2016.07.003.
 19. Lesnefsky E.J., Chen Q., Hoppel C.L. Mitochondrial Metabolism in Aging Heart // *Circ Res.* – 2016. – Vol. 118, №10. – P. 1593–1611. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.116.307505.
 20. Cai Q., Tammineni P. Mitochondrial Aspects of Synaptic Dysfunction in Alzheimer's Disease // *J Alzheimers Dis.* – 2017. – Vol. 57, №4. – P. 1087–1103. DOI: 10.3233/JAD-160726.
 21. Boengler K., Kosiol M., Mayr M., Schulz R., Rohrbach S. Mitochondria and ageing: role in heart, skeletal muscle and adipose tissue // *J Cachexia Sarcopenia Muscle.* – 2017. – Vol. 8, №3. – P. 349–369. DOI: 10.1002/jcsm.12178.
 22. Choudhury A.R., Singh K.K. Mitochondrial determinants of cancer health disparities // *Semin Cancer Biol.* – 2017. – Vol. 47. – P. 125–146. DOI: 10.1016/j.semcancer.2017.05.001.
 23. Szeto H.H., Birk A.V. Serendipity and the discovery of novel compounds that restore mitochondrial plasticity // *Clin Pharmacol Ther.* – 2014. – Vol. 96, №6. – P. 672–683. DOI: 10.1038/clpt.2014.174.
 24. Dranka B.P., Benavides G.A., Diers A.R., Giordano S., Zelickson B.R., Reily C., Zou L., Chatham J.C., Hill B.G., Zhang J., Landar A., Darley-Usmar VM. Assessing bioenergetic function in response to oxidative stress by metabolic profiling // *Free Radic Biol Med.* – 2011. – Vol. 51. – P. 1621–1635. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2011.08.005.
 25. Salabei J.K., Gibb A.A., Hill B.G. Comprehensive measurement of respiratory activity in permeabilized cells using extracellular flux analysis // *Nat Protoc.* – 2014. – Vol. 9, №2. – P. 421–438. DOI: 10.1038/nprot.2014.018
 26. Kim Y.M., Kim S.J., Tatsunami R., Yamamura H., Fukai T., Ushio-Fukai M. ROS-induced ROS release orchestrated by Nox4, Nox2, and mitochondria in VEGF signaling and angiogenesis // *Am J Physiol Cell Physiol.* – 2017. – Vol. 312, №6. – P. C749–C764. DOI: 10.1152/ajpcell.00346.2016.
 27. Shanmugasundaram K., Nayak B.K., Friedrichs W.E., Kaushik D., Rodriguez R., Block K. NOX4 functions as a mitochondrial energetic sensor coupling cancer metabolic reprogramming to drug resistance // *Nat Commun.* – 2017. – Vol. 8, №1. – P. 997. DOI:10.1038/s41467-017-01106-1.
 28. Smith M.R., Vayalil P.K., Zhou F., et al. Mitochondrial thiol modification by a targeted electrophile inhibits metabolism in breast adenocarcinoma cells by inhibiting enzyme activity and protein levels // *Redox Biol.* – 2016. – Vol. 8. – P. 136–148. DOI: 10.1016/j.redox.2016.01.002.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Авторы

Воронков Андрей Владиславович – доктор медицинских наук, доцент, заведующий кафедрой фармакологии с курсом клинической фармакологии, Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава России. ORCID ID:0000-0001-6638-6223. E-mail: prohor77@mail.ru.

Поздняков Дмитрий Игоревич – кандидат фармацевтических наук, старший преподаватель, кафедра фармакологии с курсом клинической фармакологии, Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава России. ORCID ID:0000-0003-0889-7855. E-mail: rozdniascow.dmitry@yandex.ru

Нигарян Сирануш Артуровна – аспирант, кафедра фармакологии с курсом клинической фармакологии, Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава России. ORCID ID: 0000-0001-9898-0518. E-mail: 79682650210@yandex.ru.

Хури Елена Игоревна – аспирант, кафедра фармакологии с курсом клинической фармакологии, Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава России. E-mail: elena.belova@hotmail.ru

Мирошниченко Кирилл Александрович – студент 5 курса фармацевтического факультета, Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава России. E-mail: K220436@yandex.ru

Сосновская Анастасия Викторовна – студентка 4 курса фармацевтического факультета, Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава России. E-mail: 88misi88@yandex.ru

Олохова Елена Александровна – ассистент, кафедра фармакологии и фармацевтического консультирования с курсом ПО, ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет им. профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого» Минздрава России. E-mail: tabletk@yandex.ru