

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«ВОРОНЕЖСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

На правах рукописи

Гуреев Артем Петрович

МОДУЛЯЦИЯ МЕТАБОЛИЗМА АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА И
БИОГЕНЕЗА МИТОХОНДРИЙ МОЗГА ПРИ СТАРЕНИИ МЫШЕЙ

Специальность 03.01.04 – Биохимия

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель
доктор биологических наук
профессор Попов В.Н.

Воронеж 2019

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

A β - бета-амилоидные бляшки

АФК - активные формы кислорода

ДТНБ - 5,5'-дитиобис-(2-нитробензойная кислота

МС - Метиленовый синий

β 3-АР - β 3-адренергические рецепторы

β -ГПК - β -гуанидинопропионовая кислота

6-OHDA - 6-hydroxydopamine

Acadm - Acyl-CoA dehydrogenase medium-chain

Acadv1 - Acyl-CoA dehydrogenase very long-chain

Acox1 - acyl-coenzyme A oxidase 1

АМПК - AMP-activated protein kinase

APP - amyloid- β precursor protein

ARE - Antioxidant response element

ATF2 - activating transcription factor 2

BACE1 - β site APP cleaving enzyme

CaMKIV - Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase IV

CART - The cocaine- and amphetamine-regulated transcript

Cat - catalase

Cox1 - Cytochrome c oxidase subunit I

Cpt1a - Carnitine Palmitoyltransferase 1A

CREB - cAMP response element-binding protein

ERR α - Estrogen-related receptor- α

Etfdh - Electron Transfer Flavoprotein Dehydrogenase

FoxO1 - forkhead box class-O

Gapdh - Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase

GCLC - glutamate-cysteine ligase catalytic subunit

GPX1 - glutathione peroxidase 1

GSK3 β - glycogen synthase kinase 3 β

HO-1 - heme oxygenase 1

HSP - H-strand promoter
Keap1 - Kelch-like ECH-associated protein 1
LSP - L-strand promoter
MAF - musculoaponeurotic fibrosarcoma
MAPK - mitogen-activated protein kinase
MEF2 - myocyte enhancer factor
MPP⁺ - 1-methyl-4-phenylpyridinium
MPTP - 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine
NQO1,2 - NAD(P)H quinone dehydrogenase 1 и 2
NRF1 - nuclear respiratory factor 1
Nrf2 - Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2
OGT - *O*-linked *N*-acetylglucosamine (O-GlcNAc) transferase
PGC-1 α - PPAR-Gamma-Coactivator-1 α
PINK1 - PTEN induced kinase 1
POLG - DNA polymerase gamma
POLRMT - RNA polymerase mitochondrial
PPAR - peroxisome proliferator-activated receptors
Prdx3,5 - Peroxiredoxin 3,5
PTEN - phosphatase and tensin homolog
RXR α - Retinoid X receptor α
Sirt1 – Sirtuin1
SOD2 – superoxide dismutase 2
SQSTM1 - sequestosome 1
TAS - Termination-associated sequence
TFAM - transcription factor A, mitochondrial
TFB2M - transcription factor B2, mitochondrial
TOMM20 - Translocase Outer Mitochondrial Membrane
YY1 - Yin Yang 1

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	2
ВВЕДЕНИЕ.....	7
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	15
1.1. Роль митохондриального биогенеза в функционировании организма .	15
1.2. Репликация и транскрипция мтДНК.....	16
1.3. Регуляция митохондриального биогенеза через PGC-1 α -сигнальный каскад..	18
1.3.1. Регуляция PGC-1 α на транскрипционном уровне	20
1.3.2. Регуляция PGC-1 α на посттрансляционном уровне	23
1.4. Регуляция митохондриального биогенеза через Nrf2/ARE-сигнальный каскад.	26
1.4.1. Основные характеристики Nrf2/ARE	26
1.4.2. Роль Nrf2/ARE-сигнального каскада в биогенезе митохондрий	40
1.5. Взаимодействие Nrf2/ARE и PGC-1 α сигнальных путей	44
1.6. Роль митохондриального биогенеза в старении	47
1.7. Роль митохондриального биогенеза в нейродегенеративных заболеваниях.....	49
1.7.1. Болезнь Паркинсона	51
1.7.2. Болезнь Альцгеймера	55
1.7.3. Другие нейродегенеративные заболевания.....	58
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ.....	61
ГЛАВА 2. ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	61
2.1. Объект исследования.....	61
2.1.1. Изучение влияния метиленового синего на митохондриальный биогенез мозга мыши	63

2.1.2. Изучение влияния β -гуанидинопропионовой кислоты на митохондриальный биогенез мозга мыши	65
2.1.3. Изучение влияния фенофибрата на митохондриальный биогенез мозга мыши	65
2.2. Методы исследования.....	66
2.2.1. Измерение скорости дыхания.....	66
2.2.2. Тест «Струна»	66
2.2.3. Тест «Открытое поле»	67
2.2.4. Тест «Приподнятый крестообразный лабиринт»	67
2.2.5. Измерение количества копий мтДНК.....	68
2.2.6. Измерение экспрессии генов	68
2.2.7. Выделение мтДНК.....	69
2.2.8. Измерение количества повреждений мтДНК	70
2.2.9. Выделение митохондрий.....	73
2.2.10. Измерение биоэнергетических параметров	75
2.2.11. Измерение активности цитратсинтазы	76
2.2.12. Определение содержания диеновых конъюгатов.....	76
2.3. Статистическая обработка	77
ГЛАВА 3. ВОЗРАСТНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ МИТОХОНДРИАЛЬНОГО БИОГЕНЕЗА.....	78
3.1. Возрастные изменения количества митохондрий	78
3.2. Физиологические изменения, связанные с возрастом	80
ГЛАВА 4. ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ МЕТИЛЕНОВОГО СИНЕГО НА МИТОХОНДРИАЛЬНЫЙ БИОГЕНЕЗ	84
4.1. Биохимические свойства метиленового синего.....	84

4.2. Влияние метиленового синего на физиологические параметры	89
4.3. Влияние метиленового синего на Nrf2/ARE сигнальный путь	94
ГЛАВА 5. ВЛИЯНИЕ β -ГУАНИДИНОПРОПИОНОВОЙ КИСЛОТЫ НА МИТОХОНДРИАЛЬНЫЙ БИОГЕНЕЗ	99
5.1. Влияние дефицита креатина на поведенческие особенности мышей ...	99
5.2. Влияние дефицита креатина на митохондриальный метаболизм.....	103
5.3. Влияние дефицита креатина на митохондриальный биогенез.....	106
ГЛАВА 6. ВЛИЯНИЕ ФЕНОФИБРАТА НА МЕТАБОЛИЗМ ЖИРНЫХ КИСЛОТ И БИОГЕНЕЗ МИТОХОНДРИЙ	111
6.1. Влияние фенофибрата на физиологические параметры мышей.....	111
6.2. Влияние фенофибрата на метаболизм жирных кислот в мозге	114
6.3. Влияние фенофибрата на метаболизм жирных кислот в печени.....	117
ГЛАВА 7. ИЗМЕРЕНИЕ КОЛИЧЕСТВА ОКИСЛИТЕЛЬНЫХ ПОВРЕЖДЕНИЙ МТДНК	123
7.1. Оптимизация метода определения количества повреждений в мтДНК.....	123
7.2. Повреждения, индуцируемые H_2O_2	130
7.3. Повреждения мтДНК, индуцируемые метиленовым синим <i>in vitro</i> ...	136
7.4. Влияние метиленового синего на повреждения мтДНК <i>in vivo</i>	139
7.5. Влияние β -гуанидинопропионовой кислоты и фенофибрата на повреждения мтДНК <i>in vivo</i>	143
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	146
ВЫВОДЫ.....	151
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	153

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность работы.

Старение - это общедегенеративный процесс, который связан со снижением функциональности клеток во всем организме. Для большинства клеточных компонентов требуется регенерация на протяжении всей жизни, что ассоциировано со значительными энергетическими затратами. Митохондрии, которым отводится ключевая роль в поддержании энергетического гомеостаза и метаболизма активных форм кислорода (АФК), также нуждаются в постоянном обновлении [17]. Это достигается за счет процессов митохондриального биогенеза и митофагии. Мозг, несмотря на то, что составляет всего 2% от массы тела, потребляет около 20% энергии, получаемой организмом [162]. Высокие энергетические потребности делают данный орган наиболее уязвимым для возрастных изменений. Нарушение координации процессов поддержания митохондриального гомеостаза приводит к дегенеративным процессам, которые могут способствовать патогенезу таких социально-значимых нейродегенеративных заболеваний, как болезни Альцгеймера и Паркинсона [252].

Несмотря на стремительное развитие биомедицины на данный момент не разработано эффективных медикаментозных методов лечения данных болезней. Не вызывает сомнений, что одним из ключевых факторов их развития является возрастное нарушение функционирования митохондрий, что приводит к дефициту АТФ и гиперпродукции АФК в головном мозге. Данные процессы опосредуют формирование синильных бляшек, тау-агрегацию (причины болезни Альцгеймера) [14], разрушение дофаминергических нейронов (причина болезни Паркинсона) [124].

Дополнительной причиной усугубления проблемы нейродегенеративных заболеваний является общее старение населения. В концепции демографической политики Российской Федерации одной из главных задач ставится достижение к 2025 году средней продолжительности

жизни 75 лет. При подобной тенденции к 2050 году доля людей в возрасте старше 60 лет составит 28%, в то время как на данный момент их количество около 18% [20]. Таким образом, нейродегенеративные заболевания являются дополнительным фактором, который будет усиливать негативные социально-экономические последствия старения населения Российской Федерации.

В конце XX века было разработано несколько митохондриально-направленных антиоксидантов [10] и антиоксидантов растительного происхождения [271]. Значительная часть этих препаратов показала свою эффективность при лечении онкологических заболеваний [391], диабета [53], сердечно-сосудистых заболеваний [15]. Однако при терапии нейродегенеративных заболеваний не все так однозначно. Проблема в том, что гиперпродукция АФК является не причиной, а, скорее, следствием нарушения митохондриальной стабильности. Поэтому терапия антиоксидантами может только снизить уровень АФК в клетках, но не будет способствовать поддержанию функциональности митохондрий. Фармакологическая модуляция митохондриального биогенеза представляется более перспективным направлением в терапии нейродегенеративных заболеваний, так как может одновременно увеличивать количество митохондрий и активность дыхательных субъединиц [379]. Поиск путей фармакологической регуляции митохондриального биогенеза и митофагии является относительно молодым направлением в биомедицине, которое может позволить в перспективе разработать пути предупреждения развития данных патологий, а также способствовать активному долголетию.

Классически считается, что транскрипционный фактор PGC-1 α (Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha) является «мастером регуляции митохондриального биогенеза». Однако в последние годы значительно возросло количество работ, показывающих ключевую роль в митохондриальном биогенезе Nrf2/ARE (Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 / antioxidant response element)-сигнального каскада [328]. Nrf2 активируется соединениями, которые способны нарушать его взаимодействие

с негативными регуляторами. К этим соединениям относятся полифенолы, флавоноиды, фенилендиамины, а также радикалы кислорода [11].

По этой причине вещества, которые могут провоцировать мягкий окислительный стресс, являются потенциально перспективными лекарственными препаратами. Их использование может запускать компенсаторные механизмы, в том числе и активацию Nrf2, что, в свою очередь, будет приводить к индукции и митохондриального биогенеза, и антиоксидантной защиты, которые угнетаются в процессе старения. Такой комбинированный ответ организма на фармакологическое вмешательство является перспективным направлением в решении задачи замедления патогенеза возрастных нейродегенеративных заболеваний.

Тем не менее, существует еще много нерешенных вопросов в этой области исследований. В частности, плохо изучен такой фундаментальный вопрос как взаимодействие PGC-1 α и Nrf2. Большая часть исследователей специализируется на изучении какого-либо одного из этих сигнальных путей в вопросе регуляции митохондриального биогенеза. Существует очень ограниченное число работ, целью которых являлось изучение взаиморегуляции PGC-1 α и Nrf2. Решение этого вопроса во многом помогло бы выяснить роль данных механизмов при старении и развитии связанных с ним заболеваний. Прикладным аспектом данного исследования является разработка препаратов нового поколения, таргетом которых является устранение митохондриальных дисфункций в стареющем мозге за счет активации адаптивных ответов организма.

При этом не до конца понятно, насколько безопасно индуцировать мягкий окислительный стресс в стареющем организме. Не будут ли данные процессы параллельно с активацией адаптивных ответов приводить к окислительным повреждениям клеточных структур и геномной нестабильности, что потенциально может привести к более серьезным последствиям вплоть до развития онкологических процессов. Таким образом, важно параллельно проводить исследование эффективности и безопасности

определенного способа терапии. Комплексное изучение активаторов Nrf2 и PGC-1 α на митохондриальный метаболизм АФК, их роли в биогенезе митохондрий и оценка потенциальной токсичности на различные клеточные структуры будет вносить существенный вклад в разработку инновационных методов для увеличения активного долголетия и терапии нейродегенеративных заболеваний.

Цели и задачи исследования.

Целью настоящей работы являлось выявление характера возрастных изменений митохондриального метаболизма и биогенеза в мозге, их влияния на физиологические особенности мышей, изучение возможности фармакологической модуляции данных процессов с помощью активаторов Nrf2 и PGC-1 α в мозге стареющих 15-месячных мышей.

Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи:

1. Изучить характер возрастных изменений митохондриального биогенеза и физиологических параметров мышей.
2. Установить окислительно-восстановительные свойства метиленового синего как альтернативного переносчика электронов в электрон-транспортной цепи митохондрий.
3. Изучить влияние мягкого окислительного стресса, индуцируемого метиленовым синим, на митохондриальный биогенез и физиологические параметры 15-месячных мышей.
4. Изучить влияние дефицита креатина, индуцированного инъекциями β -гуанидинопропионовой кислоты, на митохондриальный биогенез и физиологические параметры 15-месячных мышей.
5. Изучить влияние фенофибрата на митохондриальный метаболизм и биогенез в мозге и печени, а также физиологические параметры 15-месячных мышей.
6. Оптимизировать метод ПЦР длинных фрагментов для детекции окислительных повреждений мтДНК мыши.

7. Установить *in vitro* и *in vivo* токсикологические и протекторные свойства метиленового синего по отношению к мтДНК.

8. Установить токсикологические свойства фенофибрата и β -гуанидинопропионовой кислоты по отношению к различным клеточным компонентам мозга и печени мышей.

Научная новизна. Было показано, что возрастное снижение количества копий митохондрий в мозге связано с подавлением Nrf2-зависимого биогенеза. Главное отличие нашего исследования заключается в том, что для экспериментальной проверки метиленового синего, β -гуанидинопропионовой кислоты и фенофибрата использовались именно 15-месячные мыши – возраст, который наиболее уязвим для факторов, приводящих к митохондриальным дисфункциям и началу развития нейродегенеративных заболеваний.

Мы показали, что восстановленная форма метиленового синего передает электроны, предположительно, на III комплекс электрон-транспортной цепи митохондрий, а не на цитохром *c*, как считалось ранее. При этом данный процесс связан с увеличением скорости продукции H_2O_2 , а не механическим скавенджером АФК, как предполагалось ранее несколькими исследовательскими группами. Антиоксидантный эффект метиленового синего достигается за счет положительной регуляции экспрессии генов *No-1*, *Sod2*, *Prdx3*. Кроме того, нами было показано, что метиленовый синий именно через Nrf2/ARE-сигнальный путь увеличивает интенсивность митохондриального биогенеза.

Снижение уровня креатина за счет его конкурентного ингибирования β -гуанидинопропионовой кислотой также может активировать митохондриальный биогенез в мозге 15-месячных мышей. В нашем эксперименте данный эффект достигался за счет активирования оси AMPK/Nrf2/ARE, но не AMPK/PGC-1 α , как предполагалось ранее. Мы выявили различия в метаболизме β -гуанидинопропионовой кислоты в среднем мозге и коре больших полушарий, что, судя по всему, вызвано различиями в транспорте гуанидиновых соединений через гематоэнцефалический барьер в

разных отделах мозга. При этом возрастание интенсивности липидного метаболизма за счет употребления фенофибрата не увеличивает количество митохондрий ни в мозге, ни в печени.

Нами был значительно модифицирован метод ПЦР длинных фрагментов для определения количества повреждений мтДНК мышечных. Была подобрана панель праймеров с учетом наличия в ядре псевдоденов, а также с расчетом степени эффективности и линейности амплификации целевых фрагментов. Был показан гетерогенный характер повреждений, который зависит от количества GTGR-последовательностей, содержащих Fe^{2+} , необходимых для превращения H_2O_2 в $\bullet OH$, который и вызывает основные окислительные повреждения.

Практическая значимость.

Результаты проведенного исследования могут выступать в качестве основы для разработки новых подходов к замедлению старения и патогенеза таких нейродегенеративных заболеваний, как болезни Альцгеймера и Паркинсона. Полученные в ходе работы данные позволяют предположить, что стимуляции мягкого окислительного стресса, за счет альтернативного транспорта электронов, и дефицита энергии, вызванного нарушением работы креатинового цикла, могут запускать в мозге стареющих мышечных адаптивные реакции. Эти реакции приводят к увеличению количества митохондрий и повышению антиоксидантной защиты. Тот факт, что изучаемые соединения являются уже лицензированными лекарственными препаратами и биологически-активными добавками, может упростить процесс их введения в клиническую практику для терапии нейродегенеративных заболеваний или для возможной геронтопротекции.

Разработанный метод детекции окислительных повреждений мтДНК может являться удобным методом для токсикологических исследований фармакологических препаратов, которые так или иначе влияют на окислительный статус организма. Кроме того, нами были выявлены закономерности распределения повреждений в мтДНК, что расширяет

фундаментальные представления о механизмах формирования одно- и двуцепочечных разрывов.

Разработанная методология детекции количества повреждений мтДНК внедрена в учебный процесс медико-биологического факультета Воронежского государственного университета и используется при выполнении лабораторных работ по курсу «Медицинская генетика», «Классические и современные методы генетических исследований», «Спецпрактикум».

Положения, выносимые на защиту.

1. При старении наблюдается снижение функциональности Nrf2/ARE-сигнального каскада, что, вероятно, может являться одной из причин возрастного снижения интенсивности митохондриального биогенеза и антиоксидантной защиты в головном мозге.

2. Мягкий окислительный стресс, вызванный увеличением скорости продукции H_2O_2 , и дефицит энергии, вызванный ингибированием креатинового цикла, способен запускать в стареющем мозге компенсаторные реакции, приводящие к адаптивной индукции митохондриального биогенеза, предположительно, за счет активации Nrf2/ARE-сигнального каскада.

3. Структура мтДНК крайне гетерогенна и неравномерно подвержена окислительным повреждениям. H_2O_2 селективно повреждает фрагменты мтДНК, обогащенные GTGR-последовательностями. Вероятно, это связано с тем, что данные фрагменты за счет особой конформации накапливают Fe^{2+} , необходимое для превращения H_2O_2 в $\bullet OH$, который и является причиной разрывов цепи мтДНК.

4. Влияние гуанидиновых соединений и ротенона на митохондрии среднего и переднего мозга различаются. Наиболее вероятно, что это связано с особенностью их транспорта через гематоэнцефалический барьер, а не особенностью строения митохондрий в различных отделах мозга.

5. Роль Nrf2/ARE в адаптивной регуляции митохондриального биогенеза является, вероятно, более значимой, чем роль PGC-1 α . По крайней мере это справедливо для мозга, где метаболизм липидов вносит меньший вклад в общие обменные процессы, по сравнению с другими тканями.

Публикации. Основные результаты диссертационной работы изложены в 21 публикации, из них 9 – в журналах, рекомендованных ВАК РФ и индексируемых в системе Web of Science и Scopus.

Апробация работы. Основные результаты, полученные в ходе выполнения исследования, представлены на международной научно-практической конференции «Актуальные направления научных исследований XXI века: теория и практика» (Воронеж, 2014); 22-й международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов - 2015. Секция Биология» (Москва, 2015); международной научной конференции «Постгеномные технологии в медицине: от теории к практике» (Воронеж, 2015); международной научной конференции «Биомедицинские инновации для здорового долголетия» (Санкт-Петербург, 2016); 2-й международной научной конференции «Постгеномные технологии в медицине: от теории к практике» (Воронеж, 2016); 3-й международной научной конференции «Постгеномные технологии в медицине: от теории к практике» (Воронеж, 2017); международной конференции «Способы достижения активного долголетия» (Казань, 2018).

Структура и объём работы. Диссертация изложена на 192 страницах текста и состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части и обсуждения результатов, заключения, выводов, списка литературы (394 источника). Иллюстрационный материал включает 46 рисунков, 13 таблиц.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Роль митохондриального биогенеза в функционировании организма

Митохондрии играют ключевую роль в патогенезе широкого спектра заболеваний [196, 224; 267] и участвуют в процессе старения [152]. Эти процессы связаны с дисфункцией энергетического обмена, увеличением производства активных форм кислорода (АФК), накоплением различных точечных мутаций или крупных делеций в митохондриальной ДНК, а также индукцией апоптоза [16]. Однако не менее важную роль играет непосредственно количество митохондрий в той или иной ткани, то есть процесс митохондриального биогенеза [332].

Количество митохондрий и митохондриальной ДНК (мтДНК) у зародышей начинает стремительно возрастать со стадии бластоцисты [289] и продолжает увеличиваться в течение всего процесса взросления организма [157]. В ответ на физические упражнения увеличивается количество митохондрий в скелетных мышцах [138; 166] и в сердце [129]. Митохондриальный биогенез активируется при адаптации к холоду во время дифференциации адипоцитов бурой жировой ткани [110]. Все это подтверждает ключевую роль митохондриального биогенеза в нормальных не патологических физиологических процессах. Однако нет единого мнения об изменении количества митохондрий при старении. В разных тканях, в разное время, разными методами были получены противоречивые результаты. Ряд авторов, основываясь на измерении количества мтДНК, говорит об увеличении количества митохондрий у стареющих животных [312; 314]. Тем не менее, большая часть исследователей при помощи биохимических методов и метода электронной микроскопии обнаружили возрастное снижение количества копий митохондрий в различных тканях [38; 98; 204; 226; 302; 368].

Стоит отметить, что ключевое значение играет не только количество митохондрий, но и их функциональность, которая находится в зависимости от

митохондриального биогенеза, от их динамики (деление/слияния) и митофагии [17]. Координация этих процессов зависит от целого ряда взаиморегулируемых сигнальных каскадов, которые будут подробно рассмотрены в следующих главах.

1.2. Репликация и транскрипция мтДНК

МтДНК млекопитающих представляет собой кольцевую молекулу длиной примерно 16,5 т.п.н. МтДНК была практически одновременно открыта двумя независимыми группами ученых: в 1963 году при помощи электронной микроскопии [243] и 1964 году при биохимическом анализе фракций митохондрий дрожжей [337]. МтДНК человека кодирует следующие гены: *ND1*, *ND2*, *ND3*, *ND4*, *ND4L*, *ND5* и *ND6* (субъединицы I комплекса), *COX1*, *COX2*, *COX3* (субъединицы IV комплекса), цитохром *CYTB* (субъединица III комплекса), *ATPS6* и *ATPS8* (субъединицы АТФ синтазы). Также в мтДНК имеется собственная трансляционная и транскрипционная система, которая включает 2 гена, кодирующих рРНК (*16S* и *12S*) и 22 гена тРНК. Кроме того, имеется некодирующий участок, так называемая D-петля, где происходит инициация транскрипции и репликации мтДНК [83].

D-петля содержит промотор LSP (L-strand promoter) для легкой цепи и два промотора HSP1, HSP2 (H-strand promoter) для тяжелой цепи, а также точку начала репликации для H-цепи (O_H). Репликация мтДНК инициируется промотором L-цепи, и расщепление цепи мтДНК происходит вблизи блоков консервативных последовательностей (conserved sequence blocks - CSB I, II, и III). Ниже расположен участок TAS (termination-associated sequence), в котором может останавливаться процесс репликации, что играет важную роль в регуляции количества мтДНК [65] (рис. 1).

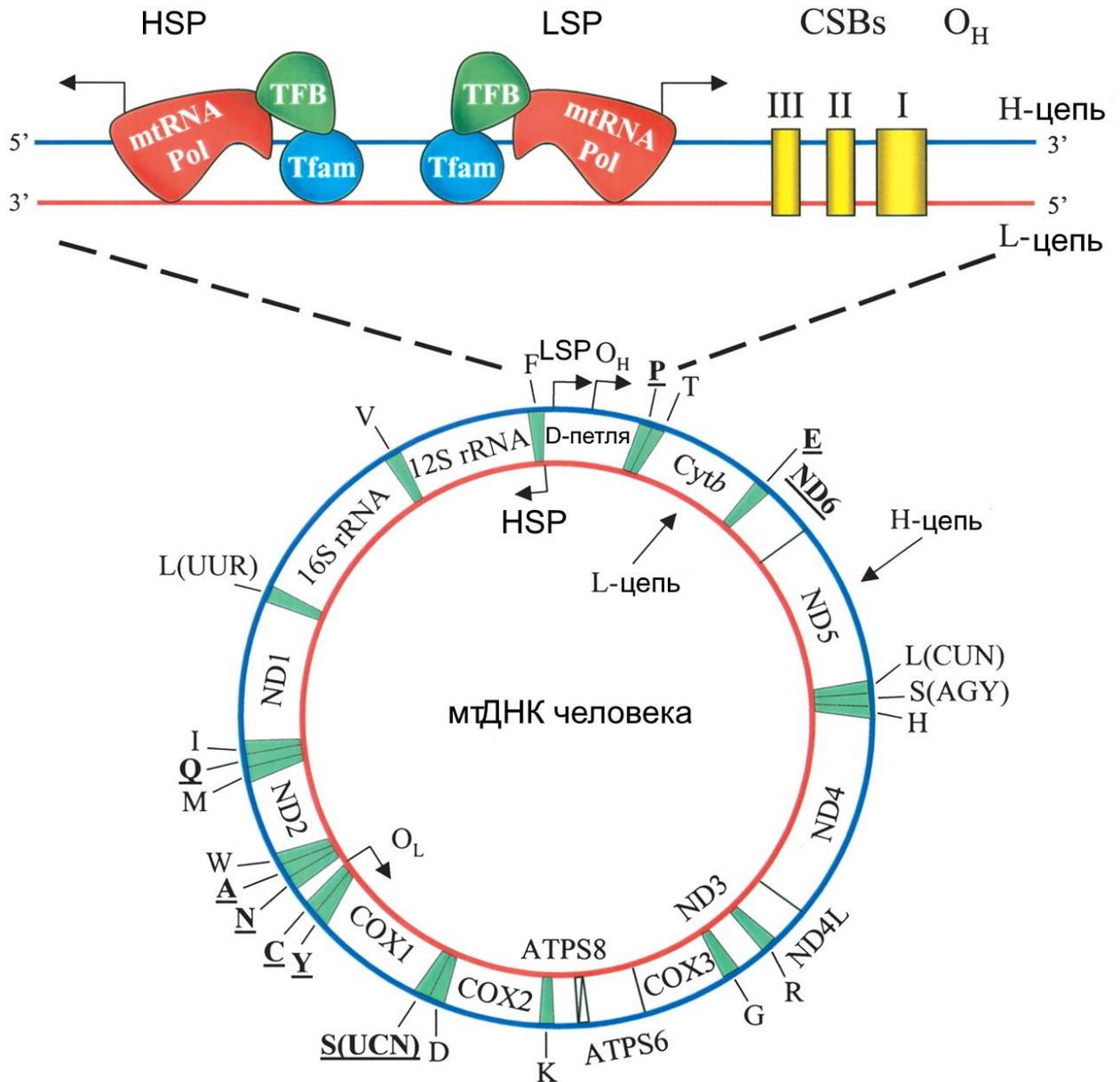


Рис. 1. Схема транскрипции мтДНК и структура мтДНК человека [189]

МтДНК не является полностью автономной генетической структурой, так как ее транскрипционная способность находится в полной зависимости от ядерного генома. У человека было обнаружено около 60 белков, прямо или косвенно связанных с мтДНК, из которых около 30 составляют так называемое ядро митохондриального нуклеоида [63]. Репликация осуществляется белком мтДНК-полимераза γ (POLG - DNA polymerase gamma). POLG - это тримерный белковый комплекс, который состоит из каталитической субъединицы, кодируемой геном *POLG*, и вспомогательной димерной субъединицы, кодируемой геном *POLG2* [147]. Транскрипцию осуществляет белок мтДНК

РНК-полимераза – POLRMT (RNA polymerase mitochondrial) [171]. Ключевым энхансером является белок TFAM (transcription factor A, mitochondrial), который обеспечивает расплетание и изгибание структуры ДНК, необходимое для связывания POLRMT с промоторами мтДНК. TFB2M (transcription factor B2, mitochondrial) функционируют как диссоциирующий фактор специфичности, который обеспечивает взаимодействие между POLRMT и TFAM. Оба TFB (TFB1M и TFB2M) связаны с диметилтрансферазами рРНК и, следовательно, могут также функционировать как модификатор рРНК [309]. При этом для TFB1M, по всей видимости, основной является именно функция метилирования рРНК, а не транскрипционного фактора [218].

Ядерные дыхательные факторы (nuclear respiratory factors) (NRF1 и NRF2) были открыты как транскрипционные факторы, увеличивающие уровень экспрессии субъединиц дыхательной цепи митохондрий [127]. Позже было показано, что NRF-1 связывается не только с генами субъединиц ЭТЦ, которые кодируются ядерным геномом, но и с промоторами генов, участвующих в транскрипции мтДНК. Было обнаружено, что NRF1 связывается со специфическими сайтами промоторных областей и регулирует экспрессию TFAM [383], TFB1M и TFB2M [143]. Кроме того, ядерные дыхательные факторы, в частности NRF2, способны регулировать экспрессию генов других митохондриальных ферментов, например, ТОММ20 (Translocase Outer Mitochondrial Membrane) - ключевого фермента, участвующего в транспорте веществ через митохондриальную мембрану [62].

1.3. Регуляция митохондриального биогенеза через PGC-1 α -сигнальный каскад

Изначально PGC-1 α был открыт как корегулятор PPAR γ , экспрессирующийся в бурой жировой ткани при холодовом воздействии и опосредующий адаптивный термогенез. Это и послужило причиной названия PGC-1 α – PPAR-Gamma-Coactivator-1 α (кодируется геном *PPARGC1A*) [24]. Впоследствии было открыто, что PGC-1 α является

коактиватором для гораздо большего числа генов. Это обеспечивается наличием нескольких функциональных доменов у молекулы PGC-1 α . Следом было показано, что PGC-1 α может взаимодействовать с обоими ядерными дыхательными факторами NRF1 и NRF2. Делеция N-терминального участка NRF1 блокировала влияние PGC-1 α на митохондриальный биогенез [210].

Регуляция митохондриального биогенеза - не единственная функция PGC-1 α . Также PGC-1 α вовлекается в процессы регуляции адаптивного термогенеза, метаболизма глюкозы и жирных кислот. Белки семейства PPAR (peroxisome proliferator-activated receptors) играют ключевую роль в регуляции метаболизма жирных кислот. Процесс активации данных рецепторов включает 5 основных этапов: 1) связывание рецептора с лигандом; 2) стабильное связывание комплекса лиганда и ядерного рецептора с ДНК; 3) высвобождение корепрессора и связывание с коактиватором; 4) активация транскрипции; 5) диссоциация комплекса транскрипции, за которым следует либо выключение механизма транскрипции, либо его повторный запуск [149].

PPAR α регулирует метаболизм липидов в печени и скелетных мышцах, а также гомеостаз глюкозы. Было установлено, что физиологическими лигандами PPAR α являются моно- и полиненасыщенные жирные кислоты, а также эйкозаноиды. Синтетическими лигандами PPAR α являются фибраты (клофибрат, безафибрат и фенофибрат) - класс амфипатических карбоновых кислот, которые были впервые использованы для лечения гипертриглицеридемии [212]. Большая часть экспрессии PPAR γ приходится на белый и бурый жир, и в несколько меньшей степени на печень. Слизистая оболочка толстого кишечника и слепой кишки тоже экспрессирует PPAR γ . Преимущественно лигандами PPAR γ являются следующие полиненасыщенные незаменимые жирные кислоты: линолевая кислота, линоленовая кислота, арахидоновая кислота и эйкозапентаеновая

кислота. Наиболее распространенными можно считать следующие вещества из этого ряда: троглитазон, росиглитазон и пиоглитазон [61].

PPAR- β/δ экспрессируется практически во всех тканях. Природными активаторами являются свободные жирные кислоты и эйкозаноиды. Интерес к PPAR- β/δ усилился относительно недавно, поэтому синтетические лиганды пока еще плохо классифицированы и изучены [296].

Еще одним таргетом, который коактивируется с помощью PGC-1 α , является ERR α (Estrogen-related receptor- α). Этот белок действует как сайт-специфический транскрипционный фактор, и было также показано, что он взаимодействует с эстрогеном. Регуляторная активность этого белка была продемонстрирована в регуляции множества генов, включая *LTF* (lactoferrin) *ACADM* (acyl coenzyme A dehydrogenase medium-chain) и гены рецепторов гормонов щитовидной железы. При этом транскрипционная активность самого ERR α не зависит от лигандов, а регулируется PGC-1 α [131]. Сам PGC-1 α может являться таргетной молекулой для целого ряда других сигнальных каскадов. Регуляция PGC-1 α осуществляется на транскрипционном и на посттрансляционном уровне [134].

1.3.1. Регуляция PGC-1 α на транскрипционном уровне

К основным регуляторам экспрессии относятся транскрипционные факторы MEF2 (myocyte enhancer factor 2), FoxO1 (forkhead box class-O), ATF2 (activating transcription factor 2) и CREB (cAMP response element-binding protein) (рис. 2). В мышцах экспрессия *PPARGC1A* индуцируется при физических нагрузках. В этом процессе задействовано сразу несколько сигнальных путей. Один из них связан со стимуляцией кальциевого пути, который играет важнейшую роль во многих митохондриальных функциях [7].

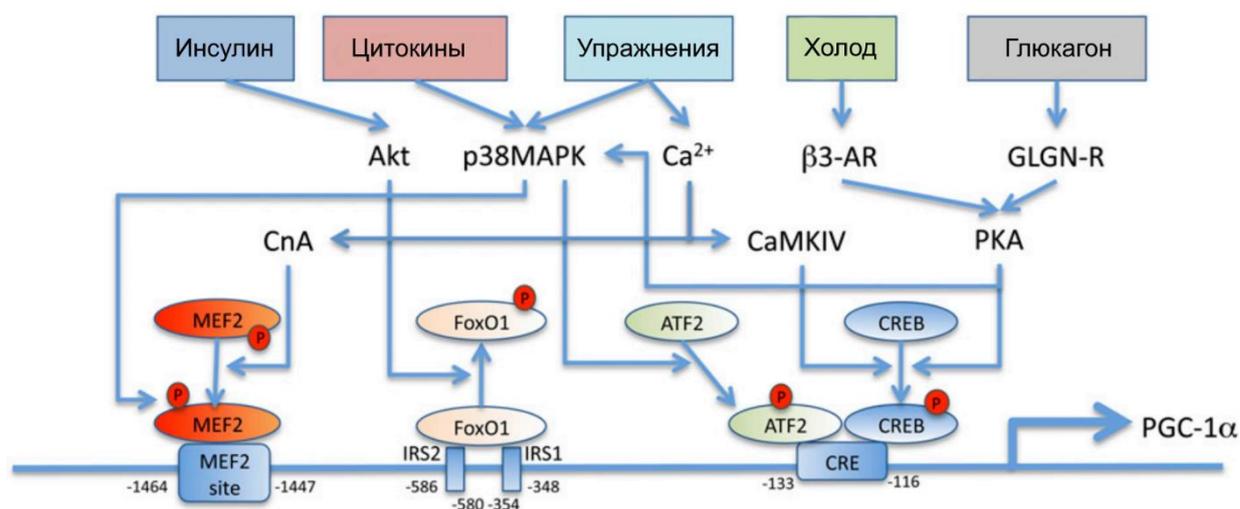


Рис. 2. Регуляции транскрипции гена *PPARGC1A* [134]

Стимуляция экспрессии *PPARGC1A* осуществляется за счет активации Ca^{2+} /кальмодулин зависимой протеинкиназы IV – CaMKIV (Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase IV) и кальцинейрина A – CnA (calcineurin A). CnA способен активировать факторы транскрипции MEF2, в частности MEF2C и MEF2D, которые непосредственно регулируют транскрипцию гена *PPARGC1A* [51]. При этом и MEF2C, и MEF2D являются таргетами для PGC-1α, что свидетельствует о наличии регуляторной петли с положительной обратной связью для регуляции экспрессии гена *PPARGC1A* [318; 374]. Одним из таргетов CaMKIV является транскрипционный фактор CREB. Промотор гена *PPARGC1A* имеет сайт связывания с CREB, который является высококонсервативным и расположен у человека в регионе между 2133 и 2116 нуклеотидом, а у мыши между 2146 и 2129 нуклеотидом [51; 92]. Таким образом, Ca^{2+} инициирует фосфорилирование CaMKIV и активацию CREB [51]. Другой механизм регуляции экспрессии *PPARGC1A* при физических нагрузках связан с активацией p38 MAPK (p38 mitogen-activated protein kinase), которые активируются главным образом цитокинами. P38 MAPK может активировать одновременно и MEF2, и ATF2 [316].

PGC-1α обладает сложной схемой ответа на инсулин, который не до конца изучен. С одной стороны, было показано, что инсулин увеличивает

экспрессию *PPARGC1A* [238]. С другой стороны, сигнальные пути, связанные с инсулином, приводят к снижению интенсивности катаболических процессов, что должно быть связано со снижением функциональной активности PGC-1 α . В подтверждение этого было показано, что FoxO1 стимулирует экспрессию *PPARGC1A*, а инсулин активирует Akt, который фосфорилирует и ингибирует FoxO1 и, тем самым, снижает экспрессию *PPARGC1A* [283].

В скелетных мышцах и буром жире экспрессия *PPARGC1A* увеличивается в ответ на холодные температуры окружающей среды. Холод улавливается симпатическим отделом нервной системы через β 3-адренергические рецепторы (β 3-AR), которые стимулируют активацию протеинкиназы A (PKA) и цАМФ сигнальный путь, что приводит к активации CREB [24; 144]. При этом PKA дополнительно вовлекает в процесс положительной регуляции экспрессии *PPARGC1A* еще и p38 MAPK сигнальный путь [273]. При голодании значительно увеличивается экспрессия *PPARGC1A* в печени. Это происходит в ответ на выработку глюкагона, который активирует цАМФ и CREB [92].

АМФ-активируемая протеинкиназа – АМПК (AMP-activated protein kinase) является важнейшей сенсорной молекулой, которая реагирует на изменение энергетического статуса клетки. Триггером для активации АМПК является смещение равновесия АМФ/АТФ в сторону АМФ, что приводит к активации катаболических путей в организме с целью увеличить уровень АТФ в клетке [116]. Наиболее важным таргетом для АМПК является PGC-1 α . Хорошо изучены механизмы АМПК-зависимой посттрансляционной модификации PGC-1 α , но не до конца понятна его роль в регуляции экспрессии *PPARGC1A*. Хотя установлено, что AICAR (5-aminoimidazole-4-carboxamide-1- β -D-ribofuranoside) – химический активатор АМПК – увеличивает экспрессию *PPARGC1A* [116].

Еще одним активатором экспрессии *PPARGC1A* является цГМФ, который активируется за счет увеличения уровня оксида азота (NO). При этом уровень NO может регулироваться непосредственно прекурсорами (L-

аргинин) и донорами NO (SNAP - S-nitroso-N-acetylpenicillamine) [228]. Другими мощными активаторами NO являются NO-синтазы (iNOS и eNOS) [227]. Эритропоэтин является классическим препаратом, способным индуцировать eNOS и, тем самым, активировать митохондриальный биогенез. Так, у нокаутных eNOS^{-/-} мышей было показано снижение количества митохондрий в скелетных мышцах [228]. iNOS активируется провоспалительными цитокинами, в то время как у iNOS^{-/-} мышей наблюдаются нарушения в транскрипции мтДНК [251].

1.3.2. Регуляция PGC-1 α на посттрансляционном уровне

Посттрансляционные модификации PGC-1 α крайне важны для регуляции митохондриального биогенеза и всего митохондриального метаболизма. К числу модификаций относят фосфорилирование, ацетилирование, метилирование, ацетилглюкозаиминирование и убиквитинирование (рис. 3) [134]. Наиболее изучено фосфорилирование PGC-1 α . AMPK фосфорилирует PGC-1 α по треонину-177 и серину-538, что увеличивает активность PGC-1 α как транскрипционного фактора [48]. В ответ на действие цитокинов p38 MAPK фосфорилирует и активирует PGC-1 α по треонину-262, серину-265 и треонину-298 [96]. Фосфорилирование PGC-1 α с помощью p38 MAPK имеет как минимум два последствия. Во-первых, увеличивается срок жизни фермента, который в норме составляет 2 – 3 часа [181]. Во-вторых, p38 MAPK нарушает взаимодействие с корепрессором p160MBP (p160 myb binding protein), что увеличивает активность PGC-1 α как транскрипционного фактора [347].

PGC-1 α может фосфорилироваться GSK3 β (glycogen synthase kinase 3 β) по треонину-295, что приводит к ингибированию фермента и способствует его протеосомальной деградации [111]. Ингибирующее фосфорилирование PGC-1 α осуществляет Akt по серину-570 [41]. У PGC-1 α существует альтернативный вариант сплайсинга, называемый NT-PGC-1 α , у которого

Все члены семейства сиртуинов, в том числе и Sirt1, используют в качестве кофактора окисленный NAD^+ . Таким образом, изменение соотношения $NAD^+/NADH$ в сторону его окисленной формы приводит к активации Sirt1 и деацетилированию PGC-1 α [364]. Это может происходить в ответ на голодание, холод, физические упражнения и в ответ на активацию AMPK, которая увеличивает количество окисленного NAD^+ за счет активации катаболических процессов [50]. Таким образом, AMPK может модулировать экспрессию *PPARGC1A*, активировать PGC-1 α за счет прямого фосфорилирования и деацетилировать его за счет модуляции активности Sirt1. Если PGC-1 α по праву называют «мастером регуляции митохондриального биогенеза», то AMPK можно назвать «мастером регуляции PGC-1 α ».

PGC-1 α может метилироваться PRMT1 (arginine methyltransferase 1) по аргинину-665, -667, -669, что значительно увеличивает активность PGC-1 α [34]. Кроме того, PGC-1 α является таргетом для OGT (*O*-linked *N*-acetylglucosamine (O-GlcNAc) transferase), который переносит O-GlcNAc-группу на серин-333, что увеличивает активность PGC-1 α [25].

PGC-1 α может подвергаться убиквитинированию и протеосомальной деградации, чему способствует фосфорилирование за счет GSK3 β . После этого E3 убиквитинлигаза SCF^{Cdc4} (Skp1/Cullin/F-box-cell division control 4) подвергает PGC-1 α протеолизу [111]. Интересно, что для этого процесса также требуется фосфорилирование, осуществляемое p38 MAPK. Но в то же время p38 MAPK способствует активации транскрипционной активности PGC-1 α [96]. Таким образом, p38 MAPK одновременно может и активировать PGC-1 α , и участвовать в его протеосомальной деградации. По этой причине роль p38 MAPK в регуляции активности PGC-1 α требует дальнейшего изучения и уточнения.

1.4. Регуляция митохондриального биогенеза через Nrf2/ARE-сигнальный каскад

1.4.1. Основные характеристики Nrf2/ARE

ARE (antioxidant response element) – элементы промоторов, были открыты при исследовании антиоксидантных свойств полифенольных соединений. Регуляторным цис-активирующим элементом ARE в составе промоторных участков генов является последовательность нуклеотидов 5'-A(G)TGAC(T)nnnGCA(G)-3' [388]. В большинстве случаев данную последовательность содержат гены, кодирующие белки с цитопротекторными свойствами, например, антиоксидантные ферменты, белки II фазы детоксикации ксенобиотиков и противовоспалительные ферменты, а также метаболические ферменты и регуляторы, участвующие в поддержании редокс-гомеостаза [105].

На данный момент известно шесть представителей белков семейства NF-E2 (nuclear factor erythroid-derived): p45, Nrf1, Nrf2, Nrf3, Bach1 и Bach2 [11]. Среди них наиболее детально изучен и описан Nrf2 (NF-E2 p45-related factor 2), кодируемый геном *NFE2L2*. В связи с тем, что существует еще один NRF2 (Nuclear respiratory factor 2), их часто путают между собой. К сожалению, можно привести несколько примеров статей в журналах, цитируемых в международных базах данных, где авторами были использованы неправильные аббревиатуры в отношении NRF2 [27; 393]. Во избежание дальнейшей путаницы в отношении белка NF-E2 p45-related factor 2 нами будет использована аббревиатура Nrf2 (заглавная первая буква, остальные строчные). В отношении белка Nuclear respiratory factor 2 будет использовано обозначение NRF2 (все буквы заглавные).

Nrf2 является короткоживущим белком (около 15 минут), который при отсутствии активирующих факторов подвергается убиквитинированию и протеосомальной деградации. На данный момент известно три убиквитинлигазные системы, которые обеспечивают деградацию Nrf2. Первым был описан Keap1 (Kelch-like ECH-associated protein 1). Keap1

функционирует как адаптерный белок, который опосредует взаимодействие Nrf2 с E3 убиквитинлигазным комплексом Cul3 (Cullin 3), и с Rbx1 (RING-box protein 1), который необходим для взаимодействия Nrf2 с убиквитинлигазной системой [19].

Другим негативным регулятором Nrf2 является GSK3 β , который способен фосфорилировать белок по серину и треонину, что помогает Nrf2 распознаваться SCF/ β -TrCP (SCF – аббревиатура, образована от первых букв субъединиц комплекса: Skp1, Cul1, F-box; β -TrCP – β -transducin repeat containing protein). Комплекс, образованный SCF/ β -TrCP, связывается с Cul1 (Cullin 1), что ведет к образованию убиквитинлигазного комплекса и последующей Keap1-независимой деградации Nrf2 [336]. Недавно был описан третий способ негативной регуляции Nrf2 за счет E3 убиквитинлигазы HRD1, которая при стрессе в эндоплазматическом ретикулуме подвергает деградации неправильно свернутые белки после их транспорта в цитоплазму [167].

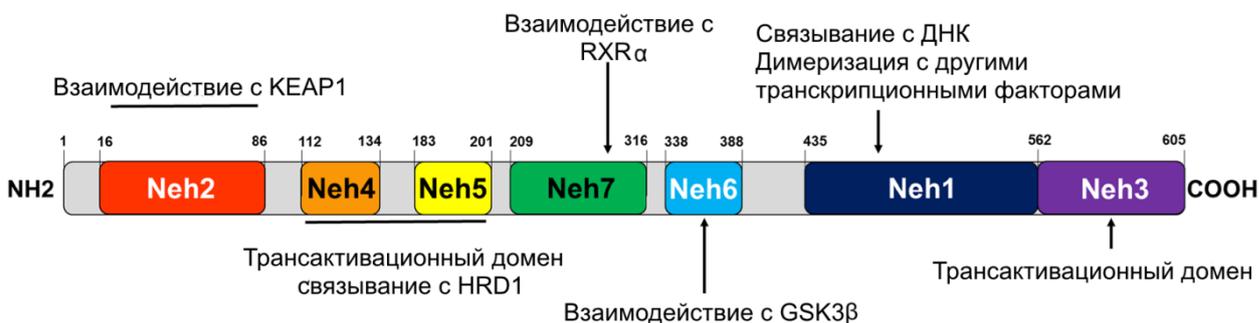


Рис. 4. Структура Nrf2 [57]

Nrf2 имеет в своем составе семь Neh (NRF2-ECH) доменов (рис. 4). Neh1 домен необходим для формирования гетеродимера с малыми MAF (musculoaponeurotic fibrosarcoma) и опосредует взаимодействие с ARE последовательностью таргетных генов [182]. Keap1 связывается с N-терминальным Neh2 доменом. Таким образом, Neh2 можно считать доменом, ответственным за цитоплазматическую локализацию Nrf2 [272]. С-терминальный Neh3 домен, а также тандемные Neh4 и Neh5 обеспечивают трансактивирующее действие Nrf2 за счет связывания с

гистонацетилтрансферазами [165]. Кроме того, Neh4 и Neh5 обеспечивают взаимодействие с HRD1 [167]. Nrf2 фосфорилируется GSK3 β по Neh6 домену [255]. Neh7 домен ответственен за связывание с RXR α (Retinoid X receptor α), который также может выступать как негативный регулятор Nrf2 [327].

Есть несколько вариантов взаимодействия Nrf2 с ARE-последовательностями в клеточном ядре. Наиболее каноническим способом активации является взаимодействие Nrf2 с bZip (basic-leucine zipper) транскрипционными факторами (чаще всего малыми MAF) и коактиватором CBP, который обладает гистонацетилтрансферазной активностью, что приводит к изменениям структуры хроматина. Это обеспечивает релаксацию ARE-содержащего промотора и облегчает связывания с РНК-полимеразой. Таким образом регулируется экспрессия большей части Nrf2-таргетных генов. Помимо этого, были описаны случаи взаимодействия Nrf2 с c-Jun, JunD и ATF3. Подобным образом регулируется экспрессия генов *NQO1,2* (NAD(P)H quinone dehydrogenase 1 и 2), *GSTya* (glutathione S-transferase cluster), *HO-1* (heme oxygenase 1) [31; 199; 250].

Индукторы Nrf2 хорошо изучены, описаны и классифицированы (табл. 1). Это природные хиноны (флавоноиды, ресвератрол, куркумин), синтетические хиноны (трет-бутилгидрохинон, третбутилгидроксианизол, пробукол), эндогенные хиноны (эстрадиол и его метаболиты, дофамин); дифенолы, фенилендиамины; акцепторы Михаэля (кротоновый альдегид); изотиоцианаты (сульфорафан), тиокарбоматы; 1,2-дителиол-3-тионы, оксатиолокисиды, алкенполисульфиды; гидропероксиды; соединения трехвалентного мышьяка; ионы тяжелых металлов (Cd, Co, Cu, Au, Hg, Pb); каротиноиды, терпеноиды и родственные им соединения; селенсодержащие соединения (особенно диселениды и селенолы) [19; 105]. Также к мощным активаторам Nrf2 относят АФК и химические соединения, которые способствуют их продукции [294].

Таблица 1. Начало. Наиболее распространенные активаторы Nrf2

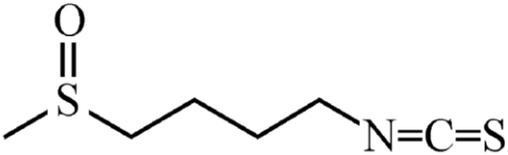
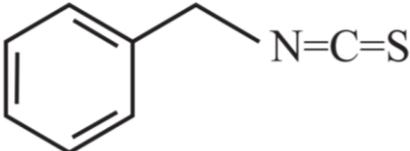
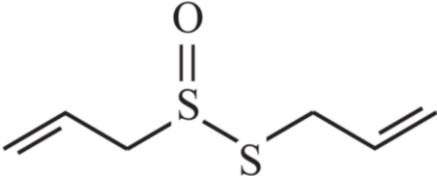
Название вещества	Химическая структура вещества	Природный источник
Сульфорафан (1-изотиоцианато-4-метилсульфинилбутан)		Овощи семейства крестоцветных (брюссельская капуста, брокколи, хрен...)
Бензилизотиоцианат		Овощи семейства крестоцветных (брюссельская капуста, брокколи, хрен...)
Аллилизотиоцианат (3-изотиоцианато-1-пропен)		Семена черной горчицы
Аллицин (2-пропен-1-сульфинотиевой кислоты S-2-пропениловый эфир)		Чеснок
Диаллилсульфид (DAS)		Чеснок, лук
Диаллилдисульфид (DADS)		Чеснок, лук

Таблица 1. Продолжение. Наиболее распространенные активаторы Nrf2

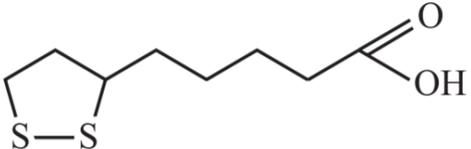
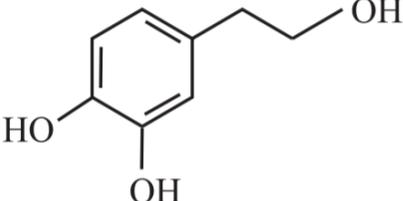
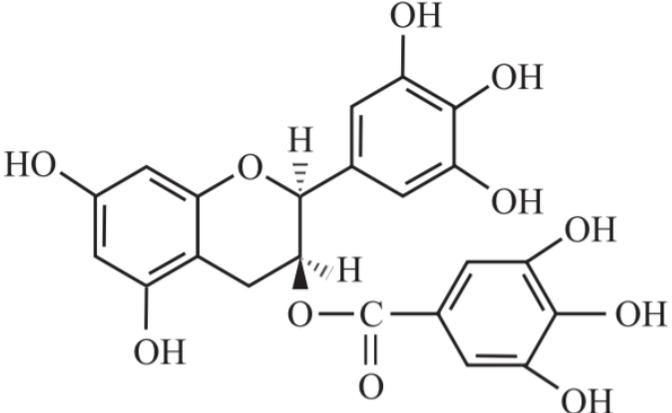
Диаллилтрисульфид (DATS)		Чеснок, лук
α-Липоевая кислота (1,2-дителиолан-3-пентановая кислота)		Брокколи, шпинат, томаты
Гидрокситирозол (4-(2-гидроксиэтил)-бензол1,2-диол)		Оливки, оливковое масло
Эпигаллокатехин-3-галлат ([(2 <i>R</i> ,3 <i>R</i>)-5,7-дигидрокси-2-(3,4,5-тригидроксифенил)-хроман-3-ил] 3,4,5-тригидроксибензоат)		Зеленый чай

Таблица 1. Продолжение. Наиболее распространенные активаторы Nrf2

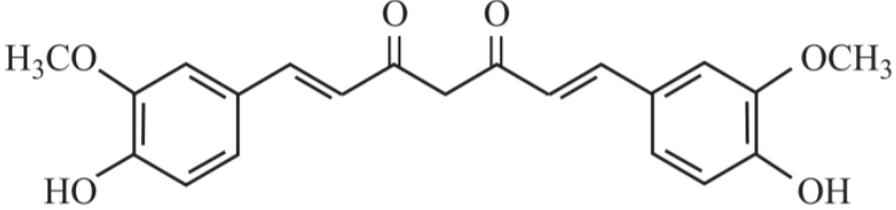
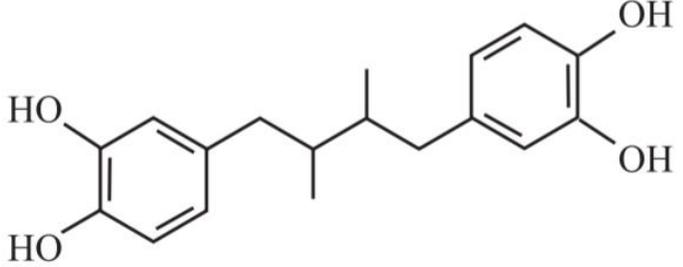
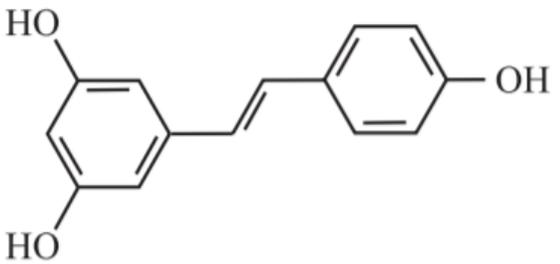
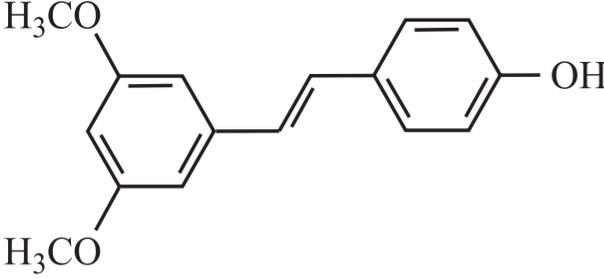
<p>Куркумин (1,7-бис-(4-гидрокси3-метоксифенил)-1,6-гептадиен-3,5-дион)</p>		<p>Куркума</p>
<p>Нордигидрогваяретовая кислота (4,4'-(2,3-диметилбутан-1,4-диил)дифенил-1,2-диол)</p>		<p>Креозотовый куст</p>
<p>Ресвератрол (5-[(E)-2-(4-гидроксифенил)-этенил]-1,3-бензол-диол)</p>		<p>Виноград, виноградные вина, арахис, ревень</p>
<p>Птеростильбен</p>		<p>Черника, голубика, виноград,</p>

Таблица 1. Продолжение. Наиболее распространенные активаторы Nrf2

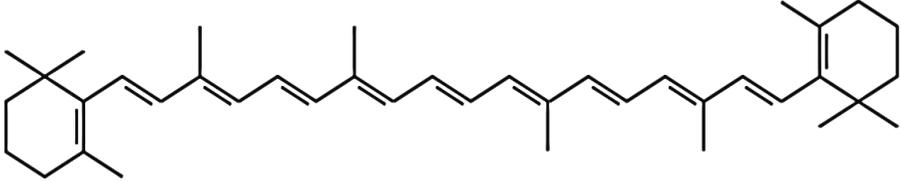
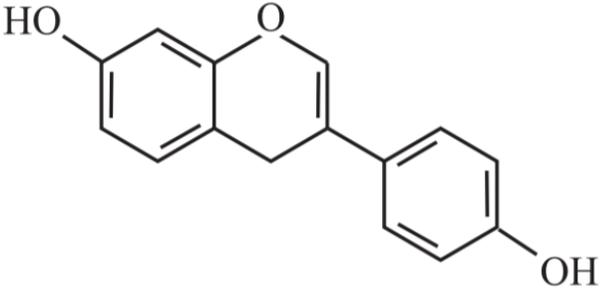
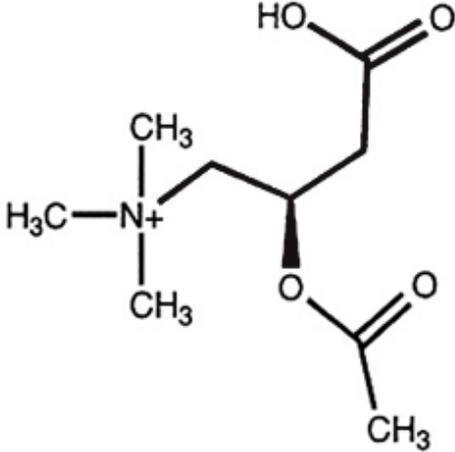
β-Каротин		Морковь, томаты, красный перец, шпинат
Эквол (3-(4-гидроксифенил)-7-хроманол)		Соя, чечевица, гранаты
Ацелил-L-карнитин		Жирная пища

Таблица 1. Продолжение. Наиболее распространенные активаторы Nrf2

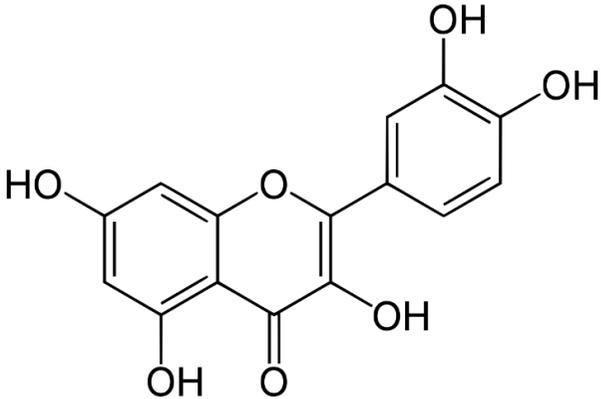
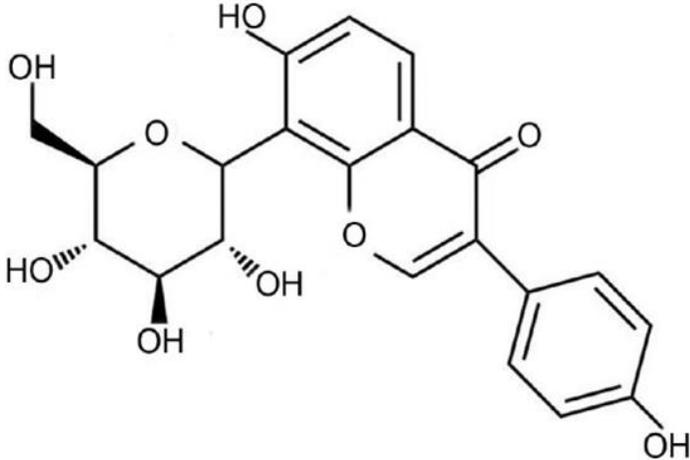
<p>Кверцетин (3,3',4',5,7 – пентагидроксифлавонон)</p>		<p>Любисток, лук, яблоки, перец, чеснок, красный виноград, чай, цитрусовые, брусника, томат, брокколи, малина, черника, клюква, красное вино, оливковое масле, желуди</p>
<p>Пуэарин 7-гидрокси-3- (4- гидроксифенил) -8 - [(3R, 4R, 5S, 6R) -3,4,5- тригидрокси-6- (гидроксиметил) оксан- 2-ил] хромен-4-он</p>		<p>Корень пуэарии</p>

Таблица 1. Продолжение. Наиболее распространенные активаторы Nrf2

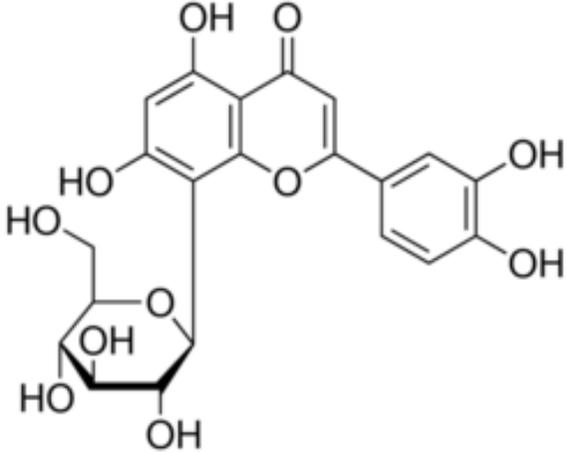
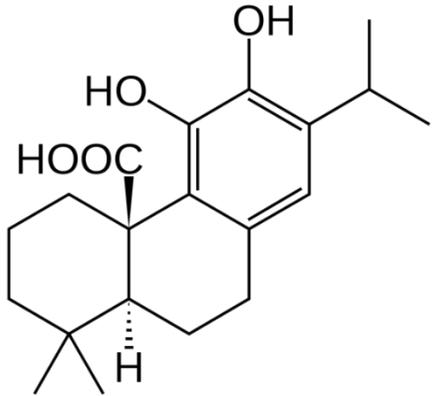
<p>Ориентин (2- (3,4-дигидроксифенил) -5,7-дигидрокси-8 - [(2S, 3R, 4R, 5S, 6R) -3,4,5-тригидрокси-6-(гидроксиметил) оксан-2-ил] хромен-4-он)</p>		<p>Пшено, гречка, асаи, страстоцвет</p>
<p>Карнозная кислота (4R, 5R, 6R) -4-гидрокси-2,3-диметокси-6-метил-5 - [(2E, 6E) -3,7,11-триметилдодека-2,6,10-триенил] циклогексен-2-ен-1-он</p>		<p>Розмарин и шалфей</p>

Таблица 1. Продолжение. Наиболее распространенные активаторы Nrf2

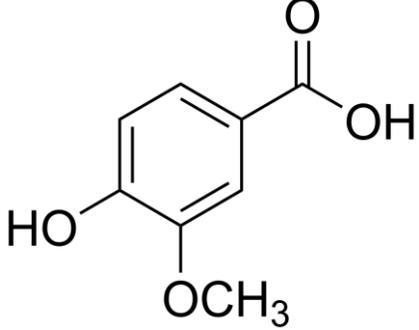
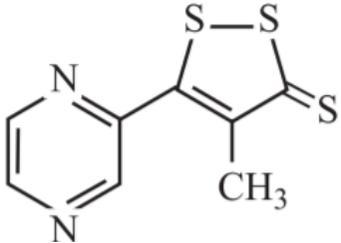
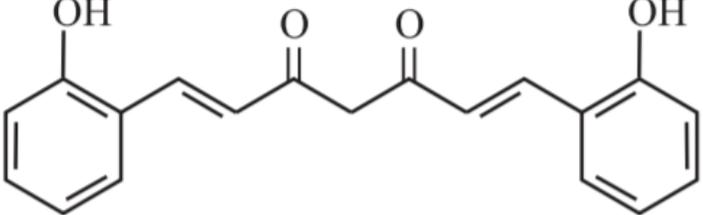
<p>Ванильная кислота 4-гидрокси-3-метоксибензойная кислота</p>		<p>Аргановое масло, виноград, красное вино</p>
<p>Синтетические активаторы Nrf2</p>		
<p>Олтипраз (5-(2-пиразинил)-4-метил-1,2-дителио3-тион)</p>		
<p>Салицилкуркуминоид (1,7-бис-(2-гидроксифенил)-1,6-гептадиен-3,5-дион)</p>		

Таблица 1. Продолжение. Наиболее распространенные активаторы Nrf2

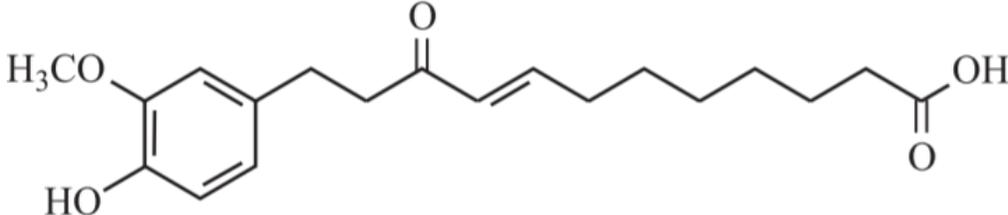
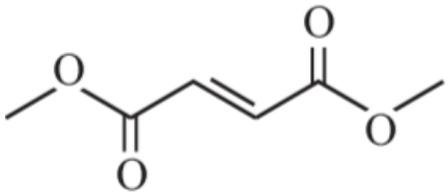
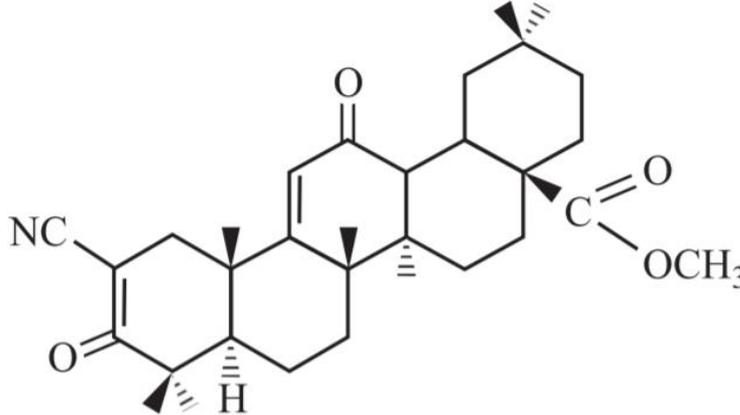
<p>Шогаол</p> <p>N + A ((E)-12-(4-гидрокси3-метоксифенил)-10-оксододек-8-еновая кислота</p>	
<p>BG-12</p> <p>(транс-бутен-2-диовой кислоты диметилловый эфир, BG00012)</p>	
<p>Бардоксолон-метил</p> <p>(метил-[2-циано3,12-диоксоолеана-1,9(11)-диен-28-оат, CDDO-Me)</p>	

Таблица 1. Продолжение. Наиболее распространенные активаторы Nrf2

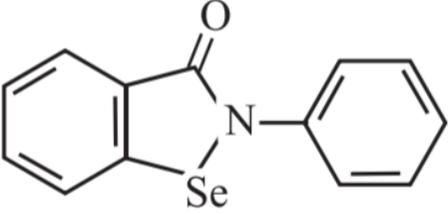
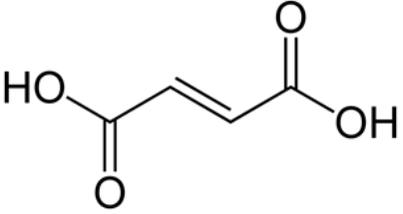
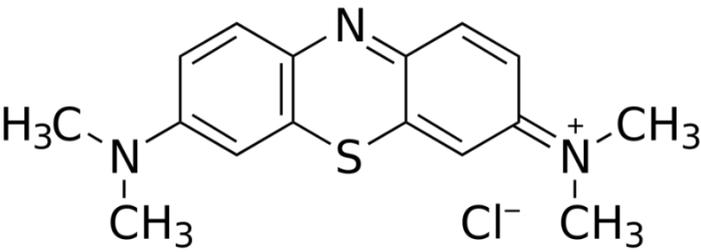
<p>Эбселен (2-фенил-1,2-бензоселеназол-3-он)</p>	
<p>Диметилфумарат (E)- Диметилбутендиоат)</p>	
<p>Метиленовый синий (N,N,N',N'-тетраметилтионина хлорид тригидрат)</p>	

Таблица 1. Продолжение. Наиболее распространенные активаторы Nrf2

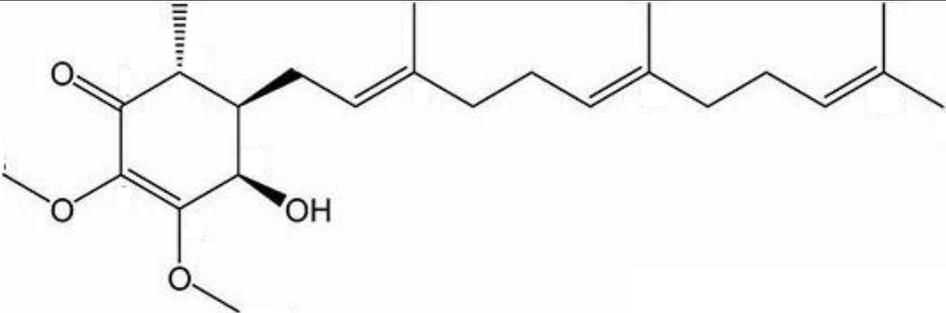
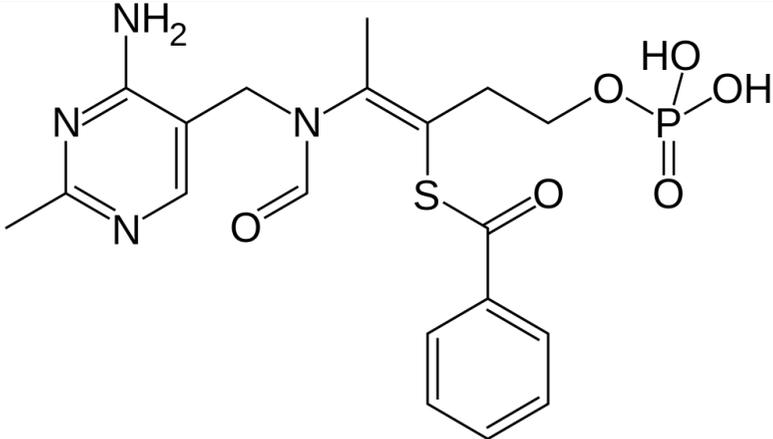
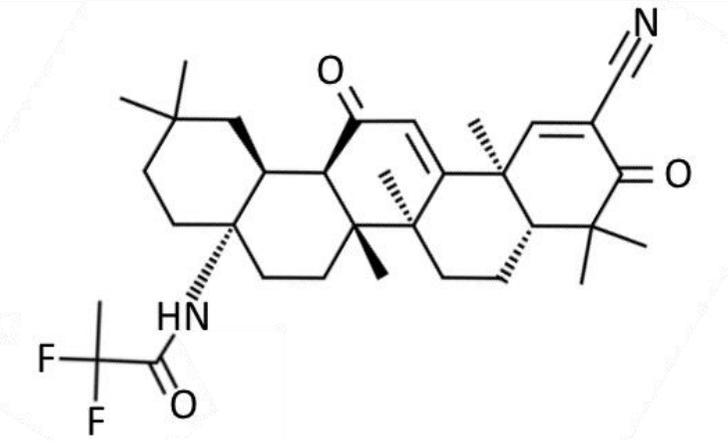
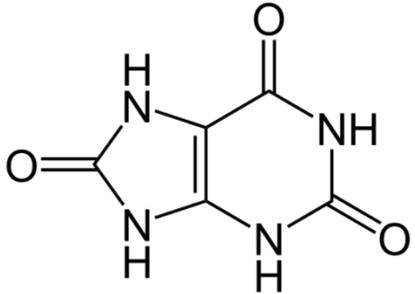
<p>Антрохинонол</p> <p>(4<i>R</i>, 5<i>R</i>, 6<i>R</i>) -4- гидрокси-2,3- диметокси-6-метил-5 - [(2<i>E</i>, 6<i>E</i>) -3,7,11- триметилдодека-2,6,10- триенил] циклогексен-2- ен-1-он</p>	 <p>The structure shows a cyclohexene ring with a ketone group at C1, a methyl group at C6, and two methoxy groups at C2 and C3. A long side chain is attached at C4, consisting of a propyl chain followed by three trans double bonds and a terminal methyl group.</p>
<p>Бенфотиамин</p> <p>S - [(2<i>Z</i>) -2 - {(4- амино-2- метилпиримидин-5-ил) метил} (формил) амино} -5- (фосфоноокси) пент-2- ен-3-ил] бензолкарботиоат</p>	 <p>The structure features a 4-amino-2-methylpyrimidin-5-ylmethyl group connected to a methylene group, which is further linked to a nitrogen atom. This nitrogen is part of a formyl group and also connected to a carbon atom that is double-bonded to a sulfur atom. The sulfur atom is bonded to a propyl chain ending in a phosphate group, and a benzoyl group (a carbonyl group attached to a benzene ring).</p>

Таблица 1 Окончание. Наиболее распространенные активаторы Nrf2

<p>Омавелоксолон (RTA 408) N - [(4<i>aS</i>, 6<i>aR</i>, 6<i>BS</i>, 8<i>aR</i>, 12<i>aS</i>, 14<i>aR</i>, 14<i>bS</i>) -11- циано-2,2,6<i>a</i>, 6<i>b</i>, 9,9,12<i>a</i>-гептаметил- 10,14-диоксо-1,3,4 5,6,7,8,8<i>a</i>, 14<i>a</i>, 14<i>b</i>- декагидропицен-4<i>a</i>-ил] -2,2- дифлюоропропанамид</p>	
<p>Урат 7,9-Дигидро-1<i>H</i>-пурин- 2,6,8(3<i>H</i>)-трион</p>	

Несмотря на их структурное разнообразие, общим является их электрофильность и способность окислять дисульфидные связи Keap1 между цистеином-273 и цистеином-288. Это нарушает взаимодействие Keap1 с Nrf2, способствуя транслокации последнего в ядро для связывания с ARE-последовательностями таргетных генов [155].

1.4.2. Роль Nrf2/ARE-сигнального каскада в биогенезе митохондрий

Идея об участии Nrf2/ARE-сигнального каскада в биогенезе митохондрий сравнительно молодая. Она впервые была высказана только в 2008 году [159]. Толчком для развития данного направления стало открытие сразу четырех ARE-сайтов в промоторной зоне гена NRF1, с которыми связывается Nrf2. В исследованиях на кардиомиоцитах оксид углерода (CO), который образовывался как продукт HO-1, стимулировал производство H₂O₂. Накопление H₂O₂ приводило к стабилизации Keap1 и, как следствие, транслокации Nrf2 в ядро. Однако, как было сказано ранее, не только Keap1, но и GSK3 β способна ингибировать перемещение Nrf2 в ядро. CO-стимулированная продукция H₂O₂ приводила к окислению PTEN (phosphatase and tensin homolog). После окисления PTEN происходит активация Akt. Akt фосфорилирует и тем самым деактивирует GSK3 β , в результате чего Nrf2 способен перемещаться в ядро, где связывается с ARE промотором гена NRF1. NRF1 в свою очередь уже активирует TFAM, который непосредственно связан с процессами репликации мтДНК.

Таким образом, данное исследование решило два фундаментальных вопроса. Во-первых, были обнаружены ARE в промоторных зонах NRF1. Во-вторых, было показано непосредственно участие Akt в деактивации GSK3 β . Это было подтверждено на мышах с Akt^{-/-}, у которых не наблюдалось фосфорилирования GSK3 β и увеличения экспрессии *NRF1*. Хотя связь между Akt и экспрессией *NRF1* была показана этой же группой исследователей двумя годами ранее [288].

Calvert et al. (2010) получили похожие результаты при лечении сердечной недостаточности у мышей сероводородом (H_2S). H_2S подобно H_2O_2 вызывал фосфорилирование Akt, что приводило к активации Nrf2 и NRF1, в результате чего, по данным иммуноблоттинга, значительно возрастало их количество в ядре. Таким образом, Nrf2-индуцированный митохондриальный биогенез рассматривался авторами как один из терапевтических механизмов H_2S при лечении сердечной недостаточности [139].

Nrf2-зависимый митохондриальный биогенез в легких наблюдался при пневмонии, вызванной *Staphylococcus aureus*. Инокуляция *S. aureus* мышам дикого типа приводила к быстрому увеличению количества противовоспалительных цитокинов и маркеров митохондриального биогенеза, в результате чего увеличивалось количество мтДНК, и возрастала активность цитратсинтазы. Это свидетельствует об адаптивном ответе организма на стрессовый фактор. Мыши, нокаутные по Nrf2 ($Nrf2^{-/-}$), не показали никаких адаптивных ответов на заражение *S. aureus* [257].

S. aureus также вызывал незначительное увеличение экспрессии *HO-1* в печени при развитии сепсиса. При этом терапия сепсиса оксидом углерода (CO) приводила к более значительному возрастанию экспрессии *HO-1*, а также *NRF1*, *NRF2* и *TFAM*. Механизм активации этих генов также зависит от Nrf2, так как у нокаутных $Nrf2^{-/-}$ мышей увеличения экспрессии этих генов после терапии CO не было обнаружено. Более того, спустя 24 часа наблюдалось гораздо более сильное снижение количества копий мтДНК в сравнении с мышами дикого типа. О том, что механизм действия CO при терапии сепсиса также связан с Akt-зависимой активацией Nrf2, дополнительно свидетельствует снижение количества копий мтДНК при делеции Akt ($Akt^{-/-}$) [32].

Еще одно недавнее исследование на легких подтверждает участие Nrf2 в митохондриальном биогенезе. Авторы показывают, что ингибирование NADPH оксидазы 4 (Nox4) с помощью малых ядерных РНК (мяРНК) приводит к увеличению количества Nrf2 в клетках легочных фибробластов, его

транслокации в ядро, где происходит увеличение экспрессии *TFAM* и активация биогенеза митохондрий [241]. Удивительно, но при этом авторы не показали увеличения количества белка NRF1, что противоречит полученным ранее данным нескольких групп исследователей, в частности, Piantadosi et al., (2008), доказавших связь между Nrf2 и NRF1 [159].

Было показано, что гентамицин индуцирует нефротоксичность за счет снижения интенсивности митохондриального биогенеза в почках. Это сопровождалось снижением биоэнергетических характеристик дыхательных комплексов митохондрий, что совпадало со снижением количества Nrf2 в ядре клеток. Куркумин (вещество из класса полифенолов) снимал негативный эффект гентамицина, поддерживал митохондриальный биогенез, опосредуемый через Nrf2 [95]. Ранее этой же группой ученых при гентамицин-индуцированной генотоксичности был показан терапевтический эффект сульфорофана. Было показано влияние сульфорофана на Nrf2, однако, прямой связи с митохондриальным биогенезом в том исследовании продемонстрировано не было [345]. Позже Negrette-Guzman et al. (2017) показали, что 5 мкМ сульфорофана индуцирует увеличение количества митохондрий. Кроме того, через 24 часа возрастал уровень белков – маркеров митохондриального биогенеза: TFAM, ND1 и NRF1. Также активация Nrf2-зависимого биогенеза была продемонстрирована и для клеточных культур рака предстательной железы. Однако одновременно с увеличением экспрессии маркеров митохондриального биогенеза происходило снижение жизнеспособности раковых клеток. Авторы связывают это с активацией внутреннего (митохондриального) пути апоптоза, что было подтверждено увеличением количества проапоптотического белка Bax [346].

Другая группа исследователей установила, что виноградный порошок увеличивает скорость митохондриального дыхания и скорость продукции АТФ в почках крыс. Это совпадает с увеличением количества Nrf2 в ядре и возрастанием экспрессии *TFAM*. Стоит отметить, что это было характерно только для старых 21-месячных крыс, у которых были снижены все эти

показатели по сравнению с молодыми 3-месячными крысами. Это позволило сделать вывод о том, что с возрастом в почках снижается активность митохондриального метаболизма и интенсивность митохондриального биогенеза за счет снижения уровня Nrf2. И это делает Nrf2 удобным таргетом для лекарственных препаратов, направленных на возрастные изменения функции почек [293].

Было показано влияние Nrf2 на митохондриальный биогенез в глиальных клетках. Для этого использовался PNU282987, который является агонистом $\alpha 7$ -никотинового ацетилхолинового рецептора ($\alpha 7$ nAChR). В культуре первичных глиальных клеток PNU282987 увеличивал количество митохондрий: экспрессию белков цитохрома *c*, и SOD2, а также скорость митохондриального дыхания. Стоит отметить, что показано ключевое участие в митохондриальном биогенезе Nrf2, HO-1 и PGC-1 α , так как в случае различных вариантов «выключения» этих белков PNU282987 переставал оказывать влияние на содержание митохондрий в глиальных клетках [160].

Wu et al. (2016) инициировали гипертонию крысам путем инъекции низких доз липосахаридов, которые вызывали воспалительные процессы в ростральном вентролатеральном отделе мозга. Это вызывало уменьшение интенсивности транслокации Nrf2 в ядро за счет образования комплексов Keap1-Nrf2 в присутствии провоспалительных цитокинов, например, интерлейкин-1 β . Это приводило к снижению экспрессии *TFAM* и уменьшению количества мтДНК, т.е. вызывало торможение митохондриального биогенеза. При этом добавление IL-1Ra (блокатора IL-1 β) или кофермента Q₁₀ отменяло эффект провоспалительных цитокинов. Также положительный эффект на митохондриальный биогенез оказывал третбутилгидрохинон – антиоксидант, известный как активатор Nrf2 [174].

Был продемонстрирован положительный эффект Nrf2/ARE каскада при лечении черепно-мозговых травм. У мышей, получавших черепно-мозговые травмы, кверцетин вызывал транслокацию Nrf2 в ядро из цитоплазмы, что вызывало увеличение уровня малональдегида, активности

супероксиддисмутазы, концентрации цитохрома *c*. Авторы связывали это с увеличением общего содержания митохондрий, вызванного активацией Nrf2 [300]. Ацетил-L-карнитин вызывал активацию митохондриального биогенеза в условиях гипоксии. Авторы также подчеркивают решающую роль Nrf2 в увеличении количества митохондрий в гиппокампе [29].

Nrf2/ARE-сигнальный каскад участвует в адаптации скелетных мышц к физической нагрузке. Физическая нагрузка приводит к увеличению продукции АФК и NO, которые приводят к активации Nrf2 и увеличению экспрессии маркеров митохондриального биогенеза (*NRF1*, *TFAM* и ряд антиоксидантных генов) [215].

1.5. Взаимодействие Nrf2/ARE и PGC-1 α сигнальных путей

Большая часть исследователей рассматривает вопрос митохондриального биогенеза отдельно через PGC-1 α сигнальный каскад, отдельно через Nrf2/ARE-сигнальный каскад. Представляется логичным тот вариант, что эти сигнальные пути перекрываются друг с другом и имеют сложную систему взаиморегуляции. Лишь незначительное количество исследователей занималось данным вопросом.

Есть данные, доказывающие, что транслокация Nrf2 в ядро находится в жесткой зависимости от АМПК. Было показано, что АМПК может фосфорилировать Nrf2 по серину-550 и за счет фосфорилирования инактивировать GSK3 β . Эти два процесса являются ключевыми для транслокации Nrf2 в ядро [49]. Было показано, что берберин [356], ингибитор альдозоредуктазы [42], антиоксидант из черники птеростильбен [303] активируют Nrf2, и этот процесс находится под контролем АМПК. Ингибирование АМПК блокировало активацию Nrf2 [260].

Есть данные, которые показывают, что не только АМПК, но и PGC-1 α способен регулировать Nrf2. Ряд исследований говорит о том, что PGC-1 α является корегулятором ряда антиоксидантных ферментов, в т.ч. SOD2 и

GPX1 (glutathione peroxidase 1). Тогда как при выключении PGC-1 α нарушается регуляция этих ферментов [348]. Позже Aquilano et al. (2013) показал, что регуляция генов антиоксидантных ферментов с помощью PGC-1 α идет через активацию Nrf2, так как после подавления экспрессии PGC-1 α практически полностью прекращалось связывание Nrf2 с ARE-регионом гена *GCLC* (glutamate-cysteine ligase catalytic subunit) и снижалось содержание белков SOD2 и GCL [274]. Кроме того, было показано, что гетерозиготные PGC-1 α ^{+/-} мыши демонстрировали снижение экспрессии *SOD2* за счет нарушения взаимодействия Nrf2 с ARE-регионом гена *SOD2* [281]. Также есть данные, что нокаут PGC-1 α рассогласовывает Nrf2-зависимый биогенез митохондрий [160]. При этом механизм непосредственного взаимодействия между PGC-1 α и Nrf2 до недавнего времени оставался неизвестен.

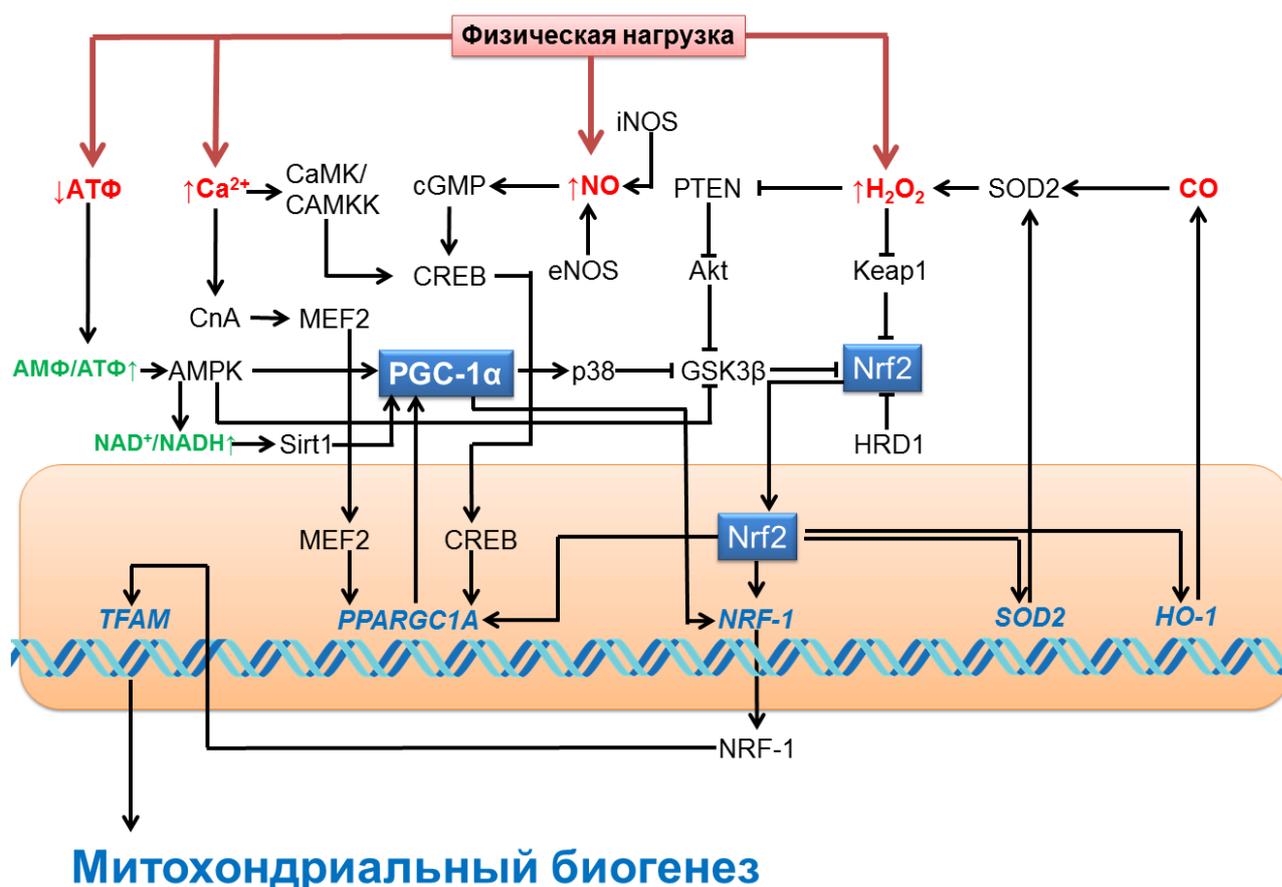


Рис. 5. Схема регуляции митохондриального биогенеза за счет Nrf2 и PGC-1 α

Choi et al (2017) показали, что причиной активации Nrf2 через PGC-1 α является инактивация GSK3 β . При этом инактивация GSK3 β осуществляется при помощи p38, который положительно регулируется при помощи PGC-1 α [284]. Таким образом, схема PGC-1 α /p38/GSK3 β /Nrf2 является наиболее вероятным вариантом взаимодействия этих двух корегуляторов транскрипции мтДНК (рис. 5).

Кроме того, весьма вероятно, что Nrf2 и PGC-1 α образуют регуляторную петлю, в том смысле, что Nrf2 может непосредственно влиять на экспрессию *PPARGC1A*. Промотор гена *PPARGC1A* содержит два ARE участка: -1723 (5'-TCTTGATGACATTGCTTCTG-3') и -226 (5'-СТGATTTGATGGAGСТАСТТ-3') [58]. Есть литературные данные, которые частично подтверждают теорию регуляторной петли Nrf2 и PGC-1 α . Выключение Nrf2 при помощи мРНК или нокаут гена Nrf2^{-/-} препятствует митохондриальному биогенезу и снижает уровень экспрессии *PPARGC1A* в гепатоцитах [82], в скелетных мышцах [256] и в легких при поражении *S. aureus* [257].

Кроме того, есть свидетельства о возможности параллельной активации двух сигнальных каскадов. Так, было показано, что метформин активирует Nrf2 без участия оси АМПК-PGC-1 α , т.к. ингибирование процесса фосфорилирования АМПК не препятствовало метформин-зависимой активации Nrf2 [324]. Хотя классически считается, что основной фармакологический эффект метформина заключается именно в активации АМПК за счет изменения соотношения АМФ/АТФ [217].

Еще одним вариантом параллельной активации Nrf2 и PGC-1 α является Erk1/2 каскад. Erk1/2 активирует как Nrf2, так и PGC-1 α через последовательное фосфорилирование LKB1, который фосфорилирует АМПК [29]. Интересно, что некоторые широко известные фармацевтические препараты, например, эритропоэтин, способны регулировать антиоксидантную защиту через ось Erk1/2/Nrf2/ARE [353]. Хотя с другой стороны, есть свидетельства о том, что эритропоэтин активирует

митохондриальный биогенез через eNOS/PGC-1 α [126] и AMPK/PGC-1 α [22]. Таким образом, эритропоэтин потенциально может активировать оба сигнальных каскада, так как фосфорилирование Akt может активировать Nrf2 за счет фосфорилирования GSK3 β [159] и непосредственно активировать eNOS [352].

Важная работа с точки зрения соотношения роли PGC-1 α и Nrf2 в митохондриальном биогенезе была выполнена Merry and Ristow (2016). Известно, что при физических нагрузках продуцируются активные формы кислорода (главным образом, H₂O₂) и азота (NO). Авторы показали, что при использовании нокауты Nrf2^{-/-} обработка клеток донорами NO и H₂O₂ не вызывает активацию митохондриального биогенеза. При этом подавление функции PGC-1 α с помощью мiРНК препятствовало NO-индуцированной активации биогенеза митохондрий, но не оказывало влияния при H₂O₂-индуцированной активации [215]. Таким образом, даже в рамках одного события, то есть физической нагрузки, различные вторичные мессенджеры (Ca²⁺, NO, H₂O₂) способны активировать митохондриальный биогенез различными механизмами (рис. 5). Была показана возможность одновременной активации Nrf2 и PGC-1 α при митохондриальном биогенезе, индуцированном физическими нагрузками [115] и ожоговой травмой [68].

1.6. Роль митохондриального биогенеза в старении

Основные постулаты теории старения изложены Harman более 60 лет назад. В основном они касаются того, что увеличение интенсивности свободно-радикальных процессов с возрастом приводит к накоплению окислительных повреждений и дегенерации тканей, то есть к их старению [153]. Однако помимо всего прочего, в стареющих тканях нарушается система обратной связи адаптивных ответов, в том числе и связанная с Nrf2. В стареющих организмах снижается способность Nrf2/ARE-каскада регулировать митохондриальный биогенез. Это было показано в почках крыс

[293]. С другой стороны, фармакологический эффект тестируемые химические соединения оказывали только у старых грызунов, что, по всей видимости, связано с тем, что у молодых организмов система адаптивных ответов не нуждается в дополнительных внешних стимулах.

Было показано, что за счет активации Nrf2-каскада геронтопротекторный эффект может оказывать эритропоэтин [353] и виноградный порошок [293]. Кроме этого еще рядом авторов было показано прямое снижение функциональности Nrf2 при старении в различных органах [36; 254].

Nrf2 был подробно изучен на низкоорганизованных организмах. Белок SKN-1 (Skinhead-1) является ортологом Nrf2 у нематоды *Caenorhabditis elegans*, которая является наиболее широко используемым объектом для изучения вопроса регуляции продолжительности жизни. Было показано, что SKN-1 также способен активироваться различными внешними стимулами, в том числе и окислительным стрессом. SKN-1 запускает сигнальный каскад, регулирующий митохондриальный биогенез и процесс аутофагии, что приводит к обновлению состава митохондрий и нормализации метаболизма [276]. В совокупности с нормализацией антиоксидантного статуса митохондрий слаженная регуляция митохондриального биогенеза и аутофагии может обеспечивать увеличение продолжительности жизни *C. elegans*. Было показано, что у *C. elegans* через SKN-1 увеличивал продолжительность жизни гидралазин [169], томатидин [372], ресвератрол и его производные [362], пирролохинолин [23] витамин D3 [385], катальпол [74], D-β-гидроксibuтират [97], экстракты чеснока: S-аллилцистеин, S-аллилмеркаптоцестеин [245] и диалилтрисульфид [358]. Также активировал SKN-1 мягкий окислительный стресс, индуцируемый низкими дозами арсенита [234].

Lin et al. (2005) сообщал, что для низших организмов, таких как черви (*C. elegans*), мухи (*Drosophila melanogaster*) и дрожжи (*Saccharomyces cerevisiae*), не существует структурного и функционального гомолога PGC-1α

[195]. Правда, позже был открыт dPGC-1/Spargel – структурный гомолог PGC-1 α у *D. melanogaster* [164]. Позже была неоднократно показана необходимость dPGC-1 для митохондриального биогенеза у *D. melanogaster* [121; 319; 355]. Было показано, что dPGC-1-зависимый митохондриальный биогенез связан с увеличенной продолжительностью жизни *D. melanogaster* мутантной линии Indy (I'm Not Dead Yet) [321]. Было показано, что мельдоний за счет положительной регуляции dPGC-1 способен увеличивать продолжительность жизни у линии мух, являющейся моделью болезни Хантингтона [213]. «Выключение» гена dPGC-1 способствует проявлению некоторых симптомов паркинсонизмов у мух [142; 216].

В отдельных случаях супрессия митохондриального биогенеза может увеличивать продолжительность жизни. Это было показано для личинок совки хлопковой (*Helicoverpa armigera*). Снижение интенсивности митохондриального биогенеза приводит к переходу организма в состояние диапаузы, которая характеризуется крайне низким уровнем метаболизма, что способствует значительному увеличению продолжительности жизни [163]. Правда стоит отметить, что данное утверждение может быть справедливо только для животных, способных к диапаузе, поэтому рассматривать супрессию митохондриального биогенеза как возможную стратегию геронтопротекции для человека нельзя.

Для насекомых на данный момент нет исследований, обсуждающих связь Nrf2 и митохондриального биогенеза. Между тем, есть данные, показывающие, что ингибирование негативных регуляторов Nrf2 - GSK-3 β [198] и Keap1 [349] приводит к увеличению продолжительности жизни.

1.7. Роль митохондриального биогенеза в нейродегенеративных заболеваниях

Нейродегенеративные заболевания (НДЗ) – гетерогенная группа заболеваний, которые характеризуются постепенным угнетением анатомических и физиологических свойств нервной системы. Характерной

чертой для этих заболеваний является прогрессирующая гибель нервных клеток, которая ведет к различным неврологическим симптомам, главным образом, к деменциям и нарушению движений. Одним из ключевых факторов развития НДЗ является старение организма, однако часто эти заболевания возникают в среднем и молодом возрасте. Этиология большинства НДЗ крайне сложная и не всегда полностью понятна, но достоверно известно, что причинами являются нарушения в энергетическом метаболизме нейронов, окислительные повреждения и экзоцитотоксины [148]. Поэтому поддержание митохондриального гомеостаза является одним из возможных терапевтических подходов к терапии НДЗ. В связи с этим в последние годы значительно возрос интерес к регуляторам митохондриального биогенеза - PGC-1 α и Nrf2, в качестве возможных таргетов для лекарственных препаратов. В результате этого, на данный момент как минимум 3 активатора Nrf2 проходят клинические стадии испытаний для лечения разных НДЗ. По состоянию на начало 2019 года, иносин (прекурсор урата – активатора Nrf2) проходит 3 стадию клинических исследований для лечения болезни Паркинсона (номер клинического исследования - NCT02642393). Диметилфумарат находится на 4 стадии клинического исследования для лечения рассеянного склероза (NCT02461069). Вещество RTA 408 находится на 2 стадии клинического исследования для лечения атаксии Фридрейха – тяжелого аутосомно-рецессивного заболевания, характеризующегося дегенеративным повреждением нервной системы (NCT02255435). Метиленовый синий проходит клинические исследования для лечения болезни Альцгеймера (NCT03446001), хронических нейропатических болей (NCT02303886), когнитивных дисфункций при биполярном расстройстве (NCT00214877).

1.7.1. Болезнь Паркинсона

Болезнь Паркинсона - это медленно прогрессирующее хроническое нейродегенеративное заболевание, которое характерно для лиц старшей возрастной группы. Характерными симптомами заболевания являются тремор, мышечная ригидность, гипокинезия, поструральная неустойчивость. При болезни Паркинсона поражаются главным образом структуры экстрапирамидной системы. Наиболее глубокая дегенерация характерна для передних отделов *substantia nigra pars compacta*. Симптомы, которые характерны для болезни Паркинсона, наблюдаются при гибели 60 – 80 % дофаминергических нейронов *substantia nigra* [190].

Причина возникновения данного заболевания комплексная и находится на стыке генетической и средовой компоненты. Наследственная форма болезни Паркинсона связана с мутациями генов непосредственно митохондриальных ферментов, и теми, которые прямо или косвенно связаны с функционированием митохондрий [5].

Различные токсины, воспалительные процессы оказывают воздействие на митохондрии дофаминергических нейронов, в результате чего увеличивается интенсивность производства АФК. Стратегия использования антиоксидантов для терапии была неоднократно продемонстрирована для большинства АФК-индуцируемых заболеваний, таких как рак, диабет, инфекционные болезни. Тем не менее, для НДЗ заметного терапевтического эффекта достигнуть не удалось. Несмотря на то, что есть обнадеживающие данные по эффективности некоторых растительных антиоксидантов [271] и митохондриально-направленных антиоксидантов на основе пластохинона [6], нельзя говорить о перспективности данного подхода к лечению болезни Паркинсона. На данный момент лечение, главным образом, симптоматическое и направленное на замещение естественного дофамина Левадопа, что зачастую сопряжено с рядом побочных эффектов [329].

Но кроме повышения продукции АФК в митохондриях нарушается гомеостаз кальция, повреждается мтДНК и нарушается взаимодействие между ядерным и митохондриальным геномом [264]. Это приводит к существенному сокращению количества митохондрий, что способствует развитию болезни Паркинсона [225]. Показано, что в образцах мозга пациентов с болезнью Паркинсона в сравнении со здоровыми людьми снижается уровень PGC-1 α , что совпадает со снижением количества факторов митохондриального биогенеза (TFAM, TFB1M, NRF1) и снижением экспрессии генов, которые кодируются мтДНК [369]. Уровень PGC-1 α снижался при MPP⁺ (1-methyl-4-phenylpyridinium) терапии (экспериментальная модель болезни Паркинсона) [102].

За последние 3 года появились работы, показывающие роль Nrf2 в митохондриальном биогенезе при болезни Паркинсона. При MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine)-индуцированной болезни Паркинсона диметилфумарат и монометилфумарат нарушали взаимодействие Keap1-Nrf2 путем алкилирования остатков цистеина Keap1, что приводит к транслокации Nrf2 из цитоплазмы в ядро и способствует активации митохондриального биогенеза. Это подтверждалось увеличением содержания мтДНК, экспрессии белков комплексов дыхательной цепи митохондрий, генов, участвующих в репликации и транскрипции мтДНК. Стоит отметить, что данные эффекты отсутствовали у Nrf2^{-/-}нокаутов [106]. Умеренные физические нагрузки могут активировать Nrf2 и препятствовать развитию паркинсонизмов за счет активации митохондриального биогенеза и антиоксидантной системы митохондрий. Это было показано на MPP⁺ [375] и 6-OHDA (6-hydroxydopamine) [237] моделях болезни Паркинсона.

Другим важным процессом, поддерживающим оптимальное количество митохондрий в клетке, является митохондриальная аутофагия, или митофагия. При чрезмерной активации биогенеза и замедленной митофагии в клетке накапливается большое количество митохондрий, что может приводить к избыточной продукции АФК. Усиление окислительного стресса приводит к

повреждению и мутациям в мтДНК. При отсутствии элиминации поврежденные митохондрии начинают накапливаться в клетке, что может приводить к активации апоптотических процессов. Кроме того, возможно накопления мутаций в мтДНК, что приводит к развитию различных митохондриальных заболеваний, связанных с гетероплазмией [76].

Наследственную форму болезни Паркинсона ассоциируют в первую очередь с мутациями в генах, кодирующих белки PARKIN и PINK1 (PTEN induced kinase 1), опосредующих митофагию [290]. При повреждении митохондрий происходит деполяризация внутренней мембраны, что оказывает влияние на импорт белка. В результате этого белок PINK1 не проникает через внутреннюю мембрану, где он обычно подвергается деградации. Это приводит к накоплению белка PINK1 на внешней мембране митохондрий, который активирует PARKIN. PARKIN является цитозольной E3-убиквитинлигазой. Убиквитинирование ряда белков запускает митофагию [365].

Существует прямая связь между Nrf2 и PINK1 за счет того, что Nrf2 может регулировать экспрессию *PINK1*, так как в промоторе этого гена было обнаружено 4 ARE-региона [259]. Таким образом, активация Nrf2 может напрямую регулировать митофагию. Позже было показано, что применение MitoQ и мелатонина может приводить к коактивации Nrf2 и PINK1 [199]. Есть данные, показывающие, что PARKIN может непосредственно взаимодействовать с TFAM и мтДНК, способствуя активации транскрипции митохондриального генома и поддержанию митохондриального биогенеза [280]. Было показано, что наличие одновременно мутаций G/G V380L *PARK2* (кодирующего PARKIN) и G/G rs2306604 *TFAM* существенно повышает риск развития болезни Паркинсона [278].

Другой ключевой молекулой, регулирующей митофагию, является P62/SQSTM1 (sequestosome 1). Недавно было продемонстрировано, что P62/SQSTM1 проникает в митохондрии по PINK1-независимому пути [365]. P62/SQSTM1 действует как адаптерная молекула, которая обеспечивает

взаимодействие убиквитинированных молекул непосредственно с аутофагосомой. Нокаут P62/SQSTM1 не участвует в митохондриальной транслокации PARKIN, но блокирует окончательное удаление поврежденных митохондрий [290].

Недавно было показано, что регуляция экспрессии *p62/SQSTM1* частично контролируется Nrf2 из-за присутствия ARE в его промоторной области [275]. Таким образом, соединения, которые индуцируют активность Nrf2, могут увеличивать экспрессию *p62/SQSTM1* [291]. Позже было показано, что активация Nrf2 с помощью диметилфумарата поддерживает P62/SQSTM1-зависимую митофагию и способствует терапии болезни Паркинсона [317].

Детально изучена Nrf2-зависимая антиоксидантная защита нейронов на различных моделях болезни Паркинсона [9; 42; 297]. Но вместе с тем, помимо прямой регуляции антиоксидантных ферментов Nrf2 способен оказывать косвенное влияние на антиоксидантный статус нейронов при болезни Паркинсона. В частности, это относится к транспорту аскорбата. Известно, что уровень аскорбата в комплексной терапии с леводопой улучшает клинические симптомы болезни Паркинсона [357]. Поступление аскорбата в нейроны зависит от переносчика аскорбата SVCT2 (solute carrier family 23 member 2) [154], экспрессия которого зависит от транскрипционного фактора YY1 (Yin Yang 1) [305]. Недавние исследования свидетельствуют о синергическом взаимодействии Nrf2 и YY1 [200]. Известно, что при болезни Паркинсона значительно снижается уровень урата [380]. Ранее было показано, что урат сам по себе является сильным антиоксидантом [381], который удаляет пероксинитрит и стабилизирует аскорбат [380].

Было проведено несколько работ, изучающих ассоциации мутаций в гене *NFE2L2* с болезнью Паркинсона. Для китайской популяции было обнаружено, что индивидуальные мутации с.351T>A,D117E и с.423G>T,Q141H ассоциированы с болезнью Паркинсона, более того, эти мутации приводят к снижению экспрессии Nrf2-зависимых генов [249]. Мета-анализ нескольких европейских популяций показал, что аллели,

локализованные в интронах гена *NFE2L2* (rs7557529 G>A и rs2886161 A>G), а также аллель, локализованный в промоторе гена (rs35652124 A>G), увеличивает риск раннего возникновения болезни Паркинсона в среднем более чем на один год. С другой стороны, аллель rs1806649 G>A напротив, снижает риск наступления заболевания более чем на один год [140]. В других исследованиях не было выявлено ни одного индивидуального однонуклеотидного полиморфизма, который был ассоциирован с возникновением болезни Паркинсона [67; 359]. von Otter et al. (2010) для шведской и польской популяции показал защитный гаплотип из 3 SNP (rs35652124; rs6706649; rs6721961), тогда как гаплотип из 5 SNP (rs7557529; rs2886161; rs1806649; rs2001350; rs10183914) напротив, ассоциирован с развитием болезни Паркинсона [55].

Таким образом, на данный момент симптоматическое лечение остается единственным способом терапии болезни Паркинсона. Некогда перспективные антиоксиданты не оправдали ожиданий, так как способны только удалять АФК, но не препятствовать дегенерации дофаминергических нейронов. Исследования последних нескольких лет показывают, что Nrf2 является оптимальным таргетом для лекарственных препаратов, которые могли бы поддерживать стабильность митохондрий, что в совокупности с антиоксидантной защитой может значительно замедлить патогенез болезни Паркинсона.

1.7.2. Болезнь Альцгеймера

Болезнь Альцгеймера является наиболее распространенной формой деменции, которая проявляется в нарушениях памяти, нарушениях речи, психологических изменениях тяжелого социального характера [18]. Болезнь Альцгеймера поражает около 6% населения в возрасте старше 65 лет и является наиболее распространенной в мире НДЗ [69]. Основной причиной заболевания считается таупатия (гиперфосфорилирование Тау-белка с

образованием нейрофибриллярных клубков) [72] и накопление бета-амилоидных бляшек (A β) [13]. A β образуется после расщепления APP (amyloid- β precursor protein) ферментами BACE1 (β site APP cleaving enzyme 1) и γ -секретаза [3; 46; 367]. Эти процессы сопровождаются обширным окислительным стрессом и нейровоспалением [57].

Потенциальная связь между болезнью Альцгеймера и митохондриями была установлена еще в 1990-х годах, когда было обнаружено значительное снижение активности COX в тромбоцитах [279] и головном мозге [64] пациентов с данным заболеванием. В дальнейшем ряд работ показал взаимосвязь между дисфункцией COX и проявлением токсичности A β , так как A β локализуется вместе с митохондриями [28]. Кроме того, при болезни Альцгеймера в нейронах наблюдаются морфологические изменения структуры митохондрий [59]. Снижение уровня COX может объясняться снижением интенсивности митохондриального биогенеза. Было показано, что у пациентов с болезнью Альцгеймера снижается уровень белка PGC-1 α и других маркеров митохондриального биогенеза [173; 282]. При этом уровень PGC-1 α коррелирует с уровнем A β , и восстановление экспрессии *PPARGC1A* в клеточных культурах ослабляло интенсивность амилоидогенеза, индуцированного гипергликемией [282].

Нарушения в функционировании Nrf2 являются одним из факторов возникновения болезни Альцгеймера. В мозге у пациентов с болезнью Альцгеймера и в животных моделях данного заболевания наблюдается снижение функциональной активности Nrf2, что проявляется в снижении экспрессии таргетных генов [180]. Данные иммуногистохимического анализа выявляли, что у пациентов с болезнью Альцгеймера в гиппокампе Nrf2 в основном локализуется в цитоплазме, в то время как у здоровых людей наблюдается примерно одинаковое количество Nrf2 в ядре и цитоплазме [130]. Парадоксально, но ряд работ показывает увеличение экспрессии ряда таргетных для Nrf2 генов в различных отделах мозга [188; 240; 307; 313]. Вероятно, это объясняется использованием в исследованиях различных

отделов мозга и различных стадий заболевания [184]. Микрочиповый анализ выявил снижение экспрессии 31 гена, которые содержат в промоторе ARE-последовательности. Но при этом во всех образцах экспрессия *NFE2L2* оказалась увеличена [299].

Тем не менее, исследователи сходятся во мнении, что Nrf2 играет защитную роль при болезни Альцгеймера. Трансгенные APP/PS1 мыши несут мутантный ген APP, что ассоциировано с повышением уровня A β . Доставка человеческого гена *NFE2L2* с помощью вектора в гиппокамп мыши приводила к снижению уровня токсичного A β и улучшала когнитивные параметры мышей [262]. Дефицит Nrf2 увеличивал степень тяжести когнитивных нарушений у APP/PS1 мышей за счет нарушения p62-регулируемой аутофагии [176]. Снижению уровня A β и улучшению когнитивных параметров грызунов способствовали такие активаторы Nrf2, как пуэарин [304], CDDO-MA [377], ориентин [265], антрохинонол [78], NaHS [170], карнозная кислота [366], ванильная кислота [47], полисахариды из *Amanita caesarea* [301] и CART (The cocaine- and amphetamine-regulated transcript) [71].

Другим таргетом для активаторов Nrf2 является тауопатия. В нормальных условиях Тау-белок стабилизирует микротрубочки и способствует внутреннему трафику клеточных компонентов. При болезни Альцгеймера нарушается функция Тау-белка, что приводит к его гиперфосфорилированию и последующей агрегации [197]. Это приводит к разрушению цитоскелета и образованию нейрофибриллярных клубков [86]. Nrf2-индуцированная аутофагия снижает степень фосфорилированности Тау-белка за счет индукции экспрессии адапторного белка NDP52 (nuclear dot protein 52 kDa), содержащего ARE. NDP52 способствует деградации гиперфосфорилированного Тау за счет аутофагии [258]. Было показано, что в мышинной модели болезни Альцгеймера (мутанты TAU p301) индукция экспрессии CX3CL1 (C-X3-C motif chemokine ligand 1) приводит к активации Akt, которая ингибирует GSK3 β . Это инициирует транслокацию Nrf2 в ядро, что защищает микроглию от таупатии и деградации [137]. Эффект Nrf2-

зависимого снижения уровня гиперфосфорилированного Tau был показан для таких веществ, как бенфотиамин [60], диметилфумарат [93]. Для метиленового синего [56; 392], аллицина [43] и Mini-GAGR (продукт расщепления низкоацилированной геллановой камеди) [223] была показана возможность одновременного снижения уровня A β и гиперфосфорилированного Tau-белка.

Таким образом, на уровне доклинических исследований активаторы Nrf2 доказали свою эффективность. Поэтому существует вероятность, что в ближайшее десятилетие появится эффективное лекарство, замедляющее патогенез болезни Альцгеймера. Наиболее перспективным соединением в данном отношении является метиленовый синий, уже проходящий клиническую стадию исследования, и диметилфумарат, который уже одобрен для использования в медицине [376].

1.7.3. Другие нейродегенеративные заболевания

Nrf2 является перспективным таргетом для лечения болезни Хантингтона [185]. Это генетическое заболевание нервной системы, которое вызывается дупликацией кодона CAG в гене *HTT* (Huntingtin). Болезнь прогрессирует в возрасте 30-50 лет и характеризуется прогрессирующим хореическим гиперкинезом и психическими расстройствами. Нейроморфологическая картина заболеваний характеризуется атрофией стриатума, а на поздней стадии также атрофией коры головного мозга, что вызывается окислительным стрессом, индуцированным митохондриальными дисфункциями. Они вызывают серьезные дефекты в структуре комплексов ЭТЦ [229]. Ингибиторы II комплекса (3-нитропропионовая кислота и малонат) вызывают повреждения его структуры и формируют симптомы, наблюдаемые при болезни Хантингтона. Мыши, дефицитные по Nrf2, более чувствительны к ингибиторам II комплекса [298], в то время как сверхэкспрессия Nrf2 напротив, защищала нейроны от токсичности малоната [298]. Синтетические тритерпиноиды, активирующие Nrf2, показали защиту от токсичности,

вызванной 3-нитропропионовой кислотой [378]. Диметилфумарат также способствовал защите нейронов в стриатуме и коре больших полушарий в некоторых моделях мышей, имитирующих болезнь Хантингтона [119].

Активация Nrf2 может являться фактором для терапии бокового амиотрофического склероза. Это медленно прогрессирующая болезнь центральной нервной системы, при которой происходит поражение как верхних, так и нижних двигательных нейронов, что приводит к параличам и последующей атрофии мышц. Это сопровождается окислительными повреждениями нейронов, воспалением и митохондриальными дисфункциями. Причины спорадических случаев бокового амиотрофического склероза не до конца установлены, но известно, что наиболее вероятной причиной возникновения наследственной формы заболевания является мутация в гене *SOD1*. Оверэкспрессия мутантного человеческого *SOD1* в моделях грызунов вызывает фенотип, схожий с фенотипом пациентов с боковым амиотрофическим склерозом [136]. В этих моделях было показано снижение уровня экспрессии гена *NFE2L2* и собственно уровня белка Nrf2 [236; 261]. Активация Nrf2 защищала нейроны от окислительных повреждений и дегенеративных процессов [253].

Диметилфумарат, активирующий Nrf2, сейчас находится в завершающей стадии клинических исследований для лечения рассеянного склероза [360]. Это хроническое аутоиммунное заболевание, при котором происходит разрушение миелиновых оболочек белого головного и спинного мозга. Это одно из немногих нейродегенеративных заболеваний, которое проявляется в молодом возрасте (около 30 лет) [244].

Индукция антиоксидантной защиты с помощью активации Nrf2 веществом омавелоксолон (RTA 408) является перспективным направлением в терапии атаксии Фридрейха [87]. Атаксия Фридрейха – тяжелое аутосомно-рецессивное заболевание, причиной которого является мутация в гене *FXN* (Frataxin), кодирующем белок, играющий важную роль в функционировании митохондрий, в частности, в выведении железа из околomitохондриального

пространства. В отсутствие фратаксина избыток железа вызывает формирование большого количества АФК, что сопряжено с накоплением окислительных повреждений [277].

Таким образом, можно сделать вывод, что активация Nrf2 является наиболее перспективным направлением в области терапии НДЗ. Во-первых, это обеспечивает антиоксидантную защиту. Снижение уровня окислительного стресса может значительно улучшать клиническую картину заболеваний. Во-вторых, поддержание митохондриального гомеостаза, связанное с регуляцией количества и функциональности митохондрий, может препятствовать дегенеративным процессам в нервной ткани, значительно замедляя скорость наступления болезни. И хотя НДЗ считаются тяжелыми неизлечимыми болезнями, мы предполагаем, что замедление патогенеза является реальной задачей, решение которой позволит улучшить состояние пациентов и продлить активное долголетие и максимально отсрочить терминальную фазу заболевания.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

ГЛАВА 2. ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Объект исследования

В качестве объекта исследования использовались мыши линии C57BL6. Мыши были получены из питомника ФГБУН НЦБМТ ФМБА России (филиал «Столбовая»). Мыши содержались в стандартных условиях при температуре +25°C, двенадцатичасовом световом режиме, относительной влажности воздуха в помещении не менее 40%. Вода и стандартный лабораторный корм (Ssniff Spezialdiäten GmbH, Германия) были доступны без ограничений. В эксперименте по изучению возрастных изменений в поведении и митохондриальном биогенезе были задействованы 7-месячные (n=8) и 15-месячные мыши (n=8). Выращивание, содержание, проведение инъекций и умерщвление животных осуществлялось согласно правилам, установленным Комитетом по уходу и использованию животных Воронежского государственного университета, которые соответствуют директиве, установленной Европейским Союзом 2010/63/EU в отношении экспериментов с использованием животных.

Мышь умерщвлялась путем дислокации шейных позвонков и последующей декапитации. Для экспериментов использовались ткани среднего и переднего мозга. В отдельных случаях использовалась печень. Диссекция мозга проводилась по схеме, представленной на рис. 6. После вскрытия черепной коробки мозг извлекался наружу. Первый поперечный разрез проводился для удаления обонятельных луковиц (*Bulbus Olfactorius*). Второй поперечный разрез удалял мозжечок (*Cerebellum*) и мозговой ствол, включающий продолговатый мозг (*Medulla Oblongata*) и мост (*Pons*). Далее проводился сагиттальный разрез и из обеих половин мозга отдельно извлекались средний мозг (*Mesencephalon*) вместе с черной субстанцией (*Substantia Nigra*) и кора больших полушарий (*Cortex Cerebri*).

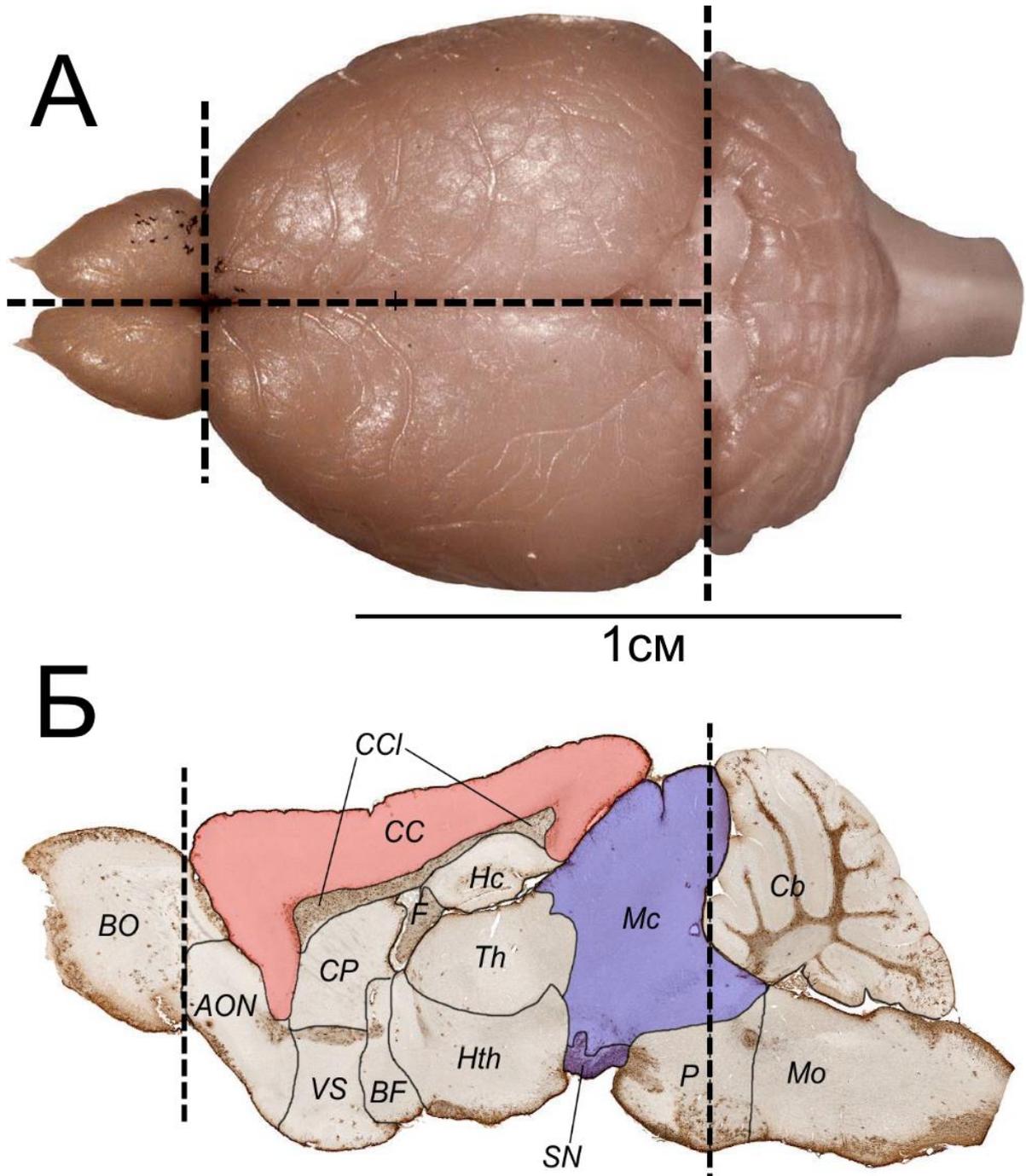


Рис. 6. Схема диссекции мозга. А. Вид мозга мыши сверху. Б. Сагиттальный разрез. Используемые отделы мозга: Кора больших полушарий (CC - *Cortex Cerebri*); Средний мозг (Mc - *Mesencephalon*) с SN - *Substantia Nigra*. Неиспользуемые отделы мозга: обонятельные луковицы (BO - *Bulbus Olfactorius*); переднее обонятельное ядро (AON - *Anterior olfactory nucleus*); мозолистое тело (Ccl - *corpus callosum*); скорлупа (CP - *Caudata Putamen*); полосатое тело (VS - *Ventral Striatum*); базальный передний мозг (BF - *Basal Forebrain*); гиппокамп (Hc - *hippocampus*); таламус (Th - *Thalamus*); гипоталамус (Hth - *hypothalamus*); продолговатый мозг (MO - *Medulla Oblongata*); мост (P - *Pons*); мозжечок (Cb - *Cerebellum*).

2.1.1. Изучение влияния метиленового синего на митохондриальный биогенез мозга мыши

15-месячные опытные мыши получали метиленовый синий (МС) (Sigma-Aldrich, США) в концентрации 5 мг/кг/день (n=6) и 15 мг/кг/день (n=6) с питьевой водой в течение 60 дней. Контрольные мыши (n=6) получали чистую питьевую воду. Целевым показателем являлось увеличение скорости дыхания минимум на 15%. Данный показатель был достигнут только группой мышей, получавшей МС в концентрации 15 мг/кг/день на 14 день эксперимента. По этой причине мыши, получавшие МС в концентрации 5 мг/кг/день, не использовались для дальнейших экспериментов.

Количество потребляемого корма и воды измерялось ежедневно. Измерение скорости дыхания проводилось на 5, 14 и 50 день эксперимента. Тест «Открытое поле» проводился на 54 и 55 день. Тест «Приподнятый крестообразный лабиринт» проводился на 57 и 58 день. Тест «Струна» проводился на 58 и 59 день. После 60 дней эксперимента мыши были умерщвлены, и ткани среднего мозга и коры больших полушарий мышей были использованы для биохимических, биоэнергетических и молекулярно-генетических исследований. Схема эксперимента представлена на рисунке 7А.

Для эксперимента по изучению нейропротекторных свойств МС использовали три группы 5-месячных мышей: 1) контрольная группа, не получавшая инъекций (n=6); 2) группа, получавшая однократную внутрибрюшинную инъекцию ротенона (n=8); 3) группа, получавшая однократную внутрибрюшинную инъекцию ротенона, и предварительно получавшая с питьевой водой 15 мг/кг/день МС в течение 7 дней (n=7). Для изучения острой токсичности производилась однократная инъекция МС в концентрации 50 мг/кг. Спустя сутки мыши умерщвлялись для измерения количества повреждений мтДНК (рис. 7Б).

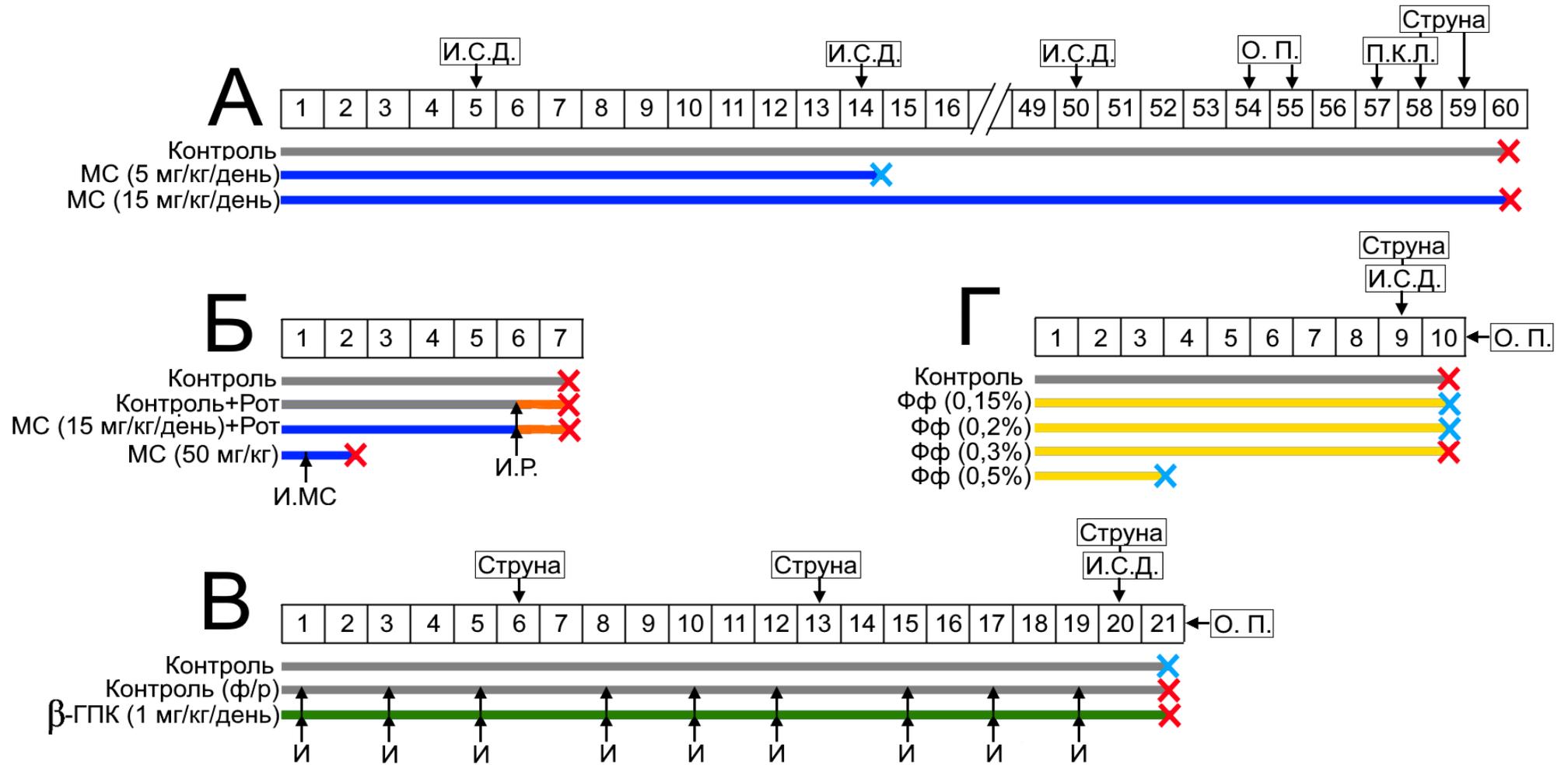


Рис. 7. Схема экспериментов. А. Схема эксперимента по изучению влияния МС на митохондриальный биогенез мышей. Б. Схема эксперимента по изучению генотоксичности МС. В. Схема эксперимента по изучению влияния β-ГПК на митохондриальный биогенез мышей. Г. Схема эксперимента по изучению влияния фенофибрата на митохондриальный биогенез мышей.

Обозначения: **X** – умерщвление экспериментальной группы мышей; **X** – окончание работ с экспериментальной группой мышей без умерщвления; И.С.Д. – Измерение скорости дыхания; О.П. – Тест «Открытое поле»; П.К.Л. – Тест «Приподнятый крестообразный лабиринт»; И – инъекции; И.Р. – Инъекции ротенона; И.МС. – Инъекции МС; ф/р – физиологический раствор.

2.1.2. Изучение влияния β -гуанидинопропионовой кислоты на митохондриальный биогенез мозга мыши

Для эксперимента использовались 15-месячные мыши, которые были разделены на три группы: мыши, не получавшие инъекции ($n=10$), получавшие инъекции физиологического раствора ($n=6$) и мыши, получавшие инъекции β -гуанидинопропионовой кислоты (β -ГПК) (Sigma-Aldrich, США) ($n=7$). Мыши получали инъекции 3 раза в неделю в течение 21 дня. Целевым показателем являлось увеличение физической силы и выносливости мышцей. Количество потребляемого корма и воды измерялось ежедневно. Измерение скорости дыхания проводилось на 20 день эксперимента. Тест «Струна» проводился на 6, 13 и 20 день эксперимента. Тест «Открытое поле» проводился на 20 день. После 3 недель эксперимента мыши были умерщвлены, и ткани среднего мозга и коры больших полушарий мышцей были использованы для биохимических, биоэнергетических и молекулярно-генетических исследований (рис. 7В). Группа мышцей, не получавшая инъекций, не была умерщвлена, так как использовалась в качестве дополнительного контроля для проверки влияния болевых ощущений от инъекций на поведенческие особенности мышцей.

2.1.3. Изучение влияния фенофибрата на митохондриальный биогенез мозга мышцей

Для эксперимента использовались 15-месячные мыши, которые были разделены на пять групп: мышцей, получавшие чистый корм и четыре группы мышцей, получавшие корм, смешанный с фенофибратом (препарат Липантил[®] - Resipharm Fontaine (Франция)) в концентрации 0,5%, 0,3%, 0,2% и 0,15 % (в каждой группе $n=6$) в течение 10 дней. Целевым показателем являлось снижение массы тела. Стабильное снижение массы тела наблюдалось при концентрации фенофибрата 0,3%. Данная экспериментальная группа

использовалась для дальнейших молекулярно-генетических и биохимических исследований. При 0,5% фенофибрата наблюдалось крайне резкое снижение массы тела спустя 3 дня после начала эксперимента. По этой причине эксперимент был прекращен. При концентрации 0,2% и 0,15% наблюдалось незначительное снижение массы тела, поэтому для дальнейших исследований данные группы не были использованы (рис. 7Г). Количество потребляемого корма и воды измерялось ежедневно. Измерение скорости дыхания и тест «Струна» проводились на 9 день эксперимента. Тест «Открытое поле» проводился на 10 день. После 10 дней эксперимента контрольная группы и группа мышей, получавшая 0,3% фенофибрата, были умерщвлены. Ткани среднего мозга и коры больших полушарий мышей были использованы для биохимических и молекулярно-генетических исследований (рис. 7Г).

2.2. Методы исследования

2.2.1. Измерение скорости дыхания

Измерение скорости дыхания осуществлялось при помощи оксиметра (Vernier, США). Мыши по очереди помещались в герметичную камеру объемом 2 л, и в течение 8 минут оценивалось количество потребляемого кислорода и выдыхаемого углекислого газа. Скорость дыхания представлена в мкмоль $O_2(CO_2)$ /мин/г массы тела. Рассчитывали значение дыхательного коэффициента как отношение скорости образования CO_2 к потреблению O_2 .

2.2.2. Тест «Струна»

Данный тест направлен на установление силы и выносливости животных. Эксперимент проводился согласно методике, описанной Cardozo-Pelaez et al. (1999) с модификациями [269]. Тестирование животных на выносливость проводилось на струне длиной 40 см, которая закреплена вертикально на высоте 50 см. Каждая мышь по очереди подвешивалась

передними лапами на центр струны. Состояние животного оценивалось в баллах через 60 сек согласно следующей схеме: 0-0,99 = мышь упала (значение присваивалось в зависимости от секунды, на которой мышь упала, например, 15 сек – 0,25 балл, 30 сек – 0,5 балла, 45 сек – 0,25 балла) 1=мышь держится за струну двумя лапами, 2=держится за струну двумя лапами и перемещается вдоль струны, 3=две передние лапы + одна или две задние лапы, 4=четыре лапы и хвост вокруг струны, 5-5,99=выход до конца струны (значение присваивалось в зависимости от секунды, на которой мышь дошла до конца струны, например, 15 сек – 5,75 балла, 30 сек – 5,5 балла, 45 сек – 5,25 балла).

2.2.3. Тест «Открытое поле»

Принципы физиологического теста «Открытое поле» были описаны еще Hall (1934) [150]. Мы использовали тест в модификации Fraser et al. (2010) [209]. Мышь помещалась в угол открытой площадки (60 x 60 см) с 5 случайно расположенными норками. Высота бортов 40 см. В течение 5 минут оценивалась горизонтальная активность, количество выходов и время, проведенное в центре, количество вертикальных стоек, заглядываний в норки, расположенных в случайном порядке, количество актов дефекации, количество и продолжительность актов груминга.

2.2.4. Тест «Приподнятый крестообразный лабиринт»

Эксперимент проводился по методике, описанной Crawley (1981) [88]. Крестообразный лабиринт содержит в себе два открытых рукава 30 x 5 см и два закрытых рукава 30 x 5 x 15 см. Животные помещались в центр лабиринта. В течение 5 минут оценивалось время пребывания в закрытых/открытых рукавах, количество вертикальных стоек, свешиваний с открытых рукавов, количество актов дефекации, количество и продолжительность актов груминга.

2.2.5. Измерение количества копий мтДНК

Выделение ДНК из всех типов тканей производилось с помощью набора diaGene для выделения ДНК (Диа-М, Россия). Количество мтДНК оценивали с помощью количественной ПЦР. Для этого производили амплификацию фрагментам мтДНК с использованием следующих праймеров:

F: 5'-ACGAGGGTCCAACTGTCTCTTA-3';

R: 5'-AGCTCCATAGGGTCTTCTCGT-3'.

В качестве референса использовался ген *Gapdh*, закодированный в ядре. Последовательности праймеров были следующими:

F: 5'-GGCTCCSTAGGCCCTCCTG-3';

R: 5'-TCCCAACTCGGCCCCCAACA-3'.

Нормализованный уровень мтДНК относительно ядерной ДНК рассчитывался по формуле $2^{(-\Delta\Delta Cq)}$.

2.2.6. Измерение экспрессии генов

Выделение РНК производилось с использованием набора ExtractRNA (Евроген, Россия) согласно прилагаемому протоколу. 500 мкг изолированной РНК использовалось для получения кДНК с помощью MMLV обратной транскриптазы (Евроген, Россия) на термоциклере Eppendorf Mastercycler personal (Eppendorf, США) согласно протоколу. Количественный ПЦР-анализ осуществлялся на термоциклере CFX96™ Real-Time System (Bio-Rad, США) с использованием набора qPCRmix-HS SYBR (Евроген, Россия). Нормализованный уровень экспрессии рассчитывался по формуле $2^{(-\Delta\Delta Cq)}$. В качестве референсов использовались гены *18s*, *Actb* и *Gapdh*. Последовательности праймеров исследуемых генов представлены в таблице 2.

Таблица 2. Последовательности праймеров, используемых для измерения экспрессии генов

Ген	Прямой праймер 5' – 3'	Обратный праймер 5' – 3'
<i>18s</i>	CGGCTACCACATCCAAGGAA	GCTGGAATTA CTGTGGCT
<i>Acadm</i>	AGGGTTTAGTTTTGAGTTGACGG	CCCCGCTTTTGT CATATTCCG
<i>Acadvl</i>	CTACTGTGCTTCAGGGACAAC	CAAAGGACTTCGATTCTGCCC
<i>Acox1</i>	ТААСТТССТСАСТСГААГССА	AGTTC CATGACCCATCTCTGCC
<i>Actb</i>	GGCTGTATTCCCCTCCATCG	CCAGTTGGTAACAATGCCATGT
<i>Cat</i>	AGCGACCAGATGAAGCAGTG	TCCGCTCTCTGTCAAAGTGTG
<i>Cox1</i>	TCGCAATTCCTACCGGTCTC	CGTGTAGGGTTGCAAGTCAGC
<i>Cpt1a</i>	CTCCGCCTGAGCCATGAAG	CACCAGTGATGATGCCATTCT
<i>Etfdh</i>	GTGCGACTAACCAAGCTGTC	GGATGAACAGTGTAGTGAGTGG
<i>Gapdh</i>	GGCTCCCTAGGCCCTCCTG	TCCCAACTCGGCCCAACA
<i>Gclc</i>	GCAGCTTTGGGTCGCAAGTAG	TGGGTCTCTTCCCAGCTCAGT
<i>Gpx1</i>	AGTCCACCGTGTATGCCTTC	GTGTCCGA ACTGATTGCACG
<i>Ho-1</i>	CACGCATATACCCGCTACCT	CCAGAGTGTT CATTCGAGCA
<i>Nfe2l2</i>	CTCTCTGAACTCCTGGACGG	GGGTCTCCGTA AATGGAAG
<i>Nrf1</i>	AGCACGGAGTGACCCAAA	TGTACGTGGCTACATGGACCT
<i>Ppara</i>	AGAGCCCCATCTGTCCTCTC	ACTGGTAGTCTGCAAAACCAAA
<i>Ppargc1a</i>	ATGTGTGCGCCTTCTTGCTCT	CACGACCTGTGTCGAGAAAA
<i>Prdx3</i>	GGTTGCTCGTCATGCAAGTG	CCACAGTATGTCTGTCAAACA
<i>Prdx5</i>	GGCTGTTCTAAGACCCACCTG	GGAGCCGAACCTTGCCTTC
<i>Sod1</i>	AACCAGTTGTGTTGTCAGGAC	CCACCATGTTTCTTAGAGTGAGG
<i>Sod2</i>	CAGACCTGCCTTACGACTATGG	CTCGGTGGCGTTGAGATTGTT
<i>Tfam</i>	ATTCCGAAGTGTTTTTCCAGCA	TCTGAAAGTTTTCGATCTGGGT

2.2.7. Выделение мтДНК

При оптимизации методики определения повреждений мтДНК использовали три способа изоляции ДНК.

1. Изоляция тотальной ДНК набором diaGene (Диа-М, Россия) согласно прилагаемому протоколу.

2. Изоляция мтДНК из замороженных тканей. 50 мг ткани гомогенизировалось в 2 мл PBS буфере (Invitrogen, США). Гомогенат центрифугировался при 13000 g в течение 1 минуты, и мтДНК изолировалась с помощью набора Plasmid Miniprep Kit (Evrogen, Россия) согласно прилагаемому протоколу.

3. Изоляция мтДНК из изолированных митохондрий. Предварительно изолированные митохондрии растворяли в лизирующем буфере из набора Plasmid Miniprep Kit (Evrogen, Россия). Дальнейшие процедуры выполнялись согласно прилагаемому протоколу

Выделенная мтДНК дополнительно очищалась с помощью магнитных шариков Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter, США). Магнитные частицы добавлялись к раствору митохондрий в соотношении 0,4X (объем/объем). Подобная концентрация обеспечивает связывание ДНК длиной около 16 т.п.н. с магнитными шариками. Отмывка от несвязавшихся компонентов (геномной ДНК других размеров или фрагментов разрушенной мтДНК) проводилась в 70% этаноле. Элюция мтДНК осуществлялась в 0,1X TE буфере.

Измерение обогащения мтДНК осуществляли с помощью количественной ПЦР по методу, описанному Quispe-Tintaya et al. (2013) [132] по стандартной формуле $2^{(-\Delta\Delta Cq)}$, где в качестве контрольного образца использовалась тотальная ДНК, выделенная с помощью набора diaGene (Диа-М, Россия).

2.2.8. Измерение количества повреждений мтДНК

Количество повреждений мтДНК оценивали с помощью ПЦР длинных фрагментов с использованием Encyclo-полимеразы (Евроген, Россия) на термоциклере CFX96™ Real-Time System (Bio-Rad, США). Для оптимизации метода мы амплифицировали ПЦР-фрагменты разной длины (295, 1326, 2069, 4546 и 9158 п.н). Для этого был использован один прямой праймер (ChrM:Пр) и серия обратных праймеров (ChrM:Обр1–5), удаленных от прямого праймера на фиксированное количество пар нуклеотидов. Условия реакции: общая

денатурация 5 мин при 95°C, далее 35 циклов 10 сек при 95°C, 30 сек при 61°C, 2–16 мин (в зависимости от длины фрагмента) при 72°C. Для определения линейности реакции (R^2) делали серию разведений ДНК (от 1 нг до 1 пг). Эффективность реакции рассчитывали по формуле (1):

$$E = 10^{(1/\text{наклон кривой})} [344] (1)$$

Последовательности праймеров приведены в таблице 3.

Таблица. 3. Последовательности праймеров, используемые при оптимизации ПЦР длинных фрагментов

ID праймера	Последовательность 5' – 3'	Границы продукта	Длина продукта
ChrM: Пр	ACGAGGGTCCAACTGTCTCTTA		
ChrM: Обр. 1	TAGGGTAACTTGGTCCGTTGAT	2078–2372	295 п.н.
ChrM: Обр. 2	CCGGCTGCGTATTCTACGTT	2078–3403	1326 п.н.
ChrM: Обр. 3	TAGTTGAGTACGATGGCCAGGA	2078–4146	2069 п.н.
ChrM: Обр. 4	GCCCAGGAAATGTTGAGGGA	2078–6623	4546 п.н.
ChrM: Обр. 5	GGCTATAAGTGGGAAGACCATT	2078–11235	9158 п.н.

После оптимизации метода и установления оптимального размера ПЦР-фрагментов (около 2 т.п.н.) были подобраны праймеры для амплификации 9 фрагментов мтДНК с целью оценки количества окислительных повреждений (табл. 4). Повреждения мтДНК инициировали за счет добавления к изолированным митохондриям 500 мкМ H_2O_2 . Значение ΔCq контрольных и опытных (поврежденных) длинных фрагментов сравнивалось с ΔCq контрольных и опытных коротких фрагментов, которые использовали в качестве референсов. Количество добавочных повреждений в мтДНК рассчитывали на 10 т.п.н. по формуле (2):

$$\text{Повреждения} = \left(1 - 2^{-(\Delta_{\text{длинный}} - \Delta_{\text{короткий}})}\right) \times \frac{10000(\text{п.н})}{\text{длина фрагмента (п.н)}} (2)$$

Таблица 4. Последовательности праймеров, используемых для детекции количества повреждений мтДНК

ID праймера	Последовательность 5' – 3'	ID праймера	Последовательность 5' – 3'	Позиции	Длина фрагмента
ChrM: Пр. 1	TAAATTTTCGTGCCAGCCACC	ChrM: Обр 1 (кор)	GTTGACACGTTTTACGCCGA	298 - 369	72 п.н.
		ChrM: Обр 1 (дл)	ATGCTACSTTTGCACGGTCA	298 - 2036	1739 п.н.
ChrM: Пр. 2	ACGAGGGTCCAACTGTCTCTTA	ChrM: Обр 2 (кор)	AGCTCCATAGGGTCTTCTCGT	2078 - 2174	97 п.н.
		ChrM: Обр 2 (дл)	CCGGCTGCGTATTCTACGTT	2078 - 3403	1326 п.н.
ChrM: Пр. 3	CTAGCAGAAACAAACCGGGC	ChrM: Обр 3 (кор)	CCGGCTGCGTATTCTACGTT	3318 - 3403	86 п.н.
		ChrM: Обр 3 (дл)	TTAGGGCTTTGAAGGCTCGC	3318 - 4992	1675 п.н.
ChrM: Пр. 4	GGCGGTAGAAGTCTTAGTAGAGAT	ChrM: Обр 4 (кор)	TGGCTGAGTAAGCATTAGACTGT	5184 - 5319	136 п.н.
		ChrM: Обр 4 (дл)	CTAGGGAGGGGACTGCTCAT	5784 - 7517	2334 п.н.
ChrM: Пр. 5	AACATTCCCACTGGCACSTT	ChrM: Обр 5 (кор)	TGTTGGGGTAATGAATGAGGCA	7858 - 7965	108 п.н.
		ChrM: Обр 5 (дл)	TTGTGTTTCATTCATATGCTAGGC	7858 - 9763	1925 п.н.
ChrM: Пр. 6	ACCTCACCATAGCCTTCTCAC	ChrM: Обр 6 (кор)	TGCCTTCCAGGCATAGTAATGT	9895 - 9982	87 п.н.
		ChrM: Обр 6 (дл)	ATGTGGTGGTGTACAGTGGG	9895 - 11856	1960 п.н.
ChrM: Пр. 7	TCATTCTTCTACTATCCCAATCC	ChrM: Обр 7 (кор)	ATGTGGTGGTGTACAGTGGG	11775 - 11856	81 п.н.
		ChrM: Обр 7 (дл)	TGGTTTGGGAGATTGGTTGATG	11775 - 13717	1942 п.н.
ChrM: Пр. 8	CCCAATCCCTCCTTCCAAC	ChrM: Обр 8 (кор)	TGGTTTGGGAGATTGGTTGATG	13650 - 13717	68 п.н.
		ChrM: Обр 8 (дл)	GGTGGGGAGTAGCTCCTTCTT	13650 - 15381	1732 п.н.
ChrM: Пр. 9	AAGAAGGAGCTACTCCCCACC	ChrM: Обр 9 (кор)	AGCTTATATGCTTGGGGAAAATAGT	15361 - 15499	139 п.н.
		ChrM: Обр 9 (дл)	GTTGACACGTTTTACGCCGA	15361 - 369	1308 п.н.

Для оценки количества окисленных оснований гуанина (8-охоG) мтДНК в количестве 50 нг инкубировали на термоциклере Eppendorf Mastercycler personal (Eppendorf, США) с 4 единицами формамидопиримидин-ДНК-гликозилазы (FPG) (New England Biolabs, США) при 37°C в течение 1 часа в соответствующем буфере. После этого фермент инактивировали за счет нагревания до 70°C в течение 20 минут. Количество повреждений рассчитывалось по формуле (2) как разница между мтДНК, обработанной и не обработанной ферментом FPG.

Для индукции повреждений мтДНК использовали ферменты эндонуклеазы рестрикции. Фрагменты 1, 2, 3 и 4 обрабатывались эндонуклеазами рестрикции AhoI и BamHI (обе SibEnzyme, Россия). Фрагмент 1 имеет сайт узнавания для AhoI (ChrM 1206–1211); фрагмент 2 имеет сайт узнавания для BamHI (ChrM 3222–3227); фрагмент 3 имеет сайт узнавания для AhoI (ChrM 4965–4970) и два сайта узнавания для BamHI (ChrM 3656–3570 и 4274–4279); фрагмент 4 не имеет сайта узнавания для обеих эндонуклеаз рестрикции. Количество повреждений рассчитывалось по формуле (2) как разница между мтДНК, обработанной и мтДНК не обработанной эндонуклеазами рестрикции.

2.2.9. Выделение митохондрий

Среда для выделения митохондрий мозга содержала следующие компоненты: 220 мМ маннитол; 100 мМ сахарозу; 1 мМ ЭГТА; 20 мМ HEPES; свободный от жирных кислот БСА в концентрации 0,2 мг/мл; все компоненты были растворены в дистиллированной воде; pH 7,4. Среда для промывки митохондрий содержала те же компоненты, но без БСА. Для приготовления перкольной среды в 100% Перколле были растворены 220 мМ маннитола; 100 мМ сахарозы; 1 мМ ЭГТА; 20 мМ HEPES; pH 7,4. 23% раствор Перколла был приготовлен из 100% Перколла путем его растворения в среде для промывки митохондрий.

Ткани мозга промывали в среде выделения и гомогенизировали в стеклянном гомогенизаторе Доунса (Пестик А) в 6 мл среды выделения при температуре +4°C. Гомогенат переносили в пробирки объемом 1,7 мл и доводили до нужного объема средой выделения. Гомогенат центрифугировали в течение 5 мин при 900 g. Полученный супернатант переносили в чистые пробирки и доводили до нужного объема средой промывки. Осаждение фракций свободных митохондрий и синапсом осуществляли при помощи центрифугирования в течение 10 мин при 14000 g. Полученный супернатант удаляли, а осадок ресуспендировали в 200 мкл среды промывки. После этого осадок перекомбинировали в одну чистую пробирку и аккуратно наносили по 200 мкл сверху на 23% раствор Перколла. Центрифугирование в градиенте Перколла проводили в течение 15 мин при 23000 g при ускорении центрифуги равном 6. После центрифугирования наблюдалось разделение на 3 фазы. После удаления верхнего и среднего слоя нижний слой ресуспендировали и добавляли среду промывки до объема 1,7 мл. Следующую промывку осуществляли путем центрифугирования в течение 10 мин при 18000 g (при стандартном ускорении 9). Супернатант удаляли, осадок ресуспендировали и перекомбинировали в одну пробирку и центрифугировали при 14000 g 5 мин. Супернатант удаляли, а осадок ресуспендировали в 50 мкл среды промывки.

Выделение митохондрий из печени осуществлялось в тех же средах, но с концентрацией БСА 0,6 мг/мл. Ткани печени гомогенизировались в гомогенизаторе Доунса (пестик А + пестик В) в 15 мл среды для выделения. Гомогенат центрифугировали в течение 5 мин при 900 g в центрифужных пробирках объемом 40 мл. Полученный супернатант переносили в чистые пробирки и доводили до нужного объема средой промывки. Митохондрии осаждали центрифугированием при 10000 g в течение 10 минут. После удаления супернатанта полученный осадок ресуспендировали и отмывали еще раз за счет центрифугирования 10000 g в течение 10 минут. Супернатант удаляли, осадок ресуспендировали в 100 мкл среды для промывки.

2.2.10. Измерение биоэнергетических параметров

Измерения проводились в среде, содержащей 45 мМ КСl, 20 мМ HEPES, 4 мМ KH_2PO_4 , 1 мМ ЭГТА, 0,2 мг/мл БСА и 10 мкМ соответствующего субстрата. В качестве NADH-зависимых субстратов использовались комбинации пируват (5 мМ) + малат (5 мМ), глутамат (5 мМ) + малат (5 мМ) или L-пролин (10 мМ). В качестве FADH_2 -зависимого субстрата использовали сукцинат (10 мМ). Для модуляции патологических состояний в работах использовались: ротенон (1 мг/мл) – ингибитор I комплекса, антимицин (3 мг/мл) – ингибитор III комплекса.

Измерение мембранного потенциала и скорости продукции H_2O_2 проводилось на спектрофлуориметре Hitachi F-7000 (Hitachi, Япония). Мембранный потенциал митохондрий определялся по интенсивности флюоресценции катионного красителя Сафранина О (Sigma-Aldrich, США). Длина волны экстинкции 495 нм. Длина волны эмиссии 586 нм. Снижение флюоресценции Сафранина О свидетельствовало о его проникновении внутрь митохондрии в обмен на катионы H^+ , что соответствует генерации мембранного потенциала.

Для измерения продукции H_2O_2 использовался Amplex Ultra Red (Invitrogen, США) и пероксидаза хрена (ThermoFisher Scientific, США). Кинетика образования H_2O_2 определялась по изменению интенсивности флюоресценции резорурфина, образующегося в ходе реакции. Длина волны экстинкции 568 нм. Длина волны эмиссия 581 нм.

Измерение скорости потребления кислорода проводилось на оксиграфе (Hansatech Instruments, Великобритания) с соответствующим программным обеспечением. Регистрировалось дыхание в состоянии покоя (состояние 2 по Чансу), затем с добавлением 20 мкМ АДФ (состояние 3 по Чансу).

Все результаты представлены в перерасчете на концентрацию белка. Измерение концентрации белка в выделенной фракции митохондрий проводили с помощью набора BSA Protein Assay Reagent (ThermoFisher

Scientific, США) на спектрофотометре Hitachi U-2900 (Hitachi, Япония) при длине волны 562 нм.

2.2.11. Измерение активности цитратсинтазы

Фрагмент мозга гомогенизировали в 50 мМ Tris-HCl буфере (pH 7,4) в гомогенизаторе Доунса. Гомогенат центрифугировали в течение 5 мин при 500 g. Осадок удаляли. Супернатант использовали для измерения активности цитратсинтазы на спектрофотометре Hitachi U-2900 (Hitachi, Япония) при длине волны 412 нм. Буфер для измерения активности содержал: 50 мМ Tris-HCl, 50 мМ KCl, 0,5 мМ оксалоацетата, 0,1 мМ ДТНБ (5,5'-дитиобис-(2-нитробензойная кислота), 10 мкл гомогената и 0,05% Triton X-100. Триггером реакции служил 0,36 мМ ацетил-КоА. Измерение проводилось в течение 4 минут. Данные представлены в мЕ/мг белка. За 1 мЕ принимали количество фермента, катализирующего восстановление 1 нмоль ДТНБ в минуту [341].

2.2.12. Определение содержания диеновых конъюгатов

В процессе перекисного окисления липидов происходит перегруппировка двойных связей, и возникают системы сопряженных диеновых структур, максимум поглощения которых составляет 232-234 нм. Гомогенат ткани центрифугировали при 500 g в течении 5 минут. К 125 мкл исследуемого образца приливали 125 мкл физиологического раствора, 1500 мкл гептана и 1500 мкл изопропилового спирта. Смесь центрифугировали при 3000 g в течение 10 мин. К супернатанту добавляли 1/10 объема дистиллированной воды и переносили в градуированные пробирки. После встряхивания наблюдали расслоение фаз. Гептановую фазу отбирали в новую пробирку и добавляли 500 мкл этилового спирта. Измерение проводили на спектрофотометре Hitachi U-2900 (Hitachi, Япония) при длине волны 233 нм. Содержание диеновых конъюгатов в гомогенате рассчитывали по формуле (3):

$$C_{\text{ДК}} = \frac{V_{\text{общ}} \times D \times 10^6}{L \times E \times C_{\text{б}} \times V_{\text{внес}}} \quad (3)$$

где $C_{\text{ДК}}$ – концентрация диеновых конъюгатов, мкмоль/г; $V_{\text{общ}}$ – объем полученного образца, мл; D – величина оптической плотности, ед.; L – длина оптического пути, 1 см; E – коэффициент молярной экстинкции, равный $2,2 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$; $C_{\text{б}}$ – концентрация белка в исследуемом образце, $V_{\text{внес}}$ – объем вносимой пробы, мл.

2.3. Статистическая обработка

Статистическая обработка проводилась с использованием пакета программ Microsoft Office Excel 2013 (Microsoft, США). Результаты представлены в виде средних значений \pm ошибка средней. Полученные данные обрабатывали с использованием t-критерия Стьюдента. Статистический анализ тестов «Открытое поле» и «Приподнятый крестообразный лабиринт» проводился с использованием 1-факторного дисперсионного анализа. В диссертационной работе обсуждаются только статистически достоверные различия ($p < 0,05$).

ГЛАВА 3. ВОЗРАСТНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ МИТОХОНДРИАЛЬНОГО БИОГЕНЕЗА

3.1. Возрастные изменения количества митохондрий

Вопрос о том, снижается или увеличивается количество митохондрий в ткани при старении, является дискуссионным. В различных тканях, в разное время, при разных методах измерения были получены противоречивые результаты. Было показано, что концентрация мтДНК в сравнении с ядерной ДНК выше в мозге 84-летних людей, чем у 21-летних [312], что может объясняться компенсаторным эффектом в ответ на возрастные митохондриальные дисфункции [314]. С другой стороны, большая часть исследователей склоняется к тому, что с возрастом снижается количество митохондрий. Это было продемонстрировано в аксонах стареющих мышечных волокон [204], в кортексе [98; 226, 302], печени [38] и эндотелиуме мозга приматов [368]. Данные исследования были основаны, как правило, на комплексном изучении, включающем в себя морфометрические (электронная микроскопия) и/или биохимические методы (измерение активности ферментов).

Мы продемонстрировали, что с возрастом снижается количество копий митохондрий в мозге. Об этом говорит снижение количества копий мтДНК у 15-месячных мышечных волокон (в сравнении с 7-месячными мышцами) (рис. 8А), снижение активности цитратсинтазы (рис. 8Б) и уровня экспрессии гена *Cox1*, который кодируется мтДНК (рис. 9). Статистически значимых различий между средним мозгом и корой больших полушарий не было выявлено. Очевидно, что это связано с возрастными изменениями митохондриального биогенеза. Мы обнаружили, что у 15-месячных мышечных волокон снижается уровень экспрессии основных маркеров митохондриального биогенеза *Tfam* и *Nrf1* (рис 9).

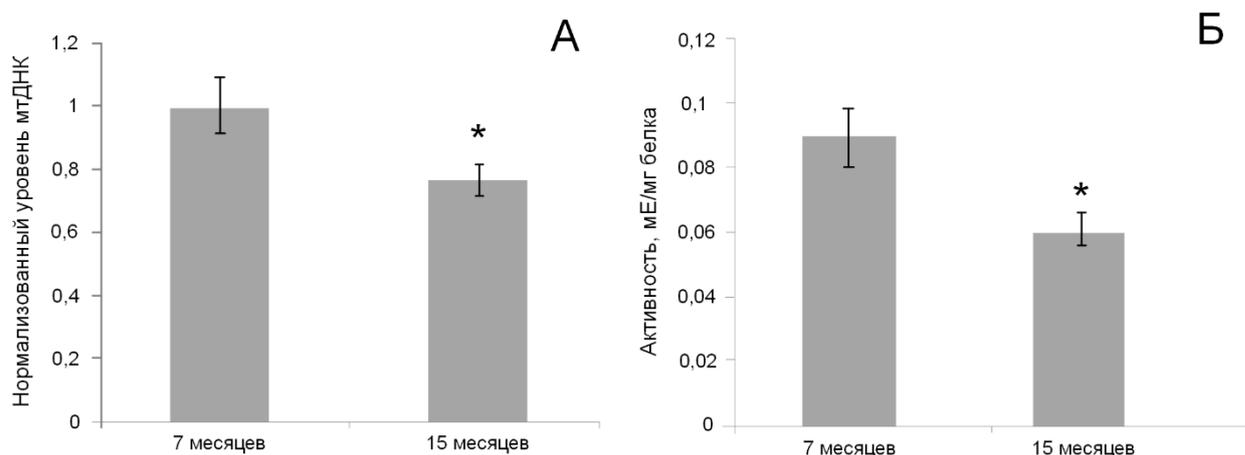


Рис. 8. Изменение количества митохондрий у 7- и 15-месячных мышей. А. Нормализованный уровень мтДНК. Б. Активность цитратсинтазы. * $p < 0,05$.

Наиболее вероятно, что это связано с возрастным снижением функциональности Nrf2/ARE сигнального каскада, что ранее было показано рядом авторов [36; 254]. Есть данные, свидетельствующие о том, что Nrf2 образует регуляторную петлю с положительной обратной связью, так как ген *Nfe2l2* имеет ARE в промоторной зоне [121]. Тем не менее, мы не обнаружили снижения экспрессии гена *Nfe2l2*

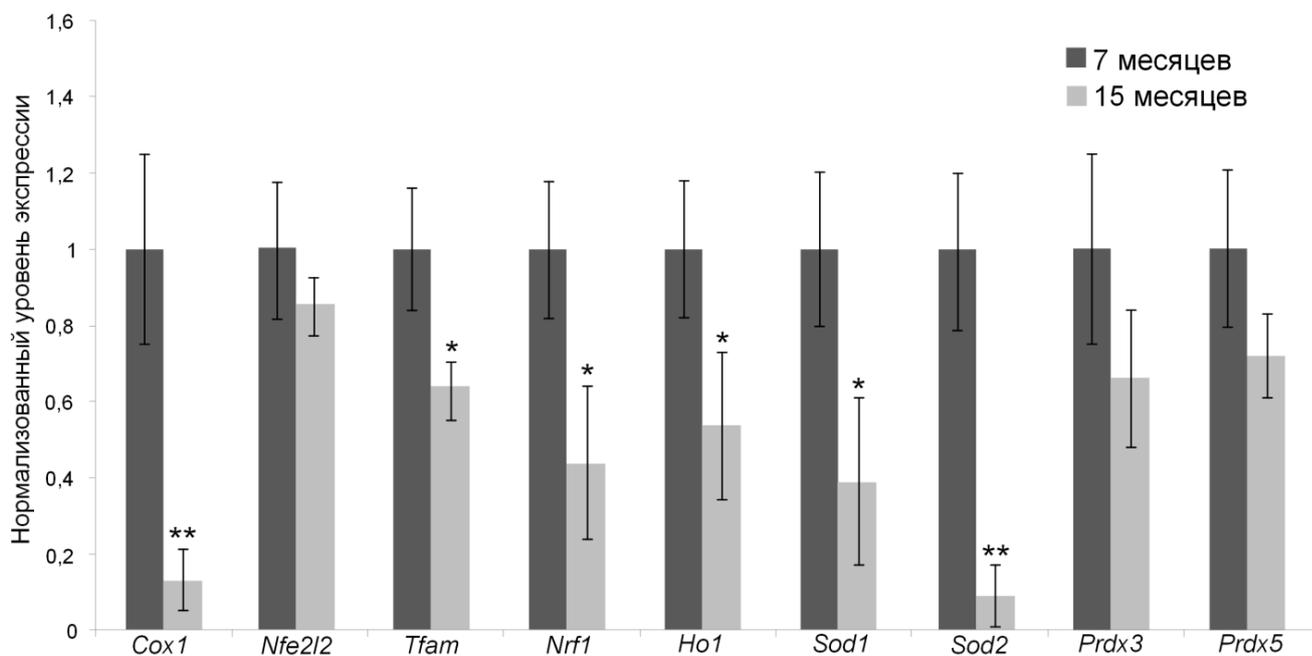


Рис. 9. Изменение экспрессии генов у 7- и 15-месячных мышей. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$

Но при этом мы обнаружили статистически достоверные возрастные снижения экспрессии в генах, содержащих ARE-регион: *Nrf1*, *Ho-1*, *Sod1*, *Sod2*, (рис. 9). По этой причине мы можем предположить, что именно возрастные нарушения функционирования Nrf2/ARE сигнального каскада связаны с возрастными изменениями интенсивности митохондриального биогенеза.

3.2. Физиологические изменения, связанные с возрастом

Митохондриальные дисфункции приводят к физиологическим изменениям у стареющего организма. Мы обнаружили, что у 15-месячных мышей снижается сила и выносливость более чем в два раза в сравнении с 7-месячными мышами ($p < 0,01$) (рис. 10). Данный эффект можно объяснить, как возрастным снижением функциональности скелетных мышц, так и дисфункцией моторных нейронов [340].

Поведенческий тест «Открытое поле» показал, что у 15-месячных мышей есть тенденция к снижению горизонтальной активности по сравнению с 7-месячным контролем ($28,3 \pm 6,8$ с и $37,3 \pm 2,9$ с, соответственно), но различия статистически не достоверны (рис. 11А).

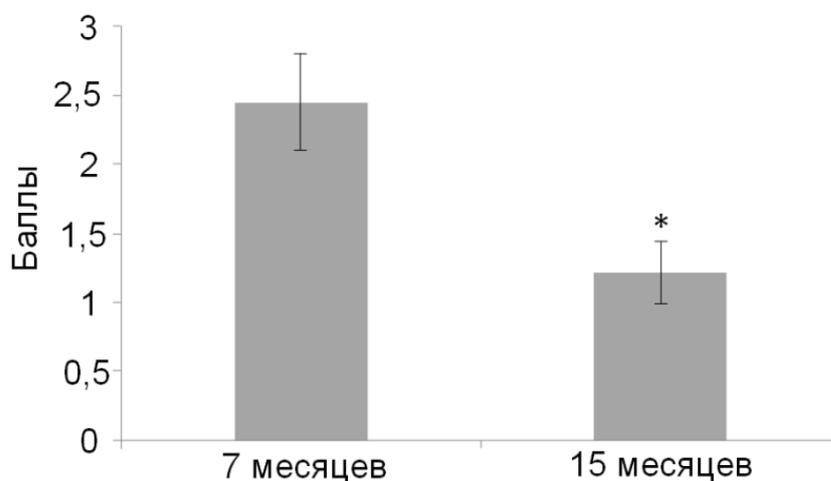


Рис. 10. Результаты теста «Струна» у 7- и 15-месячных мышей. * $p < 0,01$

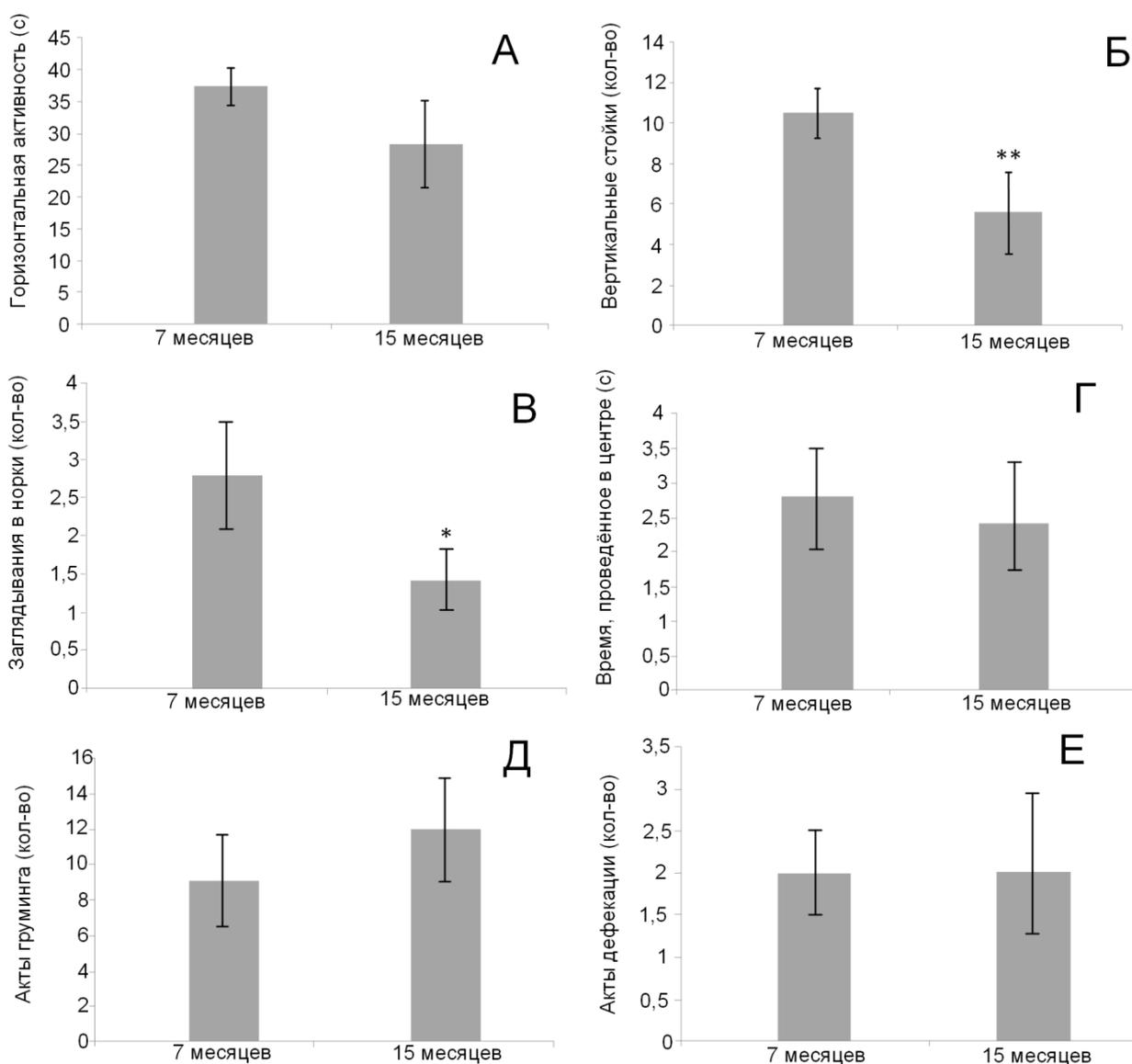


Рис. 11. Результаты теста «Открытое поле». А. Горизонтальная активность мышей; Б. Количество вертикальных стоек; В. Количество заглядываний в норки; Г. Время, проведенное мышами в центре площадки; Д. Количество актов груминга; Е. Количество актов дефекации. * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$

Были найдены различия в уровне исследовательской активности мышей, проявляющейся в количестве вертикальных стоек ($10,5 \pm 1,2$ у 7-месячных и $5,6 \pm 2,3$ у 15-месячных, $F(1,18) = 4.24$, $p < 0,001$) (рис. 11Б) и в количестве заглядываний в норки ($2,8 \pm 0,7$ у 7-месячных и $1,4 \pm 0,4$ у 15-месячных) ($F(1,18) = 2,15$, $p < 0,05$) (рис. 11В). Мы не выявили статистически значимых различий в уровне количества актов дефекаций и количества актов груминга, которые могли бы свидетельствовать об увеличении стрессорности мышей.

Тест «Приподнятый крестообразный лабиринт» выявил схожие изменения в поведении 15-месячных мышей. В частности, у стареющих мышей в 9 раз снизилось количество времени, проводимого в открытых рукавах ($F(1,17) = 4,59, p < 0,001$) (рис. 12А). Количество вертикальных стоек с возрастом у мышей снизилось с $9,6 \pm 1,7$ до $3,5 \pm 0,7$ [$F(1,17) = 8,71, p < 0,001$] (рис. 12Б). Это свидетельствует о снижении уровня исследовательского поведения. Количество свешиваний с открытых рукавов и количество актов груминга не изменялось. Это позволяет сделать вывод, что у 15-месячных мышей не увеличивается уровень тревожности по сравнению с 7-месячными мышами.

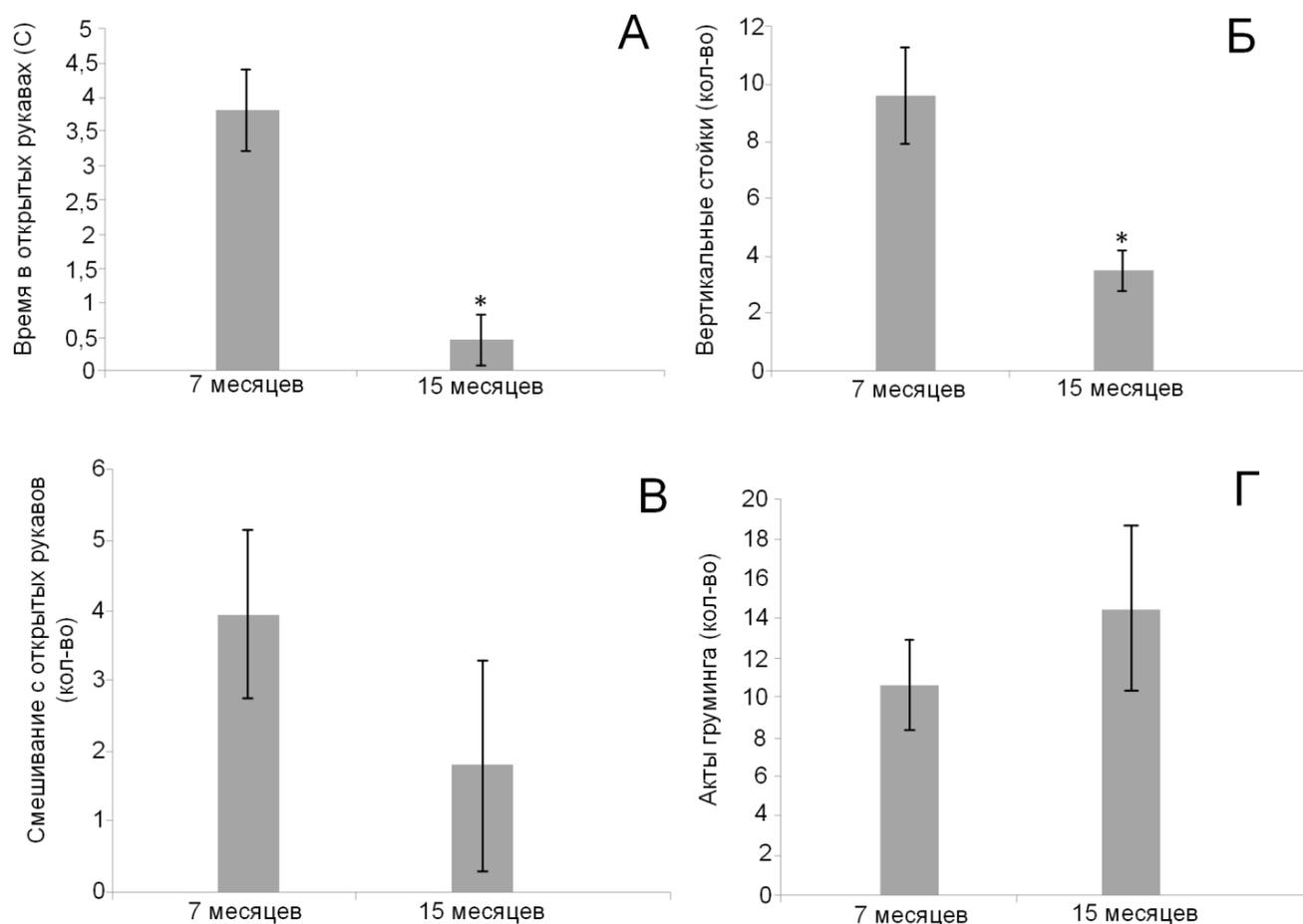


Рис. 12. Результаты теста «Приподнятый крестообразный лабиринт». А. Время, проведенное мышами в открытых рукавах; Б. Количество вертикальных стоек; В. Количество свешиваний с открытых рукавов; Г. Количество актов груминга. * $p < 0,01$

В целом наши результаты согласуются с данными Shoji et al. (2016), проводившего исследования на линии мышей C57BL/6J, которая во многом аналогична C57BL6, используемой в нашем эксперименте. Авторы показали, что у 8-12-месячных мышей проявляются моторные дисфункции, снижается локомоторная активность и увеличивается тревожность поведения [37].

В совокупности эти данные свидетельствуют о том, что в возрасте 15 месяцев мыши начинают демонстрировать некоторые поведенческие отклонения, связанные со снижением физической силы и выносливости, подавлением исследовательского поведения. Частично эти изменения могут быть детерминированы снижением уровня АТФ из-за снижения количества митохондрий, связанного с дисфункцией процесса митохондриального биогенеза. Нарушение стабильности митохондриального биогенеза может являться первым звеном в цепи дегенеративных процессов, которые, в конце концов, могут привести к патогенезу нейродегенеративных заболеваний. Несмотря на то, что в последние годы участились случаи раннего проявления болезни Альцгеймера и Паркинсона [124; 186], именно старение является ключевым фактором развития нейродегенеративных заболеваний. 15-месячных мышей можно отнести к возрастной группе, находящейся в стадии последней трети репродуктивного возраста [103]. При аппроксимации на возраст человека (45 – 50 лет) мы получаем возрастную группу, которая наиболее уязвима для факторов, приводящих к митохондриальным дисфункциям и развитию нейродегенеративных заболеваний. Мы считаем, что именно на этой стадии фармакологическое вмешательство может препятствовать митохондриальным нарушениям, замедлять проявление нейродегенераций и способствовать активному долголетию. По этой причине для дальнейших исследований были использованы мыши возрастом 15-месяцев.

ГЛАВА 4. ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ МЕТИЛЕНОВОГО СИНЕГО НА МИТОХОНДРИАЛЬНЫЙ БИОГЕНЕЗ

4.1. Биохимические свойства метиленового синего

Метиленовый синий (МС) - органический основной тиазиновый краситель, который получил широкое распространение в медицине в качестве лекарства от малярии, метгемоглобинемии и при отравлении цианидом [193]. В последние два десятилетия МС является одним из наиболее перспективных лекарств для терапии нейродегенеративных заболеваний. Это возможно благодаря высокой липофильности МС, которая позволяет ему проникать через гематоэнцефалический барьер и мембраны митохондрий [323]. Там МС проявляет свойства редокс-компонента электрон-транспортной цепи за счет того, что может окислять NADH и переносить электроны на цитохром *c*. Этот эффект известен как альтернативный транспорт электронов [44]. Это позволяет МС оказывать нейропротекторный эффект за счет регулирования митохондриального метаболизма и гомеостаза АФК, которые играют ведущую роль в патогенезе нейродегенеративных заболеваний и участвуют в процессе старения [152].

Вопрос об антиоксидантных свойствах МС остается открытым. С одной стороны, имеются доказательства того, что МС демонстрирует антиоксидантные свойства в клеточных культурах в присутствии сильных оксидантов, таких как H_2O_2 или ротенон [44; 220; 246]. Но в то же время существует данные о том, что МС проявляет прооксидантные свойства. Это в первую очередь данные, касающиеся фотосенсибилизирующих свойств МС, приводящих к продукции синглетного кислорода [205]. Кроме того, было показано, что МС способствует увеличению скорости продукции H_2O_2 в митохондриях мозга при добавлении к изолированным митохондриям при концентрации 1 мкМ и меньше [123].

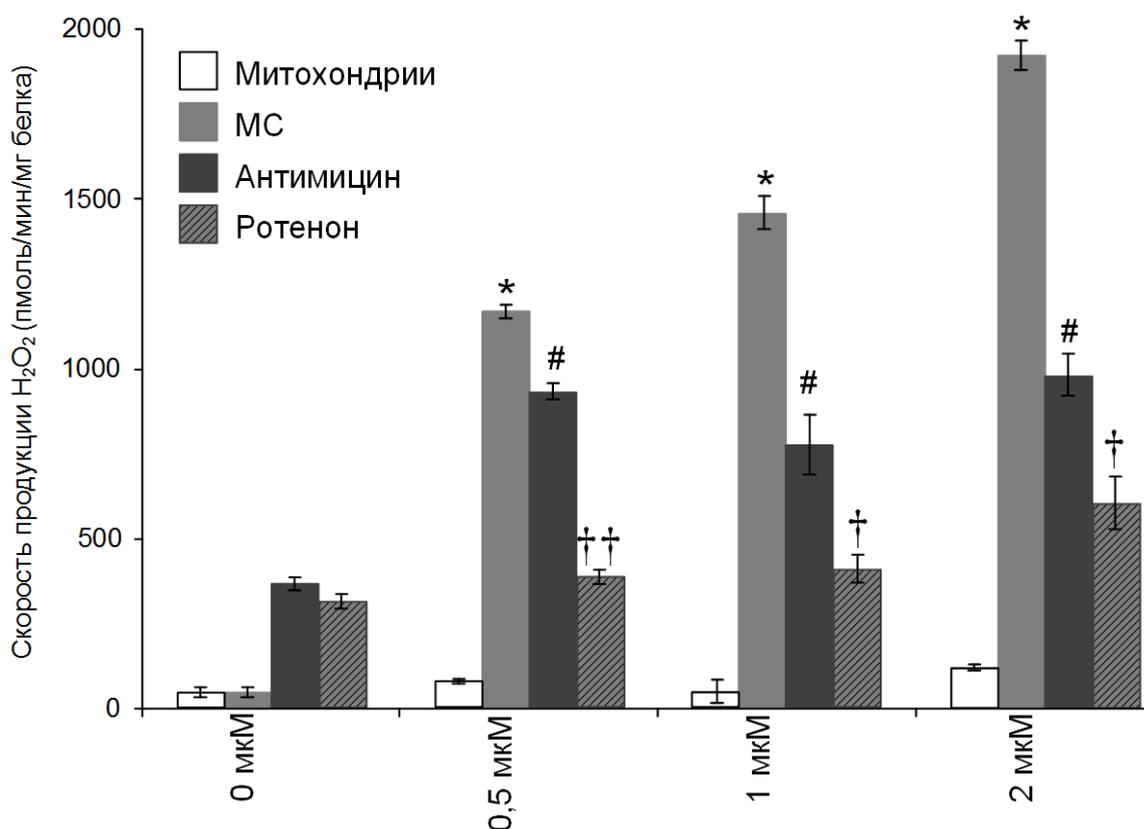


Рис. 13. Скорость продукции H_2O_2 . * $p < 0,001$ - достоверное увеличение скорости продукции H_2O_2 при добавлении МС к митохондриям. # $p < 0,001$ – достоверное снижение скорости продукции H_2O_2 при последующем добавлении антимицина. † $p < 0,05$, †† $p < 0,01$. достоверное снижение скорости продукции H_2O_2 при последующем добавлении ротенона.

В интактных митохондриях, использующих в качестве субстратов для дыхания пируват и малат, уже 0,5 мкМ МС увеличивало скорость продукции H_2O_2 с $76,3 \pm 16,6$ пмоль/мин/мг белка до 1170 ± 20 пмоль/мин/мг белка. Добавление 1 мкМ МС увеличивало скорость продукции H_2O_2 до 1460 ± 48 пмоль/мин/мг, 2 мкМ МС до 1945 ± 44 пмоль/мин/мг (рис. 13). Эти данные подтверждают результаты Tretter et al. (2014) [123] и Vekaria et al. (2017) [351]. Вместе с тем мы обнаружили, что последующее добавление антимицина снижает скорость МС-индуцированной продукции H_2O_2 . Антимицин снижает скорость продукции H_2O_2 на 25,4% в присутствии 0,5 мкМ МС, на 87,6% в присутствии 1 мкМ МС и на 95,9% в присутствии 2 мкМ МС. Эти данные выглядят удивительными в свете того, что в нормально функционирующих

митохондриях добавление антимицина увеличивает скорость продукции H_2O_2 . В контрольном эксперименте (в отсутствии МС) антимицин увеличил скорость продукции H_2O_2 более чем в 7 раз (рис. 13).

Причиной такого нетипичного ответа митохондрий на антимицин в присутствии МС является феномен альтернативного транспорта электрона. Согласно классической теории, МС принимает электроны от NADH и переносит на цитохром *c*. Однако в таком случае блокирование III комплекса ЭТЦ с помощью антимицина не приводило бы к изменению скорости продукции H_2O_2 . Мы предполагаем, что подавление МС-индуцированной продукции H_2O_2 связано с тем, что сайт, восстанавливающий МС- H_2 , расположен до сайта связывания антимицина, то есть либо в III комплексе, либо на уровне убихинона. Чтобы проверить это утверждение мы измерили скорость митохондриального дыхания с использованием комбинации субстратов пируват+малат. Ротенон полностью ингибирует дыхание митохондрий в 3 состоянии по Чансу (в присутствии АДФ). Скорость потребления кислорода снизилась с $121,4 \pm 7,2$ нмоль/мин/мг до $1,95 \pm 0,6$ нмоль/мин/мг. Добавление 1 мкМ МС ожидаемо восстановило скорость потребления кислорода до $21 \pm 3,2$ нмоль/мин/мг (рис. 14А), что свидетельствует о том, что МС способствует альтернативному транспорту электронов в обход ротенонового блока, который расположен в терминальной части I комплекса, перед убихиноном [211]. Добавление в среду антимицина снижает базовую скорость потребления кислорода до $15,6 \pm 4,9$ нмоль/мин/мг. 1 мкМ МС практически не восстанавливает скорость митохондриального дыхания (потребления кислорода $20,2 \pm 6,1$ нмоль/мин/мг) (рис. 14Б). Эти данные подтверждают предположение о том, что МС- H_2 восстанавливается не цитохромом *c*. Для подтверждения этого факта был поставлен ряд экспериментов по измерению мембранного потенциала митохондрий. Мы обнаружили, что МС помогает электронам «обходить» ротеноновый блок и практически полностью восстанавливает мембранный потенциал, заингибированный добавлением ротенона.

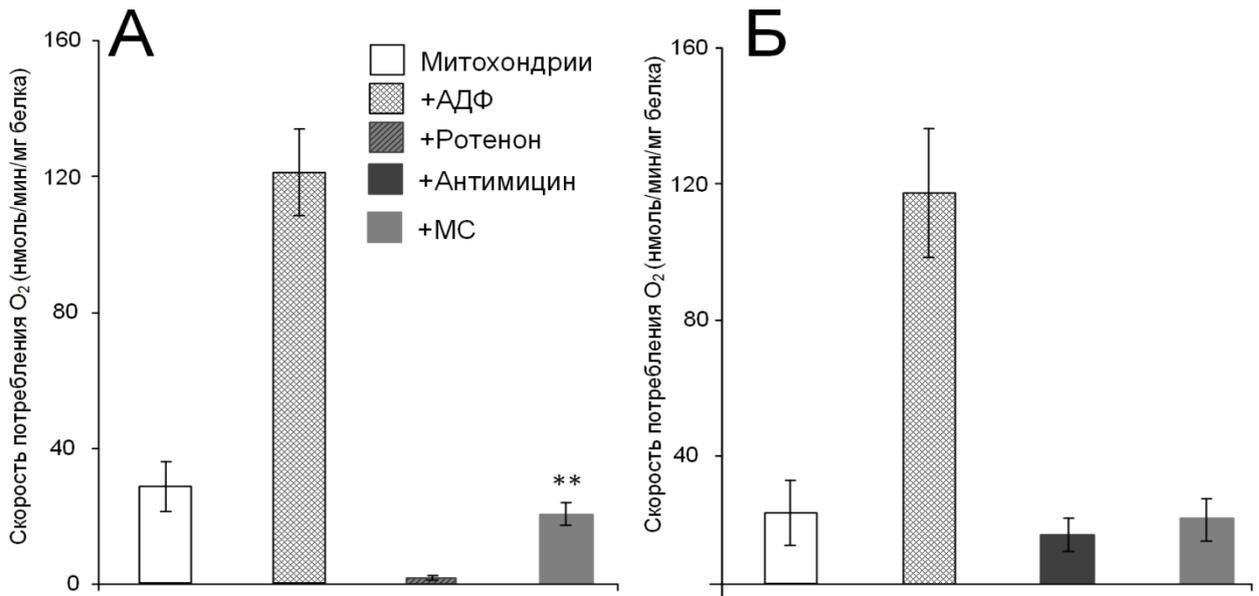


Рис. 14. Скорость дыхания изолированных митохондрий при ингибировании А) ротеноном, Б) антимицином. ** $p < 0,05$ МС восстанавливает скорость митохондриального дыхания при ингибировании ротеноном, но не антимицином.

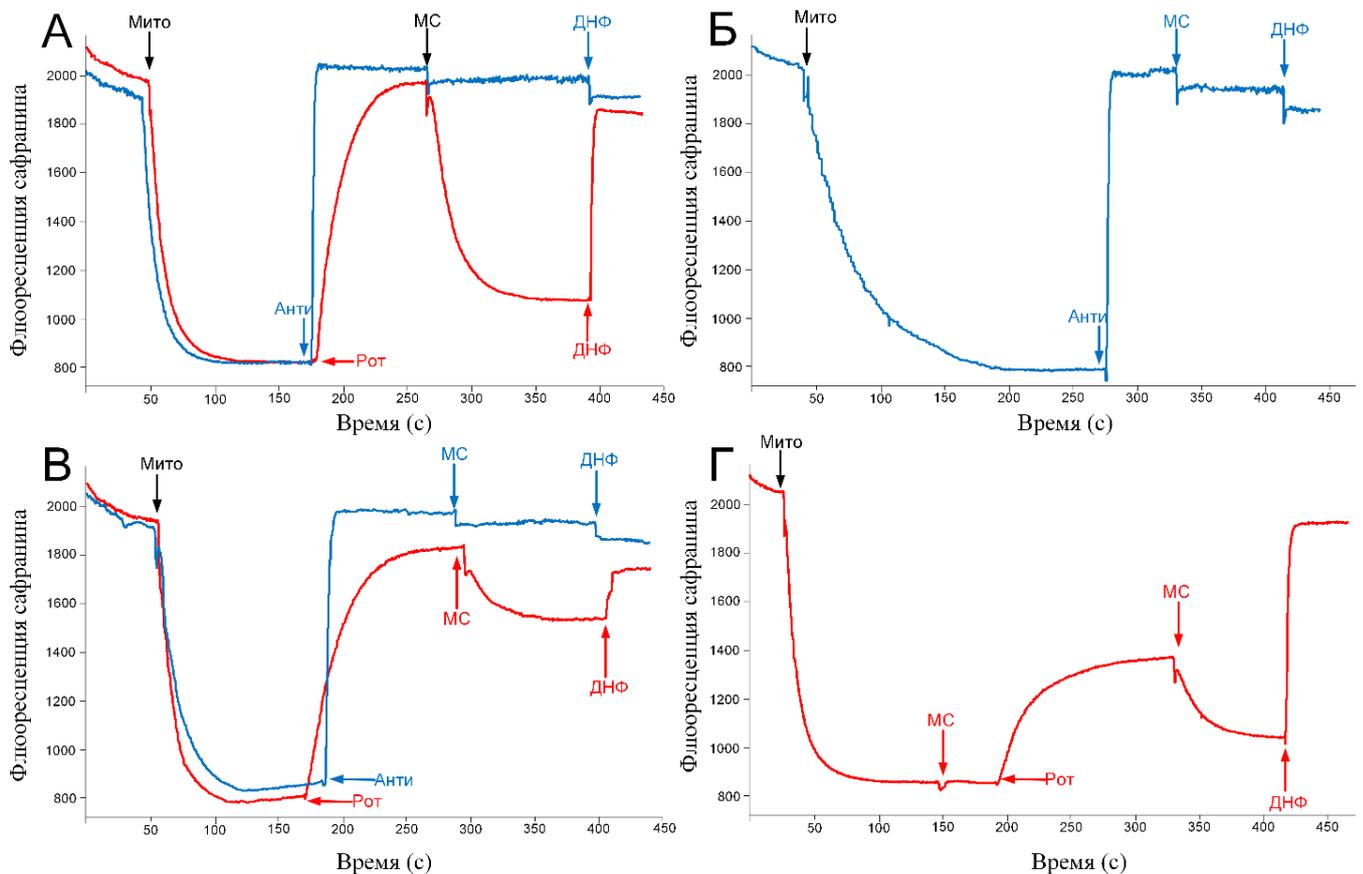


Рис. 15. Мембранный потенциал при использовании субстратов малат+пируват (А, Г), сукцината (Б) и L-пролина (В). Синяя линия – ингибирование мембранного потенциала антимицином. Красная линия – ингибирование мембранного потенциала ротеноном.

Это было показано для митохондрий, использующих в качестве субстрата для дыхания пируват+малат (рис. 15А) и L-пролин (рис. 15В). Блокирование ЭТЦ антимицином также приводило к потере мембранного потенциала, но добавление 1 мкМ МС не способствовало его восстановлению у митохондрий, использующих в качестве субстратов для дыхания пируват+малат (рис. 15А), сукцинат (рис. 15Б) и L-пролин (рис. 15В). В противовес этому, при аналогичном ингибировании ротеноном, 1 мкМ МС восстанавливал мембранный потенциал (рис. 15А,В). Более того, предварительное добавление МС частично защищало мембранный потенциал от ингибирования ротеноном (рис. 15Г).

В результате проведенных экспериментов мы можем сделать вывод о необходимости пересмотра стандартной модели функционирования МС как альтернативного переносчика электронов. Согласно модели, предложенной Tretter et al. (2014), МС способен окисляться NADH и FADH₂ до МС-Н₂ и восстанавливаться цитхромом *c* и молекулярным кислородом с образованием Н₂О₂ [123]. Наша модификация, представленная на рисунке 16, предполагает, что акцептором электронов с МС-Н₂ является III комплекс, а МС-индуцированная продукция Н₂О₂ происходит как при взаимодействии МС с молекулярным кислородом, так и за счет одноэлектронного транспорта на уровне III комплекса. Антимицин блокирует перенос электрона с цитохрома *b_h* на семихинон, в то время как второй электрон передается далее по цепи ISP-cyC1-cytC-COX-O₂. В результате этого образуется нестабильный семихинон, который может передавать электрон на кислород, что приводит к образованию супероксида, который спонтанно дисмутирует до Н₂О₂ [370]. МС, отдав электрон на III комплекс ЭТЦ, тоже создает одноэлектронный перенос, способствуя образованию супероксида, а антимицин блокирует его, за счет чего и происходит частичное снижение скорости продукции Н₂О₂, наблюдаемое нами.

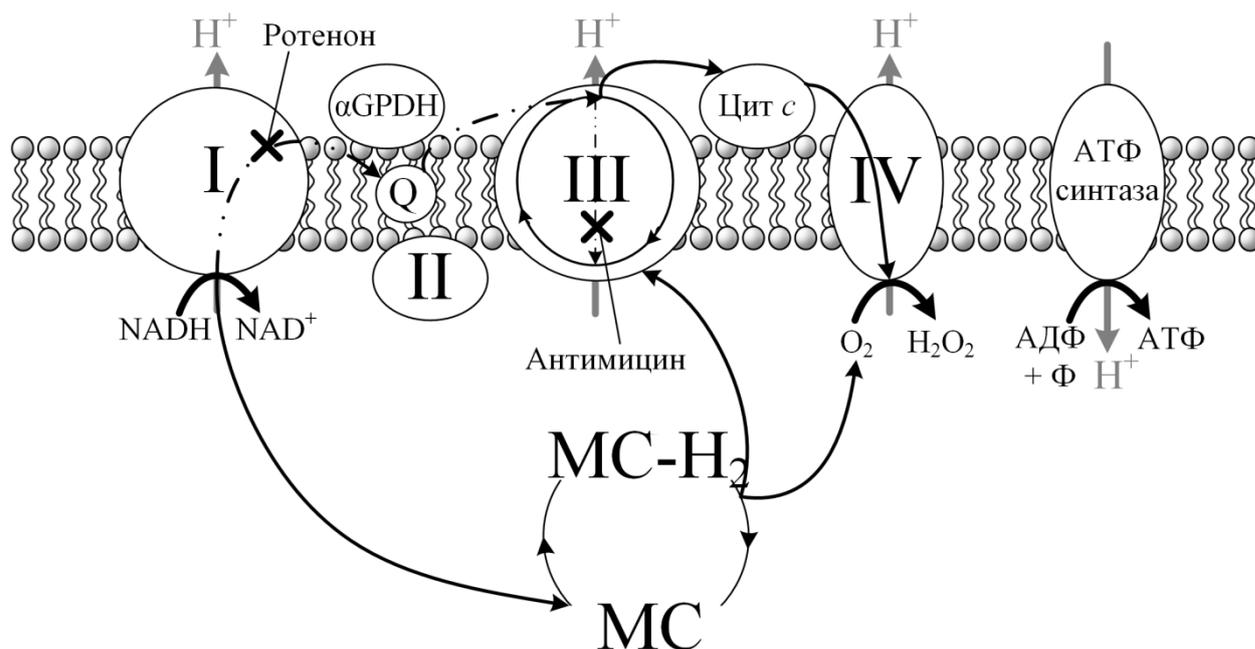


Рис. 16. Гипотетическая схема альтернативного транспорта электронов, осуществляемого метиленовым синим

4.2. Влияние метиленового синего на физиологические параметры

Ранее было неоднократно показано, что МС является хорошим нейропротектором, что выражается в улучшении митохондриального метаболизма [85; 220; 246], улучшении памяти и когнитивных параметров [145; 354]. Был показан положительный эффект МС при инсульте и ишемии головного мозга [39; 221; 247], при травмах головного мозга [101] и при различных моделях нейродегенеративных болезней [222; 392].

Несмотря на то, что достаточно хорошо изучено влияние МС на биохимические параметры клеточных культур, поведение и биохимические характеристики крыс и мышей, остается значительный пробел в исследованиях на стареющих животных. Ряд исследователей акцентирует внимание на выраженном горметическом эффекте МС, указывая, что оптимальная концентрация МС при инъекциях составляет от 1 до 4 мг/кг/день [66;323]. При высоких концентрациях (выше 10 мг/кг/день) не наблюдается положительного эффекта, а при концентрациях свыше 50 мг/кг/день

наблюдаются даже побочные эффекты, проявляющиеся в угнетении психомоторных характеристик животных [214]. Но при этом стоит учитывать, что при пероральном введении МС наблюдается другая фармакокинетика препарата, так как значительная часть препарата выводится с мочой [286]. При употреблении МС в концентрации 5 мг/кг/день с питьевой водой мы не наблюдали ожидаемого увеличения скорости дыхания, поэтому данная группа далее не использовалась в эксперименте. При увеличении концентрации МС до 15 мг/кг/день был получен ожидаемый эффект – увеличение скорости дыхания на 15%. Эксперимент с данной группой мышей был продолжен (табл. 5).

Таблица 5. Измерение скорости дыхания мышей на 5, 14 и 50 день эксперимента

	Скорость потребления O ₂ , мкМ/мин/г			Скорость эмиссии CO ₂ , мкМ/мин/г		
	5 день	14 день	50 день	5 день	14 день	50 день
Контроль	4,52±0,2	4,47±0,1	4,57±0,1	4,51±0,1	4,55±0,2	4,59±0,2
МС (5 мг/кг/день)	4,57±0,1	4,61±0,2	-	4,63±0,1	4,72±0,2	-
МС (15 мг/кг/день)	4,41±0,1	5,03±0,1*	4,82±0,1*	4,65±0,2	5,61±0,2**	4,93±0,2

*p<0,05; **p<0,01.

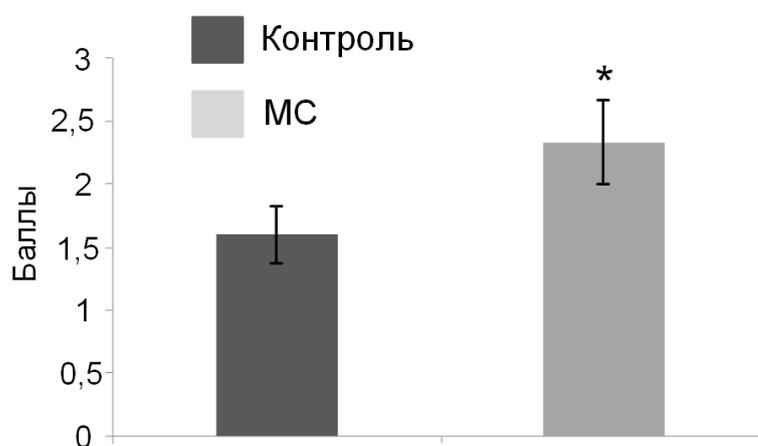


Рис. 17. Результаты теста «Струна» * p<0,01

Мы показали, что пероральная терапия МС в течение 60 дней приводила к увеличению физической силы и выносливости у 15-месячных мышей примерно в два раза ($p < 0,01$) (рис. 17). Были выявлены положительные изменения в поведенческих особенностях 15-месячных мышей, подвергаемых терапии МС.

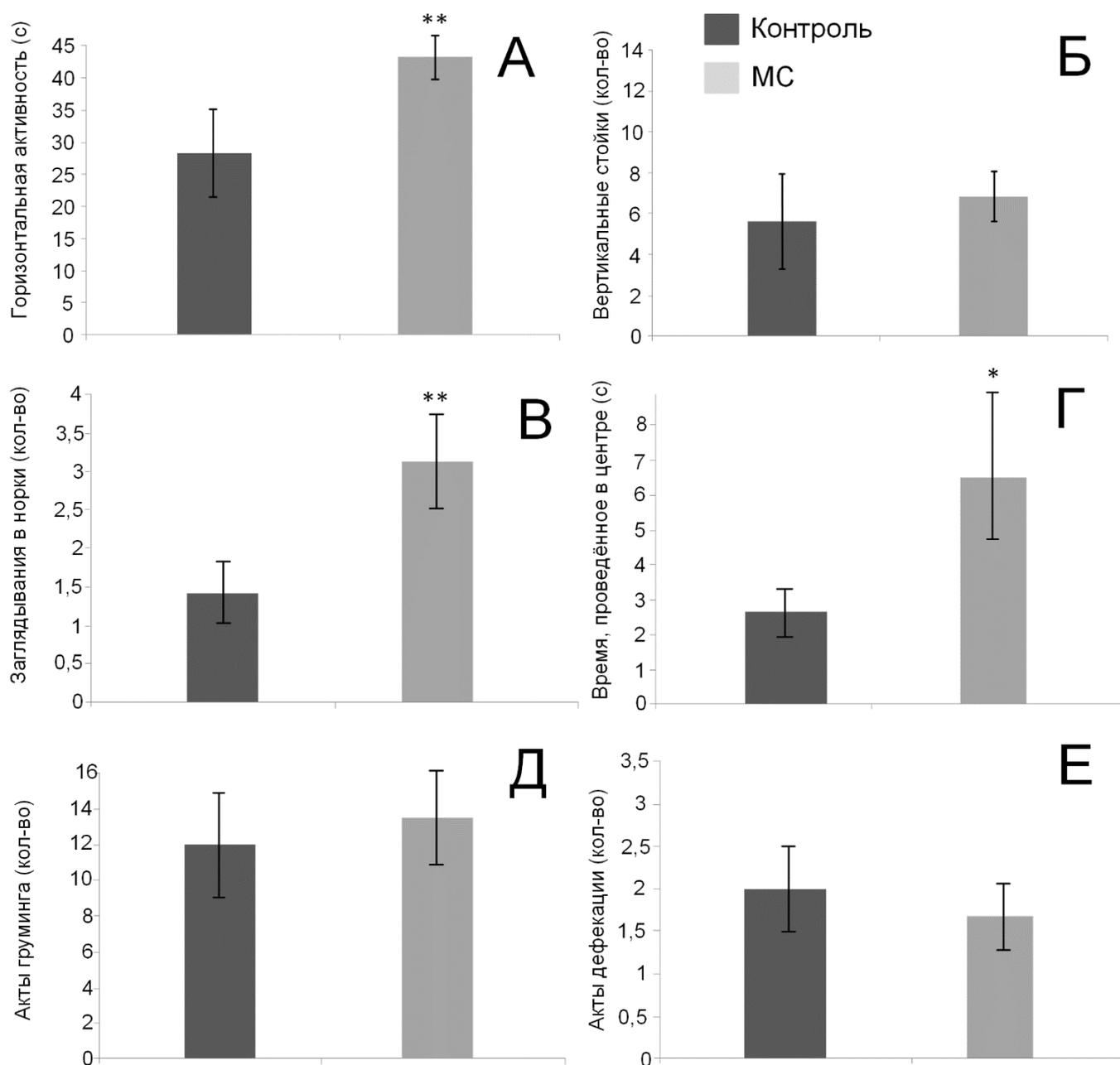


Рис. 18. Результаты теста «Открытое поле». А. Горизонтальная активность мышей; Б. Количество вертикальных стоек; В. Количество заглядываний в норки; Г. Время, проведенное мышами в центре площадки; Д. Количество актов груминга; Е. Количество актов дефекации. * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$

У данных мышей в сравнении с контролем значительно увеличилась горизонтальная активность ($F(1,18) = 5,51, p < 0,001$) (рис. 18А), хотя различий в количестве вертикальных стоек выявлено не было (рис. 18Б). У 15-месячных мышей, принимавших МС, наблюдалось в 2 раза больше заглядываний в норки ($F(1,18) = 2,15, p < 0,001$) (рис. 18В) и почти в три раза больше времени они проводили в центральной части открытого поля $F(1,18) = 4,29, p < 0,001$) (рис. 18Г). Количество актов груминга (рис. 18Д) и количество актов дефекации (рис. 18Е) в двух группах не изменялось.

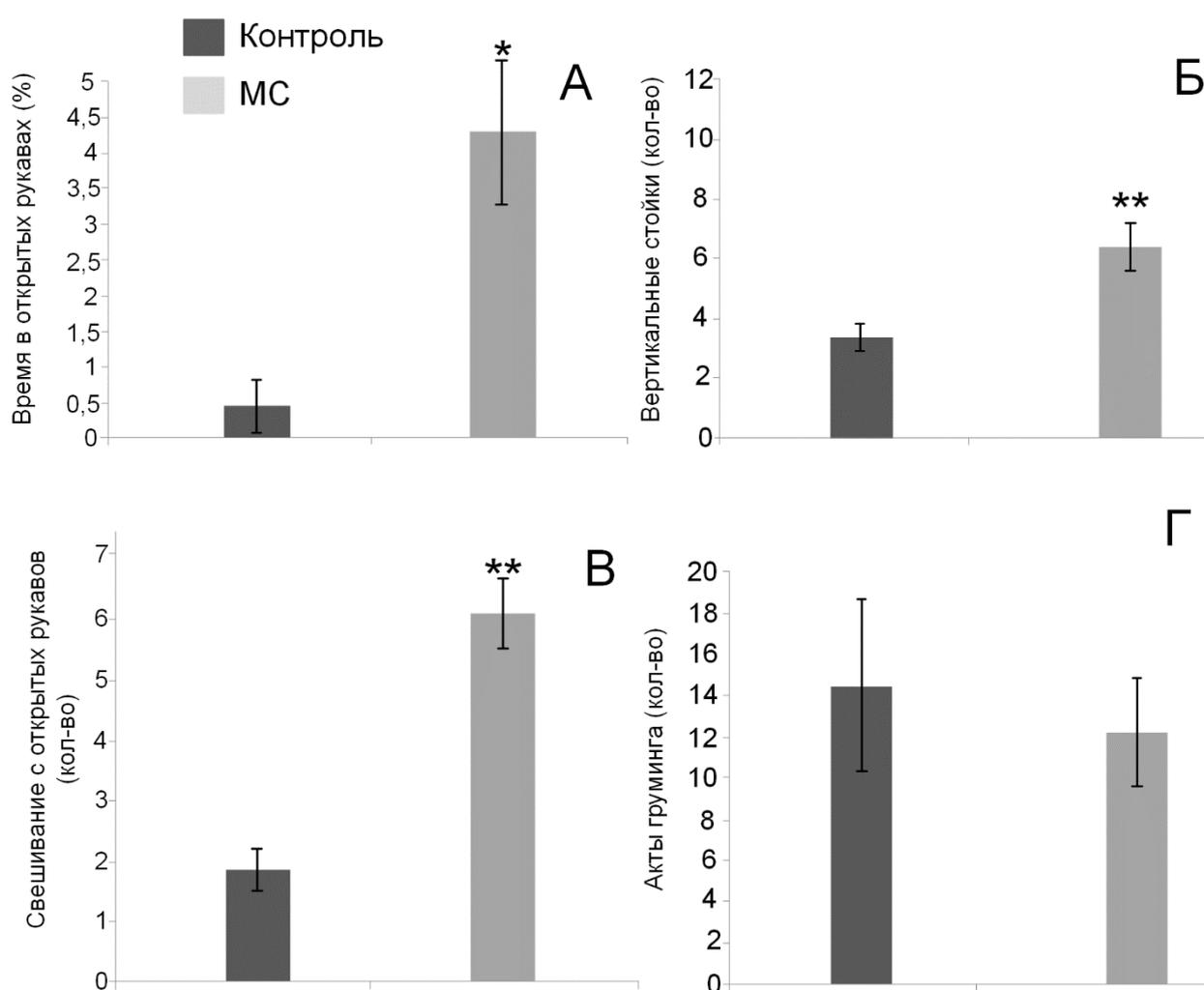


Рис. 19. Результаты теста «Приподнятый крестообразный лабиринт». А. Время, проведенное мышами в открытых рукавах; Б. Количество вертикальных стоек; В. Количество свешиваний с открытых рукавов; Г. Количество актов груминга. * $p < 0,01$, ** $p < 0,001$

Сходные результаты были получены при тестировании животных на приподнятом крестообразном лабиринте. Мыши, принимавшие МС, в 10 раз чаще заходили в открытые рукава лабиринта ($F(1,18) = 3,26, p < 0,01$) (рис. 19А) и на 70% чаще вставали в вертикальные стойки ($F(1,18) = 4,11, p < 0,001$) (рис. 19Б). Количество свешиваний с открытых рукавов у мышей, принимавших МС, увеличилось в 3,2 раза ($F(1,18) = 5,41, p < 0,001$) (рис. 19В), но статистически достоверных изменений в количестве актов груминга выявлено не было (рис. 19Г).

В сумме эти исследования показывают, что МС может оказывать анксиолитический эффект, связанный со снижением уровня тревожности и увеличении доли исследовательского поведения. В совокупности с увеличением силы и выносливости животных это может свидетельствовать об улучшении функциональных характеристик митохондрий, о чем дополнительно свидетельствует увеличение скорости дыхания мышей (табл. 4). Увеличение скорости дыхания животных на 15% может быть вызвано непосредственно альтернативным транспортом электронов, который обеспечивает МС при поступлении в митохондрии. Ранее было высказано предположение, что МС может увеличить скорость митохондриального дыхания за счет стимулирования активности I, III [219] и IV комплекса ЭТЦ [220]. Кроме того, *Atamna et al.* (2008) показали, что МС увеличивает продолжительность жизни человеческих фибробластов в ткани более чем на 20 делений. В низких наномолярных концентрациях (до 1 мкМ), МС увеличивает функциональность митохондрий, которая проявляется в увеличении активности IV комплекса на 30%, на 37-70% увеличивается потребление кислорода и синтез гема [220].

МС также способен задерживать старение клеток, вызываемое гиперпродукцией H_2O_2 за счет индуцирования антиоксидантных ферментов (в *herG2* клеточных культурах). Авторы пришли к выводу, что МС способен блокировать продукцию АФК в митохондриях и тем самым препятствовать митохондриальным дисфункциям, связанным с возрастом [220].

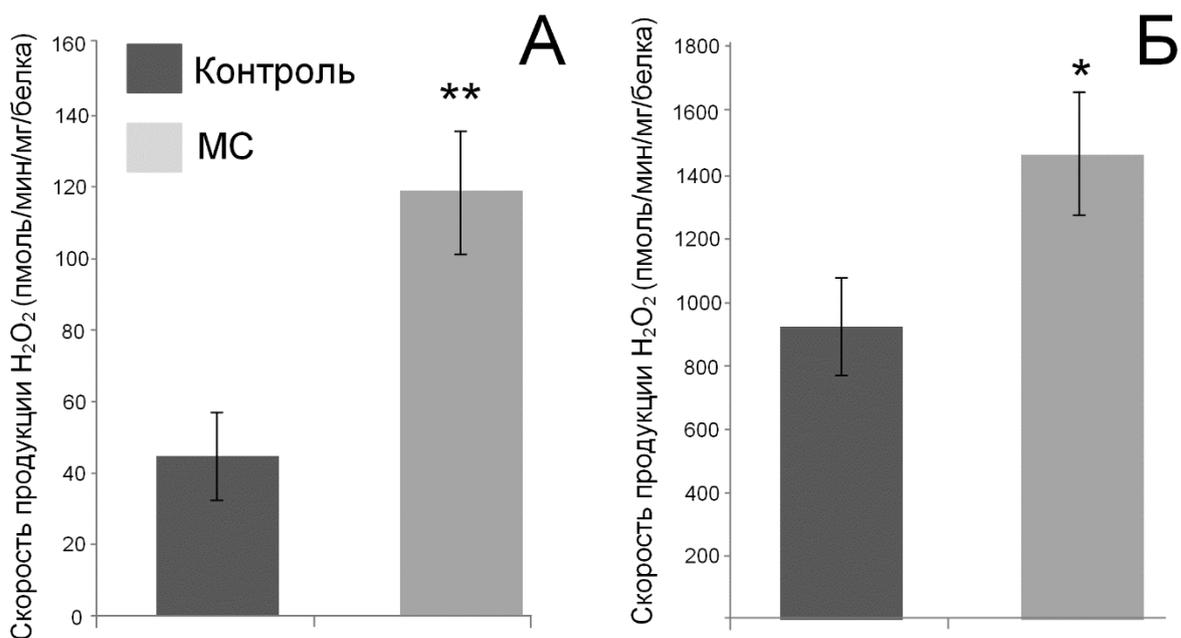


Рис. 20. Скорость продукции H₂O₂ в изолированных митохондриях мозга мыши, употреблявших МС в концентрации 15 мг/кг/день в течение 60 дней при дыхании на комбинации субстратов Малат+Глутамат (А) и сукцинате (Б). *p<0,05, **p<0,01

Однако статус МС в качестве антиоксиданта мы подвергаем значительному сомнению, так как *in vitro* МС способствует увеличению скорости продукции H₂O₂ (рис. 13). Мы измерили скорость продукции H₂O₂ в митохондриях мозга мышей, принимавших МС в течение 60 дней. Прием МС приводил почти к двухкратному увеличению скорости продукции H₂O₂ в митохондриях мозга при дыхании с использованием малата и глутамата и на 45% при использовании сукцината (рис. 20).

4.3. Влияние метиленового синего на Nrf2/ARE сигнальный путь

Прооксидантный статус МС на первый взгляд плохо сочетается с ярко выраженным положительным физиологическим эффектом, который мы наблюдали у 15-месячных мышей после 60 дней приема МС. Предположительно, это может быть связано с компенсаторными реакциями, которые может вызывать H₂O₂ за счет активации Nrf2/ARE-сигнального пути.

H_2O_2 способствует изменению конформации KEAP1, в результате чего образуется дополнительный межмолекулярный дисульфидный мостик, связывающий через Cys151 две молекулы KEAP1 [33]. Это стабилизирует и инактивирует KEAP1.

Кроме того, H_2O_2 способна окислять и инактивировать PTEN [311]. Инактивация PTEN приводит к активации PI3K-Akt сигнального каскада [233], деактивирующего GSK3 β – другой негативный регулятор Nrf2 [159]. Таким образом, мягкий окислительный стресс, проявляющийся в увеличении продукции H_2O_2 , инактивирует одновременно и KEAP1, и GSK3 β , что способствует освобождению Nrf2 и его транслокации в ядро. Гены, кодирующие антиоксидантные ферменты, являются основной мишенью Nrf2 [8].

Мы обнаружили МС-индуцированное увеличение экспрессии генов *Ho-1*, *Sod2*, *Prdx3*, но не выявили изменения в экспрессии генов *Sod1* и *Prdx5* (рис. 21). Похожие эффекты были показаны ранее для мышей с тау-патологией [222]. Таким образом, мы можем утверждать, что основной антиоксидантный эффект МС, неоднократно отмечаемый разными группами исследователей, заключается не в прямой детоксификации радикалов кислорода, а в индукции экспрессии антиоксидантных ферментов. В глобальной перспективе использования МС в качестве препарата для лечения нейродегенеративных заболеваний данный эффект представляется даже более ценным, так как использование неферментативных антиоксидантов в терапии нейродегенеративных заболеваний на данный момент не принесло глобальных успехов [271]. Перспективность использования активаторов Nrf2 в качестве подхода к терапии нейродегенеративных заболеваний обусловлена не только его способностью обеспечивать антиоксидантную защиту митохондрий. Мы показали, что МС обеспечивает увеличение количество копий митохондрий у 15-месячных мышей. Это выражается в увеличении количества копий мтДНК (рис. 22А) и увеличении активности цитратсинтазы (рис. 22Б).

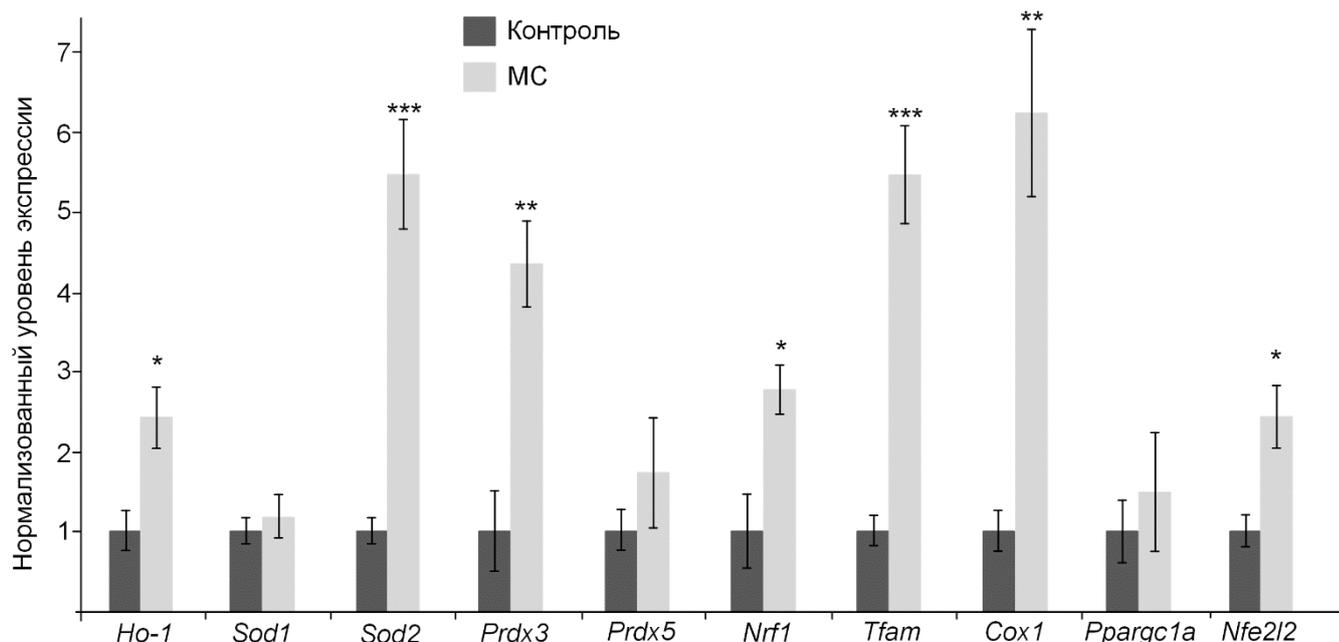


Рис. 21. Влияние метиленового синего на уровень экспрессии генов, участвующих в антиоксидантной защите и митохондриальном метаболизме. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$,

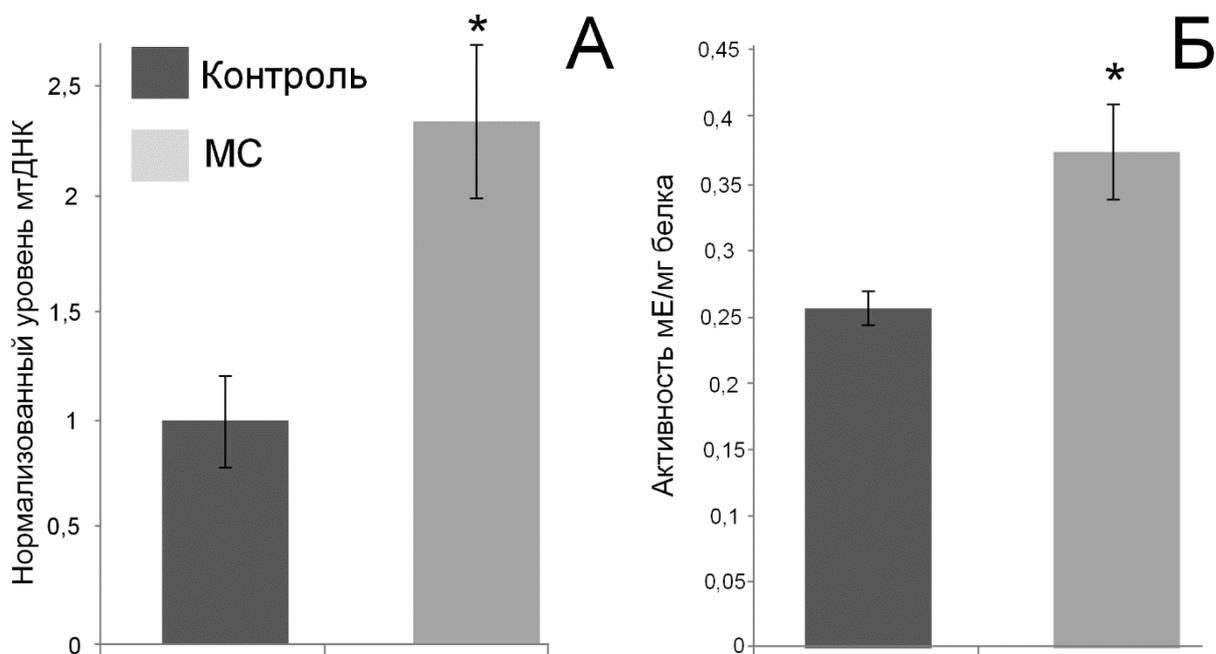


Рис. 22. Влияние метиленового синего на количества митохондрий у 15-месячных мышей. А. Нормализованный уровень мДНК. Б. Активность цитратсинтазы. * $p < 0,05$.

Наши данные говорят в пользу того, что МС может активировать митохондриальный биогенез по механизму, предложенному Piantadosi et al. (2008) [159]. Nrf2 увеличивает экспрессию *Nrf1*. Продукт данного гена, в свою очередь, увеличивает экспрессию *Tfam*. Помимо этого, мы обнаружили увеличение экспрессии митохондриального гена *Cox1* (рис. 21), что дополнительно подтверждает увеличение количества митохондрий, вызванное употреблением МС.

В 2015 году Atamna et al. предложили модель, в которой МС параллельно активирует митохондриальный биогенез через AMPK-PGC-1 α -сигнальный путь и антиоксидантную защиту через Nrf2/ARE-сигнальный каскад [85]. Данное исследование проводилось на клеточных культурах, в которых МС за счет вышеупомянутых сигнальных путей задерживал старение клеток. Мы не обнаружили увеличение экспрессии *Ppargc1a* у мышей, получавших МС, но обнаружили увеличение экспрессии *Nfe2l2* (рис. 21). Таким образом, мы можем предположить, что AMPK не участвует в МС-индуцированной активации митохондриального биогенеза. AMPK может параллельно фосфорилировать Nrf2 и PGC1- α , активируя данные белки, но так же увеличивать экспрессию *Ppargc1a*. Так как мы не обнаружили данного эффекта, то можем предположить, что ключевую роль в активации Nrf2 играет H₂O₂, который способен непосредственно окислять одновременно Keap1 и участвовать в ингибировании GSK3 β , что в итоге активирует Nrf2.

Обобщая полученные данные, мы можем сделать вывод о том, что мягкий окислительный стресс, индуцированный продукцией H₂O₂, вызываемый МС, запускает цепь компенсаторных реакций, которые в итоге приводят к активации митохондриального биогенеза и антиоксидантной защиты через Nrf2/ARE-сигнальный путь. Но при этом закономерным выглядит вопрос о том, может ли продуцированный H₂O₂ приводить к дегенеративным процессам в клетках (рис. 23). Результаты изучения генотоксичности МС в различных физиологических условиях, как *in vivo*, так и *in vitro* представлены в главе 7.2.

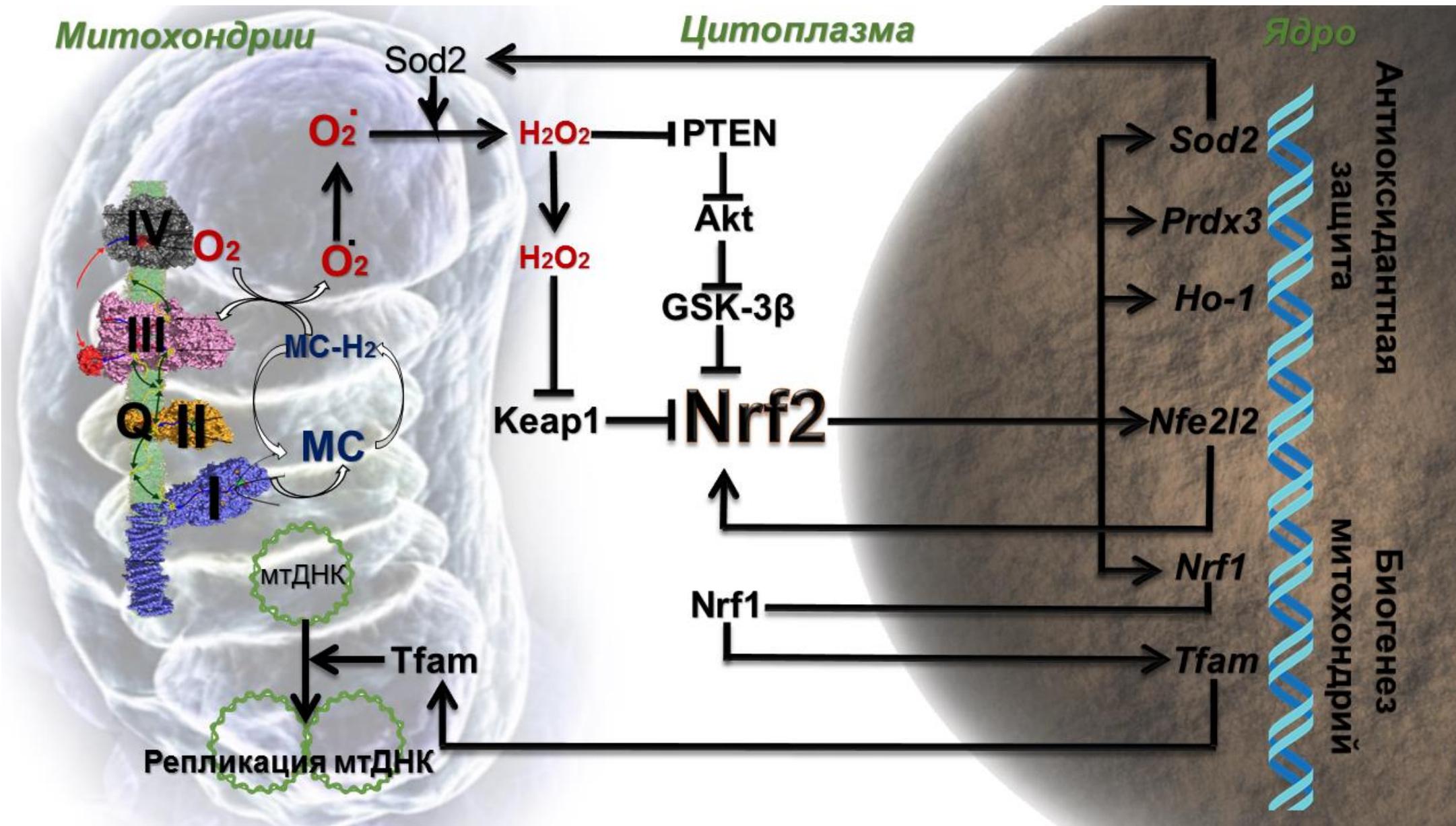


Рис. 23. Схема активации митохондриального биогенеза за счет метиленового синего

ГЛАВА 5. ВЛИЯНИЕ β -ГУАНИДИНОПРОПИОНОВОЙ КИСЛОТЫ НА МИТОХОНДРИАЛЬНЫЙ БИОГЕНЕЗ

5.1. Влияние дефицита креатина на поведенческие особенности мышей

Функциональность клетки зависит от постоянства доступа большого количества АТФ. Потребление и производство АТФ должны быть сбалансированы. Баланс особенно важен для клеток с высоким и колеблющимся энергетическим обменом, которые используют огромное количество АТФ за короткий промежуток времени. К таким клеткам относятся клетки скелетных и сердечных мышц, мозга, фоторецепторов сетчатки, сперматозоиды [178; 387].

Зачастую окислительное фосфорилирование или гликолиз, сопряженные с производством АТФ, не всегда совпадают по времени с энергетическими потребностями клетки. Для этого у клеток есть способность депонировать энергию за счет фосфотрансфера из АТФ [308]. Обеспечивает данный процесс три семейства киназ: аденилат-киназы, нуклеозиддифосфат-киназы и креатинкиназы [112]. Креатинкиназные ферменты катализируют обратимый перенос фосфата из АТФ в креатин, получая высокоэнергетическое соединение фосфокреатина и АДФ: $\text{АТФ} + \text{Креатин} \leftrightarrow \text{АДФ} + \text{Фосфокреатин}$. Фосфокреатин служит хранилищем энергии и транспортным соединением, которое позволяет немедленно регенерировать АТФ в местах, остро нуждающихся в энергии. Скорость получения АТФ из фосфокреатина в 70 раз быстрее, чем при окислительном фосфорилировании [361].

Поступление креатина в организм зависит от типа питания. Мясная диета обеспечивает до половины необходимого в организме креатина. Эндогенный креатин синтезируется из L-аргинина в две стадии, катализируемые сначала аргинин-глицин-амидинотрансферазой (AGAT),

затем гуанидиноацетат-метилтрансферазой (GAMT). Поступление креатина в клетку осуществляется специальным транспортером креатина (CRT) [389].

Полное отсутствие креатина в мозге вызывает серьезные метаболические нарушения, которые приводят к дисфункции мозга, что проявляется в умственной отсталости, заторможенности речи, эпилепсии и возможном проявлении признаков аутизма [89]. Причиной нарушения метаболизма креатина является возможное истощение ферментов GAMT [90], AGAT [54] и дефицит транспортера креатина [390]. Однако в некоторых случаях нарушение метаболизма креатина может обладать положительным эффектом. Одним из вариантов модуляции метаболизма креатина является его замещение структурными аналогами, например, β -гуанидинопропионовой кислотой (β -ГПК).

β -ГПК действует как конкурентный ингибитор поглощения креатина, в результате чего в тканях возникает локальный дефицит АТФ, что приводит к стимулированию окислительного метаболизма. Исследования на животных показали, что прием β -ГПК приводит к изменениям в метаболизме скелетных мышц, которые сходны с результатами гипоксических тренировок на выносливость [266]. В нашем исследовании тест «Струна» показал, что ко второй неделе терапия β -ГПК увеличивала физическую силу и выносливость 15-месячных животных по сравнению с мышами, получавшими инъекции физиологического раствора (рис. 11, $p < 0,01$). Максимальное (приблизительно 3-кратное) увеличение физической силы наблюдалось к концу третьей недели инъекций ($p < 0,01$). Не было статистически значимых различий между мышами, получавшими инъекции физиологического раствора и контрольными мышами, не получавшими инъекций. Быстрый эффект препарата объясняется быстрым замещением креатина в скелетной мышце. Ранее было показано, что уровень креатина снижался на 50% после 2 недель лечения β -ГПК [114] и уменьшался более чем в 2 раза после 3 недель лечения β -ГПК [320].

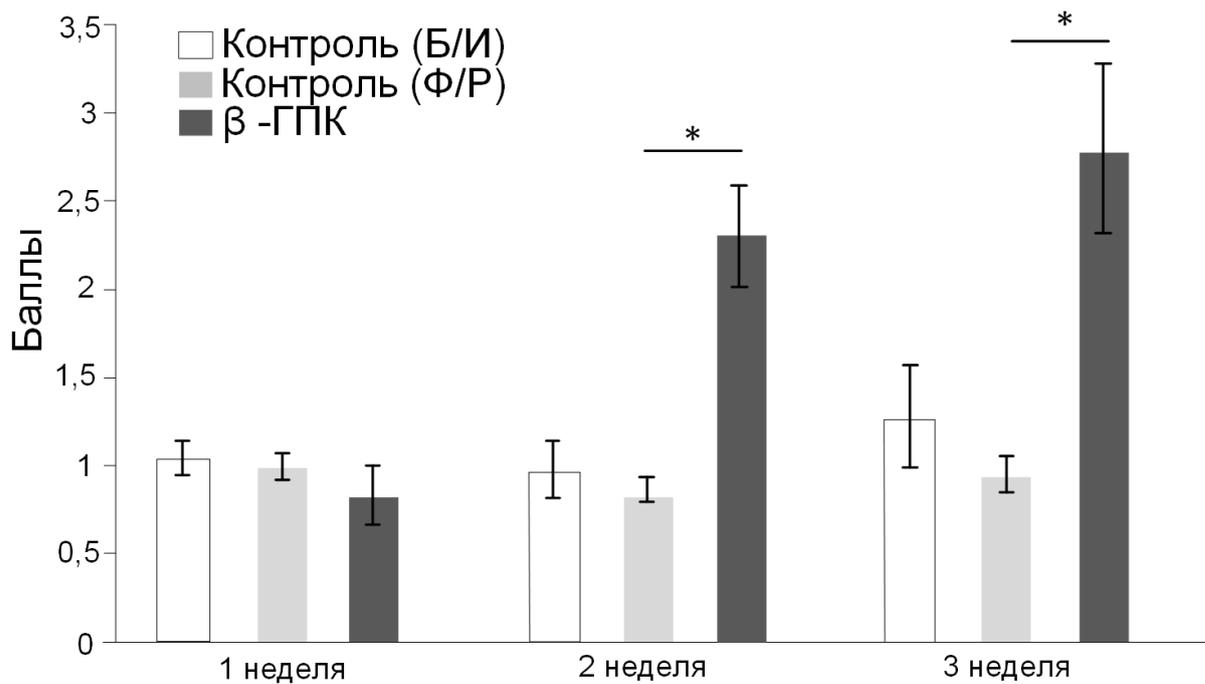


Рис. 24. Результаты теста «Струна». * $p < 0,05$.

Примечательно, что влияние инъекций β -ГПК на поведенческие параметры стареющих мышей тоже было значительным. Мы наблюдали статистически значимые изменения в нескольких параметрах. В тесте «Открытое поле» мыши, получавшие инъекции β -ГПК, проводили в центре больше времени ($F(1,18) = 4,42$; $P < 0,05$) (рис. 25Г), но не было отличий с этой группой по количеству стоек (рис. 25Б). Мыши, не получавшие инъекций, демонстрировали в два раза меньше вертикальных стоек, чем мыши, подвергавшиеся инъекциям ($F(1,18) = 5,54$; $P < 0,05$) (рис. 25Б). Инъекции физиологического раствора и β -ГПК не влияли на подвижность мышей, что проявлялось в общем времени их движения, то есть в горизонтальной активности (рис. 25А). Инъекции уменьшали частоту заглядываний в норки ($F(1,18) = 4,26$; $P < 0,05$), но мыши, которые получали инъекции β -ГПК, не отличались от мышей, которым вводили физиологический раствор по количеству заглядываний в норки (рис. 25В).

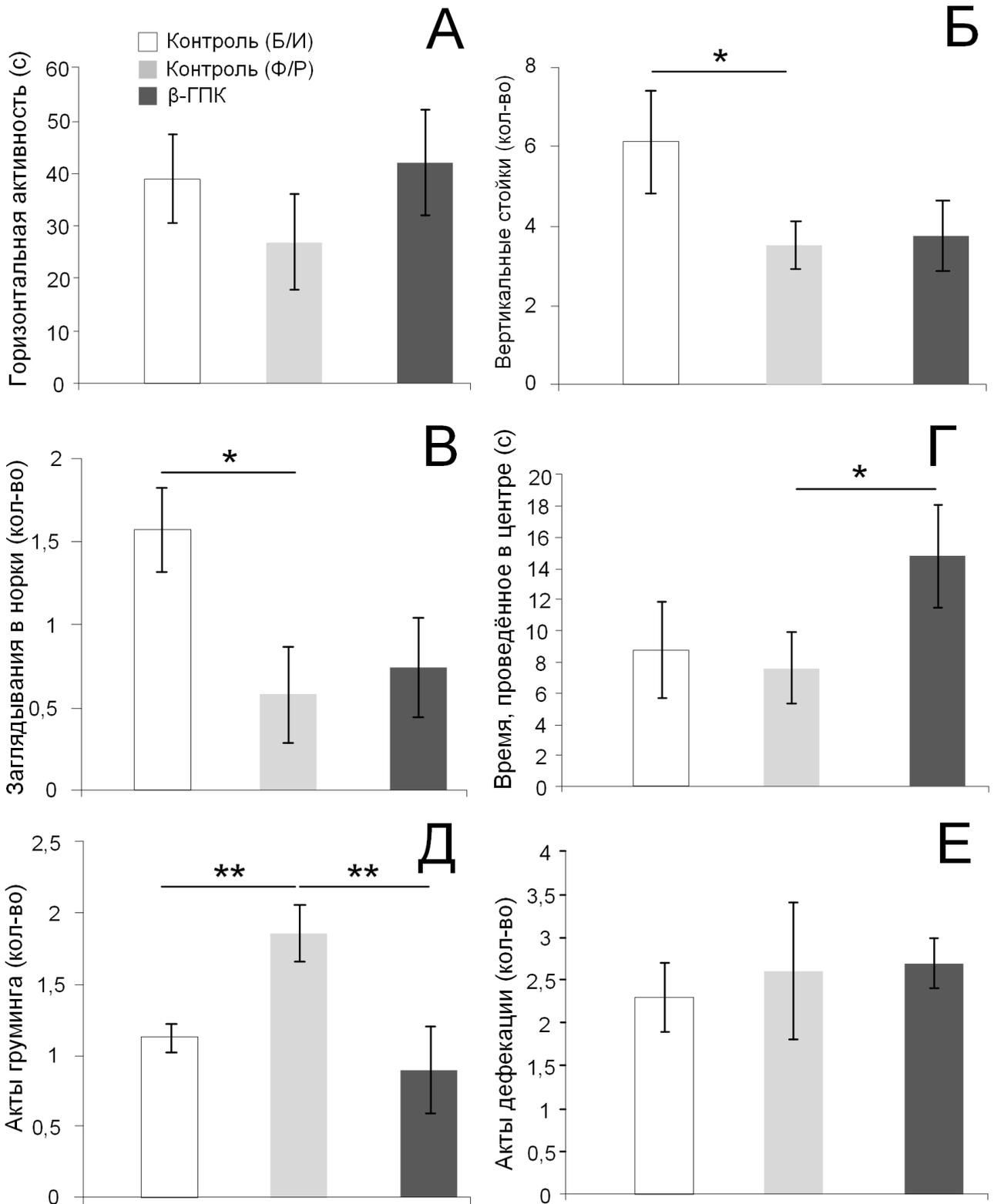


Рис. 25. Результаты теста «Открытое поле». А. Горизонтальная активность мышей; Б. Количество вертикальных стоек; В. Количество заглядываний в норки; Г. Время, проведенное мышами в центре площадки; Д. Количество актов груминга; Е. Количество актов дефекации. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$

В совокупности эти данные указывают на тенденцию к увеличению исследовательского поведения в группе, которая подвергалась лечению β -ГПК, по сравнению с мышами, которым вводили физиологический раствор. Инъекция с физиологическим раствором увеличивала количество актов груминга на 64% по сравнению с мышами, не получавшими инъекций ($F(1,18) = 6,12; p < 0,01$). Однако у мышей, которым вводили β -ГПК, груминг был в 2 раза реже, чем у тех, кому вводили физиологический раствор ($F(1,18) = 4,54, p < 0,01$) (рис. 25Д). Эти данные свидетельствуют о растущей тревожности, вызванной инъекциями, в то время как β -ГПК снижала эту тревожность.

5.2. Влияние дефицита креатина на митохондриальный метаболизм

Инъекции β -ГПК изменяли параметры дыхания (табл. 6) у экспериментальных животных: скорость эмиссии CO_2 у мышей, которым вводили β -ГПК, уменьшилась на 7% ($p < 0,05$), тогда как разницы в скорости потребления кислорода между группами не наблюдалось. Эти изменения привели к снижению дыхательного коэффициента мышей, получавших инъекции β -ГПК с $0,96 \pm 0,01$ до $0,9 \pm 0,02$ ($p < 0,05$). Между мышами, которым вводили физиологический раствор, и мышами, не получавшими инъекций, не было обнаружено различий.

Таблица. 6. Изменение скорости дыхания при инъекциях β -ГПК

	Без инъекций	Физиологический раствор	β -ГПК
Скорость эмиссии CO_2 , мкМ/мин/г	$4,49 \pm 0,24$	$4,41 \pm 0,16$	$4,11 \pm 0,12^*$
Скорость потребления O_2 , мкМ/мин/г	$4,61 \pm 0,32$	$4,56 \pm 0,36$	$4,54 \pm 0,18$
Дыхательный коэффициент	$0,97 \pm 0,02$	$0,96 \pm 0,01$	$0,9 \pm 0,02^*$

* $p < 0,05$

Механизм действия β -ГПК на метаболизм жирных кислот до сих пор недостаточно хорошо изучен. Было обнаружено, что β -ГПК усиливает липидный обмен через усиление экспрессии переносчиков жирных кислот в разных типах мышц [99] и снижение митохондриального дыхательного коэффициента [146]. Наши результаты по измерению потребления кислорода в покое демонстрируют небольшое, но статистически значимое снижение дыхательного коэффициента у мышей, получавших инъекции β -ГПК (табл. 6). В принципе, это не противоречит увеличению вклада β -окисления жирных кислот в общий метаболизм организма.

Однако маловероятно, что это связано с повышением интенсивности окисления жирных кислот в головном мозге, поскольку мы не наблюдали увеличения экспрессии гена *Ppara*, продукт которого является транскрипционным фактором для генов, участвующих в β -окислении. Напротив, количество мРНК для ацетил-СоА-дегидрогеназы (*Acadm*), ацетил-СоА-оксидазы (*Acox1*) и карнитин-пальмитоил-трансферазы (*Cpt1*) было несколько снижено в коре больших полушарий (рис. 26А). Статистически значимых изменений в экспрессии данных генов в среднем мозге не наблюдалось (рис. 26Б).

Можно предположить, что различия в экспрессии связаны с отличающейся физиологической ролью креатинового цикла в разных отделах мозга. Наиболее низкое содержание креатинкиназы характерно для коры больших полушарий по сравнению со средним мозгом и мозгом в целом [91]. Вероятно, с этим и связано более выраженное влияние низких концентраций β -ГПК именно к коре больших полушарий, так как происходит более полное ингибирование креатинового цикла. Другим вероятным объяснением данных различий являются особенности транспорта β -ГПК через гематоэнцефалический барьер [350]. Тем не менее, данный вопрос еще недостаточно хорошо изучен и нуждается в дополнительных исследованиях, которые позволили бы понять характер транспорта и распределения гуанидиновых соединений по различным отделам мозга.

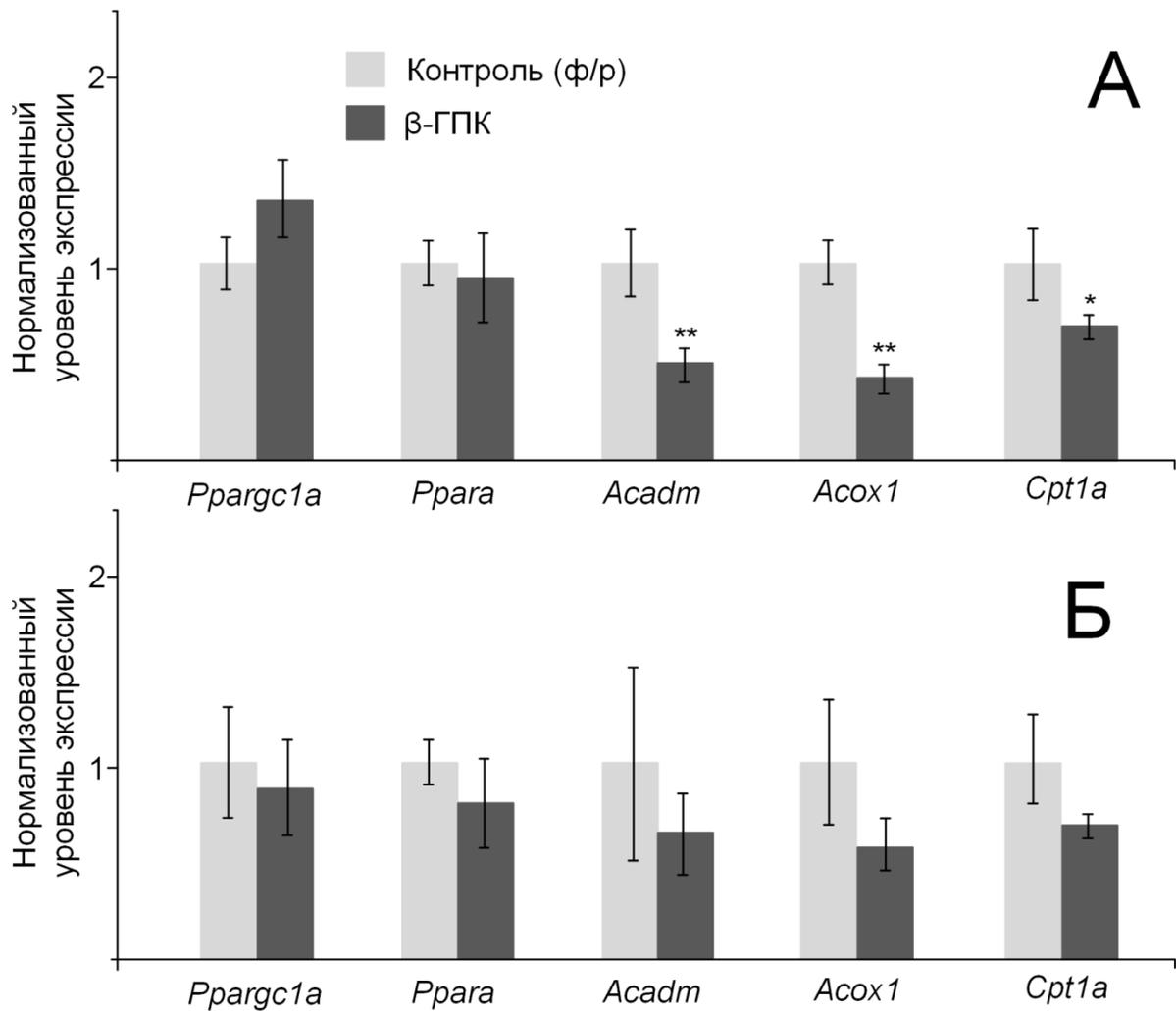


Рис. 26. Изменение экспрессии генов, регулирующих β -окисление жирных кислот, индуцируемое β -ГПК в коре больших полушарий (А) и среднем мозге (Б). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$

Отсутствие увеличения экспрессии генов, кодирующих ферменты, осуществляющие β -окисления, согласуется с результатами ранних исследований β -ГПК, в которых не было выявлено изменений концентрации триглицеридов в крови [70; 81]. Тем не менее, опираясь на свои данные и результаты работ Pandke et al. (2008) [99] и Horvath et. al. (2011) [146], мы не можем утверждать, что β -ГПК не влияет на метаболизм жирных кислот в организме. Возможно, эти изменения затрагивают другие ткани с высоким уровнем энергоемкости, например, бурый жир, что было продемонстрировано Yamashita et al. (1995) [177].

5.3. Влияние дефицита креатина на митохондриальный биогенез

Инъекции β -ГПК вызывают в клетках дефицит АТФ. Смещение равновесия АТФ:АМФ в сторону АМФ приводит к активации аденозинмонофосфат-активируемой протеинкиназе (АМПК) [1]. АМПК может непосредственно фосфорилировать и тем самым активировать PGC-1 α , а также активировать Сиртуин 1 (Sirt1), который деацетилюет PGC-1 α , что также приводит к его активации. Влияние аналогов креатина на митохондриальный биогенез через активацию АМПК/PGC-1 α сигнального каскада было неоднократно продемонстрировано в скелетных мышцах [75; 81; 99]. Похожие результаты были показаны и в головном мозге в работе Horvath et. al. (2011) [146]. Тем не менее, мы не обнаружили увеличения экспрессии гена *Pparg1a*, кодирующего PGC-1 α . Тенденция к увеличению экспрессии *Pparg1a* наблюдалась в коре больших полушарий, но данные статистически недостоверны ($P=0,09$) (рис. 26А).

Тем не менее, в коре и среднем мозге было отмечено увеличение количества митохондрий. Инъекции β -ГПК увеличивали число копий мтДНК в коре головного мозга в 1,7 раза ($P<0,01$) и 1,82 раза в среднем мозге ($P<0,05$) по сравнению с мышцами, получавшими физиологический раствор (рис. 27 А, В). В обоих отделах мозга была увеличена активность цитратсинтазы (рис. 27 Б, Г). Экспрессия митохондриального гена *Cox1* увеличивалась в 1,5 раза в коре больших полушарий и в 1,8 раза в среднем мозге у мышей, которые подвергались инъекциям β -ГПК. То есть, можно сделать вывод об увеличении интенсивности митохондриального биогенеза. Вероятно, это связано с активацией Nrf2/ARE-сигнального каскада. Инъекции β -ГПК способствовали увеличению экспрессии генов *Nrf1* и *Tfam* – транскрипционных факторов, являющихся маркерами митохондриального биогенеза. Кроме того, была увеличена экспрессия некоторых антиоксидантных генов, таких как *Ho-1*, *Sod2* для обоих исследуемых участков мозга, и *Prdx3* для коры больших полушарий. Увеличение экспрессии данных генов является маркером активации Nrf2 (рис. 28).

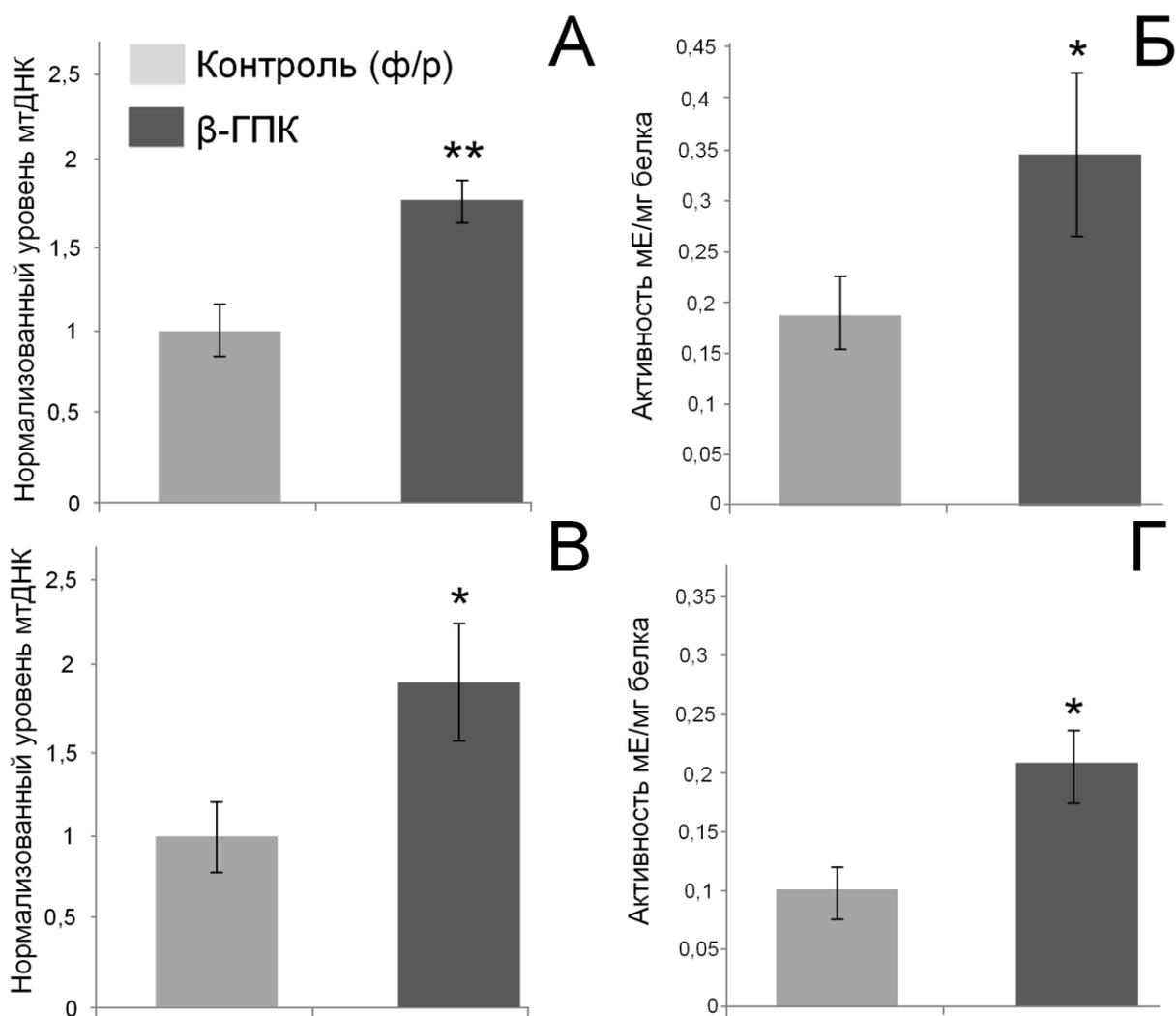


Рис. 27. Влияние инъекций β -ГПК на количество митохондрий в коре больших полушарий (А, Б), среднем мозге (В, Г). Нормализованный уровень мтДНК (А, В) и активность цитратсинтазы (Б, Г). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$

Таким образом можно сделать вывод, что β -ГПК-индуцированные физиологические улучшения у 15-месячных мышей могут быть опосредованы увеличением количества митохондрий в мозге. Тем не менее, до конца не понятен механизм, по которому может происходить увеличение интенсивности митохондриального биогенеза. Вероятно, что там задействованы не AMPK/PGC-1 α , а Nrf2/ARE-сигнальный путь. Мы предлагаем следующую модель действия β -ГПК. Дефицит креатина приводит к снижению уровня АТФ в мозге. Это вызывает компенсаторные реакции, которые в итоге приводят к эффектам, которые могут наблюдаться при умеренных физических нагрузках.

Снижение уровня АТФ вызывает активацию АМПК, которая может непосредственно фосфорилировать Nrf2, и за счет фосфорилирования инактивировать GSK3 β [49].

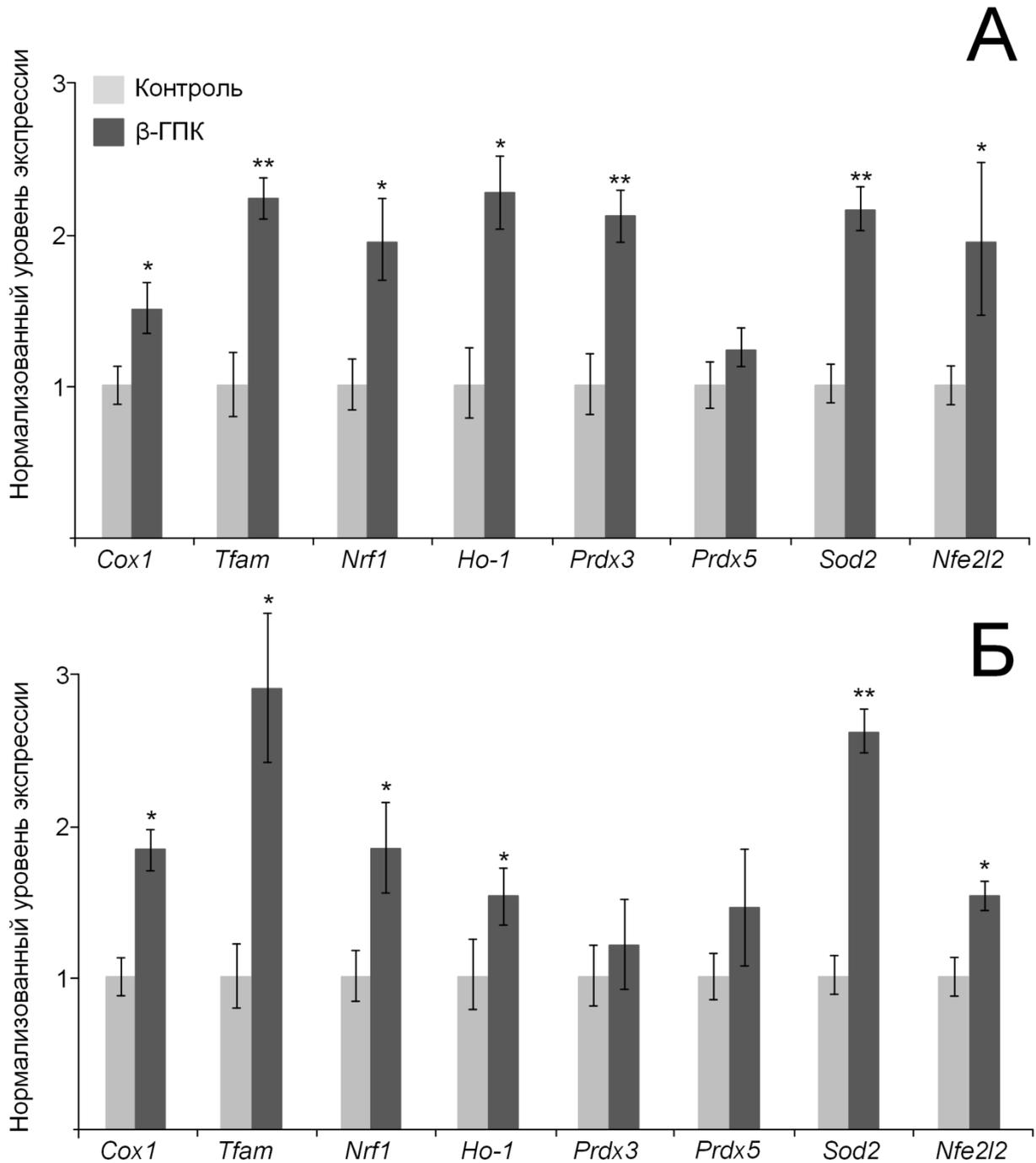


Рис. 28. Изменение экспрессии генов, регулирующих митохондриальный биогенез, индуцируемый β -ГПК в коре больших полушарий (А) и среднем мозге (Б) * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$

Последующая транслокация Nrf2 в ядро приводит к индукции экспрессии генов антиоксидантной защиты и митохондриального биогенеза. По всей видимости, данный процесс является PGC-1 α -независимым, так как активация данного транскрипционного фактора должна быть сопряжена с коактивацией ферментов и класса PPAR (в частности PPAR α), которые увеличивают экспрессию генов, участвующих в β -окислении жирных кислот. Данных изменений в мозге мы не наблюдали (рис. 26).

Данное исследование позволяет предположить, что PGC-1 α в меньшей степени участвует в биогенезе митохондрий мозга по сравнению с такими органами, как сердце, скелетные мышцы и печень. В качестве альтернативного варианта активатора митохондриального биогенеза предполагается Nrf2/ARE сигнальный путь, в активацию которого также вовлечен АМПК (рис. 29).

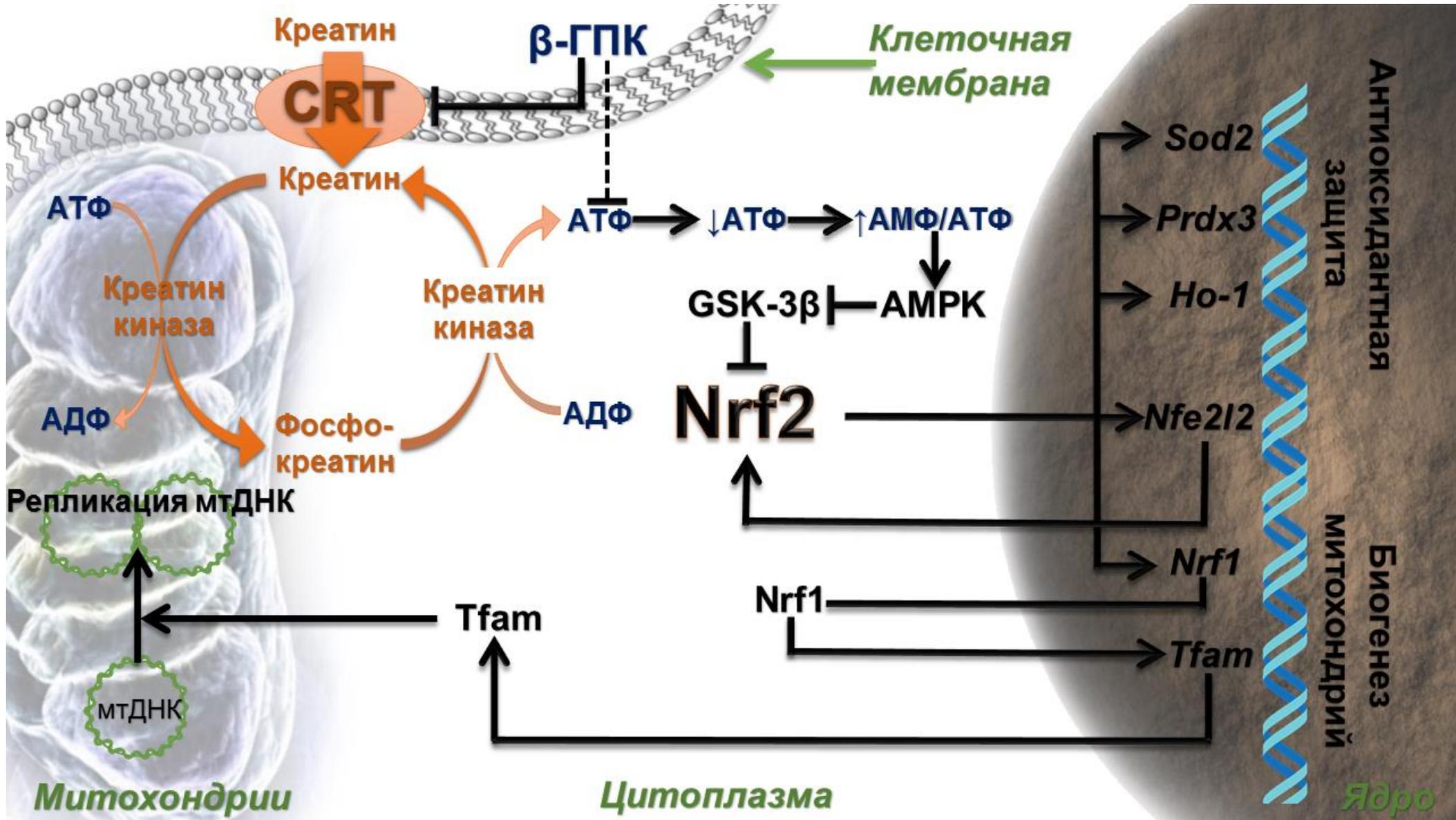


Рис. 29. Схема активации митохондриального биогенеза за счет β -гуанидинопропионовой кислоты

ГЛАВА 6. ВЛИЯНИЕ ФЕНОФИБРАТА НА МЕТАБОЛИЗМ ЖИРНЫХ КИСЛОТ И БИОГЕНЕЗ МИТОХОНДРИЙ

6.1. Влияние фенофибрата на физиологические параметры мышей

Долгое время считалось, что головной мозг использует в качестве источника энергии исключительно глюкозу, в то время как жирные кислоты не могут проникать через гематоэнцефалический барьер и вносить хоть какой-либо вклад в энергетический метаболизм мозга [338]. Правда, в последние десятилетия стали накапливаться данные, подтверждающие, что жирные кислоты могут поступать в мозг [151]. Кроме того, согласно некоторым данным, около 20% энергии мозг получает именно за счет окисления жирных кислот [133]. По этой причине, мы считаем, что регуляторы окисления жирных кислот – белки из семейства PPAR – могут оказывать влияние не только на энергетический метаболизм клетки, но и на биогенез клеточных структур, которые ответственны за окисление жирных кислот. К таким структурам относят в первую очередь митохондрии и пероксисомы.

В головном мозге в большей степени экспрессируются PPAR δ и PPAR α . Экспрессия PPAR γ практически отсутствует [202]. Синтетические лиганды PPAR α хорошо изучены и описаны. Они относятся к классу фибратов (клофибрат, безафибрат, гемфиброзил, фенофибрат). Впервые фибраты были использованы в 1970-х годах в качестве липидомодифицирующих веществ, позднее была показана их роль в активации PPAR α [183].

На первом этапе эксперимента проводилось определение оптимальной концентрации фенофибрата, при которой наблюдался бы терапевтический эффект препарата без выраженных физиологических отклонений. Концентрация 0,5% фенофибрата проявляла явную токсичность и приводила к резкому снижению массы тела уже через три дня после начала приема препарата. Дальнейшее использование этой концентрации было признано нецелесообразным. В опытных группах животных, получавших 0,2% и 0,15%

фенофибрат, была отмечена небольшая потеря веса (5-7%), после чего наблюдалось частичное восстановление веса (табл. 7).

Таблица. 7. Изменение массы тела мышей при приеме фенофибрата в различных концентрациях

Группа \ День	Масса (г) 1 день	Масса (г) 3 день	Масса (г) 10 день
Контроль	29,8±0,4	30,6±0,4	30,9±0,5
0,5% фенофибрата	30,1±0,2	24,6±1,1*	-
0,3% фенофибрата	30,6±0,6	27,2±0,7*	24,8±0,8*
0,2% фенофибрата	30,2±0,8	28,1±0,4*	28,9±0,4*
0,15% фенофибрата	29,4±0,4	28,6±0,4*	29,2±0,8*

* $p < 0,001$

Диета, содержащая 0,3% фенофибрата, приводила к равномерному снижению массы тела в течение 10 дней эксперимента. На 3 день эксперимента масса тела в сравнении с контролем снизилась на 7,4% ($p < 0,001$). В конце эксперимента на 10 день у мышей, принимавших фенофибрат, наблюдалась потеря веса на 16,3% ($p < 0,001$) (табл. 8).

Таблица. 8. Изменение скорости дыхания при приеме 0,3% фенофибрата

	Контроль	0,3% фенофибрата
Скорость эмиссии CO ₂ , мкМ/мин/г	4,69 ± 0,13	4,39 ± 0,11*
Скорость потребления O ₂ , мкМ/мин/г	4,44 ± 0,38	4,57 ± 0,28
Дыхательный коэффициент	1,06 ± 0,07	0,96 ± 0,04

* $p < 0,05$

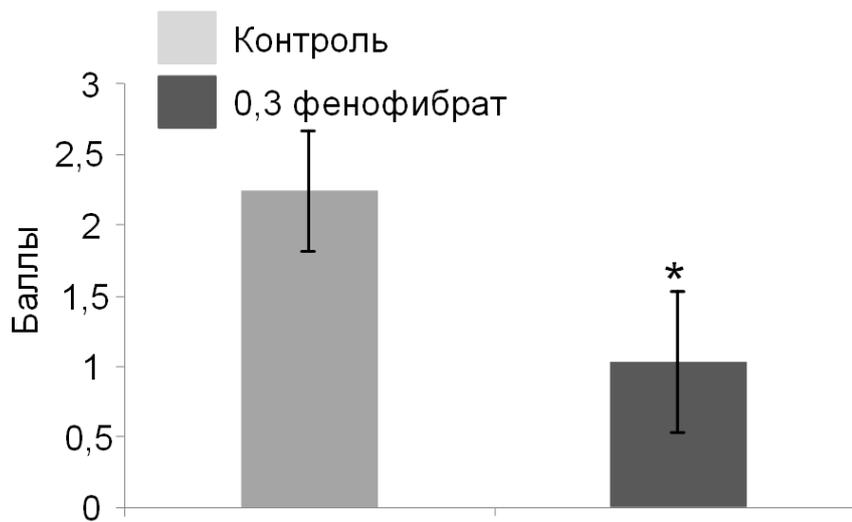


Рис. 30. Результаты теста «Струна» * $p < 0,01$

Предположительно, данный эффект был вызван активацией окисления жирных кислот. Это подтверждается снижением дыхательного коэффициента, что является признаком «переключения» метаболизма на окисление жирных кислот, а не глюкозы (табл. 8).

Обратной стороной снижения массы тела являлось снижение физической силы и выносливости мышей в два раза по сравнению с контролем ($p < 0,01$) (рис. 30). Но вместе с тем мы показали, что фенофибрат оказывает антидепрессантный эффект. Группа мышей, принимавшая фенофибрат, продемонстрировала снижение количества актов груминга $F(1,18) = 4,29$, $p < 0,05$) (рис. 31В). При этом снизилось количество заглядываний в норки $F(1,18) = 3,41$, $p < 0,05$) (рис. 31Д), что может свидетельствовать о снижении уровня исследовательского поведения. Таким образом, данные поведенческих тестов позволяют сделать вывод об антидепрессантных свойствах фенофибрата. Ранее подобный эффект был продемонстрирован в работе Barbiero et al. (2014), где фенофибрат снижал депрессивность у мышей, подвергавшихся инфузии МРТР (модель болезни Паркинсона) [248].

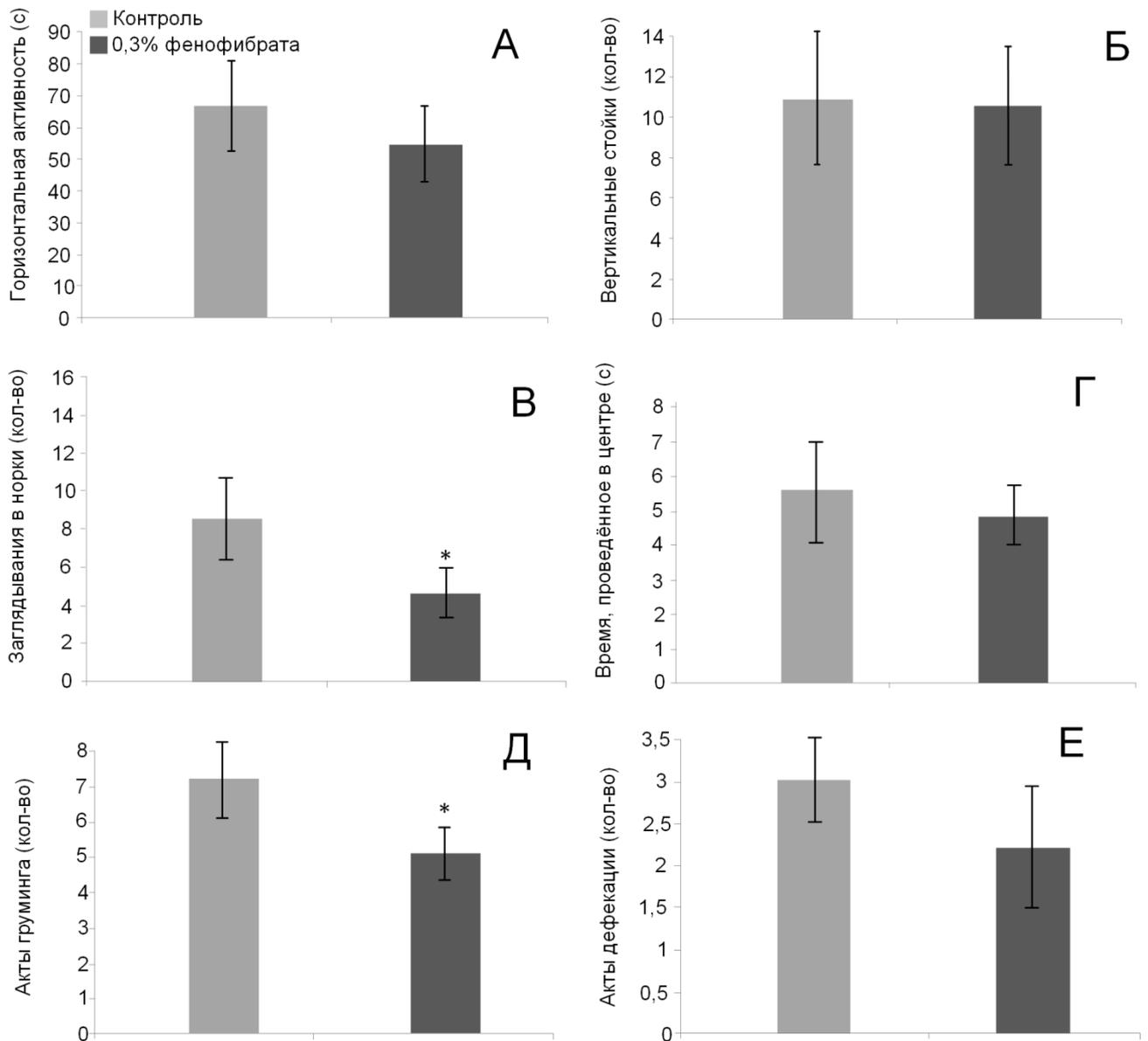


Рис. 31. Результаты теста «Открытое поле». А. Горизонтальная активность мышей; Б. Количество вертикальных стоек; В. Количество заглядываний в норки; Г. Время, проведенное мышами в центре площадки; Д. Количество актов груминга; Е. Количество актов дефекации. * $p < 0,05$.

6.2. Влияние фенофибрата на метаболизм жирных кислот в мозге

Считается, что основной терапевтический эффект фенофибрата достигается за счет липолиза, который обеспечивает ускорение процесса окисления жирных кислот. Данный процесс характерен преимущественно для

жировой ткани [117], печени [104] и сердца [156]. Влияние фенофибрата на метаболизм жирных кислот в мозге изучен в меньшей степени.

Мы показали, что фенофибрат приводил к незначительному увеличению экспрессии генов *Ppargc1a* и *Ppara* в мозге (рис. 32), что должно быть сопряжено с увеличением экспрессии генов, участвующих в β -окислении. Фенофибрат способствовал увеличению экспрессии гена *Acadm* (Acyl-CoA dehydrogenase medium-chain) в 2,2 раза (рис. 32). Это митохондриальный фермент, окисляющий жирные кислоты длиной от 6 до 10 ацил-КоА [172]. При этом в мозге мы не обнаружили увеличения экспрессии гена *Acadvl* (Acyl-CoA dehydrogenase very long-chain) (рис. 32), который катализирует немитохондриальное окисление жирных кислот длиной свыше 14 ацил-КоА [172].

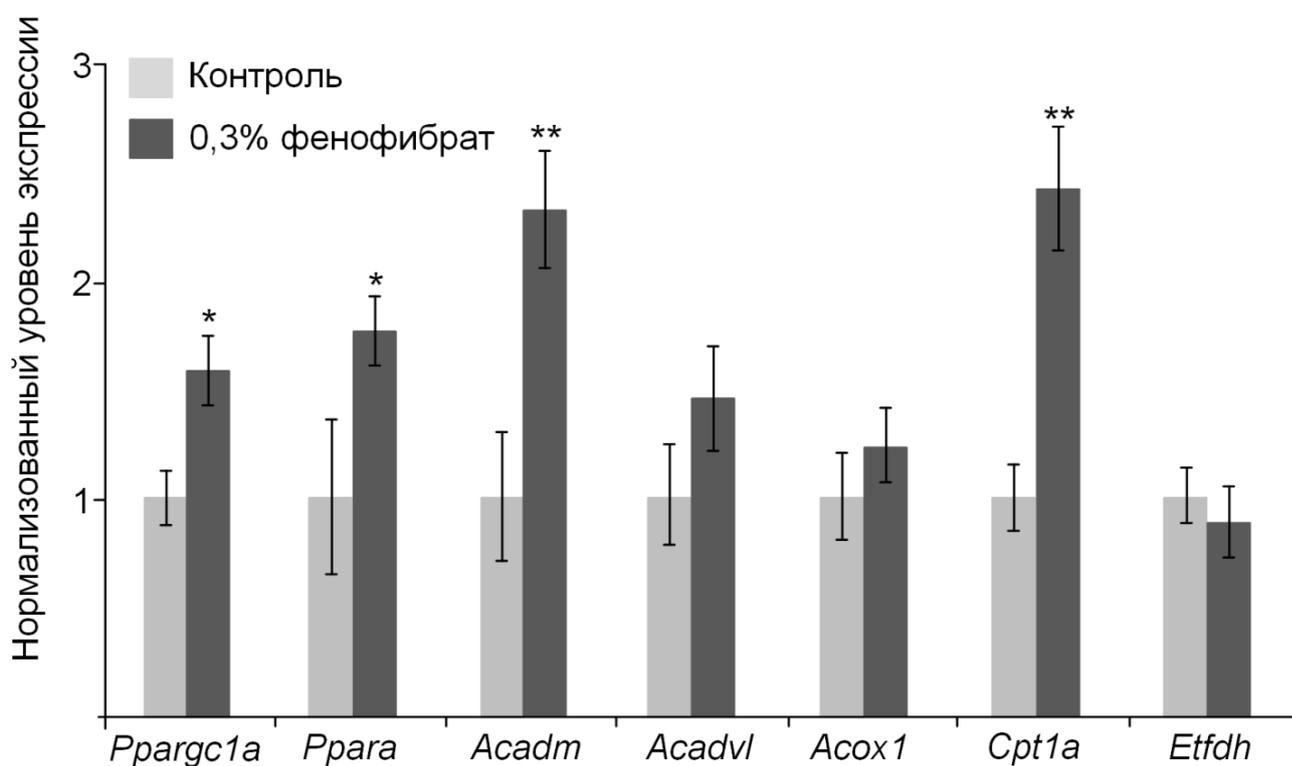


Рис. 32. Изменение экспрессии генов, регулирующих β -окисление жирных кислот, индуцируемое 0,3% фенофибратом в мозге. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Таблица 9. Количество митохондрий в мозге и печени мышей, принимавших 0,3% фенофибрат

	Нормализованный уровень мтДНК		Активность цитратсинтазы, мЕ/мг белка	
	Мозг	Печень	Мозг	Печень
Контроль	1±0,12	1±0,16	0,08±0,01	0,03±0,01
0,3% фенофибрат	1,08±0,12	0,96±0,28	0,09±0,01	0,04±0,02

Мы обнаружили фенофибрат-индуцированное увеличение экспрессии гена *Cpt1a*, который кодирует одну из субъединиц переносчика жирных кислот – карнитин-пальмитоил-трансферазы [125]. Это свидетельствует об усилении транспорта жирных кислот в митохондрии. Увеличения экспрессии гена *Acox1* – ацил-КоА-оксидаза, обеспечивающего пероксисомальное окисление жирных кислот, не было обнаружено (рис. 32). Таким образом, налицо коактивация PGC-1 α и PPAR α , что подтверждается активацией митохондриального β -окисления. Но, тем не менее, мы не обнаружили увеличения количества митохондрий в мозге. Не было отмечено увеличения количества копий мтДНК и активности цитратсинтазы (табл. 9). Не наблюдалось увеличения экспрессии митохондриального гена *Cox1*. Увеличение экспрессии маркеров митохондриального биогенеза – *Tfam* и *Nrf1* было статистически недостоверно. Зато было обнаружено увеличение экспрессии антиоксидантных генов – *Prdx5* и *Sod2* (рис. 33). Вероятно, это может быть связано с активацией Nrf2/ARE сигнального пути. Имеются работы, показывающие возможность коактивации Nrf2/ARE и PPAR γ , что имеет большой фармакологический потенциал для лечения метаболических заболеваний, таких как диабет [192]. Но мы показываем, что, судя по всему, нет прямого взаимодействия между PPAR α и Nrf2-сигнальным каскадом. По крайней мере, активация PPAR α не сопряжена с запуском компенсаторных реакций, которые приводили бы к запуску митохондриального биогенеза в мозге через Nrf2/ARE или PGC-1 α сигнальные пути.

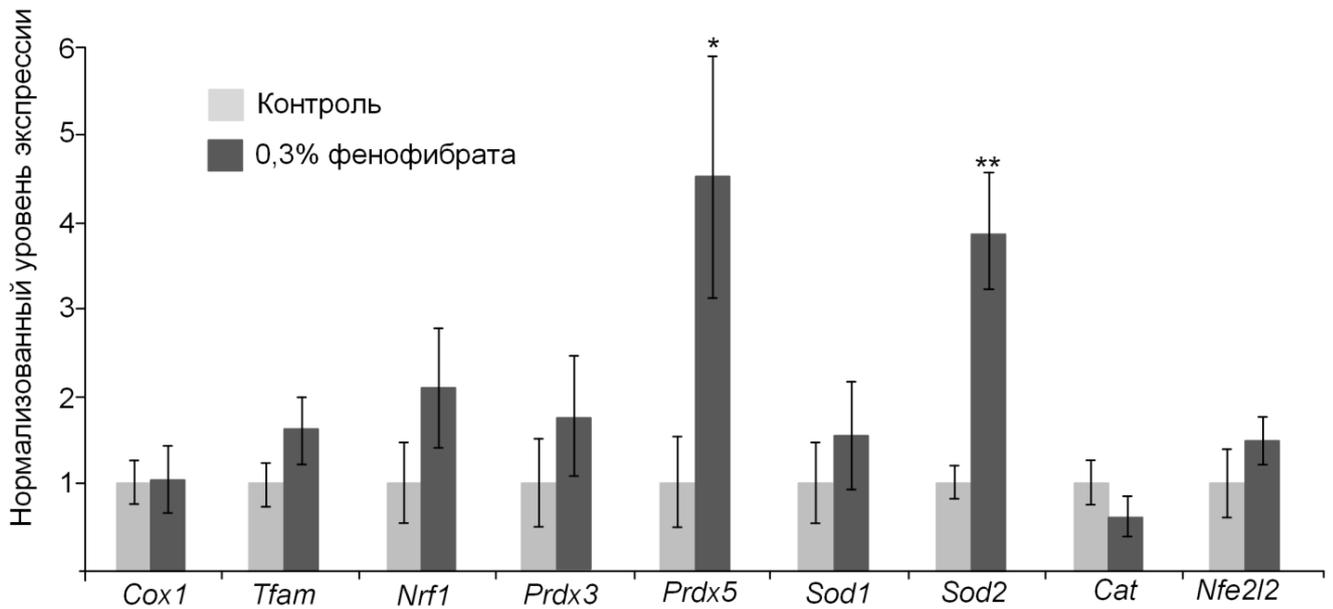


Рис. 33. Изменение экспрессии генов, регулирующих митохондриальный биогенез и антиоксидантную защиту, индуцируемое 0,3% фенофибратом в мозге. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

6.3. Влияние фенофибрата на метаболизм жирных кислот в печени

Несмотря на то, что головной мозг может использовать жирные кислоты для синтеза АТФ, все равно данный орган не является основным потребителем липидов [338]. Для уточнения роли фенофибрата в метаболизме PPAR α и его потенциальной связи с Nrf2/ARE-сигнальным путем, мы изучили экспрессию генов в печени. 0,3% фенофибрат вызывал 8-кратное увеличение экспрессии гена *Acox1* (рис. 34), продукт которого является FAD-содержащим ферментом, катализирующим первую стадию окисления жирных кислот в пероксисомах. Отличие пероксисомального β -окисления от митохондриального заключается в том, что в ходе окисления не накапливаются восстановительные эквиваленты. Электроны переносятся непосредственно на молекулярный кислород, что приводит к образованию H_2O_2 [310].

Таблица 10. Изменение количества диеновых конъюгатов и массы печени мышей, принимавших 0,3% фенофибрат

	Концентрация диеновых конъюгатов, мкмоль/г	Масса печени, г	Соотношение масса печени/ масса тела
Контроль	5,9±0,3	1,1±0,3	0,36±0,03
0,3% фенофибрат	11,1±0,8*	2,4±0,2*	0,96±0,06*

* $p < 0,001$

Следствием этого являлось увеличение содержания диеновых конъюгатов в печени мыши на 47% ($p < 0,001$) по сравнению с контролем (табл. 10). Это свидетельствует об интенсификации процессов перекисного окисления липидов в печени. Кроме того, в качестве побочного эффекта приема 0,3% фенофибрата наблюдалось заметное увеличение массы печени (более чем в 2 раза) ($p < 0,001$) (табл. 10). Печень, являясь основным регуляторным органом, ответственным за контроль метаболизма, наиболее подвержена влиянию различных синтетических препаратов, в том числе и фенофибрата. Известно, что пероксисомные пролифераторы индуцируют как гепатомегалию, так и гиперплазию печени [161]. После 10 дней приема фенофибрата отношение массы печени к массе тела животного составило $0,96 \pm 0,06$, а у контрольной группы это соотношение было $0,36 \pm 0,03$. Таким образом, было установлено, что отношение масса печени/масса мыши у опытной группы в сравнении с контролем выше в два раза. Гиперплазия печени у мышей является процессом, который приводит к развитию гепатокарциномы у мышей за счет подавления апоптоза [128]. Но стоит отметить, что данные процессы характерны для грызунов, в то время как у человека терапевтические дозы активаторов PPAR α не вызывают злокачественные перерождения печени [161].

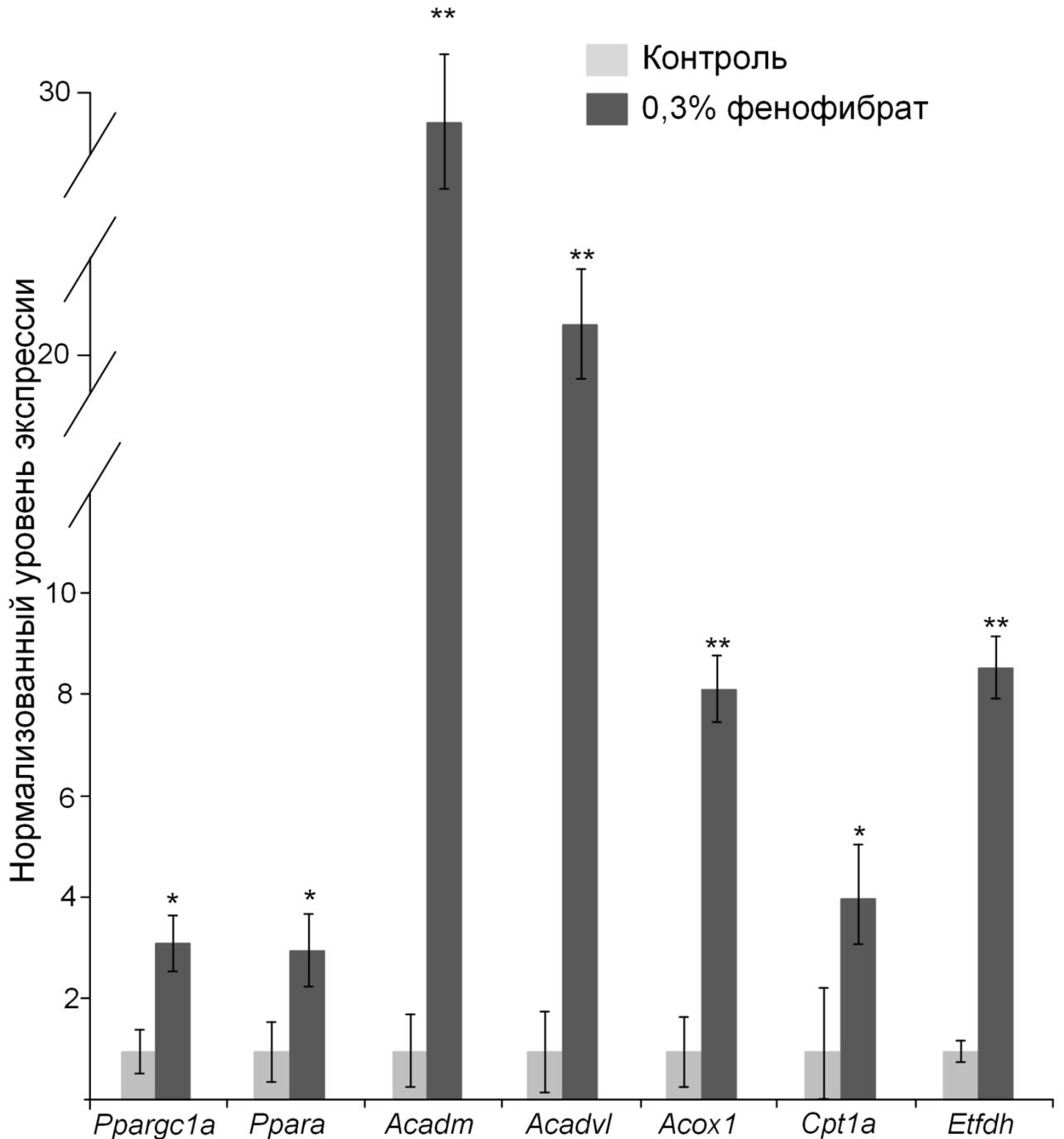


Рис. 34. Изменение экспрессии генов, регулирующих β -окисление жирных кислот, индуцируемое 0,3% фенофибратом в печени. * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$

Мыши, принимавшие 0,3% фенофибрат, демонстрировали 20-кратное увеличение экспрессии гена *Acadvl* ($p < 0,05$) и 30-кратное увеличение *Acadm* ($p < 0,05$), что свидетельствует в пользу значительного увеличения активности процессов митохондриального β -окисления (рис. 34). Кроме того, при приеме 0,3% фенофибрата отмечено 8-кратное увеличение экспрессии гена *Etfdh*

($p < 0,05$), кодирующего электронпереносный флавопротеин, который участвует в переносе восстановительных элементов в дыхательной цепи [84]. Была увеличена экспрессия гена *Cpt1a*, что означает усиление транспорта жирных кислот внутрь митохондрий (рис. 34).

На основании этих данных можно предположить, что увеличение активности митохондриального β -окисления приводит к усилению нагрузки на ЭТЦ митохондрий, и это может быть причиной увеличенной продукции АФК. В связи с этим мы обнаружили существенное увеличение экспрессии *Sod2* и *Prdx3*. Удивительно, но не было обнаружено увеличения экспрессии гена *Cat*, кодирующего каталазу – основной детоксифицирующий фермент пероксисом [100]. Возможно, с этим и связано увеличение количества диеновых конъюгатов в печени мышей, употреблявших 0,3% фенофибрата. При этом в печени мы также не обнаружили следов увеличения интенсивности митохондриального биогенеза. Не было обнаружено увеличения количества мтДНК и активности цитратсинтазы. Тем не менее, была увеличена экспрессия гена *Nrf1*. Эти данные выглядят удивительными, при условии, что не было обнаружено изменений в экспрессии *Tfam* – другого гена-маркера митохондриального биогенеза. Так же, как и в мозге мы не обнаружили увеличения экспрессии *Nfe2l2*.

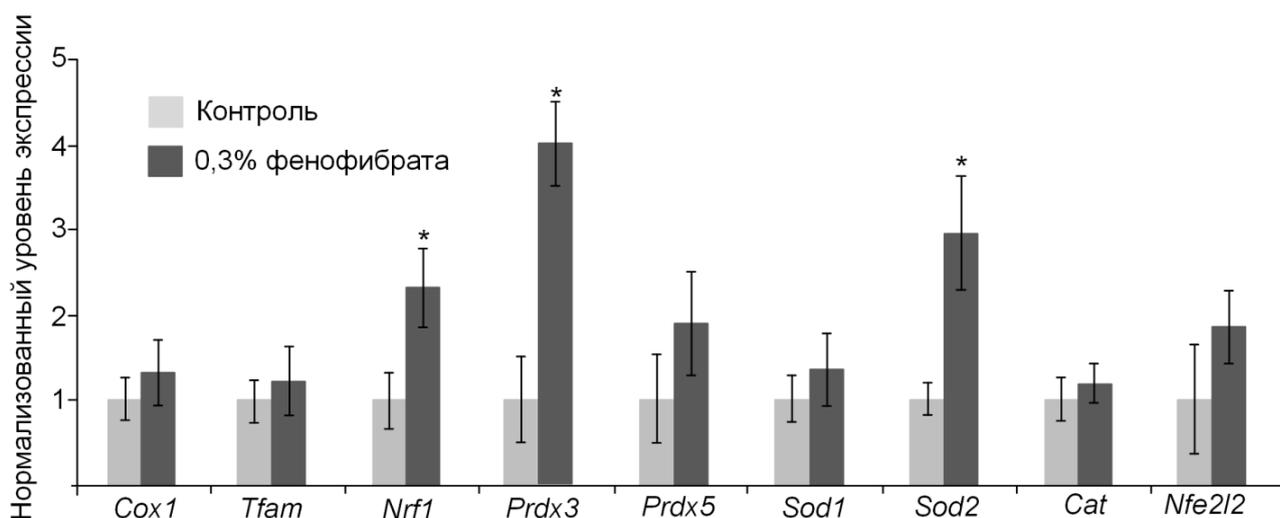


Рис. 35. Изменение экспрессии генов, регулирующих митохондриальный биогенез и антиоксидантную защиту, индуцируемое 0,3% фенофибратом в печени. * $p < 0,05$.

В сумме полученные данные могут свидетельствовать о том, что активаторы PPAR α , такие как фенофибрат, могут способствовать улучшению некоторых поведенческих параметров, например, снижению тревожности. При этом данный процесс, судя по всему, связан с общим улучшением митохондриального метаболизма, проявляющегося в увеличении пероксисомального и митохондриального окисления жирных кислот. Данные процессы не ассоциированы с увеличением митохондриального биогенеза и активацией Nrf2/ARE-сигнального пути (рис. 36). При этом положительный эффект липолиза сочетается с ярко выраженными побочными эффектами, в частности, снижением физической силы и выносливости мышечной ткани, увеличением размера печени, что может являться причиной гепатокарциномы у грызунов. Несмотря на это, фенофибрат на данный момент используется в клинической практике под несколькими торговыми марками для лечения гиперлипидемии [118], так как у людей не наблюдается тех патологических изменений, которые характерны для грызунов, принимающих фенофибрат.

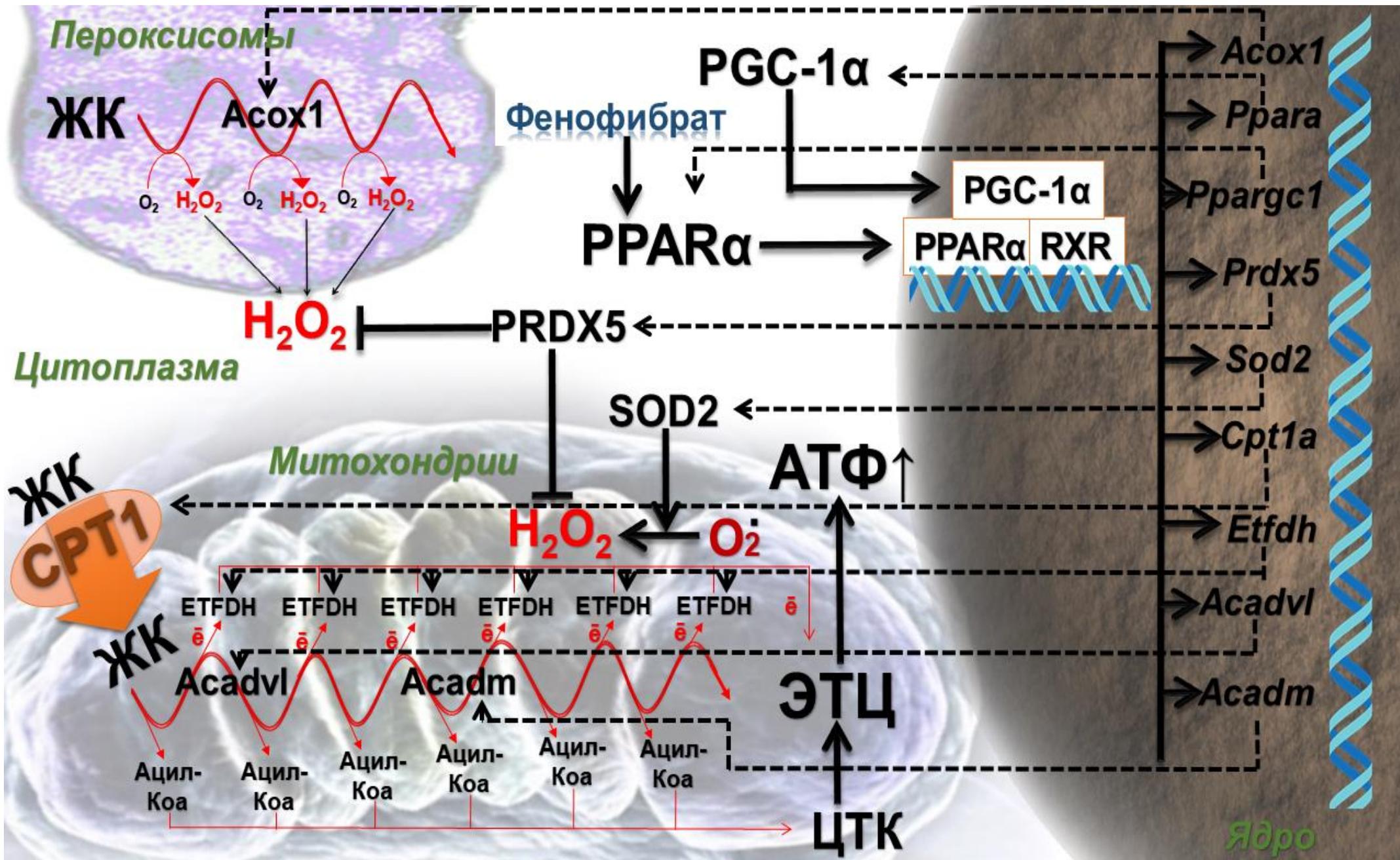


Рис. 36. Схема активации β -окисления жирных кислот за счет активации PPAR α фенофибратом

ГЛАВА 7. ИЗМЕРЕНИЕ КОЛИЧЕСТВА ОКИСЛИТЕЛЬНЫХ ПОВРЕЖДЕНИЙ мтДНК

7.1. Оптимизация метода определения количества повреждений в мтДНК

Предполагается, что накопление ошибок в мтДНК вследствие окислительных повреждений является одной из причин дегенеративных метаболических расстройств и энергетического кризиса в стареющих тканях. Во многом это обуславливается прокариотической организацией митохондриального генома, которая заключается в отсутствии гистоновых белков [40]. Кроме того, классически считалось, что мтДНК обладает менее развитыми системами репарации по сравнению с ядерным геномом, однако последние работы показывают, что это не совсем верно [9]. МтДНК локализуется в матриксе митохондрий, то есть в непосредственной близости с сайтами продукции АФК [2]. С другой стороны, каждая митохондрия содержит множество копий ДНК, поэтому возникающие мутации, теоретически, могут компенсироваться и вследствие этого не будут оказывать сколько-нибудь значимого эффекта на жизнедеятельность этих органелл. Таким образом, нарушения в мтДНК можно рассматривать скорее не только как причину метаболических дисфункций, а как биомаркер их развития, который может характеризовать уровень окислительного стресса в митохондриях различных тканей.

Классические методы определения количества повреждений ДНК, такие как саузерн-блоттинг и высокоэффективная жидкостная хроматография имеют ряд серьезных ограничений [52]. По этой причине в последние два десятилетия многие исследователи используют метод количественной ПЦР длинных фрагментов [107; 203; 231; 239]. Метод основан на предположении, что наличие повреждений в ДНК, например, одноцепочечных разрывов, модифицированных оснований или их аддуктов, будет препятствовать работе ДНК-полимеразы и накоплению ПЦР продукта. Таким образом, скорость

амплификации участка ДНК будет обратно пропорциональна количеству молекул ДНК с повреждениями [52].

На сегодняшний день открыто и исследовано множество вариантов повреждений ДНК, которые индуцируются окислительным стрессом [386]. При этом серьезные митохондриальные повреждения вызываются не только супероксид-радикалом, но и H_2O_2 . H_2O_2 -индуцированное повреждение ДНК опосредуется главным образом ионами железа, которые катализируют образование гидроксильных радикалов ($\bullet OH$), и вызывает такие серьезные повреждения, как одно- и двуцепочечные обрывы цепи ДНК [158; 179]. Другими значимыми повреждениями являются модификации тимина, приводящие к образованию димеров (ТТ) и тимин гликоля [141]. Восьмая позиция имидазольного кольца пуриновых оснований наиболее подвержена окислительным повреждениям, что приводит к образованию 7,8-дигидро-8-оксоаденина (8-оксоА) и 7,8-дигидро-8-оксогуанина (8-оксоГ) [386].

Большинство из этих повреждений способны препятствовать работе полимеразы [108] и, следовательно, могут детектироваться с помощью метода ПЦР длинных фрагментов. Исключение составляет 8-оксоГ, наличие которого в цепи длиной 90 п.н. не оказывает влияния на эффективность ПЦР и значение S_q . Ингибирование синтеза комплементарной цепи происходит только при наличии двух подряд модифицированных гуанинов [113]. Кроме того, многочисленные исследования показывали, что именно 8-оксоГ является самым распространенным типом повреждения ДНК [270]. Ряд источников указывает, что при старении происходит накопление в первую очередь 8-оксоГ [194; 268]. В живых организмах в исправлениях подобных нарушений участвуют ферменты из класса ДНК-гликозилаз, которые расщепляют окисленные пуриновые основания. В частности, фермент формамидопиримидин ДНК гликозилаза (FPG) специфичен к 8-оксоГ. FPG создает в сайтах 8-оксоГ разрывы цепи ДНК, которые способны препятствовать работе полимеразы [107].

В большинстве предыдущих работ сравнивалось количество повреждений ДНК в ядерном и митохондриальном геноме. Для обеспечения наибольшего покрытия ядерного генома амплифицировались, как правило, фрагменты длиной больше 10 т.п.н., и для мтДНК использовались ампликоны эквивалентной длины [107; 203]. Данный подход для определения количества повреждений в мтДНК имеет ряд ограничений. Во-первых, использование одного или двух ампликонов не дает возможность определить, какие участки митохондриального генома в большей степени подвержены повреждениям. Во-вторых, затруднителен подсчет количества повреждений, так как в случае, если на одной копии мтДНК на участке в 10 т.п.н. будет несколько повреждений, то амплификация будет прекращаться всего один раз, и будет учитываться лишь одно повреждение.

Таблица 11. Зависимость эффективности и линейности ПЦР от длины амплифицируемого фрагмента

Длина фрагмента	Эффективность ПЦР	Линейность R^2
295 п.н.	99,7	0,9956
1326 п.н.	92,2	0,9974
2069 п.н.	90,1	0,9919
4546 п.н.	64,1	0,9498
9158 п.н.	33,6	0,9186

Более того, в ходе оптимизации ПЦР длинных фрагментов с использованием Epcuslo-полимеразы нами было показано, что с увеличением длины продукта снижается эффективность ПЦР, что приводит к снижению чувствительности и воспроизводимости метода (табл. 11). Считается, что оптимальная эффективность ПЦР находится в пределах от 90% до 110%, а значение линейности стандартной кривой (R^2) должно быть больше 0,980 [26]. Амплификация фрагментов длиной до 2069 п.н. соответствует этим параметрам, в

то время как для фрагмента длиной 4546 п.н. наблюдается значительно меньшая эффективность (64,1%) и меньшая линейность $R^2=0,9498$. По этой причине при амплификации с использованием Epcuslo-полимеразы фрагментов мтДНК значительно больше 2 т.п.н. будет наблюдаться низкая эффективность ПЦР и, следовательно, низкая валидность полученных результатов (табл. 11). Исходя из результатов оптимизации ПЦР, при определении H₂O₂-индуцированных повреждений мтДНК мы не использовали ампликоны длиной более 2334 п.н. Использование фрагментов данной длины решает выше описанные проблемы, более того, значительно сокращает время элонгации и общую длительность реакции. С другой стороны, использование фрагментов длиной около 1 т.п.н. значительно снижает общее покрытие митохондриального генома. Так, в эксперименте Rothfuss et al. (2010) повреждения мтДНК оценивались менее чем на 25% митохондриального генома [326]. В нашем эксперименте, где размер ампликонов находится в пределах между 1,3 т.п.н и 2,3 т.п.н., общее покрытие мтДНК составляет более 95% (табл. 3).

Следующим ключевым моментом является качество и чистота используемой мтДНК. Известно, что значительные области мтДНК зачастую дублируются в виде псевдогенов в ядерном геноме [230]. С помощью программы BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) мы определили районы мтДНК мыши, дублированные в ядерном геноме. Наибольшая гомология наблюдается с фрагментом 1 хромосомы (Chr1: 24611535 – 24616188) (NC_000067.6), который гомологичен участку мтДНК (ChrM: 6390 – 11042) (NC_005089.1) на 99,94%. Среди других фрагментов мтДНК, дублированных в виде псевдогенов в ядерном геноме, стоит выделить следующие: (Chr2: 22317430 – 22320676) (NC_000068.7) гомологичен участку (ChrM: 4441 – 7679) на 97,36%; (Chr4: 78551799 – 78554673) (NC_000070.6) гомологичен участку (ChrM: 12488 – 15359) на 93,18%, (Chr11: 90538482 – 90539137) (NC_000077.6) гомологичен участку (ChrM: 6216 – 6871) на 90,7%. В остальных фрагментах уровень гомологии либо менее 90%, либо размер гомологичного участка менее 500 п.н. (рис. 37).

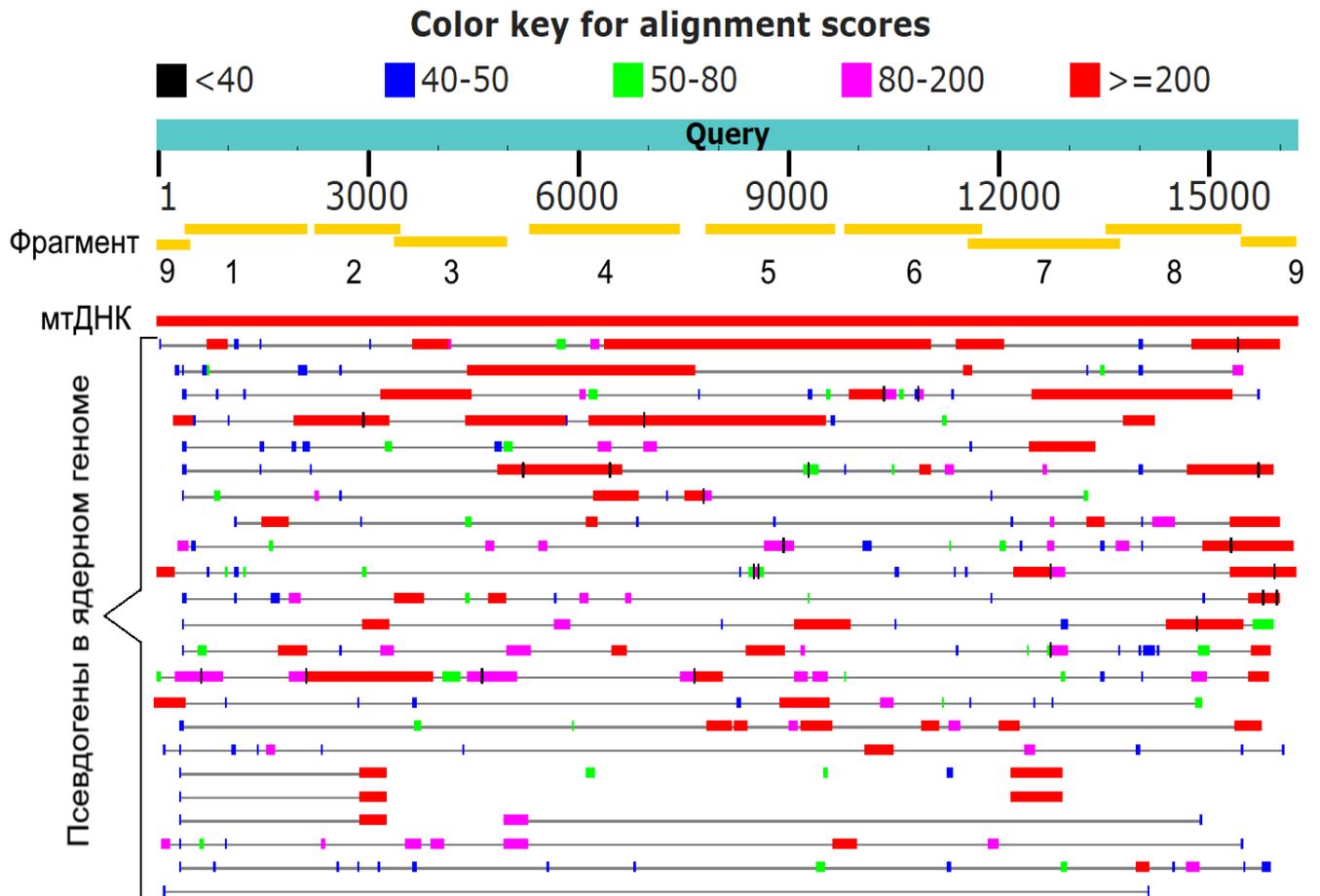


Рис. 37. Псевдогены в ядерной ДНК, дублирующие последовательности мтДНК мыши

Нами была разработана панель праймеров, которая максимально специфична именно к мтДНК (рис. 38). Несмотря на то, что большая часть праймеров в данном исследовании являются специфичными к уникальным районам мтДНК, некоторые ампликоны (например, 5 фрагмент) имеют гомологичные участки в ядерном геноме. По этой причине мы считаем, что для определения количества повреждений в мтДНК методом ПЦР длинных фрагментов использование тотальной ДНК не совсем корректно. Однако во всех предыдущих исследованиях количество повреждений мтДНК оценивалось именно из тотальной ДНК.

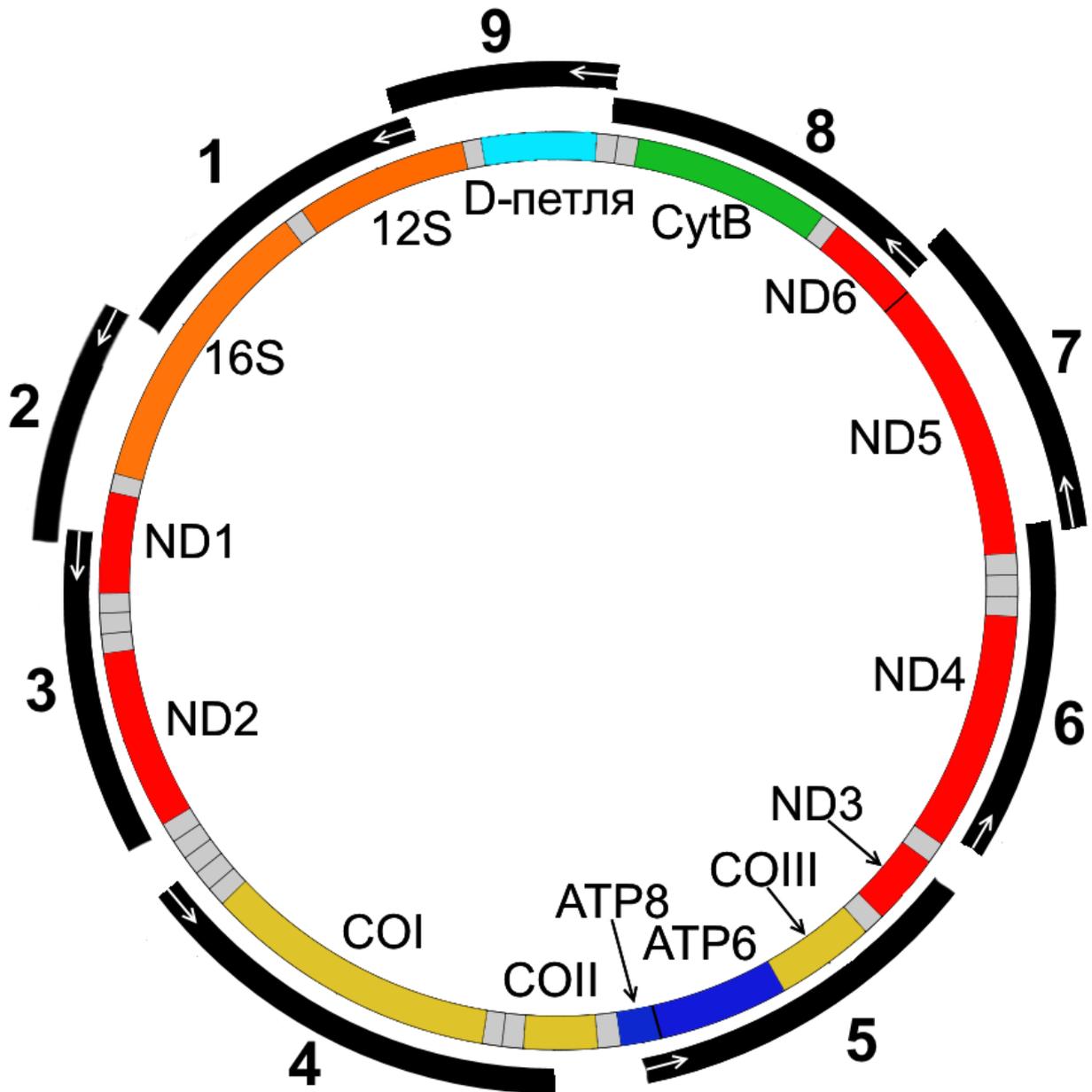


Рис. 38. Схематическое изображение покрытия мтДНК 9 фрагментами. 1) ChrM: 298–2036; 2) ChrM: 2078–3403; 3) ChrM: 3318–4992; 4) ChrM: 5784–7517; 5) ChrM: 7858–9763; 6) ChrM: 9895–11856; 7) ChrM: 11775–13717; 8) ChrM: 13650–15381; 9) ChrM: 15361–369. Черные линии обозначают собственно ПЦР фрагменты. Голубой участок обозначает некодирующий регион D-петли. Оранжевые участки – гены рРНК, Красные участки – гены субъединиц I комплекса ЭТЦ. Зеленый участок – ген субъединицы III комплекса ЭТЦ. Желтые участки – гены субъединиц IV комплекса ЭТЦ. Синие участки – гены субъединиц АТФазы.

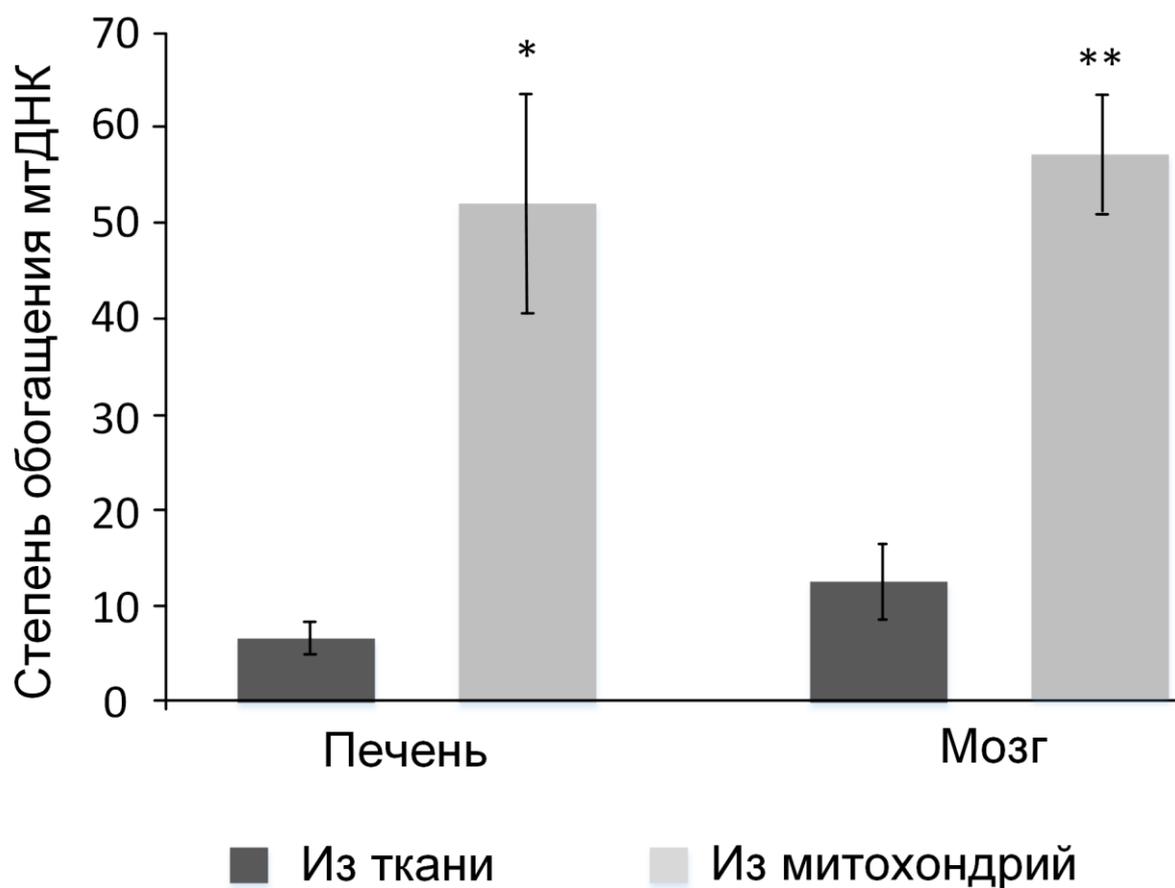


Рис. 39. Степень обогащения препаратов мтДНК, выделенных различными способами из печени и мозга.

Метод выделения мтДНК, основанный на методе Quispe-Tintaya et al., (2013) [132] заключается в том, что плазмидная ДНК бактерий по своим свойствам схожа с мтДНК млекопитающих. Использование набора Plasmid Miniprep при выделении мтДНК из изолированных митохондрий печени и мозга позволило нам получить мтДНК с высокой степенью обогащения ($52 \pm 13,4$ для печени и $57,2 \pm 6,3$ для мозга) (рис. 39). Дополнительная очистка препарата мтДНК с помощью AMPure beads приводила к увеличению значения обогащенности до $125,7 \pm 20,3$ в печени и $235 \pm 10,8$ мозга (данные не представлены). Однако подобная положительная селекция мтДНК приводит к тому, что поврежденные молекулы будут подвергаться элиминации, и по этой причине очищенная с помощью AMPure beads мтДНК может быть использована при выявлении мутаций методами секвенирования нового

поколения, но не при определении числа повреждений с помощью ПЦР длинных фрагментов. Тем не менее, и при 50-кратном обогащении мтДНК теоретической возможностью неспецифического отжига ДНК-полимеразы можно пренебречь.

7.2. Повреждения, индуцируемые H_2O_2

Для экспериментального получения повреждений мтДНК изолированные митохондрии печени и мозга в течение 30 минут инкубировали с 500 мкМ H_2O_2 . Согласно литературным данным, H_2O_2 оказывает повреждающий эффект на мтДНК в клеточных культурах в концентрациях от 20 мкМ до 1000 мкМ [107; 239; 306; 326]. Митохондрии млекопитающих обладают сложной системой ферментативной и неферментативной антиоксидантной защиты [2, 12]. В частности, ряд исследований показал, что изолированные препараты митохондрий мозга способны утилизировать экзогенную H_2O_2 со скоростью от 8 до 12 нмоль H_2O_2 /мин/мг белка [109; 335; 394]. Максимальная физиологическая концентрация H_2O_2 100 мкМ была зафиксирована в мозге крыс после ишемии и последующей реперфузии [208]. На рисунке 40 показано, что 9 фрагмент, соответствующий некодирующему району мтДНК, так называемой D-петле, наиболее подвержен окислительным повреждениям в митохондриях мозга (3,2 повреждений / 10 т.п.н.). Наши результаты сочетаются с данными Rothfuss et al (2010), полученными при обработке H_2O_2 клеток нейробластомы человека [326] и с более ранними данными, показывающими повышенную восприимчивость регуляторного региона мтДНК к соматическим мутациям при раковых заболеваниях человека [120]. С другой стороны, в исследованиях Rothfuss было показано равномерное распределение повреждений в остальных трех регионах мтДНК, а наши данные показывают значительную вариацию в разных участках. От $1,44 \pm 0,4$ повреждений / 10 т.п.н. в 1 участке до $-0,28 \pm 0,4$ повреждений в 5 участке.

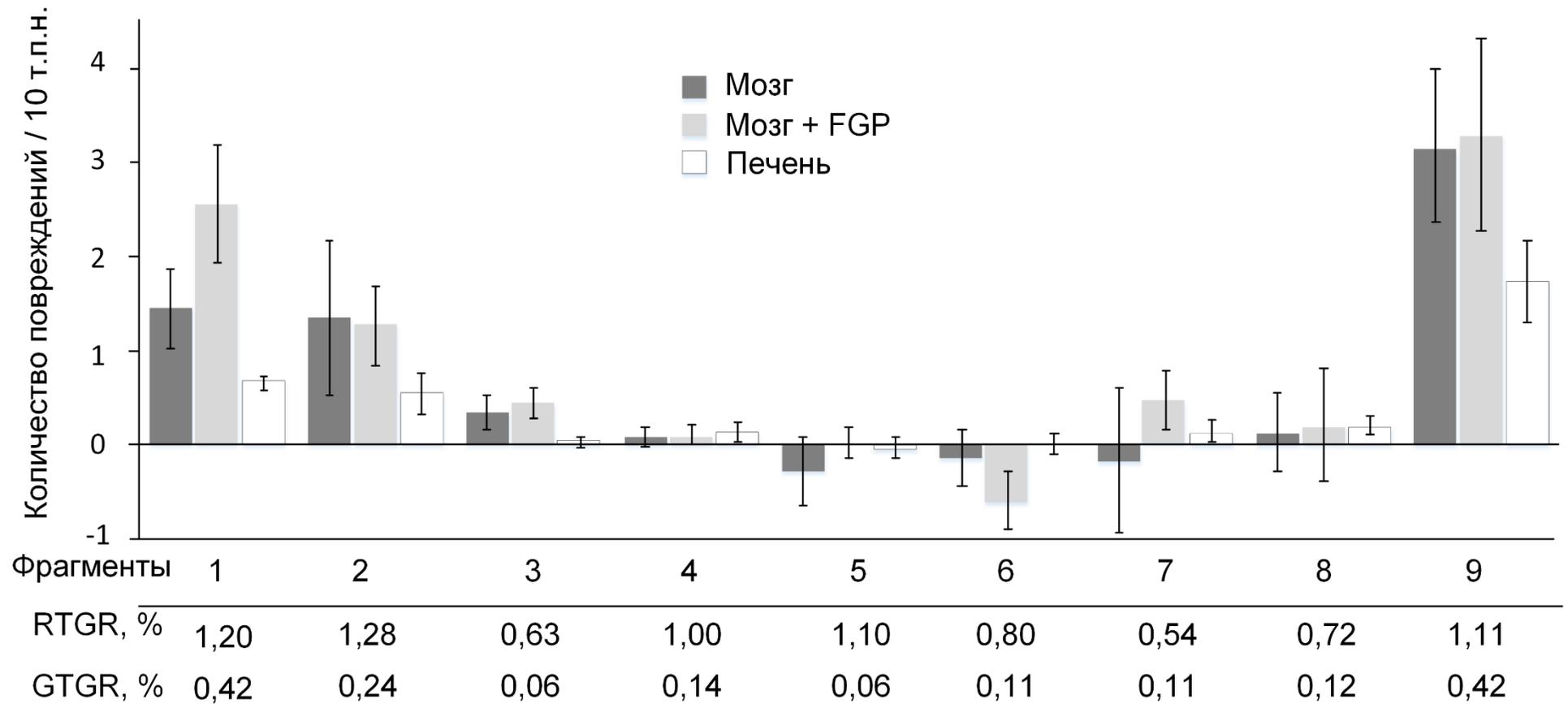


Рис. 40. Количество повреждений в мтДНК, индуцируемых добавлением к митохондриям 500 мкМ H_2O_2 в каждом из 9 фрагментах.

При этом данный эффект не может быть связан с геноспецифичностью, так как примерно один и тот же фрагмент, соответствующий генам ND1 и ND2, у Rothfuss et al. (2010) показывает значительно большую восприимчивость к повреждениям [326] (примерно 2 повреждения/10 т.п.н. мтДНК против $0,33 \pm 0,2$ повреждений / 10 т.п.н. мтДНК в нашем эксперименте) при идентичной концентрации H_2O_2 (рис. 40). Вероятно, причиной таких различий является разница нуклеотидных последовательностей мтДНК мозга мыши и нейробластомы человека.

Исследования Henle et al. (1999) показали, что различные участки ДНК в разной степени подвержены H_2O_2 -индуцированному повреждению. Из-за специфического взаимодействия Fe^{2+} с тиминном, находящемся в окружении трех пуриновых оснований, последовательность RTGR (где R это A или G), более доступна для реакции Фентона [339]. Впоследствии это было подтверждено данными ЯМР [201]. Однако последние исследования Lee и соавт. показали корреляцию между АФК-индуцированным повреждением ДНК с последовательностями GTGR (т.е. GTGA и GTGG), но не для RTGR [342].

В исследованиях Rothfuss et al (2010) во всех четырех фрагментах [326] наблюдалось примерно равное количество RTGR последовательностей (0,6%; 0,8%; 0,5% и 0,8%). В нашем эксперименте самое большое количество RTGR последовательностей в 1 и 2 фрагменте (1,2% и 1,3%), которые характеризуются наибольшим числом повреждений при обработке митохондрий H_2O_2 . Однако корреляционный анализ показал большую корреляцию числа повреждений с GTGR последовательностью ($r_s=0,78$; $p=0,01$), в то время как с RTGR последовательностями наблюдаемая корреляция статистически недостоверна ($r_s=0,53$; $p=0,07$). Эти данные согласуются в большей степени с исследованиями Lee et al.(2016) [342], чем с более ранними данными Henle et al. (1999), однако описанный в данной работе механизм повреждения специфических нуклеотидных реакций ДНК объясняет полученные нами данные [339]. Аналогично, с последовательностями GTGR коррелирует число повреждений в печени ($r_s=0,9$; $p=0,002$).

Фрагмент D-петли обладает наиболее высоким числом GTGR последовательностей 0,4%, но, судя по всему, высокое число повреждений связано не только с этим. В эксперименте Rothfuss et al. (2010) количество GTGR последовательностей 0,2%, столько же, сколько и в остальных фрагментах, а число повреждений значительно выше [326]. Вероятно, это связано с тем, что район D-петли, в котором происходит инициация и терминация транскрипции и трансляции обладает сложной структурой. Этот некодирующий фрагмент содержит промотор для легкой цепи (L-strand promoter LSP), промотор для тяжелой цепи (H-strand promoter HSP), сайт начала репликации (O_H) и консервативные последовательности, участвующие в терминации процессов трансляции и транскрипции (termination-associated sequence – TAS) [206]. В процессе формирования D-петли между O_H и TAS гибридизуется 7S ДНК [292]. Предположительно, эта трехцепочечная структура в большей степени подвержена окислительным повреждениям [326]. Эти результаты отчасти согласуются с исследованиями точечных мутаций в митохондриях мозга, где нередко наблюдается гетероплазмия именно в некодирующем участке D-петли, что может являться следствием повышенной частоты соматических мутаций [168; 343]. А повышенное число соматических мутаций может вызываться в том числе и окислительными повреждениями. Несмотря на то, что большинство из них являются летальными и блокируют репликацию мтДНК, некоторые, в том числе 8-оксоГ и 8-оксоА являются потенциально мутагенными и способны приводить к накоплению соматических мутаций [386].

Удивительным выглядит отрицательное значение количества повреждений в 5, 6 и 7 фрагментах мтДНК. Малое количество повреждений в принципе коррелирует с небольшим числом GTGR последовательностей (0,05%; 0,1% и 0,1% соответственно) (рис. 40). Но это объясняло бы небольшое число повреждений, но не их отрицательное значение. Вероятно, причиной этого являются изменения в суперспиральной конформации мтДНК при воздействии с повреждающими факторами. В клетках мтДНК представлена в

различных структурных формах: в виде суперспирали со 100 оборотами, в виде расслабленной круговой или линейной молекулы [77]. Известно, что окислительные повреждения, в том числе вызванные и H_2O_2 , могут повреждать не только отдельные азотистые основания, но и инициировать релаксацию суперспиральной конформации мтДНК [80]. Мы можем предположить, что в участках, богатых GTGR, при добавлении H_2O_2 происходят значительные повреждения мтДНК, что ведет к одноцепочечным разрывам, которые препятствуют работе полимеразы, увеличивают значение Sq и, следовательно, увеличивают число повреждений при пересчете на 10 т.п.н. Но это приводит и к ослаблению суперспирали ДНК, делая ее более доступной для ДНК-полимеразы в тех участках, где повреждения минимальны. По этой причине снижается значение порогового цикла ПЦР, и при пересчете количества повреждений на 10 т.п.н. появляется отрицательное значение в сравнении с контролем (рис. 40).

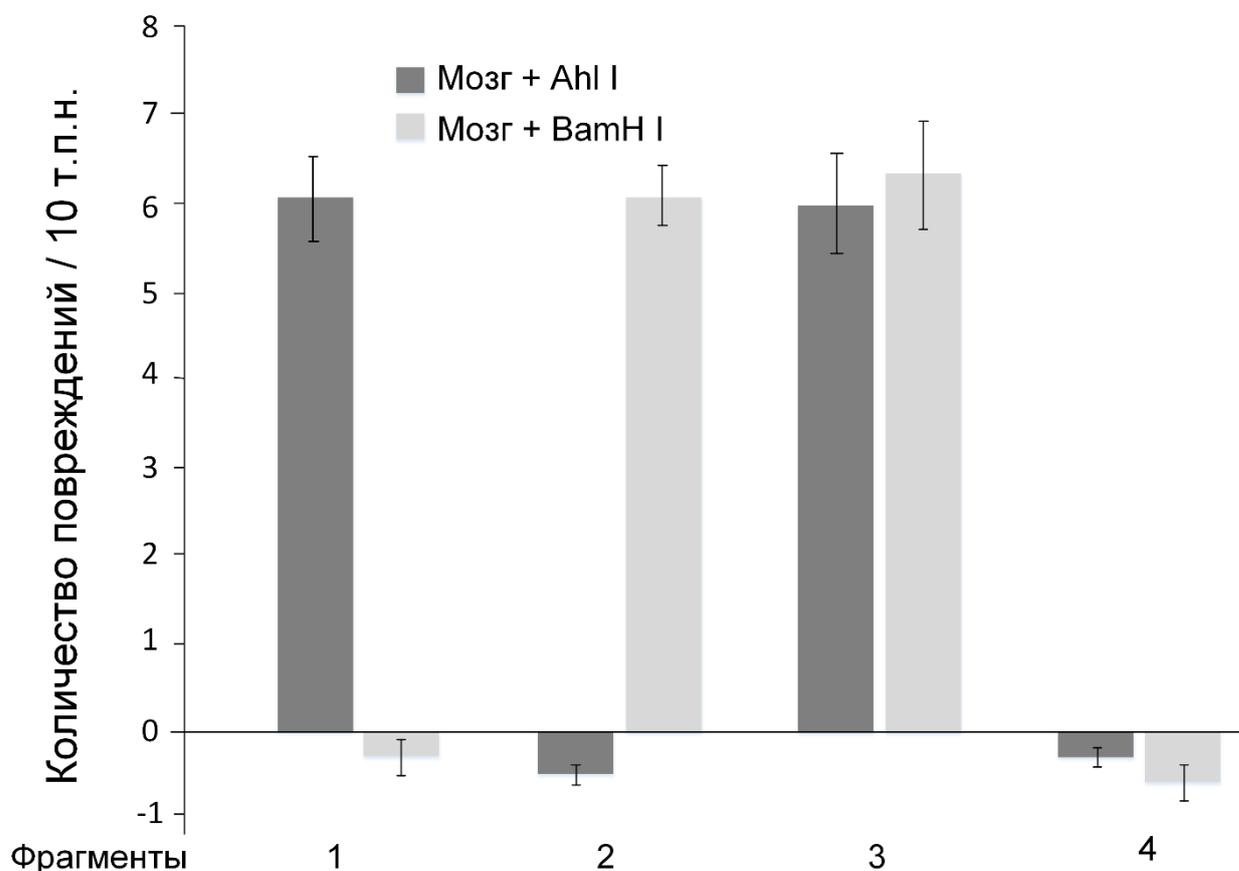


Рис. 41. Повреждения мтДНК, индуцируемые эндонуклеазами рестрикции AhiI и BamHI

Чтобы проверить это предположение был поставлен ряд положительных контролей с одной и той же мтДНК (без инкубирования с H_2O_2), которая обрабатывалась эндонуклеазами рестрикции Ahi I и BamH I. Эти рестриктазы значительно ингибировали работу полимеразы в тех фрагментах, где есть сайты узнавания (примерно 6 повреждений / 10 т.п.н. мтДНК). В то же время в других фрагментах наблюдалось снижение числа повреждений (от -0,3 до -0,6 / 10 т.п.н. мтДНК) (рис 41). Рестрикция мтДНК, так же, как и окислительные повреждения, вызывает расслабление суперспирали, что увеличивает доступность неповрежденных фрагментов для полимеразы. В связи с этим некоторые исследователи использовали эндонуклеазы рестрикции для увеличения эффективности ПЦР мтДНК [107].

Использование фермента FPG не выявило значительного увеличения количества повреждений, индуцированного H_2O_2 , за исключением 1 фрагмента, где наблюдалось статистически достоверное увеличение числа повреждений на 78% ($p < 0,05$). Имеется тенденция к значительному увеличению числа повреждений и в 7 фрагменте, однако данные статистически не достоверны ($p = 0,12$) (рис. 40). Это в целом подтверждает информацию о том, что перекисное окисление приводит к широкому спектру повреждений [386]. Расчет показал, что на долю 8-оксоГ приходится менее 25% всех повреждений при обработке препарата изолированных митохондрий мозга 500 мкМ H_2O_2 .

В митохондриях печени мтДНК в меньшей степени подвержена повреждающему эффекту H_2O_2 . Если анализировать среднее число повреждений мтДНК мозга и печени для девяти фрагментов, статистически значимых различий не наблюдается ($0,66 \pm 0,4 / 10$ т.п.н. в мозге и $0,38 \pm 0,2 / 10$ т.п.н. в печени) ($p = 0,1$) (рис. 40). Это связано с большой вариабельностью количества повреждений 6, 7, 8, 9 фрагментов мтДНК мозга, вызванных нарушением суперспиральной конформации мтДНК (обсуждение см выше). Сравнение количества повреждений в участках 1, 2 и 9, которые наиболее подвержены окислительным повреждениям, показывает статистически

значимые различия ($1,99 \pm 0,6 / 10$ т.п.н. в мозге против $0,96 \pm 0,4 / 10$ т.п.н. в печени, $p < 0,05$). Меньшее количество повреждений мтДНК печени экзогенной H_2O_2 , вероятно, объясняется особенностью антиоксидантной системы митохондрий печени. Известно, что митохондрии печени характеризуются наиболее высокой активностью каталазы, около 825 ± 15 Е/мг белка [73], в то время как активность каталазы митохондрий мозга составляет около $1,8$ Е/мг белка [12, 335].

7.3. Повреждения мтДНК, индуцируемые метиленовым синим *in vitro*

Эффект гормезиса - это характерная черта значительной части фармацевтических препаратов, эффект которых связан с модуляцией катаболических процессов и метаболизма АФК. МС не является исключением, поэтому изучению эффекта гормезиса МС посвящено значительное количество публикаций [66; 214; 323]. Oz et al. (2011) сообщает о том, что в доклинических исследованиях *in vitro* используется МС в концентрации от 1 до 10 мкМ, а токсичные эффекты наблюдаются при концентрации свыше 100 мкМ [75]. Но при этом ранее было показано, что уже 5 мкМ МС вызывает набухание митохондрий [384], а оптимум действия МС приходится на концентрацию от 100 нМ до 1 мкМ [220]. При этом в наших исследованиях на изолированных митохондриях увеличение скорости продукции H_2O_2 начинается уже при 50 нМ МС (рис. 42), а Tretter et al. (2014) наблюдал прооксидантный эффект МС при 100 нМ [123]. Стартовой концентрацией для исследования генотоксичности МС мы выбрали 10 мкМ – самый высокий предел использования МС *in vitro* [75]. Инкубация митохондрий с МС в концентрации 10 мкМ в течение 30 минут не вызывает повреждений в мтДНК ни в одном из исследуемых фрагментов. МС в концентрации 20 мкМ также не оказывает влияния на целостность мтДНК, однако появляется тенденция к накоплению повреждений в 9 фрагменте, который соответствует D-петле ($0,25 \pm 0,4$ повреждений / 10 т.п.н.), но данные статистически недостоверны.

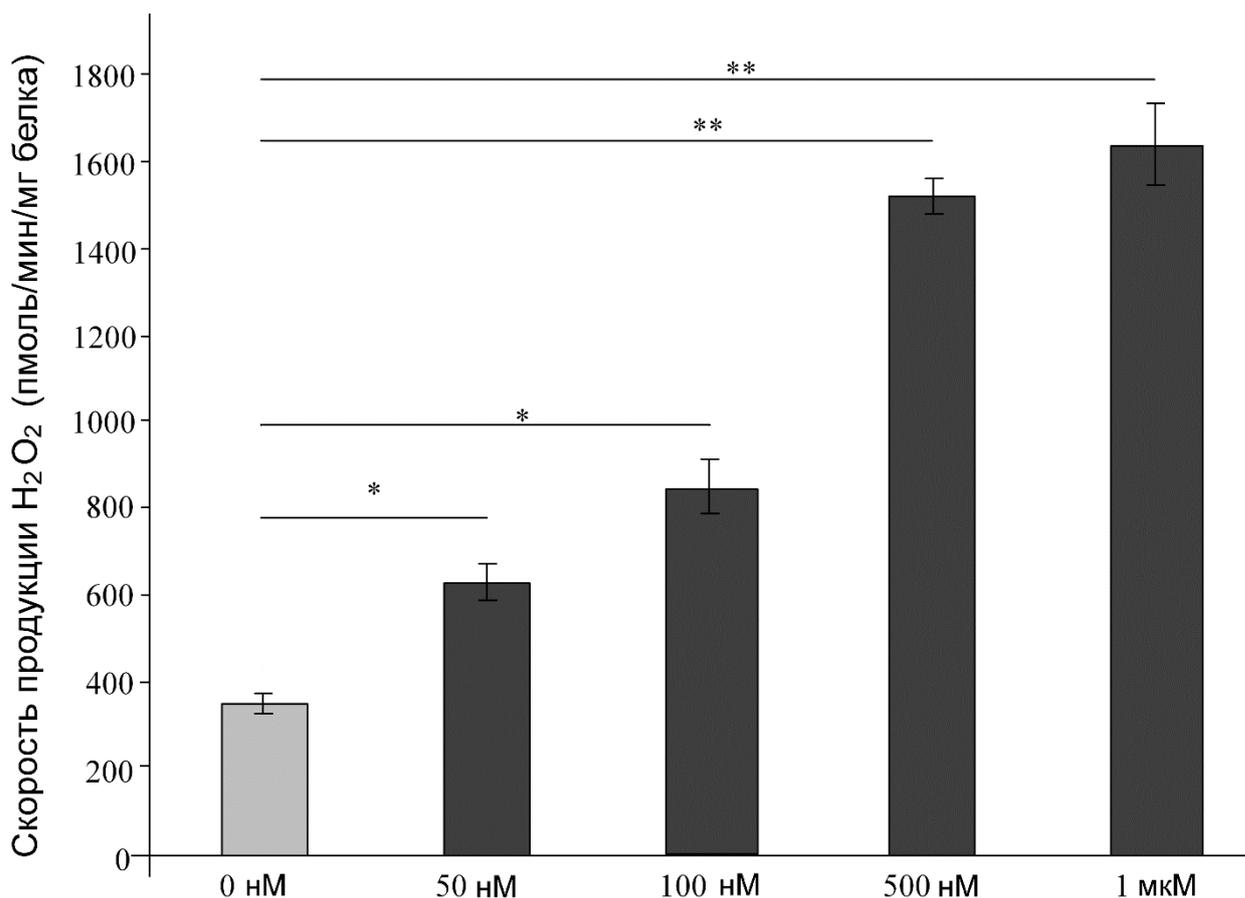


Рис. 42. Скорость продукции H₂O₂ в изолированных митохондриях при добавлении MS в концентрации от 50 нМ до 1 мкМ

Целью данного исследования являлось определение токсичности MS при тех концентрациях, которые применяются в исследованиях, поэтому дальнейшее постепенное увеличение концентрации MS не имело смысла. Но между тем, интересно было выяснить, какие повреждения может вызывать MS при концентрации, значительно превышающей нормальные физиологические. Для этого мы инкубировали изолированные митохондрии мозга при 100 мкМ MS. Сильные повреждения присутствуют в 1 фрагменте ($1,19 \pm 0,5$ повреждений / 10 т.п.н.), 2 фрагменте ($1,14 \pm 0,4$ повреждений / 10 т.п.н.) и 9 фрагменте ($1,51 \pm 0,8$ повреждений / 10 т.п.н.). В 3 фрагменте количество повреждений составляет $0,09 \pm 0,2$ повреждений / 10 т.п.н., а в 7 и 8 фрагментах наблюдалось отрицательное количество повреждений ($-0,32 \pm 0,2$ и $-0,71 \pm 0,4$, соответственно) (рис. 43). Эти результаты в целом совпадают с данными,

полученными при исследовании влияния экзогенной H_2O_2 на изолированных митохондриях, так как повреждались регионы 1, 2, 9, содержащие наибольшее количество GTRG последовательностей (1,2%; 1,3% и 1,1% соответственно).

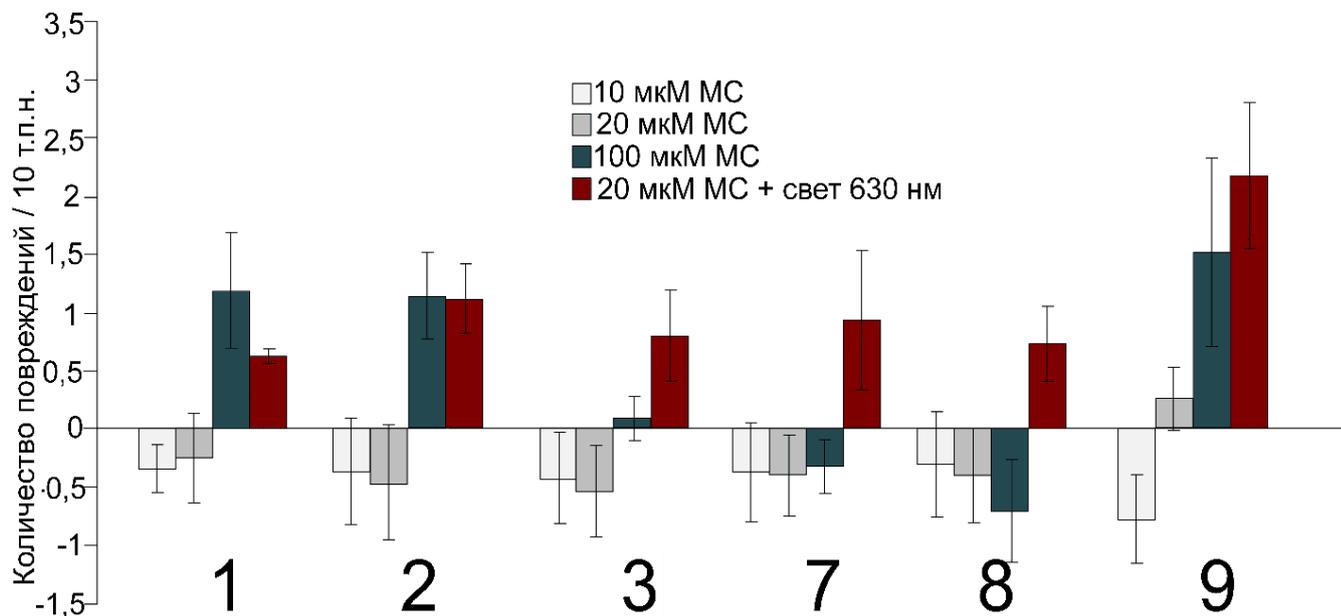


Рис. 43. Количество повреждений в мтДНК, индуцируемое 10, 20 и 100 мкМ МС, а также при фотодинамической терапии с 20 мкМ и облучением лазером с длиной волны 630 нм.

Таким образом, мы можем сделать вывод, что *in vitro* МС не оказывает генотоксичности. Дополнительно для индукции повреждений при 20 мкМ МС мы использовали свет длиной волны 630 нм. Этот эффект называется фотодинамической терапией, широко применяемой при лечении онкологических заболеваний. Известно, что в комбинации с освещением МС, использующийся в качестве фотосенсибилизатора, продуцирует существенное количество синглетного кислорода, который приводит к значительным повреждениям мтДНК [287]. Наблюдались значительные повреждения во всех исследуемых фрагментах. В 1 фрагменте $0,63 \pm 0,06$ повреждений / 10 т.п.н.; в 2 фрагменте $1,1 \pm 0,3$ повреждений / 10 т.п.н.; в 3 фрагменте $0,82 \pm 0,4$ повреждений / 10 т.п.н.; в 7 фрагменте $0,94 \pm 0,6$

повреждений / 10 т.п.н.; в 8 фрагменте $0,73 \pm 0,3$ повреждений / 10 т.п.н.; в 9 фрагменте $2,18 \pm 0,6$ повреждений / 10 т.п.н. (рис. 43).

При этом стоит отметить, что количество повреждений в каждом фрагменте никак не коррелирует с GTRG-составом мтДНК. Это также подтверждает предположение, что повреждение происходит синглетным кислородом, а не гидроксил-радикалами, образующимися из H_2O_2 в результате реакции Фентона.

7.4. Влияние метиленового синего на повреждения мтДНК *in vivo*

Ранее было показано, что внутривенные инъекции высоких доз МС могут приводить к нейротоксичным эффектам, вплоть до индукции апоптоза за счет увеличения количества каспаза-3 позитивных клеток в мозге [35]. В нашем опыте ни в хроническом (МС 60 дней перорально в концентрации 15/мг/день) ни в остром эксперименте (разовая внутрибрюшинная инъекция 50 мг/кг) не было выявлено накоплений повреждений в мтДНК (табл. 12). Эти результаты свидетельствуют о том, что МС даже в очень высоких концентрациях, несмотря на небольшую токсичность для митохондрий, не оказывает генотоксического эффекта, то есть не обладает свойствами канцерогена. Это согласуется с выводами, сделанными Auerbach et al. (2010), который проводил эксперимент на линиях крыс и мышей, особенно чувствительных к стрессу. Хотя и были отмечены тенденции к развитию онкологических процессов при употреблении высоких концентраций МС в течение 2 лет (не всегда статистически отличающиеся от контрольных особей), не было выявлено влияние на выживаемость грызунов [373].

Таблица 12. Количество повреждений мтДНК, индуцируемые пероральным приемом и однократными внутрибрюшинными инъекциями МС

Фрагмент	Перорально 15 мг/кг/день – 60 дней		Однократная внутрибрюшинная инъекция 50 мг/кг	
	Кора больших полушарий	Средний мозг	Кора больших полушарий	Средний мозг
1	-0,25±0,29	-0,21±0,12	-0,41±0,24	-0,15±0,21
2	-0,24±0,11	-0,19±0,39	-0,17±0,39	-0,08±0,19
3	-0,68±0,47	0,12±0,21	-0,34±0,46	0,04±0,2
7	0,12±0,21	0,09±0,18	-0,21±0,23	-0,27±0,26
8	-0,02±0,13	-0,18±0,2	0,16±0,35	-0,3±0,21
9	-0,28±0,23	0,06±0,18	0,45±0,78	-0,48±0,67

При этом МС способен оказывать протекторный эффект при индуцируемой нейротоксичности. Разовая инъекция ротенона в концентрации 1 мг/кг вызывает значительное увеличение количества повреждений в мтДНК. При этом стоит отметить неоднородный характер этих повреждений. В среднем мозге были выявлены повреждения во всех шести фрагментах мтДНК, в то время как для коры больших полушарий не было выявлено повреждений в 3 и 7 фрагменте мтДНК (рис. 44).

Преыдушие исследования Sanders et al. (2014) показали накопление ротенон-индуцированных нарушений в структуре мтДНК в дофаминергических нейронах среднего мозга, в то время как в коре больших полушарий наблюдалось уменьшение числа повреждений [232]. Нами показано, что ротенон-индуцированные повреждения в мтДНК коры мозга распределяются неравномерно и сосредоточены в регионах, богатых GTGR-последовательностями и в районе D-петли, в то время как в остальных участках не наблюдалось статистически достоверного увеличения нарушений (рис. 44А).

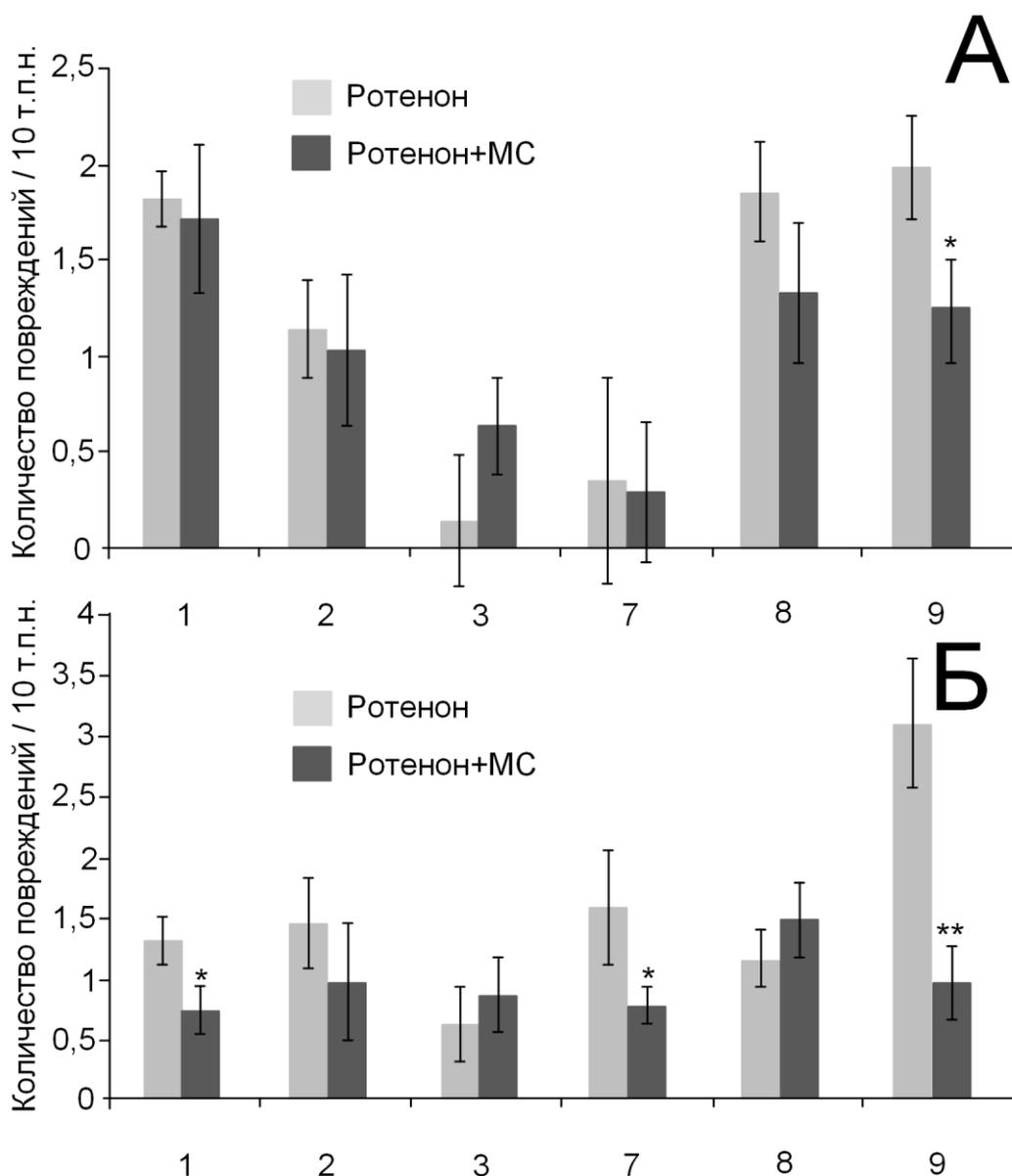


Рис. 44. Количество повреждений мтДНК в коре больших полушарий (А) и среднем мозге (Б), индуцируемые инъекциями ротенона для мышей, предварительно употреблявших и не употреблявших МС. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$

В определенной степени эти результаты согласуются с отрицательным значением количества повреждений в исследованиях Sanders et al. (2014) так как количество повреждений в их работе оценивались в одном ампликоне, из которого был исключен район D-петли, на который, предположительно, могла прийти основная доля повреждений [232]. Это, в свою очередь, могло привести к нарушению суперспиральной конформации мтДНК и ложному «снижению числа повреждений». При этом в среднем мозге однократные

инъекции ротенона вызывали значительные повреждения мтДНК в работе Sanders et al. (2014) [232] и значительные равномерные повреждения во всех проанализированных регионах мтДНК в нашем исследовании (рис. 44Б).

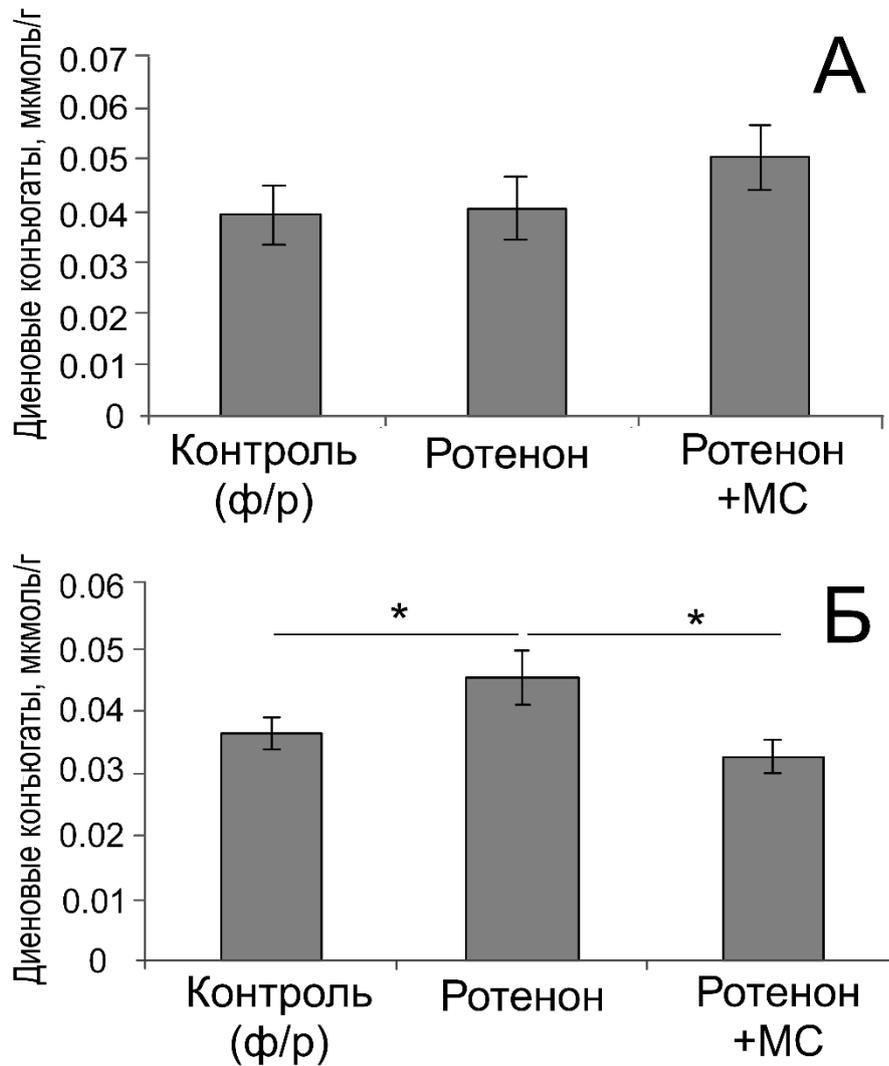


Рис. 45. Концентрация диеновых конъюгатов в коре больших полушарий (А) и среднем мозге (Б), индуцируемые инъекциями ротенона для мышей, предварительно употреблявших и не употреблявших МС. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$

Достоверное увеличение количества диеновых конъюгатов, которые являются результатом перекисного окисления липидов и, следовательно, окислительного стресса, наблюдалось только в среднем мозге, но не в коре больших полушарий (рис. 45). Мы предполагаем, что это связано с особенностью транспорта ротенона через гематоэнцефалический барьер. В результате чего ротенон может концентрироваться в большей степени в

отделах среднего мозга, например, в *substantia nigra pars compacta*. Проникая в дофаминергические нейроны, локализованные в данном отделе мозга, ротенон вызывает их дегенерацию, в результате чего могут возникать симптомы болезни Паркинсона, что неоднократно было показано ранее [330; 363].

В среднем мозге у мышей, которые перед инъекцией ротенона в течение 7 дней принимали МС в концентрации 15 мг/кг/день, наблюдалось меньшее количество повреждений в 1, 8 и 9 фрагменте, по сравнению с группой мышей, получавшей только инъекции ротенона (рис. 44Б). Концентрация диеновых конъюгатов была ниже на 28% (рис. 45Б). В коре больших полушарий МС снижал количество повреждений только в 9 фрагменте (рис. 44А). Уровень диеновых конъюгатов не изменялся (рис. 45Б).

Таким образом, проведенные исследования показывают, что МС не является генотоксичным соединением. МС-индуцируемая продукция H_2O_2 способна активировать Nrf2/ARE-сигнальный каскад, но не способствует повреждению мтДНК. Напротив, МС может частично препятствовать ротенон-индуцируемой нейротоксичности в среднем мозге. Эти результаты подтверждают перспективность данного соединения в терапии возрастных нейродегенеративных заболеваний.

7.5. Влияние β -гуанидинопропионовой кислоты и фенофибрата на повреждения мтДНК *in vivo*

На данный момент нет данных, которые свидетельствовали бы об отрицательных эффектах β -ГПК. Исключение составляет исследование Clark et al. (1994), сообщающее о том, что β -ГПК может вызывать гипертрофию миокарда. Данные патологические изменения могут являться причиной гипертонии [30]. Маловероятно, но, тем не менее, возможно, что стимуляция митохондриального биогенеза в головном мозге теоретически может

приводить к увеличению количества ошибок при транскрипции мтДНК ввиду неразвитых систем репараций в митохондриях. Возникающие мутации могли приводить к дисфункции ЭТЦ митохондрий, что может быть ассоциировано с увеличением продукции АФК и повреждениями мтДНК. Тем не менее, мы не обнаружили повреждений в мтДНК ни в одном из исследуемых фрагментов у мышей, получавших инъекции β -ГПК в течение 3 недель (табл. 13). Это исследование подтверждает возможность безопасного использования данного аналога креатина для стимуляции митохондриального биогенеза в мозге стареющего организма с целью продления активного долголетия.

Таблица 13. Количество повреждений мтДНК, индуцируемых приемом β -ГПК и фенофибрата

Фрагмент	Повреждения, индуцируемые β -ГПК в мозге	Повреждения, индуцируемые фенофибратом в мозге	Повреждения, индуцируемые фенофибратом в печени
1	-0,24±0,29	0,26±0,37	1,24±0,33*
2	0,14±0,18	-0,19±0,25	-0,12±0,21
3	-0,58±0,27	-0,21±0,33	-0,34±0,46
7	0,12±0,21	-0,18±0,29	-0,25±0,18
8	-0,22±0,31	0,25±0,58	0,25±0,35
9	-0,18±0,27	0,16±0,23	1,96±0,63*

* $p < 0,05$

Активаторы PPAR α являются более токсичными соединениями. Самым первым используемым соединением из класса фибратов был клофибрат. Его применение вызывало острую мышечную миопатию [191] и приводило к возникновению сердечной аритмии [207]. Безафибрат увеличивал риск возникновения гепатокарциномы у грызунов [325]. Были сообщения о побочных эффектах безафибрата для людей с острыми инфекционными и воспалительными заболеваниями за счет снижения уровня липопротеинов высокой плотности [4]. Несмотря на то, что недавно проведенные клинические исследования не выявили никаких побочных эффектов фенофибрата на здоровых людях [285], есть сообщения о том, что фенофибрат может

способствовать увеличению уровня креатинина в почках, что ассоциировано с развитием почечной недостаточности [295].

В нашем исследовании было показано, что помимо увеличения содержания диеновых конъюгатов в печени (табл. 10), фенофибрат может вызывать незначительные повреждения в мтДНК печени. Мы показали, что фенофибрат повреждает 1 и 9 регион, которые соответствуют генам рибосомальной РНК и D-петли (табл. 13). Данные участки ответственны за функционирование транскрипционной и репликационной активности мтДНК, в результате чего может нарушаться функционирование ЭТЦ митохондрий. При условии, что фенофибрат способствует увеличению скорости митохондриального и пероксисомального окисления жирных кислот, возрастает потребность в окислительном фосфорилировании, но нет адаптивного ответа в виде митохондриального биогенеза. Вместо этого возрастает нагрузка на ЭТЦ, что и приводит к увеличению продукции АФК, приводящая к увеличению количества диеновых конъюгатов и гепатомегалии. Несмотря на то, что у людей, принимающих фенофибрат, не наблюдается подобных патологических изменений в печени [161], необходимо проводить дальнейшие клинические исследования по влиянию фенофибрата на человека. Окислительные повреждения мтДНК могут не манифестироваться во время приема препарата, но со временем приводить к накоплению мутаций и возникновению холестатическим заболеваниям печени, связанных с мутациями мтДНК [235].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные в ходе работы данные позволяют сделать вывод о том, что к 15 месяцам у мышей происходит изменение поведенческих особенностей: подавление исследовательского поведения и снижение физической силы и выносливости. Причиной этого могут быть возрастные нарушения сигнальных путей, ответственных за поддержание обратной связи между клеточным ядром и митохондриями. Наиболее важную роль в этих процессах играет Nrf2/ARE-сигнальный каскад, который регулирует экспрессию генов, кодирующих белки с цитопротекторными свойствами: антиоксидантные ферменты, белки II фазы детоксикации ксенобиотиков и противовоспалительные ферменты, а также метаболические ферменты и регуляторы, участвующие в поддержании редокс-гомеостаза. Мы показали, что с возрастом снижается экспрессия генов, участвующих в антиоксидантной защите организма. Кроме того, с возрастом сокращается количество митохондрий в мозге, что подтверждается снижением количества копий мтДНК, уровня экспрессии митохондриального гена *Cox1* и активности цитратсинтазы. Наши исследования позволяют предложить, что причиной сокращения числа митохондрий является снижение функциональности Nrf2/ARE-сигнального пути.

Нарушение стабильности митохондриального биогенеза может быть первым звеном в цепи дегенеративных процессов, которые, в конце концов, могут привести к развитию нейродегенеративных заболеваний. По этой причине мы считаем, что у мышей возраст 15 месяцев является наиболее подходящим временем для фармацевтического воздействия с целью защиты от митохондриальных нарушений и замедления проявления нейродегенераций, что может способствовать активному долголетию.

Мы исследовали три химических модулятора метаболизма с целью изучения их влияния на митохондриальный биогенез у 15-месячных мышей. МС осуществляет альтернативный транспорт электронов в ЭТЦ митохондрий, что может способствовать защите от таких повреждающих факторов, как

ингибиторы комплексов дыхательной цепи. Однако в ходе изучения биохимических свойств МС на изолированных митохондриях мозга мышей мы выявили несоответствие классической модели механизма действия МС, которая была описана ранее Tretter et al. (2014) [123]. Согласно данной модели донором электронов для МС является I комплекс ЭТЦ, а акцептором – цитохром *c*. При этом МС должен шунтировать блок ротенона (I комплекс на уровне связывания с убихиноном) и блок антимицина (III комплекс на уровне между цитохромом b_h и семихиноном). Однако комплексное исследование мембранного потенциала, митохондриального дыхания и продукции H_2O_2 позволяет сделать вывод о том, что МС не осуществляет шунтирование антимицинового блока. Мы можем предположить, что наиболее вероятным акцептором электронов является III комплекс, а не цитохром *c*, как предполагалось ранее.

Другим важным биохимическим аспектом МС является то, что он способствует продукции H_2O_2 , но не проявляет антиоксидантных свойств, как сообщалось ранее несколькими исследовательскими группами. Мы выяснили, что антиоксидантные свойства МС связаны не с его способностью восстанавливать свободные радикалы кислорода, а с возможностью активации Nrf2/ARE-сигнального каскада, что приводит к индукции экспрессии генов, формирующих ферментативное звено антиоксидантной защиты организма. Примечательно, что активация Nrf2/ARE-сигнального пути осуществляется, по всей видимости, именно за счет увеличения продукции H_2O_2 , которая приводит к инактивации негативных регуляторов Nrf2 – Keap1 и GSK-3 β . Таким образом, мягкий окислительный стресс, индуцируемый МС у мышей в возрасте 15 месяцев, приводит к активации Nrf2/ARE-сигнального пути и положительным компенсаторным эффектам в организме. Другим положительным результатом терапии МС является активация митохондриального биогенеза, которая очевидно также связана с Nrf2/ARE-сигнальным каскадом. МС не влиял на уровень экспрессии гена *Ppargc1a*,

который кодирует PGC-1 α , являющийся общепризнанным «мастером регуляции митохондриального биогенеза».

Дефицит креатина в организме, вызванный инъекциями β -ГПК, тоже приводил к компенсаторным реакциям в мозге 15-месячных мышей. В данном случае мы также наблюдали активацию митохондриального биогенеза и Nrf2/ARE-сигнального пути. Исследования Horvath et. al. (2011) показали, что дефицит АТФ, индуцированный β -ГПК, вызывает увеличение соотношения АМФ/АТФ, что приводит к активации АМПК [146]. АМПК может фосфорилировать, и тем самым активировать, как PGC-1 α , так и Nrf2. Наши исследования показывают, что индуцируемая β -ГПК активация АМПК стимулирует не PGC-1 α , а именно Nrf2/ARE-сигнальный путь, так как увеличивалась экспрессия не генов, участвующих в метаболизме жирных кислот, а генов, ответственных за антиоксидантную защиту.

Третье исследуемое вещество – фенофибрат – приводило к стабильной активации PGC-1 α , что сопровождалось увеличением экспрессии генов, участвующих в метаболизме жирных кислот. Однако увеличения экспрессии маркеров митохондриального биогенеза, количества копий мтДНК и уровня активности цитратсинтазы мы не обнаружили. Не было обнаружено увеличения экспрессии гена *Nfe2l2*, кодирующего Nrf2.

Согласно данным результатам мы можем предположить, что Nrf2/ARE-сигнальный путь играет более важную роль в активации митохондриального биогенеза в мозге, чем PGC-1 α (рис. 46). Вероятно, что PGC-1 α в большей степени регулирует метаболизм, но именно Nrf2 является молекулярным сенсором, который реагирует на внешние негативные воздействия и активирует митохондриальный биогенез. Ген, кодирующий белок PGC-1 α , в мозге экспрессируется меньше, чем в других метаболически-активных тканях [382]. Еще в работе Tritos et al. (2003) было показано, что влияние PGC-1 α на гомеостаз в мозге не столь существенно как в печени, белой и бурой жировой ткани [79]. Однако бурное изучение физиологической роли PGC-1 α с 2008 года, которое во многом связано с работами Richard Scarpulla [331; 332; 333;

334], привело к тому, что в данной области науки утвердилось мнение, что именно PGC-1 α полностью регулирует митохондриальный биогенез. Только недавно были опубликованы работы, которые показывали, что не во всех случаях индукция митохондриального биогенеза сопровождается активацией PGC-1 α [215; 241]. Наши результаты не позволяют опровергнуть причастность PGC-1 α к митохондриальному биогенезу в мозге, однако позволяют точно сказать, что Nrf2/ARE-сигнальный путь играет большую роль в поддержании количества митохондрий, чем PGC-1 α . Это может объясняться спецификой нервной ткани. Головной мозг расходует примерно 20% кислорода от общего количества, расходуемого организмом [162]. По этой причине именно в головном мозге наиболее интенсивно протекают свободно-радикальные процессы, которые являются одним из триггеров Nrf2, регулирующих антиоксидантный статус организма. PGC-1 α , будучи основным регулятором метаболизма жирных кислот, оказывается менее задействован в функционировании нервной ткани, что подтверждается его более низким уровнем экспрессии в мозге по сравнению с печенью, белой и бурой жировой тканью [79]. Мы можем предположить, что это является одной из причин, почему Nrf2/ARE-сигнальный путь в большей мере, чем PGC-1 α , регулирует митохондриальный биогенез, что необходимо для поддержания стабильности митохондриального пула в клетках мозга. Данный процесс особенно актуален для стареющих организмов, где митохондриальные дисфункции могут являться причиной развития нейродегенеративных заболеваний.

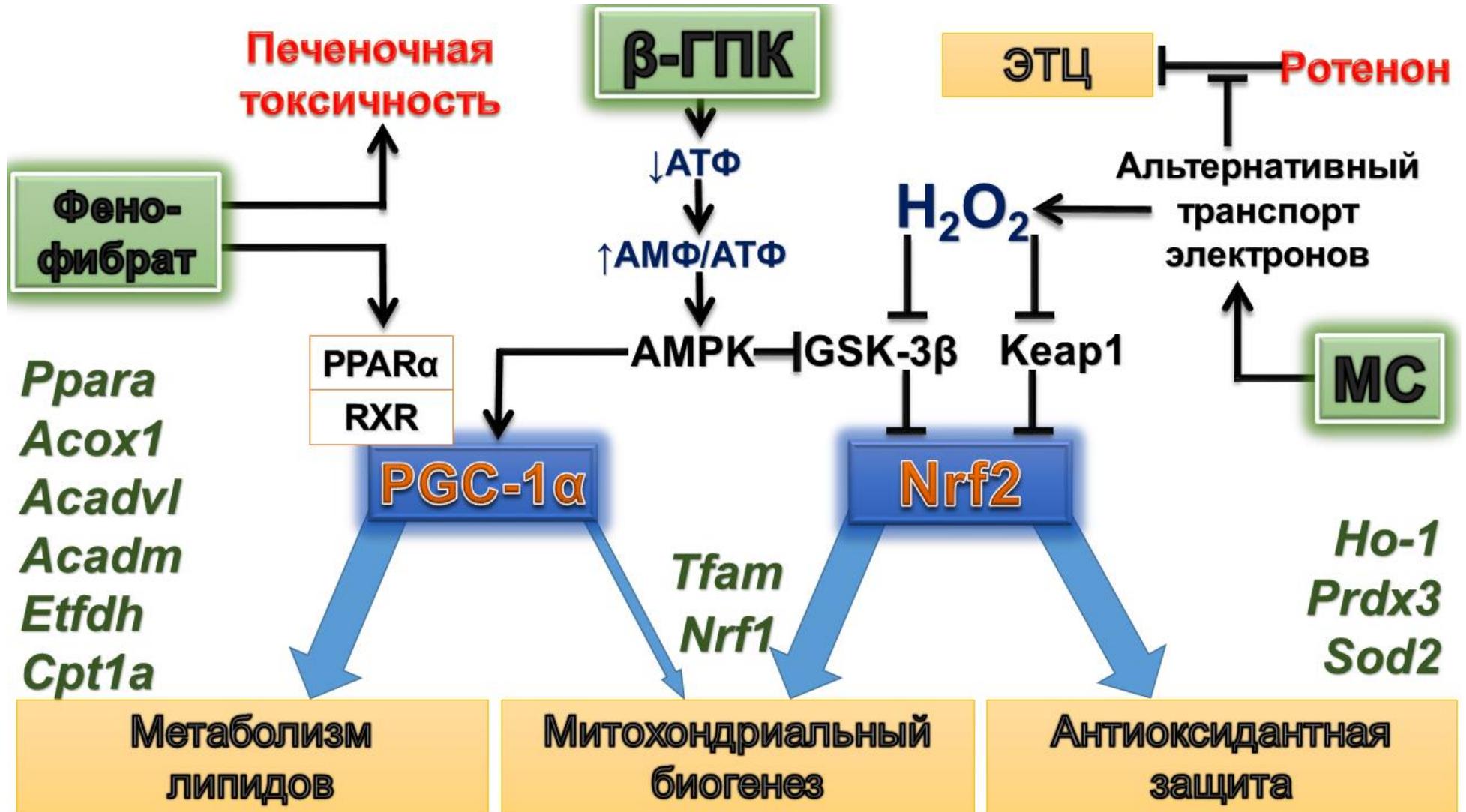


Рис. 46. Роль PGC-1 α и Nrf2 в регуляции митохондриального гомеостаза в мозге при лечении 15-месячных мышей метиленовым синим (МС), β -гуанидинопропионовой кислотой (β -ГПК) и фенофибратом.

ВЫВОДЫ

1. Выявлено, что у 15-месячных мышей по сравнению с 7-месячными снижается количество митохондрий в мозге за счет угнетения функции Nrf2/ARE-сигнального пути, что сопровождается снижением физической силы и выносливости мышей, подавлением исследовательского поведения. Данная возрастная группа оказалась наиболее перспективной для тестирования потенциальных геронтопротекторов.

2. Установлено, что метиленовый синий в изолированных митохондриях мозга мыши принимает электроны с I комплекса ЭТЦ и осуществляет шунтирование ротенонового блока I комплекса, но не шунтирование антимицинового блока III комплекса. Это позволяет предположить, что акцептором электронов с восстановленного метиленового синего является не цитохром *c*, а III комплекс.

3. Показано, что увеличение продукции H_2O_2 в мозге мышей может вызывать компенсаторные реакции в организме за счет окисления негативных регуляторов Nrf2. Это приводит к индукции Nrf2-регулируемой антиоксидантной защиты и митохондриального биогенеза. Физиологическим ответом на эти процессы является увеличение силы и выносливости 15-месячных мышей, увеличение локомоторной активности, исследовательского поведения и снижение тревожности.

4. Выявлено, что инъекции β -гуанидинопропионовой кислоты за счет снижения уровня креатина в мозге могут приводить к индукции АМФ-активированной протеинкиназы. Данный фермент по PGC-1 α -независимому пути, за счет фосфорилирования может активировать Nrf2, что приводит к увеличению интенсивности митохондриального биогенеза и антиоксидантной защиты в мозге 15-месячных мышей. Физиологическим ответом является значительное увеличение силы и выносливости мышей, а также частичное снижение тревожности и усиление исследовательского поведения.

5. Показано, что в печени и мозге фенофибрат за счет коактивации PGC-1 α и PPAR α вызывает увеличение экспрессии генов β -окисления жирных кислот,

что инициирует липолиз, проявляющийся в снижении массы тела, снижении физической силы и выносливости, но ослаблении тревожности. В ответ на интенсификацию липидного метаболизма увеличивается экспрессия некоторых антиоксидантных генов, но не увеличивается количество митохондрий в мозге и печени мышей, принимавших фенофибрат.

6. Установлено, что для детекции повреждений мтДНК с помощью ПЦР длинных фрагментов оптимально использовать ампликоны не более 2 т.п.н. С учетом наличия ядерных псевдогенов была разработана панель праймеров для мтДНК мышцы, позволяющая оценивать повреждения мтДНК с покрытием 95%, что позволяет выявить гетерогенность индуцируемых окислительных повреждений. Было выявлено, что H_2O_2 селективно повреждает фрагмент мтДНК. Наибольшие повреждения наблюдаются во фрагментах, обогащенных GTGR-последовательностями.

7. Несмотря на индукцию мягкого окислительного стресса, при нормальных терапевтических дозах метиленовый синий не вызывает повреждений мтДНК. При этом в комбинации с фотодинамической терапией метиленовый синий вызывает значительные повреждения мтДНК за счет продукции синглетного кислорода. Терапия метиленовым синим может препятствовать ротенон-индуцированной токсичности в митохондриях мозга мышей.

8. Установлено, что фенофибрат-индуцированное усиление пероксисомального и митохондриального β -окисления в печени увеличивает интенсивность процессов перекисного окисления липидов и повреждений мтДНК, что может приводить к гиперплазии печени. В мозге подобных патологических изменений не было обнаружено. β -гуанидинопропионовая кислота не вызывает окислительных повреждений.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Аtpк: структура, функции и участие в патологических процессах / Д.С. Новикова [и др.] // Биохимия. – 2015. – Т. 80, № 2. – С. 163 – 183
2. Андреев А.Ю. Метаболизм активных форм кислорода в митохондриях (обзор) / А.Ю. Андреев, Ю.Е. Кушнарера, А.А. Старков // Биохимия. – 2005. – Т. 70, № 2. – С. 246-264
3. Андреева Т.В. Биологические основы амилоидоза при болезни Альцгеймера 2017 / Т.В. Андреева, У.Дж. Лукив, Е.И. Рогаев // Биохимия. – 2017. – Т. 82, № 2. – С. 226 – 246
4. Безафибрат вызывает депрессию иммунного ответа и повышает чувствительность к эндотоксину в ассоциации с низким уровнем ЛПВП и активности PPAR α у крыс гипертензивной линии NhsaG / А.В. Шурлыгина [и др.] // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2013. – Т. 6. - С. 685-689
5. Бунеева О.А. Нарушение функций митохондрий при болезни Паркинсона / О.А. Бунеева, А.Е. Медведев // Биомедицинская химия. – 2011. – Т. 57, № 3. - С. 246-281
6. Влияние митохондриального антиоксиданта skq1 на биохимические и поведенческие параметры на модели паркинсонизма у мышей / В.В. Павшинцев [и др.] // БИОХИМИЯ. – 2017. – Т. 82, № 12. – С. 1889 – 1897
7. Заводник И.Б. Митохондрии, кальциевый гомеостаз и кальциевая сигнализация / И.Б. Заводник // Биомедицинская химия. – 2016. – Т. 62, № 3. – С. 311-317
8. Зенков Н.К. Редокс чувствительная сигнальная система keap1/nrf2/are как фармакологическая мишень / Н.К. Зенков, Е.Б. Меньщикова, В.О. Ткачев // Биохимия. – 2013. – Т. 78, № 1. – С. 27 – 47
9. Зиновкина Л.А. Механизмы репарации митохондриальной ДНК млекопитающих / Л.А. Зиновкина // Биохимия. - 2018. – Т. 83, № 3. - С. 349-367

10. Коршунова Г.А. Дизайн, синтез и некоторые аспекты биологической активности митохондриальнонаправленных антиоксидантов 2017 / Г.А. Коршунова, А.В. Шишкина, М.В. Скулачев // Биохимия. – 2017. – Т. 82, № 7. - С. 998 – 1017
11. Лабиринты регуляции Nrf2 / Н.К. Зенков [и др.] // Биохимия. – 2017. – Т. 82, № 5. – С. 749 – 759
12. Митохондриальный метаболизм активных форм кислорода: десять лет спустя / А.Ю. Андреев [и др.] // Биохимия. – 2015. – Т. 80, № 5. – С 612-630
13. Молекулярный механизм амилоидообразования αB пептидом: обзор собственных работ / О.М. Селиванова [и др.] // Биомедицинская химия. – 2018. – Т. 64, № 1. - С. 94-109
14. Окислительный стресс и его влияние на функциональную активность клеток при болезни Альцгеймера / Е.Е. Дубинина [и др.] // Биомедицинская химия. – 2015. – Т. 61, № 1. - С. 57-69
15. Окуневич И.В. Антиоксиданты: эффективность природных и синтетических соединений в комплексной терапии сердечно-сосудистых заболеваний / И.В. Окуневич, Н.С. Сапронов // Обзоры по клин. фармакол. и лек. терапии. – 2004. - Т. 3, № 3. - С. 2-17
16. Савицкая М.А. Механизмы апоптоза / М.А. Савицкая, Г.Е. Онищенко // Биохимия. – 2015. – Т. 80, № 11. – С. 1613 – 1627
17. Слияние и деление митохондрий / М.В. Патрушев [и др.] // Биохимия. – 2015. – Т. 80, № 11. – С. 1673 – 1682
18. Татарникова О. Г. Бета-амилоид и Тау-белок: структура, взаимодействие и прионоподобные свойства / О. Г. Татарникова, М. А. Орлов, Н. В. Бобкова // Успехи биологической химии. – 2015. - Т. 55. - С. 351–390
19. Ткачев В.О. Механизм работы сигнальной системы Nrf2/Keap1/ARE / В.О. Ткачев, Е.Б. Меньщикова, Н.К. Зенков // Биохимия. – 2011. – Т. 76, № 4. – Р. 502 – 519

20. Шабунова А.А. Тенденции демографического старения населения российской федерации и пути их преодоления / А.А. Шабунова, В.Н. Барсуков // Проблемы развития территории. – 2015. – Т. 75, № 1. – С. 76-87
21. Эволюция перехода высокотехнологичной медицинской помощи на страховые принципы оплаты: опыт, результаты и перспективы / О.В. Обухова [и др.] // Медицинские технологии. – 2016. – Т. 25, № 3. – С. 34-41
22. Erythropoietin contributes to slow oxidative muscle fiber specification via PGC-1 α and AMPK activation / L. Wang [et al.] // Int J Biochem Cell Biol. – 2013. – Vol. 45. – P. 1155-1164
23. Pyrroloquinoline quinone enhances the resistance to oxidative stress and extends lifespan upon DAF-16 and SKN-1 activities in *C. elegans* / J.Z. Wu [et al.] // Exp Gerontol. - 2016b. – Vol. 80. – P. 43-50
24. A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis / P. Puigserver [et al.] // Cell. – 1998. – Vol. 92. – P. 829-839
25. A PGC-1 α -O-GlcNAc transferase complex regulates FoxO transcription factor activity in response to glucose / M.P. Housley [et al.] // J Biol Chem. – 2009. - Vol. 284. – Vol. 5148–5157
26. A practical approach to RT-qPCR-publishing data that conform to the MIQE guidelines / S. Taylor [et al.] // Methods. - 2010. – Vol. 50. – P. S1–5
27. A time to reap, a time to sow: mitophagy and biogenesis in cardiac pathophysiology / A.M. Andres [et al.] // J Mol Cell Cardiol. – 2015. – Vol. 78. – P. 62-72
28. ABAD directly links Abeta to mitochondrial toxicity in Alzheimer's disease / J.W. Lustbader [et al.] // Science. – 2004. – Vol. 304, № 5669. – P. 448-452
29. Acetyl-L-carnitine-mediated neuroprotection during hypoxia is attributed to ERK1/2-Nrf2-regulated mitochondrial biosynthesis / K.B. Hota [et al.] // Hippocampus. – 2012. – Vol. 22. – P. 723-736
30. Actions of the creatine analogue beta-guanidinopropionic acid on rat heart mitochondria / J.F. Clark [et al.] // Biochem J. – 1994. – Vol. 300, № Pt 1. – P. 211-216

31. Activating transcription factor 3 is a novel repressor of the nuclear factor erythroid-derived 2-related factor 2 (Nrf2)-regulated stress pathway / S.L. Brown [et al.] // *Cancer Res.* – 2008. – Vol. 68, № 2. – P. 364-368
32. Activation of mitochondrial biogenesis by heme oxygenase-1-mediated NF-E2-related factor-2 induction rescues mice from lethal *Staphylococcus aureus* sepsis / N.C. MacGarvey [et al.] // *Am J Respir Crit Care Med.* – 2012. – Vol. 185, № 8. – P. 851-861
33. Activation of NRF2 by nitrosative agents and H₂O₂ involves KEAP1 disulfide formation / S. Fourquet [et al.] // *J Biol Chem.* - 2010. – Vol. 285, № 11. – P. 8463-8471
34. Activation of nuclear receptor coactivator PGC-1alpha by arginine methylation / C. Teyssier [et al.] // *Genes Dev.* – 2005. – Vol. 19. – P. 1466–1473
35. Adverse effects of methylene blue on the central nervous system / L. Vutskits [et al.] // *Anesthesiology.* – 2008. – Vol. 108, № 4. – P. 684-692
36. Age-associated vascular oxidative stress, Nrf2 dysfunction, and NF- κ B activation in the nonhuman primate *Macaca mulatta* / Z. Ungvari [et al.] // *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* – 2011. – Vol. 66. – P. 866-875
37. Age-related changes in behavior in C57BL/6J mice from young adulthood to middle age / H. Shoji [et al.] // *Mol Brain.* – 2016. – Vol. 9. – P. 11
38. Aging of liver: morphological and biochemical changes / K. Grasedyck [et al.] // *Mech Ageing Dev.* – 1980. – Vol. 14, № 3-4. – P. 435-442
39. Ahmed M.E. Methylene Blue promotes cortical neurogenesis and ameliorates behavioral deficit after photothrombotic stroke in rats / M.E. Ahmed // *Neuroscience.* – 2016. - Vol. 336. – P. 39–48
40. Akhmedov A.T. Mitochondrial DNA maintenance: an appraisal / A.T. Akhmedov, J. Marín-García // *Mol Cell Biochem.* – 2015. – Vol. 409, № 1-2. – P. 283-305
41. Akt/PKB regulates hepatic metabolism by directly inhibiting PGC-1alpha transcription coactivator / X. Li [et al.] // *Nature.* – 2007. – Vol. 447. – P. 1012–1016

42. Aldose reductase inhibitor, fidarestat regulates mitochondrial biogenesis via Nrf2/HO-1/AMPK pathway in colon cancer cells / K. Shukla [et al.] // *Cancer Lett.* – 2017. – Vol. 411. – P. 57-63
43. Allicin improves endoplasmic reticulum stress-related cognitive deficits via PERK/Nrf2 antioxidative signaling pathway / Y.F. Zhu [et al.] // *Eur J Pharmacol.* – 2015. – Vol. 762. – P. 239-246
44. Alternative mitochondrial electron transfer as a novel strategy for neuroprotection / Y. Wen [et al.] // *Journal of Biological Chemistry.* – 2011. – Vol. 286, № 18. – P. 16504-16515
45. Alzheimer's and Parkinson's Diseases: Expected Economic Impact on Europe- A Call for a Uniform European Strategy / P. Maresova [et al.] // *J Alzheimers Dis.* – 2016. – Vol. 54, № 3. – P. 1123-1133
46. Alzheimer's disease and Notch signaling / H.N. Woo [et al.] // *Biochem Biophys Res Commun.* – 2009. – Vol. 390, № 4. – P. 1093-1097
47. Amin F.U. Vanillic acid attenuates A β 1-42-induced oxidative stress and cognitive impairment in mice / F.U. Amin, S.A. Shah, M.O. Kim // *Sci Rep.* – 2017. – Vol. 7. – P. 40753
48. AMP-activated protein kinase (AMPK) action in skeletal muscle via direct phosphorylation of PGC-1alpha / S. Jager [et al.] // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 2007. – Vol. 104. – P. 12017–12022
49. AMPK Facilitates Nuclear Accumulation of Nrf2 by Phosphorylating at Serine 550 / M.S. Joo [et al.] // *Mol Cell Biol.* – 2016. – Vol. 36, № 14. – P. 1931-1942
50. AMPK regulates energy expenditure by modulating NAD⁺ metabolism and SIRT1 activity / C. Canto [et al.] // *Nature.* – 2009. – Vol. 458. – P. 1056–1060
51. An autoregulatory loop controls peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1alpha expression in muscle / C. Handschin [et al.] // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 2003. – Vol. 100. – P. 7111–7116

52. Analysis of DNA damage and repair in nuclear and mitochondrial DNA of animal cells using quantitative PCR / A.M. Furda [et al.] // *Methods Mol Biol.* – 2012. – Vol. 920. – P. 111-132
53. Antioxidant effects of curcuminoids in patients with type 2 diabetes mellitus: a randomized controlled trial / Y. Panahi [et al.] // *Inflammopharmacology.* – 2017. Vol. 25, № 1. - P. 25-31
54. Arginine:glycine amidinotransferase deficiency: the third inborn error of creatine metabolism in humans / C.B. Item [et al.] // *Am J Hum Genet.* – 2001. – Vol. 69, № 5. – P. 1127-1133
55. Association of Nrf2-encoding NFE2L2 haplotypes with Parkinson's disease / M. von Otter [et al.] // *BMC Med Genet.* – 2010. – Vol. 11. – P. 36
56. Attenuation of synaptic toxicity and MARK4/PAR1-mediated Tau phosphorylation by methylene blue for Alzheimer's disease treatment / W. Sun [et al.] // *Sci Rep.* – 2016. – Vol. 6, № 6. – P. 34784
57. Bahn G. Therapeutic Approaches to Alzheimer's Disease Through Modulation of NRF2 / G. Bahn, D.G. Jo // *Neuromolecular Med.* – 2019. – Vol. 21, № 1. – P. 1-11
58. Baldelli S. Punctum on two different transcription factors regulated by PGC-1 α : nuclear factor erythroid-derived 2-like 2 and nuclear respiratory factor / S. Baldelli, K. Aquilano, M.R. Ciriolo // *Biochim Biophys Acta.* – 2013. – Vol. 1830. – P. 4137-4146
59. Baloyannis S.J. Mitochondrial alterations in Alzheimer's disease / S.J. Baloyannis // *J Alzheimers Dis.* – 2006. – Vol. 9, № 2. – P. 119-126
60. Benfotiamine treatment activates the Nrf2/ARE pathway and is neuroprotective in a transgenic mouse model of tauopathy / V. Tapias [et al.] // *Hum Mol Genet.* – 2018. – Vol. 27, № 16. – P. 2874-2892
61. Berger J. The mechanisms of action of PPARs / J. Berger, D.E. Moller // *Annu Rev Med.* – 2002. – Vol. 53. – P. 409-435

62. Blesa J.R. Distinct functional contributions of 2 GABP-NRF-2 recognition sites within the context of the human TOMM70 promoter / J.R. Blesa, J. Hernández-Yago // *Biochem Cell Biol.* – 2006. – Vol. 84, № 5. – P. 813-822
63. Bogenhagen D.F. The layered structure of human mitochondrial DNA nucleoids / D.F. Bogenhagen, D. Rousseau, S. Burke // *J Biol Chem.* – 2008. – Vol. 283, № 6. – P. 3665-3675
64. Brain cytochrome oxidase in Alzheimer's disease / S.J. Kish [et al.] // *J Neurochem.* – 1992. – Vol. 59, № 2. – P. 776-779
65. Brown T.A. Release of replication termination controls mitochondrial DNA copy number after depletion with 2',3'-dideoxycytidine / T.A. Brown, D.A. Clayton // *Nucleic Acids Res.* – 2002. – Vol. 30, № 9. – P. 2004-2010
66. Bruchey A.K. Behavioral, Physiological and Biochemical Hormetic Responses to the Autoxidizable Dye Methylene Blue / A.K. Bruchey, F. Gonzalez-Lima // *Am J Pharmacol Toxicol.* – 2008. – Vol. 3, № 1. – P. 72-79
67. BST1 rs11724635 interacts with environmental factors to increase the risk of Parkinson's disease in a Taiwanese population / M.L. Chen [et al.] // *Parkinsonism Relat Disord.* – 2014. – Vol. 20, № 3. – P. 280-283
68. Burn Trauma Acutely Increases the Respiratory Capacity and Function of Liver Mitochondria / F.J. Bohanon [et al.] // *Shock.* – 2018. – Vol. 49. – P. 466-473
69. Burns A. Alzheimer's disease / A. Burns, S. Iliffe // *BMJ.* – 2009. – Vol. 338. – P. b158
70. Cardiac phosphocreatine deficiency induced by GPA during postnatal development in rat / V. Pelouch [et al.] // *Mol Cell Biochem.* – 1996. – Vol. 163-164. – P. 67-76
71. CART peptide activates the Nrf2/HO-1 antioxidant pathway and protects hippocampal neurons in a rat model of Alzheimer's disease / W. Jiao [et al.] // *Biochem Biophys Res Commun.* – 2018. – Vol. 501, № 4. – P. 1016-1022
72. Caspase-cleaved tau exhibits rapid memory impairment associated with tau oligomers in a transgenic mouse model / Y. Kim [et al.] // *Neurobiol Dis.* – 2016. – Vol. 87. – P. 19-28

73. Catalase takes part in rat liver mitochondria oxidative stress defense / M. Salvi [et al.] // *J. Biol. Chem.* - 2007. – Vol. 282. – P. 24407–24415
74. Catalpol Modulates Lifespan via DAF-16/FOXO and SKN-1/Nrf2 Activation in *Caenorhabditis elegans* / H.W. Seo [et al.] // *Evid Based Complement Alternat Med.* – 2015. – Vol. 2015. – P. 524878
75. Cellular and molecular actions of Methylene Blue in the nervous system / M. Oz [et al.] // *Med Res Rev.* – 2011. – Vol. 31, № 1. – P. 93–117
76. Chan D.C. Mitochondria: dynamic organelles in disease, aging, and development / D.C. Chan // *Cell.* – 2006. – Vol. 125, № 7. – P. 1241-1252
77. Chan S.W. Measuring mtDNA damage using a supercoiling-sensitive qPCR approach / S.W. Chan, J.Z. Chen // *Methods Mol. Biol.* - 2009. – Vol. 554. – P. 183–197
78. Chang W.H. Antroquinonol Lowers Brain Amyloid- β Levels and Improves Spatial Learning and Memory in a Transgenic Mouse Model of Alzheimer's Disease / W.H. Chang, M.C. Chen, I.H. Cheng // *Sci Rep.* – 2015. – Vol. 5. – P. 15067
79. Characterization of the peroxisome proliferator activated receptor coactivator 1 alpha (PGC 1alpha) expression in the murine brain / N.A. Tritos [et al.] // *Brain Res.* – 2003. – Vol. 961, № 2. – P. 255-260
80. Chen J. DNA supercoiling suppresses real-time PCR: a new approach to the quantification of mitochondrial DNA damage and repair / J. Chen, F.F. Kadlubar, J.Z. Chen // *Nucleic Acids Res.* - 2007. – Vol. 35. – P. 1377–1388
81. Chronic activation of AMP kinase results in NRF-1 activation and mitochondrial biogenesis / R. Bergeron [et al.] // *Am J Physiol Endocrinol Metab.* – 2001. – Vol. 281, № 6. – P. E1340-6
82. Cilostazol attenuates murine hepatic ischemia and reperfusion injury via heme oxygenase-dependent activation of mitochondrial biogenesis / Y. Joe [et al.] // *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* – 2015. – Vol. 309. – P. G21-9
83. Clayton D.A. Vertebrate mitochondrial DNA—a circle of surprises / D.A. Clayton // *Exp Cell Res.* – 2000. – Vol. 255, № 1. – P. 4-9

84. Clear relationship between ETF/ETFDH genotype and phenotype in patients with multiple acyl-CoA dehydrogenation deficiency / R.K. Olsen [et al.] // *Hum Mutat.* – 2003. – Vol. 22, № 1. – P. 12-23
85. Combined activation of the energy and cellular-defense pathways may explain the potent anti-senescence activity of methylene blue / H. Atamna [et al.] // *Redox Bio.* – 2015. – Vol. 6. – P. 426–435
86. Congdon E.E. Tau-targeting therapies for Alzheimer disease / E.E. Congdon, E.M. Sigurdsson // *Nat Rev Neurol.* – 2018. – Vol. 14, № 7. – P. 399-415
87. Cook A. Friedreich's ataxia: clinical features, pathogenesis and management / A. Cook, P. Giunti // *Br Med Bull.* – 2017. – Vol. 124, № 1. – P. 19-30
88. Crawley J.N. Neuropharmacologic specificity of a simple animal model for the behavioral actions of benzodiazepines / J.N.Crawley // *Pharmacol Biochem Behav.* – 1981. – 15, № 5. – P. 695-699
89. Creatine and guanidinoacetate: diagnostic markers for inborn errors in creatine biosynthesis and transport / L.S. Almeida [et al.] // *Mol Genet Metab.* – 2004. – Vol. 82, № 3. – P. 214-219
90. Creatine deficiency in the brain: a new, treatable inborn error of metabolism / S. Stöckler [et al.] // *Pediatr Res.* – 1994. – Vol. 36, № 3. – P. 409-413
91. Creatine kinase-B mRNA levels in brain regions from male and female rats / S.E. Ilyin [et al.] // *Brain Res Mol Brain Res.* – 1996. – Vol. 41, №. 1-2. – P. 50-56
92. CREB regulates hepatic gluconeogenesis through the coactivator PGC-1 / S. Herzig [et al.] // *Nature.* – 2001. – Vol. 413. – P. 179–183
93. Cuadrado A. Pharmacological targeting of GSK-3 and NRF2 provides neuroprotection in a preclinical model of tauopathy / A. Cuadrado, S. Kügler, I. Lastres-Becker // *Redox Biol.* – 2018. – Vol. 14. – P. 522-534
94. Cui Q. Curcumin ameliorates dopaminergic neuronal oxidative damage via activation of the Akt/Nrf2 pathway / Q. Cui, X. Li, H. Zhu // *Mol Med Rep.* – 2016. – Vol. 13, № 2. – P. 1381-1388

95. Curcumin Attenuates Gentamicin-Induced Kidney Mitochondrial Alterations: Possible Role of a Mitochondrial Biogenesis Mechanism / M. Negrette-Guzmán [et al.] // *Evid Based Complement Alternat Med.* – 2015. – Vol. 2015. – P. 917435
96. Cytokine stimulation of energy expenditure through p38 MAP kinase activation of PPARgamma coactivator-1 / P. Puigserver [et al.] // *Mol Cell.* – 2001. – Vol. 8. – P. 971–982
97. D-beta-hydroxybutyrate extends lifespan in *C. elegans* / C. Edwards [et al.] // *Aging (Albany NY).* – 2014. – Vol. 6. – P. 621-644
98. Decrease of rotenone inhibition is a sensitive parameter of complex I damage in brain non-synaptic mitochondria of aged rats / M.L. Genova [et al.] // *FEBS Lett.* - 1997. – Vol. 410, № 2-3. – P. 467-469
99. Decreasing intramuscular phosphagen content simultaneously increases plasma membrane FAT/CD36 and GLUT4 transporter abundance / K.E. Pandke [et al.] // *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* – 2008. – Vol. 295, № 3. – P. R806-813
100. Del Río L.A. ROS Generation in Peroxisomes and its Role in Cell Signaling / L.A. Del Río, E. López-Huertas // *Plant Cell Physiol.* – 2016. – Vol. 57, № 7. – P. 1364-1376
101. Delayed Methylene Blue Improves Lesion Volume, Multi-Parametric Quantitative Magnetic Resonance Imaging Measurements, and Behavioral Outcome after Traumatic Brain Injury / L. Talley Watts [et al.] // *J Neurotrauma.* – 2016. – Vol. 33, № 2. – P. 194-202
102. Delta-9-tetrahydrocannabinol protects against MPP⁺ toxicity in SH-SY5Y cells by restoring proteins involved in mitochondrial biogenesis / M.L. Zeissler [et al.] // *Oncotarget.* – 2016. – Vol. 7, № 29. – P. 46603-46614
103. Demetrius L. Of mice and men. When it comes to studying ageing and the means to slow it down, mice are not just small humans / L. Demetrius // *EMBO Rep.* – 2005. – Vol. 6. – P. S39-44

104. Dietary fenofibrate reduces hepatic lipid deposition by regulating lipid metabolism in yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco* exposed to waterborne Zn / J.L. Zheng [et al.] // *Lipids*. – 2015. – Vol. 50, № 4. – P. 417-426
105. Dinkova-Kostova A.T. The emerging role of Nrf2 in mitochondrial function / A.T. Dinkova-Kostova, A.Y. Abramov // *Free Radic Biol Med*. – 2015. – Vol. 88. – P. 179-188
106. Distinct Nrf2 Signaling Mechanisms of Fumaric Acid Esters and Their Role in Neuroprotection against 1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridine-Induced Experimental Parkinson's-Like Disease / M. Ahuja [et al.] // *J Neurosci*. – 2016. – Vol. 36. – P. 6332-6351
107. DNA damage in normally and prematurely aged mice / A.Y. Maslov [et al.] // *Aging Cell*. - 2013. – Vol. 12. – P. 467–477
108. DNA damage reduces Taq DNA polymerase fidelity and PCR amplification efficiency. *Biochem. Biophys* / J.A. Sikorsky [et al.] // *Res. Commun*. – 2007. – Vol. 355. - P 431–437
109. Drechsel D.A. Respiration-dependent H₂O₂ removal in brain mitochondria via the thioredoxin/peroxiredoxin system / D.A. Drechsel, M. Patel // *J. Biol. Chem*. - 2010. – Vol. 285. – P. 27850–27858
110. Dynamic regulation of genes involved in mitochondrial DNA replication and transcription during mouse brown fat cell differentiation and recruitment / M. Murholm [et al.] // *PLoS One*. – 2009. – Vol. 4, № 12. – P. 8458
111. Dynamic regulation of PGC-1 α localization and turnover implicates mitochondrial adaptation in calorie restriction and the stress response / R.M. Anderson [et al.] // *Aging Cell*. – 2008. – Vol. 7. – P. 101–11
112. Dzeja P.P. Phosphotransfer networks and cellular energetics / P.P. Dzeja, A.Terzic // *J Exp Biol*. – 2003. – Vol. 206, № Pt 12. – P. 2039-2047
113. Effect of DNA damage on PCR amplification efficiency with the relative threshold cycle method / J.A. Sikorsky [et al.] // *Biochem. Biophys. Res. Commun*. - 2004. – Vol. 323. – P. 823–830

114. Effect of muscle creatine content manipulation on contractile properties in mouse muscles / B.O. Eijnde [et al.] // *Muscle Nerve*. – 2004. – Vol. 29, № 3. – P. 28-35
115. Effect of temperature on fatty acid metabolism in skeletal muscle mitochondria of untrained and endurance-trained rats / J.A. Zoladz [et al.] // *PLoS One*. – 2017. – Vol. 12. – P. e0189456
116. Effects of alpha-AMPK knockout on exercise-induced gene activation in mouse skeletal muscle / S.B. Jorgensen [et al.] // *FASEB J*. – 2005. – Vol. 19. – P. 1146–1148
117. Effects of fenofibrate on lipid metabolism in adipose tissue of rats / A.V. Ferreira [et al.] // *Metabolism*. – 2006. – Vol. 55, № 6. – P. 731-735
118. Efficacy and Safety of Long-term Coadministration of Fenofibrate and Ezetimibe in Patients with Combined Hyperlipidemia: Results of the EFECTL Study / S. Oikawa [et al.] // *J Atheroscler Thromb*. – 2017. – Vol. 24, № 1. – P. 77-94
119. Efficacy of fumaric acid esters in the R6/2 and YAC128 models of Huntington's disease / G. Ellrichmann [et al.] // *PLoS One*. – 2011. – Vol. 6. – P. e16172
120. Electrophile and oxidant damage of mitochondrial DNA leading to rapid evolution of homoplasmic mutations / E. Mambo [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* - 2003. – Vol. 100. – P. 1838–1843
121. Emerging functional similarities and divergences between *Drosophila* Spargel/dPGC-1 and mammalian PGC-1 protein / S. Mukherjee [et al.] // *Front Genet*. – 2014. – Vol. 5. – P. 216
122. Enhanced expression of the transcription factor Nrf2 by cancer chemopreventive agents: role of antioxidant response element-like sequences in the nrf2 promoter / M.K. Kwak [et al.] // *Mol Cell Biol*. – 2002. – Vol. 22, № 9. – P. 2883-2892
123. Enhanced hydrogen peroxide generation accompanies the beneficial bioenergetic effects of methylene blue in isolated brain mitochondria / L. Treutter [et al.] // *Free Radic Biol Med*. – 2014. – Vol. 77. – P. 317-330

124. Epidemiology of early-onset Parkinson's disease in Finland / P. Ylikotila [et al.] // *Parkinsonism Relat Disord.* – 2015. – Vol. 21, № 8. – P. 938-942
125. Epigenetic regulation of carnitine palmitoyltransferase 1 (Cpt1a) by high fat diet / L. Moody [et al.] // *Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech.* – 2019. – Vol. 1862, № 2. – P. 141-152
126. Erythropoietin activates mitochondrial biogenesis and couples red cell mass to mitochondrial mass in the heart / M.S. Carraway [et al.] // *Circ Res.* – 2010. – Vol. 106, № 11. - P. 1722-1730
127. Evans M.J. NRF-1: a trans-activator of nuclear-encoded respiratory genes in animal cells / M.J. Evans, R.C. Scarpulla // *Genes Dev.* – 1990. – Vol. 4. – P. 1023-1034
128. Evidence for the suppression of apoptosis by the peroxisome proliferator activated receptor alpha (PPAR alpha) / R.A. Roberts [et al.] // *Carcinogenesis.* – 1998. – Vol. 19, № 1. – P. 43-48
129. Exercise Training Protects Against Acute Myocardial Infarction via Improving Myocardial Energy Metabolism and Mitochondrial Biogenesis / L. Tao [et al.] // *Cell Physiol Biochem.* – 2015. - Vol. 37, № 1. – P. 162-175
130. Expression of Nrf2 in neurodegenerative diseases / C.P. Ramsey [et al.] // *J Neuropathol Exp Neurol.* – 2007. – Vol. 66, № 1. – P. 75-85
131. Fan W. PPARs and ERRs: molecular mediators of mitochondrial metabolism / W. Fan, R. Evans // *Curr Opin Cell Biol.* – 2015. – Vol. 33. – P. 49-54
132. Fast mitochondrial DNA isolation from mammalian cells for next-generation sequencing / W. Quispe-Tintaya [et al.] // *Biotechniques.* – 2013. – Vol. 55, № 3. – P. 133-136
133. Fatty acids in energy metabolism of the central nervous system / A. Panov [et al.] // *Biomed Res Int.* – 2014. – Vol. 2014. – P. 472459
134. Fernandez-Marcos P.J. Regulation of PGC-1 α , a nodal regulator of mitochondrial biogenesis / P.J. Fernandez-Marcos, J. Auwerx // *Am J Clin Nutr.* – 2011. – Vol. 93. – P. 884S-90

135. Findley L.J. The economic impact of Parkinson's disease / L.J. Findley / Parkinsonism Relat Disord. – 2007. – Vol. 13. – P. S8-S12
136. Focal loss of the glutamate transporter EAAT2 in a transgenic rat model of SOD1 mutant-mediated amyotrophic lateral sclerosis (ALS) / D.S. Howland [et al.] // Proc Natl Acad Sci U S A. – 2002. – Vol. 99. – P. 1604–1609
137. Fractalkine activates NRF2/NFE2L2 and heme oxygenase 1 to restrain tauopathy-induced microgliosis / I. Lastres-Becker [et al.] // Brain. – 2014. – Vol. 137, № Pt 1. – P. 78-91
138. Function of specialized regulatory proteins and signaling pathways in exercise-induced muscle mitochondrial biogenesis / A. T. Erlich [et al.] // Integr Med Res. – 2016. - Vol. 5, № 3. - P. 187-197
139. Genetic and pharmacologic hydrogen sulfide therapy attenuates ischemia-induced heart failure in mice / J.W. Calvert [et al.] // Circulation. – 2010. – Vol. 122, № 1. – P. 11-19
140. Genetic associations of Nrf2-encoding NFE2L2 variants with Parkinson's disease - a multicenter study / M. von Otter [et al.] // BMC Med Genet. – 2014. – Vol. 15. – P. 131
141. Genetic effects of thymine glycol: site-specific mutagenesis and molecular modeling studies / A.K. Basu [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. - 1989. – Vol. 86. – P. 7677–7681
142. Genetic or pharmacological activation of the Drosophila PGC-1 α ortholog spargel rescues the disease phenotypes of genetic models of Parkinson's disease / C.H. Ng [et al.] // Neurobiol Aging. – 2017. – Vol. 55. – P. 33-37
143. Gleyzer N. Control of mitochondrial transcription specificity factors (TFB1M and TFB2M) by nuclear respiratory factors (NRF-1 and NRF-2) and PGC-1 family coactivators / N. Gleyzer, K. Vercauteren, R.C. Scarpulla // Mol Cell Biol. – 2005. - Vol. 25, № 4. – P. 1354-1366
144. Gomez-Ambrosi J. Rapid in vivo PGC-1 mRNA upregulation in brown adipose tissue of Wistar rats by a beta(3)-adrenergic agonist and lack of effect

- of leptin / J. Gomez-Ambrosi, G. Fruhbeck, J.A. Martinez // *Mol Cell Endocrinol.* – 2001. – Vol. 176. – P. 85–90
145. Gonzalez-Lima F. Extinction memory improvement by the metabolic enhancer methylene blue / F. Gonzalez-Lima, A.K. Bruchey // *Learn Mem.* – 2004. – Vol. 11, № 5. – P. 633-640
146. GPA protects the nigrostriatal dopamine system by enhancing mitochondrial function / T.L. Horvath [et al.] // *Neurobiol Dis.* – 2011. – Vol. 43, № 1. – P. 152-162
147. Graziewicz M.A. DNA polymerase gamma in mitochondrial DNA replication and repair / M.A. Graziewicz, M.J. Longley, W.C. Copeland // *Chem Rev.* – 2006. – Vol. 106. – P. 383-405
148. Grimm A. Brain aging and neurodegeneration: from a mitochondrial point of view / A. Grimm, A. Eckert // *J Neurochem.* – 2017. – Vol. 143, № 4. – P. 418-431
149. Grygiel-Górniak B. Peroxisome proliferator-activated receptors and their ligands: nutritional and clinical implications--a review / B. Grygiel-Górniak // *Nutr J.* - 2014. – Vol. 13. – P. 17
150. Hall C.S. Emotional behavior in the rat. I. Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality / C.S Hall // *J. Comp. Psychol.* - 1934. – Vol. 18. – P. 385–403
151. Hamilton J.A. A model for fatty acid transport into the brain / J.A. Hamilton, K. Brunaldi // *J Mol Neurosci.* – 2007. – Vol. 33, № 1. – P. 12-17
152. Harman D. About "Origin and evolution of the free radical theory of aging: a brief personal history, 1954-2009" / D. Harman // *Biogerontology.* – 2009. - Vol. 10, № 6. – P. 773–781
153. Harman D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry / D. Harman // *J Gerontol.* – 1956. – Vol. 11, № 3. – P. 298-300
154. Harrison F.E. Vitamin C function in the brain: vital role of the ascorbate transporter SVCT2 / F.E. Harrison, J.M. May // *Free Radic Biol Med.* – 2009. – Vol. 46, № 6. – P. 719-730

155. He X. Critical cysteine residues of Kelch-like ECH-associated protein 1 in arsenic sensing and suppression of nuclear factor erythroid 2-related factor 2 / X. He, Q. Ma // *J Pharmacol Exp Ther.* – 2010. – Vol. 332, № 1. – P. 66-75
156. Heart positive: design of a randomized controlled clinical trial of intensive lifestyle intervention, niacin and fenofibrate for HIV lipodystrophy/dyslipidemia / S.L. Samson [et al.] // *Contemp Clin Trials.* – 2006. – Vol. 27, № 6. – P. 518-530
157. Heerdt B.G. Changes in the number of mitochondrial genomes during human development / B.G. Heerdt, L.H. Augenlicht // *Exp Cell Res.* – 1990. – Vol. 186. – P. 54-59
158. Hegde M.L. Oxidized base damage and single-strand break repair in mammalian genomes: role of disordered regions and posttranslational modifications in early enzymes / M.L. Hegde, T. Izumi, S. Mitra // *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* – 2012. - Vol. 110. – P. 123–153
159. Heme oxygenase-1 regulates cardiac mitochondrial biogenesis via Nrf2-mediated transcriptional control of nuclear respiratory factor-1 / C.A. Piantadosi [et al.] // *Circ Res.* – 2008. – Vol. 103. – P. 1232-1240
160. Heme-Oxygenase I and PCG-1 α Regulate Mitochondrial Biogenesis via Microglial Activation of Alpha7 Nicotinic Acetylcholine Receptors Using PNU282987 / E. Navarro [et al.] // *Antioxid Redox Signal.* - 2016. – Vol. 27, № 2. – P. 93-105
161. Hepatic peroxisome proliferation in rodents and its significance for humans / P. Bentley [et al.] // *Food Chem Toxicol.* – 1993. – Vol. 31, № 11. – P. 857-907
162. Herculano-Houzel S. Scaling of brain metabolism with a fixed energy budget per neuron: implications for neuronal activity, plasticity and evolution / S. Herculano-Houzel // *PLoS One.* – 2011. – Vol. 6, № 3. – P. e17514
163. HIF-1 regulates insect lifespan extension by inhibiting c-Myc-TFAM signaling and mitochondrial biogenesis / X.W. Lin [et al.] // *Biochim Biophys Acta.* – 2016. – Vol. 1863, № 11. – P. 2594-2603

164. High-resolution dynamics of the transcriptional response to nutrition in *Drosophila*: a key role for dFOXO / B. Gershman [et al.] // *Physiol Genomics*. – 2007. – Vol. 29. – P. 24-34
165. Histone acetyltransferase MOZ acts as a co-activator of Nrf2-MafK and induces tumour marker gene expression during hepatocarcinogenesis / K. Ohta [et al.] // *Biochem J*. – 2007. – Vol. 402, № 3. – P. 559-566
166. Hood D.A. Mechanisms of exercise-induced mitochondrial biogenesis in skeletal muscle / D.A. Hood // *Appl Physiol Nutr Metab*. – 2009. – Vol. 34, № 3. – P. 465-472
167. Hrd1 suppresses Nrf2-mediated cellular protection during liver cirrhosis / T. Wu [et al.] // *Genes Dev*. – 2014. – Vol. 28, № 7. – P. 708-722
168. Human brain contains high levels of heteroplasmy in the noncoding regions of mitochondrial DNA / E.E. Jazin [et al.] // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 1996. – Vol. 93, № 22. – P. 12382-12387
169. Hydralazine induces stress resistance and extends *C. elegans* lifespan by activating the NRF2/SKN-1 signalling pathway / E. Dehghan [et al.] // *Nat Commun*. – 2017. – Vol. 8. – P. 2223
170. Hydrogen sulfide ameliorates learning memory impairment in APP/PS1 transgenic mice: A novel mechanism mediated by the activation of Nrf2 / Y. Liu [et al.] // *Pharmacol Biochem Behav*. – 2016. – Vol. 150-151. – P. 207-216
171. Identification of the gene encoding the human mitochondrial RNA polymerase (h-mtRPOL) by cyberscreening of the Expressed Sequence Tags database / V. Tiranti [et al.] // *Hum Mol Genet*. – 1997. – Vol. 6. – P. 615-625
172. Ikeda Y. Purification and characterization of short-chain, medium-chain, and long-chain acyl-CoA dehydrogenases from rat liver mitochondria. Isolation of the holo- and apoenzymes and conversion of the apoenzyme to the holoenzyme / Y. Ikeda, K. Okamura-Ikeda, K. Tanaka // *J Biol Chem*. – 1985. – Vol. 260, № 2. – P. 1311-1325

173. Impaired mitochondrial biogenesis contributes to mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease / B. Sheng [et al.] // *J Neurochem.* – 2012. – Vol. 120, № 3. – P. 419-429
174. Impaired Nrf2 regulation of mitochondrial biogenesis in rostral ventrolateral medulla on hypertension induced by systemic inflammation / K.L.H Wu [et al.] // *Free Radic Biol Med.* - 2016. – Vol. 97. – P. 58-74
175. Impaired PGC-1alpha function in muscle in Huntington's disease / R.K. Chaturvedi [et al.] // *Hum Mol Genet.* – 2009. – Vol. 18, № 16. – P. 3048-3065
176. Increased Alzheimer's disease-like pathology in the APP/ PS1ΔE9 mouse model lacking Nrf2 through modulation of autophagy / G. Joshi [et al.] // *Neurobiol Aging.* – 2015. – Vol. 36, № 2. – P. 664-679
177. Increased growth of brown adipose tissue but its reduced thermogenic activity in creatine-depleted rats fed beta-guanidinopropionic acid / H. Yamashita [et al.] // *Biochim Biophys Acta.* – 1995. – Vol. 1230, № 1-2. – P. 69-73
178. Intracellular compartmentation, structure and function of creatine kinase isoenzymes in tissues with high and fluctuating energy demands: the 'phosphocreatine circuit' for cellular energy homeostasis / T. Wallimann [et al.] // *Biochem J.* – 1992. – Vol. 281, № Pt 1. – P. 21-40
179. Intracellular iron, but not copper, plays a critical role in hydrogen peroxide-induced DNA damage / A. Barbouti [et al.] // *Free Radic. Biol. Med.* – 2001. - Vol. 31. – P. 490–498
180. Intrahippocampal injection of a lentiviral vector expressing Nrf2 improves spatial learning in a mouse model of Alzheimer's disease / K. Kanninen [et al.] // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2009. – Vol. 106, № 38. – P. 16505-16510
181. Intramolecular control of protein stability, subnuclear compartmentalization, and coactivator function of peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1alpha / M. Sano [et al.] // *J Biol Chem.* – 2007. – Vol. 282. – P. 25970–25980
182. Isolation of NF-E2-related factor 2 (Nrf2), a NF-E2-like basic leucine zipper transcriptional activator that binds to the tandem NF-E2/AP1 repeat of the

- beta-globin locus control region / P. Moi [et al.] // Proc Natl Acad Sci U S A. – 1994. – Vol. 91, № 21. – P. 9926-9930
183. Issemann I. Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators / I. Issemann, S. Green // Nature. - 1990. – Vol. 347, № 6294. – P. 645-650
184. Johnson D.A. Nrf2—a therapeutic target for the treatment of neurodegenerative diseases / D.A. Johnson, J.A. Johnson // Free Radical Biology & Medicine. – 2015. – Vol. 88. – P. 253–267
185. Joshi G. The Nrf2-ARE pathway: a valuable therapeutic target for the treatment of neurodegenerative diseases / G. Joshi, J.A. Johnson // Recent Pat CNS Drug Discov. – 2012. – Vol. 7, № 3. – P. 218-229
186. Kadohara K. Diabetes mellitus and risk of early-onset Alzheimer's disease: a population-based case-control study / K. Kadohara, I. Sato, K. Kawakami // Eur J Neurol. – 2017. – Vol. 24, № 7. – P. 944-949
187. Kaeberlein M. The SIR2/3/4 complex and SIR2 alone promote longevity in *Saccharomyces cerevisiae* by two different mechanisms / M. Kaeberlein, M. McVey, L. Guarente // Genes Dev. – 1999. – Vol. 13. – P. 2570–2580
188. Keap1 is localized in neuronal and glial cytoplasmic inclusions in various neurodegenerative diseases / K. Tanji [et al.] // J Neuropathol Exp Neurol. – 2013. – Vol. 72, № 1. – P. 18-28
189. Kelly D.P. Transcriptional regulatory circuits controlling mitochondrial biogenesis and function / D.P. Kelly, R.C. Scarpulla // Genes Dev. – 2004. – Vol. 18, № 4. – P. 357-368
190. Lang A.E. Parkinson's disease. First of two parts / A.E. Lang, A.M. Lozano // N Engl J Med. – 1998. – Vol. 339, № 15. – P. 1044-1053
191. Langer T. Acute muscular syndrome associated with administration of clofibrate / T. Langer, R.I. Levy // N Engl J Med. – 1968. – Vol. 279, № 16. – P. 856-858

192. Lee C. Collaborative Power of Nrf2 and PPAR γ Activators against Metabolic and Drug-Induced Oxidative Injury / C. Lee // *Oxid Med Cell Longev.* - 2017. – Vol. 2017. – P. 1378175
193. Lest we forget you--methylene blue.... / R.H. Schirmer [et al.] // *Neurobiol Aging.* – 2011. – Vol. 32, № 12. – P. 2325.e7-16
194. Levels of oxidative DNA damage product 8-hydroxy-2-deoxyguanosine in human serum increases with age / S. Rattan [et al.] // *Med. Sci. Res.* - 1995. – Vol. 23. – P. 469–470
195. Lin J. Metabolic control through the PGC-1 family of transcription coactivators / J. Lin, C. Handschin, B.M. Spiegelman // *Cell Metab.* – 2005. – Vol. 1. – P. 361-370
196. Lin T.M. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases / T.M. Lin, F.M. Beal // *NATURE.* – 2006. – Vol. 443. – P. 19
197. Lindwall G. Phosphorylation affects the ability of tau protein to promote microtubule assembly / G. Lindwall, R.D. Cole // *J Biol Chem.* – 1984. – Vol. 259, № 8. – P. 5301-5305
198. Lithium Promotes Longevity through GSK3/NRF2-Dependent Hormesis / J.I. Castillo-Quan [et al.] // *Cell Rep.* – 2016. – Vol. 15. – P. 638-650
199. Liu R. Sulforaphane protects rabbit corneas against oxidative stress injury in keratoconus through activation of the Nrf-2/HO-1 antioxidant pathway / R. Liu, X. Yan // *Int J Mol Med.* – 2018. – Vol. 42, № 5. – P. 2315-2328
200. Liu W. Oxidative stress-elicited YY1 potentiates antioxidative response via enhancement of NRF2-driven transcriptional activity: A potential neuronal defensive mechanism against ischemia/reperfusion cerebral injury / W. Liu, Q. Guo, H. Zhao // *Biomed Pharmacother.* – 2018. – Vol. 108. – P. 698-706
201. Localization of Fe(2+) at an RTGR sequence within a DNA duplex explains preferential cleavage by Fe(2+) and H₂O₂ / P. Rai [et al.] // *J. Mol. Biol.* - 2001. – Vol. 312. – P. 1089–1101
202. Localization of PPAR isotypes in the adult mouse and human brain / A. Warden [et al.] // *Sci Rep.* – 2016. – Vol. 6. – P. 27618

203. LORD-Q: a long-run real-time PCRbased DNA-damage quantification method for nuclear and mitochondrial genome analysis / S. Lehle [et al.] // *Nucleic Acids Res.* - 2014. – Vol. 42. – P. e41
204. Ludatscher R.M. Abnormalities of intramuscular nerves in old mice: an ultrastructural study / R.M. Ludatscher, M. Silbermann // *Exp Gerontol.* – 1988. – Vol. 23, № 2. – P. 127-137
205. Major determinants of photoinduced cell death: Subcellular localization versus photosensitization efficiency / C.S. Oliveira [et al.] // *Free Radic Biol Med.* – 2011. – Vol. 51, № 4. – P. 824–833
206. Mammalian mitochondrial nucleoids: organizing an independently minded genome / I.J. Holt [et al.] // *Mitochondrion.* - 2007. – Vol. 7. – P. 311–321
207. McGarvey J.F. Premature contractions and clofibrate / J.F. McGarvey // *JAMA.* – 1973. – Vol. 225, № 6. – P. 638
208. Measurement of striatal H₂O₂ by microdialysis following global forebrain ischemia and reperfusion in the rat: correlation with the cytotoxic potential of H₂O₂ in vitro / P.A. Hyslop [et al.] // *Brain Res.* - 1995. – Vol. 671. – P. 181–186
209. Measuring anxiety- and locomotion-related behaviours in mice: a new way of using old tests / L.M. Fraser [et al.] // *Psychopharmacology (Berl).* – 2010. – Vol. 211, № 1. – P. 99-112
210. Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1 / Z. Wu [et al.] // *Cell.* – 1999. – Vol. 98. – P. 115-124
211. Mechanistic Investigations of the Mitochondrial Complex I Inhibitor Rotenone in the Context of Pharmacological and Safety Evaluation / S. Heinz [et al.] // *Sci Rep.* – 2017. – Vol. 7. – P. 45465
212. Mehendale H.M. PPAR-alpha: a key to the mechanism of hepatoprotection by clofibrate / H.M. Mehendale // *Toxicol Sci.* – 2000. – Vol. 57, № 2. – P. 187-190

213. Meldonium improves Huntington's disease mitochondrial dysfunction by restoring peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator 1 α expression / F. Di Cristo [et al.] // *J Cell Physiol.* – 2018. – Vol. 1. – P. 14
214. Memory facilitation by methylene blue: dose-dependent effect on behavior and brain oxygen consumption / P.D. Riha [et al.] // *Eur J Pharmacol.* – 2005. – Vol. 511, № 2-3. – P. 151-158
215. Merry T.L. Nuclear factor erythroid-derived 2-like 2 (NFE2L2, Nrf2) mediates exercise-induced mitochondrial biogenesis and the anti-oxidant response in mice / T.L. Merry, M. Ristow // *J Physiol.* – 2016. – Vol. 594. – P. 5195-5207
216. Merzetti E.M. spargel, the PGC-1 α homologue, in models of Parkinson disease in *Drosophila melanogaster* / E.M. Merzetti, B.E. Staveley // *BMC Neurosci.* – 2015. – Vol. 16. – P. 70
217. Metformin pharmacogenomics: current status and future directions / A.C. Pawlyk [et al.] // *Diabetes.* – 2014. – Vol. 63. – P. 2590-2599
218. Methylation of 12S rRNA is necessary for in vivo stability of the small subunit of the mammalian mitochondrial ribosome / M.D. Metodiev [et al.] // *Cell Metab.* – 2009. – Vol. 9, № 4. – P. 386-397
219. Methylene blue as a cerebral metabolic and hemodynamic enhancer / A.L. Lin [et al.] // *PLoS One.* – 2012. – Vol. 7, № 10. – P. e46585
220. Methylene blue delays cellular senescence and enhances key mitochondrial biochemical pathways / H. Atamna [et al.] // *FASEB J.* – 2008. – Vol. 22, № 3. – P. 703-712
221. Methylene Blue Reduces Acute Cerebral Ischemic Injury via the Induction of Mitophagy / Y. Di [et al.] // *Mol Med.* – 2015. – Vol. 21. – P. 420-429
222. Methylene blue upregulates Nrf2/ARE genes and prevents tau-related neurotoxicity / C. Stack [et al.] // *Hum Mol Genet.* – 2014. – Vol. 23, № 14. – P. 3716–3732

223. Mini-GAGR, an intranasally applied polysaccharide, activates the neuronal Nrf2-mediated antioxidant defense system / K. Murphy [et al.] // *J Biol Chem.* – 2018. – Vol. 293, № 47. – P. 18242-18269
224. Mitochondria and ageing: role in heart, skeletal muscle and adipose tissue / K. Boengler [et al.] // *J Cachexia Sarcopenia Muscle.* - 2017. – Vol. 8, № 3. - P. 349-369
225. Mitochondria mass is low in mouse substantia nigra dopamine neurons: implications for Parkinson's disease / C.L. Liang [et al.] // *Exp Neurol.* – 2007. – Vol. 203, № 2. – P. 370-380
226. Mitochondrial bioenergetics in aging / G. Lenaz [et al.] // *Biochim Biophys Acta.* – 2000. – Vol. 1459. – P. 397-404
227. Mitochondrial biogenesis by NO yields functionally active mitochondria in mammals / E. Nisoli [et al.] // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2004. – Vol. 101, № 47. – P. 16507-16512
228. Mitochondrial biogenesis in mammals: the role of endogenous nitric oxide / E. Nisoli [et al.] // *Science.* – 2003. – Vol. 299, № 5608. – P. 896-899
229. Mitochondrial defect in Huntington's disease caudate nucleus / M. Gu [et al.] // *Ann Neurol.* – 1996. – Vol. 39. – P. 385–389
230. Mitochondrial DNA as a non-invasive biomarker: accurate quantification using real time quantitative PCR without co-amplification of pseudogenes and dilution bias / A.N. Malik [et al.] // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* - 2011. – Vol. 412. – P. 1–7
231. Mitochondrial DNA damage is sensitive to exogenous H₂O₂ but independent of cellular ROS production in prostate cancer cells / S.W.Chan [et al.] // *Mutat. Res.* - 2011. – Vol. 716. – P. 40–50
232. Mitochondrial DNA damage: molecular marker of vulnerable nigral neurons in Parkinson's disease / L.H. Sanders [et al.] // *Neurobiol Dis.* – 2014. – Vol. 70. – P. 214-223

233. Mitochondrial H₂O₂ regulates the angiogenic phenotype via PTEN oxidation / K.M. Connor [et al.] // *J Biol Chem.* – 2005. – Vol. 280, № 17. – P. 16916-16924
234. Mitochondrial hormesis links low-dose arsenite exposure to lifespan extension / S. Schmeisser [et al.] // *Aging Cell.* – 2013. – Vol. 12. – P. 508-517
235. Mitochondrial Mutations in Cholestatic Liver Disease with Biliary Atresia / H. Koh [et al.] // *Sci Rep.* – 2018. – Vol. 8, № 1. – P. 905
236. Mitochondrial superoxide production and nuclear factor erythroid 2-related factor 2 activation in p75 neurotrophin receptor-induced motor neuron apoptosis M. Pehar [et al.] // *J Neurosci.* – 2007. – Vol. 27. – P. 7777–7785
237. Moderate-Intensity Physical Exercise Protects Against Experimental 6-Hydroxydopamine-Induced Hemiparkinsonism Through Nrf2-Antioxidant Response Element Pathway / A.S. Aguiar Jr [et al.] // *Neurochem Res.* - 2016. – Vol. 41. – P. 64-72
238. Multiple environmental and genetic factors influence skeletal muscle PGC-1alpha and PGC-1beta gene expression in twins / C. Ling [et al.] // *J. Clin Invest.* – 2004. – Vol. 114. – P. 1518–1526
239. Mutagenesis of mitochondrial DNA in Fuchs endothelial corneal dystrophy / P. Czarny [et al.] // *Mutat. Res.* - 2013. – Vol. 760. – P. 42–47
240. NAD (P) H: Quinone oxidoreductase activity is increased in hippocampal pyramidal neurons of patients with Alzheimer's disease / Y. Wang [et al.] // *Neurobiology of Aging.* – 2000. – Vol. 21, № 4. – P. 525–531
241. NADPH Oxidase 4 (Nox4) Suppresses Mitochondrial Biogenesis and Bioenergetics in Lung Fibroblasts via a Nuclear Factor Erythroid-derived 2-like 2 (Nrf2)-dependent Pathway / K. Bernard [et al.] // *J Biol Chem.* – 2017. – Vol. 292, № 7. – P. 3029-3038
242. Naringenin protects against 6-OHDA-induced neurotoxicity via activation of the Nrf2/ARE signaling pathway / H. Lou [et al.] // *Neuropharmacology.* – 2014. – Vol. 79. – P. 380-388

243. Nass S. Intramitochondrial fibers with dna characteristics. Ii. Enzymatic and other hydrolytic treatments / S. Nass, M.M. Nass // *J Cell Biol.* – 1963. – Vol. 19. – P. 613-629
244. Natural history of multiple sclerosis in a population-based cohort / M. Debouverie [et al.] // *Eur J Neurol.* – 2008. – Vol. 15, № 9. – P. 916-921
245. Natural thioallyl compounds increase oxidative stress resistance and lifespan in *Caenorhabditis elegans* by modulating SKN-1/Nrf / T. Ogawa [et al.] // *Sci Rep.* – 2016. – Vol. 6. – P. 21611
246. Neuroprotective actions of methylene blue and its derivatives / E. Poteet [et al.] // *PloS one.* – 2012. – Vol. 7, № 10. – P. e48279
247. Neuroprotective and Functional Improvement Effects of Methylene Blue in Global Cerebral Ischemia / Q. Lu [et al.] // *Mol Neurobiol.* – 2016. – Vol. 53, № 8. – P. 5344-5355
248. Neuroprotective effects of peroxisome proliferator-activated receptor alpha and gamma agonists in model of parkinsonism induced by intranigral 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine / J.K. Barbiero [et al.] // *Behav Brain Res.* – 2014. – Vol. 274. – P. 390-399
249. NFE2L2 variations reduce antioxidant response in patients with Parkinson disease / Y. Gui [et al.] // *Oncotarget.* – 2016. – Vol. 7, № 10. – P. 10756-64
250. NF-E2-related factor 2, a key inducer of antioxidant defenses, negatively regulates the CFTR transcription / C. René [et al.] // *Cell Mol Life Sci.* – 2010. – Vol. 67, № 13. – P. 2297-2309
251. Nitric oxide synthase-2 regulates mitochondrial Hsp60 chaperone function during bacterial peritonitis in mice / H.B. Suliman [et al.] // *Free Radic Biol Med.* – 2010. – Vol. 48, № 5. – P. 736-746
252. Novel Approaches for the Treatment of Alzheimer's and Parkinson's Disease / M. Van Bulck [et al.] // *Int J Mol Sci.* – 2019. – Vol. 20, № 3. – P. E719
253. Nrf2 activation in astrocytes protects against neurodegeneration in mouse models of familial amyotrophic lateral sclerosis / M.R. Vargas [et al.] // *J Neurosci.* – 2008. – Vol. 28. – P. 13574–13581

254. Nrf2 activity is lost in the spinal cord and its astrocytes of aged mice / W. Duan [et al.] // *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* – 2009. – Vol. 45. – P. 388-397
255. Nrf2 is controlled by two distinct β -TrCP recognition motifs in its Neh6 domain, one of which can be modulated by GSK-3 activity / S. Chowdhry [et al.] // *Oncogene.* – 2013. - Vol. 32, № 32. – P. 3765-3781
256. Nrf2 modulates contractile and metabolic properties of skeletal muscle in streptozotocin-induced diabetic atrophy / S.A. Whitman [et al.] // *Exp Cell Res.* – 2013. – Vol. 319. – P. 2673-2683
257. Nrf2 promotes alveolar mitochondrial biogenesis and resolution of lung injury in *Staphylococcus aureus* pneumonia in mice / J. Athale [et al.] // *Free Radic Biol Med.* - 2012. – Vol. 53, № 8. – P. 1584-1594
258. Nrf2 reduces levels of phosphorylated tau protein by inducing autophagy adaptor protein NDP52 / C. Jo [et al.] // *Nat Commun.* – 2014. – Vol. 5. – P. 3496
259. NRF2 Regulates PINK1 Expression under Oxidative Stress Conditions / H. Murata [et al.] // *PLoS One.* – 2015. – Vol. 10, № 11. – P. e0142438
260. Nrf2-mediated liver protection by esculentoside A against acetaminophen toxicity through the AMPK/Akt/GSK3 β pathway / L. Wang [et al.] // *Free Radic Biol Med.* - 2016. – Vol. 101. – P. 401-412
261. Nuclear erythroid 2-related factor 2-antioxidative response element signaling pathway in motor cortex and spinal cord in amyotrophic lateral sclerosis / A. Sarlette [et al.] // *J Neuropathol Exp Neurol.* – 2008. – Vol. 67. - P. 1055–1062
262. Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 protects against beta amyloid / K. Kanninen [et al.] // *Mol Cell Neurosci.* – 2008. – Vol. 39, № 3. – P. 302-313
263. Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1alpha and SIRT1 / J.T. Rodgers [et al.] // *Nature.* – 2005. – Vol. 434. – P. 113–118
264. Onyango I.G. Mitochondria in the pathophysiology of Alzheimer's and Parkinson's diseases / I.G. Onyango, S.M. Khan, J.P. Bennett Jr // *Front Biosci (Landmark Ed).* – 2017. – Vol. 22. – P. 854-872

265. Orientin alleviates cognitive deficits and oxidative stress in A β 1-42-induced mouse model of Alzheimer's disease / L. Yu [et al.] // *Life Sci.* – 2015. – Vol. 121. – P. 104-109
266. Oudman I. The effect of the creatine analogue beta-guanidinopropionic acid on energy metabolism: a systematic review / I. Oudman, J.F. Clark, L.M. Brewster // *PLoS One.* – 2013. – Vol. 8, № 1. – P. e52879
267. Oxidant Mechanisms in Renal Injury and Disease / B.B. Ratliff [et al.] // *Antioxid Redox Signal.* – 2016. - Vol. 25, № 3. – P. 119-146
268. Oxidative damage, mitochondrial oxidant generation and antioxidant defenses during aging and in response to food restriction in the mouse / R.S. Sohal [et al.] // *Mech. Ageing Dev.* - 1994. – Vol. 74. – P. 121–133
269. Oxidative DNA damage in the aging mouse brain / F. Cardozo-Pelaez [et al.] // *Mov. Disord.* - 1999. – Vol. 14. – P. 972–980
270. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease / M.S. Cooke [et al.] // *FASEB J.* - 2003. – Vol. 17. – P. 1195–1214
271. Oxidative stress and Parkinson's disease: New hopes in treatment with herbal antioxidants / Sarrafchi A [et al.] // *Curr Pharm Des.* – 2016. – Vol. 22, № 2. – P. 238-246
272. Oxidative stress sensor Keap1 functions as an adaptor for Cul3-based E3 ligase to regulate proteasomal degradation of Nrf2 / A. Kobayashi [et al.] // *Mol Cell Biol.* – 2004. – Vol. 24. - № 16. – P. 7130-7139
273. p38 Mitogen-activated protein kinase is the central regulator of cyclic AMP-dependent transcription of the brown fat uncoupling protein 1 gene / W. Cao [et al.] // *Mol Cell Biol.* – 2004. – Vol. 24. – P. 3057–3067
274. p53 orchestrates the PGC-1 α -mediated antioxidant response upon mild redox and metabolic imbalance / K. Aquilano [et al.] // *Antioxid Redox Signal.* - 2013. – Vol. 18. – P. 386-399
275. p62/SQSTM1 is a target gene for transcription factor NRF2 and creates a positive feedback loop by inducing antioxidant response element-driven gene

- transcription / A. Jain [et al.] // *J Biol Chem.* – 2010. – Vol. 285, № 29. – P. 22576-22591
276. Palikaras K. Coordination of mitophagy and mitochondrial biogenesis during ageing in *C. elegans* / K. Palikaras, E. Lionaki, N. Tavernarakis // *Nature.* – 2015. – Vol. 521. – P. 525-528
277. Pandolfo M. Friedreich ataxia / M. Pandolfo // *Arch Neurol.* – 2008. – Vol. 65, № 10. – P. 1296-1303
278. PARK2 variability in Polish Parkinson's disease patients--interaction with mitochondrial haplogroups / K. Gaweda-Walerych [et al.] // *Parkinsonism Relat Disord.* – 2012. – Vol. 18, № 5. – P. 520-524
279. Parker Jr W.D. Cytochrome oxidase deficiency in Alzheimer's disease / W.D. Parker Jr, C.M. Filley, J.K. Parks // *Neurology.* – 1990. – Vol. 40, № 8. – P. 1302-1303
280. Parkin enhances mitochondrial biogenesis in proliferating cells / Y. Kuroda [et al.] // *Hum Mol Genet.* – 2006. – Vol. 15, № 6. – P. 883-895
281. Peroxisome proliferator-activated receptor γ co-activator 1- α as a critical co-activator of the murine hepatic oxidative stress response and mitochondrial biogenesis in *Staphylococcus aureus* sepsis / A.D. Cherry [et al.] // *J Biol Chem.* – 2014. – Vol. 289. – P. 41-52
282. PGC-1alpha expression decreases in the Alzheimer disease brain as a function of dementia / W. Qin [et al.] // *Arch Neurol.* – 2009. – Vol. 66, № 3. – P. 352-361
283. PGC-1alpha gene expression is down-regulated by Akt- mediated phosphorylation and nuclear exclusion of FoxO1 in insulin-stimulated skeletal muscle / R.J. Southgate [et al.] // *FASEB J.* – 2005. – Vol. 19. – P. 2072–2074
284. PGC-1 α attenuates hydrogen peroxide-induced apoptotic cell death by upregulating Nrf-2 via GSK3 β inactivation mediated by activated p38 in HK-2 Cells / H.I. Choi [et al.] // *Sci Rep.* – 2017. – Vol. 7. – P. 4319

285. Pharmacokinetic interactions and tolerability of berberine chloride with simvastatin and fenofibrate: an open-label, randomized, parallel study in healthy Chinese subjects / G. Li [et al.] // *Drug Des Devel Ther.* – 2018. – Vol. 13. – P. 129-139
286. Pharmacokinetics and organ distribution of intravenous and oral methylene blue / C. Peter [et al.] // *Eur J Clin Pharmacol.* – 2000. - Vol. 56, № 3. – P. 247–250
287. Photophysical Characterization and in Vitro Phototoxicity Evaluation of 5,10,15,20-Tetra(quinolin-2-yl)porphyrin as a Potential Sensitizer for Photodynamic Therapy / L.D. Costa [et al.] // *Molecules.* – 2016. – Vol. 21, № 4. – P. 439
288. Piantadosi C.A. Mitochondrial transcription factor A induction by redox activation of nuclear respiratory factor 1 / C.A. Piantadosi, H.B. Suliman // *J Biol Chem.* – 2006. – Vol. 281, № 1. – P. 324-333
289. Pikó L. Amounts of mitochondrial DNA and abundance of some mitochondrial gene transcripts in early mouse embryos / L. Pikó, K.D. Taylor // *Dev Biol.* – 1987. – Vol. 123, № 2. – P. 364-374
290. PINK1/Parkin-mediated mitophagy is dependent on VDAC1 and p62/SQSTM1 / S. Geisler [et al.] // *Nat Cell Biol.* – 2010. – Vol. 12, № 2. – P. 119-131
291. PMI: a $\Delta\Psi_m$ independent pharmacological regulator of mitophagy / D.A. East [et al.] // *Chem Biol.* – 2014. – Vol. 21, № 11. – P. 1585-1596
292. Pohjoismäki J.L. Of circles, forks and humanity: topological organisation and replication of mammalian mitochondrial DNA / J.L. Pohjoismäki, S. Goffart // *BioEssays.* - 2011. – Vol. 33. – P. 290–299
293. Pokkunuri I. Grape Powder Improves Age-Related Decline in Mitochondrial and Kidney Functions in Fischer 344 Rats / I. Pokkunuri, Q. Ali, M. Asghar // *Oxid Med Cell Longev.* – 2016. – Vol. 2016. – P. 6135319

294. Polyphenols activate Nrf2 in astrocytes via H₂O₂, semiquinones, and quinones / H. Erlank [et al.] // *Free Radic Biol Med.* – 2011. – Vol. 51, № 12. – P. 2319-2327
295. Possible mechanisms of the fibrate-induced increase in serum creatinine / V. Tsimihodimos [et al.] // *Clin Nephrol.* – 2002. – Vol. 57, № 5. – P. 407-408
296. PPARs: regulators of metabolism and as therapeutic targets in cardiovascular disease. Part II: PPAR- β/δ and PPAR- γ / L. Han [et al.] // *Future Cardiol.* – 2017. – Vol. 13, № 3. – P. 279-296
297. Primary cultured astrocytes from old rats are capable to activate the Nrf2 response against MPP⁺ toxicity after tBHQ pretreatment / A. Alarcón-Aguilar [et al.] // *Neurobiol Aging.* – 2014. – Vol. 35, № 8. – P. 1901-1912
298. Protection from mitochondrial complex II inhibition in vitro and in vivo by Nrf2-mediated transcription / M.J. Calkins [et al.] // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2005. – Vol. 102. – P. 244–249
299. Protective effect of 3H-1, 2-dithiole-3-thione on cellular model of Alzheimer's disease involves Nrf2/ARE signaling pathway / L. Wang [et al.] // *European Journal of Pharmacology.* – 2017. – Vol. 795. – P. 115–123
300. Protective Effects of Quercetin on Mitochondrial Biogenesis in Experimental Traumatic Brain Injury via the Nrf2 Signaling Pathway / X. Li [et al.] // *PLoS One.* – 2016. – Vol. 11. – P. e0164237
301. Protective roles of *Amanita caesarea* polysaccharides against Alzheimer's disease via Nrf2 pathway / Z. Li [et al.] // *Int J Biol Macromol.* – 2019. – Vol. 121. – P. 29-37
302. Proteome alterations in rat mitochondria caused by aging / N.A. Dencher [et al.] // *Ann N Y Acad Sci.* – 2007. – Vol. 1100. – P. 291-298
303. Pterostilbene Decreases Cardiac Oxidative Stress and Inflammation via Activation of AMPK/Nrf2/HO-1 Pathway in Fructose-Fed Diabetic Rats / R. Kosuru [et al.] // *Cardiovasc Drugs Ther.* - 2018. – Vol. 32. – P. 147-163

304. Puerarin alleviates cognitive impairment and oxidative stress in APP/PS1 transgenic mice / Y. Zhou [et al.] // *Int J Neuropsychopharmacol.* – 2014. – Vol. 17, № 4. – P. 635-644
305. Qiao H. Interaction of the transcription start site core region and transcription factor YY1 determine ascorbate transporter SVCT2 exon 1a promoter activity / H. Qiao, J.M. May // *PLoS One.* – 2012. – Vol. 7, № 4. – P. e35746
306. Quantification of DNA damage by real-time qPCR / W. Wang [et al.] // *Methods Mol. Biol.* – 2016. - Vol. 1351. – P. 27–32
307. Quinone reductase (NQO1), a sensitive redox indicator, is increased in Alzheimer's disease / A.K. Raina [et al.] // *Redox Report.* – 1999. – Vol. 4, № 1–2. – P. 23–27
308. Ratto A. Phosphagen kinase evolution. Expression in echinoderms / A. Ratto, B.M. Shapiro, R. Christen // *Eur J Biochem.* – 1989. – Vol. 186, № 1-2. – P. 195-203
309. Rebelo A.P. Mitochondrial DNA transcription regulation and nucleoid organization / A.P. Rebelo, L.M. Dillon, C.T. Moraes // *J Inherit Metab Dis.* – 2011. – Vol. 34, № 4. – P. 941-951
310. Reddy J.K. Peroxisomal beta-oxidation and peroxisome proliferator-activated receptor alpha: an adaptive metabolic system / J.K. Reddy, T. Hashimoto // *Annu Rev Nutr.* – 2001. – Vol. 21. – P. 193-230
311. Redox regulation of PI 3-kinase signalling via inactivation of PTEN / N.R. Leslie [et al.] // *EMBO J.* – 2003. – Vol. 22, № 20. – P. 5501-5510
312. Reduced steady-state levels of mitochondrial RNA and increased mitochondrial DNA amount in human brain with aging / A. Barrientos [et al.] // *Brain Res Mol Brain Res.* - 1997. – Vol. 52, № 2. – P. 284-289
313. Regional NAD(P)H:quinone oxidoreductase activity in Alzheimer's disease / K.S. SantaCruz [et al.] // *Neurobiol Aging.* – 2004. – Vol. 25, № 1. – P. 63-69
314. Regulation of neuron mitochondrial biogenesis and relevance to brain health / I.G. Onyango [et al.] // *Biochim Biophys Acta.* – 2010. – Vol. 802. – P. 228-234

315. Regulation of NT-PGC-1 α subcellular localization and function by PKA-dependent modulation of nuclear export by CRM1 / J.S. Chang [et al.] // *J Biol Chem.* – 2010. – Vol. 285. – P. 18039–18050
316. Regulation of the MEF2 family of transcription factors by p38 / M. Zhao [et al.] // *Mol Cell Biol.* – 1999. – Vol. 19. – P. 21–30
317. Repurposing the NRF2 Activator Dimethyl Fumarate as Therapy Against Synucleinopathy in Parkinson's Disease / I. Lastres-Becker [et al.] // *Antioxid Redox Signal.* – 2016. – Vol. 25, № 2. – P. 61-77
318. Restoration of insulin-sensitive glucose transporter (GLUT4) gene expression in muscle cells by the transcriptional coactivator PGC-1 / L.F. Michael [et al.] // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 2001. – Vol. 98. – P. 3820–3825
319. RNF34 modulates the mitochondrial biogenesis and exercise capacity in muscle and lipid metabolism through ubiquitination of PGC-1 in *Drosophila* / P. Wei [et al.] // *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai).* – 2018. – Vol. 50. – P. 1038-1046
320. Robinson D.M. Effect of creatine manipulation on fast-twitch skeletal muscle of the mouse / D.M. Robinson, D.S. Loiselle // *Clin Exp Pharmacol Physiol.* – 2002. – Vol. 29, № 12. – P. 1105-1111
321. Rogers R.P. Increased mitochondrial biogenesis preserves intestinal stem cell homeostasis and contributes to longevity in Indy mutant flies / R.P. Rogers, B. Rogina // *Aging (Albany NY).* – 2014. – Vol. 6. – P. 335-350
322. Rogina B. Sir2 mediates longevity in the fly through a pathway related to calorie restriction / B. Rogina, S.L. Helfand // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 2004. – Vol. 101. – P. 15998–60003
323. Rojas J.C. Neurometabolic mechanisms for memory enhancement and neuroprotection of methylene blue / J.C. Rojas, A.K. Bruchey, F. Gonzalez-Lima // *Prog Neurobiol.* – 2012. – Vol. 96, № 1. – P. 32-45
324. Role of Nrf2 and protective effects of Metformin against tobacco smoke-induced cerebrovascular toxicity / S. Prasad [et al.] // *Redox Biol.* – 2017. – Vol. 12. – P. 58-69

325. Role of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha (PPARalpha) in bezafibrate-induced hepatocarcinogenesis and cholestasis / T. Hays [et al.] // *Carcinogenesis*. – 2005. – Vol. 26, № 1. – P. 219-227
326. Rothfuss O. Analysis of differential DNA damage in the mitochondrial genome employing a semi-long run real-time PCR approach / O. Rothfuss, T. Gasser, N. Patenge // *Nucleic Acids Res.* – 2010. – Vol. 38, № 4. – P. e24
327. RXR α inhibits the NRF2-ARE signaling pathway through a direct interaction with the Neh7 domain of NRF2 / H. Wang [et al.] // *Cancer Res.* – 2013. – Vol. 73, № 10. – P. 3097-3108
328. Ryoo I.G. Regulatory crosstalk between the oxidative stress-related transcription factor Nfe2l2/Nrf2 and mitochondria / I.G. Ryoo, M.K. Kwak // *Toxicol Appl Pharmacol.* – 2018. – Vol. 359. – P. 24-33
329. Salat D. Levodopa in the treatment of Parkinson's disease: current status and new developments / D. Salat, E. Tolosa // *J Parkinsons Dis.* – 2013. – Vol. 3, № 3. – P. 255-269
330. Sanders L.H. Oxidative damage to macromolecules in human Parkinson disease and the rotenone model / L.H. Sanders, J. Timothy Greenamyre // *Free Radic Biol Med.* – 2013. – Vol. 62. – P. 111-120
331. Scarpulla R.C. Metabolic control of mitochondrial biogenesis through the PGC-1 family regulatory network / R.C. Scarpulla // *Biochim Biophys Acta.* – 2011. – Vol. 1813, № 7. – P. 1269-1278
332. Scarpulla R.C. Nuclear control of respiratory chain expression by nuclear respiratory factors and PGC-1-related coactivator / R.C. Scarpulla // *Ann N Y Acad Sci.* – 2008. – Vol. 1147. – P. 321-334
333. Scarpulla R.C. Transcriptional integration of mitochondrial biogenesis / R.C. Scarpulla, R.B. Vega, D.P. Kelly // *Trends Endocrinol Metab.* – 2012. – Vol. 23, № 9. – P. 459-466
334. Scarpulla R.C. Transcriptional paradigms in mammalian mitochondrial biogenesis and function / R.C. Scarpulla // *Physiol Rev.* – 2008. – Vol. 88. – P. 611-638

335. Scavenging of H₂O₂ by mouse brain mitochondria / Starkov A.A. [et al.] // *J Bioenerg Biomembr.* – 2014. – Vol. 46, № 6. – P. 471-477
336. SCF/ β -TrCP promotes glycogen synthase kinase 3-dependent degradation of the Nrf2 transcription factor in a Keap1-independent manner / P. Rada [et al.] // *Mol Cell Biol.* – 2011. – Vol. 31, № 6. – P. 1121-1133
337. Schatz G. Deoxyribonucleic acid associated with yeast mitochondria / G. Schatz, E. Haslbrunner, H. Tuppy // *Biochem Biophys Res Commun.* – 1964. – Vol. 15, № 2. – P. 127-132
338. Schönfeld P. Why does brain metabolism not favor burning of fatty acids to provide energy? Reflections on disadvantages of the use of free fatty acids as fuel for brain / P. Schönfeld, G. J. Reiser // *Cereb Blood Flow Metab.* – 2013. – Vol. 33, № 10. – P. 1493-1499
339. Sequence-specific DNA cleavage by Fe²⁺-mediated fenton reactions has possible biological implications / E.S. Henle [et al.] // *J. Biol. Chem.* - 1999. – Vol. 274. – P. 962–971
340. Shefner J.M. Strength Testing in Motor Neuron Diseases / J.M. Shefner // *Neurotherapeutics.* – 2017. – Vol. 14, № 1. – P. 154-160
341. Shepherd D. Citrate synthase from rat liver / D. Shepherd, P.B. Garland // *Methods in Enzymology.* – 1969. – P. 11–16
342. Single-molecule visualization of ROS-induced DNA damage in large DNA molecules / J. Lee [et al.] // *Analyst.* - 2016. – Vol. 141. – P. 847–852
343. Somatic mitochondrial DNA mutations in single neurons and glia / I. Cantuti-Castelvetri [et al.] // *Neurobiol Aging.* - 2005. – Vol. 26. – P. 1343–1355
344. Statistical analysis of real-time PCR data / J.S. Yuan [et al.] // *BMC Bioinf.* - 2006. – Vol. 7. – P. 85
345. Sulforaphane attenuates gentamicin-induced nephrotoxicity: role of mitochondrial protection / M. Negrette-Guzmán [et al.] // *Evid Based Complement Alternat Med.* – 2013. – Vol. 2013. – P. 135314

346. Sulforaphane induces differential modulation of mitochondrial biogenesis and dynamics in normal cells and tumor cells / M. Negrette-Guzmán [et al.] // *Food Chem Toxicol.* – 2017. – Vol. 100. – P. 90-102
347. Suppression of mitochondrial respiration through recruitment of p160 myb binding protein to PGC-1alpha: modulation by p38 MAPK / M. Fan [et al.] // *Genes Dev.* - 2004. – Vol. 18. – P. 278–289
348. Suppression of reactive oxygen species and neurodegeneration by the PGC-1 transcriptional coactivators / J. St-Pierre [et al.] // *Cell.* – 2006. – Vol. 127, № 2. – P. 397-408
349. Sykiotis G.P. Keap1/Nrf2 signaling regulates oxidative stress tolerance and lifespan in *Drosophila* / G.P. Sykiotis, D. Bohmann // *Dev Cell.* – 2008. – Vol. 14. – P. 76-85
350. Tachikawa M. Transport characteristics of guanidino compounds at the blood-brain barrier and blood-cerebrospinal fluid barrier: relevance to neural disorders / M. Tachikawa, K. Hosoya // *Fluids Barriers CNS.* – 2011. – Vol. 8, № 1. – P. 13
351. Targeting mitochondrial dysfunction in CNS injury using Methylene Blue; still a magic bullet? / H.J. Vekaria [et al.] // *Neurochem Int.* – 2017. - Vol. 109. – P. 117-125
352. Tengan C.H Nitric oxide in skeletal muscle: role on mitochondrial biogenesis and function / C.H. Tengan, G.S. Rodrigues, R.O. Godinho // *Int J Mol Sci.* – 2012. – Vol. 13. – P. 17160-17184
353. The Anti-Aging Effect of Erythropoietin via the ERK/Nrf2-ARE Pathway in Aging Rats / H. Wu [et al.] // *J Mol Neurosci.* – 2017. – Vol. 61. – P. 449-458
354. The brain metabolic enhancer methylene blue improves discrimination learning in rats / K.M. Wrubel [et al.] // *Pharmacol Biochem Behav.* – 2007. – Vol. 86, № 4. – P. 712-717
355. The cAMP phosphodiesterase Prune localizes to the mitochondrial matrix and promotes mtDNA replication by stabilizing TFAM / F. Zhang [et al.] // *EMBO Rep.* - 2015b. – Vol. 16. – P. 520-527

356. The crosstalk between Nrf2 and AMPK signal pathways is important for the anti-inflammatory effect of berberine in LPS-stimulated macrophages and endotoxin-shocked mice / C. Mo [et al.] // *Antioxid Redox Signal.* – 2014. – Vol. 20. – P. 574-588
357. The effect of ascorbic acid on the pharmacokinetics of levodopa in elderly patients with Parkinson disease / H. Nagayama [et al.] // *Clin Neuropharmacol.* – 2004. – Vol. 27, № 6. – P. 270-273
358. The garlic constituent diallyl trisulfide increases the lifespan of *C. elegans* via *skn-1* activation / A.A. Powolny [et al.] // *Exp Gerontol.* – 2011. – Vol. 46. – P. 441-452
359. The NFE2L2 rs35652124 polymorphism and the risk of Parkinson's disease: a systematic review and meta-analysis / M. Zhu [et al.] // *Neuroreport.* – 2016. – Vol. 27. – P. 901–905
360. The NRF2 pathway as potential biomarker for dimethyl fumarate treatment in multiple sclerosis / A. Hammer [et al.] // *Ann Clin Transl Neurol.* – 2018. – Vol. 5, № 6. – P. 668-676
361. The phosphocreatine circuit: Molecular and cellular physiology of creatine kinases, sensitivity to free radicals and enhancement by creatine supplementation / T. Wallimann [et al.] // *Molecular Systems Bioenergetics.* – 2007. – P. 195-264
362. The resveratrol derivatives trans-3,5-dimethoxy-4-fluoro-4'-hydroxystilbene and trans-2,4',5-trihydroxystilbene decrease oxidative stress and prolong lifespan in *Caenorhabditis elegans* / N. Fischer [et al.] // *J Pharm Pharmacol.* – 2017. – Vol. 69. – P. 73-81
363. The rotenone-induced rat model of Parkinson's disease: behavioral and electrophysiological findings / C. von Wrangel [et al.] // *Behav Brain Res.* – 2015. – Vol. 279. – P. 52-61
364. The secret life of NAD⁺: an old metabolite controlling new metabolic signaling pathways / R.H. Houtkooper [et al.] // *Endocr Rev.* – 2010. – Vol. 31. – P. 194–223

365. The ubiquitin kinase PINK1 recruits autophagy receptors to induce mitophagy / M. Lazarou [et al.] // *Nature*. – 2015. – Vol. 524, № 7565. – P. 309-314
366. Therapeutic advantage of pro-electrophilic drugs to activate the Nrf2/ARE pathway in Alzheimer's disease models / S.A. Lipton [et al.] // *Cell Death Dis.* – 2016. – Vol. 7, № 12. – P. e2499
367. Thiamine deficiency increases β -secretase activity and accumulation of β -amyloid peptides / Q. Zhang [et al.] // *Neurobiol Aging*. – 2011. - Vol. 32, № 1. – P. 42-53
368. Thinning of capillary walls and declining numbers of endothelial mitochondria in the cerebral cortex of the aging primate, *Macaca nemestrina* / E.M. Burns [et al.] // *J Gerontol.* – 1979. – Vol. 34, № 5. – P. 642-650
369. Thomas R.R. Impaired complex-I mitochondrial biogenesis in Parkinson disease frontal cortex / R.R. Thomas, P.M. Keeney, J.P. Bennett // *J Parkinsons Dis.* – 2012. – Vol. 2, № 1. – P. 67-76
370. Tiron as a spin-trap for superoxide radicals produced by the respiratory chain of submitochondrial particles / I.V. Grigolava [et al.] // *Biokhimiia*. – 1980. – Vol. 45, № 1. – P. 75–82
371. Tissenbaum H.A. Increased dosage of a Sir-2 gene extends lifespan in *Caenorhabditis elegans* / H.A. Tissenbaum, L. Guarente // *Nature*. – 2001. – Vol. 410. – P. 227–230
372. Tomatidine enhances lifespan and healthspan in *C. elegans* through mitophagy induction via the SKN-1/Nrf2 pathway / E.F. Fang [et al.] // *Sci Rep.* – 2017. – Vol. 7. – P. 46208
373. Toxicity and carcinogenicity studies of methylene blue trihydrate in F344N rats and B6C3F1 mice / S.S. Auerbach [et al.] // *Food Chem Toxicol.* – 2010. – Vol. 48, № 1. – P. 169-177

374. Transcriptional co-activator PGC-1 alpha drives the formation of slow-twitch muscle fibres / J. Lin [et al.] // *Nature*. – 2002. – Vol. 418. – P. 797–801
375. Treadmill exercise activates Nrf2 antioxidant system to protect the nigrostriatal dopaminergic neurons from MPP+ toxicity / Y.H. Tsou [et al.] // *Exp Neurol*. – 2015. – Vol. 263. – P. 50-62
376. Treatment of psoriasis with fumaric acid esters (Fumaderm) / U. Mrowietz [et al.] // *J Dtsch Dermatol Ges*. – 2007. – Vol. 5, № 8. – P. 716-717
377. Triterpenoid CDDO-methylamide improves memory and decreases amyloid plaques in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease / M. Dumont [et al.] // *J Neurochem*. – 2009. – Vol. 109, № 2. – P. 502-512
378. Triterpenoids CDDO-ethyl amide and CDDO-trifluoroethyl amide improve the behavioral phenotype and brain pathology in a transgenic mouse model of Huntington's disease / C. Stack [et al.] // *Free Radic Biol Med*. – 2010. – Vol. 49. - P. 147–158
379. Uittenbogaard M. Mitochondrial biogenesis: a therapeutic target for neurodevelopmental disorders and neurodegenerative diseases / M. Uittenbogaard, A. Chiaramello // *Curr Pharm Des*. – 2014. - Vol. 20, № 35. – P. 5574-5593
380. Urate as a predictor of the rate of clinical decline in Parkinson disease / A. Ascherio [et al.] // *Arch Neurol*. – 2009. – Vol. 66, № 12. – P. 1460-1468
381. Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant- and radical-caused aging and cancer: a hypothesis / B.N. Ames [et al.] // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 1981. – Vol. 78, № 11. - P. 6858-6862
382. Villena J.A. New insights into PGC-1 coactivators: redefining their role in the regulation of mitochondrial function and beyond / J.A.Villena // *FEBS J*. – 2015. – Vol. 282, № 4. – P. 647-672
383. Virbasius J.V. Activation of the human mitochondrial transcription factor A gene by nuclear respiratory factors: a potential regulatory link between nuclear and mitochondrial gene expression in organelle biogenesis / J.V.

- Virbasius, R.C. Scarpulla // Proc Natl Acad Sci U S A. – 1994. – Vol. 91, № 4. – P. 1309-1313
384. Visarius T.M. Stimulation of respiration by methylene blue in rat liver mitochondria / T.M. Visarius, J.W. Stucki, B.H.Lauterburg // FEBS Lett. – 1997. – Vol. 412, № 1. – P. 157-160
385. Vitamin D Promotes Protein Homeostasis and Longevity via the Stress Response Pathway Genes *skn-1*, *ire-1*, and *xbp-1* / K.A. Mark [et al.] // Cell Rep. – 2016. – Vol. 17. – P. 1227-1237
386. Wallace S.S. Biological consequences of free radical-damaged DNA bases / S.S. Wallace // Free Radic. Biol. Med. – 2002. - Vol. 33. – P. 1–14
387. Wallimann T. Creatine kinase in non-muscle tissues and cells / T. Wallimann, W. Hemmer // Mol Cell Biochem. – 1994. – Vol. 133-134. – P. 193-220
388. Wasserman W.W. Comprehensive analysis of proteins which interact with the antioxidant responsive element: correlation of ARE-BP-1 with the chemoprotective induction response / W.W. Wasserman, W.E. Fahl // Arch Biochem Biophys. – 1997. – Vol. 344, № 2. – P. 387-396
389. Wyss M. Health implications of creatine: can oral creatine supplementation protect against neurological and atherosclerotic disease? / M. Wyss, A. Schulze // Neuroscience. – 2002. – Vol. 112, № 2. - 243-260
390. X-linked creatine-transporter gene (SLC6A8) defect: a new creatine-deficiency syndrome / G.S. Salomons [et al.] // Am J Hum Genet. – 2001. – Vol. 68, № 6. – P. 1497-1500
391. Yasueda A. Efficacy and interaction of antioxidant supplements as adjuvant therapy in cancer treatment: a systematic review / A. Yasueda, H. Urushima, T. Ito // Integr Cancer Ther. - 2016. – Vol. 15, № 1. – P. 17–39
392. Zakaria A. Methylene Blue Improves Brain Mitochondrial ABAD Functions and Decreases A β in a Neuroinflammatory Alzheimer's Disease Mouse Model / A. Zakaria, N. Hamdi, R.M. Abdel-Kader // Mol Neurobiol. – 2016. – Vol. 53, № 2. – P. 1220-1228

393. Zhu J. After the banquet: mitochondrial biogenesis, mitophagy, and cell survival / J. Zhu, K.Z. Wang, C.T. Chu // *Autophagy*. – 2013. – Vol. 9, № 11. – P. 1663-1676
394. Zoccarato F. Respiration-dependent removal of exogenous H₂O₂ in brain mitochondria: inhibition by Ca²⁺ / F. Zoccarato, L. Cavallini, A. Alexandre // *J. Biol. Chem.* - 2004. – Vol. 279. – P. 4166–4174