

©Новиков, Левченкова

## СОДЕРЖАНИЕ ЭРИТРОПОЭТИНА И ФАКТОРА РОСТА ЭНДОТЕЛИЯ СОСУДОВ В УСЛОВИЯХ НОРМОКСИИ И ПРИ ИШЕМИИ ГОЛОВНОГО МОЗГА ПОД ДЕЙСТВИЕМ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОГО И ГИПОКСИЧЕСКОГО ПРЕКОНДИЦИОНИРОВАНИЯ

*В.Е. Новиков, О.С. Левченкова\**

Смоленский государственный медицинский университет,  
214019, Смоленск, ул. Крупской, 28; \*эл. почта: levchenkova-o@yandex.ru

Содержание эритропоэтина (ЕРО) и фактора роста эндотелия сосудов (VEGF-A) в сыворотке крови и головном мозге (ГМ) крыс линии Вистар изучали с помощью иммуноферментного анализа с использованием специфических крысиных антител. Данные ростовые факторы активно исследуются в качестве биомаркеров клеточного повреждения или, напротив, цитопротекции, а также мишеней для средств, способных инициировать прекодиционирование (ПреК). В качестве изучаемых нейропротективных подходов использовали фармакологическое (введение амтизола), гипоксическое (гипобарическая гипоксия) и комбинированное (амтизол+гипобарическая гипоксия) ПреК. Через 1 ч (ранний период) и 48 ч (поздний период) после окончания ПреК производили забор материала (серия опытов в условиях нормоксии). В другой серии опытов животным через 1 ч и 48 ч после окончания ПреК моделировали ишемию ГМ путём перевязки общих сонных артерий и через сутки после операции определяли содержание ЕРО и VEGF-A. При сравнении эффективности фармакологического и гипоксического ПреК в возможной индукции ЕРО и VEGF-A при нормоксии выявлено, что амтизол (3,5-диамино-1,2,4-тиадиазол) повышает уровень ЕРО в ГМ, не изменяя содержание ЕРО в сыворотке крови и VEGF-A в обоих субстратах. Трёхкратная (60 мин экспозиции с интервалом 48 ч) гипобарическая гипоксия (410 мм рт.ст.) повышает содержание ЕРО и VEGF-A в сыворотке крови и ГМ, но в большинстве опытных групп различия с интактным контролем оказываются статистически незначимыми. Комбинированное ПреК приводит к значимому повышению содержания ЕРО и VEGF-A при нормоксии как в раннем, так и позднем периоде ПреК. При ишемии ГМ в контрольной группе содержание ЕРО как в сыворотке крови, так и в тканях ГМ было выше значений интактного контроля. При оценке содержания VEGF-A в контрольной группе с ишемией обнаружена тенденция к повышению его в сыворотке крови и отсутствие значимых различий в тканях ГМ. При использовании до операции ишемии комбинированного ПреК содержание ЕРО было ниже в сыворотке крови в сравнении с контролем с ишемией в поздний период ПреК, не отличалось значимо от значений контроля с ишемией в сыворотке крови в ранний период и в тканях ГМ в оба периода ПреК. Содержание VEGF-A при использовании комбинированного ПреК было значимо ниже в сыворотке крови в сравнении с контролем с ишемией как в ранний, так и в поздний периоды ПреК, в тканях ГМ крыс не отличалось от значений интактного контроля и контроля с ишемией в ранний период ПреК и было выше контрольных значений в поздний период ПреК.

**Ключевые слова:** эритропоэтин (ЕРО); фактор роста эндотелия сосудов (VEGF-A); прекодиционирование; ишемия головного мозга; амтизол

**DOI:** 10.18097/PBMC20206604339

### ВВЕДЕНИЕ

Ключевым фактором в формировании адаптации клетки к гипоксии является HIF-1 $\alpha$ , который запускает экспрессию целого ряда генов, в частности эритропоэтина (ЕРО) и фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) [1]. Эти факторы роста, участвуя, как известно, в эритропоэзе и ангиогенезе соответственно, также играют важную роль в нормальном развитии и функционировании центральной нервной системы [2, 3]. ЕРО и VEGF являются важными сигнальными белками в формировании нейропротективного эффекта при гипоксическом прекодиционировании [2, 4].

Феномен прекодиционирования (ПреК) активно изучается на протяжении последних 30 лет [5-7]. Он заключается в повышении устойчивости организма и его органов, в частности головного мозга (ГМ), к повреждающему действию последующей тяжёлой ишемии через активацию эндогенных защитных механизмов путём повторяющегося кратковременного

воздействия сублетальным или умеренным по силе повреждающим фактором [5, 6, 8]. В развитии ПреК наблюдается два защитных периода: ранний (срочной адаптации) развивается через несколько минут от начала действия повреждающего фактора и длится до 2 ч и поздний (долгосрочной адаптации) развивается через 24 ч, длится до 72 ч [1, 5]. Помимо широко известных физических вариантов ПреК (ишемическое, гипоксическое) изучается эффективность комбинированного способа ПреК, когда физический вариант ПреК потенцируется с помощью лекарственных веществ, то есть дополняется фармакологическим ПреК, что позволяет уменьшить силу воздействия физическим прекодиционным фактором [5, 7, 9]. В качестве веществ для фармакологического ПреК (ФПреК) изучаются средства из разных фармакологических групп, в том числе средства с антигипоксическим действием, так как в механизме их действия имеются те же, что и при ПреК, мишени на сигнальном и эффекторном этапе. Кроме того,

использование таких веществ до ПреК может позволить смягчить для организма тяжёлое воздействие физическим прекондиционным фактором [5, 10].

Согласно данным литературы, ЕРО и VEGF-A способны оказывать нейропротективное действие [2, 11]. На этом основании мы выдвинули гипотезу о том, что ЕРО и VEGF-A являются необходимым звеном в реализации защитного действия ранее апробированного нами способа повышения устойчивости организма животных к гипоксии и ишемии с использованием фармакологического и гипоксического ПреК [12].

Целью данной работы было изучить уровень ЕРО и VEGF-A в условиях нормоксии и при экспериментальной ишемии ГМ крыс на фоне применения амтизола, умеренной гипобарической гипоксии и их комбинированного использования в режиме прекондиционирования.

### МЕТОДИКА

Работа выполнена на 72 белых крысах-самцах линии Вистар массой 200-270 г, полученных из филиала Научного центра биомедицинских технологий “Столбовая”. За месяц до основного эксперимента крыс типизировали по устойчивости к гипоксии на высоко- и низкоустойчивых по оценке времени пребывания при разряжении атмосферного давления, соответствующего высоте 12000 метров, до появления апноэ. В основной эксперимент брали низкоустойчивых животных, для которых HIF-1 $\alpha$  имеет ключевое значение в формировании адаптации к гипоксии [1].

Фармакологическое ПреК проводили с помощью средства с выраженным антигипоксическим действием — амтизола (3,5-диамино-1,2,4-тиадиазол), свежеприготовленный 2,5% (масса/объём) раствор которого вводили трижды через день внутривентриально в дозе 25 мг/кг (субстанция предоставлена кафедрой фармакологии Военно-медицинской академии им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург). Амтизол, повышая резистентность организма к гипоксии при его профилактическом введении, может вызывать адаптивные изменения, схожие по механизму развития со срочной адаптацией к гипоксии [13]. В механизме действия амтизола известна способность активировать гликолиз без накопления лактата в клетке; повышать содержание 2,3-дифосфоглицерата, тем самым увеличивая диссоциацию оксигемоглобина и обеспечивая лучшую отдачу кислорода тканям. Кроме того, за счёт ингибирования липолиза амтизол предупреждает повреждающее действие свободных жирных кислот на клеточные, лизосомальные, митохондриальные мембраны, уменьшает разобщение процессов окисления и фосфорилирования [13]. Эти эффекты могут быть обусловлены повышением экспрессии генов, ответственных за адаптацию организма к гипоксии, и прекондиционными свойствами соединения.

Гипоксическое ПреК моделировали трижды через день, помещая животных в условия умеренной гипобарической гипоксии (ГБГ) под стеклянный

колпак, из-под которого с помощью насоса Комовского откачивали воздух до его разрежения 410 мм. рт. ст., что соответствовало высоте 5000 метров (ГБГ-5000), экспозиция после достижения “высоты 5000 метров” составляла 60 мин. Комбинированное ПреК моделировали авторским способом путём поочерёдного применения амтизола и ГБГ-5000 в течение 6 дней. В первый, третий и пятый день эксперимента животным вводили амтизол. Во второй, четвёртый, шестой день моделировали ГБГ-5000 [12].

Животных наркотизировали с помощью внутривентриального введения 8% (масса/объём) раствора хлоралгидрата, вводимого из расчёта 400 мг/кг. Операцию ишемии ГМ у крыс проводили путём одномоментной двусторонней перевязки общих сонных артерий (ОСА). Операцию производили спустя 1 ч после прекращения комбинированного ПреК (ранний период), а также через 48 ч (поздний период).

Забор образцов тканей осуществляли после одномоментной декапитации животных. В группах без ишемии его проводили через 1 ч и 48 ч после последнего эпизода ПреК, в группах с ишемией — через сутки после операции.

Для определения содержания ЕРО и VEGF-A в тканях ГМ оба полушария ГМ крыс с добавлением фосфатно-солевого буфера гомогенизировали с помощью полуавтоматического гомогенизатора Schuett homgen Plus (“Schuett Biotec”, Германия) на льду в течение 1 мин при скорости вращения 1000 об/мин. Полученный гомогенат переносили в центрифужную пробирку и центрифугировали при 1000 g в течение 20 мин при температуре от 0 до +2°C. Надосадочную жидкость (супернатант) использовали для определения уровня исследуемых белков.

Содержание ЕРО и VEGF-A в сыворотке крови и супернатанте ГМ проводили методом иммуноферментного анализа в соответствии с протоколом, предоставленным производителем, с использованием планшетов для количественного измерения данных белков в сыворотке крови и тканях крыс (SEA028Ra, SEA143Ra, Tests ELISA Kit for Erythropoietin, Vascular Endothelial Growth Factor A, “Cloud-Clone Corp.”, США). Значения получены в пг/мл. В супернатанте ГМ содержание ЕРО и VEGF-A пересчитывали на мг белка [3], содержание которого в пробах определяли по методу Лоури.

Полученные результаты обрабатывали статистически с помощью программного обеспечения StatPlus Pro 6.9.1.0, используя для попарного сравнения выборку непараметрический U-критерий Манна-Уитни ( $p \leq 0,05$ ). Данные представлены в виде медианы и интерквартильного интервала между 25 и 75 процентилями.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В сыворотке крови и ГМ интактных крыс определялось базовое содержание ЕРО, причём содержание в ГМ было значительно выше (табл. 1). Это свидетельствует о том, что экспрессия ЕРО и его рецепторов не ограничена костным мозгом, а наблюдается во многих тканях, в частности, в ГМ.

Таблица 1. Содержание эритропоэтина под действием фармакологического и гипоксического preconditionирования до и после ишемии ГМ у крыс

Группы	n	Сыворотка крови	Супернатант ГМ
		ЕРО пг/мл	ЕРО пг/мг белка
1. Интактный контроль	8	31,25 (24,4; 37,0)	656,7 (624,2; 741,9)
2. Через 1 ч после фармакологического ПреК	6	29,8 (25,3; 45,1)	904,3* (753; 959,7)
3. Через 48 ч после фармакологического ПреК	6	31,4 (30,4; 41,7)	867,1 <sup>^(1)</sup> (750,6; 880,6)
4. Через 1 ч после гипоксического ПреК	6	41,5 (27,2; 51,7)	888,1 <sup>^(1)</sup> (803,6; 1007,7)
5. Через 48 ч после гипоксического ПреК	6	45,0 <sup>^(1)</sup> (30,4; 48,3)	921,2 <sup>^(1)</sup> (765,1; 1043,6)
6. Через 1 ч после комбинированного ПреК	8	47,7* (45,4; 62,1)	1066,9* <sup>^(2)</sup> (983,4; 1225,3)
7. Через 48 ч после комбинированного ПреК	8	62* <sup>^(3) + (5)</sup> (53,0; 76,0)	1179,7* <sup>^(3) + (5)</sup> (1147,9; 1355,5)
8. Ишемия контроль	8	56,7* (39,1; 78,3)	919,1* (889,7; 1115,6)
9. Ишемия через 1 ч после комбинированного ПреК	8	39,3 <sup>^(6)</sup> (27,9; 59,0)	912,1* (849,6; 1107,1)
10. Ишемия через 48 ч после комбинированного ПреК	8	33,7 <sup>#</sup> <sup>^(7)</sup> (29,1; 40,6)	1166,3* <sup>^(9)</sup> (487; 557,8)

Примечание. Различия достоверны ( $p \leq 0,05$ , U-критерий Манна-Уитни) по сравнению: \* — с интактным контролем, # — с группой “ишемия контроль”, +/- — значимо больше или меньше по сравнению с указанным в скобках номером опытной группы, ^ —  $p \leq 0,1$  — различия на уровне статистической тенденции по сравнению с указанным в скобках номером группы.

Использование фармакологического ПреК не вызывало статистически значимых изменений уровня ЕРО в сыворотке крови крыс в сравнении с интактной контрольной группой как в ранний (через 1 ч после ПреК), так и в поздний (через 48 ч после ПреК) период ПреК. В то же время в ГМ в ранний период ПреК определялось повышение ЕРО в сравнении с интактным контролем ( $p=0,038$ ), в поздний — тенденция к повышению ( $p=0,093$ ).

Тенденция к повышению уровня ЕРО в сыворотке крови крыс в сравнении с интактной контрольной группой отмечена в группе с гипоксическим ПреК в поздний период ПреК, в ранний период различия не были значимы, в ГМ — как в ранний ( $p=0,052$ ), так и поздний ( $p=0,093$ ) периоды ПреК.

Применение комбинированного ПреК повышало уровень ЕРО в сыворотке крови и ГМ крыс в сравнении с интактной контрольной группой как в ранний период ПреК ( $p=0,020$  и  $p=0,0007$  соответственно), так и в поздний ( $p=0,033$  и  $p=0,0007$  соответственно). Кроме того, в ранний период ПреК уровень ЕРО в ГМ был выше в сравнении с соответствующей группой фармакологического ПреК ( $p=0,009$ ), в поздний период ПреК уровень ЕРО был выше в сравнении с соответствующими группами фармакологического ( $p=0,014$  как для сыворотки крови, так и супернатанта ГМ) и гипоксического ПреК ( $p=0,038$  — сыворотка крови и  $p=0,002$  — супернатант ГМ).

В группе контроля с ишемией содержание ЕРО через сутки после операции повышалось в сравнении с интактным контролем ( $p=0,023$  — сыворотка крови и  $p=0,001$  — супернатант ГМ).

Среди способов ПреК для их оценки при ишемии использовали эффективный при нормоксии комбинированный способ, при котором отмечена индукция ростовых факторов. Значения ЕРО в большинстве опытных групп животных с ишемией, которым до операции проводили комбинированное ПреК, как в сыворотке крови, так и в супернатанте ГМ, значимо не отличались от значений контроля с ишемией.

В ранний период ПреК уровень ЕРО в сыворотке крови не отличался от значений группы интактного контроля, контроля с ишемией, но был значимо ниже соответствующей группы ПреК без ишемии ( $p=0,027$ ). В ГМ уровень ЕРО был выше интактного контроля ( $p=0,004$ ), не отличался от контроля с ишемией и соответствующей группы ПреК без ишемии.

В поздний период ПреК уровень ЕРО в сыворотке крови был значимо ниже в сравнении с группой с ишемией ( $p=0,046$ ) и соответствующей группы комбинированного ПреК без ишемии ( $p=0,005$ ). В то же время в супернатанте ГМ уровень ЕРО был выше значений группы интактного контроля ( $p=0,0007$ ), не отличался значимо от значений контроля с ишемией ( $p=0,247$ ), наблюдалась статистическая тенденция к повышению ЕРО в сравнении с группой комбинированного ПреК в ранний период ( $p=0,074$ ).

## СОДЕРЖАНИЕ ЕРО И VEGF-A ПРИ НОРМОКСИИ И ИШЕМИИ ГОЛОВНОГО МОЗГА ПРИ ПреК

Базовый уровень VEGF-A в группе интактного контроля был выше в супернатанте головного мозга по сравнению с уровнем в сыворотке крови (табл. 2).

Использование фармакологического ПреК не изменяло уровень VEGF-A в сыворотке крови и ГМ крыс в сравнении с интактной контрольной группой в оба периода ПреК. При применении гипоксического ПреК уровень VEGF-A в сыворотке крови и ГМ крыс в сравнении с интактной контрольной группой статистически не отличался в ранний период ПреК ( $p=0,366$  — сыворотка крови и  $p=0,196$  — супернатант ГМ), в поздний период был выше на уровне статистической тенденции ( $p=0,096$  — сыворотка крови и  $p=0,105$  — супернатант ГМ). В условиях нормоксии комбинированное ПреК приводило к увеличению уровня VEGF-A через 1 ч ( $p=0,031$  — сыворотка крови и  $p=0,027$  — супернатант ГМ) и через 48 ч ( $p=0,02$  — сыворотка крови и  $p=0,035$  — супернатант ГМ) после последнего предъявления прекодиционного фактора в сравнении с интактным контролем.

При определении уровня VEGF-A через 1 сутки после моделирования ишемии ГМ в сыворотке крови наблюдалась тенденция к повышению его содержания ( $p=0,066$ ), в супернатанте ГМ не было обнаружено достоверных отличий относительно группы интактного контроля ( $p=0,462$ ). Содержание VEGF-A в сыворотке крови при применении комбинированного ПреК с последующим моделированием ишемии было ниже контроля с ишемией в оба периода ПреК ( $p=0,023$  для раннего и  $p=0,035$  для позднего периода),

в то же время в супернатанте ГМ в ранний период не наблюдалось значимых различий в сравнении с интактным контролем ( $p=0,172$ ) и контролем с ишемией ( $p=0,344$ ), а в поздний период ПреК уровень VEGF-A был выше в сравнении с интактным контролем ( $p=0,045$ ) и с ишемией ( $p=0,020$ ). Уровень VEGF-A в сыворотке крови в группах комбинированного ПреК с ишемией был ниже соответствующих групп комбинированного ПреК без ишемии ( $p=0,0019$  — сыворотка крови в ранний период и  $p=0,01$  — сыворотка крови в поздний период ПреК), в ГМ животных таких различий не было.

Значимость VEGF как биомаркера цитопротективного эффекта под действием ПреК в литературе интерпретируется неоднозначно. С одной стороны, VEGF относят к маркерам долгосрочной адаптации организма к гипоксии [1]. С другой стороны, нейропротективный эффект ишемического ПреК, оцененный через 1 сутки после ишемии ГМ, которую моделировали через 48 ч после ПреК (поздний период), ассоциирован с достоверным снижением уровня VEGF в ГМ [14]. Нами также не было выявлено значимых изменений VEGF-A в ГМ крыс при ишемии в сравнении с интактным контролем. В других работах описано, что в острый период инфаркта миокарда или мозгового инсульта наблюдается угнетение экспрессии VEGF, а в восстановительном периоде происходит некоторое его повышение, связанное с восстановлением коллатерального кровотока [15].

Таблица 2. Содержание фактора роста эндотелия сосудов под действием фармакологического и гипоксического прекодиционирования до и после ишемии ГМ у крыс

Группы	n	Сыворотка крови	Супернатант ГМ
		VEGF-A пг/мл	VEGF-A пг/мг белка
1. Интактный контроль	8	3,75 (2,45; 4,45)	127,7 (116,4; 169,8)
2. Через 1 ч после фармакологического ПреК	6	3,15 (3,1; 3,95)	136,2 (115,1; 146,7)
3. Через 48 ч после фармакологического ПреК	6	3,20 (2,65; 4,42)	160,5 (136,6; 175,2)
4. Через 1 ч после гипоксического ПреК	6	4,2 (3,42; 4,6)	165,6 (145,3; 179,6)
5. Через 48 ч после гипоксического ПреК	6	4,45 <sup>^(1)</sup> (3,82; 5,07)	169,5 <sup>^(1)</sup> (151,1; 182,5)
6. Через 1 ч после комбинированного ПреК	8	4,9 <sup>#+(2)</sup> (4,45; 6,6)	187,7 <sup>#+(2)^(4)</sup> (102,92; 109,05)
7. Через 48 ч после комбинированного ПреК	8	5,2 <sup>#+(3)</sup> (4,45; 7,02)	190,7 <sup>*</sup> (160,7; 209,8)
8. Ишемия контроль	8	5,1 <sup>^(1)</sup> (3,65; 5,90)	147,1 (135,3; 160,2)
9. Ишемия через 1 ч после комбинированного ПреК	8	3,0 <sup>#-(6)</sup> (2,65; 3,57)	174,5 (140,5; 199,2)
10. Ишемия через 48 ч после комбинированного ПреК	8	3,45 <sup>#-(7)</sup> (2,65; 4,27)	189,7 <sup>#*</sup> (82,2; 98,5)

Примечание. Различия достоверны ( $p \leq 0,05$ , U-критерий Манна-Уитни) по сравнению: \* — с интактным контролем, # — с группой “ишемия контроль”, +/- — значимо больше или меньше по сравнению с указанным в скобках номером опытной группы, ^ —  $p \leq 0,1$  — различия на уровне статистической тенденции по сравнению с указанным в скобках номером группы.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ

Факторы роста ЕРО и VEGF являются важными регуляторными белками, обеспечивающими адекватное функционирование тканей при различных физиологических и патологических состояниях. Значительна роль ростовых факторов в индукции реакций адаптации клеток и тканей в условиях гипоксии и ишемии, что делает возможным их потенциальное использование в качестве цитопротекторов. С другой стороны, уровень ЕРО и VEGF может служить маркером инициации реакций адаптации. Однако, учитывая неоднозначные данные литературы по интерпретации изменений уровня ЕРО и VEGF при ишемических состояниях, необходимы дальнейшие исследования этих ростовых факторов с помощью различных методов с целью разработки на их основе объективных и информативных прогностических показателей.

В проведенном нами исследовании показано, что в механизме нейропротективного эффекта комбинированного ПреК (амтизол + гипобарическая гипоксия) определенную сигнальную роль в индукции процессов адаптации выполняют HIF-1 $\alpha$ -ассоциированные факторы роста — ЕРО и VEGF. При раздельном фармакологическом или гипоксическом ПреК содержание данных факторов статистически значимо не меняется или наблюдается тенденция к их повышению, особенно в тканях ГМ. Под влиянием комбинированного ПреК их содержание в сыворотке крови и ГМ крыс значимо повышается в условиях нормоксии, что может рассматриваться как реализация эндогенных адаптивных механизмов.

При ишемии ГМ, вызванной перевязкой ОСА, содержание ЕРО повышается как в сыворотке крови, так и в ГМ. В то же время значимой индукции VEGF-A через сутки после ишемии не было обнаружено, что не позволяет использовать VEGF-A в качестве маркера ишемического повреждения в остром периоде постишемического периода, определяемого ИФА.

При использовании комбинированного ПреК до ишемии и оценке содержания ЕРО и VEGF через сутки после неё, в сыворотке крови индукция этих ростовых факторов не наблюдается, в большинстве групп их уровень статистически значимо не отличается от уровня интактного контроля. В то же время полученные данные в ГМ крыс, подвергнутых процедуре комбинированного прекодиционирования и последующей двухсторонней перевязке общих сонных артерий, не позволяют говорить о снижении уровня ЕРО и VEGF-A в ишемизированном мозге крыс, так как нет статистически значимых различий с их уровнями в контроле с ишемией, уровень VEGF-A в позднем периоде ПреК, напротив, повышается.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарят заведующего кафедрой фармакологии Военно-медицинской академии им. С.М. Кирова профессора П.Д. Шабанова за любезно предоставленную субстанцию амтизола.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ

Финансирование работы осуществлялось за счёт средств Смоленского государственного медицинского университета.

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все исследования проводили согласно “Правилам лабораторной практики” (приказ Минздрава России №199н от 01.04.2016), Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей ETS 123 (от 18.03.1986) с приложением А от 15.06.2006.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Лукьянова Л.Д. (2019) Сигнальные механизмы гипоксии, М: РАН, 215 с. [Lukyanova L.D. (2019) Signal mechanisms of hypoxia, M: RAS, 215 p.]
2. Larphaveesarp A., Ferriero D.M., Gonzalez F.F. (2015) Brain Sciences, **5**(2), 165-177.
3. Tanaka T., Kai S., Koyama T., Daijo H.A., Adachi T., Fukuda K., Hirota K. (2011) PloS One, **6**(12), e29378. DOI: 10.1371/journal.pone.0029378
4. Шляхто Е.В., Баранцевич Е.Р., Щербак Н.С., Галагудза М.М. (2012) Вестник РАМН, **67**(6), 42-50. [Shlyakhto E.V., Barantsevitch E.R., Shcherbak N.S., Galagudza M.M. (2012) Vestnik RAMS, **67**(6), 42-50.]
5. Зарубина И.В., Шабанов П.Д. (2016) Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии, **14**(1), 4-28. [Zarubina I.V., Shabanov P.D. (2016) Reviews on Clinical Pharmacology and Drug Therapy, **14**(1), 4-28.]
6. Deryagin O.G., Gavrilova S.A., Gainutdinov K.L., Golubeva A.V., Andrianov V.V., Yafarova G.G., Buravkov S.V., Koshelev V.B. (2017) Front. Neurosci., **11**, 427. DOI: 10.3389/fnins.2017.00427
7. Esposito E., Desai R., Ji X., Lo E.H. (2015) Brain Circulation, **1**(1), 104-113.
8. Рыбникова Е.А., Самойлов М.О. (2016) Успехи физиологических наук, **47**(4), 3-17. [Rybnikova E.A., Samoilov M.O. (2016) Uspekhi fiziologicheskikh nauk, **47**(4), 3-17.]
9. Yang Y., Lu F., Huang L., Yang S., Kong Y., Tan W., Gong Z., Zhan S. (2017) Am. J. Translational Res., **9**(12), 5308-5319.
10. Новиков В.Е., Левченкова О.С., Климкина Е.И., Кулагин К.Н. (2019) Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии, **17**(1), 37-45. [Novikov V.E., Levchenkova O.S., Klimkina E.I., Kulagin K.N. (2019) Reviews on Clinical Pharmacology and Drug Therapy, **17**(1), 37-45.]
11. Asadi B., Askari G.R., Khorvash F., Bagherpur A., Mehrabi F., Karimi M., Ghasemi M., Najjaran A. (2013) Int. J. Prevent. Med., **4**(2), 306-312.
12. Новиков В.Е., Левченкова О.С. (2013) Патент RU2517032C1, РФ. [Novikov V.E., Levchenkova O.S. (2013) Patent RU2517032C1.]

13. Александрова А.Е. (2005) Экспериментальная и клиническая фармакология, **68**(5), 72-78.  
[Aleksandrova A.E. (2005) Experimental and Clinical Pharmacology, **68**(5), 72-78.]
14. Ma X.M., Liu M., Liu Y.Y., Ma L.L., Jiang Y., Chen X.H. (2016) Neural Regeneration Research, **11**(5), 765-770.
15. Колесник Ю.М., Беленичев И.Ф., Мазур И.А., Абрамов А.В., Кучеренко Л.И., Бухтиярова Н.В. (2011) Патология, **8**(2), 89-95. [Kolesnik Yu.M., Belenichev I.F., Mazur I.A., Abramov A.V., Kucherenko L.I., Buhtiarova N.V. (2011) Patologiya, **8**(2), 89-95.]

Поступила в редакцию: 02. 02. 2020.  
После доработки: 07. 07. 2020.  
Принята к печати: 09. 07. 2020.

**ERYTHROPOIETIN AND VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR LEVEL IN NORMOXIA AND IN CEREBRAL ISCHEMIA UNDER PHARMACOLOGICAL AND HYPOXIC PRECONDITIONING**

**V.E. Novikov, O.S. Levchenkova\***

Smolensk State Medical University,  
28 Krupskoy str., Smolensk, 214019 Russia; \*e-mail: levchenkova-o@yandex.ru

The level of erythropoietin (EPO) and vascular endothelial growth factor (VEGF-A) was investigated in blood serum and brain of Wistar rats by the enzyme immunoassay with specific rat antibodies. These growth factors are actively studied as biomarkers of ischemia or cytoprotection, as well as targets for agents initiating preconditioning (PreC). Pharmacological (amtizol administration), hypoxic (hypobaric hypoxia), and combined PreC (amtizol+hypobaric hypoxia) were used as neuroprotective approaches in this experimental work. In normoxia groups blood and brain tissue were collected 1 h (early period) or 48 h (delayed period) after the PreC. In addition we studied groups of animals with cerebral ischemia (induced by bilateral ligation of the common carotid arteries) 1 h and 48 h after the combined PreC: the levels of EPO and VEGF-A in the blood serum and the brain supernatant were determined in one day after the ligation. Experiments have shown that amtizol (3,5-diamino-1,2,4-thiadiazole) in normoxia increased the EPO level in the brain, and did not change EPO in blood serum and VEGF-A levels in both serum and the brain. A three-day (60 min exposure with 48 h intervals) hypobaric hypoxia (410 mm Hg) increased EPO and VEGF-A in the blood serum and brain tissues, but in most experimental groups differences did not reach the level of statistical significance versus intact control. The combined PreC was accompanied by a significant increase of EPO and VEGF-A in normoxia conditions both in early and delayed period of PreC. In cerebral ischemia the EPO level in the blood serum and brain tissues was higher than in intact control. The serum level of VEGF-A of the ischemia control group tended to increase while the brain level of VEGF-A remained basically unchanged versus the intact control group. In combined PreC before ischemia, the EPO level was lower in serum as compared with the ischemia control in the delayed PreC period, but did not differ significantly from the ischemia control in serum in early period and in brain tissues in both PreC periods. The VEGF-A level in the groups of combined PreC was significantly lower in serum as compared with the ischemia control in both the early and delayed PreC; in brain tissues it did not differ from the level of both the intact and ischemia control in early PreC period and was higher than in both control groups in the delayed PreC period.

**Key words:** erythropoietin (EPO); vascular endothelial growth factor (VEGF-A); preconditioning; cerebral ischemia; amtizol

**Funding.** The study was financed from the budget of Smolensk State Medical University.

Received: 02.02.2020, revised: 07.07.2020, accepted: 09.07.2020.