



УДК 615. 015: 616- 001.8

ВЛИЯНИЕ АМТИЗОЛА НА РЕЗИСТЕНТНОСТЬ ОРГАНИЗМА К ОСТРОЙ ГИПОКСИИ В ПОЗДНИЙ ПЕРИОД ПРЕКОНДИЦИОНИРОВАНИЯ

В.Е. НОВИКОВ
О.С. ЛЕВЧЕНКОВА

*¹ Смоленская государственная
медицинская академия*

e-mail: os.levchenkova@gmail.com

В экспериментах на мышах изучена резистентность организма к острой гипобарической гипоксии в поздний период фармакологического (амтизол 25 мг/кг) и физического (умеренная гипобарическая гипоксия) прекондиционирования. Установлено, что сочетанное чередующееся использование гипоксического фактора и амтизола повышает продолжительность жизни животных в условиях тяжелой гипобарической гипоксии в отсроченный период прекондиционирования (спустя 48 часов). Обсуждается возможный механизм действия амтизола.

Ключевые слова: гипоксия, прекондиционирование, фармакологическое прекондиционирование, амтизол.

Введение. В середине прошлого столетия отечественными фармакологами была сформулирована концепция адаптогенов – веществ, неспецифически повышающих устойчивость организма к действию повреждающих факторов. Позднее отдельные её положения конкретизировались и появились такие группы лекарственных веществ, как антигипоксанты, актопротекторы, радиопротекторы и пр. [10]. В 80-е годы в США был открыт феномен прекондиционирования, который представляет собой метаболическую адаптацию организма или отдельных его органов к гипоксии и/или ишемии, развивающуюся после повторяющихся кратковременных сублетальных по интенсивности эпизодов снижения доставки кислорода к тканям. Наиболее изучены формы физического прекондиционирования организма, такие как ишемическое прекондиционирование миокарда и головного мозга и гипоксическое прекондиционирование [1, 7, 12].

Доказано, что прекондиционирование имеет два периода: ранний (классический) и поздний или «второе защитное окно». Ранний период защищает организм от повреждения в интервале от нескольких минут до 2 ч. Поздний период развивается приблизительно через 24 ч после начала действия причинного фактора и длится около 48-72 часов [5]. Поиск оптимального способа прекондиционирования постоянно продолжается. В настоящее время в связи с расшифровкой механизмов развития феномена метаболической адаптации в научной литературе обсуждается возможность использования лекарственных средств из разных фармакологических групп для запуска явления прекондиционирования [2, 13, 14, 16, 17]. Возможно, в концепцию адаптогенов впишутся фармакологические средства, запускающие прекондиционирование. В механизме действия многих соединений, относящихся к группе антигипоксантов, имеются компоненты, схожие с эффекторным этапом развития феномена прекондиционирования. В силу того, что прекондиционирование имеет два периода (ранний и поздний), нам представляется наиболее правомочным говорить о прекондиционных свойствах соединений, если они обладают отсроченным по отношению к повреждающему фактору защитным эффектом.

Для данного исследования нами было выбрано лекарственное средство из группы антигипоксантов, производное аминотиола – амтизол. Амтизол (3,5-диамино-1,2,4-тиодиазол) имеет циклическую структуру, синтезирован на кафедре фармакологии Военно-медицинской академии им. С.И. Кирова. Данное соединение проявляет высокую эффективность при различных формах острой гипоксии. Амтизол рекомендован Фармакологическим комитетом Минздрава РФ в качестве эталонного средства при изучении новых веществ с антигипоксической активностью [10].

Цель работы. Изучить влияние амтизола на устойчивость организма мышей к острой гипоксии в поздний период прекондиционирования.

Материалы и методы исследования. Опыты проведены на лабораторных мышьях-самцах, массой 18-26 г, содержащихся в обычных условиях вивария. Животных подвергали физическому (гипоксическому) или фармакологическому (введение амтизола) прекондиционированию. Амтизол вводили опытным животным внутрибрюшинно в дозе 25 мг/кг. Раствор амтизола готовили из его субстанции *ex tempore*, используя стерильную воду для инъекций. Доза 25 мг/кг была выбрана с учетом того, что в этой дозе амтизол оказывает выраженное защитное действие



при различных формах острых гипоксических состояний [6, 9, 10]. В исследовании использовано несколько режимов введения амтизола (режимы прекондиционирования). Последнюю инъекцию данного соединения проводили за 48 часов до помещения животных в модельные условия. Резистентность мышей к острой гипоксии в поздний период прекондиционирования (спустя 48 часов после применения прекондиционного фактора) оценивали по продолжительности жизни животных в условиях острой гипобарической гипоксии (ОГБГ), которую вызывали путем “поднятия” животных на “высоту” 11 000 м со скоростью 50 м/сек и экспозицией на “высоте” до полного прекращения дыхания у животных (по последнему агональному вдоху) [8]. Используя эту же модель острой гипоксии на предварительном этапе, животных разделяли по устойчивости к гипоксии на низко – и высокоустойчивых, повторно низкоустойчивых животных брали в эксперимент спустя 30 дней.

Все экспериментальные животные были разделены на 8 групп, по 6 особей в каждой экспериментальной группе. Первая группа (I) – интактная контрольная. Вторая группа (II) – животные, подвергавшиеся трижды через день гипобарической гипоксии в режиме прекондиционирования (“подъём на высоту” 5000 метров и пребывание в этих условиях в течение часа с дополнительным “подъёмом” на 28 и 58 минутах на “высоту” 6500 метров) – ГБГ-5000 [4, 10]. Третья группа (III) – опытная группа, получавшая амтизол однократно. Четвертая группа (IV) – опытная группа, получавшая амтизол три дня подряд 1 раз в день. Пятая группа (V) – опытная группа, получавшая амтизол пять дней подряд 1 раз в день. Шестая группа (VI) – опытная группа, получавшая амтизол три дня подряд 1 раз в день, затем был сделан перерыв в три дня, после которого повторен трехдневный курс введения амтизола. Седьмая группа (VII) – опытная группа, получавшая амтизол трижды в прерывистом режиме (через день) 1 раз в день. Восьмая группа (VIII) – опытная группа, подвергшаяся сочетанному чередующемуся применению амтизола и гипобарической гипоксии в режиме прекондиционирования (1 день – амтизол, следующий день – ГБГ-5000, всего в течение 6 дней).

Значимость различий измеряемого параметра оценивали с помощью непараметрического критерия Вилкоксона-Манна-Уитни для независимых выборок. Данные считались достоверными при $p < 0.05$.

Результаты исследования и их обсуждение. Продолжительность жизни животных контрольной группы составила $5,7 \pm 1,34$ минут. Гипоксическое прекондиционирование (ГБГ-5000 – II группа) повышало среднюю продолжительность жизни мышей на критической “высоте” на 25% относительно контроля, но эти изменения не носили достоверного характера. Возможно, данный режим гипоксической тренировки недостаточно эффективен для развития феномена прекондиционирования (табл.).

Таблица

Влияние амтизола и умеренной гипоксии на резистентность организма мышей к острой гипобарической гипоксии в поздний период адаптации

Группы животных	Режим прекондиционирования	Продолжительность жизни, мин.	Продолжительность жизни, %
(I) – контрольная	интактные животные	$5,71 \pm 1,34$	100
(II) – ГБГ-5000	трехкратно через день	$7,13 \pm 3,32$	125
(III) – амтизол 25 мг/кг	однократно	$6,64 \pm 1,72$	116
(IV) – амтизол 25 мг/кг	три дня подряд	$7,28 \pm 1,31$	127
(V) – амтизол 25 мг/кг	пять дней подряд	$8,01 \pm 1,79$	140
(VI) – амтизол 25 мг/кг	2 курса по 3 дня с перерывом в 3 дня	$6,4 \pm 1,67$	112
(VII) – амтизол 25 мг/кг	трехкратно в прерывистом режиме (через день)	$7,1 \pm 1,50$	124
(VIII) – амтизол 25 мг/кг + ГБГ-5000	через день в течение 6 дней	$9,9 \pm 1,45^*$	173*

Примечание: * – достоверность различий по отношению к показателям контрольной группы животных ($p < 0,05$).

В группе III регистрируемый показатель не отличался от контрольных значений, т.е. однократное введение амтизола не изменяет устойчивость к гипоксии в отсроченный период. В то же



время известно, что однократная внутривенная инъекция амтизола в дозе 25 мг/кг животным за 30 минут до предъявления тяжелой гипоксии 11000 м значительно повышает продолжительность жизни животных (по данным разных авторов на 50-60% в сравнении с показателями контрольных групп) [10,11]. Курсовое введение амтизола животным в выбранных нами режимах (группы IV, V, VI и VII) достоверно не влияло на продолжительность жизни мышей в условиях ОГБГ в сравнении с контролем. Вместе с тем, трехдневное и пятидневное введение амтизола (группа IV и V) по влиянию на устойчивость животных к гипоксии в поздний период прекондиционирования не уступало по эффективности гипоксической тренировке (группа II).

Значимые изменения были выявлены в опытной группе VIII, где введение амтизола чередовали с ГБГ-5000, а средняя продолжительность жизни мышей на "смертельной" площадке была на 73% выше в сравнении с контрольной группой. Результаты этой серии экспериментов свидетельствуют о том, что амтизол и ГБГ-5000 вызывают синергичные изменения в механизмах адаптации к острой гипоксии в поздний период прекондиционирования указанными факторами.

В развитии феномена прекондиционирования в качестве факторов, запускающих его развития, могут выступать кратковременные повторяющиеся сублетальные по интенсивности эпизоды гипоксии или ишемии, а также фармакологические агенты [2,13,14]. Использованный в данной работе амтизол является препаратом с поливалентным механизмом действия. Экспериментальные и клинические исследования показали его высокую антигипоксическую активность при гипоксических состояниях различного генеза [3,6,10]. Отмечено, что раннее назначение амтизола позволяет добиться лучшего лечебного эффекта. Эффекторный этап действия амтизола (общий ответ организма на соединение), что также называют вторичной фармакологической реакцией, достаточно хорошо изучен. Так, амтизол уменьшает потребность организма в кислороде за счет ослабления дыхательного контроля в тканях, торможения нефосфорилирующих видов окисления, повышения степени сопряжения окисления с фосфорилированием в митохондриальной окислительной цепи. Амтизол препятствует накоплению лактата, повышает его утилизацию, активируя лактатдегидрогеназу. Это способствует переходу лактата в пируват, а затем образованию из пирувата оксалоацетата и сукцината и его последующему окислению в цикле Кребса. Кроме того, в энергообеспечении антигипоксического действия амтизола играет роль повышение активности сукцинатдегидрогеназы и аспартатаминотрансферазы. При гипоксии амтизол поддерживает уровень креатинфосфата, АТФ, АДФ и АМФ во внутренних органах на уровне нормоксических значений [10]. Это позволяет обеспечить экономию значительной доли кислорода с перераспределением его в пользу жизненно важных органов. Введение амтизола приводит к появлению в отростках нейронов многочисленных митохондрий около зоны синаптических контактов, что, вероятно, усиливает энергообеспечение и облегчает синаптическую передачу [9]. Показано, что амтизол обладает выраженным мембраностабилизирующим действием, оказывая тормозящее влияние на активацию процессов ПОЛ при остро развивающейся гипоксии.

Начальные точки приложения действия амтизола, обеспечивающие формирование первичной фармакологической реакции, т.е. молекулы-мишени для амтизола, как и для большинства других препаратов из класса антигипоксантов, не определены, и этот момент требует дальнейшего изучения. В настоящее время доказано, что амтизол и другие аминотиоловые производные являются активными мембранотропными соединениями, способными изменять проводимость калиевых, кальциевых и натриевых каналов нервных клеток. Влияние амтизола на величины тока ионов носит дозозависимый характер. В работе на изолированных нейронах продемонстрировано, что амтизол, блокируя протонный ток и влияя через него на инактивацию кальциевого тока, устраняет инактивацию калиевых каналов [11]. Возможно, что данные об увеличении ионных токов при действии на нейроны антигипоксантов аминотиолового ряда, использованных в малых концентрациях, могут быть интерпретированы как активирующее воздействие. Известно, что митохондриальные калиевые каналы участвуют в формировании адаптации организма к гипоксии, а антигипоксический эффект таких соединений, как уридин и уридинмонофосфат обусловлен именно активацией калиевых каналов, расположенных во внутренней мембране митохондрий [3]. Более того, именно калиевым каналам митохондрий уделяется большое внимание при изучении феномена прекондиционирования, ранний и поздний периоды которого опосредован через активацию АТФ-зависимых митохондриальных калиевых каналов.

Некоторыми исследователями высказывается мнение об универсальности механизмов, обеспечивающих повышение резистентности организма к гипоксии в условиях прекондиционирования. Одним из оснований такой гипотезы является инверсия полушарного доминирования в формировании устойчивости к острой гипоксии с гиперкапнией под действием амтизола и в случае применения интервальной гипоксической тренировки (ИГТ). В обоих случаях при исходном



доминировании левого полушария, после действия амтизола или ИГТ – доминирующей становится правая гемисфера [9].

Таким образом, результаты собственных исследований и данные литературы свидетельствуют о том, что амтизол может рассматриваться в качестве потенциального прекондиционного фактора, повышающего резистентность организма к острой гипоксии в ранний и поздний периоды адаптации. Однако для запуска феномена прекондиционирования с помощью амтизола с целью повышения резистентности организма в отсроченный период требуется разработка эффективных режимов применения препарата. В наших опытах амтизол достоверно увеличивал продолжительность жизни животных при острой гипоксии в поздний период прекондиционирования только в режиме, когда применялся совместно с гипоксическим фактором.

Выводы.

1. Сочетанное чередующееся применение амтизола (25 мг/кг) и гипоксии (ГБГ-5000) сопровождается повышением резистентности экспериментальных животных к острой гипобарической гипоксии в поздний период прекондиционирования.

2. Синергичное действие факторов фармакологического (амтизол 25 мг/кг) и физического (ГБГ-5000) прекондиционирования на резистентность животных к острой гипоксии может свидетельствовать об универсальности механизмов адаптации животных к гипоксии в поздний период прекондиционирования.

Литература

1. Зарубина, И. В. Молекулярные механизмы ишемического и фармакологического прекондиционирования / И.В. Зарубина, А. В. Горяинов, П. Д. Шабанов // *Обзоры по клин. фармакол. и лек. терапии.* – 2010. – Т. 8. – № 2. – С.3–12.
2. Зухурова, М.А. Гипоксическое и фармакологическое прекондиционирование как механизмы защиты при фокальной ишемии головного мозга крыс / М.А. Зухурова, А.В. Старков, А.В. Старовойт и др. // *Регионарное кровообращение и микроциркуляция.* – 2010. – №3(35). – С.84–89.
3. Левченкова, О.С. Антигипоксанты: возможные механизмы действия и клиническое применение / В.Е. Новиков, О.С. Левченкова // *Вестник Смоленской государственной медицинской академии.* – 2011. – №4. – С.43–57.
4. Лукьянова, Л.Д. Современные проблемы адаптации к гипоксии. Сигнальные механизмы и их роль в системной регуляции / Л.Д. Лукьянова // *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* – 2011. – №1. – С.3–19.
5. Лупанов, В.П. Протективная ишемия в кардиологии. Формы кондиционирования миокарда / А.В. Максименко, В.П. Лупанов // *Кардиоваскулярная терапия и профилактика.* – 2011. – 10(1). – С.111–119.
6. Марышева, В.В. Антигипоксанты аминотиолового ряда / В.В. Марышева // *Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии.* – 2007. – Т. 5. – № 1. – С.17–27.
7. Маслов, Л.Н. Триггерный механизм нейропротекторного эффекта ишемического прекондиционирования / Л.Н. Маслов // *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* – 2011. – № 2. – С.47–54.
8. Методические рекомендации по экспериментальному изучению препаратов, предлагаемых для клинического изучения в качестве антигипоксических средств / Под ред. проф. Л.Д. Лукьяновой. – М., 1990. – 19с.
9. Михеев, В.В. Влияние амтизола на межполушарную асимметрию головного мозга мышей линии shh при гиперкапнической гипоксии / В.В. Михеев, В.В. Марышева, П.Д. Шабанов // *Асимметрия.* – 2011. – Т. 5. – № 3. – С. 23–34.
10. Шабанов, П.Д. Метаболические корректоры гипоксии / П.Д. Шабанов, И.В. Зарубина, В.Е. Новиков, В.Н. Цыган; ред. А.Б. Белевитин. – СПб.: Информ-Навигатор, 2010. – 912 с.
11. Шабанов, П.Д. Метаболические и мембранные эффекты аминотиоловых антигипоксантов / П.Д. Шабанов, А.И. Вислобоков А.И., В.В. Марышева и др. // *Психофармакология и биологическая наркология.* – 2005. – Т. 5. – № 4. – С. -34.
12. Camara, AK Cardioprotection by pre- and post-conditioning: implications for the role of mitochondria / AK Camara, M Aldakkak, M Bienengraeber, DF Stowe // *Acta Anaesthesiologica Croatica.* – 2011. – Vol.8, №1. – P.7–18.
13. Goulton, Chelsea S. Pharmacological preconditioning with GYKI 52466: a prophylactic approach to neuroprotection / Chelsea S. Goulton, Anna R. Patten, John R. Kerr et al. // *Frontiers in Neuroscience Neuropharmacology.* – 2010. – Vol. 4. – P.1–11.
14. Najafi, M Pharmacological preconditioning with L-carnitine: relevance to myocardial hemodynamic function and glycogen and lactate content / M Najafi, A Javidnia, A Ghorbani-haghjo et al. // *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences.* – 2010. – Vol.23, №3. – P.250–255.
15. Parra, V.M. Late cardiac preconditioning by exercise in dogs is mediated by mitochondrial potassium channels / V.M. Parra, P. Macho, R.J. Domenech // *J. Cardiovasc. Pharmacol.* – 2010. – Vol. 56. – P. 268–274.
16. Schwartz, L. Pharmacological preconditioning with diazoxide slows energy metabolism during sustained ischemia / L. Schwartz, K.A. Reimer // *Exp. Clin. Cardiol.* – 2007. – Vol. 12. – P.139–147.



17. Wen, J.Y Protective effect of pharmacological preconditioning of total flavones of abelmoschl manihot on cerebral ischemic reperfusion injury in rats / J.Y Wen, Z.W. Chen // The American Journal of Chinese Medicine. – 2007. – Vol. 35, №4. – P.653–661.

INFLUENCE OF AMTHIZOLE ON THE ORGANISM RESISTANCE TO ACUTE HYPOXIA IN THE LATE PERIOD OF PRECONDITIONING

V.E.NOVIKOV
O.S. LEVCHENKOVA

*Smolensk State
Medical Academy*

e-mail: os.levchenkova@gmail.com

An organism resistance to acute hypobaric hypoxia was investigated in mice in the late period of pharmacological (amthizole 25 mg/kg) and physical (mild hypobaric hypoxia) preconditioning. It was found that the combined use of alternating hypoxic and amthizole factors led to significant increase in the duration of animal life in case of subsequent severe hypobaric hypoxia in the late period of preconditioning (in 48 hours). Possible mechanism of amthizole action is discussed.

Keywords: hypoxia, preconditioning, pharmacological preconditioning, amthizole.